

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 051**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2007 PCT/EP2007/006349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2008 WO08003524**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2007 E 07765215 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2043697**

54 Título: **Eritrocitos que contienen medios de contraste para imagen por resonancia magnética**

30 Prioridad:

**03.07.2006 GB 0613183**

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

**01.03.2018**

73 Titular/es:

**ERYDEL S.P.A. (100.0%)  
Via Sasso 36  
Urbino, IT**

72 Inventor/es:

**MAGNANI, MAURO y  
ANTONELLI, ANTONELLA**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

ES 2 657 051 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

Eritrocitos que contienen medios de contraste para imagen por resonancia magnética

## CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La presente invención hace referencia a formulaciones de medios de contraste para IRM, así como a la preparación y utilización de tales formulaciones.

## INTRODUCCION

10 **[0002]** Existen diversos medios de contraste para IRM disponibles para distintas aplicaciones, incluidas: la detección de daños en los órganos o modificaciones patológicas, el estado y el tamaño de ganglios linfáticos, la detección de lesiones gastroentéricas que dan lugar a hemorragia, la presencia de masas tumorales en el cerebro u otros tejidos, lesiones renales y formación de imágenes del sistema circulatorio.

15 **[0003]** Si bien los medios de contraste para IRM más habituales son los quelatos de gadolinio (Gd), estos tienden a ser no específicos, con una acumulación rápida en el riñón, de manera que sólo se obtienen ventanas de imágenes de corta duración (Kubaska, 2001). Los quelatos de gadolinio muestran una extravasación rápida en el intersticio y los riñones los excretan rápidamente ( $t_{1/2} \approx 1,5$  h - Allkemper, 2002). Por lo tanto, se han de utilizar en combinación con técnicas de formación de imágenes rápidas con el fin de proporcionar el contraste de vaso sanguíneo en relación con tejido requerido.

20 **[0004]** En los últimos años, se han producido y utilizado nanopartículas superparamagnéticas como medios de contraste para IRM. Las nanopartículas superparamagnéticas constituyen medios de contraste para IRM excelentes, superiores a derivados de gadolinio, pero a pesar de diversos esfuerzos por mejorar su química de superficie y biocompatibilidad, su vida media en la circulación es corta y los macrófagos tisulares que envuelven dichos materiales las absorben rápidamente.

25 **[0005]** La relaxividad de los medios de contraste SPIO típicos es considerablemente superior que la relaxividad de otras moléculas paramagnéticas, tal como el gadolinio (Jung, 1995). Las partículas de óxido de hierro superparamagnéticas constituyen los primeros medios de contraste específicos del hígado clínicamente aprobados (Low, 1997; Halavaara, 2002) y en los últimos años se han utilizado en casi todos los ámbitos de las biociencias, biotecnología y aplicaciones biomédicas, incluido el contraste de intestino, la formación de imágenes de bazo, la formación de imágenes de ganglio linfático, la formación de imágenes de médula ósea, la formación de imágenes de perfusión y la angiografía para IRM (Wang, 2001).

30 **[0006]** Las propiedades importantes de las partículas magnéticas para aplicaciones biomédicas incluyen la no toxicidad, la biocompatibilidad, la inyectabilidad y la acumulación de alto nivel en el tejido u órgano diana, y la nanotecnología ha avanzado hasta un nivel que permite producir, caracterizar y adaptar específicamente las propiedades funcionales de las nanopartículas magnéticas para aplicaciones clínicas. Esto presenta como resultado la mejora de la calidad de la formación de imágenes por resonancia magnética y la elaboración de una variedad de partículas de óxido de hierro.

35 **[0007]** El óxido ferroso o férrico es el principal constituyente de las partículas magnéticas y, puesto que estas son atraídas por una densidad de flujo magnético elevada, se utilizan para el encauzamiento farmacéutico y para procesos de bioseparación, incluida la clasificación de células (Ito, 2005). El tamaño de partícula varía ampliamente e influye en sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas (Allkemper, 2002). En la actualidad, se distingue entre dos grupos de medios superparamagnéticos principales (Bonnemain, 1995): los SPIO (óxidos de hierro superparamagnéticos), cuyo tamaño, incluido el recubrimiento, es mayor que 50 nm y los USPIO (óxidos de hierro superparamagnéticos ultrapequeños) cuyo tamaño es menor que 50 nm. Esta diferencia de tamaño se traduce en diferencias considerables tanto en la proporción de relaxividad R2/R1, como en la vida media plasmática y en la biodistribución (Bonnemain, 1998; Reimer, 1998).

40 **[0008]** La agregación debida a las fuerzas de atracción asociadas a las nanopartículas de magnetita se evita mediante la creación de una doble capa electrostática, normalmente mediante la utilización de tensioactivos poliméricos que funcionan como estabilizador estérico, tal como ácido dimercaptosuccínico (DMSA, por sus siglas en inglés) (Morais, 2004), polímero de polisacárido (dextrano o derivados de dextrano), almidón, alcohol polivinílico (PVA, por sus siglas en inglés), polioxitileno (PEO, por sus siglas en inglés), polietilenglicol (PEG) o mediante modificación del punto isoeléctrico con un recubrimiento de citrato o de sílice (Cornell, 1991; Bacri, 1990). Las nanopartículas de óxido de hierro que más se suelen utilizar están recubiertas de dextrano y se toleran bien fisiológicamente (Babincova, 2000).

- [0009]** Las nanopartículas magnéticas también constituyen medios específicos potenciales para determinadas patologías, puesto que un fármaco inmovilizado en materiales magnéticos podría transportarse a través del sistema vascular y concentrarse en un punto particular en el cuerpo debido a la acción de un campo magnético externo. Para mejorar la especificidad, el fármaco se asocia, generalmente, a otra molécula capaz de reconocimiento específico y unión al sitio de destino. El tipo más común de moléculas asociadas son anticuerpos (y sus fragmentos), lectinas, proteínas, hormonas, moléculas cargadas y algunos ligandos de peso molecular bajo, tal como folato (Sudimack, 2000; Petri-Fink, 2005). Un ejemplo ampliamente divulgado de la administración de fármacos magnéticos es como una sustitución o para aumentar el tratamiento de quimioterapia/radioterapia (Lübbe, 2001; Hilger, 2002; Zhou, 2006).
- [0010]** Los SPIO pueden inyectarse por vía intravenosa, contando con la circulación sanguínea para transportar las partículas al área de interés. De forma alternativa, en muchos casos, la suspensión de partículas (ferrofluido) se inyecta directamente en la zona general que se desea tratar. Cualquiera de estas vías presenta el requisito de que las partículas no se agreguen y bloqueen su propia extensión.
- [0011]** La dispersión a la masa tisular general se favorece, presumiblemente, mediante gradientes de presión desde los vasos sanguíneos hasta los espacios tisulares. Partículas mayores, de 50-100 nm de diámetro, no se transportaron de esta manera y permanecieron en circulación o unidas a las paredes del sistema vascular, con el consiguiente riesgo de trombosis (Berry, 2003).
- [0012]** Asimismo, después de la administración por vía intravenosa de SPIO, los SPIO se recubren rápidamente de proteínas séricas (Davis, 1997). Este proceso de opsonización hace que el sistema de defensa principal del cuerpo, el sistema reticuloendotelial (RES, por sus siglas en inglés), reconozca las partículas. El RES es un sistema disperso de células fagocíticas especializadas que se asocian a la estructura tisular conjuntiva del hígado, bazo y ganglios linfáticos (Kreuter, 1994; Araujo, 1999). Las células macrófagas (Kupffer) del hígado y bazo cumplen una función primordial en la eliminación de partículas opsonizadas. Por lo tanto, la aplicación de nanopartículas *in vivo* requeriría la modificación de superficie que garantizaría que las partículas son estables al RES. La literatura informa tanto del recubrimiento de nanopartículas con diferentes moléculas, como de estrategias con las que se intenta inhibir la opsonización de componentes plasmáticos, de manera que se permiten tiempos de circulación mayores (Brigger, 2002; Moghimi, 2001).
- [0013]** Puesto que la velocidad de absorción de SPIO en el sistema reticuloendotelial está relacionada, de forma inversa, con su tamaño de partícula (Allkemper, 2002), la minimización de la superficie de partícula da lugar a una absorción de proteínas menor, lo que reduce la fagocitosis de las partículas, dando lugar, finalmente, a una retención intravascular prolongada.
- [0014]** Sean cuales sean los parámetros del ferrofluido, la vía de infusión, tal como la duración y la velocidad de la inyección, así como los parámetros fisiológicos, han de tenerse en cuenta para estas nuevas formas de aplicación farmacológica. Asimismo, existen problemas fundamentales asociados a la utilización de encauzamiento farmacéutico dirigido magnéticamente. El encauzamiento, por ejemplo, a un tipo de célula específico, puede ser posible con recubrimientos dirigidos, pero es difícil retener las partículas en las proximidades de la membrana celular durante cualquier duración de tiempo, puesto que la célula tiende a iniciar automáticamente la endocitosis mediada por receptor (Wilhelm, 2003).
- [0015]** Si bien se ha explorado una amplia variedad de tamaños y de materiales para prolongar el tiempo de circulación o para mejorar la especificidad de las nanopartículas, sus aplicaciones están limitadas por un RES que es muy eficaz en la eliminación de objetos extraños circulantes, y todavía no ha sido posible evitar esto con éxito (Gaur, 2000).
- [0016]** También se han llevado a cabo estudios sobre ferrofluidos encapsulados en eritrocitos para obtener el encauzamiento del fármaco atrapado hacia el lugar de acción. Sprandel *et al.*, han descrito la magnetización de fantasmas de eritrocitos, mientras que Vyas *et al.* han cargado eritrocitos con ibuprofeno y magnetita mediante la utilización de la técnica de prehinchamiento. Estos estudios se llevaron a cabo *in vitro* y muestran que es posible atrapar fármacos y magnetita en los eritrocitos. Sin embargo, mostraron una descarga muy elevada de prácticamente la totalidad de la magnetita atrapada, debido a su efecto citotóxico y hemolítico en las células (Vyas, 1994).
- [0017]** Se han propuesto los eritrocitos como un nuevo portador de fármaco y se les considera como vectores biocompatibles potenciales para distintas sustancias bioactivas, tales como fármacos, enzimas y péptidos (Magnani, 2002). La encapsulación de fármacos o de agentes biológicamente activos puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el método descrito en el documento de patente 6,139,836 (US patent; Magnani *et al.*). Diversos estudios también han dado a conocer la preparación de eritrocitos sensibles al magnetismo para el encauzamiento de fármacos mediante la coencapsulación de un fármaco con diversos ferrofluidos, por ejemplo, magnetita (Vyas, 1994). Entre otras aplicaciones de los eritrocitos portadores, se encuentra su posible utilización

como medios de contraste para IRM, por ejemplo, el gadolinio DTPA dimeglumina (Gd-DTPA) se ha encapsulado en eritrocitos humanos y de ratas (Johnson, 1998).

5 **[0018]** Los medios de contraste que incorporan nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIO) son prometedores como medio para visualizar las células marcadas mediante la utilización de IRM. Recientemente, se han proporcionado nanopartículas de SPIO para el diagnóstico y monitorización de diversas enfermedades cardiovasculares, incluidas, pero sin carácter limitativo, la aterosclerosis, la trombosis, la isquemia, así como para la terapia del cáncer celular. Los SPIO estándar disponibles en el mercado, tales como SHU 555A (Resovist, de Schering), son intensificadores extremadamente fuertes de la relajación de protones, pero presentan vidas medias útiles muy cortas tras la administración por vía intravenosa, puesto que se eliminan rápidamente de la sangre en minutos y se acumulan en las células retículoendoteliales del hígado y el bazo.

10 **[0019]** En el documento de patente US 2005/0261575, se da a conocer un IRM de contraste positivo de células, objetos y tejidos marcados magnéticamente.

**[0020]** En el documento de patente WO 2006/012201, se dan a conocer nanopartículas para la formación de imágenes de placas ateroscleróticas.

15 **[0021]** En el documento de patente US 2004/0076586, se dan a conocer composiciones y métodos para la administración de agentes farmacéuticamente activos con nanopartículas.

**[0022]** En el documento de patente US-A-6,933,331, se expone nanotecnología para la administración de fármacos, medios de contraste e implantes biomédicos.

20 **[0023]** En el documento de patente US-A-4,669,481, se dan a conocer métodos de imagen por resonancia magnética mediante la utilización de glóbulos rojos marcados con cromo.

**[0024]** En el documento de patente WO 2006/048321 A1, se exponen sustancias diagnósticamente activas que incluyen nanopartículas que pueden introducirse en células biológicas.

**[0025]** En el documento de patente WO 91/16080 A1, se dan a conocer quelatos de gadolinio o yodo que podrían encapsularse en eritrocitos como medios de contraste.

25 **[0026]** En el documento de patente US 5928958, se describen partículas superparamagnéticas de hierro con tamaños que oscilan entre 3-50 nm y entre 10-100 nm.

**[0027]** En el documento de patente US 2006/0078502A, se describe un medio de contraste para IRM que comprende un complejo de un catión paramagnético, tal como  $Gd^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$  y  $Fe^{3+}$ .

30 **[0028]** En la actualidad, se llevan a cabo grandes esfuerzos en el desarrollo de portadores magnéticos biocompatibles para el transporte dirigido y la liberación controlada de fármacos.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

**[0029]** De forma sorprendente, se acaba de descubrir que las partículas de óxido de hierro superparamagnéticas pueden encapsularse en eritrocitos mediante la utilización de una cantidad permeable de una solución de diálisis hipotónica.

35 **[0030]** Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer un eritrocito viable que contiene óxido de hierro superparamagnético citosólico en forma de nanopartículas, que presenta una vida comparable a la de los eritrocitos sin tratar. Se prefiere que la cantidad de óxido de hierro superparamagnético (SPIO, por sus siglas en inglés) se encuentre presente en los eritrocitos en una cantidad suficiente para permitir la imagen por resonancia magnética (IRM) cuando se inyecta una preparación de una pluralidad de dichos eritrocitos a un individuo. Cuando las concentraciones de SPIO en los eritrocitos son relativamente bajas o se utilizan cantidades inferiores de eritrocitos, la IRM puede ser posible solo después de que se haya empleado una fuente magnética externa para atraer los eritrocitos que contienen SPIO a una ubicación particular. A título orientativo, si bien el experto en la materia será capaz fácilmente de discernir concentraciones adecuadas, la cantidad de SPIO en lo que respecta a la cantidad de hierro en los eritrocitos debería oscilar entre 1 mM y 40 mM, siendo el rango preferido entre aproximadamente 3 mM y 20 mM.

45 **[0031]** Se observará que la presente invención da a conocer una preparación de eritrocitos que contienen SPIO citosólico. Tal preparación puede resultar adecuada para su utilización inmediata para una inyección a un paciente con fines de IRM o puede prepararse posteriormente para tal utilización y puede encontrarse en un

estado liofilizado, por ejemplo. En caso de liofilizarse, es deseable incorporar una o más sustancias en la preparación para inhibir o evitar la degradación de las membranas, tal como propilenglicol.

**[0032]** Por "citósólico", se entiende que las partículas de SPIO están presentes en el citosol en lugar de, por ejemplo, en las vesículas de endocitosis, tal como se obtendría mediante el proceso de endocitosis o fagocitosis.

5 **[0033]** También se prefiere que los eritrocitos de la presente invención comprendan uno o más fármacos, de manera que los eritrocitos puedan utilizarse como vehículos de administración de fármacos. Tales fármacos pueden utilizarse como se describe anteriormente y pueden asociarse a las partículas de SPIO o transportarse sobre o dentro de los eritrocitos. De forma particularmente preferible, los fármacos son tales que deben ser eficaces cuando los eritrocitos se dirigen a una zona específica mediante la utilización de magnetismo externo y  
10 también se prefiere que los fármacos puedan liberarse mediante la aplicación de magnetismo externo, tal como mediante ruptura de los eritrocitos a través de los efectos sobre las partículas de SPIO.

**[0034]** Se prefiere que las partículas de SPIO puedan coatraparse dentro de los eritrocitos con al menos una de diversas categorías de agentes farmacéuticamente activos, ingredientes o fármacos, incluidos, pero sin carácter limitativo: los fármacos antiinflamatorios e inmunodepresivos, tales como los análogos de glucocorticoides; los  
15 fármacos antivirales o antiretrovirales, tales como los inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos/nucleótidos (ITIN), los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN), los inhibidores de la proteasa y/o los inhibidores de la fusión o la entrada; los fármacos contra el cáncer, tales como los agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, la antraciclina, los agentes intercalantes, los inhibidores de la tirosina quinasa, los inhibidores de la metiltransferasa, los inhibidores de la deacetilasa y los inhibidores de la proteasoma; los  
20 oligonucleótidos; los anticuerpos monoclonales, los péptidos y los ácidos nucleicos peptídicos; los fármacos fotosensibilizadores; y los agentes fluorescentes infrarrojos. También se prefiere que puedan utilizarse combinaciones o mezclas de cualquiera de los anteriores. Los expertos en la materia conocerán ejemplos específicos de dichos fármacos.

**[0035]** Pueden coencapsularse nanopartículas y fármacos y/u otros nanomateriales dentro de los eritrocitos para el encauzamiento de fármacos y/o la liberación de fármacos y/o la destrucción de células en caso de que el  
25 material encapsulado provoque un calentamiento local tras la radiación externa, por ejemplo.

**[0036]** De este modo, los fármacos que pueden, de otra manera, ser no específicos y tóxicos a otros tejidos, pueden encauzarse cuidadosamente. Por lo tanto, las toxinas, los agentes quimioterapéuticos y los anticuerpos son los fármacos preferidos para su utilización en la presente invención.

### 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

**[0037]** Por "viable", se entiende un eritrocito que el huésped en el que se inyecta todavía reconoce como viable. Los eritrocitos inviables o muertos, tales como los eritrocitos hendidos preparados en la técnica, se reconocen inmediatamente como inviables y se eliminan del sistema hospedador. La ventaja de los eritrocitos de la presente invención consiste en que son capaces de sobrevivir durante varios días sin eliminarse y suelen tener una vida  
35 comparable a la de los eritrocitos no tratados. En este sentido, los glóbulos rojos (RBC, por sus siglas en inglés) también pueden denominarse eritrocitos estables. En particular, se prefiere que los RBC puedan evitar sustancialmente la depuración inmune y de que alrededor de al menos un 50 % y más preferiblemente entre al menos un 60 % y al menos un 70 % o un 80 % de los RBC cargados presenten vidas *in vivo* estadísticamente significativas comparables a los RBC no modificados.

40 **[0038]** Los términos glóbulos rojos y eritrocitos se utilizan de manera intercambiable en el presente documento.

**[0039]** El óxido de hierro superparamagnético citosólico también se denomina en el presente documento óxido de hierro superparamagnético encapsulado o sustancialmente interiorizado, o SPIO encapsulado o sustancialmente interiorizado y es distinto del SPIO vesicular o micelar. El tamaño de las partículas se analiza a continuación en el presente documento, pero no se limita a SPIO y el rango de tamaños incluye USPIO. Se  
45 prefiere que el tamaño total de cada partícula, incluido cualquier recubrimiento, tal como dextrano, no sea mayor que 80-90 nm, y que se encuentre preferiblemente entre 20 y 60 nm, más preferiblemente entre 3 y 50 nm, más preferiblemente entre 10 y 100 nm, más preferiblemente entre 10 y 30 nm, más preferiblemente entre 20 y 50 nm, más preferiblemente entre 50 y 80 nm y más preferiblemente entre 40 y 60 nm.

**[0040]** Se observará que las presentes nanopartículas también pueden denominarse nanopartículas de SPIO  
50 (SPION, por sus siglas en inglés).

**[0041]** Tal como se analiza en más detalle en la sección de Resultados de los Ejemplos, diversas tentativas en la técnica anterior han dado lugar a eritrocitos que muestran medio de contraste sobre la superficie celular.

**[0042]** Esta modificación de las membranas podría llevar a depuración inmune debido a la opsonización de los eritrocitos. La presente invención, sin embargo, evita esto mediante la interiorización sustancial de las nanopartículas de medio de contraste dentro del citoplasma de la célula. El documento de patente WO 2006/048321 A1 hace referencia a la incorporación en células de mamíferos (incluidos los glóbulos y, por lo tanto, los eritrocitos) de sustancias activas y de sustancias diagnósticamente activas en forma de nanopartículas. Sin embargo, una publicación reciente de los mismos solicitantes y de otros (Nano Letters 6, 2505-2509, 2006) prueba que el método propuesto genera eritrocitos que contienen nanopartículas unidas a la membrana. Por lo tanto, las células se modifican en la superficie y la presencia de nanopartículas de medio de contraste absorbidas sobre la superficie celular conlleva la depuración inmune. Por lo tanto, este método no da lugar a eritrocitos viables o estables.

**[0043]** El documento de patente WO 91/16080 A1 (Guerbet) es una publicación antigua y hace referencia a un medio de contraste encapsulado en eritrocitos por medio de una técnica de resellado de lisis. La aplicación se focaliza en la utilización de quelatos de gadolinio o yodo como medio de contraste. Existen pocas referencias a medios de contraste que incluyan coloides superparamagnéticos, pero no hay más análisis de los mismos o trabajo experimental sobre ello, como lo demuestra el hecho de que se ignoren cuestiones tales como la dispersión. Asimismo, no se hace mención de nanopartículas y, de hecho, no se da a conocer ninguna referencia al tamaño posible de estos coloides superparamagnéticos.

**[0044]** Desde esta publicación, es evidente que los coloides superparamagnéticos pueden, de hecho, dar lugar a interacciones de eritrocitos y daños. Por lo tanto, esta publicación no proporciona eritrocitos viables ni describe la utilización de nanopartículas. Asimismo, su método de encapsulación es una técnica de resellado de lisis. A partir de su trabajo con gadolinio y yoduro, los autores simplemente suponen que otros medios de contraste, incluido el óxido de hierro, podrían haber seguido un comportamiento similar. Sin embargo, investigaciones recientes (incluida la publicación en Nano Letters, más arriba) contradicen esto y, en la actualidad, está claro que las condiciones basadas en ellos adecuadas para quelatos de gadolinio y moléculas que contienen yoduro no son adecuadas para las nanopartículas de SPIO.

**[0045]** Por el contrario, los presentes inventores han descubierto, de forma sorprendente, que el SPIO puede proporcionar al menos una de las siguientes ventajas por separado pero que se complementan. En primer lugar, el sistema inmunitario no depura los eritrocitos de la presente invención cuando están cargados con el material paramagnético, lo que constituye una ventaja considerable en relación con los eritrocitos que tienen incluso una pequeña cantidad de material paramagnético unido a su superficie celular. Esto proporciona a los presentes eritrocitos una vida mejorada *in vivo*, de manera que se facilita de forma considerable el diagnóstico con IRM en un entorno clínico en el que pueden producirse retrasos y también permite que los eritrocitos penetren profundamente en los tejidos corporales. De hecho, la estabilidad y viabilidad aumentada de los eritrocitos permite que se tomen imágenes del mismo paciente en diversas ocasiones a lo largo del tiempo, de manera que se permite la obtención de un conjunto de datos a lo largo del tiempo, que podría utilizarse para estudiar la eficacia del fármaco durante diversos días o incluso semanas.

**[0046]** Una ventaja adicional y bastante inesperada consiste en que se ha descubierto que las nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas o cargadas en RBC generan (en condiciones idénticas) un tiempo de relajación  $T2^*$  considerablemente inferior a la señal medida mediante la adición de la misma cantidad de nanopartículas a una suspensión de RBC (glóbulo rojo) idéntica o a sangre intacta. Si se baja el tiempo de relajación  $T2^*$ , se mejora la resolución de la imagen de IRM. Esto ayudará a los médicos a detectar tumores incluso más pequeños, por ejemplo.

**[0047]** Se prefiere, particularmente, que las nanopartículas superparamagnéticas presenten la fórmula general  $Fe_2^{3+}O_3M^{2+}O$ , donde  $M^{2+}$  es un catión de metal divalente tal como hierro ferroso, manganeso, níquel, cobalto o magnesio.

**[0048]** Preferiblemente, el SPIO es magnetita. Esto se produce cuando el ion metálico ( $M^{2+}$ ) es hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ), de forma que se proporcionan las nanopartículas superparamagnéticas de la fórmula  $FeFe_2O_4$ . Por lo tanto, se prefiere que  $M^{2+}$  sea hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ).

**[0049]** Sin embargo, también se prefiere que el SPIO comprenda alternativas al hierro ferroso, aunque se observará que esto se aplica al  $M^{2+}$  y que el SPIO es todavía un óxido de hierro. Dicho de otro modo, sólo se sustituye el  $M^{2+}$ , no el elemento  $Fe_2^{3+}$  de la fórmula general de SPIO  $Fe_2^{3+}O_3M^{2+}O$ . Por lo tanto, también se prefieren otros SPIO que no sean de magnetita.

**[0050]** En consecuencia, se prefiere, particularmente, que  $M^{2+}$  sea al menos uno de los siguientes cationes divalentes, seleccionados del grupo que consiste en manganeso, níquel, cobalto y magnesio. Esto da lugar a  $MnFe_2O_4$ ,  $NiFe_2O_4$ ,  $CoFe_2O_4$  y  $MgFe_2O_4$ , como se expone en Nature Medicine, Vol. 13, número 1, página 95-99, enero 2007 (Jae-Hyun Lee *et al.*) y en Eur. Radiol. Vol. 11, página 2319-2331, 2001 (Yi-Xiang J. Wang *et al.*). El

manganeso, que da lugar a  $MnFe_2O_4$ , se prefiere particularmente, puesto que proporciona un efecto de contraste de resonancia magnética fuerte, debido a su valor de relajividad elevado.

5 **[0051]** En la presente invención, también se da a conocer un proceso para la preparación de uno o más eritrocitos, según se define en el presente documento, comprendiendo dicho proceso la diálisis de una preparación de dichos eritrocitos contra un tampón hipotónico suficiente como para permeabilizar los eritrocitos, y donde dicha preparación comprende SPIO monodispersado y, posteriormente, resellar los eritrocitos.

10 **[0052]** La carga de nanopartículas magnéticas en eritrocitos mediante la utilización del procedimiento de la invención se produce a través de los poros de la membrana del RBC que surgen de la diálisis de la suspensión de RBC en un tampón hipotónico. Esto difiere de lo que se describe en publicaciones anteriores en las que los autores han informado acerca del atrapamiento de ferrofluidos en los eritrocitos por medio de una técnica con la que se producían células fantasma hendidas (Jain, 1994) con estabilidad limitada.

15 **[0053]** El término "monodispersado/a" indica que las partículas de SPIO se tratan para que no se aglomeren y se prefiere obtener el SPIO preparado con anterioridad de dicha manera, en lugar de tratar el SPIO en la preparación de eritrocitos. Se prefiere, particularmente, que las nanopartículas de SPIO sean suficientemente pequeñas como para que puedan pasar a los eritrocitos fácilmente cuando se vuelven porosos al estar expuestos al tampón hipotónico. Tales nanopartículas se recubren, preferiblemente, de dextrano, aunque en la presente invención también se contempla cualquier otro medio para obtener la monodispersión. Se prefiere el nanomaterial magnético monodispersado PMP-50, comercializado por G.kisker GbR. Schering comercializa un ferrofluido particularmente preferido con el nombre de SHU 555A (Resovist).

20 **[0054]** El tampón hipotónico puede estar presente en cualquier concentración adecuada para alcanzar la formación de poros de los eritrocitos. Si la osmolaridad del tampón hipotónico es demasiado elevada, quizás no se produzca la formación de poros, mientras que si la osmolaridad es demasiado baja, quizás se puedan dañar en exceso los eritrocitos y se recupere una cantidad de células viables insuficiente. Por lo tanto, a título indicativo, se prefiere una osmolaridad de entre 60 y 120 mOsm, siendo más preferible todavía un rango de entre 25 70 y 110 mOsm.

**[0055]** Se ha descubierto que las tasas de recuperación que sobrepasan un 70 % de eritrocitos expuestos a un tampón hipotónico pueden alcanzarse al tiempo que se obtienen concentraciones internas suficientemente elevadas de SPIO donde la osmolaridad de los eritrocitos no baja de 90 mOsm después del tratamiento.

30 **[0056]** El volumen del tampón como proporción para la preparación de eritrocitos se encuentra, preferiblemente, entre aproximadamente 15 y el infinito, siendo más preferido un rango de entre aproximadamente 20 y 100 y siendo particularmente preferido un rango de 40-80.

35 **[0057]** La naturaleza del tampón no es particularmente importante, siempre que no sea dañina a los eritrocitos para el paciente de manera que o se reduce radicalmente la cantidad de eritrocitos que sobreviven al tratamiento o son tóxicos para el paciente de manera no deseada. Entre los tampones adecuados, se incluyen los tampones de carbonato y de fosfato.

40 **[0058]** Con el fin de obtener un grado satisfactorio de viabilidad para los eritrocitos, se prefiere utilizar un tampón hipotónico que comprende ingredientes para garantizar el buen curso de los eritrocitos mientras se forman poros en los mismos. En este sentido, se prefiere la presencia de un pH equilibrado, preferiblemente a aproximadamente 7,4, junto con glucosa y ATP. También pueden incorporarse otros ingredientes, tal como glutatión, con el fin de mejorar la viabilidad y la recuperación de eritrocitos viables.

45 **[0059]** La duración de la exposición de los eritrocitos al tampón hipotónico puede ser tan larga como se desee, pero se encuentra preferiblemente entre 20 minutos y 5 horas, más preferiblemente entre 30 minutos y 4 horas, y más preferiblemente entre 1 hora y 3 horas. Es particularmente preferible minimizar la cantidad de exposición tanto como sea posible, al tiempo que se garantiza la absorción de la cantidad máxima de SPIO, puesto que los eritrocitos en los que se forman poros son vulnerables.

50 **[0060]** El resellado de los eritrocitos tratados se lleva a cabo mediante técnicas conocidas después de la eliminación del tampón de diálisis. Se prefiere que, después del resellado, se laven los eritrocitos para eliminar cualquier SPIO extracelular. Un agente de lavado adecuado es el tampón Hepes. A continuación, los eritrocitos pueden almacenarse en tampón Hepes o en cualquier otra solución adecuada, tal como plasma artificial, antes de la utilización.

**[0061]** En la presente invención, también se da a conocer la utilización de una preparación de eritrocitos según se define en el presente documento en una técnica de imagen por resonancia magnética.

**[0062]** En la presente invención, también se proporciona la utilización de una preparación de eritrocitos según se define en el presente documento en el tratamiento de una enfermedad en la que los eritrocitos de la invención se pueden localizar alrededor de una zona que se ha de tratar por medio de una fuerza magnética externa.

5 **[0063]** Se observará que los eritrocitos pueden proceder de cualquier animal, pero proceden preferiblemente de un mamífero y, particularmente de forma preferible, de un humano. Asimismo, el ser humano que se ha de tratar o cuyas imágenes han de formarse puede ser un animal, preferiblemente mamífero y, particularmente de forma preferible, humano. Si bien es preferible la utilización de eritrocitos del paciente, también se acepta la utilización de eritrocitos preparados procedentes de un donante compatible y, particularmente de forma preferible, de un donante universal.

10 **[0064]** En la presente invención, también se dan a conocer eritrocitos para su utilización en un método que consiste en eliminar glóbulos rojos de un paciente y, opcionalmente, separarlos de otros glóbulos y, opcionalmente, el suero, de forma que se cargan los glóbulos rojos con SPIO y se vuelven a introducir los glóbulos rojos en el paciente. Preferiblemente, los glóbulos rojos pueden almacenarse en cualquier etapa y más preferiblemente, una vez se hayan cargado con SPIO, de modo que se permita un almacenaje preparado con  
15 anterioridad de eritrocitos cargados útiles en situaciones de emergencia, por ejemplo. En dichos casos, se prefiere que los eritrocitos procedan de un donante universal, de grupo sanguíneo O. También se dan a conocer eritrocitos para su utilización en un método de imagen por resonancia, que comprende la administración de los RBC actuales cargados con SPIO. El método también comprende, preferiblemente, la eliminación de glóbulos rojos de un paciente y, opcionalmente, separarlos de otros glóbulos y, opcionalmente, el suero, de forma que se  
20 cargan los glóbulos rojos con SPIO y se vuelven a introducir los glóbulos rojos en el paciente. Preferiblemente, los glóbulos rojos pueden almacenarse en cualquier etapa y, más preferiblemente, una vez se hayan cargado con SPIO, según se define anteriormente.

**[0065]** También se da a conocer un método para hacer descender el tiempo de relajación T2\* del óxido de hierro superparamagnético mediante la encapsulación del mismo en eritrocitos, siendo viables dichos eritrocitos  
25 encapsulados.

**[0066]** En un aspecto adicional, se da a conocer un método de aumentar la resolución de la imagen por resonancia del óxido de hierro superparamagnético, mediante encapsulación del óxido de hierro superparamagnético en eritrocitos viables.

30 **[0067]** En otro aspecto adicional, se da a conocer una preparación farmacológicamente activa que comprende material superparamagnético encapsulado en eritrocitos viables, adecuado para su administración al paciente para imagen por resonancia.

**[0068]** Por lo tanto, se ha encontrado, en la actualidad, una estrategia para cargar nanopartículas de SPIO en eritrocitos humanos de una manera que evita la depuración del RES y que ofrece un enfoque novedoso para la administración de fármacos intravascular y la formación de imágenes en acumulación de sangre. Se ha  
35 descubierto, de forma inesperada, que las nanopartículas superparamagnéticas pueden encapsularse en eritrocitos humanos en cantidades suficientemente elevadas como para ser útiles como medios de contraste y que estos constructos son estables. A diferencia de las nanopartículas superparamagnéticas, estos eritrocitos cargados con partículas no son reconocidos por los macrófagos a menos que se encuentren en el final de su vida fisiológica o a menos que se modifiquen de manera específica.

40 **[0069]** Estos eritrocitos cargados con óxido de hierro superparamagnético son constructos artificiales útiles como medios de contraste, especialmente para la formación de imágenes del sistema circulatorio y en la detección de vasos sanguíneos ocluidos o de angiogénesis alterada en zonas del cuerpo definidas o vasos sanguíneos dañados que dan lugar a hemorragia.

45 **[0070]** En la presente invención, se dan a conocer eritrocitos humanos cargados con nanopartículas superparamagnéticas útiles como medios de contraste para IRM, especialmente en la formación de imágenes del sistema circulatorio. Dichos eritrocitos también pueden contener uno o más fármacos coencapsulados con dichas nanopartículas superparamagnéticas y pueden ser atraídos por un campo magnético externo para liberar el fármaco encapsulado en órganos seleccionados o, de forma preferencial, en zonas del cuerpo seleccionadas.

**[0071]** A continuación, se describirá la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos.

## 50 MATERIALES Y MÉTODOS

### *Materiales*

**[0072]** El procedimiento de carga de los eritrocitos se llevó a cabo con un ferrofluido disponible en el mercado SHU 555A (Resovist, 0,5 mmol Fe/ml) obtenido a partir de la empresa farmacéutica Schering, que consiste en nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas recubiertas de carboxidextrano, con un diámetro de 60 nm.

- 5 **[0073]** Esta suspensión particulada se utiliza, por lo general, para mejorar la señal de los exámenes de imagen por resonancia magnética (IRM). También se utilizó suspensión de nanopartículas de magnetita recubiertas con sílice, SiMagn (27 mg/ml) con un tamaño de aproximadamente 40-140 nm.

*Encapsulación de nanopartículas magnéticas en eritrocitos humanos*

**[0074]** Se recogió sangre humana procedente de voluntarios sanos en tubos heparinizados.

- 10 **[0075]** Se aislaron los glóbulos rojos (RBC) mediante centrifugación a 1400 g a 4 °C durante 10 min de la sangre recién extraída. Se eliminó el suero y la capa leucocitaria y se lavó el volumen celular tres veces con tampón Hepes (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM glucosa, pH 7,4) y, a continuación, se volvió a suspender en el mismo tampón a un hematocrito de un 70 %. Se dializaron estas células en presencia de nanopartículas magnéticas durante 75 min mediante la utilización de un tubo con un corte de 12-14 kDa en 50 vol de 10 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM de glucosa, 4 mM de MgCl<sub>2</sub> pH 7,4, que contenía 2mM de ATP y 3mM de glutatión reducido. La osmolaridad del tampón de diálisis era 64 mOsm.

- 15 **[0076]** Todos estos procedimientos se llevaron a cabo a 4 °C en condiciones estériles. Se obtuvo el resellado de RBC mediante la adición de 0,1 vol de 5 mM de adenina, 100 mM de inosina, 2mM de ATP, 100 mM de glucosa, 100 mM de piruvato de sodio, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 194 mM de NaCl, 1,606 M de KCl, 35 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 (PIGPA) por vol de RBC dializado y mediante la incubación a 37 °C durante 45 min.

- 20 **[0077]** Las células reselladas se recuperaron mediante centrifugación a 400 g y se lavaron cuatro veces con tampón Hepes para eliminar las partículas magnéticas no atrapadas.

**[0078]** Por medio del mismo procedimiento, se prepararon eritrocitos sin carga (UL-RBC, por sus siglas en inglés), con la excepción de que se dializaron en ausencia de material magnético.

- 25 **[0079]** A continuación, se analizó la susceptibilidad magnética de los eritrocitos cargados (L-RBC, por sus siglas en inglés), así como otros parámetros distintos.

*Concentración de magnetita*

**[0080]** Se cargaron los eritrocitos mediante la utilización de distintas cantidades de SHU 555A (0,5 mmol Fe/ml o 28 mg/ml).

- 30 **[0081]** 1ml de RBC se dializó tanto en presencia de 5,6 mg de Fe (200µl) (L1-RBC) como de 22,4 mg de Fe (800µl) (L2-RBC). Se calculó la eficacia de carga por medio de distintos parámetros.

**Caracterización *in vitro* de eritrocitos cargados con SHU 555A;**

*Porcentaje de recuperación de células*

- 35 **[0082]** El porcentaje de recuperación de células se determinó por medio del recuento de la cantidad de eritrocitos intactos totales antes y después de la carga con magnetita mediante la utilización de un hemocitómetro.

*Evaluación de la integridad de las células*

- 40 **[0083]** Para determinar si las células cargadas retenían las propiedades de los glóbulos rojos nativos, se examinaron diversas características de integridad de las células. Se midió el volumen corpuscular medio, la concentración de hemoglobina media y la concentración de hemoglobina corpuscular media con un citómetro automatizado (Modelo MICROS O.T, HoribaABX Diagnostics, Italia).

*Receptividad magnética*

- 45 **[0084]** Se colocaron 1x10<sup>9</sup> eritrocitos cargados en un microtubo y se analizó su receptividad magnética mediante una incubación cerca de un imán de 3000 Gauss. Los eritrocitos magnéticos localizados en el lugar de la aplicación magnética se separaron de RBC no atraído mediante lavado en tampón Hepes, se recogieron y se contaron con un citómetro automatizado y se calculó el porcentaje de células atraídas con respecto a la cantidad de células inicial.

*Mediciones de la relajación de RMN de suspensiones de eritrocitos cargados y determinación de la concentración de magnetita atrapada*

5 **[0085]** La concentración de magnetita en eritrocitos cargados se determinó mediante mediciones de la relajación de RMN con la utilización de una curva de dosis-respuesta generada mediante la adición de cantidades conocidas de medio de contraste SHU 555A a muestras de sangre humana y murina. El rango de concentración estudiado era de 0 a 15 mM de Fe con al menos 9 niveles de concentración. El tiempo de relajación longitudinal ( $T_1$ ) y transversal ( $T_2$ ) de estas muestras a un 44 % de hematocrito se midió a una fuerza de campo magnético de 4,7 Tesla a 37 °C mediante la utilización de un espectrómetro AC-200 NMR-Bruker.  $T_1$  se midió mediante la utilización de una secuencia de recuperación de inversión de 180°-τ-90° con un retraso de relajación fija de al menos 5 x  $T_1$ . Los tiempos de inversión (τ) se eligieron a partir de un valor  $T_1$  estimado.  $T_2$  se midió mediante la utilización del método de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Los tiempos de eco se eligieron a partir de un valor  $T_2$  estimado.

15 Los valores de  $(1/T_1^c - 1/T_1^0)$  (donde  $T_1^c$  es el tiempo de relajación a la concentración [c] del medio de contraste y  $T_1^0$  el tiempo de relajación de la muestra de RBC sin SHU 555A) se trazaron en comparación con la concentración de SHU 555A y se ajustaron mediante el método de los mínimos cuadrados a una línea recta, cuya pendiente es la relaxividad longitudinal ( $r_1$ ).

**[0086]** Se obtuvieron dos valores  $r_1$  diferentes en dos rangos de concentración:  $r_1=2,49 \text{ seg}^{-1}\text{mM}^{-1}$  en el rango  $0,1 \text{ mM}<[c]<1\text{mM}$  y  $r_1=1,95 \text{ seg}^{-1}\text{mM}^{-1}$  en el rango  $1\text{mM}<[c]<15\text{mM}$ .

20 **[0087]** La relaxividad transversal ( $r_2$ ) se calculó de manera similar en el intervalo  $0,1 \text{ mM}<[c]<0,3\text{mM}$  trazando los valores de  $(1/T_2^c - 1/T_2^0)$  en comparación con [c], dando lugar a  $r_2=153,6 \text{ seg}^{-1}\text{mM}^{-1}$ . Todos los análisis se llevaron a cabo en EXCEL (Microsoft Corporation).

Para que la correlación se considerara lineal, se definieron los siguientes criterios: coeficiente de correlación (R cuadrado) mayor que 0,990 y la distribución de puntos alrededor de la curva de regresión debe distribuirse de forma aleatoria.

25 **[0088]** Por lo tanto, fue posible calcular la concentración de SHU 555A encapsulado en los eritrocitos mediante la utilización de la fórmula inversa  $[c]=(1/T_1 - 1/T_1^0)/r_1$  y  $[c]=(1/T_2 - 1/T_2^0)/r_2$  en relación con los valores  $T_1$  y  $T_2$  medidos de suspensiones de eritrocitos cargados a un hematocrito de un 44 %.

30 **[0089]** También se determinó el valor  $T_2^*$ , obtenido de las FID de RMN medidas a 37 °C, en muestras de suspensión de RBC y L1-RBC control y en una muestra de RBC control mezclado con la misma cantidad de medio SHU 555A incorporado a L1-RBC.

*Morfología*

35 **[0090]** Se examinaron eritrocitos normales, sin carga y cargados mediante microscopía electrónica por transmisión (MET) y microscopía de exploración electrónica (SEM, por sus siglas en inglés). Para el análisis MET, se lavaron las células rápidamente en tampón fosfato Sörensen 0,1 M pH 7,3, se sedimentaron a 600 g y se fijaron inmediatamente en 2,5 % de glutaraldehído en el mismo tampón durante 1 h. A continuación, se fijaron posteriormente las células en 1 % de OsO4 en tampón fosfato, se deshidrataron con etanol y se incorporaron a araldita. Se recogieron secciones finas en rejillas de níquel, teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se analizaron con un microscopio electrónico Philips CM10. Para el análisis SEM, se lavaron los RBC y se fijaron en suspensión con un 2,5 % de glutaraldehído en tampón Sörensen y se depositaron gotas de la suspensión sobre cubreobjetos recubiertos de poli-lisina. La adhesión se llevó a cabo durante la noche en una cámara húmeda y sellada a 4 °C. A continuación, se lavaron los portaobjetos y se fijó posteriormente 1 % de OsO4 en tampón fosfato durante 1 h.

**[0091]** Se llevó a cabo una deshidratación de alcohol progresiva ligera y las muestras se sometieron a secado de punto crítico.

45 **[0092]** Tras montarse en portaobjetos de microscopio de exploración electrónico convencional por medio de pegamento de plata, se recubrieron de oro los portaobjetos mediante un dispositivo de pulverización. Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio de exploración electrónico Philips 515.

*Estabilidad in vitro*

50 **[0093]** Se volvieron a suspender las células cargadas a un hematocrito de un 6 % en solución salina fosfatada (PBS, por sus siglas en inglés) (154 mM NaCl, 5 mM  $K_2HPO_4/NaH_2PO_4$ , pH 7,4) que contenía 5 mM de glucosa,

se colocaron en placas de Petri y se incubaron a 37 °C. En diversos intervalos temporales, se quitaron las muestras y se compactaron mediante centrifugación a 600 g durante 10 min.

5 **[0094]** La hemoglobina liberada en los sobrenadantes de las muestras se midió a 540 nm por espectrofotometría y se determinó el porcentaje de hemólisis comparando la absorbancia del sobrenadante con la absorbancia obtenida tras la hemólisis completa del mismo número de células en agua destilada.

**[0095]** Asimismo, los gránulos de estas muestras diluidos en tampón Hepes a un hematocrito de un 44 % se caracterizaron con mediciones de RMN de relajividad.

#### *Reconocimiento de RBC cargados con nanopartículas magnéticas por macrófagos humanos*

10 **[0096]** Se obtuvieron macrófagos derivados de monocitos humanos a partir de muestras de sangre de donantes sanos mediante la separación en solución Lymphoprep (densidad específica 1,077; Axis-Shield PoC AS, Noruega).

15 Los monocitos se separaron de los linfocitos mediante adherencia a placas de plástico durante la noche a 37 °C. Después de la eliminación de las células no adherentes mediante varios lavados, las células se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con un 10 % (v/v) de suero de ternera fetal (FCS, por sus siglas en inglés) inactivado por calor, un 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomina) y 2 mM de L-glutamina a 37 °C en atmósfera humificada con un 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió cada 2 días y después de 7 días de cultivo, la gran mayoría de las células adherentes eran macrófagos diferenciados. Los RBC cargados con nanopartículas magnéticas se prepararon mediante una diálisis de RBC en presencia de 6 mg de SHU 555A o de suspensiones de nanopartículas de SiMagn.

20 **[0097]** Se incubaron 1x10<sup>6</sup> macrófagos durante 16 h en presencia de RBC cargado con SHU 555A o de RBC cargado con SiMagn o de RBC sin carga en una proporción de 100 RBC por macrófago. Finalizado este periodo, se eliminaron los RBC cuidadosamente mediante lavados repetidos y se fijaron los macrófagos en metanol y se observaron tras el tinte May-Grunwald Giemsa con un microscopio óptico Olympus IX51.

#### *Estudios in vivo*

25 Preparación animal

**[0098]** Se almacenaron ratones Balb/C hembra (Nossan, Milán, Italia) a 22 ± 1 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12-h, una humedad de 60 ± 5 % y 12 renovaciones de aire/h.

30 **[0099]** En los experimentos farmacocinéticos, cada ratón recibió por vía intraperitoneal 250 µl de una suspensión de RBC cargado a un 10 % de hematocrito, derivada de una suspensión de eritrocitos que contenía 1,5 µmol de RBC con hierro paramagnético/ml.

**[0100]** Tras finalizarse la inyección, las extracciones de muestras de sangre de las arterias oculares se llevaron a cabo los días 2, 3, 6, 10, 13 y se analizaron alícuotas de sangre entera con mediciones de RMN.

#### RESULTADOS

35 **[0101]** Los resultados que se muestran en la figura 1 indican que es posible encapsular nanomateriales magnéticos monodispersados en eritrocitos humanos, especialmente los que tienen un tamaño medio de 40-60 nm, y que las células resultantes, después del procedimiento, tienen una morfología normal. De hecho, no se observaron diferencias considerables en la morfología celular, según se observa con la microscopía de exploración electrónica (SEM), con respecto a las células control. La mayoría de eritrocitos parecían tener una forma discoidal bicóncava, con estomatocitos ocasionales y equinocitos aún más escasos.

40 **[0102]** Mediante la utilización del análisis microscópico de transmisión electrónica, se analizó la presencia de nanopartículas en al menos 10 marcos. Para cada campo, se seleccionó una zona central de muestras en las que los eritrocitos aparecían distribuidos de forma homogénea. El análisis microscópico mostró un aspecto morfológico similar en todas las muestras cargadas de RBC; cada campo presentó al menos un 60 % de eritrocitos que contenían nanopartículas magnéticas, dispersadas en citoplasma (figura 1A).

45 **[0103]** Los eritrocitos cargados eran ligeramente más pequeños de media que las células sin tratar (MCV 78,5 y 60 en comparación con 87 fl, respectivamente para L1-RBC y L2-RBC), con menos hemoglobina por célula (MCH 20,1 y 16 en comparación con 28 pg), pero con una concentración de hemoglobina celular media casi normal (MCHC 31 y 28 en comparación con 33 g/dl). Cabe destacar que el MCV que se indica anteriormente se debe a la dilución de RBC aplicada en estos procedimientos de carga (es decir, para L2 RBC: 1 ml de RBC a un

70 % de hematocrito con 800 µl de SHU 555A) y no a la utilización de SHU 555A, ya que se observaron valores similares cuando se prepararon eritrocitos sin carga con la utilización de diluciones idénticas.

5 **[0104]** El procedimiento de preparación total daba lugar, normalmente, a una recuperación de células de eritrocitos cargados que oscilaba entre un 60 % y un 70 %, similar a la de las células sin carga. Este porcentaje de recuperación de células es mayor que el valor obtenido por otros autores (Vyas, 1994; Johnson, 1998). Los eritrocitos cargados eran sensibles al campo magnético externo y mantenían su susceptibilidad magnética durante varios días.

10 **[0105]** Los resultados obtenidos son inesperados, puesto que la técnica anterior indica que todos los intentos anteriores de encapsulación de nanomateriales en eritrocitos daban lugar a al menos algunas nanopartículas unidas en la membrana de eritrocito externa. Sin embargo, la presencia de nanopartículas unidas a la superficie conlleva la depuración inmune inmediata a través del RES.

15 **[0106]** Por ejemplo, el documento de patente WO 2006/048321 da a conocer sustancias diagnósticamente activas que incluyen nanopartículas que pueden introducirse en células biológicas, pero estas nanopartículas son parcialmente absorbidas en la superficie externa de la membrana de eritrocito. Los mismos inventores han documentado esto claramente en Nano Letters 6, 2006 pág. 2505-2509. Esto ocurre si los nanomateriales están hechos de nanopartículas superparamagnéticas recubiertas de sílice (fig. 1B) o si las nanopartículas no están monodispersadas.

20 **[0107]** Dicho de otro modo, los presentes inventores han descubierto que solamente la utilización de SPIO en combinación con un método para garantizar que el SPIO está presente en el citosol de eritrocitos, en lugar de ser absorbido en la superficie celular, es suficiente para evitar sustancialmente la depuración del eritrocito y, por lo tanto, conllevar tiempos de retención mejorados.

25 **[0108]** La presencia de nanopartículas unidas a la membrana de eritrocito externa constituye un fenómeno relevante cuando el objetivo de la formación de imágenes IRM del sistema vascular, puesto que esta condición activaría el reconocimiento de RBC cargados por macrófagos tisulares como los presentes en el sistema reticuloendotelial (RES), lo que provoca su rápida eliminación de la circulación sanguínea. De hecho, los experimentos *in vitro* realizados a la absorción de RBC cargados de ensayo por macrófagos humanos muestran que los RBC cargados con SHU 555A no son fagocitados, mientras que los RBC cargados con magnetita y sílice que contienen nanopartículas unidas a la membrana de eritrocito externa son activamente reconocidos y fagocitados por macrófagos. (fig. 2)

30 **[0109]** En la figura 2, se muestran macrófagos humanos que se incubaron durante 16 horas a 37 °C con eritrocitos sin carga (a), eritrocitos cargados con SHU 555A (b) y eritrocitos cargados con SiMagn (c) y se lavaron con PBS. Las células fijas, como se indica en "Materiales y Métodos" se tiñeron con May-Grunwald Giemsa y se observaron, con magnificación 40x. Las imágenes muestran la interacción membrana-macrófago y la fagocitosis de los RBC cargados con SiMagn, pero no de los RBC cargados con SHU 555A, en comparación  
35 con los eritrocitos sin carga.

**[0110]** Se calculó la concentración final de material magnético en eritrocitos humanos mediante análisis RMN con la utilización de los valores  $r_1$  y  $r_2$ , obtenidos de la curva de calibración descrita en Materiales y Métodos (más arriba). SHU 555A incorporado en los eritrocitos humanos en una cantidad de 4,64 mM  $\pm$  2, cuando se dializó 1 ml de RBC con 5,6 mg de Fe y 15,2 mM  $\pm$  4 cuando se dializaron las células con 22,4 mg de Fe.

40 **[0111]** Los resultados muestran que la concentración de nanopartículas magnéticas encapsuladas aumenta tanto con cantidades crecientes del medio de contraste incubado con RBC como con un descenso de la miliosmolaridad del tampón de diálisis, pero el tiempo de diálisis no le influye (Tabla 1 y Tabla 2). La medición de RMN del valor  $T_2^*$  de los RBC (a un 44 % de hematocrito) cargados con nanopartículas superparamagnéticas es inferior (0,38 ms) al valor de la sangre entera y los glóbulos rojos depurados del suero y no dializados (ND), al mismo hematocrito (21,9 y 30 ms, respectivamente).  
45

**Tabla 1:** Experimentos de carga con RESOVIST con cantidades diferentes de medio y tiempos de diálisis diferentes. Todas las muestras se midieron a un hematocrito de un 44 % y el contenido de hierro paramagnético se calculó mediante las fórmulas siguientes:

Muestra	Descripción de muestra	T <sub>1</sub> (mseg)	T <sub>2</sub> (mseg)	*[c] de r1	**[c] de r2
ND	RBC no dializado	2330	138	/	/
UL	RBC dializado y sin carga	2196	108	/	/

Muestra	Descripción de muestra	T <sub>1</sub> (mseg)	T <sub>2</sub> (mseg)	*[c] de r1	**[c] de r2
50-Res-L-RBC	<i>Dependencia de dosis:</i> 500 µl de RBC 70 % dializado en presencia de diferentes cantidades de medio Resovist	355	<5	1,2 mM	-
100-Res-L-RBC		104	<5	4,7 mM	-
200-Res-L-RBC		46	<5	10,9 mM	-
400-Res-L-RBC		32	<5	15,8 mM	-
100-Res-L-RBC 75 min	<i>Dependencia de tiempos de diálisis:</i> 500 µl de RBC 70 % en presencia de 100 µl de medio Resovist	92	<5	5,3 mM	-
100-Res-L-RBC 135 min		87	<5	5,6 mM	-
100-Res-L-RBC 195 min		81	<5	6,1 mM	-

\*[c] = (1/T<sub>1c</sub> - 1 / T<sub>1o</sub>)/r1    \*\*[c]=(1/T<sub>2c</sub> - 1 / T<sub>2o</sub>) / r2    T<sub>1o</sub> y T<sub>2o</sub> son los valores del RBC control (ND). Los valores indicados como <5 corresponden a <5 mseg y no son detectables debido a la sensibilidad instrumental.

**[0112]** Lo que también es particularmente inesperado es el descubrimiento de que este valor (0,38 ms) es también considerablemente inferior a T<sub>2</sub>\* de las suspensiones que contienen la misma concentración de medio SHU 555A añadido a sangre entera (0,5 ms) o a RBC no dializados (0,64 ms) (Tabla 3). Por lo tanto, la presente invención permite obtener un valor T<sub>2</sub>\* inferior al determinado por la presencia de nanopartículas en la sangre. El resultado de esto es una resolución mejorada en la formación de imágenes por IRM.

**[0113]** También se analizó el efecto en los valores T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> de la dilución de muestras RBC cargadas en sangre no procesada. A la dilución máxima sometida a ensayo (1:250), correspondiente a una inyección de 20 ml de RBC cargado en un cuerpo humano adulto, los valores T<sub>1</sub> resultan 300 mseg inferiores a T<sub>1</sub> de la sangre entera (Tabla 4). Asimismo, los valores T<sub>2</sub>\* de los RBC cargados (L1-RBC) diluidos 1:125 y 1:250 en sangre no procesada son inferiores al valor de sangre entera que contiene medio de contraste no encapsulado a la misma concentración de L1-RBC a las mismas diluciones (14,92 en comparación con 16,65 ms y 17,32 en comparación con 19,79 ms, respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 2: Experimentos de carga con RESOVIST con tampón de diálisis con diferentes miliosmolaridades

Muestra	Descripción de muestra	T <sub>1</sub> (mseg)	T <sub>2</sub> (mseg)	[c] de r1	[c] de r2
ND	RBC no dializado	2289	149,4	/	/
Res-L-RBC (300 mOsm)	RBC no dializado incubado con Resovist	1274	18,6	0,13 mM	0,31 mM
Res-L-RBC (64 mOsm)	500 µl de RBC 70 % dializado en presencia de 100 µl de medio Resovist contra tampón de diálisis a diferentes miliosmolaridades	75	<5	6,6 mM	-
Res-L-RBC (110 mOsm)		104	<5	4,7 mM	-
Res-L-RBC (165 mOsm)		656	12,4	0,44 mM	0,48 mM
Res-L-RBC (212 mOsm)		800	13,2	0,33 mM	0,44 mM

Los valores indicados como <5 no son significativos debido a la sensibilidad instrumental.

Tabla 3: Medición de RMN de los valores T1, T2 y T2\* de RBC cargados

Muestra	Descripción de muestra	T <sub>1</sub> (mseg)	T <sub>2</sub> (mseg)	T <sub>2</sub> <sup>*</sup> (mseg)
Control	Sangre entera			<b>21,96</b>
ND	RBC no dializado	2294	140,2	<b>30</b>
L1-RBC	500µl de RBC 70 % dializado en presencia de 100 µl de medio Resovist	142,5	2,27	<b>0,38</b>
ND + res	Medio Resovist añadido a RBC no dializado a la misma concentración de L1-	123,1	3,37	<b>0,64</b>
SE + res	Medio Resovist añadido a sangre entera a la misma concentración de L1-RBC	129,6	6,9	<b>0,5</b>
L1-RBC (1:125)	RBC cargado diluido con sangre entera	1777	68,3	<b>14,92</b>
L1-RBC (1:250)		1894	86,58	<b>17,32</b>
SE + res (1:125)	SE + res diluido con sangre entera	1713	61,7	<b>16,65</b>
SE + res (1:250)		1845	80,6	<b>19,79</b>

Tabla 4: Medición de RMN de SHU555A (Resovist) en eritrocitos humanos cargados (5,6 mg de Fe/ml RBC 70 %) diluidos con sangre entera. Los valores indicados como &lt;5 no son significativos debido a la sensibilidad instrumental.

Muestra	Descripción de muestra	T <sub>1</sub> (mseg)	T <sub>2</sub> (mseg)	[c] de r1	[c] de r2	[c] dilución estimada
Control	Sangre entera	2130	116,4	/	/	/
Sin carga	RBC dializado	2114	105,6	/	/	/
Ln.a.	RBC cargado con Res no magnéticamente	81	<5	6,1 mM	-	-
Ln.a 1:2	RBC cargado diluido con sangre entera	134	<5	3,6 mM	-	3,05 mM
Ln.a 1:50		1309	38,6	0,118 mM	0,113	0,122 mM
Ln.a 1:100		1582	59,0	0,065 mM	0,054	0,061 mM
Ln.a 1:200		1714	71,2	0,045 mM	0,036	0,030 mM
Ln.a 1:250		1790	79,8	0,036 mM	0,026	0,024 mM

- 5 La estabilidad *in vitro* de los eritrocitos cargados incubados a 37 °C en tampón fisiológico durante varias veces se caracterizó mediante medición de RMN (figura 3). Los resultados obtenidos mostraron que los valores T1 en RBC cargado son inferiores con respecto a los de las células control durante varios días.

[0114] Cabe destacar que las células cargadas no liberan una cantidad significativa de hemoglobina con respecto a las células control (cargado 3,7 % en comparación con 2,7 % de células control no dializadas - figura 4).

- 5 [0115] Se aplicó el mismo procedimiento de carga a los eritrocitos murinos, con la obtención de una encapsulación de Resovist correspondiente a una concentración de hierro paramagnético que oscila entre 1,5 mM y 3,75 mM (para 500 µl de RBC tratado con 100 µl de Resovist), Tabla 5.

Muestras	T <sub>1</sub> (mseg)	T <sub>2</sub> (mseg)	%Ht	[c]
ND	2300	134	44	/
*100-Res-L-RBC	246	<5	44	1,5 mM
ND	3411	401,7	10	/
100-Res-L-RBC (inyectado por vía peritoneal)	894	<5	10	0,3 mM

[0116] Tabla 5. Resultados de RMN farmacocinético *in vivo* tras inyección intraperitoneal de eritrocitos cargados de 100 res en ratones balb. \*500 µl de RBC 70 % se dializan durante 75 min en presencia de 100 µl (2,8 mg de Fe) de medio Resovist

- 10 [0117] Los experimentos *in vivo* con ratones Balb/C se realizaron para investigar la presencia de RBC cargado con nanopartículas magnéticas en el sistema vascular y se analizaron muestras de extracciones de sangre con el análisis RMN durante largos intervalos de tiempo (días).

- 15 [0118] Los resultados que se indican en la figura 5 muestran que la vida media biológica de las nanopartículas magnéticas en la fracción de RBC cargada de sangre entera era similar a la vida media de los eritrocitos murinos no procesados (12 días), mientras que la inyección en ratones de una cantidad equivalente de suspensión sin Resovist produce un T1 medible sólo durante unas pocas horas y que desaparece totalmente de la circulación en 24 horas.

## REFERENCIAS

### [0119]

- 20 Allkemper T., Bremer C., Matuszewski L., Ebert W., Reimer P.; 2002. Contrast-enhanced Blood-Pool MR angiography with optimized iron oxides: effect of size and dose on vascular contrast enhancement in rabbits. *Radiology* 223 (2): 432-438.
- Araujo L., Lobenberg R., Kreuter J.; 1999. Influence of the surfactant concentration on the body distribution of nanoparticles. *Journal of colloid and interface science* 212: 474-482.
- 25 Babincova M., Sourivong P., Leszczynska D., Babinec P.; 2000. Blood-specific whole-body electromagnetic hyperthermia. *Medical Hypotheses* 55(6): 459-460.
- Bacri J., Perzynski R., Salin D., Cabuil V., Massart R.; 1990. Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 85, 27.
- Berry C.C., Curtis A.S.G.; 2003. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36: 198-206.
- 30 Bonnemain B.; 1995. Superparamagnetic agents: physicochemical characteristics and preclinical imaging evaluation for potential applications in: *Contrast Media Research (CMR)*. Naantali 17-22: 35.
- Bonnemain B.; 1998. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications a review. *Journal of Drug Targeting* 6(3): 167-174.
- 35 Brähler M., Georgieva R., Buske N., Müller A., Müller S., Pinkernelle J., Teichgräber U., Voigt A., Bäuml H.; 2006. Magnetite-loaded carrier erythrocytes as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nano Letters* 6(11): 2505-2509.
- Brigger I., Dubernet C., Couvreur P.; 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 631-651.
- 40 Cornell R.M., Schertmann U.; 1991. Iron oxides in the laboratory; preparation and characterization. VCH Publishers, Weinheim.
- Davis S.S.; 1997. Biomedical applications of nanotechnology-implications for drug targeting and gene therapy. *Trends Biotechnol.* 15: 217-224.
- 45 Frank H., Weissleder R., Brady T.J.; Enhancement of MR angiography with iron oxide: preliminary studies in whole-blood phantom and in animal. *AJR Am J Roentgenol* 162: 209-213. Gaur U., Sahoo S.K., De T.K., Ghosh P.C., Maitra A., Ghosh P.K.; 2000. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int. J. Pharm.* 202: 1-10.

- Halavaara J., Tervahartiala P., Isoniemi H., Hockerstedt K.; 2002. Efficacy of sequential use of superparamagnetic iron oxide and gadolinium in liver MR imaging. *Acta radiologica* 43: 180-185.
- Hilger I., Fruhauf K., Andra W., Hiergeist R., Hergt R., Kaiser W. A.; 2002. Heating potential of iron oxides for therapeutic purposes in interventional radiology. *Acad. Radiol.* 9: 198-202. Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T.; 2005. Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 100(1): 1-11.
- Jain S.K., Vyas S.P.; 1994. Magnetically responsive diclofenac sodium-loaded erythrocytes: Preparation and in vitro characterization. *J Microencapsulation* 11(2): 141-151.
- Johnson K.M., Tao J.Z., Kennan R.P., Gore J.C.; 1998. Gadolinium-bearing red cells as blood pool MRI contrast agents. *Magn. Reson. Med* 40(1): 133-142.
- Jung C. W., Jacobs P.; 1995. Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magnetic Resonance Imaging* 13(5): 661-674.
- Kreuter J. 1994. Drug targeting with nanoparticles. *Eur. J Drug. Metab. Pharmacokinet* 19: 253-256.
- Kubaska S., Sahani D.V., Saini S., Hahn P.F., Halpern E.; 2001. Dual contrast enhanced magnetic resonance imaging of the liver with superparamagnetic iron oxide followed by gadolinium for lesion detection and characterization. *Clin. Radiol.* 56: 410-415.
- Low R.N.; 1997. Contrast agents for MR imaging of the liver. *J. Magn. Reson. Imaging* 7(1): 56-67.
- Lübbe A. S., Alexiou C., Bergemann C.; 2001. Clinical applications of magnetic drug targeting. *J Surg. Res.* 95:200-206.
- Magnani M., Rossi L., Fraternali A., Bianchi M., Antonelli A., Crinelli R., Chiarantini L.; 2002. Erythrocyte-mediated delivery of drug, peptides and modified oligonucleotides. *Gene Ther.* 9(11): 749-751.
- Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C.; 2001. Long-circulating and target specific nanoparticles: theory to practise. *Pharm. Rev.* 53: 283-318.
- Morais P.C., Santos J.G., Silveira L.B., Gansau C., Buske N., Nunes W.C., Sinnecker J.P.; 2004. Susceptibility investigation of the nanoparticle coating-layer effect on the particle interaction in biocompatible magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 272-276: 2328-2329.
- Petri-Fink A., Chastellain M., Juillerat-Jeanneret A., Ferrari A., Hofmann H.; 2005. Development of functionalized magnetic nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials* 26: 2685-2694.
- Reimer P., Tombach B.; 1998. Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions. *Eur. Radiol.* 8: 1198-1204.
- Sudimack J., Lee R.J.; 2000. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv. Drug Del. Rev.* 41: 147-162.
- Vyas S.P., Jain S.K.; 1994. Preparation and in vitro characterization of a magnetically responsive ibuprofen-loaded erythrocytes carrier. *J Microencapsulation* 11(1): 19-29.
- Wang Yi-X. J., Hussain S.M., Krestin G.P.; 2001. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.* 11: 2319-2331.
- Wilhelm C., Billotey C., Roger J., Pons J.N., Bacri J.C., Gazeau F.; 2003. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 24: 1001-1011.
- Zhou J., Leuschner C., Kumar C., Hormes J.F., Soboyejo W.O.; 2006. Sub-cellular accumulation of magnetic nanoparticles in breast.

40

## REIVINDICACIONES

1. Eritrocito que contiene óxido de hierro nanoparticulado superparamagnético citosólico, **caracterizado por que** el eritrocito es viable, presentando una vida comparable a la de eritrocitos sin tratar.
- 5 2. Preparación que comprende una pluralidad de eritrocitos según la reivindicación 1, donde la cantidad de óxido de hierro superparamagnético presente en la preparación es suficiente como para que la preparación sea útil como medio de contraste para imagen por resonancia magnética.
3. Eritrocito o preparación del mismo según la reivindicación 1 o 2, donde la cantidad de SPIO en los eritrocitos se encuentra entre 1 mM y 40 mM, preferiblemente entre 3 mM y 20 mM.
- 10 4. Eritrocito o preparación del mismo según cualquier reivindicación anterior, donde el tamaño de partícula total medio no es mayor que 80-90 nm, y se encuentra preferiblemente entre 20 y 60 nm.
5. Eritrocito o preparación del mismo según cualquier reivindicación anterior, donde los eritrocitos comprenden uno o más fármacos.
- 15 6. Eritrocito o preparación del mismo según la reivindicación anterior 5, donde el fármaco se selecciona entre al menos uno de los siguientes: fármacos antiinflamatorios e inmunodepresivos; fármacos antivirales o antiretrovirales; fármacos contra el cáncer; oligonucleótidos; anticuerpos monoclonales, péptidos y ácidos nucleicos peptídicos; fármacos fotosensibilizadores; y agentes fluorescentes infrarrojos; o mezclas de los mismos.
7. Eritrocito o preparación del mismo según cualquier reivindicación anterior, donde las partículas de SPIO se recubren de dextrano.
- 20 8. Eritrocito o preparación del mismo según cualquier reivindicación anterior, donde las nanopartículas superparamagnéticas presentan la fórmula general  $Fe_2^{3+}O_3M^{2+}O$  donde  $M^{2+}$  es un catión de metal divalente seleccionado del grupo que consiste en: manganeso, níquel, cobalto y magnesio.
- 25 9. Proceso para la preparación de uno o más eritrocitos según se define en cualquier reivindicación anterior, comprendiendo dicho proceso la diálisis de una preparación de dichos eritrocitos contra un tampón hipotónico suficiente como para permeabilizar los eritrocitos, y donde dicha preparación comprende SPIO monodispersado, realizándose dicha diálisis durante un tiempo suficiente como para permitir la absorción de al menos una parte de dicho SPIO por dichos eritrocitos y, posteriormente, resellado de los eritrocitos.
- 30 10. Proceso según la reivindicación 9, donde el tampón hipotónico presenta una osmolaridad de entre 60 y 120 mOsm, preferiblemente 70 a 110 mOsm.
11. Proceso según la reivindicación 9 o 10, donde la osmolaridad de los eritrocitos no baja de 90 mOsm después del tratamiento.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde el tampón hipotónico comprende ingredientes para mejorar la supervivencia de los eritrocitos mientras se someten a la formación de poros.
- 35 13. Proceso según la reivindicación 12, donde el tampón presenta un pH equilibrado, glucosa y ATP.
14. Proceso según la reivindicación 13, donde el tampón presenta un pH de aproximadamente 7,4.
15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, donde la duración de la exposición de los eritrocitos al tampón hipotónico se encuentra entre 20 minutos y 5 horas, preferiblemente entre 30 minutos y 4 horas, preferiblemente 1 hora a 3 horas.
- 40 16. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde los eritrocitos tratados se resellan, y preferiblemente, a continuación, se lavan para eliminar el exceso de SPIO.
17. Eritrocito o preparación del mismo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su utilización en una técnica de imagen por resonancia magnética.
- 45 18. Eritrocito o preparación según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su utilización en el tratamiento de una enfermedad donde los eritrocitos son localizables por medio de una fuerza magnética externa alrededor de una zona que se ha de tratar.
19. Eritrocito o preparación del mismo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su utilización en la preparación de un paciente para imagen por resonancia magnética, donde los eritrocitos

o la preparación de los mismos se produce mediante eliminación de eritrocitos del paciente y mediante carga con SPIO para producir eritrocitos según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para volver a introducirse en el paciente mediante inyección.

- 5           **20.** Eritrocito o preparación del mismo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su utilización en la preparación de un paciente para imagen por resonancia magnética según la reivindicación 19, donde los eritrocitos se almacenan una vez se hayan cargado con SPIO.
- 21.** Eritrocito o preparación del mismo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su utilización en un método de imagen por resonancia magnética que comprende la administración de los eritrocitos a un paciente.
- 10           **22.** Eritrocito o preparación del mismo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su utilización en imagen por resonancia magnética *in vivo*, donde el óxido de hierro superparamagnético se encapsula en eritrocitos viables para aumentar la resolución de la imagen por resonancia del óxido de hierro superparamagnético.
- 15           **23.** Preparación farmacológicamente activa que comprende material superparamagnético encapsulado en eritrocitos viables según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, adecuada para su administración a un paciente para imagen por resonancia.

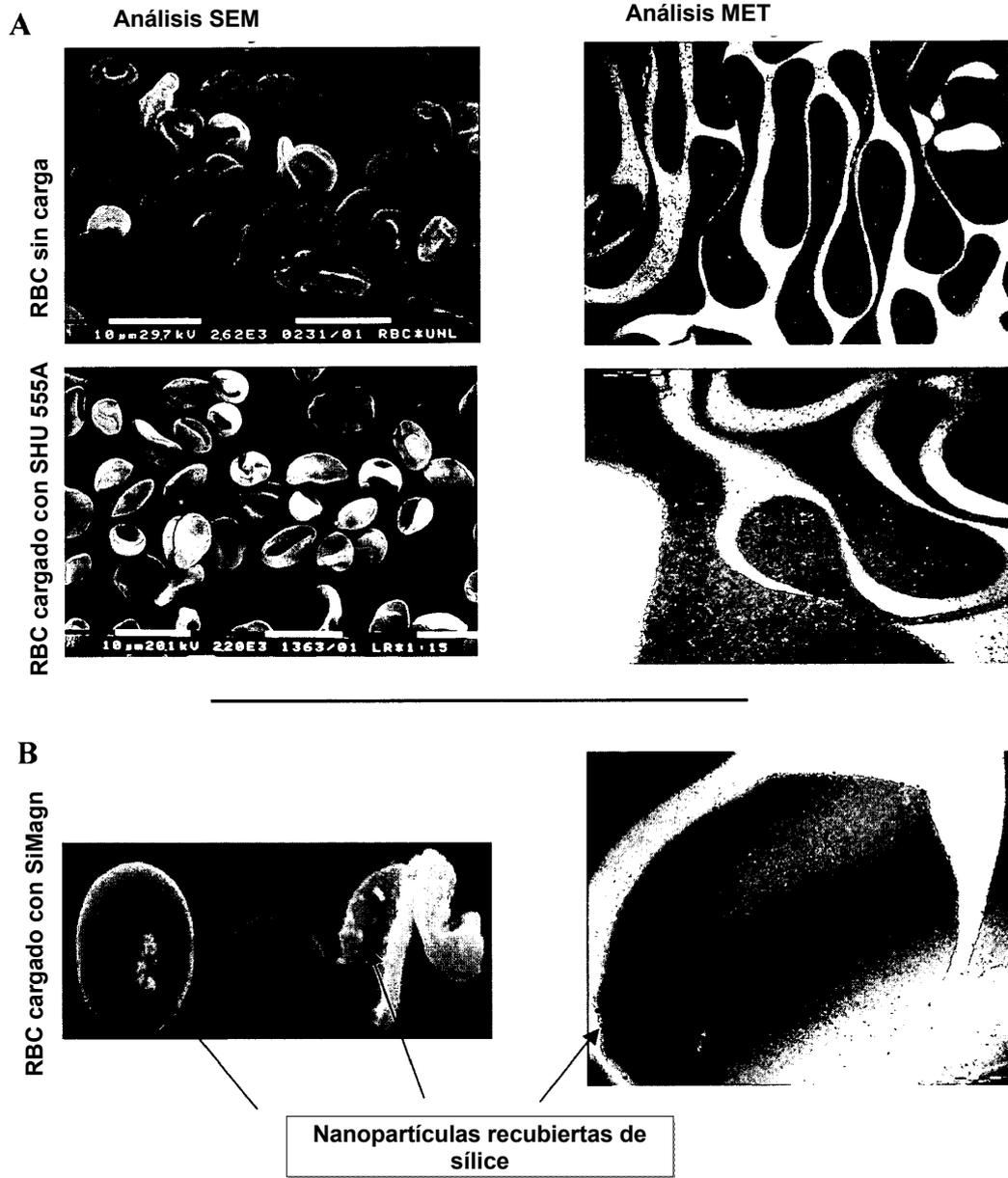


Fig. 1

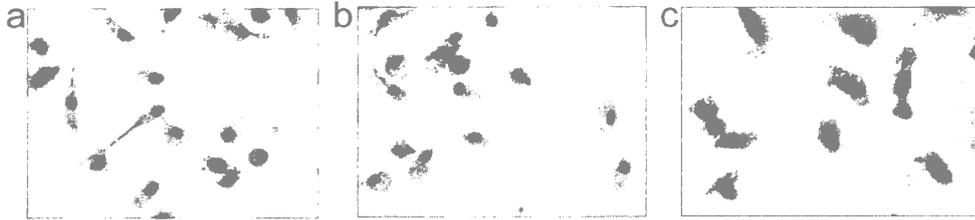


Fig. 2

**Estabilidad *in vitro***

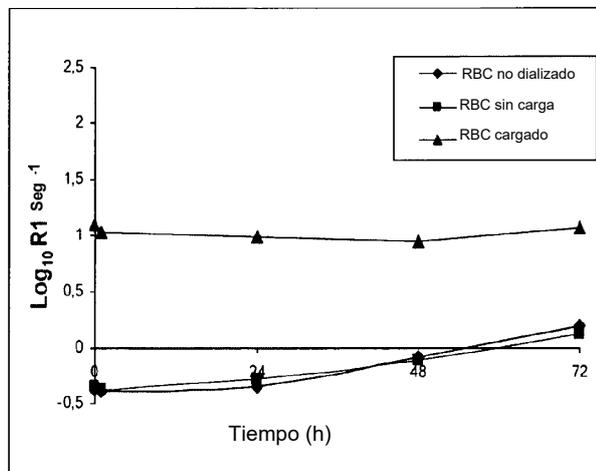


Fig. 3

**Liberación de hemoglobina *in vitro***

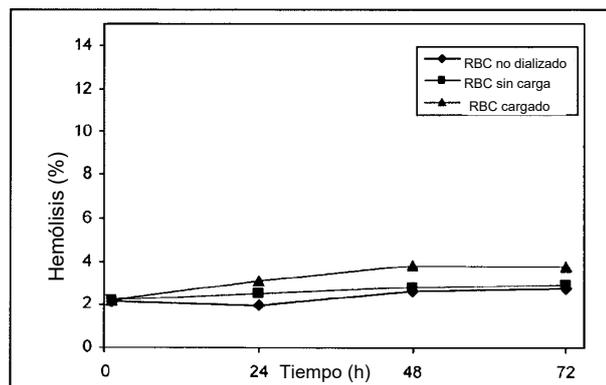


Fig. 4

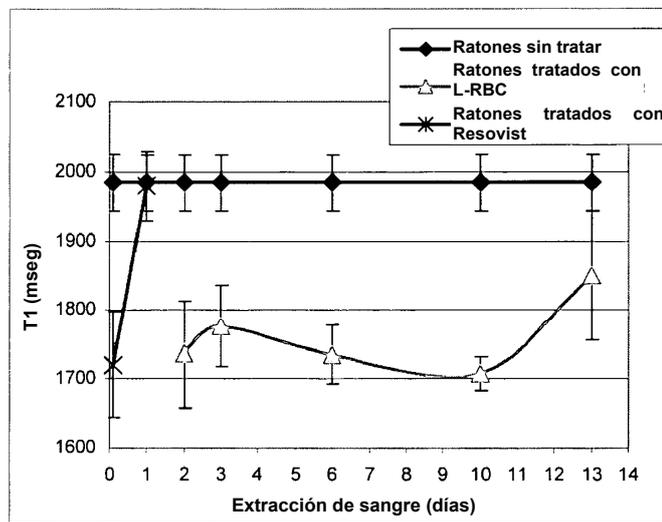


Fig. 5