



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 176**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04746441 .7**

96 Fecha de presentación : **25.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1650293**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Célula magnética y método de uso de la misma.**

30 Prioridad: **30.06.2003 JP 2003-188626**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.05.2011**

73 Titular/es: **EISAI R&D MANAGEMENT Co., Ltd.**  
**6-10, Koishikawa 4-chome**  
**Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, JP**  
**Mitsuo Ochi**

72 Inventor/es: **Ochi, Mitsuo**

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 358 176 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).

**DESCRIPCION**

Célula magnética y método de uso de la misma.

**CAMPO TÉCNICO**

- 5 La presente invención se refiere a una célula magnética que es útil en medicina, en particular en medicina regenerativa.

**TÉCNICA ANTECEDENTE**

- 10 En general, un fármaco se dispersa por todo el cuerpo después de la administración, y sería deseable que un anticanceroso y otros fármacos con fuertes efectos secundarios permanecieran a altas concentraciones en el sitio de acción sin dispersarse a otros lugares. Se han realizado diversos esfuerzos para concentrar el fármaco localmente. Un método que se ha probado es usar una partícula magnética para concentrar el fármaco localmente por medio de una fuerza magnética ejercida desde el exterior del cuerpo. Por ejemplo, es posible incluir un material magnético junto con el fármaco en un liposoma que, a continuación, es administrado y guiado hasta una ubicación por la fuerza magnética, aumentando de este modo la concentración local del fármaco (véase por ejemplo el documento Journal of the Japanese Oral Surgery Society, febrero de 1997, págs. 55-61).

- 15 Por otro lado, también se conoce una técnica para modificar con un anticuerpo la superficie de una perla magnética compuesta por un polímero y un material ferrimagnético tal como magnetita y similares, y usar una reacción de antígeno-anticuerpo para aislar y producir una célula, y esta técnica se ha aplicado al tipado de HLA, selección de células madre hematopoyéticas y similares (véase por ejemplo el documento Biomaterial, febrero de 2003, págs. 113-119).

- 20 El documento WO 00/71169 A2 describe un método de marcado de células vivas para hacerlas detectables en obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI).

El documento Elmi M. M et al., a simple method for preparation of inmuno-magnetic liposomes, International Journal of pharmaceutics 215 (2001) 45-50, describe un método para preparar liposomas inmuno-magnéticos.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

- 25 Problemas a resolver por la invención

Sin embargo, no existen ejemplos de unión de la partícula magnética a una célula mensenchimatosas, condrocito u otras células que podrían usarse en medicina regenerativa. Por lo tanto, muchas preguntas siguen sin resolver, tales como si la célula que tiene la partícula magnética unida a ella es retenida o no localmente por la fuerza magnética externa después de la administración y si la célula muestra o no actividad intrínseca.

- 30 Medios para resolver los problemas

Los inventores perfeccionaron la presente invención como resultado de una exhaustiva investigación centrada en las funciones de la superficie celular. Es decir, en la presente invención, se proporciona una célula magnética de acuerdo con la reivindicación 1. La composición de esta célula le permite moverse a una ubicación deseada usando el magnetismo de la partícula magnética.

- 35 En la célula magnética de acuerdo con la presente invención, la superficie está unida mediante una secuencia de aminoácidos específica de la partícula magnética. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos específica incluye un péptido (RGDS) que comprende los cuatro aminoácidos, arginina-glicina-ácido aspártico-serina.

En la célula magnética de acuerdo con la presente invención, la partícula magnética incluye al menos un material magnético.

- 40 En un aspecto preferido de la célula magnética de acuerdo con la presente invención, la partícula magnética también incluye un fármaco.

**Efecto ventajoso de la invención**

- 45 Dado que, con la célula magnética de acuerdo con la presente invención, la célula magnética puede introducirse en el cuerpo y mantenerse durante un largo periodo en un sitio afectado por una enfermedad mediante una acción de un campo magnético desde el exterior del cuerpo, las funciones intrínsecas de la célula pueden expresarse eficazmente. Además, el uso de la célula magnética de acuerdo con la presente invención permite la aplicación a medicina regenerativa incluyendo formación de cartílago y a fármacos contra el cáncer y otros sistemas de administración de fármacos de acuerdo con las necesidades de terapia.

**MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION**

- 50 (Primera realización) (no forma parte de la invención)

- 55 La célula magnética se basa en el uso de un componente adhesivo sobre una superficie de una célula. La figura 1 muestra una vista esquemática de una célula magnética 10 de la primera realización. Esta célula magnética 10 comprende una partícula magnética 60, que está unida mediante un enlazador 50 a glucoproteína 40 expresada en la superficie de la célula 20 que tiene el núcleo 30. Los ejemplos de la glucoproteína 40 usados incluyen, aunque sin limitación, CD44 o HLA.

Un ejemplo de la partícula magnética 60 usada incluye un liposoma que comprende un material magnético 70. Este liposoma también puede contener un fármaco 80, que puede controlar la actividad celular, y el material magnético y el fármaco también pueden encapsularse usando otro tipo de cápsula

5 En este caso, el liposoma es una bicapa lipídica esférica que tiene un interior acuoso. Cuando se forma el liposoma, una molécula presente en una solución acuosa se incorpora al interior acuoso. El contenido incorporado al liposoma está protegido de un micro-entorno externo y es transportado eficazmente al interior del citoplasma, dado que el liposoma se fusiona con la membrana celular.

10 Aquellos conocidos habitualmente como liposoma pueden usarse como el liposoma usado, particularmente aquellos liposomas que pueden usarse sin problemas para ingestión oral e inyección. Dicho liposoma puede usarse apropiadamente, o puede diseñarse de nuevo y formarse un liposoma usando los materiales conocidos. Más específicamente, es deseable usar un liposoma que comprende fosfolípidos, éter glicerofosfolípidos, esfingofosfolípidos, glicero glucolípidos y esfingoglucolípidos como principales componentes estructurales de la membrana del liposoma, y que también comprende esterol, tocoferol y similares como componente lipídico que estabiliza la membrana del liposoma.

15 Pueden usarse fosfolípidos conocidos habitualmente como los fosfolípidos mencionados anteriormente, incluyendo fosfolípidos naturales, fosfolípidos sintéticos y similares. Los fosfolípidos que pueden usarse favorablemente incluyen (1) fosfatidilcolina, (2) fosfatidiletanolamina, (3) fosfatidilglicerol, (4) fosfatidilserina, (5) ácido fosfático, (6) fosfatidilinositol y similares.

20 Los ejemplos de la fosfatidilcolina (1) mencionada anteriormente incluyen lecitina de yema de huevo, lecitina de soja, lecitina de yema de huevo hidrogenada, lecitina de soja hidrogenada, fosfatidilcolina derivada de soja, fosfatidilcolina hidrogenada derivada de soja y otras fosfatidilcolinas naturales; y sistemas sintéticos tales como fosfatidilcolina que comprende un ácido carboxílico saturado o insaturado con de 7 a 22 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen dimiristoil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina y dioleoil fosfatidilcolina. Los restos de ácidos grasos de las mencionadas anteriormente pueden ser octanoilo, nonanoilo, decanoilo, undecanoilo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, oleilo, estearilo, palmitoleilo, oleilo, linoleilo, linolenilo, araquidonilo u otros grupos. Además, las partes del resto de ácido graso que se unen a los sitios 1- y 2- de glicerina pueden ser iguales o diferentes.

25 Los ejemplos de la fosfatidiletanolamina (2) mencionada anteriormente incluyen fosfatidiletanolamina derivada de soja, fosfatidiletanolamina hidrogenada derivada de soja y otras fosfatidiletanolaminas naturales; y sistemas sintéticos tales como fosfatidiletanolamina que comprende un ácido carboxílico saturado o insaturado con de 7 a 22 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen dimiristoil fosfatidiletanolamina, dipalmitoil fosfatidiletanolamina y dioleoil fosfatidiletanolamina. Los restos de ácidos grasos pueden ser grupos tales como los mostrados en (1) anteriormente.

30 Los ejemplos del fosfatidilglicerol (3) mencionado anteriormente incluyen sistemas sintéticos tales como fosfatidilglicerol que comprende un ácido carboxílico saturado o insaturado con de 7 a 22 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen dimiristoil fosfatidilglicerol, dipalmitoil fosfatidilglicerol y dioleoil fosfatidilglicerol. Los restos de ácidos grasos constituyentes pueden ser grupos tales como los mostrados en (1) anteriormente.

35 Los ejemplos de la fosfatidilserina (4) mencionada anteriormente incluyen fosfatidilserina derivada de soja, fosfatidilserina hidrogenada derivada de soja y otros sistemas naturales; y sistemas sintéticos tales como fosfatidilserina que comprende un ácido carboxílico saturado o insaturado con de 7 a 22 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen dimiristoil fosfatidilserina, dipalmitoil fosfatidilserina y dioleoil fosfatidilserina. Los restos de ácidos grasos constituyentes pueden ser grupos tales como los mostrados en (1) anteriormente.

40 Los ejemplos de los ácidos fosfáticos (5) incluyen ácidos sintéticos tales como ácidos fosfáticos que comprenden un ácido carboxílico saturado o insaturado con de 7 a 22 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen ácido dimiristoil fosfático, ácido dipalmitoil fosfático, ácido dioleoil fosfático y similares. Los restos de ácidos grasos constituyentes pueden ser grupos tales como los mostrados en (1) anteriormente. Además, los ejemplos del fosfatidilinositol (6) mencionado anteriormente incluyen fosfatidilinositol derivado de soja, fosfatidilinositol hidrogenado derivado de soja y otros sistemas naturales, y también puede usarse fosfatidilinositol sintético. Los restos de ácidos grasos constituyentes pueden ser grupos tales como los mostrados en (1) anteriormente. También pueden usarse Glicero fosfolípidos, esfingofosfolípidos, glicero glucolípidos, esfingoglucolípidos y similares como un constituyente de membrana del liposoma usado en la presente invención. En la presente invención, pueden usarse esteroides y tocoferoles como componente lipídico para estabilizar la membrana del liposoma. Los esteroides mencionados anteriormente pueden ser los conocidos habitualmente como esteroides, y los ejemplos incluyen colesterol, sitosterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol. El colesterol es particularmente deseable desde el punto de vista de disponibilidad. Los tocoferoles mencionados anteriormente pueden ser aquellos conocidos habitualmente como tocoferoles y, por ejemplo, el tocoferol comercial es deseable desde el punto de vista de disponibilidad y similares.

45 El material de la cápsula usado puede ser una resina de intercambio iónico, cerámica cristalina, un vidrio o látex biocompatible. También puede usarse como microesfera junto con diversos tensioactivos. Además, puede usarse una nanoesfera y otro lípido, polímero o un material proteico como el material de la cápsula mencionado anteriormente. El diámetro de la cápsula no está particularmente limitado pero es preferentemente de decenas a cientos de nanómetros. La cápsula de fármaco encapsula al menos un material magnético y puede encapsular o no encapsular a un fármaco, pero es deseable desde el punto de vista del control celular que el fármaco esté encapsulado.

60 La cápsula de fármaco también puede estar provista de un medio de control de la liberación del fármaco para controlar la liberación del fármaco, y los ejemplos de medio de control de la liberación del fármaco incluyen un polímero, una molécula sensible a la temperatura y una sustancia sensible a ultrasonidos y/o al magnetismo. Los

ejemplos específicos incluyen el compuesto polimérico (polímero de ácido poliacrílico) con un punto de enturbiamiento descrito en la Publicación de Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N° H5-228358 y las sustancias sensibles a ultrasonido (derivado de porfirina y derivado de xanteno, etc.) descritas en la Publicación de Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N° 11-92360.

- 5 Siempre que el material magnético sea magnético, no existen límites particulares respecto al material magnético usado, que puede ser paramagnético, super-paramagnético o ferromagnético y el término "ferromagnético" puede incluir ferromagnético o ferrimagnético. Los ejemplos específicos del material magnético incluyen magnetita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y maghemita así como partículas de compuestos de hierro, cobalto, níquel y otros elementos ferromagnéticos. De estos materiales ferromagnéticos, la magnetita y la maghemita son deseables debido a que no muestran toxicidad para los organismos vivos y son estables. La magnetita es particularmente deseable.

El material magnético mencionado anteriormente no solamente incluye la partícula de compuesto ferromagnético mencionado anteriormente por sí misma sino también la partícula magnética que está incluida en celulosa, almidón, dextrano, agarosa, metacrilato, estireno o similares, y la partícula magnética biosintetizada por una bacteria magnética en la que la magnetita está cubierta por fosfolípidos.

- 15 Se explican algunos métodos mediante los cuales la superficie de la célula mencionada anteriormente contiene a la partícula magnética. Dichos métodos incluyen un método en el que un grupo funcional reactivo de la superficie celular se une a un grupo funcional reactivo de la partícula magnética mediante enlace covalente, y un método en el que la unión se realiza por medio de un enlazador y similares. Los ejemplos del enlazador usado en la presente invención incluyen un anticuerpo o compuesto (en lo sucesivo en este documento, "separadores bifuncionales") que tiene un grupo carboxilo, un grupo amino u otros grupos funcionales reactivos en ambos extremos. Los ejemplos preferidos del método de unión del enlazador a bacterias con célula magnética incluyen un método de unir el grupo funcional reactivo en la superficie celular mediante el separador bifuncional a la partícula magnética cubierta con una película fosfolipídica que se obtiene machacando las bacterias magnéticas, y un método de unir HLA, CD44 u otras moléculas adhesivas a la superficie celular mediante una reacción de antígeno-anticuerpo a un anticuerpo usado como un enlazador que está unido mediante un enlace amida a la partícula magnética cuya superficie ha sido modificada con el grupo carboxilo.

- En la célula magnética usada, la partícula magnética puede estar incluida dentro de la célula, o puede estar unida a la superficie celular, o puede estar unida a la superficie celular mediante un enlazador. Una partícula magnética puede estar incluida dentro de la célula, por ejemplo, mediante un método que usa una "pistola de partículas" como se describe en la Publicación de Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N° H6-133784.

- En la primera realización, el fármaco 80 que está contenido en la partícula magnética mencionada anteriormente 60 puede ser una sustancia bioactiva tal como una citoquina u otra sustancia que controla el sistema de transmisión de señales celulares, aunque no está limitada a éstas. Los ejemplos específicos de citoquinas incluyen interferones ( $\text{IFN-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\beta$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  y similares), interleuquinas ( $\text{IL-1}$  a  $\text{IL18}$  y similares), linfoquinas, factores de necrosis tumoral ( $\text{TNF}\alpha$  y similares) factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factores estimuladores de colonias de macrófagos (M-CSF, CSF-1), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina, trombopoyetina, factor de células madre hematopoyéticas (SCF), factor de actividad quimiotáctica de monocitos (MCAF), factores de crecimiento transformantes ( $\text{TGF-}\alpha$ ,  $\text{TGF-}\beta$ ), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y similares. En particular, se prefieren interferones, interleuquinas, factores de necrosis tumoral, eritropoyetina, trombopoyetina, factores de crecimiento transformantes, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento nervioso.

- El fármaco mencionado anteriormente 80 puede ser un fármaco para una enfermedad a prevenir y/o tratar en el sitio afectado por la enfermedad. Aunque sin limitarse a esto, los ejemplos específicos de fármacos incluyen un anticancerígeno tal como clorhidrato trihidrato de irinotecano, mitomicina C, 5-fluorouracilo, cisplatino, clorhidrato de gemcitabina, doxorubicina y taxol. Otros ejemplos incluyen donepazil y otros fármacos contra el Alzheimer. La célula magnética puede usarse como un sistema de suministro de fármacos al incorporar este fármaco 80 en la parte del liposoma de la célula magnética.

- El fármaco mencionado anteriormente 80 puede formar una sal. Los ejemplos favorables de esta sal incluyen sales de ácidos inorgánicos, sales de ácidos orgánicos, sales de bases inorgánicas, sales de bases orgánicas, y sales con aminoácidos ácidos o básicos. De éstas, se prefieren las sales farmacológicamente aceptables. Los ejemplos favorables de sales con ácidos inorgánicos incluyen sales con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, mientras que los ejemplos favorables de sales con ácidos orgánicos incluyen sales con ácido acético, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido esteárico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y similares. Los ejemplos favorables de sales con bases inorgánicas incluyen sales de sodio, sales de potasio y otras sales de metales alcalinos, sales de calcio, sales de magnesio y otras sales de metales alcalinotérreos, y sales de aluminio, sales de amonio y similares. Los ejemplos favorables de sales con bases orgánicas incluyen sales con dietilamina, dietanolamina, meglumina, N,N'-dibenciletilendiamina y similares.

- 60 Cuando el fármaco mencionado anteriormente 80 se administra al paciente como fármaco preventivo o terapéutico para una enfermedad asociada, no existen límites respecto a la vía de administración, dosificación o número de administraciones, que varían dependiendo de los síntomas del paciente, del tipo y la gravedad de la enfermedad, de la edad, de las funciones cardíaca, hepática y renal y similares. Por ejemplo, En el caso de terapia contra el cáncer en un ser humano, pueden administrarse de 0,01 mg a 1000 mg o preferentemente de 0,1 mg a 1000 mg o más preferentemente de 0,1 mg a 100 mg diariamente a un adulto en el caso de administración oral, y de 0,01 mg a 500 mg o preferentemente de 0,1 mg a 500 mg o más preferentemente de 0,1 mg a 100 mg diariamente a un adulto en el caso de administración intravenosa, divididos en de 1 a 5 administraciones al día, dependiendo de los síntomas.

Una composición de fármaco que comprende el fármaco mencionado anteriormente 80 también puede introducirse en la célula magnética, y la composición mencionada anteriormente puede fabricarse mediante un método conocido usando excipientes, lubricantes, aglutinantes, disgregantes, estabilizantes, aromatizantes, diluyentes y otros aditivos. Los ejemplos específicos de excipientes incluyen excipientes orgánicos tales como lactosa, sacarosa, glucosa, almidón de maíz, almidón de patata, alfa dextrina de almidón y otros derivados de almidón, celulosa cristalina y otros derivados de celulosa, goma arábiga, dextrina, y pululano; y excipientes inorgánicos tales como anhídrido silícico ligero, silicato de aluminio sintético, silicato de calcio, metasilicato aluminato de magnesio y otros derivados de silicato, hidrogenofosfato de calcio y otros derivados de fosfato, carbonato de calcio y otros carbonatos, sulfato de calcio y otros sulfatos y similares. Los ejemplos específicos de lubricantes incluyen ácido esteárico, sales metálicas de ácido esteárico tales como estearato de calcio y estearato de magnesio, talco, sílice coloidal, ceras tales como cera de colmena y cera espermaceti, ácido bórico, ácido adípico, sulfatos tales como sulfato de sodio, glicol, ácido fumárico, benzoato de sodio, DL-leucina, sales de sodio de ácidos grasos, lauril sulfatos tales como lauril sulfato sódico y lauril sulfato de magnesio, ácidos silícicos tales como anhídrido silícico e hidrato silícico, y los derivados de almidón mencionados anteriormente. Los ejemplos específicos de aglutinantes incluyen hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol, y compuestos tales como los excipientes mencionados anteriormente. Los ejemplos específicos de disgregantes incluyen derivados de celulosa tales como lauril sulfato sódico y lauril sulfato de magnesio, ácidos silícicos tales como anhídrido silícico e hidrato silícico, y los derivados de almidón mencionados anteriormente. Los ejemplos específicos de aglutinantes incluyen hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol, y compuestos tales como los excipientes mencionados anteriormente. Los ejemplos específicos de estabilizantes incluyen ésteres de ácido paraoxibenzoico tales como metilparabeno y propilparabeno, alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico y alcohol polietílico, cloruro de benzalconio, fenoles tales como fenol y cresol, timerosal, ácido dihidroacético, y ácido sórbico. Los ejemplos específicos de aromatizantes incluyen edulcorantes, aromas ácidos, aromáticos y similares que se usan habitualmente en preparaciones.

Aunque sin limitarse a esto, la célula usada en la presente invención es preferentemente un linfocito, una célula madre mesenquimatosas, un condrocito cultivado o similares.

(Segunda realización) (de acuerdo con la invención)

La figura 2 muestra una vista esquemática de una célula magnética de acuerdo con la presente invención. La presente invención usa integrina 110 presente en la superficie celular y el péptido 120, que tiene actividad adhesiva con respecto a integrina. Aunque sin limitarse a esto, el péptido mencionado anteriormente puede ser RGDS (un péptido constituido por los cuatro aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico-serina, peso molecular 433,42).

En la presente invención, la célula magnética 200 que tiene una partícula magnética en la superficie se proporciona mediante el uso de la perla magnética activada 130, que está modificada con la secuencia de aminoácidos de RGDS en la superficie de la perla magnética.

Esta célula magnética puede prepararse de la siguiente manera. En primer lugar, una perla magnética cuya superficie ha sido modificada de antemano con un grupo carboxilo se activa por medio de un reactivo. El reactivo para la activación no está particularmente limitado siempre que pueda activar el grupo carboxilo, pero se prefiere una carbodiimida. En segundo lugar, el grupo carboxilo activado en la superficie de la perla magnética y el grupo amino del péptido se hacen reaccionar para formar un enlace amida, que introduce al péptido en la superficie de la perla magnética.

En la presente invención, la cantidad del péptido que recubre a la perla puede ser de 10 ng a 20 µg de anticuerpo o péptido que forma un ligando por el equivalente a 3 mg de perla magnética, y es preferentemente de 15 ng a 15 µg o más preferentemente de 20 ng a 10 µg. Es decir, en términos de peso unitario de perla magnética, de 3 ng a 6,6 µg pueden recubrir por 1 mg de perla magnética. Si se recubre con demasiado péptido la perla magnética, las células magnéticas finales terminan adhiriéndose entre sí, impidiendo el movimiento hasta el sitio afectado por la enfermedad que es la diana. Si se recubre con demasiado poco, no pueden conseguirse las propiedades de la propia célula magnética.

A continuación, la perla magnética con el péptido introducido y la molécula de adhesión a la superficie de la célula diana se hacen reaccionar para preparar la perla magnética de acuerdo con la presente invención. Para los fines de la reacción, la cantidad de perla magnética con péptido introducido depende del porcentaje de introducción de péptido, pero es preferentemente de 0,1 µl a 20 µl o más preferentemente de 0,2 µl a 18 µl o aún más preferentemente de 0,5 µl a 15 µl por  $2 \times 10^5$  de las células diana mencionadas anteriormente. Si la cantidad de perla magnética con péptido introducido es de 0,1 µl o menos, la propia célula magnética no realizará su función, mientras que si la cantidad de perla magnética con péptido introducido es de 20 µl o más, las células magnéticas se adherirán entre sí, impidiendo el movimiento al sitio afectado por la enfermedad que es la diana.

Aunque sin limitarse a esto, la solución de reacción para hacer reaccionar a la perla magnética con el péptido introducido con la molécula de adhesión en la superficie celular puede ser BSA (albúmina de suero bovino) solución salina tamponada con fosfato (en lo sucesivo en este documento, "BSA/PBS"), y se prefiere una solución de BSA/PBS con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) añadido, BSA al 0,5%, EDTA 4,4 µM en PBS (-) (concentración de EDTA de 4,4 µM a 2 mM).

En la segunda realización, un experto en la materia podría entender fácilmente que el material magnético y el fármaco en la primera realización pueden usarse de la misma manera.

A continuación, se explicará el método de uso de la célula magnética de acuerdo con la presente invención. La célula magnética preparada como se ha descrito anteriormente puede usarse en terapia como se describe a continuación si se cultiva en diversas células. El fluido de cultivo y la temperatura en el cultivo pueden seleccionarse según sea apropiado. El fluido de cultivo depende de las células usadas, pero por ejemplo un fluido de cultivo a base de DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco) es adecuado en el caso de condrocitos cultivados.

5 La célula magnética de acuerdo con la presente invención puede usarse en terapia estando retenida durante un largo periodo en un sitio diana afectado por la enfermedad de acuerdo con el tipo de células. Por ejemplo, usando una célula madre mesenquimatosa mieloide, puede formarse tejido condroide en un sitio afectado por la enfermedad. Por consiguiente, es importante que la célula magnética de acuerdo con la presente invención sea retenida durante un largo periodo en el sitio diana afectado por la enfermedad.

10 La expresión "retenido durante un largo periodo en un sitio afectado por la enfermedad" usada en la presente invención significa que la célula magnética es retenida durante el tiempo suficiente para que se realicen sus funciones, y es deseable un periodo de 1 a 90 días o preferentemente de 1 a 80 días o más preferentemente de 1 a 50 días. El sitio de administración de la célula magnética de acuerdo con la presente invención puede ser un sitio con una lesión en el cuerpo o un sitio sometido a tratamiento, y los ejemplos incluyen cerebro, hueso, hígado, corazón y articulaciones. Los ejemplos específicos de enfermedades incluyen hemorragia cerebral, tumores malignos, daño de la médula espinal, defectos de cartílago, defectos musculares y daños al ligamento.

15 La administración de la célula magnética de acuerdo con la presente invención para la retención dentro del cuerpo puede ser mediante métodos quirúrgicos o mediante inyección. La administración quirúrgica significa administración abriendo un agujero en un hueso por ejemplo, mientras que inyección significa administración directa mediante inyección a un sitio afectado por la enfermedad o administración general mediante inyección intravenosa.

20 La expresión "campo magnético" usada en la presente invención significa preferentemente un campo 60 gauss (en lo sucesivo en este documento "G") o más con el fin de imantar a la partícula magnética, y se prefieren 70 G o más con el fin de retener a la partícula en una ubicación específica e impedir la dispersión en el cuerpo. El campo magnético puede aplicarse desde el exterior del cuerpo o puede aplicarse incrustando un imán en el cuerpo. En este caso, se prefiere un imán de neodimio desde el punto de vista de fuerza magnética del imán, estabilidad y potencia.

25 La figura 3 muestra una vista esquemática de terapia usando la célula magnética de acuerdo con la presente invención. Como se muestra en la figura 3, la célula magnética de acuerdo con la presente invención se introduce *in vivo* mediante inyección intra-articular. Dado que el imán permanente se dispone en una ubicación a la que debe moverse y colocarse la célula magnética, la célula magnética de acuerdo con la presente invención puede moverse a la ubicación deseada mediante la acción de la fuerza magnética de los imanes permanentes mencionados anteriormente. En la figura 3, la célula magnética puede moverse a un sitio defectuoso en cartílago articular y colocarse allí. Si una célula usada como la célula magnética de acuerdo con la presente invención es una célula madre mesenquimatosa mieloide, es posible formar tejido condroide en el sitio y reparar el sitio defectuoso mencionado anteriormente.

30 La reparación de cartílago, que es un foco de atención de la investigación de la medicina regenerativa, se explicó en la figura 3, pero si la ubicación del tratamiento es una célula cancerosa, es posible concentrar localmente un fármaco incluyendo un anticanceroso en la partícula magnética que compone la célula magnética.

35 La liberación de fármaco a partir de la célula magnética de acuerdo con la presente invención que se ha administrado *in vivo* está controlada por medio de enzimas u otra acción, o temperatura.

La expresión "controlar la actividad de la célula magnética" usada en la presente invención significa el control de la actividad celular tal como diferenciación o proliferación por medio de citoquinas u otros fármacos.

40 La célula magnética y la cápsula con el fármaco pueden administrarse simultáneamente o por separado y, por ejemplo, un modo sería un kit de fármaco en el que la célula magnética y la cápsula con el fármaco se incluyen como inyecciones en un único paquete.

La presente invención se explica con más detalle usando los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

(Preparación de la célula magnética 1) (Ejemplo de referencia)

#### 1. Activación de perlas magnéticas

45 El equivalente a 3 mg (60  $\mu$ l) se tomaron de una solución madre de ferrisphere 100C (fabricada por Japan Paint; 50 mg/ml) como perlas magnéticas, y se lavaron añadiendo NaOH 0,01 N y agitando a temperatura ambiente durante 10 minutos en un mezclador. Esta operación de lavado se repitió una vez, y el lavado se realizó de nuevo añadiendo agua desionizada y agitando a temperatura ambiente durante 5 minutos en el mezclador. Esta operación de lavado se repitió 3 veces. Para activar las perlas magnéticas, el exceso de agua se retiró y las perlas magnéticas se mezclaron minuciosamente en un tubo con 50  $\mu$ l cada uno de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (en lo sucesivo en este documento "EDC", fabricada por Sigma) y N-hidroxisuccinimida (en lo sucesivo en este documento "NHS", fabricada por Sigma) preparada previamente a 50 mg/ml a pH 5,0 con ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico 25 mM (en lo sucesivo en este documento "MES", fabricado por Sigma), y se agitó inclinando lentamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la reacción, el tubo se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Finalmente se lavó dos veces con MES 25 mM a pH 5,0, para un volumen de solución final (40  $\mu$ l).

#### 2. Fijación de anticuerpos después de la activación

60 Anticuerpos CD44 de rata (fabricados por Chemicon; 20  $\mu$ g) se disolvieron en MES 25 mM (60  $\mu$ l), se añadieron a las perlas activadas mencionadas anteriormente, y se agitaron inclinando lentamente a temperatura ambiente durante 3 horas para fijar los anticuerpos a las perlas activadas. Después de la reacción, el tubo se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Los anticuerpos que no habían reaccionado con las

perlas se retiraron añadiendo etanolamina 0,05 M en tampón fosfato seguida de agitación inclinando lentamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Las perlas fijadas se lavaron durante 5 minutos a 4°C en BSA al 0,5% en tampón fosfato (fabricado por Sigma). Esta operación de lavado se repitió cuatro veces. Esto se suspendió en BSA al 0,5% en tampón fosfato (1 ml) y se almacenó a 4°C.

### 5 3. Unión de perlas fijadas a la célula

Células madre mesenquimatosas mieloides de rata cultivadas se transfirieron de una placa a un tubo donde se mantuvieron durante 10 minutos a 4°C. Se realizó una reacción de antígeno-anticuerpo añadiendo las perlas preparadas mencionadas anteriormente (60  $\mu$ l) a la suspensión celular ( $1 \times 10^6$  células) seguido de agitación inclinando lentamente durante 1 hora a 4°C. Después de la reacción, el tubo se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Esto se resuspendió a continuación en BSA al 0,5% en tampón fosfato. Esta operación de lavado se realizó 4 veces. Los experimentos se realizaron en suspensión en tampón fosfato.

(Preparación de una célula magnética que tiene un liposoma magnético)

#### 1. Síntesis de N-[3-(2-piridiltio)propionil]fosfatidil etanolamina (en lo sucesivo en este documento "PDP-PE")

15 Se disolvieron éster N-succinimidílico del ácido 3-(2-piridiltio)propiónico (25 mg) y trietilamina (50 mol) en etanol anhidro (3 ml), y fosfatidil etanolamina (50 moles) se disolvió adicionalmente y se agitó. Después de 5 horas, el metanol se retiró a presión reducida, y el residuo se disolvió en cloroformo. Una columna de gel de sílice (10 ml) que se había activado durante una noche a 150°C se lavó en cloroformo. Después del lavado, el producto de reacción se hizo pasar a través de la columna y se lavó con cloroformo adicional (20 ml). 20 ml de cada una de las soluciones mezcladas a 40:1, 30:1, 25:1, 20:1 y 15:1 de cloroformo/metanol se hicieron pasar a través, seguida de 60 ml de una solución final mezclada a 10:1. Los pases de 15:1 y 10:1 se concentraron juntos a presión reducida.

#### 20 2. Preparación del liposoma

Fosfatidilcolina de huevo (10  $\mu$ moles), colesterol (10  $\mu$ moles) y PDP-PE (1  $\mu$ mol) se disolvieron en éter dietílico (3 ml), y el éter dietílico se vaporizó a presión reducida. Solución salina (0,9%, 1 ml) que contenía hierro magnético ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , 5 mg) y un fármaco a encapsular (TGF- $\beta$ , bFGF) y un tampón de ácido bórico/ácido cítrico (pH 6,0) se añadieron y se agitaron usando un mezclador de vórtice, y la película fina que se adhería al interior del matraz se retiraba completamente seguida de 50 minutos de tratamiento con ultrasonido con un Sonicador con Baño de ultrasonidos (el mismo que anteriormente). Usando un imán permanente de 0,45 T (el mismo que anteriormente), los liposomas magnéticos preparados y los materiales magnéticos no encapsulados se aislaron de la solución. Después de 15 minutos de centrifugado a 1000 x g (ppm), los liposomas magnéticos que constituían el sobrenadante se separaron de los materiales magnéticos no encapsulados que constituían el sedimento.

#### 30 3. Unión de liposomas con anticuerpos

Anticuerpos CD44 humanos (20  $\mu$ g) se disolvieron en MES 25 mM (60  $\mu$ l), y el liposoma preparado se añadió y se agitó inclinando lentamente durante 3 horas a temperatura ambiente para fijar los anticuerpos a los liposomas. Después de la reacción, esto se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Para retirar los anticuerpos que no reaccionaron, etanolamina (0,05 M) en tampón fosfato se añadió y se agitó inclinando lentamente durante 1 hora a temperatura ambiente.

40 Esto se lavó durante 5 minutos a 4°C en BSA al 0,5% en tampón fosfato. Esta operación de lavado se repitió 4 veces. Después de la precipitación y la estabilización con BSA al 0,5% en tampón fosfato (1 ml), esto se almacenó a 4°C.

#### 4. Unión de liposomas con anticuerpos fijados a las células

Células madre mesenquimatosas mieloides humanas cultivadas se transfirieron de una placa a un tubo, y se almacenaron durante 10 minutos a 4°C. Se realizó una reacción de antígeno-anticuerpo añadiendo los liposomas preparados a la suspensión celular ( $1 \times 10^6$ ) y agitando inclinando lentamente durante 1 hora a 4°C. Después de la reacción, el tubo se colocó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Esto se resuspendió en BSA al 0,5% en tampón fosfato. Esta operación de lavado se repitió 4 veces. Los experimentos se realizaron en suspensión en tampón fosfato o similares.

#### Ejemplo 1 (Ejemplo de referencia)

(Ensayo *in vitro*)

50 Células madre mesenquimatosas mieloides ( $4 \times 10^5$ ) unidas a partículas magnéticas que se habían preparado mediante los métodos anteriores se extendieron sobre una placa de Petri. En este ejemplo, un imán de neodimio de 4300 G redondo (diámetro 5 mm) se situó bajo el centro de la placa. En el ejemplo comparativo, no se usó ningún imán. Se añadieron TGF- $\beta$  y dexametasona a la placa. Después de 21 días de cultivo, éste se evaluó mediante tinción con azul de toluidina. En el ejemplo, el tejido condroide se había formado localmente centrado en una posición correspondiente a la del imán. En el ejemplo comparativo, el tejido condroide no se había formado localmente.

60 La figura 4 muestra imágenes microscópicas (50 aumentos) observadas 1 mes después de la inyección intra-articular de células magnéticas de acuerdo con la presente invención sin (A) y con (B) la presencia de un campo magnético externo aplicado durante aproximadamente 72 horas. En la figura 4(A), queda claro que las células magnéticas mostradas mediante puntos negros se observan en todas las células. Por otro lado, en la figura 4(B), las

células magnéticas mostradas mediante puntos negros se concentran en el lado izquierdo de la figura 4(B). La tinción de las figuras 4(A) y (B) era realmente mediante tinción con hematoxilina-eosina, y se muestra en gris.

5 A partir de estos resultados, se muestra que las células magnéticas se movieron localmente por medio de la acción de imanes. Además, se observó la reparación de cartílago hialino en células que habían sido expuestas a un campo magnético externo.

Ejemplo 2 (Ejemplo de referencia)

(Reparación de defecto óseo en articulaciones de rodilla de conejo)

10 Defectos óseos de 5 mm de ancho se introdujeron en dos lugares en articulaciones de rodilla de conejo de acuerdo con los métodos descritos en el documento Bioindustry 2002 Vol. 19 No. 6, págs. 47-53. Las células magnéticas (3,0 µg) obtenidas en el ejemplo se administraron a estos defectos mediante inyección. A continuación, un imán con un campo magnético de 700 G se dejó durante 9 semanas en la superficie correspondiente a los defectos. Mientras tanto, se administraron células magnéticas sin un campo magnético externo en un ejemplo comparativo. Como resultado, las células de cartílago estaban localmente presentes en los defectos óseos en el ejemplo y se observó  
15 reparación de defectos óseos a partir de la formación de puentes de nuevo hueso, mientras que en el ejemplo comparativo sin el campo magnético externo no se observó reparación de defectos óseos.

(Preparación de células magnéticas 2)

1. Activación de perlas magnéticas usando EDC y NHS

20 El equivalente a 3 mg (60 µl) se tomaron de una solución madre de ferrisphere 100C (fabricada por Japan Paint; 50 mg/ml) y se lavaron añadiendo NaOH 0,01 N y agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente en un mezclador. Esta operación de lavado se repitió una vez, y el lavado se realizó de nuevo añadiendo agua desionizada y agitando a temperatura ambiente durante 5 minutos en un mezclador. Esta operación de lavado se repitió 3 veces. Para activar las perlas magnéticas, el exceso de agua se retiró y las perlas magnéticas se mezclaron minuciosamente con 50 µl de cada uno de EDC y NHS preparados a 50 mg/ml a pH 5,0 con MES 25 mM, y se agitó  
25 inclinando lentamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la reacción, el tubo se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Finalmente se lavó dos veces con MES 25 mM a pH 5,0 (volumen de solución final (40 µl)).

2. Fijación de anticuerpos después de la activación

30 Anticuerpos CD44 de rata (fabricados por Chemicon) o péptidos RGDS (fabricados por Peptide Laboratories) (20 µg) se disolvieron en MES 25 mM (60 µl), se añadieron a las perlas activadas (suspendidas en 40 µl de MES 25 mM a pH 5,0) y se agitaron inclinando lentamente a temperatura ambiente durante 3 horas para fijar los anticuerpos a las perlas activadas. Después de la reacción, el tubo se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Para retirar los anticuerpos que no habían reaccionado con las perlas, se añadió etanolamina (0,05 M) en PBS (-) de pH 8,0, y se agitó inclinando lentamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Las perlas fijadas se lavaron durante 5 minutos a 4°C en BSA al 0,5% en PBS (-). Esta operación de lavado se  
35 repitió cuatro veces. Esto se suspendió en BSA al 0,5% (1 ml) en PBS (-) y se almacenó a 4°C.

3. Unión de perlas con anticuerpos fijados a las células

40 Células madre mesenquimatosas mieloides de rata cultivadas se transfirieron de una placa a un tubo. Se realizó una reacción de antígeno-anticuerpo añadiendo las perlas preparadas (15 µl) por 500 µl de la suspensión celular ( $2 \times 10^5$  células) seguida de agitación inclinando ocasionalmente durante 1 hora a 4°C. Se usó BSA al 0,5% en PBS (-) como tampón de reacción en este caso. Después de la reacción, el tubo se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Esto se resuspendió a continuación en BSA al 0,5% en PBS (-). Esta operación de lavado se realizó 3-4 veces. Los experimentos se realizaron en suspensión en PBS (-) o similares.

(Preparación de perlas magnéticas 3)

1. Activación de perlas magnéticas usando EDC y NHS

45 El equivalente a 3 mg (60 µl) se tomaron de una solución madre de ferrisphere 100C (fabricada por Japan Paint; 50 mg/ml) y se lavaron añadiendo NaOH 0,01 N y agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente en un mezclador. Esta operación de lavado se repitió una vez, y el lavado se realizó de nuevo añadiendo agua desionizada y agitando a temperatura ambiente durante 5 minutos en un mezclador. Esta operación de lavado se repitió 3 veces. Para activar las perlas magnéticas, el exceso de agua se retiró y las perlas magnéticas se mezclaron minuciosamente con 50 µl de cada uno de EDC y NHS preparados a 50 mg/ml a pH 5,0 con MES 25 mM, y se agitó  
50 inclinando lentamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la reacción, el tubo se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Finalmente se lavó dos veces con MES 25 mM a pH 5,0 (volumen final de solución (40 µl)).

2. Fijación de anticuerpos después de la activación

55 Anticuerpos CD44 de rata (fabricados por Chemicon) o péptidos RGDS (fabricados por Peptide Laboratories) (10 ng) se disolvieron en MES 25 mM (60 µl) a pH 5,0, se añadieron a las perlas activadas (suspendidas en 40 µl de MES 25 mM a pH 5,0) y se agitaron inclinando lentamente a temperatura ambiente durante 3 horas para fijar los anticuerpos a las perlas activadas. Después de la reacción, el tubo se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Para retirar los anticuerpos que no habían reaccionado con las perlas, se  
60 añadió etanolamina (0,05 M) en PBS (-) de pH 8,0, y se agitó inclinando lentamente a temperatura ambiente durante



1 hora. Las perlas fijadas se lavaron durante 5 minutos a 4°C en BSA al 0,5% en PBS (-). Esta operación de lavado se repitió cuatro veces. Esto se suspendió en BSA al 0,5% (1 ml) en PBS (-) y se almacenó a 4°C.

### 3. Unión de perlas con anticuerpos fijados a las células

5 Células madre mesenquimatosas mieloides de rata cultivadas se retiraron de una placa y se transfirieron a un tubo. Las perlas preparadas (1  $\mu$ l) se añadieron por 500  $\mu$ l de la suspensión celular ( $2 \times 10^5$  células) seguida de agitación inclinando ocasionalmente durante 1 hora en un refrigerador (4-10°C) en el caso de los anticuerpos CD44 para conseguir una reacción de antígeno-anticuerpo. En el caso de los péptidos RGDS, la reacción se realizó mediante agitación por inclinación ocasional durante 1 hora a 37°C. Se usó BSA al 0,5%, EDTA 4,4  $\mu$ M en PBS (-) como tampón de reacción en este caso. Después de la reacción, el tubo se dejó durante 2 minutos sobre un imán de neodimio, y el sobrenadante se retiró. Esto se resuspendió a continuación en BSA al 0,5% en PBS (-). Esta operación de lavado se realizó 3-4 veces. Los experimentos se realizaron en suspensión en PBS (-) o similares.

15 Las figuras 5 (A) y (B) muestran imágenes microscópicas (a 480 aumentos) de células magnéticas preparadas mediante los métodos de preparación 2 y 3 anteriores, respectivamente, (células magnéticas mediadas por integrina y péptido RGDS) según lo observado en células madre mesenquimatosas de rata. Queda claro a partir de la figura 5 que la actividad de las células magnéticas de acuerdo con la presente invención está afectada por la cantidad de péptido RGDS con cuerpos magnéticos introducido en las perlas magnéticas, en otras palabras, por la cantidad del péptido mencionado anteriormente que recubre a las perlas magnéticas, y en última instancia las células magnéticas muestran una mayor tendencia a agregarse en células en el cuerpo cuanto mayor sea la cantidad mencionada anteriormente de introducción y mayor sea la cantidad de perlas magnéticas.

20 La figura 6 muestra los resultados para la expresión de ARNm (genes) de Colágeno de Tipo II y Aggrecan según lo medido mediante RT-PCR después de 21 días de cultivo cuando las células magnéticas (células madre mesenquimatosas de rata) preparadas con CD44 o péptido RGDS de acuerdo con la presente invención se sometieron a cultivo del sedimento usando medio de inducción de cartílago. La expresión de ambos genes se confirmó en el grupo (grupo D+) en el que la diferenciación se indujo mediante adición de TGF- $\beta^3$  y dexametasona. En el grupo (grupo D-) que se cultivó sin adición de TGF- $\beta^3$  y dexametasona, por otro lado, no se observó expresión de ningún gen. A partir de los resultados mostrados en la figura 6 se supone a partir de Condrogénesis del complejo de RT-PCR que se puede inducir a las células magnéticas (células madre mesenquimatosas) que tienen antígeno CD44 o péptido RGDS como enlazador a que se diferencien en células de cartílago.

30 La figura 7 muestra una fotografía que explica la formación de células magnéticas de acuerdo con la presente invención usando células madre neurales de rata. A partir de los resultados mostrados en la figura 7, se muestra que cuando células madre neurales de rata agregadas se dispersaban con una pipeta y a continuación se aplicaban perlas modificadas con el péptido RGDS mencionado anteriormente, se formaban células magnéticas usando células madre neurales de rata mediante la integrina de las células madre neurales.

### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

35 Con las células magnéticas de acuerdo con la presente invención, dado que las células magnéticas pueden introducirse *in vivo* y ser retenidas durante un largo periodo en un sitio afectado por una enfermedad mediante la acción de un campo magnético aplicado externamente, las funciones intrínsecas de las células pueden expresarse eficazmente. Además, las células magnéticas de acuerdo con la presente invención pueden aplicarse a condrogénesis y otra medicina regenerativa y como sistemas de administración de fármacos para el anticanceroso y similares dependiendo de la necesidad de terapia.

### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una vista esquemática de la célula magnética de acuerdo con la primera realización la presente invención.

45 La figura 2 muestra una vista esquemática de la célula magnética de acuerdo con la segunda realización de la presente invención.

La figura 3 es un dibujo que explica la recuperación de cartílago como medicina regenerativa.

La figura 4 muestra imágenes microscópicas (a 50 aumentos) tomadas sin (A) y con (B) la aplicación de un campo magnético externo durante aproximadamente 72 horas, un mes después de la inyección intra-articular de células magnéticas de acuerdo con la presente invención.

50 La figura 5 muestra imágenes microscópicas (a 480 aumentos) de células magnéticas preparadas de acuerdo con los métodos de preparación 2 (5A) y 3 (5B) de la presente invención en células madre mesenquimatosas de rata.

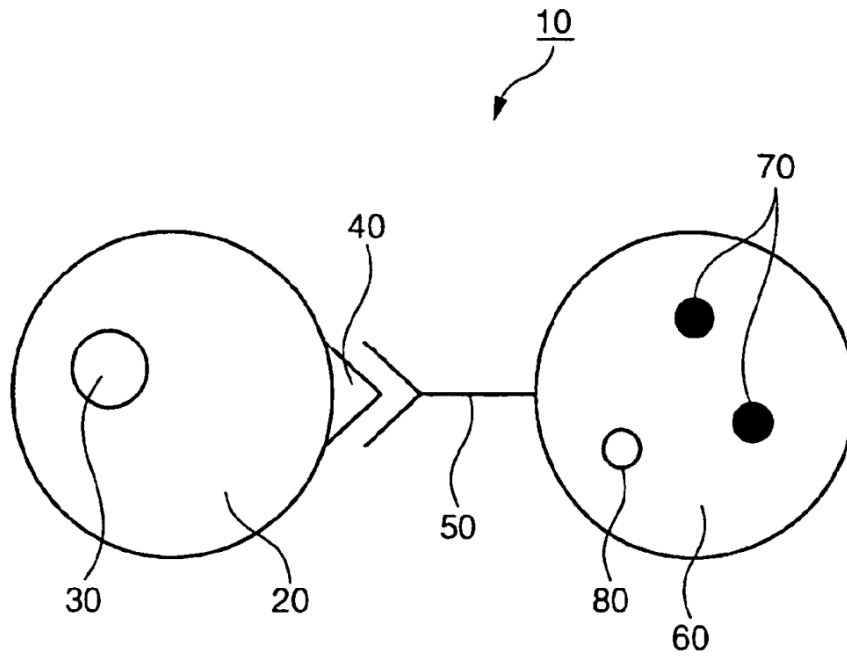
55 La figura 6 muestra los resultados para la expresión de ARNm (genes) de Colágeno de Tipo II y Aggrecan según lo medido mediante RT-PCR después de 21 días de cultivo cuando células magnéticas (células madre mesenquimatosas de rata) preparadas con CD44 o péptido RGDS de la presente invención se sometieron a cultivo del sedimento usando medio de inducción de cartílago.

La figura 7 muestra fotografías que explican células magnéticas de acuerdo con la presente invención formadas usando células madre neurales de rata. (A) es una imagen a 400 aumentos y (B) es una imagen a 1600 aumentos.

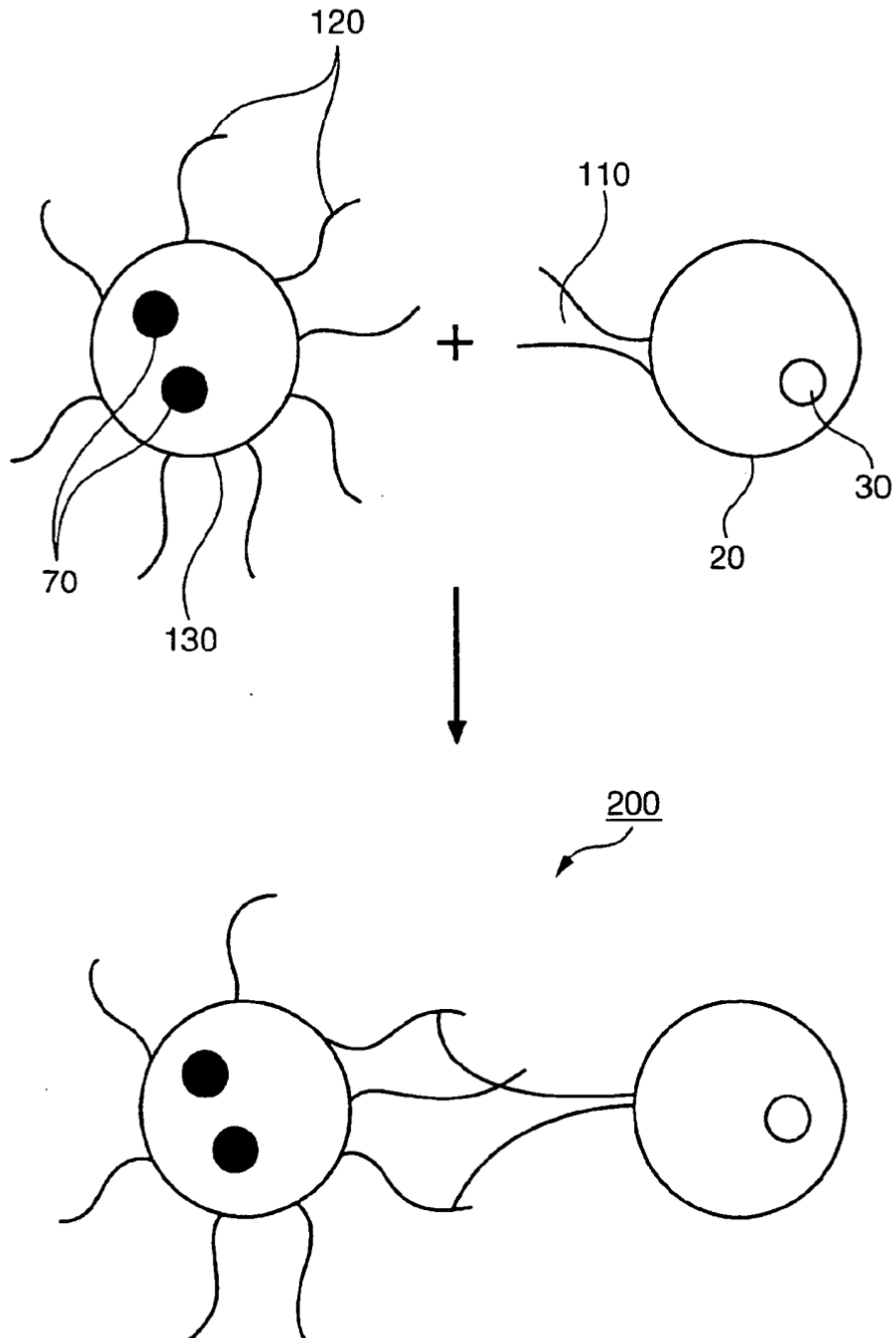
**REIVINDICACIONES**

1. Una célula magnética que comprende:  
una célula que tiene integrina en una superficie de la misma; y una partícula magnética que comprende un péptido que tiene una actividad adhesiva a integrina y un material magnético, en la que la cantidad de péptido que recubre a las partículas magnéticas es de 3 ng a 6,6  $\mu$ g por 1 mg de la partícula magnética, en la que la partícula magnética está en la superficie de la célula y el péptido está en la superficie de la partícula magnética.
- 5 2. La célula magnética de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de RGDS.
- 10 3. La célula magnética de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además un fármaco.

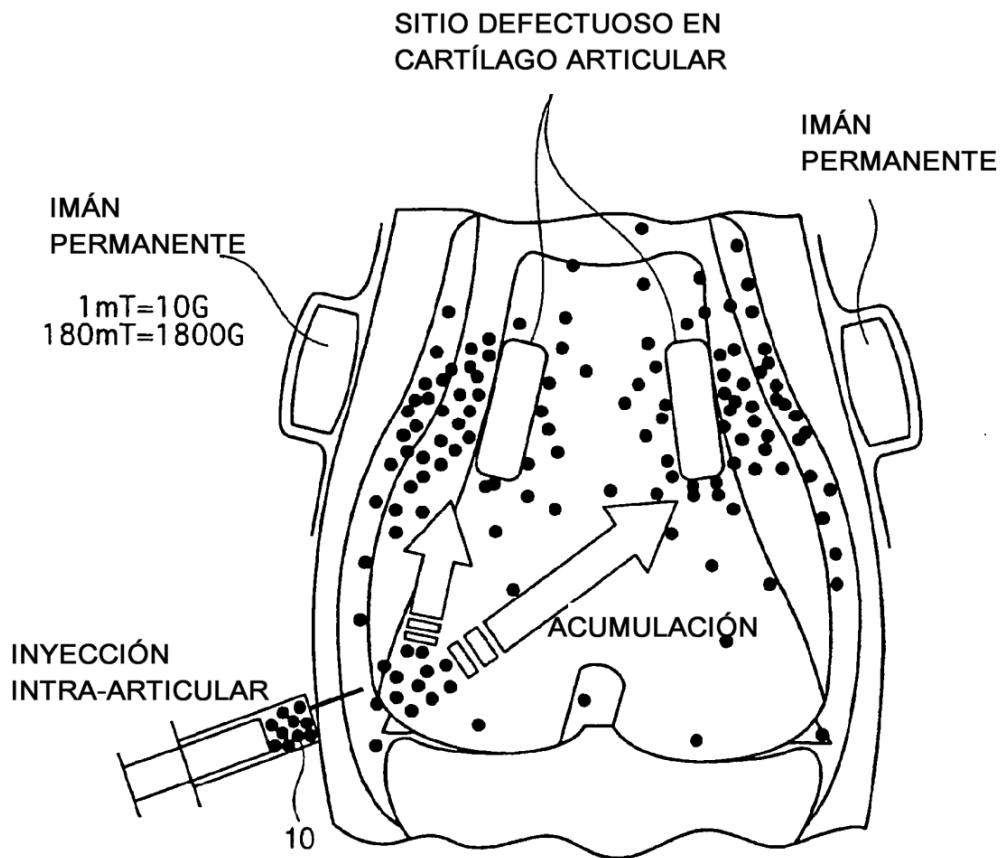
**FIG.1**



**FIG.2**

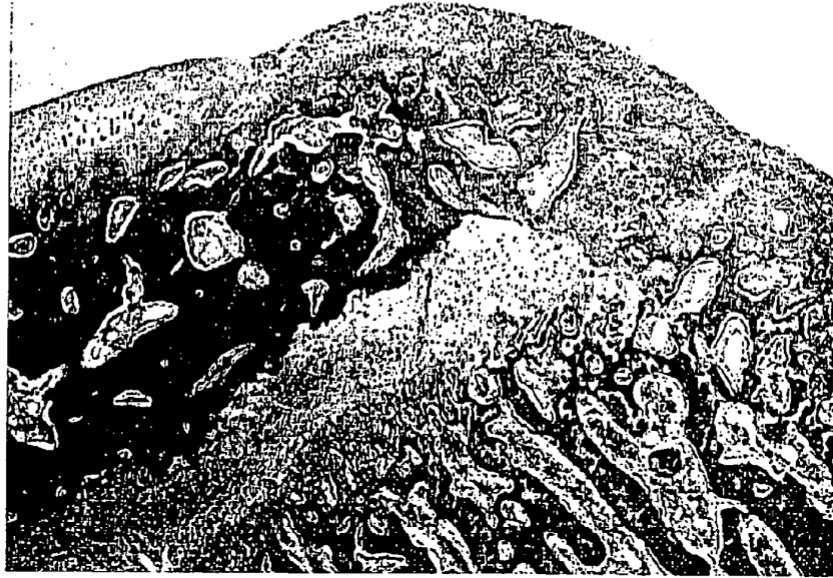


**FIG.3**



**FIG.4**

(A)

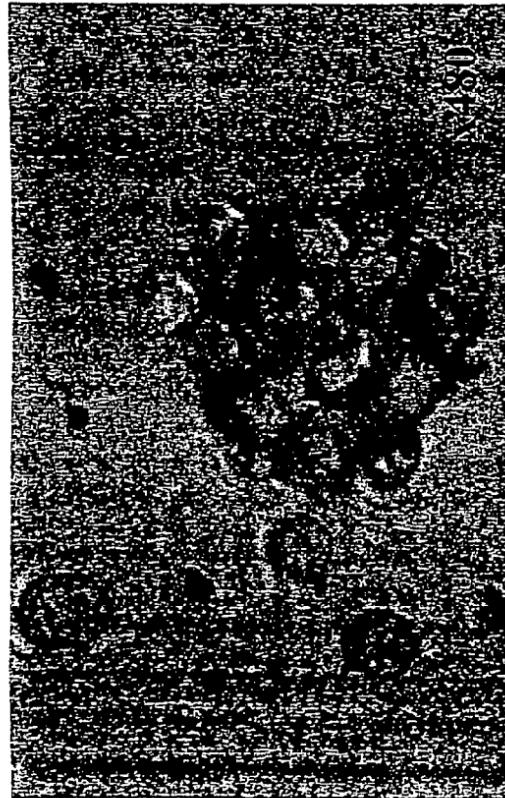


(B)

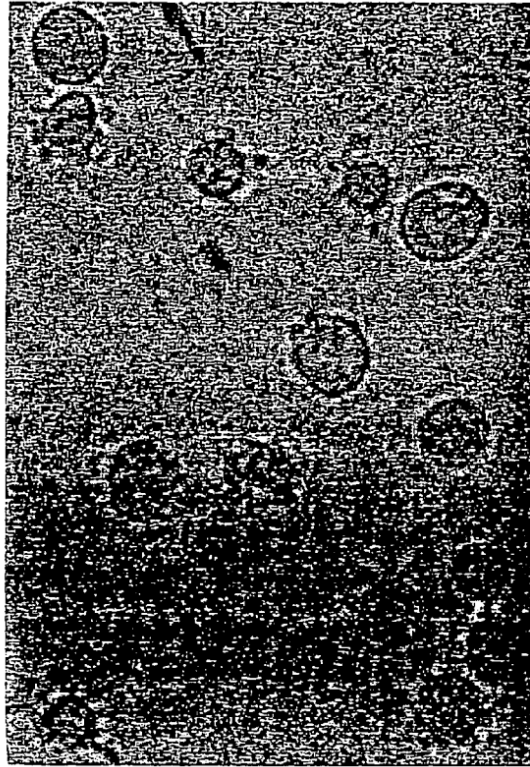


**FIG.5**

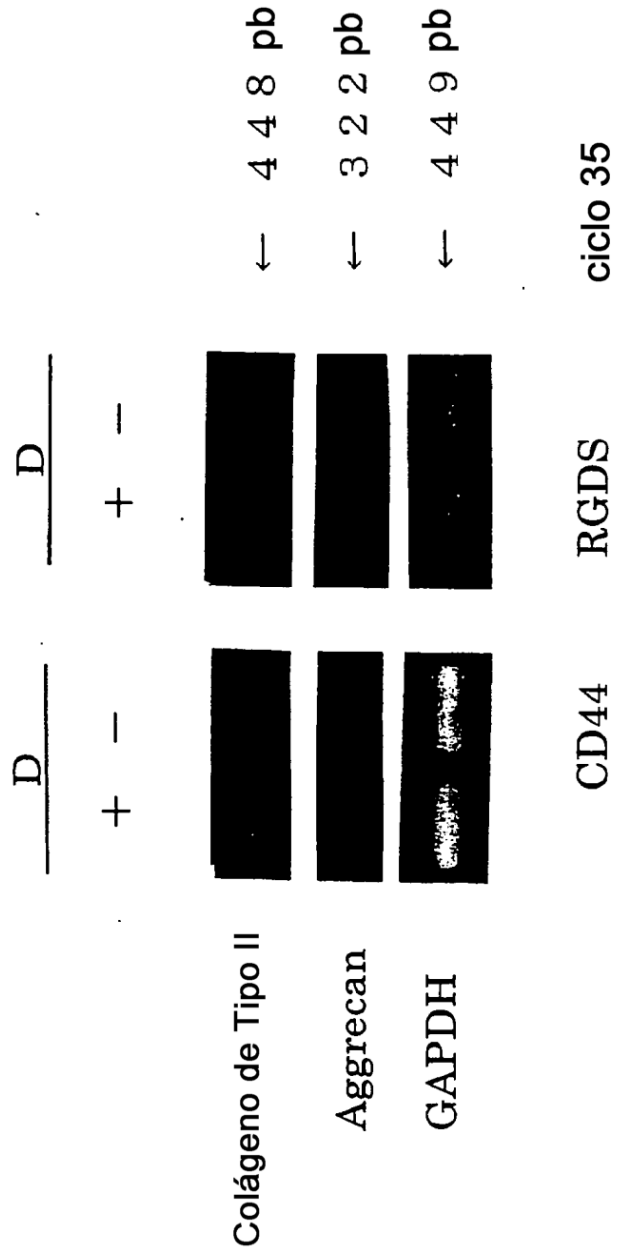
(A)



(B)



**FIG.6**





**FIG.7**

(A)



(B)

