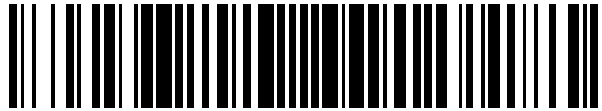


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 891**

51 Int. Cl.:

A61K 49/10 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)
A61K 51/12 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2005 E 05705450 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 1713513**

54 Título: **Marcaje celular para técnicas de resonancia magnética nuclear**

30 Prioridad:

16.01.2004 US 537303 P
25.10.2004 US 621961 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.09.2014

73 Titular/es:

CARNEGIE MELLON UNIVERSITY (100.0%)
5000 FORBES AVENUE, SUITE 302
PITTSBURGH, PA 15213, US

72 Inventor/es:

AHRENS, ERIC T.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 491 891 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

Marcaje celular para técnicas de resonancia magnética nuclear

5 **Solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud provisional en EE UU No. 60/537.3030, presentada el 16 de enero, 2014 y la solicitud provisional en EE UU No. 60/621.961, presentada el 25 de octubre, 2004.

10 **Antecedentes**

Muchos procesos biológicos se llevan a cabo por poblaciones dinámicas, móviles de células. Por ejemplo, las células del sistema inmunitario son reclutadas desde el torrente sanguíneo a áreas de inflamación o infección, lo que produce una acumulación de células inmunitarias en el sitio afectado. Una marcada infiltración de células inmunitarias con frecuencia se produce en tejidos afectados por enfermedades autoinmunitarias, cánceres e infecciones. Asimismo, el rechazo a trasplantes está mediado por células inmunitarias del huésped que entran y destruyen el tejido trasplantado. También hay evidencia creciente de que las células madre que se originan en la médula ósea migran a través del torrente sanguíneo y ayudan en la regeneración de tejidos dañados.

Aunque las poblaciones de células dinámicas desempeñan un papel clave en enfermedades significativas, las tecnologías actuales para seguir el movimiento de células *in vivo* son bastante limitadas. Típicamente, los movimientos celulares se siguen solo en "instantáneas" obtenidas por análisis histológico de biopsias de tejidos. Sin embargo, el proceso de muestreo de un tejido con frecuencia altera el comportamiento de las células, y solo se puede obtener un número limitado de biopsias de un tejido u órgano particular. Se ha hecho algún progreso estudiando movimientos celulares mediante ensayos *in vitro* y tejidos aislados *ex vivo*. Los instrumentos existentes para el análisis no invasivo de organismos vivos son, actualmente, poco adecuados para seguir células vivas. Las tecnologías de imágenes basadas en luz, tales como tecnologías de bioluminiscencia (por ejemplo, luciferasas), con frecuencia son ineficaces en la visualización de estructuras profundas porque la mayoría de los tejidos de mamíferos son ópticamente opacos. Las técnicas de tomografía de emisión de positrones (TEP) que usan sondas radioactivamente marcadas son muy sensibles. Sin embargo, la instrumentación de TEP con frecuencia está limitada a una resolución de varios milímetros y es incapaz de resolver detalles finos de tejidos y órganos. Además, las células marcadas no se pueden detectar durante periodos de tiempo que se extiende más allá del periodo de semidesintegración del radioisótopo típico de TEP, y generalmente la TEP no es útil para estudios longitudinales. Para ganar un entendimiento fundamental de procesos celulares, se deben desarrollar nuevas vías para visualizar las dinámicas de población de tipos celulares específicos *in vivo*.

La imagenología por resonancia magnética (IRM) es una herramienta diagnóstica clínica muy usada porque es no invasiva, permite vistas en sujetos ópticamente opacos, y proporciona contraste entre tejidos blandos a una resolución espacial razonablemente alta. La IRM convencional se enfoca casi exclusivamente en visualizar anatomía y no tiene especificidad por ningún tipo de célula particular. La 'sonda' usada por la IRM convencional es el ubicuo protón (^1H) en moléculas de agua móviles. Se necesitan nuevas clases de sondas o reactivos de IRM exógenos para facilitar la imagenología específica de célula en sujetos vivos.

45 **Compendio**

La invención se refiere a las formas de realización como se caracterizan en las reivindicaciones.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona métodos y reactivos novedosos para marcar células *ex vivo* con un reactivo de imagenología de fluorocarbono, que se puede detectar por una técnica de resonancia magnética nuclear. Las células marcadas se pueden administrar a un sujeto y posteriormente detectar por técnicas de resonancia magnética nuclear. Los ejemplos de técnicas de resonancia magnética nuclear incluyen imagenología por resonancia magnética (IRM) y espectroscopía de resonancia magnética (ERM) localizada. Puesto que las técnicas de resonancia magnética nuclear generalmente se realizan como procedimientos no invasivos, las células marcadas se pueden detectar en uno o más puntos temporales en un sujeto vivo. Las células marcadas también se pueden detectar en un cultivo celular o en esencialmente cualquier otro medio en el que se pueda realizar la técnica de resonancia magnética nuclear, tal como explantes de tejido, órganos y tejidos retirados de un sujeto (posiblemente antes del trasplante en un receptor de trasplante), tejidos artificialmente generados y varias matrices y estructuras sembradas con células.

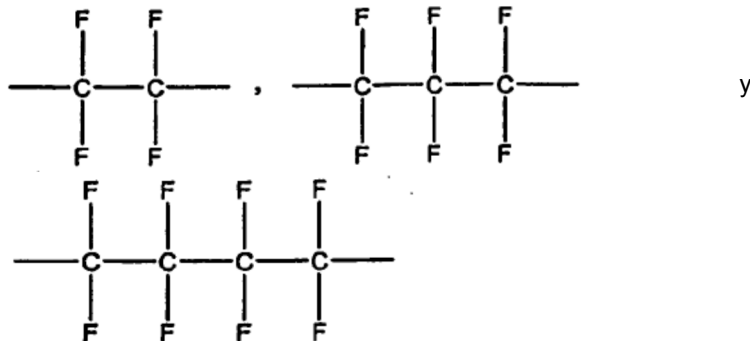
En ciertos aspectos, la divulgación proporciona métodos para marcar una célula, como se definen en las reivindicaciones. Tales métodos incluyen poner en contacto la célula *ex vivo* con un reactivo de imagenología de fluorocarbono en condiciones tales que el reactivo de imagenología de fluorocarbono se asocia con la célula. Los perfluoropoliéteres (PFPE) son ejemplos de reactivos de imagenología de fluorocarbono adecuados. Los perfluoropoliéteres pueden ser lineales o cíclicos (por ejemplo, éteres perfluoro-corona). Opcionalmente, la célula se puede poner en contacto con el reactivo de imagenología de fluorocarbono en presencia de un reactivo que aumenta la absorción del reactivo de imagenología de fluorocarbono. Los lípidos catiónicos son un ejemplo de un reactivo

adecuado que aumenta la absorción; se describen otros de tales reactivos en el presente documento y son, en vista de esta especificación, conocidos en la técnica. Mientras que un reactivo de imagenología de fluorocarbono puede ser internalizado por una célula, también se puede asociar con la superficie extracelular de una célula. La asociación con una superficie extracelular se puede aumentar conjugando el reactivo de imagenología a una fracción de direccionamiento celular. Una fracción de direccionamiento celular puede ser esencialmente cualquier entidad molecular que se une a las células deseadas, tal como un anticuerpo que se une a un epítipo que está expuesto al medio extracelular. La absorción de un reactivo de imagenología en una célula se puede aumentar conjugando el reactivo de imagenología con una fracción de internalización. Una fracción de internalización es cualquier entidad molecular que estimula o fomenta la entrada del reactivo de imagenología en la célula. Los ejemplos incluyen péptidos y fracciones de internalización que se unen a receptores u otras proteínas de superficie celular que se internalizan mediante, por ejemplo, endocitosis mediada por receptor. Un reactivo de imagenología se puede formular como una emulsión. La célula puede ser esencialmente cualquier célula, incluyendo células procariontas y eucariotas. En formas de realización preferidas, la célula es una célula de mamífero. En ciertas formas de realización la célula es una célula del sistema inmunitario, tal como una célula dendrítica. Una célula también puede ser una célula madre o una célula que se ha preparado para la administración a un sujeto como parte de una terapia celular o un trasplante, tal como trasplante de células madre de sangre periférica o trasplante de médula ósea.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona reactivos de imagenología de fluorocarbono. Los reactivos de imagenología de fluorocarbono preferidos tienen una o más de las siguientes propiedades: citotoxicidad tolerable, un espectro de ¹⁹F RMN que es sencillo, idealmente que tiene una resonancia única, estrecha para minimizar artefactos de desplazamiento químico; un gran número de átomos de flúor equivalentes en RMN por molécula; e idoneidad para la formulación para permitir el marcaje eficaz de muchos tipos de células. Los reactivos de imagenología de fluorocarbono preferidos incluyen perfluoroéteres lineales o cíclicos (por ejemplo, éteres perfluoro-corona). Los éteres perfluoro-corona preferidos incluyen perfluoro-15-corona-5, perfluoro-18-corona-6 y perfluoro-12-corona-4. En ciertas formas de realización, el reactivo de imagenología de fluorocarbono es un poliéter perfluorado que tiene una fórmula media:



en donde Y se selecciona del grupo que consiste en:



en donde n es un número entero de 8 a 20; en donde X y Z son iguales y se seleccionan del grupo que consiste en perfluoroalquilo, perfluoroéteres, perfluoroalquilo terminado con fluoroacilo, carboxilo, amida o éster, metiloles, cloruros ácidos, amidas, amidinas, acrilatos y ésteres. En una forma de realización particularmente preferida, n es 10-12, más preferiblemente 11. En una forma de realización adicional, X y/o Z son poliéteres que están terminados con un grupo (por ejemplo, un grupo carboxilo) que facilita la adición de fracciones adicionales. Opcionalmente, el reactivo de imagenología comprende una fracción funcional adicional. La fracción funcional adicional puede ser una fracción de detección que facilita la detección del reactivo por una técnica diferente a una técnica de resonancia magnética nuclear. Los ejemplos de fracciones de detección incluyen fracciones de detección fluorescentes y fracciones de detección de TEP. Según esto, la divulgación proporciona fluorocarbonos derivados en uno o más extremos del polímero con al menos una fracción funcional, en donde la al menos una fracción funcional se selecciona del grupo que consiste en: una fracción de detección, una fracción hidrofílica, una fracción de direccionamiento y una fracción de absorción celular. La incorporación de una fracción de detección crea una fracción de marcaje dual (u orden superior) que facilita la detección por más de una técnica (por ejemplo, TEP e IRM o microscopía de fluorescencia y ERM). Opcionalmente, un reactivo de imagenología se puede formular como una emulsión. Las emulsiones preferidas serán estables a temperatura corporal (37°C para seres humanos) y a una temperatura de almacenamiento, tal como 4°C o temperatura ambiente (20-25°C). Preferiblemente, se diseña una emulsión para facilitar la absorción del reactivo de imagenología por las células del sujeto. Una emulsión puede tener un tamaño medio de partícula de entre 10 y 500 nm de diámetro (lo que significa que la emulsión puede contener partículas menores de 10 nm de diámetro o mayores de 500 nm de diámetro, pero que tienen un diámetro de partícula medio aritmético que está entre 10 y 500 nm, calculado por métodos conocidos en la técnica). Preferiblemente, el diámetro medio de partícula de la emulsión estará entre 30 y 300 nm o entre 30 y 200 nm. En

ciertos aspectos, la invención proporciona métodos para detectar una célula en un sujeto. Un método puede comprender: administrar al sujeto una célula que está marcada con un reactivo de imagenología de fluorocarbono y examinar al menos una parte del sujeto por una técnica de resonancia magnética nuclear. Tal análisis puede incluir IRM o ERM, que puede incluir recoger datos para y generar una imagen de distribución de ^{19}F . La imagenología también puede incluir recoger datos para y generar una imagen de ^1H anatómica convencional. En una forma de realización preferida, se generan y comparan imágenes de ^{19}F y ^1H , opcionalmente por superposición o revestimiento. Opcionalmente, las células marcadas se pueden detectar usando ^{19}F ERM. En una forma de realización preferida se usa una imagen de ^1H anatómica convencional como molde para dirigir las posiciones de uno más vóxeles localizados para ^{19}F ERM.

En algunos aspectos, la especificación divulga formulaciones celulares marcadas. Una formulación celular marcada para la administración a un sujeto puede comprender una célula; y un reactivo de imagenología de fluorocarbono que se asocia con la célula, y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como será aparente a partir de esta divulgación, los métodos descritos en el presente documento serán útiles en una variedad de procedimientos clínicos. Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos para detectar células donantes en un receptor, tal como un receptor de trasplante o un receptor de otros tipos de terapia basada en células. Tal método puede comprender administrar células para trasplante a un receptor de trasplante, al menos una parte de tales células para trasplante están marcadas con un reactivo de imagenología de fluorocarbono; y examinar al menos una parte del sujeto por una técnica de resonancia magnética nuclear, detectando de esta manera las células marcadas. La detección de las células marcadas se puede hacer una vez o repetidamente y se puede realizar de modo que proporcione información sobre la localización y tráfico de células marcadas en el receptor de trasplante. Los ejemplos de receptores de células incluyen receptores de trasplantes de médula ósea (o fracciones celulares que contienen células madre hematopoyéticas, comúnmente pero no exclusivamente derivadas de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical) y receptores de trasplante de otras células u órganos. Los receptores de trasplante de órganos incluyen receptores de órganos donantes tales como hígado, corazón, pulmón, riñón, tejido pancreático, tejido neural u otros trasplantes. Los receptores también incluyen receptores de células donantes, que pueden derivar directamente de un donante (en el caso de células autólogas, el "donante" es el mismo individuo que el receptor) o estar sometidas a cultivo limitado o extenso antes del uso. Las células donantes pueden derivar esencialmente de cualquier tejido que sirva como fuente de células útiles, y pueden incluir células madre (incluyendo células precursoras) con la excepción de células madre embrionarias humanas, tales como células madre hematopoyéticas, hemangioblastos, células madre hepáticas, células madre neurales, células madre musculares (por ejemplo, células satélite), células precursoras de cardiomiocitos, células madre pancreáticas, células precursoras endoteliales vasculares, células madre mesenquimatosas, células precursoras de hueso o cartílago, o pueden incluir células maduras, tales como células dendríticas, células inmunitarias (por ejemplo, células T, células B), condrocitos, osteoblastos, y similares. Las células para la administración pueden ser autólogas, heterólogas o incluso derivadas de otro organismo, tal como un cerdo. Otros aspectos de la presente invención serán aparentes a partir de la divulgación a continuación.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1. ^{19}F RMN confirma el marcaje de PFPE en una variedad de tipos de células. El panel (a) muestra un espectro de ^{19}F RMN a 282 MHz de CD marcadas con PFPE (pico derecho). También se muestra un compuesto de referencia, ácido trifluoroacético (izquierda). El compuesto PFPE, compuesto de perfluoro-15-corona-5 éter se muestra en la parte superior derecha. El panel (b) muestra espectros de ^{19}F RMN para células de gliosarcoma 9L de rata, células T, y macrófagos marcados con PFPE. Por tanto, muchos tipos de células diferentes se pueden marcar fácilmente con PFPE con eficacia comparable. Los datos en (b) se midieron usando procedimientos de marcaje y medida similares a (a).

Figura 2. IRM *in vitro* de tubos capilares que contienen CD marcadas con PFPE (CD+PFPE) y células CD sin marcar (cont). Cada tubo capilar de 1 mm contenía 3×10^6 células en PBS. A la izquierda es una imagen de ^1H convencional, y a la derecha es una imagen de ^{19}F . Los tubos capilares están incluidos en agarosa. Ambas imágenes se adquirieron usando una secuencia de pulso de eco de espín 2DFT estándar en un sistema de IRM 11.7 T. La imagen de ^1H se adquirió con 256x256 puntos de imagen, resolución en plano de $\sim 25 \mu\text{m}$, y un espesor de sección de 1 mm, y la ^{19}F se adquirió con 64x64 puntos, resolución en plano de $100 \mu\text{m}$ y una sección de 1 mm de espesor.

Figura 3. IRM *in vivo* de cuádriceps después de la inyección intramuscular de CD marcadas con PFPE. Se muestran (de izquierda a derecha) imágenes frontales de ^{19}F y ^1H y una imagen compuesta de $^{19}\text{F}+^1\text{H}$. La imagen de ^{19}F se muestra en una escala de intensidad 'hierro caliente', y en la imagen compuesta (derecha) el ^{19}F se hace semitransparente. La imagen de ^1H se adquirió con 256x256 puntos de imagen, resolución en plano de $\sim 50 \mu\text{m}$, y un espesor de sección de 1 mm, y la ^{19}F se adquirió con 64x64 puntos, resolución en plano de $\sim 200 \mu\text{m}$ y una sección de 1 mm de espesor. La barra de escala en el rincón inferior izquierdo es 5 mm. El ratón se anestesió, entubó y colocó en un ventilador durante la sesión de imagenología.

- Figura 4.** IRM *in vivo* de migración de CD en el ganglio linfático poplíteo de ratón después de inyección en la almohadilla de la pata delantera. Se inyectaron CD marcadas con PFPE (3×10^6) ~4 horas antes. La pata izquierda claramente muestra una acumulación de CD marcadas en el tobillo así como una localización consistente con el ganglio poplíteo. Estas imágenes frontales se adquirieron y procesaron de una manera similar a como se describe en la figura 3. La imagen de ^1H se adquirió con 256×256 puntos de imagen, resolución en plano de $\sim 50 \mu\text{m}$, y un espesor de sección de $1,25 \text{ mm}$, y la ^{19}F se adquirió con 128×64 puntos, resolución en plano de $\sim 200 \mu\text{m}$ y una sección de $1,25 \text{ mm}$ de espesor.
- Figura 5.** Sección oblicua *in vivo* a través del abdomen de un ratón que se había inoculado con CD marcadas con PFPE. La imagen de ^{19}F se muestra en una escala de pseudocolor en hierro caliente y se superpone sobre una imagen de ^1H anatómica en escala de grises. Las células son aparentes en el hígado, bazo y posiblemente los pulmones. Esta imagen se adquirió aproximadamente 4 horas después de que 10×10^6 CD marcadas se inyectaran a través de la vena de la cola. Las imágenes se adquirieron usando métodos y parámetros similares como se describen en la figura 4.
- Figura 6.** Análisis fenotípico por FACS de CD derivadas de médula ósea (BM) marcadas con PFPE (líneas gruesa) y sin marcar (línea fina). Las células de BM se cultivaron en GM durante 4 días y se maduraron en presencia de $\text{TNF-}\alpha + \text{PGE}_2$ (paneles superiores) o no (paneles inferiores). Las células se tiñeron con CD11c-PE (marcador de CD) y anticuerpos conjugados a FITC indicados. Los resultados representan histogramas de células seleccionadas para expresión de CD11c. Los histogramas sombreados representan los controles.
- Figura 7.** Micrografía electrónica de CD marcada con PFPE. Se muestra una DC marcada representativa a pocos aumentos (a) y a mayores aumentos (b). En (a), se observan numerosos puntos claros (partículas de PFPE) dentro de la célula que no se observan en células sin marcar. En (b), las partículas aparecen como esferoides lisos. El perímetro de la partícula se tiñe por osmio. Los diámetros de las partículas son $\sim 100\text{-}200 \text{ nm}$. Las barras de escala representan $1 \mu\text{m}$ en (a) y 50 nm en (b).
- Figura 8.** La concentración de PFPE intracelular eficaz (cuadrados sólidos) y el número total de células (círculos abiertos) como función del tiempo después del marcaje de CD. La retención de partículas de PFPE persiste durante muchos días *in vitro*. En cada punto temporal se recogió un único pocillo de cultivo tisular y se contaron 1×10^6 células; estas se precipitaron después y se ensayaron con ^{19}F RMN. El eje izquierdo muestra el área integrada bajo el pico de ^{19}F RMN normalizado a un compuesto de referencia (ácido trifluoroacético) medido al mismo tiempo; la señal normalizada está directamente relacionada con la concentración de PFPE. El eje derecho muestra el número total de células en la placa. Nótese que a ~ 2 días las células en la placa se vuelven confluentes y después hay una pérdida neta de células en tiempos posteriores. Al mismo tiempo, la señal de ^{19}F inicialmente disminuye como se espera debido a la dilución como resultado de la división celular; después de que las células tienen crecimiento excesivo y empiezan a morir las células restantes absorben cualquier exceso de PFPE en el medio y el ^{19}F neto por célula aumenta.
- Figura 9.** Concentración de PFPE en CD medida por ^{19}F RMN como función de la lipofectamina añadida. Se observa que el aumento máximo en la absorción de PFPE es ~ 26 veces. Todos los datos se adquirieron después del mismo periodo de incubación (4 horas).
- Figura 10.** Citotoxicidad de CD marcadas con PFPE medida por liberación de la enzima G6PD. Se muestran células 0, 18 y 24 después del marcaje y controles. Las condiciones de incubación (de izquierda a derecha) son todas las células lisadas (es decir, imitando toxicidad del 100%), nada añadido (sin tratar), Lipofectamina añadida (Lipo), PFPE añadido (PFPE) y PFPE+Lipofectamina añadidos (PFPE+Lipo). Los valores se dan como la media \pm EEM (error estándar de la media) para $N=8$.
- Figura 11.** Proliferación de CD marcadas con PFPE ensayadas por MTT (a) y ADNbc (b). Las células se incubaron durante 3 horas a 37°C con (de izquierda a derecha) nada añadido (sin marcar), Lipofectamina añadida (Lipo), PFPE añadido (PFPE) y PFPE+Lipofectamina añadidos (PFPE+Lipo). Los valores se dan como la media \pm EEM (error estándar de la media) para $N=16$.
- Figura 12.** Estructura molecular de éster de PFPE lineal (a) y espectro de ^{19}F RMN de emulsiones hechas de esta molécula (b). El PFPE lineal (a) tiene una media de 48 átomos de F. La RMN muestra un pico principal a -92 ppm de los grupos internos CF_2 y dos picos mucho menores de los grupos terminales. El compuesto de PFPE principal sin emulsionar tiene un espectro de RMN idéntico (datos no mostrados). Los datos de ^{19}F RMN se adquirieron a 282 MHz .
- Figura 13.** Microscopía electrónica de partículas en emulsión de PFPE lineal (a) e histograma de tamaños de partícula (b). De (b), el tamaño medio de partícula es $42 \pm 19 \text{ nm}$ ($N=133$). Las emulsiones se prepararon rociando sobre rejillas recubiertas de carbono, secando y tomando imágenes. La barra de escala = 100 nm .
- Figura 14.** Ilustraciones de un reactivo de imagenología de PFPE lineal y reacciones de ejemplo para generar derivados.

Descripción detallada

1. Visión general

La invención proporciona métodos novedosos para marcar células *ex vivo* con un reactivo de imagenología de fluorocarbono como se define en las reivindicaciones. Las células marcadas se pueden detectar luego por una técnica de resonancia magnética nuclear de ^{19}F (por ejemplo, IRM/ERM). Las técnicas de resonancia magnética nuclear de ^{19}F son herramientas de imagenología excelentes para sistemas biológicos debido a la ausencia de señales de fondo endógenas. El flúor está presente, si acaso, a niveles sumamente bajos en organismos vivos, y generalmente no en una forma química que sea detectable por técnicas de resonancia magnética nuclear en estado líquido. Esto es bastante distinto de la ^1H IRM convencional que, mientras que proporciona visualización de detalle anatómico fino, no permite la detección selectiva de poblaciones celulares particulares. Ciertos métodos divulgados en el presente documento permiten el cribado del cuerpo completo o parcial para visualizar la distribución de células marcadas en un sujeto vivo. La localización anatómica precisa de las células marcadas detectadas por resonancia magnética nuclear de ^{19}F se puede determinar, por ejemplo, por superposición de una imagen de ^1H IRM que proporciona detalle anatómico. En formas de realización preferidas, la imagen de ^1H se adquiere durante la misma sesión de imagenología que la imagen de ^{19}F (sin mover al sujeto) para asegurar el registro. Además, las técnicas de resonancia magnética nuclear divulgadas en el presente documento se pueden aplicar eficazmente en contextos *ex vivo*, como en el caso de muestras de tejidos, órganos extirpados y cultivos celulares. La tecnología de imágenes divulgada en el presente documento se puede aplicar a un gran número de problemas biológicos y médicos.

El método de la invención comprende marcar células *ex vivo* con un reactivo de imagenología de ^{19}F , administrar las células marcadas a un sujeto, y detectar las células marcadas en el sujeto. Las células que se van a marcar pueden ser una fracción celular cruda o muestra de tejido, o las células se pueden cultivar y/o someter a enriquecimiento antes del marcaje. Por ejemplo, se pueden seleccionar tipos particulares de células por separación celular activada por fluorescencia (FACS) antes del marcaje. Otros métodos de separación o enriquecimiento selectivo se conocen en la técnica para varios tipos de células diferentes que pueden ser de interés. Los tipos de células que se marcan también se pueden controlar por la naturaleza del reactivo de imagenología. Por ejemplo, las suspensiones coloidales sencillas del reactivo de imagenología tenderán a ser absorbidas más rápidamente por células con actividad fagocítica. Como otro ejemplo, un reactivo de imagenología se puede formular con o covalentemente unido a una fracción de direccionamiento que facilita el direccionamiento selectivo del reactivo de imagenología a una población particular de células. Los reactivos de imagenología se describen adicionalmente posteriormente. Después del marcaje, las células se pueden administrar inmediatamente o las células se pueden almacenar, cultivar más, purificar, enriquecer, segregar o procesar de cualquier manera que no sea incompatible con el uso pretendido de tales células.

En ciertos aspectos, las células marcadas se administrarán para un fin terapéutico. La tecnología descrita en el presente documento se puede usar para seguir el tráfico de los agentes terapéuticos celulares *in vivo* o en cualquier otro medio deseado, tal como un explante de tejido. Los trasplantes de células de médula ósea se han usado mucho durante muchos años en receptores de terapias ablativas para cánceres. También se han usado varias poblaciones celulares purificadas en lugar de médula ósea, tales como poblaciones celulares enriquecidas para células madre hematopoyéticas; por ejemplo, las células se pueden recoger de sangre de cordón umbilical o sangre periférica. Después de entrar en el torrente sanguíneo, las células madre generalmente viajan a la médula ósea, donde empiezan a producir nuevos glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. Esta incorporación del injerto habitualmente se produce en aproximadamente 2 a 4 semanas después del trasplante. Tradicionalmente, la incorporación del injerto se sigue ensayando recuentos sanguíneos de forma frecuente, y la recuperación completa de la función inmunitaria generalmente requiere de varios meses (para receptores de trasplante autólogo) a años (para pacientes que reciben trasplantes alogénos o singénicos). El muestreo de células por aspiración de la médula ósea puede proporcionar información adicional sobre la función de las células trasplantadas. Estas técnicas de seguimiento se pueden aumentar marcando *ex vivo* las células que se van a trasplantar (o alguna pequeña fracción de tales células), lo que permite así el seguimiento no invasivo de la localización y movimiento de las células trasplantadas por técnicas de resonancia magnética nuclear. El trasplante alogeno no mieloablativo (es decir, trasplante de intensidad reducida) es una terapia celular similar que puede ser eficaz para tratar varios tipos de cáncer. Generalmente, esta técnica se basa en una dosis menor de radiación y/o agente quimioterapéutico y una enfermedad del injerto contra el huésped limitada (la acción de las células inmunitarias del trasplante contra cualquier célula cancerosa residual del huésped) para proporcionar suficiente actividad anticáncer, así como el potencial hematopoyético de la células del injerto para restablecer el sistema hematopoyético del paciente. Como con el injerto ablativo tradicional, las técnicas de la presente invención se pueden usar para seguir las localizaciones y movimientos de las células del injerto en un trasplante alogeno no mieloablativo.

Los tratamientos celulares también están en desarrollo para su uso en la administración de proteínas terapéuticas. En una forma de realización, las células se pueden aislar, hacer crecer en cantidad *ex vivo* y después implantar para producir y secretar factores solubles, que pueden ser activos bien localmente (por ejemplo, enzimas, citoquinas y neurotransmisores) o a una distancia (por ejemplo, hormonas y reguladores de crecimiento). Las células también se pueden administrar a un paciente para lograr fines terapéuticos complejos, tales como la reconstitución de tejidos,

órganos, o respuestas inmunitarias basadas en su capacidad de migración a sitios específicos en el cuerpo, salir de la circulación, e integrarse en el tejido circundante o diferenciarse para sustituir tejido dañado. También se han propuesto terapias de células madre para una miríada de enfermedades incluyendo trastornos neurológicos, particularmente los caracterizados por muerte celular (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, ictus y lesión cerebral causada por traumatismo), trastornos cardiovasculares (por ejemplo, infarto de miocardio), regeneración muscular (por ejemplo, en pacientes que padecen caquexia u otros trastornos consuntivos), regeneración pancreática en diabetes, regeneración hepática, etc. En cada caso, las células, o una subpoblación de las mismas, se pueden marcar con un reactivo de imagenología *ex vivo* antes de la administración, permitiendo de esta manera el seguimiento de estas células *in vivo*. El seguimiento *in vivo* por una técnica de resonancia magnética nuclear puede ser útil, por ejemplo, para evaluar la viabilidad de las células administradas. Un médico puede personalizar un programa de dosis dependiendo del grado al que se detectan las células marcadas en un paciente después de la administración. El seguimiento *in vivo* también puede ser útil en determinar si células terapéuticas se han localizado en una localización deseada. En general, será posible investigar correlaciones entre el comportamiento de migración de las células terapéuticas *in vivo*, así como el número y/o supervivencia de las células terapéuticas *in vivo*, y los desenlaces terapéuticos. Cuando se han establecido tales correlaciones, la imagenología *in vivo* de las células terapéuticas se puede usar como un indicador pronóstico que puede ser provechoso en seleccionar la dosis apropiada, modos de administración e intervenciones terapéuticas adicionales que beneficiarán al paciente. Ciertos avances de imagenología de la invención beneficiarán a una amplia gama de estrategias terapéuticas celulares porque estas metodologías de imagenología serán capaces de detectar *cuando, donde y si* las células terapéuticas se han administrado a las dianas deseadas *in vivo*.

Un ejemplo de una aplicación de la tecnología divulgada en el presente documento es en seguir células dendríticas (CD). Se sabe que las CD son las células presentadoras de antígenos más eficaces y tienen la capacidad de estimular células T indiferenciadas para iniciar una respuesta inmunitaria. Debido a que las CD son los estimuladores más potentes de la respuesta inmunitaria en el cuerpo, las CD representan un posible enfoque terapéutico para aumentar la "visibilidad" de tumores al sistema inmunitario de un paciente. Las CD son el foco de vacunas tumorales en desarrollo. Se usan métodos variables para exponer las células dendríticas a antígenos tumorales *ex vivo*, después de lo cual las células dendríticas educadas se reinfunden para estimular la aniquilación tumoral mediada por células T. En los ejemplos, posteriormente, los solicitantes presentan datos aplicando una forma de realización de la presente invención al marcaje y seguimiento de CD.

En ciertos aspectos, las células marcadas se administran a un sujeto para fines no terapéuticos. Por ejemplo, las células se pueden marcar *ex vivo*, administrar a un sujeto y después detectar, con la esperanza de que las células marcadas se comportarán similarmente a células no marcadas similares *in vivo* y por tanto se pueden usar para seguir el comportamiento de poblaciones celulares endógenas. El seguimiento se puede usar para el fin de seguir movimientos de células, particularmente en el caso de células que se sabe que son muy móviles, tales como células del sistema inmunitario, muchos tipos de células madre y células de origen sanguíneo. El seguimiento también se puede usar para el fin de seguir la viabilidad o adherencia de células no móviles en el sitio del implante. Las células de muchos tejidos, tales como músculo, hígado, páncreas, riñón, cerebro o piel tenderán a ser relativamente estacionarias, pero la desaparición del marcador puede indicar un alto índice de muerte, baja adherencia, u otra información. Las técnicas modernas de cultivo y separación celular permiten el agrupamiento y marcaje selectivos de virtualmente cualquier población celular deseada, incluyendo varios tipos de células madre, tipos de células inmunitarias y otros tipos de células sanguíneas.

Como ejemplo, se pueden usar células inmunitarias marcadas como indicadores detectables para los movimientos de células inmunitarias en un paciente. Las células inmunitarias participan en y son marcadores para un huésped de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, así como cáncer y formación de placa aterosclerótica. Como metodología general, se puede detectar cualquier proceso que implica el reclutamiento de células inmunitarias en un paciente administrando al paciente células inmunitarias marcadas. La acumulación de marcador en un área particular proporciona una indicación del grado de respuesta inmunitaria que se produce en esa parte del cuerpo. Tradicionalmente, estos tipos de estudios implican técnicas histológicas que son incompatibles con sujetos vivos. Ciertos métodos de la invención pueden facilitar el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas. La capacidad de seguir poblaciones seleccionadas de células inmunitarias de forma no invasiva, y sin el uso de radioisótopos, puede tener impacto en muchas áreas de la inmunología básica y clínica, tal como esclerosis múltiple, diabetes, seguimiento del rechazo al trasplante de órganos, y cáncer. Por ejemplo, los tumores están con frecuencia muy infiltrados por células inmunitarias. Se pueden tomar imágenes de células marcadas en un sujeto para revelar la localización de un tumor, y en algunos casos puede ser útil como cribado de detección no invasiva. La detección temprana de cánceres ha sido un problema crítico, ya que los cánceres en estadios más tempranos se tratan fácilmente por cirugía sin recurrir a agentes quimioterapéuticos debilitantes. Asimismo, se puede seguir el progreso de otras enfermedades inflamatorias siguiendo la dinámica de las células inmunitarias en el paciente. La eficacia de la terapia inmunosupresora también se puede evaluar. En el caso de un receptor de trasplante de órgano, el receptor podría recibir una dosis de células inmunitarias marcadas antes de recibir el trasplante. El seguimiento *in vivo* de la acumulación de células inmunitarias en el trasplante podría entonces usarse como una señal temprana de aviso de rechazo. En el caso de trasplantes, los métodos divulgados en el presente documento son particularmente deseables porque la alternativa, biopsias, se sabe bien que aumenta el riesgo de rechazo al órgano.

5 Como un ejemplo adicional, las células para su uso en un trasplante de células de médula ósea, o un trasplante de células madre de sangre periférica, se pueden marcar *ex vivo* como se describe en el presente documento, administrar y después seguir *in vivo* por una técnica de resonancia magnética nuclear. Tal seguimiento se puede
10 usar para evaluar el injerto incorporado de las células donantes en las cavidades óseas del receptor, así como la supervivencia y movimiento de las células marcadas en el receptor. Un médico puede usar información respecto al tráfico de células donantes en un receptor como una indicación temprana del probable éxito o fracaso del procedimiento. Este tipo de detección temprana permitirá a los médicos ajustar la pauta terapéutica tras el trasplante en conformidad. Otro tratamiento celular de cáncer donde la tecnología de detección se puede aplicar es el
15 trasplante alógeno no mieloablativo, o de intensidad reducida. Este procedimiento se puede usar con infusión de linfocitos del donante para aumentar el efecto del injerto contra el tumor que destruye las células cancerosas. Aquí la población entera, o una fracción, de células trasplantadas se podría marcar antes de la infusión. A continuación se podría usar una técnica de resonancia magnética nuclear para determinar hacia donde se dirigen las células en el cuerpo, que puede ser indicativo de la eficacia del procedimiento. Como con frecuencia es deseable limitar la dosis de células alógenas para minimizar el rechazo, el patrón de tráfico celular se puede usar para calibrar la dosis. En las anteriores terapias celulares contra el cáncer puede ser deseable marcar selectivamente una o más subpoblaciones de las células trasplantadas (por ejemplo, células madre CD34+ o células T) que se cree que tienen eficacia terapéutica.

20 Como un ejemplo más, las células implicadas en la formación de nuevo tejido, tal como en angiogénesis, se pueden marcar, administrar al sujeto, y detectar para identificar puntos calientes de la formación de tejido. Por ejemplo, se pueden marcar células de músculo liso y/o células precursoras endoteliales e introducir las en el torrente sanguíneo. Se espera que tales células se acumulen en sitios de actividad angiogénica. La actividad angiogénica se puede asociar con sucesos fisiológicos y patológicos tales como el ciclo menstrual, embarazo temprano, formación
25 colateral de vasos en respuesta a bloqueos arteriales, desarrollo de tumores y cicatrización. Similarmente, las células implicadas en la cicatrización, tal como fibroblastos, se pueden marcar y administrar sistémicamente o a un sitio de lesión sospechada para seguir el comportamiento celular.

30 En ciertos casos, se puede demostrar que las células están asociadas tan a fondo con un sitio o estructura biológica de interés que las células marcadas se pueden administrar para el único fin de ayudar en la visualización de tal estructura. Como se ha mencionado anteriormente, las células inmunitarias característicamente infiltran tumores. Según esto, las células inmunitarias marcadas se pueden administrar con el fin de visualizar tumores.

35 La tecnología divulgada en el presente documento se puede aplicar a estudios de modelos animales de enfermedades humanas. Varios modelos animales de enfermedades pueden mostrar dinámica o supervivencia alterada de una o más poblaciones celulares. Tales poblaciones celulares se pueden marcar, administrar al animal y seguir. Por ejemplo, se puede seguir la infiltración de células inmunitarias en el páncreas del modelo de ratón NOD para diabetes. Otros ejemplos de modelos animales incluyen: encefalomiелitis alérgica experimental (modelo de esclerosis múltiple), modelos tumorales de gliosarcoma y rechazo al trasplante de órganos. Siguiendo poblaciones
40 fenotípicamente definidas de células inmunitarias en estos modelos, se pueden aclarar aspectos de la etiología de la enfermedad y seguir cómo está afectado el tráfico de células por los tratamientos. Este método se puede usar, por ejemplo, para cribar fármacos que tienen un efecto deseado en un modelo animal. Un ensayo de cribado de fármacos puede comprender administrar células marcadas a un animal y detectar las células *in vivo* en presencia de un agente de prueba. Los cambios en el comportamiento de las células que se correlacionan con la presencia del agente de prueba pueden ser indicativos de un efecto terapéutico. Tales se pueden detectar por comparación con una referencia adecuada, incluyendo, por ejemplo, el mismo animal antes del tratamiento con el agente de prueba o un animal separado, sin tratar. Además de un agente de prueba, los métodos se pueden usar para evaluar los efectos de condiciones de prueba, tales como un régimen de ejercicio, lesión, alteración genética, etc. Como ejemplo, se espera que un fármaco para tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria disminuya la tendencia de las células inmunitarias de acumularse en el tejido afectado. Además de evaluaciones de estado estacionario, los métodos divulgados en el presente documento se pueden usar para evaluar propiedades cinéticas de células, tal como la velocidad a la que las células llegan a un sitio particular y el tiempo de persistencia de la señal en un sitio. Los ensayos de cribado de fármacos pueden ser particularmente poderosos cuando se combinan con seguimiento *in vivo* de poblaciones celulares bien definidas, tal como ciertos grupos de células inmunitarias que están implicadas en
55 varios trastornos. Por ejemplo, el seguimiento de células T citotóxicas puede ser particularmente útil en la identificación de fármacos que pueden ser útiles en prevenir el rechazo a trasplantes. La capacidad de seguir células *in vivo* proporciona un nuevo ensayo poderoso que se puede aplicar al análisis de esencialmente cualquier animal experimental, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los varios ratones transgénicos o mutantes de otra forma que se han generado.

60 Varios grupos han estudiado el marcaje y visualización de células inmunitarias usando agentes de contraste de IRM. Otros investigadores han usado agentes de contraste de IRM para marcar tipos celulares tales como células madre y precursores neuronales. La mayoría de estos estudios hacen las células magnéticamente distintas a través de la incorporación de agentes de óxido de hierro superparamagnético (SPIO). También se han usado células marcadas con agentes de contraste que incorporan otros tipos de iones metálicos, particularmente gadolinio y manganeso. En estudios que utilizan estos agentes basados en iones metálicos, no se toman imágenes de los compuestos

directamente; en su lugar, se observa su efecto indirecto en aguas circundantes. La presencia del agente tiende a acortar los tiempos de relajación (T_1 , T_2 o T_2^*) de agua en proximidad al compuesto; estos efectos se pueden detectar en imágenes ponderadas para tiempo de relajación. Los agentes de SPIO, por ejemplo, imparten contraste a las imágenes de ^1H convencionales perturbando localmente el campo magnético experimentado por las moléculas de agua móviles cercanas, que a su vez modula T_1 , T_2 o T_2^* . Los métodos descritos en el presente documento son claramente diferentes de los métodos que usan agentes de contraste basado en iones metálicos porque las señales de los núcleos de ^{19}F en los reactivos de imagenología se pueden detectar directamente y opcionalmente, tomar imágenes.

Una desventaja inherente para detectar células marcadas usando agentes de contraste basados en iones metálicos es que con frecuencia se está en una situación donde es necesario interpretar cambios sutiles en contraste en escala de grises en regiones que se cree que contienen células marcadas. La gran señal de fondo de ^1H de la alta concentración de agua móvil presente en tejidos hace difícil identificar inequívocamente regiones que contienen células marcadas; esto es especialmente problemático si la biodistribución de las células marcadas no se conoce *a priori*. Los resultados de una imagen 'instantánea' con frecuencia son ambiguos sobre si las células marcadas están presentes en un tejido específico. Este es un problema particularmente molesto cuando se trata de detectar células marcadas con SPIO en órganos cargados con hierro que aparecen intrínsecamente oscuros en imágenes anatómicas (ponderadas para T_2 o T_2^*), tal como en el hígado o el bazo. Con frecuencia se debe recurrir a detectar cambios de intensidad en imágenes por lapso de tiempo en un órgano particular durante un periodo de varias horas para verificar que las células marcadas se han acumulado.

Por tanto los métodos y composiciones divulgados en el presente documento proporcionan herramientas muy necesitadas en los campos de la medicina y biología

2. Reactivos y formulaciones de imagenología

El reactivo de imagenología usado en los métodos objeto es un fluorocarbono, es decir, una molécula que incluye al menos un enlace carbono-flúor. En virtud de los átomos de ^{19}F , los reactivos de imagenología divulgados en el presente documento se pueden detectar por ^{19}F IRM y otras técnicas de resonancia magnética nuclear, tal como técnicas de ERM. En ciertas formas de realización preferidas, un reactivo de imagenología de fluorocarbono tendrá una o más de las siguientes propiedades: 1) citotoxicidad tolerable; 2) un espectro de ^{19}F RMN que es sencillo, idealmente que tiene una resonancia única, estrecha para minimizar artefactos de desplazamiento químico; 3) alta sensibilidad con un gran número de átomos de flúor equivalentes en RMN en cada molécula; y 4) formulados para permitir el marcaje eficaz de muchos tipos de células y no restringidos a células fagocíticas.

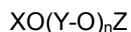
Los compuestos ejemplares incluyen ésteres (triflatos) o sulfonamidas (triflamidas) de ácido aril o heteroaril trifluorometil sulfónico, ésteres de alcoholes fluorados (tal como 2,2,2-trifluoroetanol, perfluoro-tert-butanol, y 2,2,3,3,3-pentafluoropropanol), ésteres y amidas de ácidos perfluoroalcanoicos (tal como ácido trifluoroacético, ácido perfluorotetradecanoico, y ácido nonafluoropentanoico), éteres de perfluoroalcanos, y similares. Preferiblemente, el reactivo de imagenología comprende una pluralidad de flúores unidos a carbono, por ejemplo, más de 5, más 10, más de 15, o más de 20 flúores unidos a carbono. Preferiblemente al menos 4, al menos 8, al menos 12 o al menos 16 de los flúores tienen un desplazamiento químico de RMN aproximadamente equivalente.

En ciertas formas de realización, el reactivo de imagenología es un éter perfluoro corona, tal como perfluoro-15-corona-5, perfluoro-18-corona-6, perfluoro-12-corona-4, etc., también denominados en el presente documento perfluoropoliéteres cíclicos (PFPE cíclicos). Tales compuestos son ventajosos en que los núcleos de ^{19}F de estas moléculas tendrán resonancias de RMN similares o idénticas, lo que produce una imagen con mayor relación de señal a ruido con una reducción o ausencia de artefactos de imagen de desplazamiento químico. El macrociclo perfluoro-15-corona-5 éter tiene características particularmente preferibles. No es ni lipofílico ni hidrofílico, que es típico para perfluoropoliéteres, y se emulsiona en solución acuosa. Las emulsiones típicas son pequeños particulados (~10-500 nm de diámetro) que son estables en solución acuosa y pueden ser absorbidas por las células. El experto en la materia reconocerá, que otros compuestos fluorados tendrán propiedades deseables, particularmente esos compuestos fluorados en los que cada átomo de flúor está en un medio químico similar. Los ésteres de perfluoro-tert-butanol, 1,3,5-tris(trifluorometil)benceno, hexafluoroacetona, poli(trifluorometileno), y perfluorociclohexano son ejemplos de compuestos que tienen múltiples átomos de flúor con resonancias de ^{19}F que tienen las mismas, o casi las mismas frecuencias de Larmor.

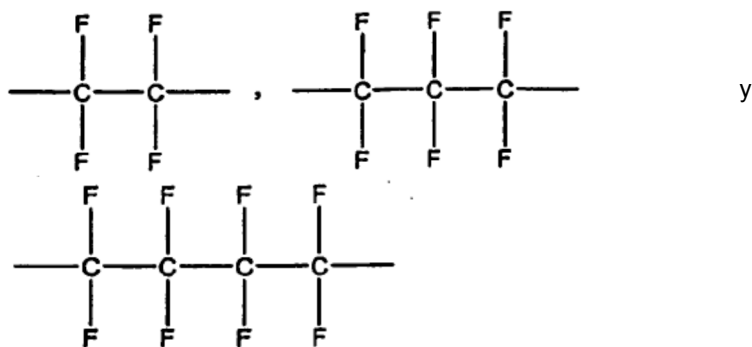
En ciertas formas de realización, el reactivo de imagenología es un polímero. En ciertas formas de realización, el reactivo de imagenología es o incluye un perfluoropoliéter lineal (PFPE lineal), por ejemplo, un compuesto que tiene una estructura o parte de la misma que comprende unidades repetidas de $-\text{O}-\text{CF}_2(\text{CF}_2)_x\text{CF}_2-$, en donde x es un número entero de 0 a 10, preferiblemente de 0-3, y n es un número entero de 2 a 100, preferiblemente de 4 a 40. Por ejemplo, se puede obtener óxido de polietileno lineal perfluorado de Exfluor Corp. (Round Rock, TX). Cualquiera o ambos extremos (o una pluralidad de extremos, en el caso de polímeros ramificados) se pueden derivar con una fracción que proporciona una funcionalidad deseada adicional. Por ejemplo, un reactivo de imagenología puede tener una fórmula de A-B-C, donde A y/o C puede ser una fracción funcional y B comprende unidades repetidas de $-\text{O}-\text{CF}_2(\text{CF}_2)_x\text{CF}_2-$, en donde x es un número entero de 0 a 10, preferiblemente de 0-3, y n es un número entero de

2 a 100, preferiblemente de 4 a 40. Las fracciones funcionales (por ejemplo, monómeros no fluorados que confieren una función deseada particular) se discuten además posteriormente.

Un perfluoropoliéter lineal también se puede describir como una composición que tiene la fórmula media:



en donde Y se selecciona del grupo que consiste en:



en donde n es un número entero de 8 a 30; en donde X y Z son iguales y se seleccionan del grupo que consiste en perfluoroalquilos, perfluoroéteres, perfluoroalquilos terminados con fluoroacilo, carboxilo, amida o éster, metiloles, cloruros ácidos, amidas, amidinas, acrilatos y ésteres, así como cualquiera de los anteriores derivados con una fracción funcional.

Mientras que un polímero completamente fluorado se puede formar, por ejemplo, haciendo reaccionar un diácido perfluorado con un dihalocarbono perfluorado (tal como 1,4-diyodooctafluorobutano), los monómeros fluorados se pueden hacer reaccionar con otros monómeros (opcionalmente fracciones funcionales, que pueden estar no fluorados) para formar polímeros híbridos que son útiles como reactivos de imagenología. Se puede usar una variedad de diferentes monómeros no fluorados para variar las propiedades químicas y físicas del polímero global, y hacer posible ajustar el reactivo de imagenología para usos específicos. Por ejemplo, un reactivo de imagenología muy lipofílico se puede concentrar en adipocitos y otros tejidos grasos, mientras que un reactivo de imagenología muy hidrofílico puede ser útil para la imagenología del sistema circulatorio o el sistema linfático.

Para marcar células, los reactivos de imagenología se pueden emplear en una o más de al menos tres modalidades: 1) reactivos de imagenología que son internalizados o absorbidos de otra manera por las células diana sin la formación de asociación covalente u otra unión; 2) reactivos de imagenología que se unen covalentemente a las células diana; y 3) reactivos de imagenología acoplados a moléculas, tales como anticuerpos o ligandos, que se unen a moléculas presentes en las células diana.

Los reactivos de imagenología del primer tipo incluyen los éteres perfluoro corona y otros PFPE que son absorbidos por las células y, preferiblemente, son retenidos en la célula sin degradación durante un periodo de tiempo sustancial, por ejemplo, que tienen una semivida en la célula de al menos 1 hora, al menos 4 horas, al menos aproximadamente un día, al menos aproximadamente tres días, o incluso al menos aproximadamente una semana. Por razones obvias, se prefiere que el reactivo de imagenología no interfiera con las funciones celulares normales o muestre citotoxicidad a las concentraciones empleadas para el marcaje. Como se demuestra en el presente documento, los perfluoropoliéteres muestran efecto tóxico mínimo en las células marcadas.

Los reactivos de imagenología del segundo tipo incluyen compuestos electrófilos que reaccionan con sitios nucleófilos en la superficie celular, tal como grupos tiol, amino y/o hidroxilo expuestos. Según esto, los reactivos de imagenología tales como maleimidias, yoduros de alquilo, ésteres de N-hidroxisuccinimida o N-hidroxisulfosuccinimida (ésteres de NHS o sulfo-NHS), acilsuccinimidias, y similares pueden formar enlaces covalentes con la superficies celulares. Otras técnicas usadas en acoplamiento de proteínas se pueden adaptar para el acoplamiento de reactivos de imagenología a proteínas de la superficie celular. Véase Means et al. (1990) Bioconjugate Chemistry 1:2-12, para enfoques adicionales a tal acoplamiento.

Los reactivos de imagenología del tercer tipo se pueden preparar haciendo reaccionar reactivos de imagenología del segundo tipo no con las células mismas, sino con una fracción funcional que es un ligando o anticuerpo de direccionamiento celular. Los ligandos y anticuerpos adecuados se pueden seleccionar para la aplicación de interés. Por ejemplo, un ligando que selectivamente se dirige a células hematopoyéticas se podría marcar con un reactivo de imagenología como se describe en el presente documento y administrar a un paciente, tal como por inyección.

Alternativamente, un reactivo de imagenología se puede acoplar a un péptido de internalización indiscriminado, tal como la proteína antepennepedia, proteína transactivadora (TAT) de VIH, mastoparano, melitina, bombolitina, hemolisina delta, pardaxina, exotoxina A de *Pseudomonas*, clatrina, toxina de la difteria, proteína del complemento C9, o un fragmento de cualquiera de estas. Las células tratadas con esta molécula indiscriminada *ex vivo* absorberán el reactivo de imagenología, el reactivo de imagenología se puede usar para visualizar y/o seguir las células implantadas por técnicas de resonancia magnética nuclear.

En una forma de realización, el péptido de internalización deriva de la proteína antepennepedia de drosophila u homólogos de la misma. Se ha demostrado que el homeodominio de 60 aminoácidos de longitud de la homeoproteína antepennepedia se transloca a través de membranas biológicas y puede facilitar la translocación de los polipéptidos heterólogos a los que está acoplado. Véase, por ejemplo, Derossi et al. (1994) *J Biol Chem*: 269:10444-10450; y Perez et al. (1992) *J Cell Sci* 102:717-722. Se ha demostrado que fragmentos de tan solo 16 aminoácidos de longitud de esta proteína son suficientes para dirigir la internalización. Véase, Derossi et al. (1996) *J Biol Chem*: 271: 18188-18193.

Otro ejemplo de un péptido de internalización es la proteína transactivadora (TAT) de VIH. Esta proteína parece estar dividida en cuatro dominios (Kuppuswamy et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:3551-3561). La proteína TAT purificada es absorbida por células en cultivo celular (Frankel y Pabo, (1989) *Cell* 55:1189-1193), y péptidos, tal como el fragmento que corresponde a los residuos 37-62 de TAT, son rápidamente absorbidos por células *in vitro* (Green y Loewenstein, (1989) *Cell* 55:1179-1188). La región muy básica media la internalización y direccionamiento de la fracción de internalización al núcleo (Ruben et al., (1989) *J. Virol.* 63:1-8). Se pueden conjugar péptidos o análogos que incluyen una secuencia presente en la región muy básica, tal como CFITKALGISYGRKKRRRPPQGS, a reactivos de imagenología fluorados para ayudar en la internalización y direccionamiento de esos reactivos al medio intracelular.

Otra composición de PFPE de interés es PFPE lineales derivados con una variedad de grupos terminales. Los compuestos lineales tienen la ventaja de que se pueden conjugar una variedad de entidades funcionales a los grupos terminales, tal como fracciones funcionales de varios tipos. Los espectros de ¹⁹F RMN de estos compuestos lineales generalmente es más complejo que el de compuestos macrocíclicos, pero un PFPE con dos señales de RMN bien separadas también se puede usar. En este caso puede ser deseable usar una secuencia de pulso de IRM que incorpore uno o más pulsos de saturación fuera de resonancia aplicados a la resonancia menor para eliminar cualquier artefacto de desplazamiento químico.

Una aplicación particularmente útil de PFPE lineales es la síntesis de un agente de "modo dual" que se puede detectar por técnicas de resonancia magnética nuclear de ¹⁹F e incluye una fracción de detección que facilita la detección por un segundo método de detección. Como ejemplo, se puede usar una fracción fluorescente unida a los grupos terminales para generar reactivos de imagenología que se pueden visualizar con ¹⁹F IRM y microscopia de fluorescencia. Se pueden usar una amplia variedad de fracciones fluorescentes en un agente de modo dual. Se conocen muchos fluoróforos adecuados, incluyendo fluoresceína, lisamina, ficoeritrina, rodamina (Perkin Elmer Cetus), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham). Las fracciones fluorescentes incluyen derivados de fluoresceína, benzoxadioazol, cumarina, eosina, amarillo Lucifer, piridiloxazol y rodamina. Se pueden encontrar estas y muchas fracciones fluorescentes ejemplares en Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (2000, Molecular Probes, Inc.). Fracciones fluorescentes adicionales incluyen nanocristales fluorescentes, tales como los productos de "punto cuántico" disponibles de Quantum Dot Corporation (Hayward, Calif.). Tales nanocristales se pueden construir con un núcleo semiconductor que tiene un espectro de emisión apropiado (por ejemplo, CdS, CdSe, CdTe), una cubierta compuesta de material no emisor transparente y relativamente no reactivo que se puede unir eficazmente a material nuclear subyacente (por ejemplo, ZnS) y un recubrimiento que proporciona solubilidad deseable (por ejemplo, para solubilidad en soluciones acuosas, fisiológicas) y posibles grupos reactivos para la unión a un fluorocarbono descrito en el presente documento..

Los reactivos de imagenología de modo dual que permiten la detección fluorescente son particularmente útiles en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, el marcaje fluorescente permite el uso de mecanismos de separación celular basados en fluorescencia, tal como separación celular activada por fluorescencia (FACS). La separación celular puede ser deseable, por ejemplo, para enriquecer una población de células que se han marcada con éxito. Esto puede ser particularmente útil donde el marcaje se ha dirigido a poblaciones celulares más raras. Los agentes de modo dual también son útiles para encontrar y caracterizar células marcadas después de que se hayan implantado en un sujeto vivo. En esta aplicación, las células se pueden someter a biopsia, o recoger por algún otro medio, del sujeto después de que hayan residido allí durante algún tiempo. Se puede realizar después el análisis biológico de las células recogidas. Por ejemplo, se puede realizar análisis por FACS en las células recogidas, donde después de seleccionar positivamente células para el marcador PFPE fluorescente, se puede ensayar en las células la expresión de marcadores de superficie celular específicos (usando una sonda fluorescente de color diferente) para investigar cualquier cambio en el fenotipo celular que se produjera después de la implantación. Los marcadores fluorescentes también se pueden usar para microscopia de fluorescencia de células particularmente usando microscopia de fluorescencia confocal tridimensional. La microscopia de fluorescencia generalmente no será útil para la visualización *in vivo* de tejidos profundos que contienen células marcadas, pero se pueden visualizar tejidos superficiales así como muestras de tejidos. El marcaje dual es particularmente valioso en calibrar y validar cualquier

nuevo método de marcaje de resonancia magnética nuclear basado en fluorocarbono. Los resultados obtenidos, por ejemplo, mediante IRM/ERM se pueden comparar a los obtenidos por detección de fluorescencia, tanto en células marcadas cultivadas (de biopsia u otra manera) como *in vivo*, al nivel posible. Se puede usar una potencia de señal de fluorescencia por molécula unidad conocida para calibrar las medidas de IRM/ERM.

Las fracciones de detección adecuadas para imagenología por TEP también se pueden usar para crear reactivos de imagenología de modo dual que son detectables por técnicas de resonancia magnética nuclear y por técnicas de TEP. Por ejemplo, el isótopo ^{18}F es un marcador potente para métodos de detección de TEP. Un reactivo de imagenología de fluorocarbono puede comprender una mezcla de isótopos ^{18}F y ^{19}F , proporcionando de esta manera un marcador de modo dual que es adecuado para IRM/ERM y TEP. También se pueden añadir ^{18}F y ^{19}F en monómeros separados para formar un copolímero mezclado, o partes de ^{18}F se pueden localizar en cualquier extremo del poliéter lineal, en la posición donde se añadirían la mayoría de otras fracciones funcionales. ^{18}F no tiene señal de RMN y por tanto se puede añadir en posiciones que tenderían, por ejemplo, a disminuir la amplitud de línea de RMN, simplificar el espectro de RMN, o mejorar los desplazamientos químicos de resonancias que afectan adversamente la lectura obtenida por una técnica de resonancia magnética nuclear. Además, las moléculas de los reactivos de imagenología de fluorocarbono pueden incorporar otros radioisótopos que son eficaces en sondas de TEP, tales como ^{11}C , ^{15}O , y ^{13}N . Los expertos en la materia pueden, en vista de esta especificación, idear muchas otras fracciones detectables por TEP que se pueden incorporar en o, por ejemplo, unir a un grupo(s) terminal(es) de reactivos de imagenología de esta invención.

En ciertas formas de realización, un perfluoropoliéter lineal se puede derivar con una fracción relativamente hidrofílica en uno, o preferiblemente, ambos extremos. Por ejemplo, la fracción hidrofílica puede ser un polietilenglicol, formando de esta manera un copolímero tribloque con regiones solubles en agua en cada extremo y una región hidrofóbica en el centro. Cuando se mezclan en un medio acuoso, los reactivos de imagenología de este tipo tenderán a formar micelas, con el núcleo del PFPE rodeado por una cubierta soluble en agua. Los bloques amino-PEG están comercialmente disponibles con una gama de pesos moleculares. El acoplamiento del núcleo de PFPE con otros grupos, tal como aminas alifáticas (véase, por ejemplo la figura 14, Rxn 2 y 4a) y fosfatidiletanolamina (véase, por ejemplo, la figura 14, Rxn 3) en lugar de secciones hidrofílicas, dará derivados con diferentes características de solubilidad.

En ciertas formas de realización, la invención proporciona formulaciones de reactivos de imagenología que son adecuadas para la absorción por células. Las emulsiones que comprenden un reactivo de imagenología de fluorocarbono, tal como un PFPE, preferiblemente tendrán una distribución de tamaños de partícula que permite la absorción celular adecuada. Por ejemplo, generalmente será deseable que el tamaño medio de partícula esté en un intervalo de 10 nm a 500 nm, y preferiblemente un intervalo de 30 nm a 150 nm o un intervalo desde aproximadamente 350 a 500 nm. Opcionalmente, el 25%, 50%, 75% o más de las partículas también estarán en el intervalo seleccionado. Se puede evaluar el tamaño de partícula, por ejemplo, por técnicas de dispersión de luz o por visualización de partículas en emulsión usando micrografías de ME. En ciertos tipos de células que tienen una cantidad relativamente pequeña de citoplasma, tal como la mayoría de las células madre, los tamaños de partícula preferidos estarán en el intervalo de 10-50 nm de diámetro. Las emulsiones para su uso en células preferiblemente deben ser estables en un amplio intervalo de temperaturas. Por ejemplo, con frecuencia será deseable almacenar la emulsión a una temperatura fría, en el intervalo de 2-10°C, y preferiblemente 4°C, y después calentar la emulsión a temperatura ambiente (por ejemplo, de 18 a 28°C, y más típicamente de 20 a 25°C). Después de marcar las células, la emulsión experimentará una temperatura de aproximadamente 37°C. Según esto, una emulsión preferida retendrá el intervalo deseado de tamaños de partícula a temperaturas que varían desde temperaturas de refrigeración hasta la temperatura corporal. El tensioactivo se puede diseñar para formar emulsiones estables que tengan una gran cantidad de PFPE en la fase acuosa. Además, puede tener propiedades que aumenten la administración intracelular de las partículas de la emulsión en el menor tiempo de incubación posible. Aumentar la carga intracelular de PFPE mejora la sensibilidad a las células marcadas. Además, disminuir el tiempo de incubación puede ser importante cuando se trabaja con cultivos de células primarias porque el fenotipo celular puede evolucionar a lo largo del tiempo. La eficacia de la absorción intracelular depende del tipo de célula. Por ejemplo, los macrófagos y las células dendríticas endocitarán casi cualquier particulado, mientras que otros tipos de células de interés pueden ser solo ligeramente fagocíticas. En cualquier caso la eficacia de la absorción se puede aumentar sustancialmente incorporando lípidos catiónicos en el tensioactivo, usando péptidos (por ejemplo oligo-Arg9 y péptidos de tipo TAT) o incorporando anticuerpos que se dirigen a moléculas de superficie celular específicas.

Las propiedades de una emulsión se pueden controlar principalmente mediante las propiedades del reactivo de imagenología mismo, la naturaleza de los tensioactivos y/o solventes usados, y el procesamiento (por ejemplo, sonicación, etc.). Los métodos para formar emulsiones de PFPE se describen extensamente en las patentes en EE UU Nos. 5.330.681 y 4.990.283, Una fase continua de un compuesto polihidroxilado, tal como polialcoholes y sacáridos en solución acuosa concentrada puede ser eficaz. Los siguientes polialcoholes y sacáridos han demostrado ser particularmente eficaces: glicerol, xilitol, manitol, sorbitol, glucosa, fructosa, sacarosa, maltitol, compuestos diméricos de glicerol (diglicerol o bi(2,3-di-hidroxipropil) éter, compuestos polihidroxilados sólidos solubles en agua como azúcares y productos de condensación de glicerol como triglicerol y tetraglicerol. La dispersión en emulsión se puede realizar en presencia de tensioactivos convencionales, incluyendo tensioactivos catiónicos, aniónicos, anfóteros y no iónicos, siendo preferibles los tensioactivos iónicos. Los ejemplos de

tensioactivos adecuados incluyen lauril sulfato de sodio, sulfosuccinato (hemiéster sulfosuccínico), coco-anfocarboxiglicinato, cetil fosfato de potasio, alquil-polioxi-etileno-éter carboxilato de sodio, cloruro de potasio y benzalconio, alquil amidopropil betaina, alcohol cetílico-estearílico etoxilado, y monooleato sorbitano-etoxilato (20) Tween 20. Mientras que se pueden usar las ecuaciones termodinámicas para intentar predecir mezclas de reactivos de imagenología que darán emulsiones que tienen los tamaños de partícula y estabilidad deseados, generalmente se acepta que los ensayos reales de varias mezclas serán los más eficaces. La emulsificación de mezclas es simple y rápida, lo que permite el ensayo rápido de una amplia gama de combinaciones para identificar las que dan lugar a emulsiones que son adecuadas para su uso en los métodos divulgados en el presente documento.

3. Células y marcaje

Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar con una amplia de células, incluyendo células tanto procariotas como eucariotas, y preferiblemente células de mamífero excepto células madre embrionarias humanas. Las tecnologías para la preparación de células incluyen cultivo celular, clonación, transferencia nuclear, modificación genética y encapsulación.

Una lista parcial de células de mamífero incluye: células sanguíneas, mioblastos, células de médula ósea, células de sangre periférica, células de sangre de cordón umbilical, cardiomiocitos (y precursores de los mismos), condrocitos (células de cartílago), células dendríticas, tejido neural fetal, fibroblastos, hepatocitos (células del hígado), células de islotes del páncreas, queratinocitos (células de la piel) y células madre. En ciertas formas de realización preferidas, las células que se van a usar son una población fraccionada de células inmunitarias. Las subpoblaciones reconocidas de células inmunitarias incluyen los linfocitos, tal como linfocitos B (receptores Fc, MHC de clase II, CD19+, CD21+), linfocitos T cooperadores (CD3+, CD4+, CD8-), linfocitos T citolíticos (CD3+, CD4-, CD8+), células citolíticas naturales (CD16+), los fagocitos mononucleares, incluyendo monocitos, neutrófilos y macrófagos, y células dendríticas. Otros tipos de células que pueden ser de interés incluyen eosinófilos y basófilos.

Las células pueden ser autólogas (es decir, derivadas del mismo individuo) o singénicas (es decir, derivadas de un individuo genéticamente idéntico, tal como un hermano de camada singénico o un gemelo idéntico), aunque las células alógenas (es decir, células derivadas de un individuo genéticamente diferente de la misma especie) también se contemplan. Aunque menos preferidas, las células xenógenas (es decir, derivadas de una especie diferente que el receptor), tal como células de cerdos transgénicos, también se pueden administrar. Cuando las células del donante son xenógenas, se prefiere que las células se obtengan de un individuo de una especie en el mismo orden, más preferiblemente la misma superfamilia o familia (por ejemplo, cuando el receptor es un ser humano, se prefiere que las células deriven de un primate, más preferiblemente un miembro de la superfamilia Hominoidea).

Las células, donde sea médica y éticamente apropiado, se obtienen de cualquier estadio de desarrollo del donante individual, incluyendo prenatal (por ejemplo, embrionario o fetal), lactante (por ejemplo, desde el nacimiento hasta aproximadamente tres años de edad en seres humanos), niño (por ejemplo, desde aproximadamente tres años de edad hasta aproximadamente 13 años de edad en seres humanos), adolescente (por ejemplo, desde aproximadamente 13 años de edad hasta aproximadamente 18 años de edad en seres humanos), adulto joven (por ejemplo, desde aproximadamente 18 años de edad hasta aproximadamente 35 años de edad en seres humanos), adulto (por ejemplo, desde aproximadamente 35 años de edad hasta aproximadamente 55 años de edad en seres humanos), o viejo (por ejemplo, desde aproximadamente 55 años de edad y más allá de esa edad en seres humanos).

En muchas formas de realización, las células se marcan poniendo en contacto las células con una emulsión del reactivo de imagenología, de modo que el reactivo es absorbido por las células. Se pueden marcar tanto células fagocíticas como no fagocíticas por tal método. Por ejemplo, como se demuestra en el presente documento, se pueden marcar tanto células dendríticas (fagocíticas) como células de gliosarcoma (no fagocíticas) poniendo en contacto las células con una emulsión del reactivo de imagenología.

En ciertas formas de realización las células que se van a marcar son células madre. Las terapias de células madre se usan comúnmente como parte de una pauta ablativa para el tratamiento de cáncer con alta dosis de radiación y/o agentes quimioterapéuticos. Las pautas ablativas generalmente emplean células madre hematopoyéticas, o poblaciones de células que contienen células madre hematopoyéticas, según se puedan obtener, por ejemplo, de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea. Se pueden marcar células de este tipo, o una parte de las mismas, y seguirlas in vivo para verificar la supervivencia e incorporación del injerto en la localización apropiada. Otros tipos de células madre son cada vez más atractivas como agentes terapéuticos para una amplia variedad de trastornos.

Como un ejemplo, las células pueden ser células madre embrionarias de ratón, o células ES de otro animal modelo. El marcaje de tales células puede ser útil en seguir el destino de tales células administradas a ratones, opcionalmente como parte de un programa de investigación preclínica para desarrollar tratamientos de células madre embrionarias. Los ejemplos de células madre embrionarias de ratón incluyen: la línea de células ES JM1 descrita en M. Qiu et al., Genes Dev 9, 2523 (1995), y la línea ROSA line descrita en G. Friedrich, P. Soriano, Genes Dev 5, 1513 (1991), y células ES de ratón descritas en la patente en EE UU No. 6.190.910. Muchas otras líneas de

ES de ratón están disponibles de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Los ejemplos de células madre embrionarias humanas incluyen las disponibles a través de los siguientes suministradores: Arcos Bioscience, Inc., Foster City, California, CyThera, Inc., San Diego, California, BresaGen, Inc., Athens, Georgia, ES Cell International, Melbourne, Australia, Geron Corporation, Menlo Park, California, Universidad de Goteburgo, Goteburgo, Suecia, Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia, Maria Biotech Co. Ltd. — Maria Infertility Hospital Medical Institute, Seúl, Corea, MizMedi Hospital — Universidad Nacional de Seúl, Seúl, Corea, National Centre for Biological Sciences/Tata Institute of Fundamental Research, Bangalore, India, Pochon CHA University, Seúl, Corea, Reliance Life Sciences, Mumbai, India, Technion University, Haifa, Israel, Universidad de California, San Francisco, California, y Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wisconsin. Además, se describen ejemplos de células madre embrionarias en las siguientes patentes y solicitudes de patentes publicadas en EE UU: 6.245.566; 6.200.806; 6.090.622; 6.331.406; 6.090.622; 5.843.780; 20020045259; 20020068045. Se describen células ES humanas seleccionadas de la lista de líneas celulares aprobadas suministrada por los Institutos Nacionales de Salud y accesible en <http://escr.nih.gov>. Se describe una línea de células madre embrionarias seleccionada del grupo que consiste en: línea WA09 obtenida del Dr. J. Thomson (Univ. de Wisconsin) y las líneas UC01 y UC06, ambas en el registro actual del NIH.

En ciertas formas de realización, una célula madre para su uso en los métodos divulgados es una célula madre de origen neural o neuroendocrino, tal como una célula madre del sistema nervioso central (véase, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 6.468.794; 6.040.180; 5.753.506; 5.766.948), cresta neural (véase, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 5.589.376; 5.824.489), el bulbo olfatorio o tejidos neurales periféricos (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente en EE UU publicadas 20030003574; 20020123143; 20020016002 y Gritti et al. 2002 J Neurosci 22(2):437-45), la médula espinal (véase, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 6.361.996, 5.851.832) o un linaje neuroendocrino, tal como la glándula suprarrenal, hipófisis o ciertas partes del intestino (véase, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 6.171.610 y células PC12 como se describe en Kimura et al. 1994 J. Biol. Chem. 269: 18961-67). En formas de realización preferidas, se obtiene una célula madre neural de un tejido periférico o un tejido sanado fácilmente, proporcionando de esta manera una población autóloga de células para trasplante.

Se pueden emplear células madre hematopoyéticas o mesenquimatosas en ciertos métodos divulgados. Estudios recientes sugieren que células madre hematopoyéticas derivadas de médula (HSC) y mesenquimatosas (MSC), que se aíslan fácilmente, tienen un potencial de diferenciación más amplio que el previamente reconocido. Las HSC purificadas no solo dan lugar a células en la sangre, sino que también se pueden desarrollar a células normalmente derivadas de endodermo, como hepatocitos (Krause et al., 2001, Cell 105: 369-77; Lagasse et al., 2000 Nat Med 6: 1229-34). Similarmente, se espera que las HSC de sangre periférica y de sangre de cordón umbilical proporcionen un espectro útil de potencial de desarrollo. Las MSC parecen ser similarmente multipotentes, produciendo progenie que puede, por ejemplo, expresar marcadores de células neurales (Pittenger et al., 1999 Science 284: 143-7; Zhao et al., 2002 Exp Neurol 174: 11-20). Los ejemplos de células madre hematopoyéticas incluyen las descritas en las patentes en EE UU Nos. 4.714.680; 5.061.620; 5.437.994; 5.914.108; 5.925.567; 5.763.197; 5.750.397; 5.716.827; 5.643.741; 5.061.620. Los ejemplos de células madre mesenquimatosas incluyen los descritos en las patentes en EE UU Nos. 5.486.359; 5.827.735; 5.942.225; 5.972.703, las descritas en las publicaciones PCT nos. WO 00/53795; WO 00/02654; WO 98/20907, y las descritas en Pittenger et al., y Zhao et al., anteriormente.

Las líneas de células madre preferiblemente derivan de mamíferos, tal como roedores (por ejemplo, ratón o rata), primates (por ejemplo, monos, chimpancés o seres humanos), cerdos, y rumiantes (por ejemplo, vacas, oveja y cabras), y particularmente de seres humanos. En ciertas formas de realización, las células madre derivan de una fuente autóloga o una fuente coincidente de tipo de HLA. Por ejemplo, las células madre se pueden obtener de un sujeto en necesidad de células productoras de hormonas pancreáticas (por ejemplo, pacientes diabéticos en necesidad de células productoras de insulina) y cultivar para generar células productoras de insulina autólogas. Otras fuentes de células madre se obtienen fácilmente de un sujeto, tal como células madre de tejido muscular, células madre de la piel (dermis o epidermis) y células madre de grasa.

En algunas formas de realización preferidas, las células para la administración a un ser humano deben cumplir las directrices de buena práctica de tejidos impuestas por la Agencia de Alimentos y Fármacos de EE UU (FDA) o agencia reguladora equivalente en otro país. Los métodos para desarrollar tal línea celular pueden incluir ensayos del donante y evitar la exposición de células y productos no humanos.

Las células derivadas de un donante (opcionalmente el paciente es el donante) se pueden administrar como células sin fraccionar o fraccionadas, según dicte el fin de las células que se van a administrar. Las células se pueden fraccionar para enriquecer ciertos tipos de células antes de la administración. Los métodos de fraccionamiento se conocen bien en la técnica, y generalmente implican tanto la selección positiva (es decir, retención de células basado en una propiedad particular) como la selección negativa (es decir, eliminación de células basado en una propiedad particular). Como será aparente para el experto en la materia, las propiedades particulares (por ejemplo, marcadores de superficie) que se usan para la selección positiva y negativa dependerán de la población de células deseada. Los métodos usados para la selección/enriquecimiento de células pueden incluir tecnología de inmunofluorescencia o métodos de centrifugación de densidad. La tecnología de inmunofluorescencia puede tomar una variedad de formas, como se sabe bien en la técnica, pero generalmente utiliza un anticuerpo o derivado de

anticuerpo en combinación con algún tipo de tecnología de segregación. La tecnología de segregación generalmente produce la segregación física de células unidas por el anticuerpo y células no unidas por el anticuerpo, aunque en algunos casos se puede usar tecnología de segregación que mata las células unidas por el anticuerpo para la selección negativa.

5 Se puede utilizar cualquier tecnología de inmunofinidad adecuada para la selección/enriquecimiento de las células seleccionadas que se van a usar, incluyendo separación celular activada por fluorescencia (FACS), absorción, separación inmunomagnética, cromatografía de inmunofinidad, fijación del complemento mediada por anticuerpos, inmunotoxina, segregación por gradiente de densidad, y similares. Después del procesamiento en el proceso de
10 inmunofinidad, las células deseadas (las células unidas por el reactivo de inmunofinidad en el caso de la selección positiva, y las células no unidas por el reactivo de inmunofinidad en el caso de selección negativa) se recogen y bien se someten a rondas adicionales de selección de inmunofinidad/enriquecimiento o se reservan para la administración al paciente.

15 La selección de inmunofinidad/enriquecimiento típicamente se lleva a cabo incubando una preparación de células que comprende el tipo de célula deseado con un anticuerpo o reactivo de afinidad derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo específico para un marcador de superficie determinado), después utilizando el reactivo de afinidad unido para seleccionar bien a favor o contra las células a las que el anticuerpo está unido. El proceso de selección generalmente implica una separación física, tal como puede lograrse dirigiendo gotas que contienen
20 células individuales a diferentes envases dependiendo de la presencia o ausencia de reactivo de afinidad unido (FACS), utilizando un anticuerpo unido (directa o indirectamente) a un sustrato de fase sólida (absorción, cromatografía de inmunofinidad), o utilizando un campo magnético para recoger las células que están unidas a partículas magnéticas a través del reactivo de afinidad (separación inmunomagnética). Alternativamente, las células indeseables se pueden eliminar de la preparación usando un reactivo de afinidad que dirige un ataque citotóxico a
25 las células unidas por el reactivo de afinidad. El ataque citotóxico se puede activar por el reactivo de afinidad (por ejemplo, fijación del complemento) o puede estar localizado a las células diana por el reactivo de afinidad (por ejemplo, inmunotoxina, tal como cadena B de la ricina).

Aunque se espera que los métodos divulgados en el presente documento se usen frecuentemente para el
30 seguimiento *in vivo* de células, se debe indicar que las metodologías son igualmente eficaces para el seguimiento de células en cultivo, en una muestra de tejido u otro material celular *ex vivo*. Para usos terapéuticos, las células se pueden marcar en un paso deseado durante la preparación para la administración al paciente.

35 Se pueden usar una variedad de métodos para marcar células con reactivos de imagenología. En general, las células se colocarán en contacto con el reactivo de imagenología de modo que el reactivo de imagenología se asocie con la célula. Las condiciones con frecuencia serán condiciones de cultivo celular estándar diseñadas para mantener la viabilidad celular. El término "asociado" se pretende que abarque cualquier manera por la cual el reactivo de imagenología y la célula permanecen en proximidad física suficientemente cerca durante una cantidad suficiente de tiempo para permitir que el reactivo de imagenología proporcione información útil sobre la posición de
40 la célula, sea *in vivo* o *in vitro*. El reactivo de imagenología se puede localizar intracelularmente, por ejemplo, después de fagocitosis o entrada mediada por tensioactivo en la célula. Las células inmunitarias, tal como las células dendríticas, macrófagos y células T son muy fagocíticas y los datos presentados en el presente documento y en otros estudios demuestran que tales células, y otros tipos de células fagocíticas, se marcan fácilmente. Un estudio [21] en el modelo animal de encefalomieltis alérgica experimental (EAE) mostró que se pudieron detectar monocitos, marcados *in situ* después de una inyección embolada de PFPE emulsionado, en el SNC usando ¹⁹F IRM. También se pueden marcar otros tipos de células, tal como células madre, independientemente de la actividad fagocítica. El reactivo de imagenología se puede insertar en una membrana celular o unir de forma covalente o no covalente a un componente extracelular de la célula. Por ejemplo, ciertos fluorocarbonos lineales descritos en el presente documento se pueden derivar para unir una o más fracciones de direccionamiento. Una fracción de direccionamiento se seleccionará para facilitar la asociación del reactivo de imagenología con la célula que se va a marcar. Una fracción de direccionamiento se puede diseñar para producir la inserción no específica del fluorocarbono en una membrana celular (por ejemplo, una secuencia de aminoácido hidrofóbico u otra fracción hidrofóbica tal como una fracción palmitoilo o fracción miristoilo) o para facilitar la entrada no específica en la célula. Una fracción de
50 direccionamiento se puede unir a un componente de la superficie celular, como en el caso de ligandos de receptores. Una fracción de direccionamiento puede ser un miembro de un par de unión específico, donde el compañero es un componente de la superficie celular. La fracción de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un ligando para un receptor, o un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal o cualquiera de los varios agentes de unión polipeptídicos que comprenden una parte variable de una inmunoglobulina (por ejemplo, fragmento Fv, fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, anticuerpo de dominio individual, anticuerpo camelizado, anticuerpo humanizado, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos).
60

Donde se van a usar células en una pauta terapéutica, se han usado varios métodos para la administración de células incluyendo inyecciones y uso de dispositivos especiales para implantar células en varios órganos. La presente invención no está unida a ningún método de administración particular. Los datos presentados en el
65 presente documento demuestran que las células marcadas se pueden seguir independientemente de si las células se administran directamente a un sitio particular o se administran sistémicamente. Se tomaron imágenes con éxito

de CD marcadas después de una implantación focal directamente en tejidos o una inyección intravenosa. Las células se pueden insertar en un dispositivo de administración que facilita la introducción por inyección o implantación en los sujetos. Tales dispositivos de administración pueden incluir tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y líquidos en el cuerpo de un sujeto receptor. En una forma de realización preferida, los tubos tienen además una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la cual las células de la invención se pueden introducir en el sujeto en una localización deseada. Las células se pueden preparar para la administración en una variedad de formas diferentes. Por ejemplo, las células se pueden resuspender en una solución o gel o incluir en una matriz soporte cuando están contenidas en tal dispositivo de administración. Las células se pueden mezclar con un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las células de la invención permanecen viables. Los soportes y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones tampones acuosas, solventes y/o medios de dispersión. El uso de tales soportes y diluyentes se conoce bien en la técnica. La solución es preferiblemente estéril y líquida. Preferiblemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. Las soluciones de la invención se pueden preparar incorporando células como se describen en el presente documento en un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según se requiera, otros ingredientes enumerados anteriormente, seguido por esterilización por filtración.

4. Técnicas de resonancia magnética nuclear

Como se describe en el presente documento, se pueden usar técnicas de resonancia magnética nuclear para detectar poblaciones de células marcadas. El término “detectar” se usa para incluir cualquier esfuerzo para determinar la presencia o ausencia de una molécula o célula marcada, particularmente por una técnica de resonancia magnética nuclear. El término “detectar” también se pretende que incluya medidas más sofisticadas, incluyendo medidas cuantitativas y generación de imágenes bi o tridimensionales. Por ejemplo, se puede usar IRM para generar imágenes de tales células. En muchos casos, las células marcadas se pueden administrar a un sujeto vivo. Después de la administración de las células, alguna parte del sujeto, o el sujeto entero, se puede examinar por IRM para generar un conjunto de datos de IRM. Un “conjunto de datos”, como el término se usa en el presente documento, se pretende que incluya datos brutos reunidos durante el ensayo de resonancia magnética del material objeto, así como información procesada, transformada o extraída de los datos brutos. Los ejemplos de información procesada incluyen representaciones pictóricas bidimensionales o tridimensionales del material objeto. Otro ejemplo de información extraída es una puntuación que representa la cantidad o concentración de reactivo de imagenología de señal de ^{19}F en el material objeto. Por ejemplo, se puede medir y usar la relación de señal a ruido (SNR) de la señal de ^{19}F para calcular la abundancia de células marcadas. Este tipo de datos se puede recoger en una única región del sujeto, tal como, por ejemplo, el bazo u otro órgano de relevancia particular para las células marcadas. Las células marcadas se pueden examinar en contextos diferentes que en el sujeto. Puede ser deseable examinar las células marcadas en cultivo. En ciertas formas de realización, las células marcadas se pueden aplicar a o generar en una muestra de tejido o cultivo de tejido, y por tanto se pueden tomar imágenes de las células marcadas en esos contextos también. Por ejemplo, un órgano, tejido u otro material celular trasplantado se puede poner en contacto con un reactivo de imagenología para generar células marcadas antes de la implantación de tal trasplante en un sujeto.

En general, los agentes de marcaje de la invención se diseñan para su uso en sistemas de detección de IRM convencionales. En la implementación más común de IRM, se observa el núcleo de hidrógeno (protón, ^1H) en moléculas de agua móvil contenidas en materiales objeto. Para detectar los marcadores divulgados en el presente documento, se detecta un núcleo alternativo, ^{19}F . La ^{19}F IRM tiene solo sensibilidad ligeramente menor comparada con ^1H ; la sensibilidad relativa es aproximadamente 0,83. Ambos tienen un espín de +1/2. La abundancia isotópica natural de ^{19}F es del 100%, que es comparable al 99,985% para ^1H . Los principios físicos detrás de la detección y formación de imágenes son los mismos tanto para IRM de ^1H como de ^{19}F . El material objeto se coloca en un campo magnético estático grande. El campo tiende a alinear el momento magnético asociado con los núcleos de ^1H o ^{19}F a lo largo de la dirección del campo. Los núcleos se perturban del equilibrio por radiación de radiofrecuencia pulsada (RF) a la frecuencia de Larmor, que es una frecuencia característica proporcional a la potencia del campo magnético donde los núcleos absorben energía resonantemente. Tras eliminar la RF, los núcleos inducen un voltaje transitorio en una antena receptora; este voltaje transitorio constituye la señal de resonancia magnética nuclear (RMN). La formación espacial está codificada tanto en la frecuencia como en la fase de la señal de RMN por la aplicación selectiva de gradientes de campo magnético que se superponen sobre el campo estático grande. Los voltajes transitorios generalmente se digitalizan, y después estas señales se pueden procesar, por ejemplo, usando un ordenador para dar imágenes.

A una potencia constante de campo magnético, la frecuencia de Larmor de ^{19}F solo es ligeramente menor (~6%) comparada con ^1H . Por tanto, es sencillo adaptar los escáneres de IRM convencionales, tanto hardware como software, para adquirir datos de ^{19}F . La detección de ^{19}F se puede acoplar con diferentes tipos de barridos de resonancia magnética, tal como IRM, ERM u otras técnicas. Típicamente, será deseable obtener una imagen de IRM de ^1H para comparar frente a la imagen de ^{19}F . En un organismo vivo u otro tejido biológico, la IRM del protón proporcionará una imagen del material objeto y permitirá definir el contexto anatómico de las células marcadas detectadas en la imagen de ^{19}F . En una forma de realización preferida de la invención, los datos se recogen tanto

para ^{19}F como ^1H durante la misma sesión; el sujeto no se mueve durante estas adquisiciones para asegurar mejor que los dos conjuntos de datos están en registro espacial. Normalmente, los conjuntos de datos de ^{19}F y ^1H se adquieren secuencialmente, en cualquier orden. Alternativamente, con las modificaciones apropiadas al hardware y/o software del instrumento de IRM, ambos conjuntos de datos se pueden adquirir simultáneamente, por ejemplo, para conservar el tiempo de imagenología. Se pueden acoplar otras técnicas de imagenología, tal como detección de fluorescencia con ^{19}F IRM. Esto será particularmente deseable donde el reactivo de imagenología de fluorocarbono se ha derivado con una fracción fluorescente.

El examen de IRM se puede realizar según cualquier metodología adecuada conocida en la técnica. Se han desarrollado muchos tipos diferentes de secuencias de pulsos de IRM, o el conjunto de instrucciones usadas por el aparato de IRM para orquestar la recogida de datos, y técnicas de procesamiento de señal (por ejemplo, reconstrucción de transformada de Fourier y proyección) a lo largo de los años para la recogida y procesamiento de datos de imágenes (por ejemplo, véase *Magnetic Resonance Imaging, Tercera Edición*, editores D.D. Stark y W.G. Bradley, Mosby, Inc., St. Louis MO 1999). Los reactivos y métodos de esta invención no están unidos a ninguna secuencia de pulso de imagenología o método de procesamiento particular de señales brutas de RMN. Por ejemplo, los métodos de IRM que se pueden aplicar a esta invención abarcan ampliamente imagenología basada en eco de espín, eco estimulado, eco en gradiente, desintegración sin inducción, y cualquier combinación de las mismas. Las técnicas de imagenología rápidas, donde se adquieren más de una línea en espacio k o grandes segmentos de espacio k de cada señal excitada, también son muy estables para adquirir los datos de ^{19}F (o ^1H). Los ejemplos de técnicas de imagenología rápida incluyen planteamientos de eco de espín (por ejemplo, FSE, turbo SE, TSE, RARE o HASTE), imagenología de eco planar (EPI), técnicas combinadas de eco en gradiente y eco de espín (por ejemplo, GRASE), imagenología espiral, e imagenología de adquisición rápida. El desarrollo de métodos nuevos y mejorados de secuencia de pulso y procesamiento de señal es un campo en continua evolución, y los expertos en la materia pueden imaginar múltiples formas para tomar imágenes de células marcadas con ^{19}F en su contexto anatómico.

Como otro ejemplo de una técnica de resonancia magnética nuclear, se puede usar ERM para detectar la presencia de células marcadas con fluorocarbono en tejidos u órganos localizados. Normalmente, los métodos de ERM se implementan en un escáner de IRM convencional. Con frecuencia el volumen de interés (VOI) localizado se define en un escáner de ^1H IRM convencional. Posteriormente la magnitud de la señal de ^{19}F RMN observada en el VOI se relaciona directamente al número de células detectadas, y/o la concentración media de PFPE por célula presente en el tejido u órgano. Los métodos para aislar un VOI en un sujeto mucho mayor se conocen bien en la técnica (por ejemplo, *Magnetic Resonance Imaging, Tercera Edición*, Capítulo 9, Editores D.D. Stark y W.G. Bradley, Mosby, Inc., St. Louis MO 1999). Los ejemplos incluyen usar una espiral superficial de RF localizada cerca del VOI, deterioro de superficie, métodos de gradiente B_1 de espiral de superficie, técnicas de gradiente B_0 de sección selectiva, STEAM, PRESS, espectroscopía *in vivo* de imagen selectiva (ISIS), e imagenología espectroscópica de resonancia magnética (MRSI). El desarrollo de métodos nuevos y mejorados de secuencia de pulso y procesamiento de señal es un campo en continua evolución para ERM, y los expertos en la materia pueden imaginar múltiples formas detectar señales de ^{19}F RMN que emanan de las células marcadas con fluorocarbono en los VOI.

Esta solicitud se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solamente para fines de ilustración de ciertos aspectos y formas de realización de la presente solicitud, y no se pretende que limiten la solicitud.

Ejemplos

En esta sección, se presentan datos que demuestran la factibilidad de la invención. La forma de realización ejemplar de esta invención usa reactivo de imagenología basados en flúor para marcar células cultivadas. Las células marcadas se introducen en un sujeto vivo y se siguen *in vivo* usando ^{19}F IRM. Las imágenes de ^{19}F IRM se superponen con imágenes de ^1H IRM para establecer la localización anatómica de las células marcadas.

1. Propiedades de RMN de células dendríticas marcadas con PFPE

Estos datos demuestran el marcaje *in vitro* de células inmunitarias con PFPE. Se incubaron células dendríticas (CD) de una líneas celular derivada de piel fetal (FSDC) [24] en condiciones fisiológicas durante 4 horas en medio de cultivo (que contenía RPMI-1640, suero bovino fetal al 10%, estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, penicilina 100 U/ml, y glutamina 2 mM) con partículas en emulsión de PFPE (es decir, perfluoro-15-corona-5 éter). Las células se lavaron después a fondo del exceso de PFPE, y se colocaron 3×10^6 células en un tubo capilar de RMN. Un espectro de ^{19}F RMN típico de FSDC se muestra en la figura 1. Este espectro se obtuvo a (282 MHz) usando un espectrómetro de RMN de alta resolución estándar. Se observó un único pico de RMN del PFPE en las CD con buena relación de señal a ruido (figura 1). La anchura de línea de RMN (anchura completa a semimáximo) es ~ 150 Hz, que es lo suficientemente estrecha para aplicaciones de IRM. Un compuesto con ^{19}F de referencia (ácido trifluoroacético) se colocó en un tubo separado cerca del capilar que contenía las CD (figura 1). Comparando las áreas integradas bajo los dos picos se puede cuantificar el número total de moléculas PFPE absorbidas por las células. Otros tipos de células se han marcado con PFPE, y se obtuvieron resultados similares. La figura 1b muestra los espectros de ^{19}F RMN para células de gliosarcoma 9L de rata, esplenocitos enriquecidos en células T, y macrófagos marcados con PFPE. Los datos en la figura 1b se obtuvieron usando procedimientos de medida y marcaje similares a (a). Las

células de gliosarcoma 9L de rata (ATCC, Manassas, VA) se cultivaron de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecido SBF al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, y estreptomycin 100 µg/ml. El PFPE se premezcló con Lipofectamina, y después se añadió al cultivo celular y se incubó durante 4 horas. Las células se lavaron a fondo, se precipitaron y se ensayaron con ^{19}F RMN (figura 1b). Los esplenocitos enriquecidos en células T se obtuvieron de un ratón C57BL/6J. El bazo se recogió, aplastó entre portaobjetos de vidrio, y se resuspendió en RPMI con SBF al 5%. Los glóbulos rojos se eliminaron. El enriquecimiento en células T se alcanzó incubando células en una columna de nailon preparada para eliminar las células adherentes. Las células restantes se marcaron con PFPE en suspensión incubando la emulsión en condiciones fisiológicas en RPMI con SBF al 10% durante 3 horas. No se usó Lipofectamina para estas células. Las células se recogieron después y se cargaron en un tubo de centrífuga con una solución de Ficoll para limpiar la suspensión celular de cualquier PFPE restante. Después de la centrifugación, las células precipitan en el fondo del tubo y el PFPE permanece en el Ficoll. El precipitado celular se recuperó y analizó con ^{19}F RMN. Los macrófagos eran una línea celular de ratón adherente EOC-20 (ATCC); estos se cultivaron en medio DMEM suplementado según las instrucciones del suministrador. Se añadió PFPE al medio de cultivo y se incubó durante la noche. Las células se lavaron después a fondo, se recogieron y precipitaron para ^{19}F RMN. Como en el caso con las células T, no se usó Lipofectamina en el marcaje de los macrófagos, ya que estas células son muy fagocíticas y absorben fácilmente las partículas en emulsión.

Los solicitantes han marcado con éxito varios tipos diferentes de CD, incluyendo CD derivadas de médula ósea (MBDC) y CD de una línea celular derivada de piel fetal [24] (FSDC). Los solicitantes también han marcado con éxito macrófagos, células T y células de gliosarcoma y los resultados indican que la eficacia de marcaje es comparable a la que se observa en las CD. Los espectros de ^{19}F RMN tomados en suspensiones de células intactas se han usado para confirmar el marcaje intracelular de PFPE y para cuantificar la cantidad de absorción.

2. IRM *in vitro* de CD marcadas con PFPE

Para confirmar que las células inmunitarias marcadas con PFPE son útiles para IRM, se realizó imagenología de ^{19}F *in vitro* de suspensiones de CD. Se marcaron FSDC de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Se preparó un fantoma incrustando dos tubos capilares de vidrio de 1 mm de diámetro en agarosa, donde cada tubo capilar contenía 3×10^6 CD en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Uno de los tubos capilares contenía células sin marcar (control). Se colocó el fantoma en una espiral de superficie de RF construida en el laboratorio que se podía volver hacia ^1H o ^{19}F mientras estaba en la superficie interior del imán. Las imágenes se adquirieron usando una secuencia de eco de espín 2DFT estándar en un sistema 11.7 T MRI. La figura 2 muestra los resultados de imagenología, donde el panel izquierdo es la imagen de ^1H y el panel derecho es la imagen de ^{19}F . La imagen de ^{19}F muestra una única mancha intensa en la región que contiene el tubo capilar con las células marcadas. No se pudieron detectar artefactos de desplazamiento químico. La imagen de ^{19}F no tenía señal de ^1H de fondo; lo que demuestra la alta selectividad de la tecnología de imagenología.

3. IRM *in vitro* de células inmunitarias marcadas con PFPE

Las células marcadas con PFPE se pueden visualizar en sujetos vivos usando IRM en una variedad de condiciones. Se tomaron imágenes de las CD marcadas después de una implantación focal directamente en tejidos o una inyección intravenosa. Estos datos muestran que la sensibilidad de la tecnología de imagenología es suficiente para su uso *in vivo* con una variedad de métodos de administración de células.

En un conjunto de experimentos se inyectaron 3×10^6 FSDC marcadas con PFPE en PBS directamente en el músculo cuádriceps de un lado de un ratón. Los métodos de marcaje eran similares a los descritos anteriormente. Los datos de las imágenes se adquirieron ~4 horas tras la inyección. La pierna inyectada se colocó sobre una espiral de superficie construida en el laboratorio que se podía volver hacia ^1H o ^{19}F . Las imágenes se adquirieron durante un periodo de ~2 horas en un ratón anestesiado. Se obtuvieron imágenes para ambos núcleos usando una secuencia de eco de espín 2DFT estándar en un sistema 11.7 T MRI. Los resultados típicos se muestran en la figura 3. Nótese que la señal de ^{19}F parece seguir hacia arriba desde el sitio de inyección. Este movimiento puede representar la migración de las CD al ganglio linfático de drenaje; se sabe que una pequeña proporción de CD inyectadas de esta manera se puede encontrar en ganglios linfáticos en horas. También nótese que en la imagen de ^1H se observa una pequeña cantidad de hiperintensidad en músculo en la misma localización que las células marcadas, lo que es consistente con la presencia de células inflamatorias residentes y las CD implantadas.

La figura 4 demuestra la capacidad de las CD marcadas con PFPE de migrar a ganglios linfáticos *in vivo*. En este experimento se inyectaron 3×10^6 FSDC marcadas directamente en la punta de la almohadilla de la pata delantera. Las imágenes se adquirieron usando parámetros similares como en la figura 3. Aproximadamente 4 horas después, una imagen de la pata inyectada muestra que las células han migrado y acumulado en el ganglio linfático poplíteo localizado adyacente a la rodilla (figura 4). La pierna sin inyectar (derecha) no muestra señal de ^{19}F .

En otros estudios, se investigó la factibilidad de imagenología de CD marcadas con PFPE sistémicamente después de una inyección intravenosa. Se tomaron imágenes del torso de ratón *in vivo*, y se visualizaron regiones que contenían una acumulación concentrada de células marcadas. En estos experimentos, $\sim 10 \times 10^6$ FSDC se marcaron usando el mismo método que anteriormente y se inyectaron a través de la vena de cola. Se muestran datos

representativos en la figura 5. En este corte oblicuo a través del torso la señal de ^{19}F es más aparente en el hígado, bazo y posiblemente los pulmones (figura 5).

4. Estudios de fenotipo de CD marcadas con PFPE

Los solicitantes han realizado varios experimentos para determinar si el marcaje de CD con PFPE altera el fenotipo celular. Se han realizado experimentos de separación celular activada por fluorescencia (FACS) en cultivos primarios de BMDC y en la línea de FSDC. Las CD primarias se recogieron de células de médula ósea extraídas de ratones NOD. Las células de BM se cultivaron en presencia de GM-CSF durante 4 días como se ha descrito previamente [1]. El cuarto día se añadieron condiciones de maduración a algunas de las células, que consistían en $\text{TNF}\alpha$ + PEG_2 , y las células restantes se cultivaron con GM-CSF solo. Las CD cultivadas en solo GM-CSF tienen un fenotipo inmaduro caracterizado por bajos niveles de expresión de moléculas coestimuladoras, mientras que $\text{TNF}\alpha$ y PEG_2 aumentan la expresión de estas moléculas así como los niveles de producción de citoquina IL-12p70. Las células se marcaron con PFPE como se describe anteriormente. Las CD se purificaron por separación celular magnética usando microbolas magnéticas recubiertas con anti-CD11c. El fenotipo de las células se determinó por análisis de citometría de flujo para la expresión de marcadores de CD y específicos de maduración. La capacidad de estas células de secretar IL-12 se determinó incubando las CD con células J558 transfectadas con CD40L durante 48 horas. Cuando las células se marcaron con compuestos de PFPE no se observaron cambios en el fenotipo (figura 6). También se observaron resultados similares obtenidos para la línea de CD (datos no mostrados).

5. Microscopía electrónica de CD marcadas con PFPE

Para esclarecer la distribución intracelular de las partículas en emulsión de PFPE, se realizó microscopía electrónica (ME) en células marcadas. La figura 7 muestra resultados típicos en una única célula. Las partículas en emulsión son enseguida aparentes en grandes números (figura 7a) y aparecen como esferoides lisos. Las partículas parecen estar compartimentalizadas en regiones que son consistentes con vacuolas fagocíticas (figura 7b). La tinción con osmio usada para destacar las estructuras intracelulares también tiende a delinear los límites de las partículas de PFPE (figura 7b).

Se marcaron FSDC con partículas en emulsión de PFPE como se ha descrito anteriormente. Las CD se lavaron después, precipitaron y fijaron con PBS que contenía glutaraldehído al 2% a temperatura ambiente durante 30 minutos y se mantuvieron durante la noche a 4°C. Las células se lavaron tres veces en PBS y se trataron con OsO_4 al 1% en PBS durante 10 minutos. Todas las muestras se lavaron tres veces en H_2O y se deshidrataron en una serie ascendiente de etanol. Se usó óxido de propileno (OP) como un solvente transicional. Las células se infiltraron durante la noche en una solución que contenía una mezcla 1:1 de OP y Epon-Araldite (EA). Al día siguiente la mezcla se sustituyó con EA al 100%, y la muestra se colocó en un desecador durante 8 horas. La muestra se colocó en cápsulas de plástico que contenían EA y se polimerizó a 60°C durante 48 horas. Se cortaron secciones finas (0,1 μm) usando un microtomo y se colocaron en rejillas de Cu de malla 200. Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo acuoso al 1% y citrato de plomo Reynolds. Se tomaron imágenes de las secciones usando un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 7100.

6. Tiempo de retención intracelular de emulsiones de PFPE

Se realizaron experimentos para estimar el tiempo de retención intracelular de las partículas de PFPE *in vitro* en FSDC. Los resultados muestran que hay poca o ninguna tendencia para que las células degraden o excreten el PFPE a lo largo del tiempo. En el inicio experimental, se sembraron numerosas placas de cultivo de tejido idénticas con FSDC y se marcaron todas con PFPE como se describe anteriormente. Después del marcaje, se eliminaron los agentes de PFPE en exceso en el medio por lavado a fondo. Las células se incubaron después en condiciones fisiológicas durante una semana. En varios tiempos durante el curso de una semana, se lavaron CD en una única placa de cultivo de cualquier PFPE liberado al medio. Las células se recogieron después, se precipitaron y la concentración de PFPE intracelular restante se ensayó adquiriendo espectros de ^{19}F RMN de los precipitados (como se describe en la sección 1). La figura 8 muestra la evolución temporal para la retención de PFPE durante un periodo de una semana. Durante los ~2 días iniciales se produjo división celular a una velocidad rápida normal; esto indica que el PFPE no afectó a la división celular ni es tóxico. Después del periodo inicial de ~2 días las células se volvieron confluentes en las placas y se produjo algo de pérdida celular como se esperaba. Consecuentemente, la señal de ^{19}F parece aumentar en las CD restantes debido a la recaptación de las partículas de PFPE que se liberaron por las células apoptóticas lisadas.

7. Aumento de la eficacia de marcaje con PFPE usando lípidos catiónicos

Los experimentos en esta sección demuestran que la incorporación de lípidos catiónicos en el tensioactivo para generar emulsiones de PFPE aumenta la absorción celular (figura 9). Para cada punto de datos en la figura 9, 1×10^6 FSDC se marcaron con PFPE como se describe en la sección 1. Se premezclaron varias cantidades de lípidos catiónicos (Lipofectamina™, Invitrogen Inc.) con la emulsión de PFPE antes de que se añadiera al medio. Después del periodo de incubación, las células se lavaron a fondo del exceso de PFPE, se precipitaron y se ensayó el contenido de PFPE a partir de la señal de ^{19}F RMN normalizada como se ha descrito anteriormente. Los resultados

muestran que se puede alcanzar un aumento drástico en la absorción celular para un intervalo de concentraciones de Lipofectamina (figura 9). Se observó aproximadamente un aumento de 26 veces en la absorción a los niveles más altos de lipofectamina estudiados (figura 9). Los resultados de ME en células fijadas confirmaron que las partículas de PFPE eran intracelulares.

8. Citotoxicidad de PFPE y efectos en la proliferación celular

PFPE esencialmente no tiene efectos tóxicos en las células después de la absorción. Después del marcaje con PFPE se determinó la fracción de células que sobreviven usando el ensayo de citotoxicidad Vybrant (Molecular Probes, Eugene, OR). Este ensayo mide la liberación de una enzima específica (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, G6PD) del citoplasma en el medio de cultivo circundante, y es un método muy aceptado para estimar el número de células no viables en una población. La G6PD reduce el NAD⁺ suministrado en la mezcla de reacción a NADH, que a su vez favorece la reducción de la resazurina no fluorescente a la resorufina fluorescente. En una hora se puede medir la citotoxicidad en tan solo 500 células usando un lector de microplacas. Los solicitantes incubaron las FSDC durante 3 horas a 37°C con PFPE, PFPE más el agente de transfección Lipofectamina (para aumentar la absorción intracelular), Lipofectamina sola, y células sin mezclar. Las células se lavaron después, se contaron y sembraron en microplacas de 96 pocillos. En los tiempos 0, 18 y 24 después del marcaje las células se ensayaron según las direcciones del fabricante. La figura 10 muestra los resultados. En conjunto, hay o poca ninguna toxicidad aparente para todos los tiempos estudiados.

Para probar si el marcaje con PFPE tenía algún efecto adverso sobre la proliferación celular, los solicitantes han usado dos métodos complementarios, incluyendo los ensayos de MTT y de ADN bicatenario (ADNbc) total. El ensayo mitocondrial, o MTT (ATCC, Manassas, VA), proporciona información sobre la respuesta de las células a factores externos. El metil tiazol tetrazolio (MTT) amarillo se reduce a formazán púrpura por deshidrogenasas en las mitocondrias intactas. Después de la lisis celular la absorbancia del formazán se cuantifica fotométricamente en un lector de microplacas de 96 pocillos. Se prepararon las células marcadas con PFPE y los controles de forma idéntica a los descritos para el ensayo de citotoxicidad de G6PD (anteriormente). Siguiendo las instrucciones del fabricante, la proliferación por MTT se ensayó 0, 18 y 24 horas después del marcaje. La figura 11a muestra la absorción de MTT normalizada frente al tiempo. No se observan diferencias significativas entre los grupos.

También se puede medir con precisión el número total de células a lo largo del tiempo por técnicas fluorescentes. Los solicitantes han usado el kit de cuantificación de ADNbc fluorométrico azul FluoReporter (Molecular Probes, Eugene, OR) que contiene un tinte que penetra en las células (Hoechst 33258). Tras unirse de forma no intercalante a regiones ricas en A/T del ADNbc, la fuente de fluorescencia del bis-bencimidazol aumenta linealmente con el número de células en la muestra. Se prepararon FSDC marcadas y controles de manera idéntica a como para los ensayos de MTT y citotoxicidad de G6PD. Las células se ensayaron 0, 18 y 24 horas después del marcaje según las instrucciones del fabricante usando un lector de microplacas. Los resultados se muestran en la figura 11b. Se observó poca o ninguna diferencia significativa en la proliferación celular entre células marcadas y células sin marcar.

9. Reactivos de imagenología de PFPE lineal

Se sintetizó un óxido de polietileno lineal de 1.600 MW terminado con grupo funcionales de éster metílico según los métodos descritos en la patente en EE UU no. 5.539.059. Los solicitantes han sintetizado con éxito emulsiones del éster de PFPE lineal (figura 12a). Hasta aquí, el producto final se ha caracterizado por ¹⁹F RMN (figura 12b) y ME (figura 13a). Este material da una resonancia de ¹⁹F RMN principal con un pequeño pico lateral que es aceptable para aplicaciones de IRM. Si es necesario, se pueden usar pulsos de RF saturante fuera de resonancia para eliminar fantasmas de imágenes del pico pequeño. Los datos de ME se usaron para ensayar el tamaño de partícula de la emulsión. La figura 13b muestra un histograma de tamaños de partícula calculados de múltiples micrografías de ME. Los tamaños se calcularon de una manera automatizada usando un programa de software comercial (Scion Corp., Fredrick, MD). Se calculó que el tamaño medio de partícula era 42 ± 19 nm (el error es la desviación estándar). Este tamaño de partícula es menor que las emulsiones de perfluoro-15-corona-5 éter usadas para los resultados mostrados anteriormente, y el menor tamaño es adecuado para la tecnología de imagenología. Para hacer estas emulsiones, se calentó el éster dimetílico de PFPE con polietilenglicol (PEG) 600 MW y O-(2-aminoetil)-O-metil polietilenglicol 750 (Sigma-Aldrich) a 85°C durante 48 horas. Se usó una relación molar 2:1 de PEG:PFPE. Se añadieron cloruro de metileno y lecitina (de fosfolípidos de huevo, Sigma, St. Louis, MS) a la mezcla y se desecó en nitrógeno puro. Se añadió H₂O destilada, y la mezcla se sonicó durante 3 minutos para formar emulsiones.

El éster de PFPE lineal reacciona fácilmente para producir derivados con una gama de propiedades. La química de reacción de los grupos terminales de los polietilenglicoles se entiende bien y se puede explotar para preparar una gama de reactivos de imagenología conjugados. Como se esboza en la figura 14, se pueden unir fracciones hidrofílicas y lipofílicas a este PFPE formando conjugados solubles en agua y solubles en lípidos, respectivamente. El acoplamiento de grupos polietilenglicol (PEG) a este PFPE hará un copolímero tribloque con regiones solubles en agua en cada extremo y una región hidrofóbica en el centro (figura 14, Rxn 1). Las propiedades de los copolímeros tribloque se ajustan variando el tamaño de las secciones de PEG relativas a la sección de PPO. Se sabe que los copolímeros en bloque que contienen secciones solubles en agua, fluorocarbono e hidrocarbono se segregan en

dominios con cada tipo de polímero asociándose solo consigo mismo [46]. Se espera que el copolímero PEG-PFPE-PEG se comporte de forma similar, formando micelas con un núcleo de PFPE rodeado por una cubierta de PEG soluble en agua. Los bloques amino-PEG están comercialmente disponibles con una gama de pesos moleculares. El acoplamiento del núcleo de PFPE con otros grupos, tales como aminas alifáticas (figura 14, Rxn 2 y 4a) y fosfatidiletanolamina (figura 14, Rxn 3) en lugar de las secciones de PEG, dará derivados con diferentes características de solubilidad. Se pueden preparar agentes de modo dual compuestos de PFPE con grupos terminales de colorantes fluorescentes, tal como Cy5 (figura 14, Rxn 4b). Como es el caso para las proteínas etiquetadas fluorescentemente, los colorantes fluorescentes pueden actuar como marcadores para la distribución y localización de los conjugados en las células y se pueden usar con análisis por FACS y microscopía óptica.

Como se ha preparado previamente, el perfluoro-15-corona-5 éter se puede emulsionar en una mezcla de lecitina al 2% y aceite de cártamo al 2% usando sonicación, formando gotas medias de ~100-200 nm. Se pueden usar muchas otras composiciones de tensioactivos (por ejemplo, Pluronic) que conocen los expertos en la materia en la formación de emulsiones similares. También se pueden formar micelas de los derivados del PFPE lineal por sonicación. La emulsificación de perfluoropoliéteres ha sido descrita por Visca, et al. [44] y Brunetta [43]. Estos procedimientos se usarán como base para producir emulsiones de derivados de PFPE. La alta solubilidad en agua de los colorante Cy producirá micelas similares a las parejas PEG-PFPE. Se pueden añadir tensioactivos adicionales, tal como lecitina, según sea necesario para producir micelas pequeñas, estables. La formación de micelas se puede optimizar para contenido máximo de PFPE.

El contenido final de PFPE de las emulsiones y micelas se puede medir usando ¹⁹F RMN relativo a una concentración conocida de ácido trifluoroacético. El tamaño medio d partícula de cada emulsión se puede estimar por técnicas de ME o dispersión de luz. También se pueden usar las micrografías de ME o dispersión de luz para calcular histogramas de diámetros de partículas.

En caso de conflicto, la presente solicitud, incluyendo cualquier definición en el presente documento, controlará.

1. Feili-Hariri, M., et al., *Immunotherapy of NOD mice with bone marrow-derived dendritic cells*. Diabetes, 1999. 48: p. 2300-2308.
2. Pluchino, S., et al., *Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis*. Nature, 2003. 422(6933): p. 688-694.
3. Yeh, T.C., et al., *In-vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles*. Magn Reson Med, 1995. 33: p. 200-208.
4. Schulze, E., et al., *Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro*. Invest Radiol, 1995. 30(10): p. 604-10.
5. Moore, A., R. Weissleder, y A. Bogdanov, *Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages*. JMRI-Journal of Magnetic Resonance Imaging, 1997. 7(6): p. 1140-1145.
6. Weissleder, R., et al., *Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging*. JMRI-Journal of Magnetic Resonance Imaging, 1997. 7(1): p. 258-263.
7. Schoepf, U., et al., *Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies*. Biotechniques, 1998. 24(4): p. 642-+.
8. Ye, Q., et al., *In vivo detection of acute rat renal allograft rejection by MRI with USPIO particles*. Kidney International, 2002. 61(3): p. 1124-1135.
9. Dousset, V., et al., *In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance*. Magnetic Resonance in Medicine, 1999. 41(2): p. 329-333.
10. Josephson, L., et al., *High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-tat peptide conjugates*. Bioconjugate Chemistry, 1999. 10(2): p. 186-191.
11. Dodd, C.H., et al., *Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles*. Journal of Immunological Methods, 2001. 256(1-2): p. 89-105.
12. Ahrens, E.T., et al., *Receptor-mediated endocytosis of iron-oxide particles provides efficient labeling of dendritic cells for in vivo MR imaging*. Magn. Reson. Med., 2003. 46(6): p. 1006-1013.
13. Hoehn, M., et al., *Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: A highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. 99(25): p. 16267-16272.
14. Lewin, M., et al., *Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells*. Nature Biotechnology, 2000. 18(4): p. 410-414.
15. Kanno, S., et al., *Macrophage accumulation associated with rat cardiac allograft rejection detected by magnetic resonance imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles*. Circulation, 2001. 104(8): p. 934-938.
16. Fishman, J.E., et al., *Oxygen-sensitive 19F NMR imaging of the vascular system in vivo*. Magn Reson Imaging, 1987. 5(4): p. 279-85.
17. Eidelberg, D., et al., *19F NMR imaging of blood oxygenation in the brain*. Magn Reson Med, 1988. 6(3): p. 344-52.
18. Dardzinski, B.J. y C.H. Sotak, *Rapid tissue oxygen tension mapping using 19F inversion-recovery echo-planar imaging of perfluoro-15-crown-5-ether*. Magn Reson Med, 1994. 32(1): p. 88-97.

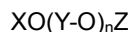
19. Noth, U., et al., *In-vivo measurement of partial oxygen-pressure in large vessels and in the reticuloendothelial system using fast 19F-MRI*. Magn Reson Med, 1995. 34(5): p. 738-745.
20. Lutz, J., et al., *Measurement of oxygen tensions in the abdominal cavity and in the skeletal muscle using 19F-MRI of neat PFC droplets*. Oxygen Transport to Tissue Xix, 1997. 428: p. 569-572.
- 5 21. Duong, T.Q. y S.G. Kim, *In vivo MR measurements of regional arterial and venous blood volume fractions in intact rat brain*. Magn. Reson. Med., 2000. 43(3): p. 393-402.
22. McGoron, A.J., et al., *Perfluorocarbon distribution to liver, lung and spleen of emulsions of perfluorotributylamine (FTBA) in pigs and rats and perfluorooctyl bromide (PFOB) in rats and dogs by F-19 NMR-spectroscopy*. Artificial Cells Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology, 1994. 22(4): p. 1243-1250.
- 10 23. Noth, U., et al., *Perfluoro-15-crown-5-ether labelled macrophages in adoptive transfer experimental allergic encephalomyelitis*. Artificial Cells Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology, 1997. 25(3): p. 243-254.
24. Girolomoni, G., et al., *Establishment of a cell-line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin*. European Journal of Immunology, 1995. 25(8): p. 2163-2169.

15 **Equivalentes**

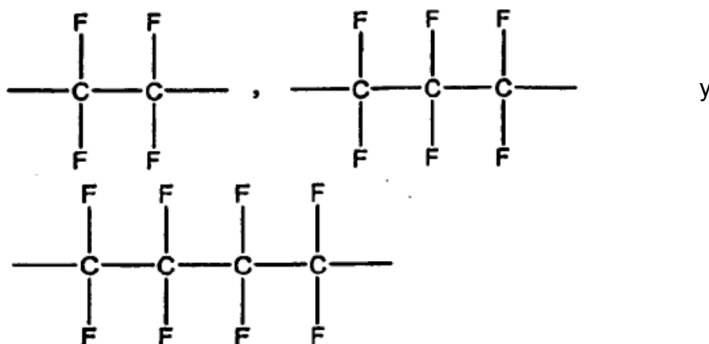
Mientras que formas de realización específicas de las invenciones objeto se divulgan explícitamente en el presente documento, la especificación anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones de las invenciones serán
 20 aparentes para los expertos en la materia tras la revisión de esta especificación y las reivindicaciones posteriores. El ámbito completo de las invenciones se debe determinar por referencia a las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para marcar una célula, el método comprende poner en contacto la célula ex vivo con un reactivo de imagenología de fluorocarbono en condiciones tales que el reactivo de imagenología de fluorocarbono se asocia con la célula, en donde dicha célula marcada se va administrar a un sujeto, en donde dichas células marcadas son detectables por imagenología de resonancia magnética de ¹⁹F y en donde dicha célula no es una célula madre embrionaria humana.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la célula se pone en contacto con el reactivo de imagenología de fluorocarbono en presencia de un reactivo que aumenta la absorción.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el reactivo que aumenta la absorción comprende un lípido catiónico.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el reactivo de imagenología de fluorocarbono se formula como una emulsión.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la emulsión comprende partículas que tiene un diámetro medio de entre 30 y 500 nm.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el reactivo de imagenología de fluorocarbono es un perfluoro-corona éter.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el reactivo de imagenología es perfluoro-15-corona-5 éter.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el fluorocarbono es un poliéter perfluorado que tiene una fórmula media:



en donde Y se selecciona del grupo que consiste en:



9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el reactivo de imagenología comprende una fracción funcional adicional.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la fracción funcional adicional es una fracción de detección.
11. El método de la reivindicación 8, en donde n=11.
12. El método de la reivindicación 8 u 11, en donde X y Z son perfluoroéteres terminados con un grupo carboxilo.
13. El método de la reivindicación 12, en donde cada carboxilo se deriva con un polietilenglicol.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde X y Z se derivan con una fracción de detección fluorescente.
15. El método de la reivindicación 1, en donde el reactivo de imagenología de fluorocarbono es un polímero de fluorocarbono lineal derivado en uno o más extremos del polímero con al menos una fracción funcional, en

donde la al menos una fracción funcional se selecciona del grupo que consiste en: una fracción de detección, una fracción hidrofílica, una fracción de direccionamiento y una fracción de absorción celular.

- 5 16. El método de la reivindicación 15, en donde el fluorocarbono lineal es un perfluoropoliéter lineal.
17. El método de la reivindicación 15 o 16, en donde la al menos una fracción funcional es una fracción de detección.
- 10 18. El método de la reivindicación 10 o de la reivindicación 17, en donde la fracción de detección se selecciona del grupo que consiste en: una fracción de detección fluorescente y una fracción de detección de TEP.
19. El método de la reivindicación 4, en donde la emulsión comprende un perfluoropoliéter y tiene un tamaño de partícula que varía de 10 a 500 nm.
- 15 20. El método de la reivindicación 19, en donde la emulsión es estable a temperaturas que varían de 4°C a 37°C.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que comprende además examinar al menos una parte del sujeto por una técnica de resonancia magnética nuclear, detectando de esta manera una célula marcada en un sujeto.
- 20 22. El método de la reivindicación 1, que comprende además recoger un conjunto de datos de ¹H.
23. El método de la reivindicación 22, que comprende además generar e incluir una imagen de ¹⁹F y una imagen de ¹H.
- 25 24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 21 a 23, en donde el reactivo de imagenología de fluorocarbono es un perfluoropoliéter.
25. El método de la reivindicación 24, en donde el reactivo de imagenología de fluorocarbono se selecciona del grupo que consiste en: un perfluoropoliéter lineal, un perfluoropoliéter cíclico y una mezcla de los mismos.
- 30 26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en donde la célula se va a administrar al sujeto como parte de una pauta terapéutica celular.
- 35 27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en donde la célula es una célula madre.
28. El método de la reivindicación 1, en donde una formulación celular marcada se va a administrar a un sujeto, la formulación comprende:
- 40 (a) una célula; y
(b) un reactivo de imagenología de fluorocarbono que se asocia con la célula.
29. El método de la reivindicación 28, en donde dicha formulación comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 30. El método de la reivindicación 28 o 29, en donde el reactivo de imagenología de fluorocarbono es un perfluoropoliéter.
31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 28 a 30, en donde al menos una parte del reactivo de imagenología de fluorocarbono se internaliza en la célula.
- 50 32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 28 a 31, en donde al menos una parte del reactivo de imagenología de fluorocarbono se asocia con la superficie extracelular de la célula.
33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 28 a 32, en donde el reactivo de imagenología de fluorocarbono se conjuga a una fracción de direccionamiento celular.
- 55 34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 28 a 33, en donde la fracción de direccionamiento celular comprende un anticuerpo que se une a un epítipo que está expuesto al medio extracelular.
- 60 35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 28 a 34, en donde el reactivo de imagenología de fluorocarbono se conjuga a una fracción de internalización.
36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 21 a 27 o 28 a 35, en donde la célula es una célula de mamífero.
- 65

37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 21 a 27 o 28 a 36, en donde la célula es una célula del sistema inmunitario.
- 5 38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 21 a 27 o 28 a 37, en donde la célula es una célula dendrítica.
39. El método de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 38, en donde la célula se prepara para su uso en una pauta terapéutica celular.
- 10 40. El método de la reivindicación 1, en donde dichas células detectables son células trasplantadas que se van a detectar en un receptor de trasplante.
41. El método de la reivindicación 40, en donde la localización y opcionalmente el tráfico de células marcadas se detecta en el receptor del trasplante.
- 15 42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 41, en donde el receptor del trasplante es un receptor de trasplante de médula ósea.
- 20 43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 42, en donde las células para el trasplante comprenden células madre hematopoyéticas.
44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 43, en donde las células para el trasplante derivan de médula ósea, sangre de cordón umbilical o sangre periférica.
- 25 45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 44, en donde el receptor del trasplante es un receptor de un órgano donante.
- 30 46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 45, en donde al menos una parte de las células del órgano donante están marcadas con reactivo de imagenología de fluorocarbono.

Figura 1

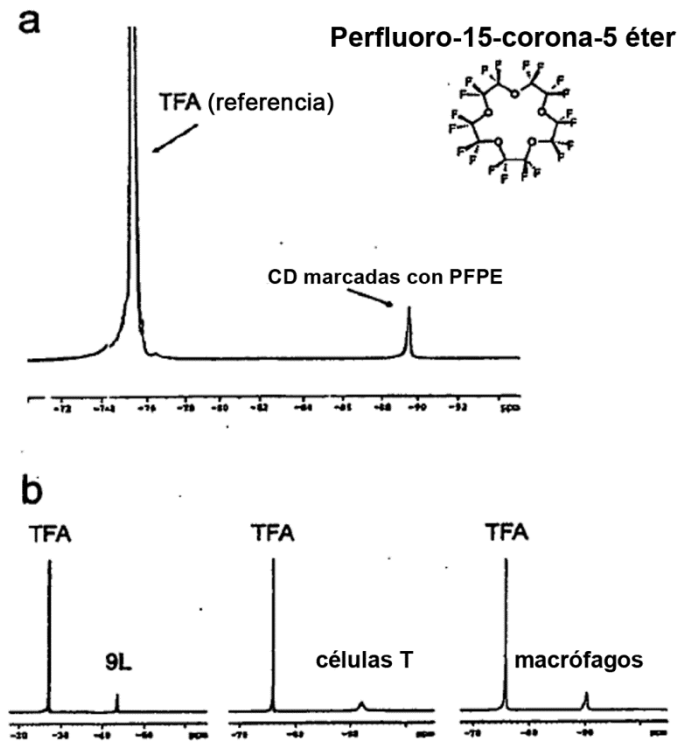


Figura 2

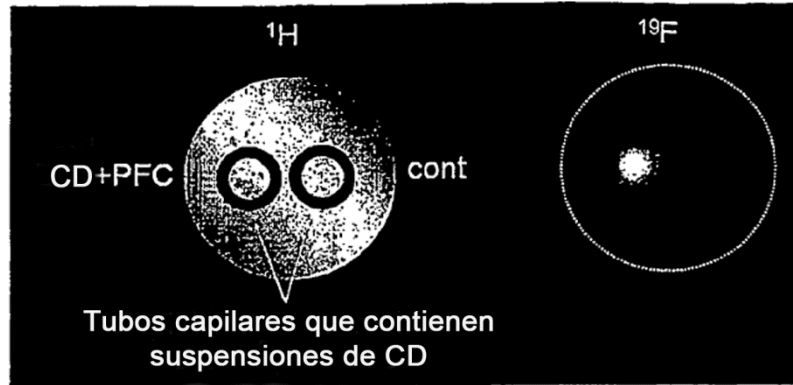


Figura 3

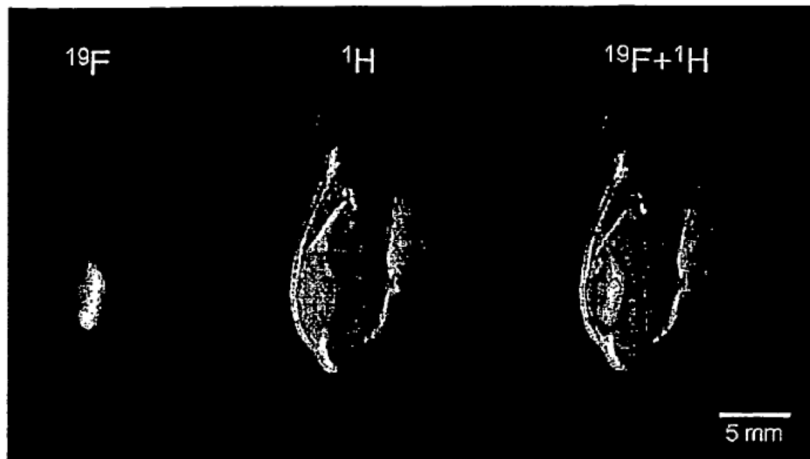


Figura 4

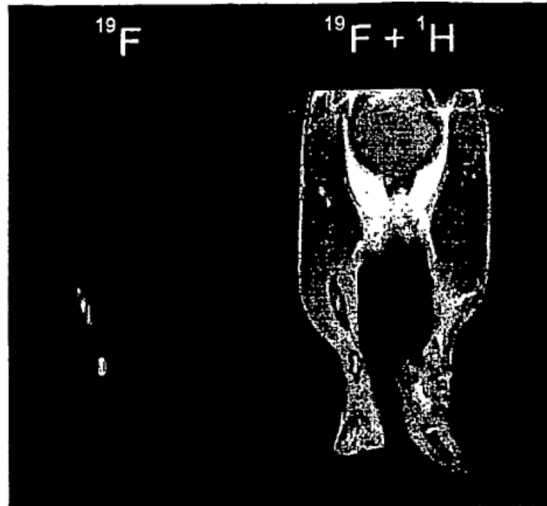


Figura 5

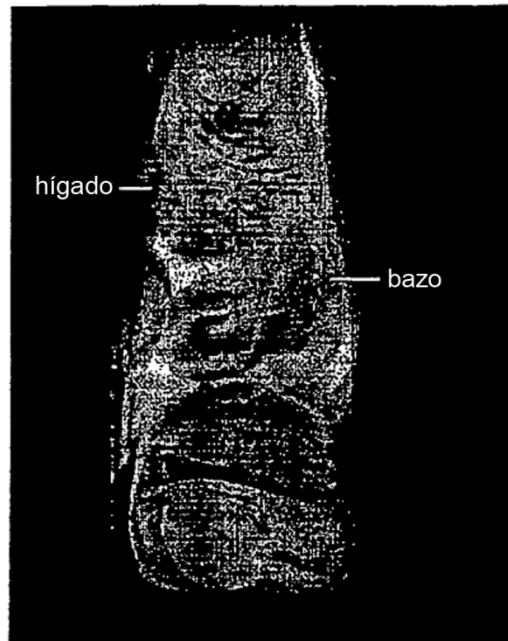


Figura 6

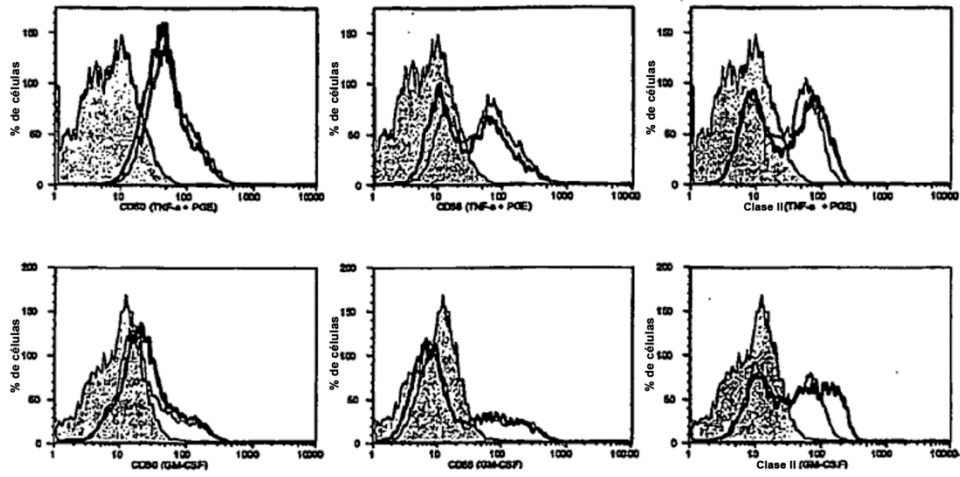


Figura 7

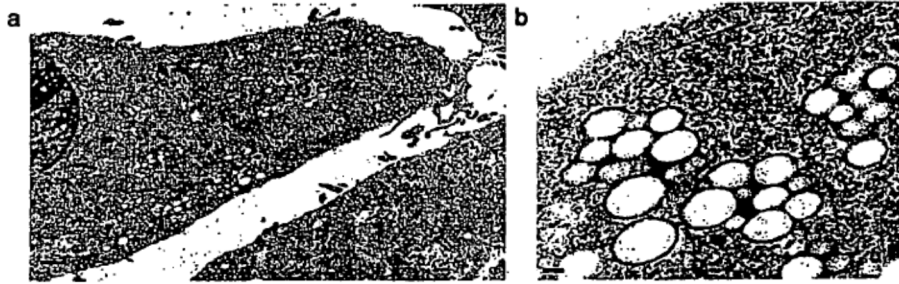


Figura 8

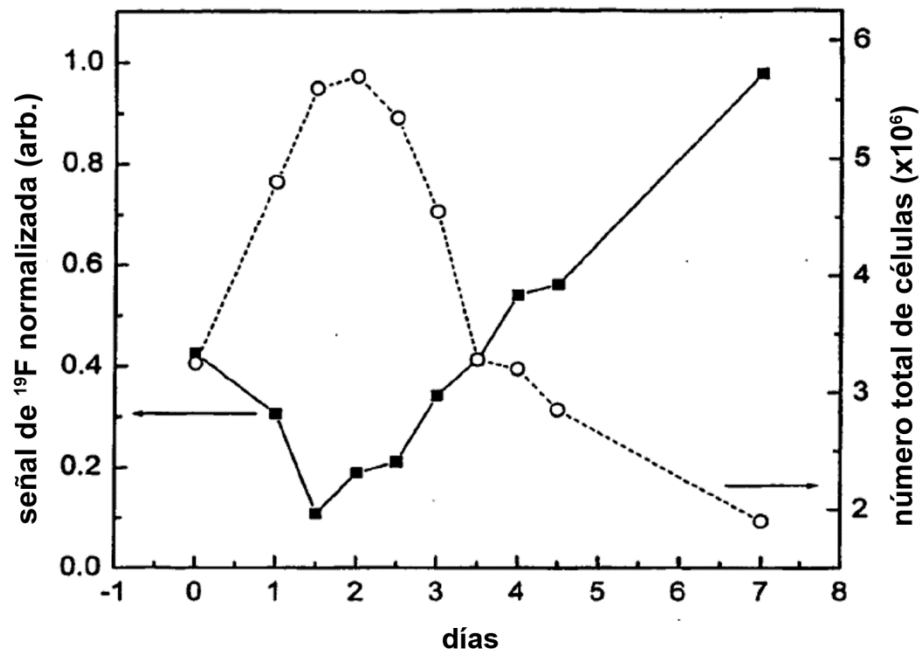


Figura 9

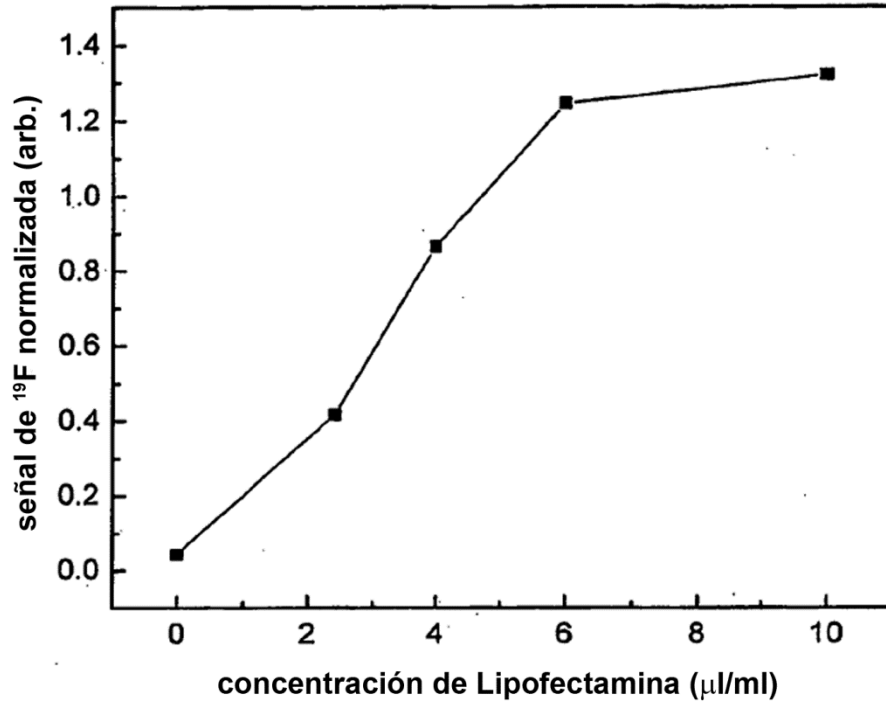


Figura 10

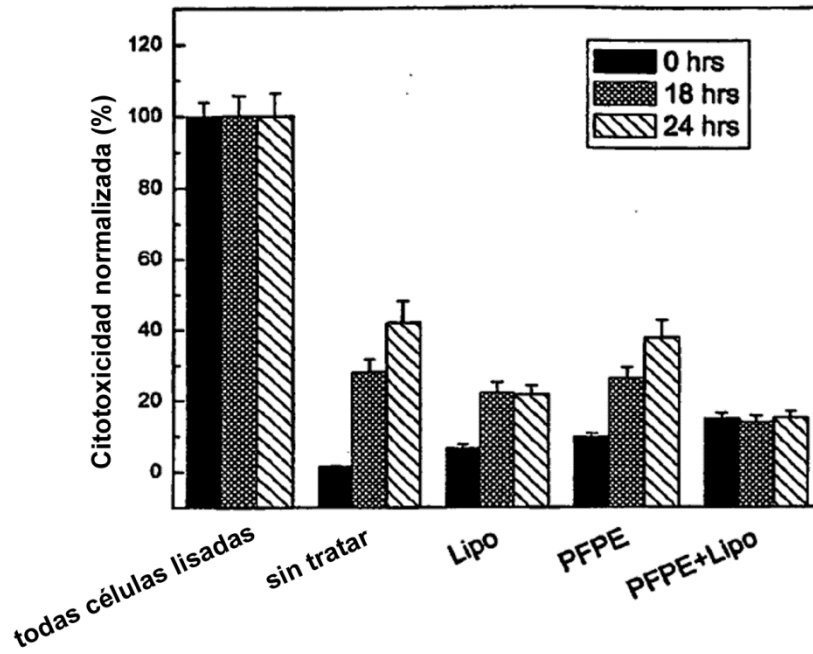


Figura 11

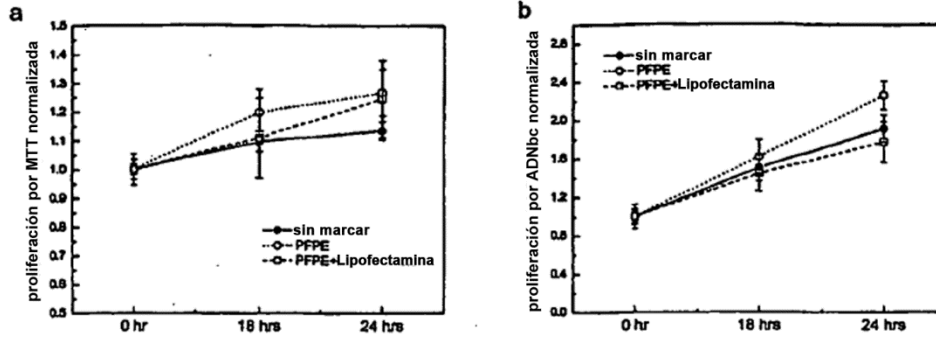


Figura 12

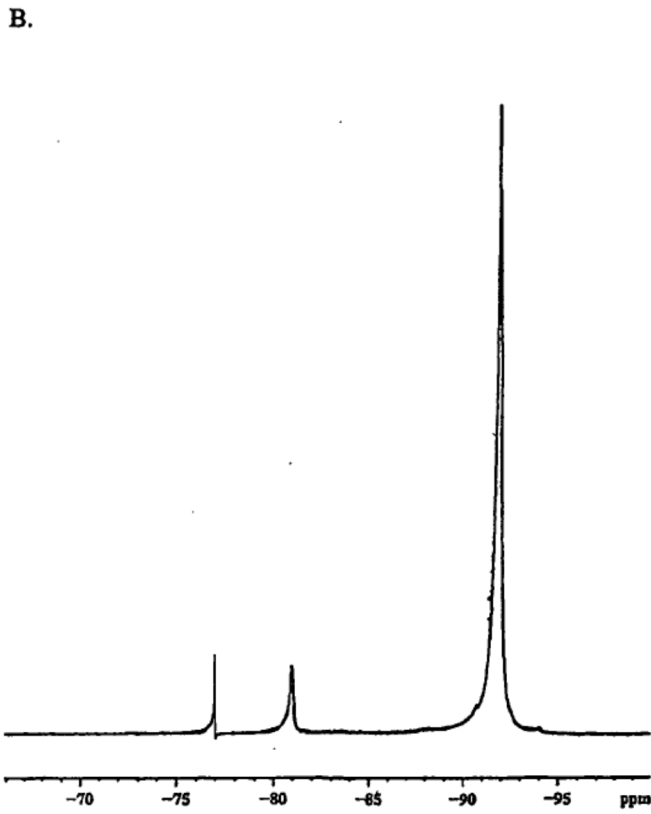
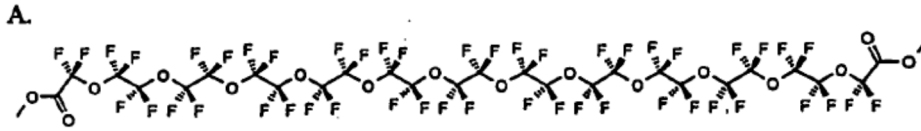


Figura 13

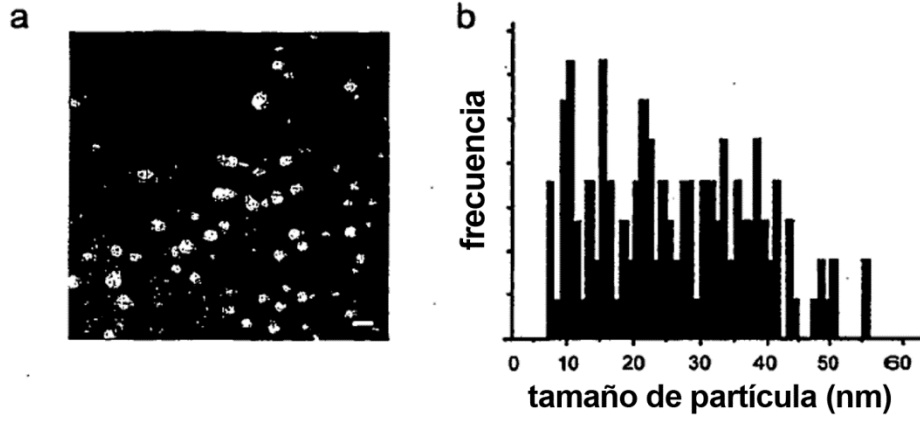
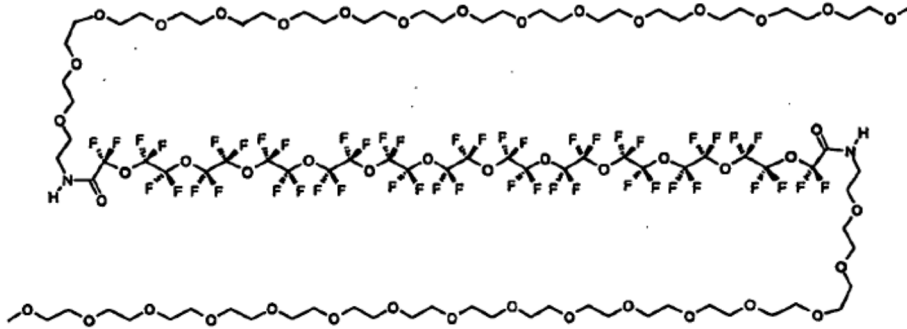
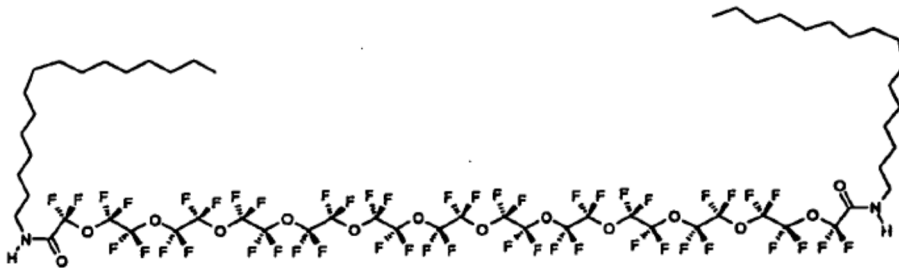


Figura 14

Rxn 1: éster de PFPE + O-aminoetil-O'-metil-PEG 750 → PEG2-PFPE



Rxn 2: éster de PFPE + hexadecilamina → bis-hexadecilamido-PFPE



Rxn 3: éster de PFPE + dimiristoil fosfatidil etanolamina → diPE-PFPE

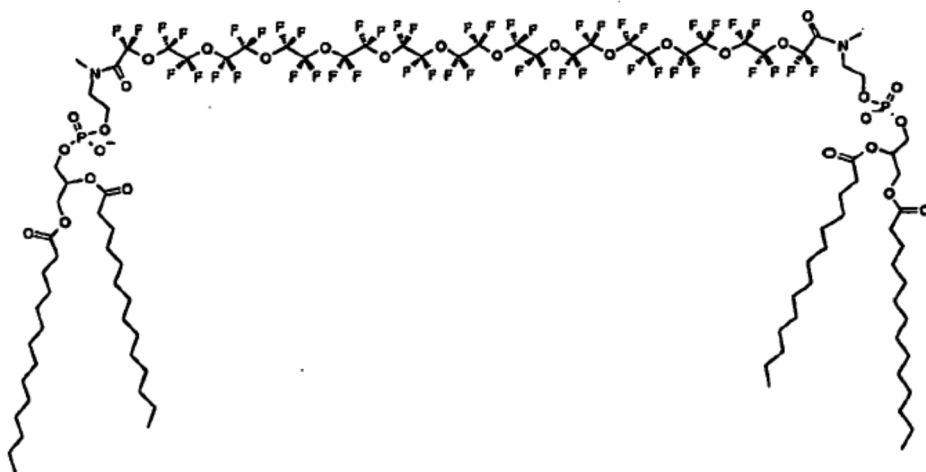


Figura 14 (cont.)

Rxn 4a: éster de PFPE + 1,6-diaminohexano → bis-aminohexil-PFPE-amida

Rxn 4b: bis-aminohexil-PFPE-amida + éster de Cy5-NHS → di-Cy-PFPE

