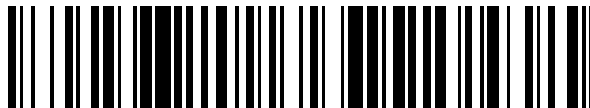


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 710**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2009 PCT/US2009/042606**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09135178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2009 E 09739980 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2285421**

54 Título: **Métodos para la producción y uso de eritrocitos cargados con sustancias para la observación y el tratamiento de la hemodinámica microvascular**

30 Prioridad:

02.05.2008 US 126344

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

08.06.2018

73 Titular/es:

**NOVADAQ TECHNOLOGIES ULC (100.0%)
8329 Eastlake Drive, Unit 101
Burnaby, BC V5A 4W2, CA**

72 Inventor/es:

FLOWER, ROBERT W.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 671 710 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

Métodos para la producción y uso de eritrocitos cargados con sustancias para la observación y el tratamiento de la hemodinámica microvascular

5

Campo de la invención

10

Se describen en la presente descripción estuches, composiciones y métodos para el uso clínico de eritrocitos en los campos de la angiografía y la terapia médica. Los eritrocitos se han precargado con sustancias para la observación del flujo sanguíneo en condiciones fisiológicas para detectar anomalías en la circulación. Los eritrocitos también pueden usarse para el suministro de sustancias terapéuticas en áreas vasculares localizadas. Esta tecnología puede aplicarse a cualquier vasculatura que pueda visualizarse directamente por medios ópticos, como las vasculaturas oculares.

15

Antecedentes de la invención

20

La formación de imágenes angiográficas médicas típicamente implica la administración a un sujeto de una sustancia detectable (véase la patente de Estados Unidos núm. 6,915,154). En algunos casos la sustancia detectable también puede ser un agente terapéutico (véase la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2004/0206364). Con más frecuencia la sustancia detectable se administra directamente a un sujeto mediante la inyección intravascular, en cuyo caso la sustancia detectable se mezcla con y se transporta por el plasma a través de la vasculatura, junto con las células sanguíneas. Cuando se usa la metodología de angiografía convencional, en donde la sustancia detectable es un colorante líquido, la fisiología del flujo sanguíneo se trata de una manera muy simplista, especialmente a nivel microvascular (es decir, las arteriolas, los capilares y las vénulas).

25

La sangre es un fluido no newtoniano, pseudoplástico. Sin embargo, en aplicaciones de diagnóstico, la sangre se trata a menudo como si fuera similar al agua (es decir, un fluido newtoniano), y no una mezcla homogénea de dos fluidos no newtonianos claramente diferentes: (1) líquido (plasma) y (2) partículas (células sanguíneas, especialmente eritrocitos). Las limitaciones inherentes a la angiografía convencional contribuyen a ignorar que la dinámica del movimiento plasmático no necesariamente refleja la dinámica del movimiento de los eritrocitos, especialmente a nivel microvascular, donde su movimiento es mucho más importante que el del plasma para la eficiencia metabólica de la circulación. Por ejemplo, en la angiografía convencional de las vasculaturas oculares con fluoresceína sódica e indocianina verde (SFA e ICGA), la fluorescencia observada proviene de las moléculas de colorante asociadas principalmente con el plasma sanguíneo, no con los eritrocitos. Incluso en los capilares, donde estos se deforman para pasar uno a la vez en forma de vagón, los eritrocitos no pueden verse en las imágenes de angiogramas convencionales, por lo que los fenómenos metabólicamente significativos como la vasomoción, que resulta en la suspensión periódica del movimiento de los eritrocitos a través de los capilares, no pueden visualizarse directamente. Sin embargo, se ha postulado que todos los hallazgos clínicos relacionados con el edema en la maculopatía diabética pueden explicarse como resultado de alteraciones en la vasomoción retiniana (Bek 1999, Acta Ophthalmol Scand 77:376). Además, en la angiografía convencional, las moléculas de colorante abandonan el plasma y se asocian con las paredes de los vasos, por lo que los vasos sanguíneos exhiben rápidamente fluorescencia en estado estacionario, oscureciendo de esta manera la visualización adicional del movimiento de la sangre. En consecuencia, la angiografía convencional con colorante fluorescente se limita como herramienta de diagnóstico, ya que la información hemodinámica que transmite es engañosa con respecto a la eficiencia metabólica y la capacidad del flujo sanguíneo microvascular. Un ejemplo de esto sería basarse en la observación de angiogramas convencionales para analizar la capacidad metabólica del flujo sanguíneo a través de una membrana neovascular coroidea (CNV). Debido al fenómeno bien conocido de escurrimiento de plasma (que puede ocurrir cuando el vaso alimentador de la CNV emerge en un ángulo agudo a partir del vaso arterial coroideo que lo alimenta), solo el plasma deficiente en eritrocitos profusaría la CNV, pero esta deficiencia no se reflejaría en las imágenes de angiograma, ya que la fluorescencia proviene solo del colorante en el plasma, no de los eritrocitos.

30

35

40

45

50

Alternativamente, se ha administrado una sustancia detectable (por ejemplo, el colorante de fluoresceína sódica) en un portador de partículas, los liposomas sensibles al calor (Kiryu y otros 1994, Invest Ophthalmol Vis Sci 35:3724). Sin embargo, tales partículas artificiales son rígidas y pequeñas para asegurar que puedan pasar sin obstrucciones a través de los vasos capilares más pequeños. No pueden servir como modelos fieles de la dinámica de los eritrocitos.

55

Resumen de la invención

60

En la presente descripción se describen estuches, composiciones, y métodos que aprovechan la capacidad de los eritrocitos de precargarse con diversas sustancias, como colorantes fluorescentes que facilitan la formación de imágenes médicas. Los eritrocitos humanos, a pesar de sus grandes diámetros y volúmenes, se adaptan fácilmente a los diámetros capilares pequeños, y se ha demostrado que poseen propiedades que los hacen útiles como portadores de moléculas diferentes a la hemoglobina. Los eritrocitos son capaces de deformación reversible, como ocurre cuando están en una solución hipotónica; sus volúmenes aumentan, lo que provoca que poros de 200-500 Å se abran transitoriamente en las membranas de las células (Seeman, 1967, J Cell Biology 32:55), lo que permite el intercambio de transmembrana bidireccional entre su contenido normal (hemoglobina) y sustancias de alto peso molecular colocadas en su cercanía externa. Después, cuando la solución vuelve a la normotonidad, los poros se cierran y las células vuelven a su tamaño normal, y en encapsulan en su interior las sustancias añadidas; la sustancia restante no retenida puede eliminarse por

65

5 lavado, lo que deja eritrocitos osmóticamente competentes cargados de sustancias; estas células contienen cantidades reducidas de hemoglobina, lo que las hace incompetentes o al menos ineficaces con respecto al suministro de oxígeno. Sin embargo, los eritrocitos cargados de sustancias (S-IE) parecen tener un tiempo de vida normal de hasta 120 días, y se han utilizado para estudiar la morfología, fisiología y bioquímica de la membrana (véase, por ejemplo, Wu y otros, 2005, Biochem Pharmacol 69(8): 1257; Rodnenkov y otros, 2005, Pathophysiology 11 (4):209). Los S-IE se han usado en el campo de la formación de imágenes médicas (véase, por ejemplo, Thelwall y otros, 2002, Magnetic Resonance in Medicine 48:649; Kleszcynska y otros, J. Fluoresc. 15(2):137).

10 Una modalidad se refiere al descubrimiento de que la cantidad de colorante ICG insertada en cada eritrocito puede producir fluorescencia detectable sin exceder los niveles seguros de iluminación retinal. Otra modalidad se refiere al descubrimiento de que la cantidad necesaria para inducir óptimamente la fluorescencia y la cantidad mucho más necesaria para absorber energía suficiente para potenciar la fotocoagulación son mutuamente excluyentes. Todavía otra modalidad se refiere al resellado de las células de los eritrocitos cargados de sustancias.

15 El uso de eritrocitos como un sistema de suministro de fármacos ha sido investigado (ver, por ejemplo, Rossi y otros 2001, Biotechnol Appl Biochem 33:85; Magnani y otros, 1998, Biotechnol Appl Biochem 28:1). En el método descrito, los eritrocitos cargados con diversas sustancias terapéuticas se reinyectaron autólogamente en un sujeto y se distribuyeron subsecuentemente por todo el cuerpo; allí estos liberaron continuamente la sustancia encapsulada a medida que la población de eritrocitos experimentaba una muerte celular normal en un intervalo de aproximadamente 120 días. Aunque es útil para el suministro de ciertos fármacos en los que es conveniente el mantenimiento de algún nivel de sustancia a lo largo de la circulación, este método no permite fácilmente la liberación dirigida de sustancias terapéuticas en una alta concentración. Por lo tanto, su uso puede ser limitado para el suministro de sustancias a áreas vasculares específicas que requieren concentraciones terapéuticas demasiado altas para ser toleradas en todo el cuerpo. Otra modalidad se refiere al descubrimiento de que en situaciones donde el área vascular objetivo es ópticamente accesible (por ejemplo, las vasculaturas oculares o las vasculaturas de órganos huecos tales como la vejiga), los eritrocitos cargados con sustancias apropiadas pueden lisarse por medio del suministro óptico de una radiación apropiada, y de esta manera suministran en áreas precisamente localizadas sus contenidos retenidos.

30 También se describen en la presente descripción estuches y métodos para la preparación relativamente fácil de eritrocitos cargados con sustancias (S-IE) para su uso en la aplicación clínica para la reinyección autóloga. Alternativamente, pueden prepararse eritrocitos precargados adecuados para la reinyección homóloga en una forma comercial. Con este fin, en la presente descripción se describen metodologías para producir y estabilizar células cargadas con sustancias, tanto para aplicaciones de diagnóstico como terapéuticas en seres humanos, que pueden evitar la necesidad del usuario final de acceder a extensos servicios de laboratorio con el objetivo de obtener y procesar células en condiciones estériles de banco sanguíneo.

35 Otra modalidad se refiere al descubrimiento de que los S-IE con fluorescencia incrementada (por encima de lo que puede lograrse mediante la carga óptima de colorante solo en cada eritrocito) para la detección de células, pueden lograrse mediante la incorporación de coloides metálicos de plata.

40 Otra modalidad proporciona nuevos enfoques para la detección y la liberación controlada de sustancias terapéuticas encapsuladas en S-IE que dan como resultado el suministro de altas concentraciones de sustancia con respecto a áreas vasculares específicas, pero que al mismo tiempo ascienden a concentraciones de microdosis con respecto a la circulación como un todo; esto hace posible el uso de sustancias que de cualquier otra manera serían rechazadas debido a la importante toxicidad sistémica que demuestran cuando se administran por inyección intravenosa convencional. Diversas sustancias y sus combinaciones pueden precargarse en los eritrocitos de manera que se considere un espectro de propiedades biológicas, químicas y físicas convenientes de esos elementos de maneras en las que esas combinaciones no producirían resultados útiles.

45 Una modalidad se refiere al uso de sustancias precargadas en eritrocitos y al uso de S-IE en angiografía de diagnóstico oftálmico y suministro de fármacos. Alternativamente, esta tecnología puede aplicarse a otras vasculaturas que pueden visualizarse directamente, así como también a otras sustancias que facilitan fines similares en esas otras vasculaturas.

50 Breve descripción de los dibujos

55 Diversas modalidades de la invención se comprenderán a partir de la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y los dibujos adjuntos, en los que:

60 Las Figuras 1A-1D son micrografías de fluorescencia en el infrarrojo cercano a 40 aumentos, de eritrocitos, que comparan la luminosidad de las células "teñidas" con ICG (A - teñidas en solución de ICG 1 mM durante 30 minutos y B - teñidas en solución de ICG 2 mM durante 60 minutos para células en las cuales se cargó ICG a través de los poros en sus membranas; C - plasma teñido que resulta de la exposición durante 20 minutos de los eritrocitos teñidos de A; D - dializados en solución de ICG 1 mM durante 30 minutos);

65 Las Figuras 2A-C son micrografías de fluorescencia en el infrarrojo cercano a 40 aumentos, de eritrocitos en los que se cargó ICG, lo que demuestra el efecto de introducir diferentes concentraciones de colorante en la suspensión de células dializadas;

Las Figuras 3A-3D son micrografías de fluorescencia en el infrarrojo cercano a 40 aumentos que comparan la luminosidad de ICG "teñido" (A = luminosidad inicial, B = luminosidad a 20 s) y eritrocitos cargados con ICG (C = luminosidad inicial, D = luminosidad a 20 s) después de la exposición continua a la misma iluminación, debido al blanqueamiento;

La Figura 4A es una micrografía de fluorescencia en el infrarrojo cercano a 40 aumentos, de eritrocitos humanos cargados con ICG;

La Figura 4B es una fotografía de un vial que contiene eritrocitos humanos liofilizados cargados con ICG;

La Figura 4C es una micrografía de fluorescencia en el infrarrojo cercano a 40 aumentos, de eritrocitos humanos liofilizados y cargados con ICG, reconstituidos mediante la adición de 1 ml de H₂O;

La Figura 5A es una imagen de angiograma con fluoresceína sódica (izquierda) y una imagen de angiograma convencional con ICG (derecha) para la orientación del ojo derecho normal de un paciente;

La Figura 5B es una imagen de angiograma de eritrocitos cargados con ICG del ojo derecho normal del paciente; los eritrocitos individuales aparecen como puntos blancos;

La Figura 5C es una imagen de angiograma con fluoresceína sódica (izquierda) y una imagen de angiograma convencional con ICG (derecha) para la orientación del ojo izquierdo enfermo del paciente;

La Figura 5D es un angiograma de eritrocitos cargados con ICG del ojo izquierdo enfermo del paciente; los eritrocitos individuales aparecen como puntos blancos;

Las Figuras 6A y 6B son imágenes de angiograma del mismo ojo de conejo que comparan la fluorescencia de ICG en la vasculatura coroidal después de la inyección intravenosa convencional de un bolo de colorante ICG acuoso (6A) y después de la inyección de un bolo idéntico que contiene coloide de plata (6B);

La Figura 7 es una imagen de fluorescencia en el infrarrojo que compara el efecto potenciador de la fluorescencia del coloide de plata en soluciones de ICG de 0,05 mg/ml; las muestras en el lado izquierdo no contienen coloides, mientras que las del lado derecho contienen coloides; las muestras en la parte superior se encuentran en tubos de 1 cm de espesor, mientras que las de la parte inferior se encuentran en tubos de 100 micrómetros de espesor;

La Figura 8 es una imagen de fluorescencia en el infrarrojo de las muestras de la Figura 7 que muestra el reflejo de la luz de longitud de onda 805 nm utilizada para estimular la fluorescencia; en este caso, no se colocó ningún filtro de barrera frente a la cámara CCD;

La Figura 9 es un diagrama esquemático de una modalidad de un estuche que contiene recipientes estériles usados en la carga de sustancias en eritrocitos (ver Ejemplo 1);

La Figura 10A es una representación esquemática de las etapas implicadas en la eliminación de un volumen de eritrocitos libre de plasma y leucocitos a partir de la parte inferior del tubo al vacío para la recolección de muestras de sangre después de la centrifugación, mediante el uso de una aguja larga;

La Figura 10B es una representación esquemática de las etapas implicadas en la eliminación de un volumen de eritrocitos de la parte inferior de los dos tubos de 15 ml de solución de lavado después de la centrifugación, mediante el uso de una aguja larga; y

La Figura 11 es una representación esquemática de las etapas secuenciales ordenadas (A-E) que detalla el uso de esos recipientes particulares del estuche representado en la figura 9 para lograr la diálisis de los eritrocitos, incluida la adición de colorante ICG a la solución una vez que se completa la diálisis y los poros en las membranas celulares se abren.

Descripción detallada de la invención

Preparación de eritrocitos cargados con sustancias para reinyección

Una modalidad se refiere a la encapsulación de colorantes fluorescentes en eritrocitos para observación diagnóstica. Opcionalmente, los eritrocitos pueden usarse para el suministro de sustancias terapéuticas. En la solicitud anterior, la reinyección de S-IE puede mejorar el rendimiento de la angiografía al visualizar el movimiento de los eritrocitos fluorescentes, en lugar del plasma marcado con colorante. En la última solicitud, el motivo para la encapsulación de sustancias en las células es que muchas sustancias convenientes no se unen bien a la membrana celular externa (como es cierto para el colorante ICG). Sin embargo, la encapsulación de esas sustancias en los eritrocitos y la liberación localizada por lisis inducida por láser facilita el suministro de altas concentraciones de sustancias en las áreas objetivo, que solo ascienden a concentraciones de microdosis con respecto a la circulación como un todo. Esto hace posible el uso de sustancias que de cualquier otra manera tendrían que rechazarse. En la solicitud anterior para observación diagnóstica, la asociación de colorantes fluorescentes con eritrocitos puede depender de una o más de tres circunstancias, cada una de las cuales se relaciona con por qué es útil la inserción del colorante en la célula en lugar de simplemente "teñir" el exterior de la célula:

(1) Aunque muchos colorantes fluorescentes, como el colorante ICG, se unen a la membrana celular externa de los eritrocitos, la unión es débil y no covalente, e independientemente de la concentración del colorante y el tiempo de conjugación, la luminosidad máxima de fluorescencia que puede conseguirse es considerablemente menor que la óptima (véase la Figura 1). Los eritrocitos en el cuadro B se "tiñeron" mediante conjugación con colorante ICG en una solución al doble de la concentración del colorante y durante el doble que las células del cuadro A; sin embargo, la luminosidad de fluorescencia de ambos es la misma ya que solo hay un número finito de sitios de unión disponibles en la superficie celular, independientemente de la abundancia de las moléculas de colorante en una solución particular. El cuadro C demuestra que una vez que las células "teñidas" entran en contacto con proteínas plasmáticas, las moléculas de ICG son más atraídas por las proteínas plasmáticas que por la membrana celular, por lo que las células "teñidas" se vuelven aún menos brillantes durante la circulación; esto no ocurre con las células cargadas con colorante.

(2) La exposición a la energía de excitación de fluorescencia para fines de diagnóstico no debe exceder el nivel de exposición máximo seguro permisible para la retina sensorial. Dado que el colorante ICG es un emisor de fluorescencia bastante débil, debe tenerse cuidado para garantizar que la cantidad de ICG presente después de la carga sea óptima, lo que da como resultado la máxima intensidad de fluorescencia posible a un nivel de energía de excitación seguro dado. Esta condición puede cumplirse mediante la inserción de colorante en los eritrocitos. La Figura 1, Cuadro D, demuestra que la carga de eritrocitos con ICG por diálisis en una solución de colorante que tiene la misma menor concentración usada para teñir las células en el Cuadro A, es considerablemente más brillante; hay considerablemente más sitios de unión dentro de un volumen celular (incluidos los asociados con la hemoglobina residual) que en su superficie externa. Además, dado que el ICG es sujeto a la extinción de la fluorescencia por concentración, incluso cuando está dentro de los eritrocitos, la cantidad de colorante cargado debe controlarse: demasiado o muy poco no producirá la fluorescencia máxima. La misma luminosidad de las células en A y B demuestra "tinción" mediante la conjugación incluso en una solución de colorante de alta concentración que no alcanza la luminosidad óptima posible mediante la inserción de colorante (D). La imagen C demuestra que la afinidad de las moléculas de colorante ICG es mayor por las proteínas plasmáticas que por la membrana externa de los eritrocitos; las células en A, B y D se resuspenden en solución salina isotónica. Alcanzar la concentración óptima de colorante se logra controlando la cantidad de colorante en la solución durante la diálisis una vez que se abren los poros de las membranas celulares; la experimentación ha determinado que la cantidad óptima es de aproximadamente 1,0 $\mu\text{mol/ml}$ de solución de células dializadas (véase la Figura 2). Después de establecer el equilibrio entre las soluciones internas y externas de las células, los poros se cierran cuando se vuelve la solución hipotónica que contiene las células a un nivel normotónico, lo que fija la concentración de colorante retenido. Esto también tiene la ventaja de prevenir la tinción del plasma con colorante y la asociada reducción del contraste entre la fluorescencia de la célula y la luminosidad de fondo una vez que las células vuelven a inyectarse. Las Figuras 2A, 2B y 2C tienen concentraciones de 0,31 $\mu\text{mol/ml}$ de solución, 0,89 $\mu\text{mol/ml}$ de solución y 6,14 $\mu\text{mol/ml}$ de solución que dan lugar a una luminosidad promedio en escala de grises de 8 bits de 159, > 255 y 165, respectivamente.

(3) El colorante ICG es sujeto de blanqueo, lo que dificulta la detección y la visualización de los eritrocitos cargados con ICG debido a los reducidos niveles de fluorescencia resultantes para un nivel de iluminación dado. Esto puede ser un problema, especialmente cuando es conveniente realizar observaciones durante períodos de muchos segundos, como sería necesario para observar los efectos de la vasomoción sobre el movimiento de los eritrocitos, en donde el movimiento celular individual puede detenerse temporalmente durante hasta 30 segundos. Se ha determinado experimentalmente que, mientras que las células "teñidas" con colorante ICG son susceptibles de blanqueo, las células cargadas con ICG no lo son (véase la Figura 3). De nuevo, es el número limitado de moléculas colorantes en la membrana externa de un eritrocito, en comparación con el número dentro del volumen celular lo que hace que este fenómeno sea significativamente visible en las células "teñidas", pero no en las células cargadas.

En una modalidad, la encapsulación de diversas sustancias en eritrocitos humanos se lleva a cabo mediante un procedimiento de diálisis hipotónica, resellado isotónico y reasociación. La colocación de eritrocitos lavados en una solución hipotónica provoca que los poros que pueden tener un tamaño que oscile entre 200-500 Å se abran transitoriamente en las membranas celulares, permitiendo de esta manera que las sustancias en la solución (como el colorante ICG) atraviesen las membranas. El hacer la solución hipotónica normotónica provoca que los poros se cierren, y las células (ahora con contenido de hemoglobina reducido) vuelvan a un estado osmóticamente competente, y la encapsulación de las sustancias en su interior. Las sustancias restantes no retenidas pueden lavarse, dejando solo eritrocitos cargados con sustancias (S-IE).

En una modalidad, la retención del colorante (o encapsulación) es como se describe a continuación. Se obtiene sangre fresca en anticoagulante ácido-citrato-dextrosa en condiciones estériles y se centrifuga para obtener los eritrocitos. Después se lavan en un tampón para eliminar las proteínas de la superficie, los leucocitos y las plaquetas y después se centrifugan. Los eritrocitos se suspenden a aproximadamente 70 % de hematocrito (Ht) en la solución de tampón de lavado dentro de un tubo de diálisis, donde se dializan frente a un tampón de diálisis. El colorante ICG se agrega después a la solución de eritrocitos dializados, y la mezcla se incuba con agitación suave. Los eritrocitos (ahora con contenido reducido de hemoglobina) se vuelven a cerrar cuando la solución de eritrocitos dializados vuelve a un estado normotónico y mediante la incubación de las células. Las células reselladas se lavan varias veces y se centrifugan cada vez. Aproximadamente 9 ml de sangre total producen 4 ml de eritrocitos cargados con ICG (aproximadamente 80 % de Ht). Esta misma metodología básica puede elaborarse para satisfacer varios enfoques para proporcionar los S-IE a usar en varias circunstancias diferentes:

1. Preparación Ad-hoc de pequeños volúmenes de los S-IE para la reinyección autóloga:

Una modalidad proporciona un método para un usuario final que quiere utilizar los S-IE para un sujeto específico, mediante el uso de los propios eritrocitos del sujeto, o para introducir sustancias en una combinación o concentración deseada.

La invención proporciona un método que comprende:

- (a) proporcionar eritrocitos en una solución anticoagulante de sangre;
- (b) dializar la solución que contiene eritrocitos en (a) frente a un tampón de diálisis que tiene una osmolalidad en el intervalo de 50-70 mOsm/kg para hacer que se abran los poros en el eritrocito;
- (c) combinar la solución dializada en (b) con al menos un colorante fluorescente que es colorante verde de indocianina y una sustancia que inhibe la formación destructiva de cristales de hielo; y

(d) combinar la solución que contiene colorante en (c) con una solución de resellado que tiene una osmolalidad de al menos 1,000 mOsm/kg para reducir la osmolalidad, lo que provoca que los poros de los eritrocitos se cierren y se retenga dentro de los eritrocitos al menos un colorante fluorescente y la sustancia; que comprende además la etapa de liofilizar los eritrocitos que contienen el colorante y la sustancia retenidos.

5

En una modalidad, el suministro en la etapa (a) comprende obtener una muestra de sangre de un sujeto.

En una modalidad, la solución dializada en (b) tiene una osmolalidad en el intervalo de 80-90 mOsm/kg, por ejemplo, una osmolalidad en el intervalo de 85-87 mOsm/kg.

10

En una modalidad, el método comprende además lavar los eritrocitos con una solución isotónica antes de la diálisis en (b).

15

En una modalidad, el al menos un colorante fluorescente en (c) es colorante verde de indocianina que tiene una concentración en el intervalo de 0,25 a 3,0 μ moles/ml de solución dializada.

Puede usarse un estuche que comprende lo siguiente:

un anticoagulante sanguíneo;

un tampón de diálisis que tiene una osmolalidad en el intervalo de 50-70 mOsm/kg;

20

una cámara de diálisis;

al menos un colorante fluorescente; y

una solución de resellado que tiene una osmolalidad de al menos 1,000 mOsm/kg.

25

En una modalidad, la cámara de diálisis suspende desde su parte superior un tubo de diálisis con un límite de peso molecular en el intervalo de 12 000 a 14 000 Daltons. En una modalidad, el tubo de diálisis permite la introducción de un fluido que contiene sangre en el tubo, y puede introducirse un fluido de diálisis fuera del tubo suspendido.

30

Pequeñas cantidades de eritrocitos, como las que serían necesarias para la reinyección autóloga en un solo individuo, pueden prepararse en condiciones estériles, usando su propia sangre, en aproximadamente un tiempo de 1,75 horas. Sin embargo, dado que las condiciones estériles de laboratorio rara vez están disponibles de manera conveniente en lugares donde se llevan a cabo procedimientos diagnósticos y terapéuticos frecuentes, es un requisito una forma conveniente de preparar o adquirir los eritrocitos si dichos procedimientos van a aplicarse ampliamente. Una modalidad proporciona estuches (uno para cada sujeto individual) que consiste cada uno de una serie de recipientes estériles desechables, precargados con cantidades apropiadas de productos químicos. Puede transferirse un volumen de sangre recién obtenido, en secuencia uno a otro, hasta que se completen las etapas de carga de sustancias (véanse las Figuras 9, 10 y 11). Los S-IE preparados de esta manera pueden almacenarse para su uso durante varios días a 4 °C, hasta su uso.

35

Puede usarse un refrigerador pequeño que contiene una pequeña centrífuga de velocidad fija y tiempo fijo. El espacio del refrigerador (accesible desde su parte superior para mantener razonablemente contenido el aire frío) puede ser lo suficientemente grande como para contener y preenfriar un estuche y para proporcionar un espacio de trabajo fresco y estéril, así como también un lugar para almacenar temporalmente los S-IE preparados hasta su uso.

40

La ventaja de este método básico de preparación es la introducción ad hoc de sustancias o mezclas de sustancias (es decir, la introducción simultánea de dos o más sustancias discretas, cada una a una concentración diferente). Además, la reinyección autóloga de las células de un sujeto asegura que se encontrará con la contaminación de la incompatibilidad de la proteína humana. Aunque no se requiere ningún procesamiento adicional, siempre que las células se almacenen a la temperatura adecuada y se utilicen dentro de varios días, las células pueden conservarse durante periodos mucho más largos mediante alguno de los métodos que se describen más abajo. (Ver Ejemplos 1 y 2)

45

En consecuencia, también se describe en la presente descripción un estuche que comprende:

un anticoagulante sanguíneo;

una pluralidad de soluciones hipotónicas;

al menos un colorante fluorescente; y

una solución de resellado que tiene una osmolalidad de al menos 1,000 mOsm/kg.

50

El estuche que se describe en la presente descripción proporciona una pluralidad de soluciones hipotónicas para diluir sucesivamente una muestra de sangre y alcanzar una osmolalidad final en el intervalo de 80-90 mOsm/kg, por ejemplo, en el intervalo de 85-87 mOsm/kg. La pluralidad de soluciones puede comprender al menos tres o al menos cuatro soluciones hipotónicas, teniendo cada una osmolalidad diferente. En una modalidad, la pluralidad de soluciones puede tener la misma o diferente osmolalidad, siempre que la osmolalidad máxima de cualquiera de las soluciones sea 300 mOsm/kg y la osmolalidad mínima de cualquiera de las soluciones sea de 50 mOsm/kg.

55

En cualquier modalidad descrita en la presente descripción, el estuche puede comprender además una solución salina isotónica de lavado que comprende glucosa o trehalosa, por ejemplo, una solución de glucosa 5 mM o al menos una solución de trehalosa 50 mM (por ejemplo, una solución de trehalosa 50 mM).

60

Otro método que se describe en la presente descripción comprende las siguientes etapas:

(a) combinar eritrocitos con un anticoagulante sanguíneo para formar una solución que tiene una osmolalidad de al menos 300 mOsm/kg;

5 (b) diluir sucesivamente la solución en (a) con al menos tres soluciones hipotónicas para reducir la osmolalidad a menos de 100 mOsm/kg para provocar la apertura de los poros de los eritrocitos;

(c) combinar la solución diluida en (b) con al menos un colorante fluorescente; y

(d) combinar la solución que contiene colorante en (c) con una solución de resellado que tiene una osmolalidad de al menos 1,000 mOsm/kg para reducir la osmolalidad, provocando que los poros de los eritrocitos se cierren y se retenga al menos un colorante fluorescente dentro de los eritrocitos.

10

En una modalidad, los estuches o métodos descritos en la presente descripción incluyen una solución isotónica de resellado que tiene una osmolalidad de al menos 2,000 mOsm/kg.

15

En una modalidad, después de realizar cualquier método que se describe en la presente descripción, después de la etapa (d), el método comprende además:

(e) lavar los eritrocitos en una solución salina isotónica de lavado que contiene glucosa o trehalosa para eliminar el colorante extracelular.

20

En una modalidad, el lavado se realiza con una solución salina que contiene trehalosa 50 mM.

25

En una modalidad, los estuches o métodos que se describen en la presente descripción proporcionan al menos un colorante fluorescente, en particular colorante verde de indocianina (ICG). En una modalidad, la concentración de colorante de una composición que comprende el colorante retenido se encuentra en el intervalo de 0,25 a 1,5 mM. En otra modalidad, la concentración de colorante se encuentra en el intervalo de 0,3 a 0,4 mM. En una modalidad, esta concentración optimiza la intensidad de la fluorescencia para facilitar la visualización de las células. Aún en otra modalidad, la concentración de colorante es mayor que 0,4 mM. Esta concentración puede facilitar la absorción por parte de las células de longitudes de onda en el infrarrojo, lo que permite de esta manera que las células sean capaces de lisarse al calentarse.

30

En una modalidad, la fuente de eritrocitos es sangre tipo O. En otra modalidad, la fuente de eritrocitos es sangre tipo A o tipo B. En la última modalidad, el método puede comprender además añadir α - β -glucosidasa para separar los aglutinógenos A y B de la superficie de los eritrocitos.

35

En una modalidad, la composición que comprende el colorante retenido en los eritrocitos comprende además al menos un excipiente biocompatible. En una modalidad, el al menos un excipiente es polisacarosa. En una modalidad, la al menos una concentración de excipiente está en el intervalo de 0,5 % a 5 %.

2. Pequeños volúmenes preparados previamente de los S-IE para Inyección Universal:

40

Una modalidad proporciona un método para producir los S-IE para usuarios finales que desean el acceso a los S-IE sin tener que adquirir sangre de sus sujetos. Este método puede realizarse a gran escala y puede proporcionar múltiples usuarios finales.

45

En situaciones en las que la solicitud de la metodología básica anterior puede ser inconveniente debido a las limitaciones de la ubicación de las instalaciones o el tiempo, es posible utilizar en su lugar S-IE obtenidos de una fuente que no sea el sujeto. Utilizando la metodología básica, alícuotas de grandes volúmenes de eritrocitos de donantes humanos de sangre O negativos, precargados con diversas sustancias o mezclas de sustancias, pueden congelarse lentamente y mantenerse a temperaturas criogénicas hasta que se necesiten para la inyección universal. Tal enfoque puede usarse para crear células cargadas con sustancias que pueden ser inyectadas universalmente en sujetos humanos, mientras se elimina la necesidad de obtener primero la sangre del sujeto y el tiempo requerido para la perpetración. Este enfoque es particularmente adecuado para preparaciones de células cargadas con sustancias que pueden usarse frecuentemente en numerosos sujetos, como para la modalidad de procedimientos diagnósticos o terapéuticos normalizados, donde no se contempla el uso de sustancias ad hoc.

50

Alternativamente, el grupo de sujetos que forma la fuente de eritrocitos para la preparación a granel de eritrocitos cargados con sustancias inyectables universalmente, puede expandirse más allá de aquellos que tienen solo sangre tipo O negativo mediante el uso al comienzo del proceso de carga celular de α - β glucosidasa para separar la superficie celular A- y B-aglutinógenos. Parece que no existe nada definitivo en la bibliografía que indique el nivel umbral a partir del cual cualquier antígeno de superficie de la membrana celular no eliminado por lavado u otro tratamiento induciría una reacción inmunológica. Dado que se anticipa, especialmente con respecto al uso diagnóstico, que el volumen máximo de células procesadas reinyectadas será del orden de solo 1 o 2 ml, existe una posibilidad mínima de inducir una reacción inmunológica.

65

3. Preparación de S-IE fuera de plataforma para inyección universal

Los S-IE liofilizados preparados para la inyección universal en los que se han insertado las sustancias convenientes a las concentraciones deseadas dan como resultado una preparación comercial que se almacena fácilmente a temperatura ambiente durante períodos prolongados (más de un año). La reconstitución solo requiere la adición de agua estéril, lo que hace que dicho producto sea la forma más conveniente de S-IE inyectables. Este parece ser el método más adecuado para hacer que las células cargadas de sustancias sean estables y se reconstituyan fácilmente.

Los intentos anteriores de desarrollar un método para liofilizar eritrocitos de manera que la reconstitución de las células de como resultado eritrocitos con un citoesqueleto intacto y con hemoglobina biológicamente activa (es decir, células biológicamente viables por completo) han demostrado ser ilusorios; el hecho de que tal preparación no se encuentre disponible fácilmente subraya esto. Generalmente, cuando los eritrocitos se liofilizan por métodos previos, por ejemplo, en una solución salina acuosa o una solución salina tamponada con fosfato (PBS), las células reconstituidas se dañan en la medida en que no son capaces de metabolizar (es decir, la hemoglobina celular no puede transportar oxígeno), y/o el rendimiento de las células intactas, no deformadas, es inaceptablemente bajo. Un factor que provoca el daño puede surgir en el proceso de congelación, donde los cristales de hielo se forman en el interior y exterior de las células, lo que altera de esta manera la estructura celular. Los intentos de obviar este problema parecen incluir principalmente procedimientos que utilizan velocidades de enfriamiento que son más rápidas que la formación de cristales de hielo (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5656498), o la inclusión de un monosacárido en el fluido de suspensión celular que puede o puede no difundirse en las células, cuya presencia suprime la cristalización del hielo durante el enfriamiento (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5340592). Sin embargo, parece ser que estos enfoques no han logrado producir rendimientos suficientemente altos de células funcionales tras la reconstitución como para ser útiles en el campo clínico.

En los métodos que se describen en la presente descripción, la composición que contiene el colorante retenido se congela o liofiliza. En consecuencia, las composiciones que se describen en la presente descripción son composiciones congeladas o secadas bajo congelación (liofilizadas) que comprenden una composición seca bajo congelación (liofilizada) que comprende al menos un colorante fluorescente retenido dentro de los eritrocitos.

En el método de la invención, los eritrocitos en (d) retienen adicionalmente una sustancia (por ejemplo, en estado hipotónico) que inhibe la formación destructiva de cristales de hielo durante el enfriamiento. En una modalidad, la sustancia es un monosacárido, por ejemplo, trehalosa. En consecuencia, en una modalidad, los eritrocitos pueden retener adicionalmente trehalosa o al menos un agente con eficacia terapéutica.

Una modalidad se refiere al reconocimiento de que ignorar los problemas encontrados por diversos intentos previos radica en el reconocimiento de dos ventajas asociadas con los métodos de uso y producción de eritrocitos cargados con sustancias con respecto a los métodos de uso y producción dirigidos a almacenamiento a largo plazo de sangre metabólicamente funcional. El primero es que la producción de células metabólicamente normales después de la reconstitución, que transportan O₂, no es importante para las aplicaciones de los S-IE para diagnóstico y tratamiento; de hecho, el reemplazo de una porción del contenido de hemoglobina de las células es parte del proceso de carga. En segundo lugar, los métodos de producción de los S-IE implican la apertura de poros en las membranas de las células para permitir el equilibrio entre los contenidos internos de las células y la solución en la que se suspenden las células. Esta última situación facilita considerablemente la introducción controlada de una cantidad adecuada de monosacárido (preferiblemente, trehalosa) para evitar la formación de cristales de hielo durante el proceso de liofilización; esto se logra sustituyendo la trehalosa 50 mM por la glucosa 5 mM en la composición de solución tampón de lavado descrita en el Ejemplo 1 Preparación ad-hoc de eritrocitos humanos cargados con colorante ICG para la reinyección autóloga. Una vez hecho esto, las células finales cargadas con la sustancia se diluyen en un 50 % de "hematocrito" en el mismo tampón de lavado con trehalosa, se agrega polisacárido (5 %) como excipiente para reducir la aglutinación celular cuando se reconstituye, al agregar 1 ml de agua destilada al sedimento liofilizado en el vial tapado. Como se demuestra en la Figura 4, los eritrocitos humanos reconstituidos cargados con ICG son equivalentes en intensidad de fluorescencia a la que poseen antes de la liofilización.

Aplicación Diagnóstica de Eritrocitos cargados con Colorante Fluorescente

La formación de imágenes angiografía médica típicamente implica la administración a un sujeto de una sustancia detectable, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 6,915,154 y 6,351,663. En algunos casos, la sustancia detectable también puede ser un agente terapéutico, como se describe en, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2004/0206364.

Además de su papel en el suministro de los requisitos metabólicos a los tejidos que satisfacen, entre las partículas naturales presentes en la sangre, así como también las artificiales que se introducen en la circulación sanguínea para diversos fines, los eritrocitos son muy adecuados para su uso como portadores de sustancias. Estos son las partículas sanguíneas naturales más grandes y, desde un punto de vista hemodinámico, son esencialmente tan pasivas como el suero, y solo agregan resistencia al flujo sanguíneo debido a su tamaño y masa. (En comparación, los leucocitos y los trombocitos son biológicamente activos, por lo que sus movimientos en la sangre que fluye están influenciados por una dinámica de fluido distinta a la del suero. Por ejemplo, los leucocitos, que forman parte del sistema inmunitario, muestran un comportamiento de arrastre y avance al pasar la superficie endotelial de las paredes de los vasos). Además, a pesar

de sus grandes volúmenes, los S-IE conservan la capacidad de los eritrocitos originales para deformarse, lo que les permite pasar a través de capilares de pequeño diámetro; esta característica supera el impedimento de tamaño inherente al uso de portadores artificiales (como los liposomas) cuya geometría siempre es rígida. Estos atributos de los eritrocitos los hacen ideales para transportar los colorantes fluorescentes utilizados en la angiografía. A diferencia de los angiogramas convencionales que muestran el movimiento de plasma teñido con colorante, que a menudo muestran un frente de onda mal definido que transita solo una vez, los angiogramas que muestran eritrocitos fluorescentes individuales pueden proporcionar información continua sobre la velocidad y dirección del flujo sanguíneo en una multitud de vasos simultáneamente. Existen varios aspectos de la creación y el uso de eritrocitos cargados con colorantes para angiografía (por ejemplo, eritrocitos cargados con ICG):

1. Los eritrocitos cargados con colorante son convenientes en lugar de los teñidos con colorante, debido a que la unión del colorante a la membrana eritrocitaria externa parece ser débil (es decir, unión no covalente). La energía impartida a esas células "teñidas" con colorante como resultado del flujo sanguíneo turbulento, por ejemplo, es suficiente para romper esos enlaces débiles. Después, las moléculas de colorante se hacen disponibles para su unión con otras proteínas cercanas, lo que resulta rápidamente en una tinción de plasma y de la pared de los vasos sanguíneos que disminuye el contraste entre los eritrocitos y su fondo, mientras que al mismo tiempo disminuye la luminosidad de los propios eritrocitos. Además, no es posible unir suficiente colorante a las membranas celulares para alcanzar la intensidad de fluorescencia máxima necesaria para la visualización adecuada de las células individuales (véanse las Figuras 1A y 1B). Por otro lado, el proceso de cargado del colorante permite el control de la cantidad de colorante insertada en los eritrocitos, de manera que la concentración del colorante dentro de las células es muy cercana, pero no excede, a la concentración a la que se produce la extinción de la fluorescencia (véase 1A y 1B a 1D). En el caso de ICG, esto se logra mediante la adición de 1 μmol de colorante ICG a cada mililitro de la solución de eritrocitos dializados, en ese punto del procedimiento de carga de sustancias, cuando los volúmenes de las células se incrementan en la medida en que los poros de las membranas de las células se abren (véase la Figura 2). Con los poros abiertos, se produce el intercambio de transmembrana de moléculas grandes; la hemoglobina dentro de las células se mueve hacia el exterior hasta que se alcanza un equilibrio dinámico entre el movimiento de hemoglobina hacia dentro y hacia fuera. El colorante ICG que se añade a la solución en la que las células están suspendidas se une a las moléculas de hemoglobina, y con el tiempo, esas moléculas se mueven hacia las células y alcanzan un equilibrio de concentración con las que están fuera de las células. Cuando los poros de las células se cierran y las moléculas de colorante/hemoglobina fuera de las células se eliminan por lavado, las células restantes cargadas con colorante emiten fluorescencia de manera óptima cuando se estimulan con la energía de excitación adecuada.

2. Una vez rellenos con plasma teñido con colorante, como en la angiografía convencional con colorante fluorescente, los vasos sanguíneos exhiben solo fluorescencia de estado estacionario, inhibiendo la visualización de cualquier partícula transportada por la sangre, incluso si las partículas mismas son fluorescentes. Sin embargo, es posible visualizar eritrocitos individuales en capilares si ellos, en lugar del plasma, emiten fluorescencia y si la separación entre eritrocitos adyacentes excede la resolución limitada de difracción de la óptica del ojo (aproximadamente 7 μm para los capilares perifoveales y 11 μm para los coriocapilares) (véase Flower RW. Optimizing treatment of choroidal neovascularization feeder vessels associated with age-related macular degeneration. *Am J. Ophthalmol.* 2002; 134:228-239. ⁸). Estas condiciones se lograron mediante la retención del colorante ICG en los eritrocitos, como se describió anteriormente, y la reinyección de un pequeño bolo de ellos. Durante el tránsito a las vasculaturas oculares, estos se diluyen en la sangre circulante en la medida en que las células individuales cargadas con ICG se separan en más de 11 μm , lo que hace posible la visualización de las mismas. Se descubrió que el uso de eritrocitos cargados para producir una fluorescencia óptima produce la señal de fluorescencia más fuerte para cualquier nivel dado de irradiación de la luz de excitación. Por razones de seguridad, es conveniente permanecer tan por debajo como sea posible de la exposición máxima permisible (MPE) para un tejido dado.

3. La visualización de los eritrocitos circulantes cargados con colorante requiere el uso de un dispositivo que irradia el campo de visión del tejido de interés con energía lumínica a una longitud de onda apropiada (óptimamente, 805 nm para ICG). Esto puede hacerse eficientemente cuando esa energía se aplica como trenes de alta frecuencia y alta potencia máxima, pulsos de luz de corta duración, cada uno de los cuales ilumina todo el campo de visión de interés. Esta configuración da como resultado una alta relación de señal a ruido de la imagen, que requiere la amplificación de la señal más baja, lo que minimiza de esta manera la introducción de ruido electrónico asociado con la amplificación. Adicionalmente, la adquisición de imágenes durante periodos de tiempo muy cortos en sincronía con impulsos de iluminación de corta duración actúa esencialmente para congelar el movimiento dentro de cada imagen, obviando de esta manera la borrosidad asociada con el movimiento de los eritrocitos dentro del campo de visión (FOV).

La eficacia del uso de eritrocitos cargados con colorante se demostró con éxito en ojos tanto de conejo como de primates no humanos ⁹. (véase Flower R, Peiretti E, Magnani M, Rossi L, Serafini S, Gryczynski Z, Gryczynski I., Observation of erythrocyte dynamics in the retinal capillaries and choriocapillaris using ICG-loaded erythrocyte ghost cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49: 5510-5516). Además, los resultados informados validaron la predicción de Bek de que todos los hallazgos clínicos relacionados con el edema en la maculopatía diabética pueden explicarse como resultado de alteraciones en la vasomoción retiniana¹⁰. También se obtuvieron resultados de los primeros sujetos humanos en un estudio clínico preliminar para demostrar la viabilidad de la reinyección autóloga de eritrocitos cargados con ICG para angiografía (véase la Figura 5). El protocolo de estudio para humanos requirió inyectar volúmenes muy pequeños de células cargadas con ICG en los primeros sujetos y aumentar gradualmente el volumen en los siguientes, hasta alcanzar

un nivel equivalente al utilizado en los monos. En consecuencia, existen diferencias significativas entre la aparición de los angiogramas publicados de mono, donde la metodología se optimizó, y los de los primeros sujetos humanos. La razón principal es que la fracción de eritrocitos fluorescentes circulantes en estos primeros sujetos humanos fue aproximadamente 4 veces menor que en los monos.

5

Sin embargo, estos primeros angiogramas humanos soportan algunos de los hallazgos en los estudios más extensos en monos. Las Figuras 5A y 5B son del ojo derecho normal de un sujeto con edema macular relacionado con la edad; la Figura 5B muestra una única imagen de angiograma de eritrocitos cargados con ICG del campo de visión de 10° de área. La distribución de los eritrocitos anclados es relativamente uniforme, consistente con lo que se informó para el ojo normal de mono⁹. En el ojo izquierdo enfermo (Figuras 5C y 5D), la imagen del angiograma se centra sobre la lesión neovascular coroidea (CNV). La distribución de los eritrocitos anclados que rodean la CNV es similar a la del ojo normal compañero, pero en la CNV no se observan eritrocitos. Sin embargo, al observar la película de angiograma real, algunos eritrocitos eventualmente pasan a través del área de la CNV; pero lo hacen a la mitad de la velocidad que aquellos eritrocitos que no están anclados en el área que rodea la CNV o aquellos en el ojo normal. (Esto puede ser el resultado tanto del escurrimiento de plasma como de una mayor resistencia de la CNV al flujo sanguíneo). Mínimamente, los primeros angiogramas humanos demuestran que pueden adquirirse eritrocitos cargados con ICG y que la presencia de vasomoción o su ausencia puede aparentemente determinarse de ese modo. Basado en el trabajo de Bek¹⁰, la visualización de eritrocitos puede usarse como un predictor para el inicio del edema retinal y para controlar la eficacia temprana del tratamiento. Además, la evidente capacidad de rastrear eritrocitos individuales hace posible la evaluación cuantificable rutinaria del flujo sanguíneo en cualquier vaso.

10

15

20

Sustancias Exógenas para la potenciación de la fluorescencia de EGC

25

En una modalidad, los métodos que se describen en la presente descripción comprenden además la etapa de añadir coloides metálicos antes de la etapa (d). En una modalidad, los coloides metálicos son de plata.

30

Los coloides metálicos de plata muy próximos a los colorantes débilmente fluorescentes pueden aumentar marcadamente los rendimientos de la fluorescencia. Se demostró que, si las moléculas de ICG se acercan en un primer ejemplo mediante la unión de coloides de plata a grupos amino sembrados sobre una superficie de vidrio y después los conjugados de ICG/albumina se unen a las mismas superficies, los rendimientos de la fluorescencia del ICG aumentan más de 30 veces¹¹. Subsecuentemente, se llevaron a cabo experimentos para determinar si el mismo efecto de potenciación se produciría in vivo en angiogramas ICG realizados en ojos de conejo.

35

40

Se inyectaron en las venas de la oreja de un conejo muestras de colorante ICG solo y de colorante/coloide de Ag, que contenían concentraciones idénticas de colorante (0,250 mg/ml) y se registraron los angiogramas de fluorescencia de ICG. El fondo del ojo se iluminó uniformemente mediante luz pulsada de diodo láser a 805 nm de longitud de onda, y cuando el colorante transitaba a través de las vasculaturas oculares, se registró digitalmente la luz de fluorescencia emitida por el colorante de longitud de onda de 835 nm. Se realizó una comparación de angiogramas con colorante solo y colorante/suspensión coloidal de los mismos ojos, mediante el uso en cada caso de imágenes de la misma fase vascular provista de colorante. Como se indica mediante las imágenes de angiograma del ejemplo en la Figura 6, la intensidad de fluorescencia del colorante/suspensión varió de solo dos a tres veces más que la del colorante solo.

45

50

55

60

La disparidad entre la potenciación de la fluorescencia informada en los experimentos realizados mediante el uso de superficies de vidrio en las que los conjugados colorante/coloide se unieron con grupos amino (30 veces) y los observados en los angiogramas in vivo (2 a 3 veces) aparentemente se debió al hecho de que el efecto de potenciación de la fluorescencia mediante coloides se manifiesta en capas muy delgadas del colorante/suspensión y se suprime en las gruesas. Esto se demuestra mediante la comparación de la fluorescencia de capas gruesas (1 cm) y delgadas (100 µm) de ambas muestras, como se muestra en la Figura 7. En esta figura, las muestras gruesas se encuentran en la parte superior, y las delgadas en la parte inferior; ICG 0,250 mg/ml en HAS está a la izquierda, y ICG 0,250 mg/ml en HAS con 4,684 mg/ml de coloide Ag está a la derecha. El conjunto de muestras se iluminó uniformemente con luz de longitud de onda de 805 nm, y se capturó la imagen de fluorescencia de ICG. En el caso de las muestras gruesas, el ICG solo, en la izquierda, es significativamente más brillante, mientras que, en el caso de las muestras delgadas, la suspensión de colorante/coloide es significativamente más brillante. En parte, la explicación de estas relaciones es que los coloides en suspensión dispersan la luz, como se muestra en la Figura 8, en donde la misma serie de muestras en la Figura 7 se ilumina uniformemente con una luz de longitud de onda de 810 nm y una imagen hecha de la luz reflejada. Nótese que tanto las muestras gruesas como finas de colorante/coloide reflejan, en lugar de absorber o transmitir, la luz incidente; es decir, las interacciones de la luz observadas con el colorante/suspensión surgen como un fenómeno de superficie. En consecuencia, más moléculas de colorante ICG solo en la muestra gruesa interactúan con la luz con respecto a aquellas en la muestra gruesa de colorante/suspensión. En el caso de las dos muestras delgadas, sin embargo, la potenciación de la fluorescencia en la muestra de colorante/suspensión dio como resultado una fluorescencia más brillante de las moléculas de colorante ICG presentes en comparación con la misma densidad de moléculas en la muestra de colorante solo. Esto se debió a que una mayor cantidad de luz incidente se transmitió por la muestra de colorante solo en comparación con el colorante/suspensión coloidal.

65

En base a las observaciones anteriores, lograr una potenciación significativa de la fluorescencia de ICG en la angiografía mediante la asociación del colorante con coloides metálicos, requiere no solo que las moléculas de colorante se

mantengan en estrecha asociación con los coloides, sino que la conjugación colorante/coloide esté contenida en capas delgadas. Estas condiciones pueden cumplirse al contener los conjugados colorante/coloide dentro de los S-IE, en donde la pequeña cantidad de hemoglobina restante en las células es suficiente para actuar como el sitio de unión de ICG a la proteína. Por lo tanto, puede lograrse una útil y significativa potenciación de la fluorescencia del colorante a partir de las EGC cargadas con ICG mediante la encapsulación del coloide metálico de plata durante el proceso de cargado de los S-IE.

Aplicación Terapéutica de EGC cargadas con sustancias

En una modalidad, los eritrocitos retienen al menos un agente con eficacia terapéutica. Como los S-IE son esencialmente recipientes circulantes de volumen cerrado en los que la concentración de moléculas insertadas puede controlarse con precisión, los S-IE pueden usarse para transportar sus contenidos, secuestrados de la sangre, a una ubicación vascular determinada, donde puede detectarse su presencia y liberarse sus contenidos. Tal escenario asume que la ubicación vascular es visualmente accesible, que los S-IE contienen un marcador detectable (tal como un colorante fluorescente) además de la sustancia transportada, y que existe un medio para liberar los contenidos de los S-IE.

La liberación controlada de sustancias en áreas vasculares específicas mediante este método hace posible el uso de sustancias que no podrían utilizarse si el suministro se realizara por medios convencionales. Esto se debe a que cuando se encapsulan en S-IE y se inyecta en un bolo de células empaquetadas, el volumen de sustancias agregado que se introduce es muy pequeño. Siempre que ese volumen agregado se encuentre en el orden de 1/100 del volumen umbral para producir un efecto farmacológico (terapéutico o tóxico), generalmente se considera una microdosificación. (En Canadá, Europa y los Estados Unidos, ahora los estudios experimentales de IND en humanos, a menudo pueden realizarse sobre la base de datos de animales pequeños. Esto coloca a estos estudios en un intervalo más asequible para las empresas más pequeñas.) Por lo tanto, el espectro de colorantes que podría potencialmente considerarse para su uso se expande mucho cuando se administran en forma de microdosis.

Los S-IE mantienen la forma, el comportamiento y la longevidad de los eritrocitos de los que se derivan, por lo que son capaces de deformarse para pasar a través de capilares de pequeño diámetro, convirtiéndolos en vesículas ideales para transportar y administrar sustancias intravascularmente. Los eritrocitos cargados de sustancias reinyectadas pueden circular durante hasta aproximadamente 120 días (el tiempo de vida promedio de los eritrocitos), durante cuyo tiempo se liberarán sus contenidos de una manera u otra. Dado que cualquier población de los S-IE se comporta de la misma manera que cualquier población de eritrocitos normales con respecto a la eritropoiesis, a menos que se active externamente, solo se liberará una pequeña fracción del contenido de la célula inyectada en un momento determinado, y la liberación completa se extenderá durante aproximadamente 120 días. Y dado que solo se inyectan volúmenes muy pequeños de células, los niveles de moléculas liberadas en el cuerpo en cualquier momento, o incluso en el agregado, siempre deben ser órdenes de magnitud por debajo de los umbrales de efecto o toxicidad. Además, dado que la distribución de los S-IE eventualmente sería uniforme en todo el volumen de sangre circulante total, se diluirá aún más la concentración de sustancia liberada gradualmente a niveles posiblemente indetectables (o al menos, traza).

Durante el tránsito inicial a través de la circulación, un bolo de S-IE empacado inyectado permanece relativamente intacto. A los pocos minutos de la inyección, los S-IE se distribuyen equitativamente por todo el cuerpo y, a menos que de alguna manera se dirijan a un área específica del cuerpo, a partir de ese momento la liberación de la sustancia es gradual durante un período de 120 días. En las vasculaturas que pueden observarse directamente por medios ópticos, la liberación del contenido de fármaco de los S-IE circulantes puede desencadenarse mediante la aplicación de energía lumínica, especialmente durante el tránsito inicial y temprano. Dicha energía lumínica podría enfocarse fácilmente para cubrir cualquier área conveniente, lo suficientemente pequeña como para cubrir una sola célula o lo suficientemente grande como para cubrir la vasculatura de un órgano completo.

La visualización directa facilita el control sobre la cantidad de sustancia liberada, teniendo en cuenta que, para cualquier área determinada de la vasculatura en cualquier parte del cuerpo, la densidad de los S-IE circulantes será mayor durante el tránsito inicial y disminuirá rápidamente con el paso de tiempo hasta que solo unas pocas células estarán presentes en cada capilar del área visualizada. Por ejemplo, si la energía de la luz se aplicara a un área vascular determinada durante el paso inicial de las células inyectadas, la concentración de la sustancia liberada sería alta; si se aplica unos minutos más tarde, la concentración sería mucho menor, pero siempre en proporción a la relación de S-IE con respecto a los eritrocitos normales circulantes. Aunque el volumen agregado de la sustancia inyectada encapsulada en los S-IE puede encontrarse en el nivel de microdosis, cuando se libera solamente dentro del volumen de sangre de un área pequeña de la vasculatura, la concentración de la sustancia puede ser muy alta.

En consecuencia, en combinación con los métodos que se describen en la presente descripción en donde la etapa (d) da como resultado una primera población de eritrocitos con colorante retenido, después de la etapa (d) el método comprende adicionalmente:

- (e) repetir las etapas (a) y (b) con una segunda muestra de eritrocitos;
- (f) repetir la etapa (c) con al menos un colorante fluorescente a una concentración mayor que la de la etapa (c);
- (g) repetir la etapa (d) con el producto de (f) para formar una segunda población de eritrocitos con colorante retenido; y
- (h) combinar la primera y la segunda población.

5 En una modalidad, el método comprende además añadir al menos un agente con eficacia terapéutica en la etapa (e) o (f), en donde la segunda población comprende además eritrocitos con el agente retenido. Pueden considerarse numerosos agentes con eficacia terapéutica para la precarga. Los fármacos ilustrativos incluyen ganciclovir (antirretroviral), acetónido de triamcinolona (esteroide); fluocinolona y dexametasona (esteroides oculares específicos); pegaptanib sódico y rhuFab V2 (anti-VEGF, anti-angiogénico); verteporfina (derivado de benzoporfirina) (terapia fotodinámica); y carboplatino y topotecan (quimioterapéutico).

10 En una modalidad, el al menos un colorante en la primera población tiene una concentración en el intervalo de 0,3 a 0,4 mM, y el al menos un colorante en la segunda población tiene una concentración mayor que 0,4 mM, en donde tras la iluminación con energía láser de 805 nm, los eritrocitos de la primera población emitirán fluorescencia, y en donde el aumento de la energía láser calienta los eritrocitos de la segunda población debido a su absorción potenciada, lo que provoca que se lisen y se libere el agente terapéutico retenido.

15 La capacidad para liberar una sustancia encapsulada en los S-IE requiere la capacidad de detectar u observar la presencia de las células en el área objetivo, de modo que la energía de la luz estimuladora de la liberación pueda aplicarse precisamente en el momento en que esté presente la concentración deseada de células. Esto se logra mediante la inclusión en las células de un colorante fluorescente (como ICG), junto con la sustancia terapéutica. Para rastrear en tiempo real el número (y por lo tanto, la densidad) de los S-IE presentes en el área vascular de interés puede usarse un algoritmo de programa informático aplicado a las imágenes de video de la vasculatura de interés, y cuando se alcanza el nivel deseado, este puede activar automáticamente la aplicación de la energía lumínica estimulante de la liberación. Puede necesitarse conocer la densidad de las células presentes antes de desencadenar la liberación para garantizar que no demasiadas células se lisen al mismo tiempo que se produce una reducción u oclusión significativa del flujo sanguíneo.

25 En consecuencia, una modalidad proporciona un algoritmo de programa informático aplicado a las imágenes de video de un área vascular de interés que puede rastrear en tiempo real el número y por lo tanto, la densidad de S-IE presentes en el área vascular de interés. En una modalidad, cuando se alcanza un nivel predeterminado de densidad de S-IE, se activará la aplicación de energía lumínica capaz de hacer que los eritrocitos cargados con sustancias liberen sus contenidos.

30 En otra modalidad, un algoritmo de programa informático que tiene en cuenta los volúmenes respectivos de dos poblaciones de eritrocitos cargados con sustancias diferentes inyectadas como un bolo mixto, el volumen total de sangre circulante y el tiempo transcurrido después de la inyección, basándose en la detección de los S-IE de un tipo, calcula la densidad del otro tipo presente.

35 En una modalidad, donde el tipo de S-IE detectado se carga con colorante ICG, y el segundo tipo de S-IE presente se carga con un agente terapéutico, así como también la concentración más alta posible de ICG, esta última sustancia queda retenida para facilitar la absorción de longitudes de onda en el infrarrojo, de esta manera calentando y lisando las células.

40 La luz aplicada puede interactuar con los S-IE de varias maneras para provocar la liberación del contenido de las células. Por ejemplo, la luz puede ser absorbida selectivamente por las células, lo que eleva así su temperatura hasta el punto en que se rompen, o puede reaccionar con una molécula específica asociada con la membrana celular que comprometerá la integridad estructural de la membrana, que provoca su ruptura. La absorción selectiva de la energía de la luz puede lograrse mediante la aplicación de una longitud de onda que se absorbe de manera eficiente por alguna sustancia asociada con las células cargadas de sustancias. Por ejemplo, si se asume que esas células también contienen un colorante fluorescente para facilitar su visualización, entonces puede aplicarse un mayor nivel de potencia de la misma luz estimulante de la fluorescencia solo al área vascular objetivo en lugar de a todo el campo de visión. Por supuesto, si se usa este enfoque, entonces, es conveniente tener presente la mayor cantidad de colorante posible en los S-IE para una absorción de luz eficiente.

50 Sin embargo, si el colorante en cuestión sufre extinción de la fluorescencia por concentración, entonces hay una concentración óptima de sus moléculas, en cualquier volumen dado y para cualquier nivel de iluminación dado en el que se produce la fluorescencia óptima. Por encima o por debajo de esa concentración óptima, se produce la reducción de la intensidad de la fluorescencia, y exceder la exposición máxima permisible (MPE) no puede compensar este fenómeno. (Por ejemplo, la metodología específica empleada para insertar ICG en S-IE es tal que solo la concentración óptima de moléculas de colorante está presente en las células cargadas, aproximadamente 0,03 mg/ml; por encima de ese nivel se produce extinción de la fluorescencia). Así, la concentración de colorante intercelular para estimular la fluorescencia celular no es necesariamente lo suficientemente alta como para actuar como un absorbente de energía láser con el fin de calentar las células al nivel necesario para su ruptura y liberación de sus contenidos; la absorción óptima requiere la mayor concentración de colorante posible. La solución a este dilema es inyectar una mezcla de dos especies de S-IE: una que contenga solo el colorante fluorescente en la concentración óptima para una fluorescencia máxima, y la segunda que contenga tanto la sustancia terapéutica como el colorante a la máxima concentración posible. La mezcla tendría menos del primer tipo de células que del segundo, ya que el propósito del primer tipo es solo para indicar la presencia de los S-IE cargados y para facilitar la determinación de su concentración dentro del área vascular de interés.

65

EJEMPLOS

Ejemplo 1

5 Preparación ad-hoc de EGC de humano cargados con colorante ICG para la reinyección autóloga

El ICG se encapsula en eritrocitos humanos mediante un procedimiento de diálisis hipotónica, resellado isotónico y reasociación. Estas etapas se llevan a cabo mediante el uso de diversos recipientes estériles (precargados con fluidos apropiados) incluidos en un estuche, como se representa en la Figura 9. Algunos de los recipientes son tubos de centrífuga y todos los recipientes y viales son desechables. La Figura 9 es un diagrama de los recipientes estériles usados en la carga de eritrocitos con sustancias. A: un tubo al vacío de 10 ml que contiene un anticoagulante para la adquisición de una muestra de sangre. B: representa dos tubos al vacío de centrífuga de 15 ml y dos de 50 ml, que contiene cada uno una cantidad previamente medida de tampón salino isotónico de lavado. C: un recipiente que tiene un tapón superior de goma al que se fija una longitud de tubo de diálisis (sellado en su parte inferior), de modo que puede introducirse una solución que contiene eritrocitos en el tubo de diálisis mediante una aguja de inyección insertada a través del tapón de goma. Fuera del tubo de diálisis, una pequeña cantidad de solución de lavado mantiene húmeda la membrana del tubo de diálisis. D: un recipiente sellado que contiene el volumen de tampón hipotónico de diálisis en el que se introduce el tubo de diálisis que contiene la solución de eritrocitos lavados. En el centro de la cubierta de este recipiente hay un puerto cubierto en el que encaja el tapón de goma de C. E: un vial con tapón de goma que contiene una cantidad de colorante ICG liofilizado medida previamente y un vial sellado que contiene un volumen de H₂O destilada previamente medido, para la reconstitución del colorante. F: un vial con tapón de goma que contiene una cantidad previamente medida de solución de resellado. G: un tubo al vacío con tapón de goma para almacenar las células terminadas. H; una de varias agujas largas estériles (6") para transferir células de un recipiente a otro.

25 Nueve (9) ml de sangre fresca, a la que se agrega un anticoagulante (ácido-citrato-dextrosa o ácido etilendiaminotetraacético), se obtienen en condiciones estériles y se centrifugan a 2,000 g durante 5 minutos para obtener al menos 4,0 ml de eritrocitos (véase la Figura 10, A). La extracción de sangre se realiza con un tubo al vacío* de 10 ml precargado con anticoagulante. Este mismo tubo se inserta en la centrífuga y la sangre se separa, con los eritrocitos en la parte inferior. Mediante el uso de una aguja larga conectada a una jeringa, la muestra de 4 ml de eritrocitos se extrae de la parte inferior, para excluir cualquier glóbulo blanco en la capa leucoplaqueante suprayacente y el suero. (* Nota: "tubo al vacío", como se usa en este documento, se refiere a una variación del recipiente de tipo tubo de ensayo al vacío con tapón de goma esterilizado comúnmente utilizada para venopunción. Cada uno se diseña para resistir la centrifugación, se esteriliza, se llena previamente con un líquido apropiado, y se extrae el aire para formar un vacío.)

35 Después los eritrocitos se lavan dos veces en HEPES 10 mM (pH 7,4) que contiene NaCl 154 mM y glucosa 5 mM (tampón de lavado) para eliminar leucocitos y plaquetas, centrifugando a 2,000 g durante 5 minutos cada vez. Esto se realiza inyectando los eritrocitos en la jeringa, desde la etapa anterior, en el primero de dos tubos al vacío de 15 ml precargado con 10 ml de solución de lavado y centrifugar, nuevamente a 2,000 g durante 4 minutos. Una vez que los eritrocitos se concentran de nuevo en la parte inferior del tubo, se eliminan mediante el uso de la aguja larga y la jeringa (véase la Figura 10, B) y se transfieren al segundo tubo al vacío de 15 ml precargado con solución de lavado, se repite la centrifugación y los eritrocitos concentrados son nuevamente recogidos en una jeringa.

45 Después los eritrocitos se suspenden al 70 % de hematocrito (Ht) en la solución de tampón de lavado dentro de un tubo de diálisis que tiene un corte de 12-14 kD; esto se hace mediante la inyección de los contenidos de la jeringa de la etapa anterior a través de la parte superior y dentro del frasco que contiene el tubo de diálisis (véase la Figura 11, A). El tubo de diálisis que contiene eritrocitos se retira entonces de su botella levantando la parte superior de la botella (a la que se une el tubo de diálisis) y transfiriéndola al recipiente grande (Figura 11, B). Se retira la pequeña tapa del recipiente grande, y la bolsa de diálisis se inserta a través de la abertura y se presiona hacia abajo para sellar el recipiente (véase la Figura 11, C). Dentro del recipiente grande, se dializa un volumen de RBC durante 90 minutos frente a 50 volúmenes de tampón de diálisis (10 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaHCO₃ y glucosa 20 mM, pH 7,4) que contiene glutatión reducido 3 mM y ATP 2 mM. La osmolalidad del tampón es de aproximadamente 60 mOsm, mientras que la de la solución de RBC alcanza aproximadamente 87 mOsm al final del tiempo de diálisis. Todos estos procedimientos se realizan a 4 °C.

55 Después, el tubo de diálisis se retira del recipiente grande y se devuelve a su botella original, en cuyo momento se agrega 1 μmol de colorante ICG a cada mililitro de la solución de RBC dializada (véase la Figura 11, D), y la mezcla se incuba durante 30 minutos a 70 °C en agitación suave. (La cantidad correcta de ICG liofilizado se proporciona en un pequeño vial al que se agrega un volumen por medición).

60 Los eritrocitos se vuelven a sellar mediante la adición de 0,1 volúmenes de, 100 mM de inosina, 20 mM de ATP, 4 mM de MgCl₂, 100 mM de glucosa anhidra, 100 mM de piruvato de sodio, 190 mM de NaCl, 1666 mM de KCl y 33 mM de NaH₂PO₄ (pH 7,4) por volumen de solución de eritrocitos dializados (esta solución se mide previamente y se proporciona en una ampolla estéril). La bolsa de diálisis en su botella se coloca en un baño pequeño a 37 °C, y las células se incuban durante 25 minutos.

65 Las células reselladas se lavan 4 veces en el tampón de lavado (50 ml cada vez) y se centrifugan cada vez durante 10 min a 500 g; hay una recuperación celular de alrededor del 40 %. Típicamente, alrededor de 32 ml de sangre total rinde

16 ml de eritrocitos cargados con ICG (70 de Ht). Esto se hace de acuerdo con el mismo procedimiento que se muestra en la Figura 10, B, y finalmente los eritrocitos procesados cargados con ICG se inyectan en el vial de almacenamiento estéril que se proporciona y se almacenan a 4°C hasta que se usan para la angiografía en el sujeto del que se obtuvieron las células.

5

Ejemplo 2

Una alternativa al método, sin diálisis, en el Ejemplo 1 (Ejemplo Comparativo)

10

La encapsulación de ICG en eritrocitos humanos mediante un procedimiento de diálisis hipotónica, resellado isotónico y reasociación similar al método descrito en el Ejemplo 1 puede llevarse a cabo sin recurrir a una etapa de diálisis. Esto se realiza disminuyendo la tonicidad de la solución en la cual los eritrocitos se suspenden de 300 mOsm/kg a 87 mOsm/kg, en cuatro etapas, para abrir poros en las membranas de las células. Todas estas etapas se llevan a cabo en el mismo tubo de centrifuga de 50 ml, al término del cual puede introducirse el colorante ICG en la solución de suspensión celular. Como en el Ejemplo 1, se utiliza un estuche que consiste de varios recipientes estériles y fluidos previamente medidos. En este caso, el estuche tiene componentes diferentes a los indicados en el ilustrado en la Figura 9; este estuche consiste en:

15

- 1 tubo al vacío de 10 ml * que contiene un anticoagulante (ácido-citrato-dextrosa)
- 2 tubos al vacío de 15 ml, cada uno que contiene 10 ml de tampón de lavado esterilizado
- 1 tubo al vacío de 50 ml que contiene 4 ml de tampón de lavado de 198 mOsm/kg esterilizado
- 1 vial que contiene 10 ml de tampón de lavado 198 mOsm/kg esterilizado
- 1 vial que contiene 20 ml de tampón de lavado 99 mOsm/kg esterilizado
- 1 vial que contiene 29,8 mg de colorante ICG liofilizado
- 25 1 jeringa precargada con 1,5 ml de H₂O destilada esterilizada, para la reconstitución del ICG
- 1 vial que contiene 3,8 ml de solución de resellado esterilizada
- 5 agujas estériles largas (alrededor de 4 pulgadas)
- 3 tubos al vacío de 50 ml, cada uno con 40 ml de tampón de lavado normotónico esterilizado
- 1 vial de vacío con tapón de goma de 5-ml que contiene 1 ml de tampón de lavado normotónico

30

(* Nota: "tubo al vacío", como se usa en este documento, se refiere a una variación comúnmente utilizada del recipiente de tubo de ensayo al vacío con tapón de goma esterilizado para venopunción. Cada uno se diseña para resistir la centrifugación, se esteriliza, se llena previamente con un líquido apropiado, y se extrae el aire para formar un vacío.)

35

Nueve (9) ml de sangre fresca, a la que se agrega un anticoagulante (ácido-citrato-dextrosa o ácido etilendiaminotetraacético), se obtienen en condiciones estériles y se centrifugan a 2,000 g durante 5 minutos para obtener al menos 4,0 ml de eritrocitos (véase la Figura 10, A). La extracción de sangre se realiza con un tubo al vacío* de 10 ml precargado con anticoagulante. Este mismo tubo se inserta en la centrifuga y la sangre se separa, con los eritrocitos en la parte inferior. Utilizando una de las dos agujas largas que se suministran conectadas a una jeringa (véase la Figura 9, H), se extrae de la parte inferior la muestra de eritrocitos de 4 ml, para excluir cualquier glóbulo blanco en la capa leucocitaria suprayacente y el suero.

40

Después los eritrocitos se lavan dos veces en HEPES 10 mM (pH 7,4) que contiene NaCl 154 mM y glucosa 5 mM (tampón de lavado) para eliminar leucocitos y plaquetas, centrifugando a 2,000 g durante 5 minutos cada vez. Esto se realiza inyectando los eritrocitos en la jeringa, desde la etapa anterior, en el primero de dos tubos al vacío de 15 ml precargado con 10 ml de solución de lavado y centrifugar, nuevamente a 2,000 g durante 4 minutos. Una vez que los eritrocitos se concentran de nuevo en la parte inferior del tubo, se eliminan mediante el uso de una de las agujas largas y una jeringa (véase la Figura 10, B) y se transfieren al segundo tubo al vacío de 15 ml precargado con solución de lavado, se repite la centrifugación y los eritrocitos concentrados son nuevamente recogidos en una jeringa.

50

Se añaden tres (3) ml de los eritrocitos lavados dos veces a un tubo al vacío de 50 ml que contiene 4 ml de tampón de lavado de 198 mOsm/kg y se agita suavemente durante 20 minutos.

55

El volumen de 10 ml medido previamente de tampón de lavado 99 mOsm/kg se agrega a un tubo al vacío de 50 ml y se agita suavemente durante 20 min adicionales.

60

El volumen de 20 ml medido previamente de tampón de lavado de 49 mOsm/kg se agrega a un tubo al vacío de 50 ml y se agita suavemente durante unos 20 minutos; esto producirá una mezcla a aproximadamente 87 mOsm/kg, lo que provoca que se abran los poros en los eritrocitos.

65

El volumen de 1,5 ml de H₂O destilada medido previamente se agrega al vial que contiene 29,8 mg de ICG liofilizado para reconstituirlo, y después se agrega el colorante líquido al contenido del tubo al vacío de 50 ml, lo que da como resultado una concentración de colorante de 1 µmol/ml. El tubo al vacío de 50 ml se agita suavemente en un baño a 37 °C durante 20 minutos.

Los eritrocitos vuelven a sellarse añadiendo el volumen de 3,8 ml medido previamente, 100 mM de inosina, 20 mM de ATP, 4 mM de MgCl₂, 100 mM de glucosa anhidra, 100 mM de sodio, 190 mM de NaCl, 1666 mM de KCl y 33 mM de NaH₂PO₄ (pH 7,4) a la solución en el tubo al vacío de 50 ml para hacer la mezcla normotónica; se agita y se mantiene en el baño a 37 °C durante 20 minutos.

5 El tubo de 50 ml se centrifuga a 2,000 g durante 5 minutos, después de lo cual se utiliza una de las agujas largas que se suministran y una jeringa para eliminar el volumen de 3 ml de células en la parte inferior del tubo y transferirlas a un tubo tapado de 50 ml que contiene 40 ml de tampón de lavado. Este tubo se agita y se centrifuga a 2,000 g durante 4 minutos.

10 El procedimiento del párrafo [052] se repite dos veces más, después de lo cual se extraen 1-2 ml de los eritrocitos cargados con colorante tres veces en la parte inferior del tubo con la última de las agujas largas y una jeringa y se depositan en un vial de vacío de 5 ml estéril con tapón de goma que contiene 1-2 ml del tampón de lavado normotónico. Estas células a aproximadamente 50 % de Ht pueden almacenarse a 4 °C durante varios días antes de la reinyección para la angiografía.

15 Referencias:

1. DeLoach R. Encapsulation of exogenous agents in erythrocytes and the circulating survival of carrier erythrocytes. *J Appl Biochem.* 1983; 5:149-57.
- 20 2. De Loach JR Sprandel U: Red blood cells as carriers for drugs. Basel Karger 1985; De Flora A PNAS 1986; 83:7029.
3. Ropars C, Chassaing M, Nicolau C, Red Blood Cells as carriers for drugs. Potential therapeutic applications. Oxford, Pergamon Press, 1987.
- 25 4. Rossi L, Brandi G, Schiavano GF, Scarfi S, Millo E, Damonte G, Benatti U, De Flora A, Magnani M. Heterodimer-loaded RBCs as bioreactors for slow delivery of the antiviral drug azidothymidine and the antimycobacterial drug ethambutol. *AIDS Res Hum Retrovir* 1999; 15:345-353.
- 30 5. Rossi L, Serafini S, Cenerini L, Picardi F, Bigi L, Panzani I, Magnani M. RBC-mediated delivery of dexamethasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biotechnol Appl Biochem.* 2001; 33:85-89.
6. Rossi L, Castro M, D'Orio F, Damonte G, Serafini S, Bigi L, Panzani I, Novelli G, Dallapiccola B, Panunzi S, Di Carlo P, Bella S, Magnani M. Low doses of dexamethasone constantly delivered by autologous RBCs slow the progression of lung disease in cystic fibrosis patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2004; 33:57-63.
- 35 7. Annese V, Latiano A, Rossi L, Lombardi G, Dallapiccola B, Serafini S, Damonte G, Andriulli A, Magnani M. RBCs-mediated delivery of dexamethasone in steroid-dependent IBD patients-a pilot uncontrolled study. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100:1370-1375.
- 40 8. Flower RW. Optimizing treatment of choroidal neovascularization feeder vessels associated with age-related macular degeneration. *J. Ophthalmol.* 2002; 134:228-239.
9. Flower R, Peiretti E, Magnani M, Rossi L, Serafini S, Gryczynski Z, Gryczynski I., Observation of erythrocyte dynamics in the retinal capillaries and choriocapillaris using ICG-loaded erythrocyte ghost cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49: 5510-5516.
- 45 10. Bek T. Diabetic maculopathy caused by disturbances in retinal vasomoción: a new hypothesis. *Acta Ophthalmol Scand.* 1999; 77:376-380.
- 50 11. Geddes CD, Haishi C, Gryczynski I, Gryczynski Z, Jiyu F, Lakowicz JR. Metal-Enhanced Fluorescence (MEF) Due to Silver Colloids on a Planar Surface: Potential Applications of Indocyanine Green to in Vivo Imaging. *J Phys. Chem. A.* 2003; 107:3443-3449.

55

Reivindicaciones

1. Un método que comprende:
 - (a) proporcionar eritrocitos en una solución anticoagulante de sangre;
 - (b) dializar la solución que contiene eritrocitos en (a) frente a un tampón hipotónico de diálisis que tiene una osmolalidad en el intervalo de 50-70 mOsm/kg para permitir que se abran los poros en el eritrocito;
 - (c) combinar la solución dializada en (b) con al menos un colorante fluorescente que es colorante verde de indocianina y una sustancia que inhibe la formación destructiva de cristales de hielo; y
 - (d) combinar el colorante y la solución que contiene la sustancia en (c) con una solución de resellado con una osmolalidad de al menos 1,000 mOsm/kg para reducir la osmolalidad, lo que provoca de esta manera que los poros de los eritrocitos se cierren y queden retenidos dentro de los eritrocitos el al menos un colorante fluorescente y la sustancia;
 que comprende además la etapa de liofilización (d-1) de los eritrocitos que contienen el colorante fluorescente y la sustancia retenidos.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la sustancia es opcionalmente un monosacárido, opcionalmente trehalosa.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde la solución dializada en (b) tiene una osmolalidad en el intervalo de 80-90 mOsm/kg y/o la solución de resellado tiene una osmolalidad de al menos 2,000 mOsm/kg.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el suministro en la etapa (a) comprende obtener una muestra de sangre de un sujeto, opcionalmente en donde una fuente de eritrocitos en (a) es
 - (i) sangre tipo O, o
 - (ii) sangre tipo A o tipo B y para (ii), después de la etapa (a), el método comprende opcionalmente añadir α - β glucosidasa para separar la superficie de los eritrocitos A- y B- aglutinógenos.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde los eritrocitos se lavan con una solución isotónica antes de la diálisis en (b).
6. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el colorante verde de indocianina en (d) tiene una concentración en el intervalo de 0,25 a 3,0 μ moles/ml de solución dializada, y/o en donde la concentración del colorante retenido en (d) se encuentra en el intervalo de 0,25 a 1,5 mM, o se encuentra en el intervalo de 0,3 a 0,4 mM, o es mayor que 0,4 mM.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de añadir al menos un agente con eficacia terapéutica antes de la etapa (d) para retener al menos un agente dentro de los eritrocitos.
8. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde después de la etapa (d), el método comprende además añadir al menos un excipiente biocompatible, que es opcionalmente polisacarosa, opcionalmente en donde la al menos una concentración de excipiente está en el intervalo de 0,5 % a 5 %.
9. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la etapa (d) da como resultado una primera población de eritrocitos con colorante retenido, y en donde después de la etapa (d), el método comprende, además:
 - (e) repetir las etapas (a) a (b) con una segunda muestra de eritrocitos;
 - (f) repetir la etapa (c) con el producto de (e) y al menos un colorante fluorescente a una concentración mayor que la del paso (c);
 - (g) repetir la etapa (d) con el producto de (f) para formar una segunda población de eritrocitos con colorante retenido; y
 - (h) combinar la primera y la segunda población.
10. El método de conformidad con la reivindicación 9, que comprende además añadir al menos un agente con eficacia terapéutica en la etapa (e) o (f), en donde la segunda población comprende además eritrocitos con el agente retenido y opcionalmente en donde el al menos un colorante en la primera población tiene una concentración en el intervalo de 0,3 a 0,4 mM, y el al menos un colorante en la segunda población tiene una concentración mayor que 0,4 mM, en donde después de iluminarse con energía láser de 805 nm, los eritrocitos de la primera población emiten fluorescencia, y en donde el aumento de la energía del láser calienta los eritrocitos de la segunda población debido a su mayor absorción, lo que provoca que se lisen y se libere el agente terapéutico retenido.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 7, 9 o 10, en donde después de la etapa (d), el método comprende, además:
 - (e-1) lavar los eritrocitos en una solución salina isotónica de lavado que contiene glucosa o trehalosa para eliminar el colorante extracelular.

ES 2 671 710 T3

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, en donde después de la etapa (e-1) el método comprende además añadir al menos un excipiente biocompatible, que es opcionalmente polisacarosa, opcionalmente en donde la al menos una concentración de excipiente está en el intervalo de 0,5 % a 5 %.
- 5 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5 o 7 a 11, en donde la solución de lavado contiene trehalosa que tiene una concentración de al menos 50 mM.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de añadir coloides metálicos antes de la etapa (d).
- 10 15. El método de conformidad con la reivindicación 14, en donde los coloides metálicos son de plata.

15

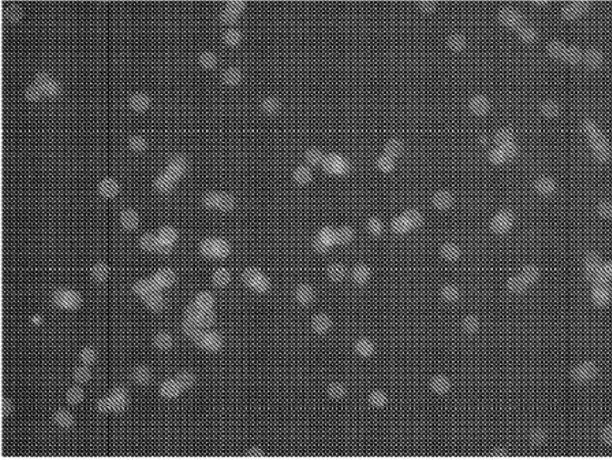


Figura 1A

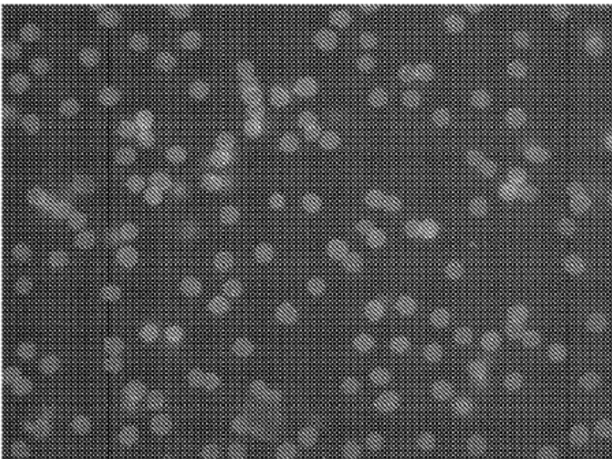


Figura 1B

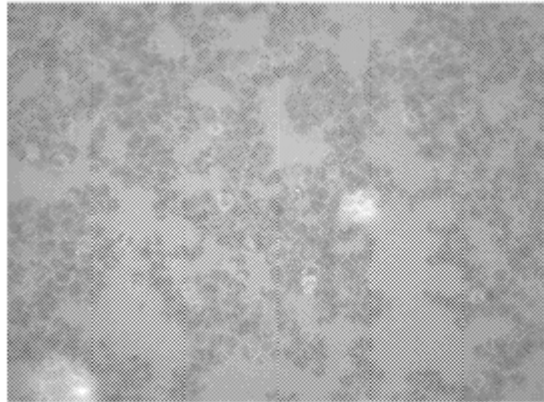


Figura 1C

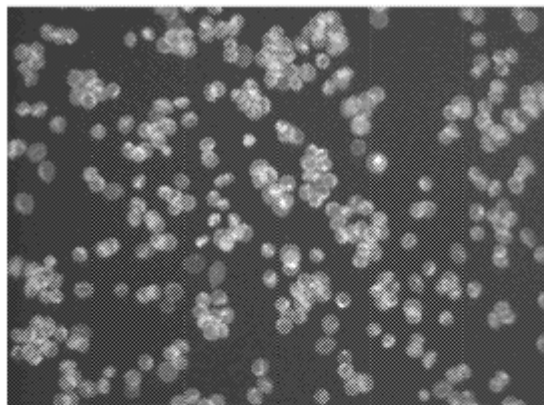


Figura 1D

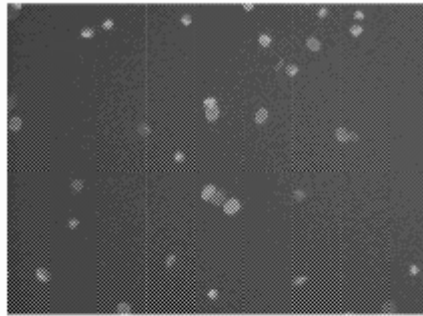


Figura 2A

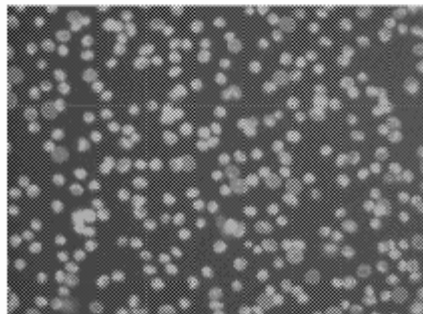


Figura 2B

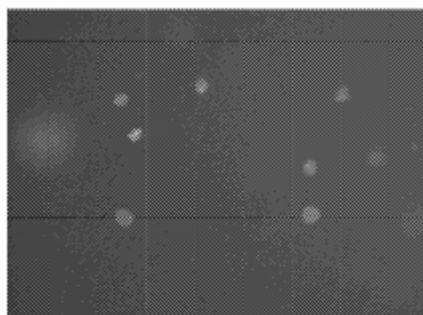


Figura 2C

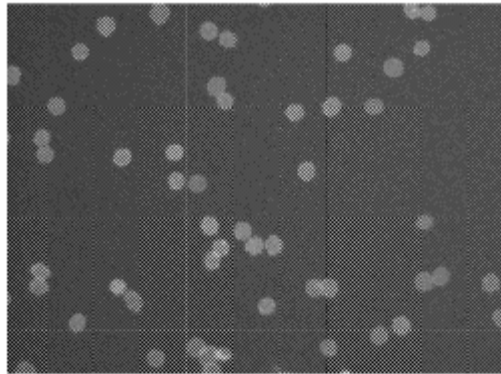


Figura 3A

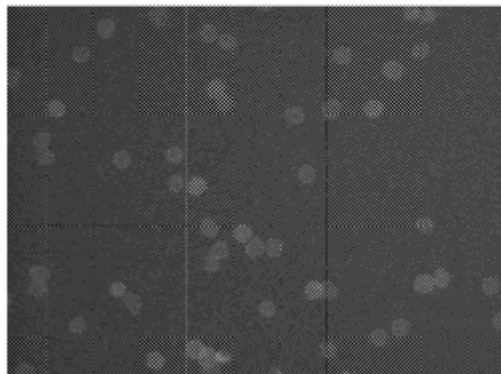


Figura 3B

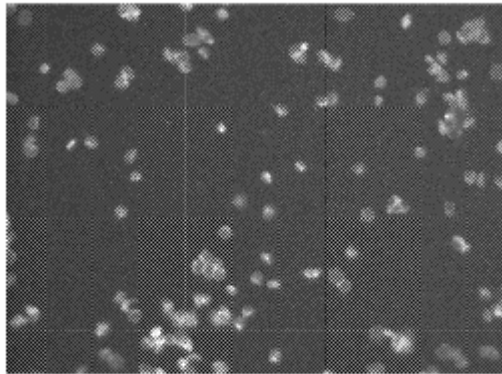


Figura 3C

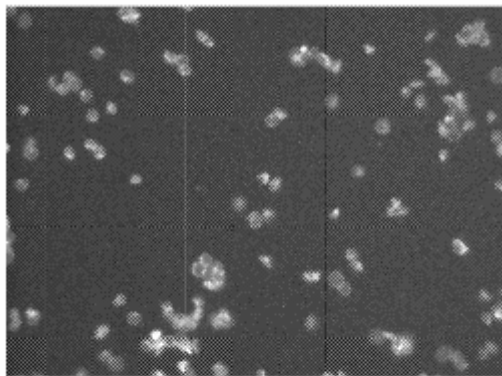


Figura 3D

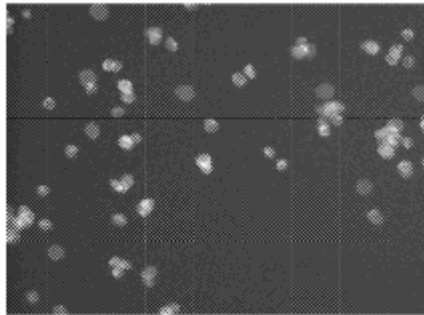


Figura 4A



Figura 4B

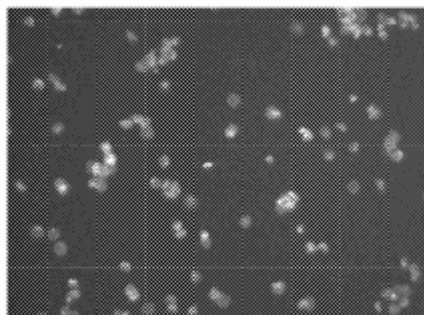


Figura 4C

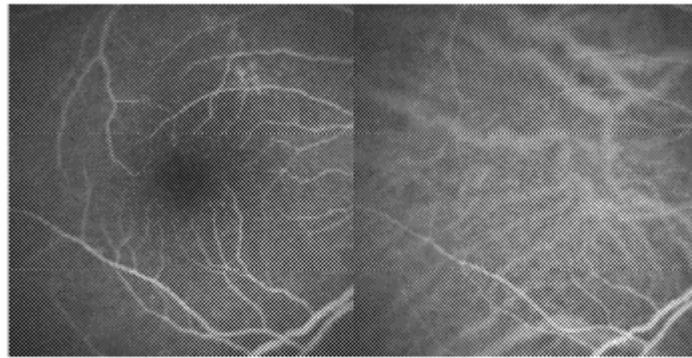


Figura 5A

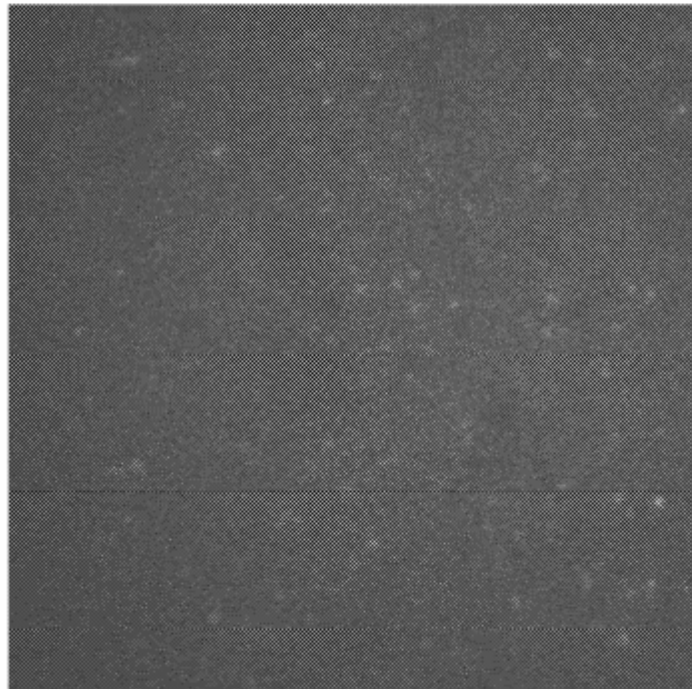


Figura 5B



Figura 5C

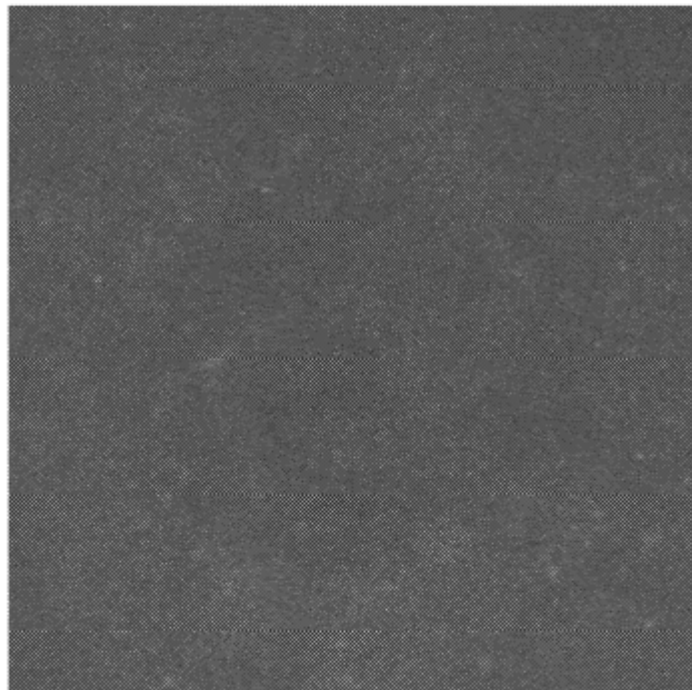


Figura 5D

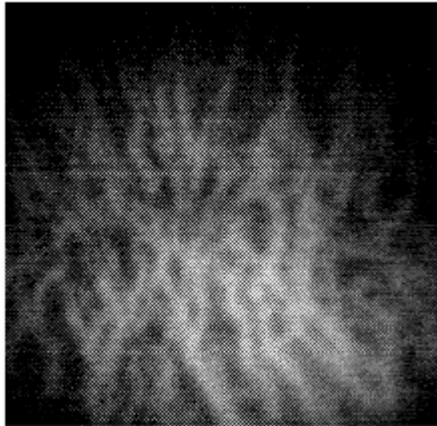


Figura 6A

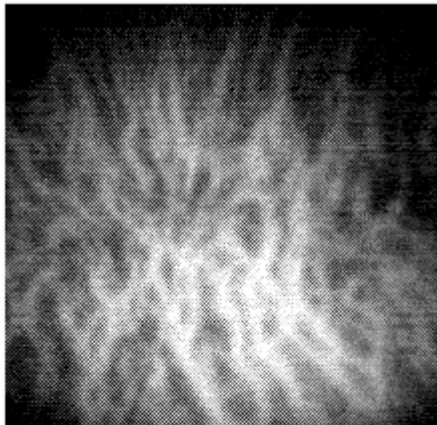


Figura 6B

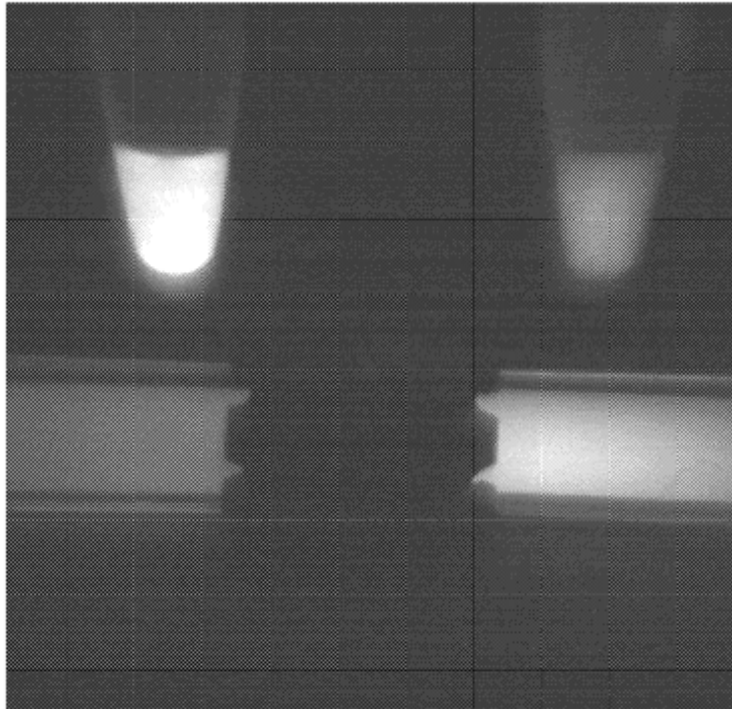


Figura 7

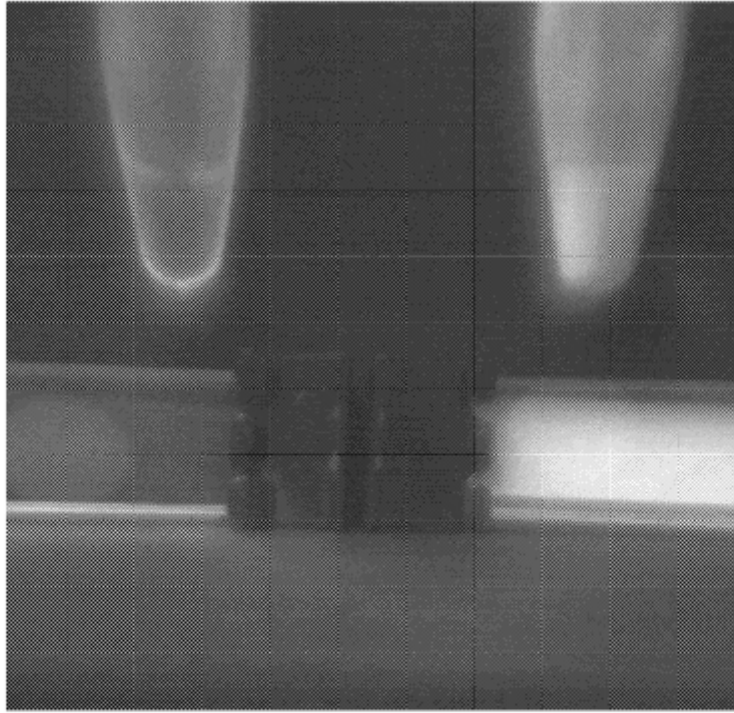


Figura 8

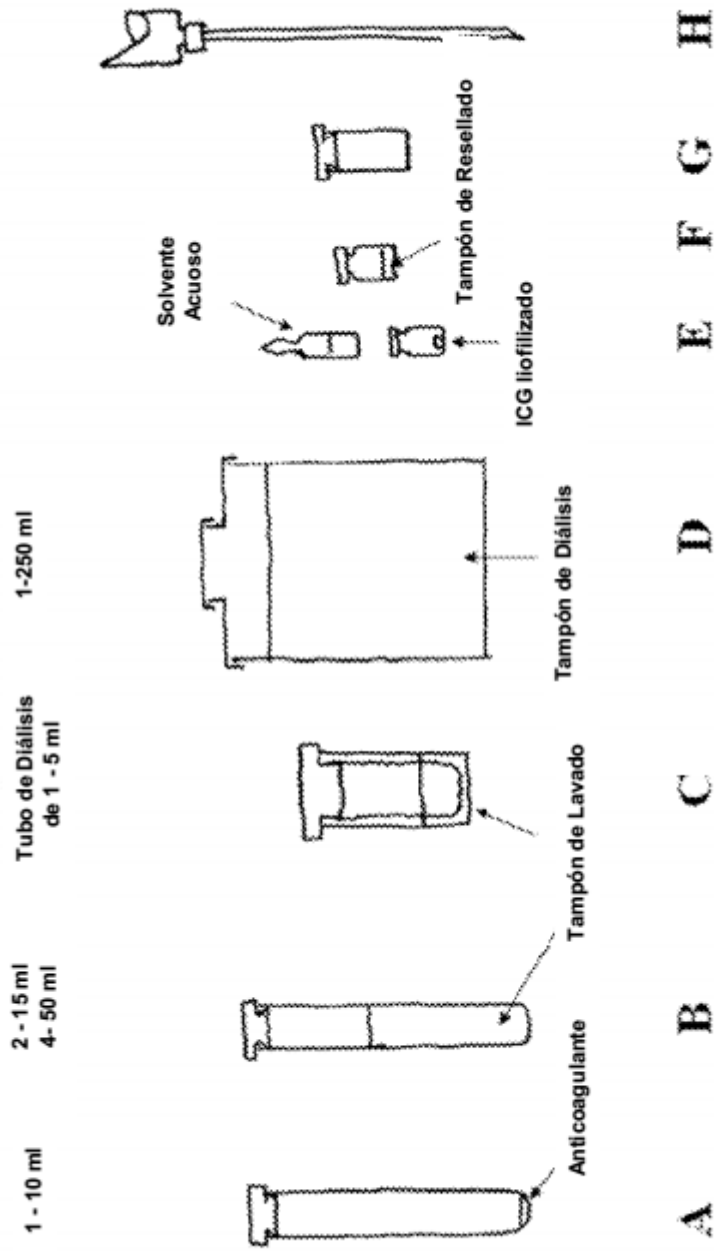


Figura 9

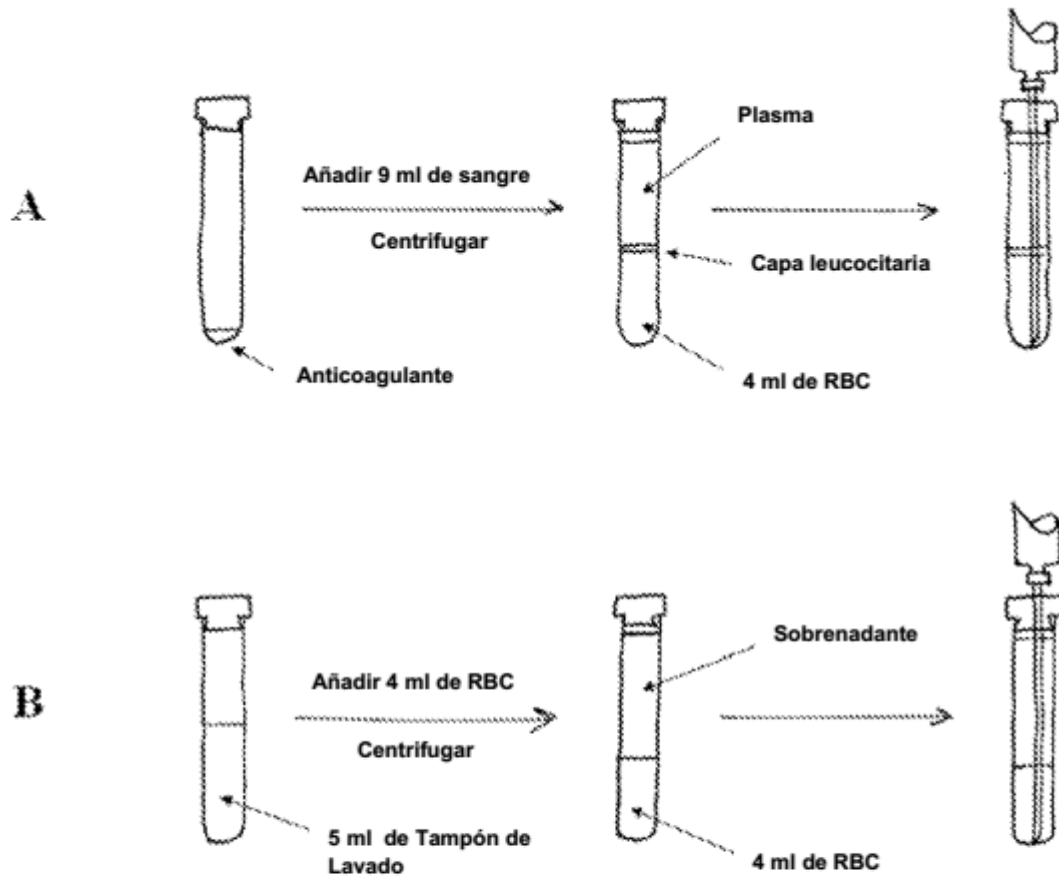


Figura 10

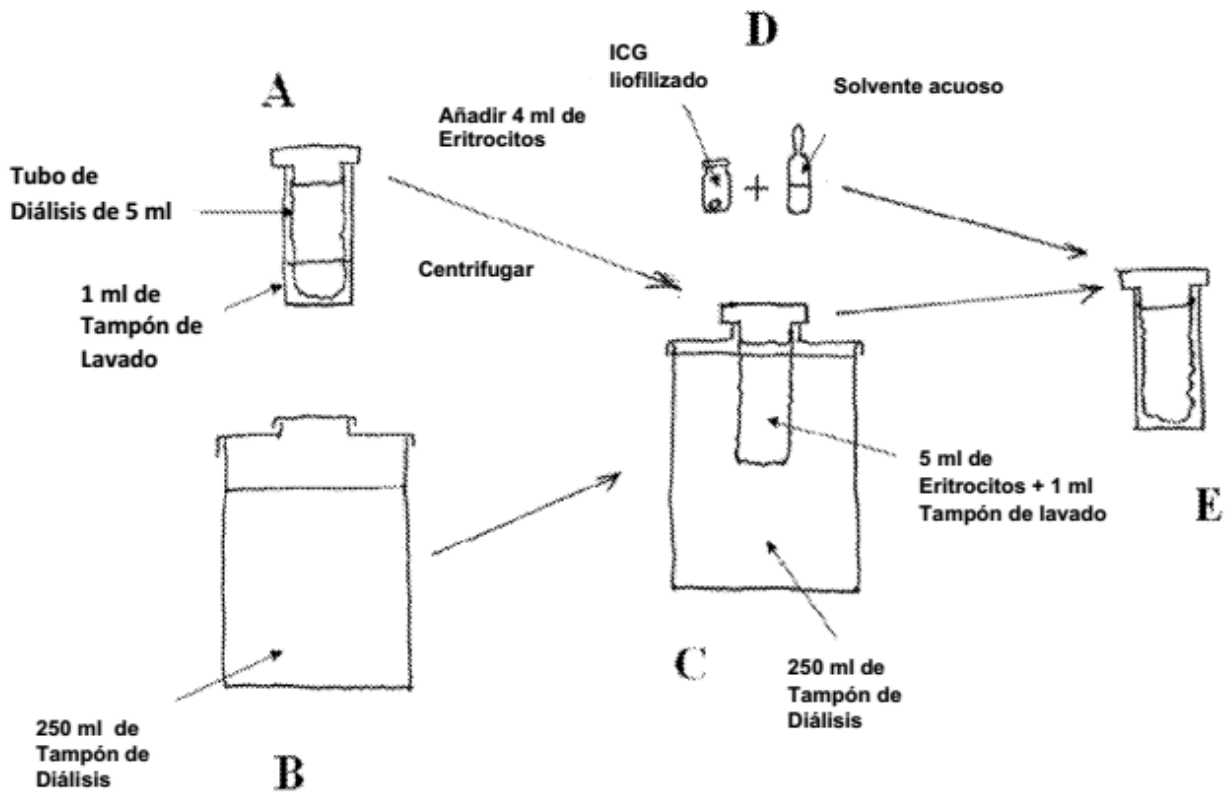


Figura 11