

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 855 006**

51 Int. Cl.:

A61N 2/06 (2006.01)

A61N 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015** **PCT/US2015/023880**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016** **WO16160012**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015** **E 15719901 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020** **EP 3277375**

54 Título: **Partículas de hierro y platino para la adherencia de productos biológicos en implantes médicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2021

73 Titular/es:

YALE UNIVERSITY (100.0%)
2 Whitney Avenue
New Haven, CT 06510, US

72 Inventor/es:

FAHMY, TAREK;
SINUSAS, ALBERT;
LEE, JUNG, SEOK;
KIM, DONGIN;
MATHUR, ANTHONY y
MARTIN, JOHN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 855 006 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

Partículas de hierro y platino para la adherencia de productos biológicos en implantes médicos

5 **Campo de la invención**

El campo de la invención se refiere en general a la atracción, la captura y la retención de células localizadas *in vivo*, y, más particularmente, a composiciones y métodos para la atracción, la captura y la retención de células diana en una superficie metálica de un dispositivo o injerto, el seguimiento no invasivo o invasivo de la acumulación de células en el dispositivo o injerto y la evaluación no invasiva o invasiva del estado del dispositivo.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los costes directos e indirectos solamente para la Unión Europea ascienden a 300.000 millones de euros al año. De forma similar, en los EE.UU. se proyecta que para 2030 los costes directos e indirectos de las enfermedades cardiovasculares podrían superar el billón de dólares por año. Se ha hecho un gran progreso en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares mediante intervenciones terapéuticas que incluyen fármacos y dispositivos; sin embargo, siguen siendo enfermedades mortales con una mortalidad de cuatro años todavía en el intervalo de aproximadamente el 50 %. La colocación de stents es el único procedimiento de revascularización que ha resistido la prueba del tiempo y ha madurado hasta convertirse en la técnica predeterminada.

El stent de arteria coronaria ha revolucionado el tratamiento de pacientes con arteriopatía coronaria y su uso está aumentando en todo el mundo. Aunque el resultado para los pacientes ha mejorado, los stents todavía fallan debido a la reestenosis y debido a la trombosis temprana y tardía que se produce en el sitio de la implantación. Aunque los stents de elución de fármaco han ayudado a reducir el problema de la reestenosis, todavía se produce proliferación de la neointima que provoca reestenosis. Adicionalmente, existe preocupación con respecto a la seguridad a largo plazo de los stents de elución fármaco, ya que parece haber un aumento pequeño pero real en la trombosis tardía y muy tardía del stent, observada particularmente después de la interrupción de la terapia antiplaquetaria.

Como se describe en el documento WO2013045956, se está desarrollando un stent magnetizado biodegradable (BMS, por sus siglas en inglés) para reducir la incidencia de reestenosis. Se usa un stent magnético para atraer células terapéuticamente pertinentes, incluyendo células progenitoras (PC, por sus siglas en inglés) que están marcadas con partículas de hierro *in vitro*. Una vez red desplegadas dentro del paciente, las células son atraídas al BMS ya implantado y contribuyen a la formación de un endotelio nuevo. Con el tiempo, los BMS experimentan una degradación predecible para dejar una arteria totalmente biológica a través de la regeneración de tejidos nativos.

Sigue existiendo la necesidad de mejores composiciones, dispositivos y métodos de uso para potenciar la reparación tisular para, por ejemplo, reducir o prevenir la reestenosis y la trombosis (temprana o tardía). En particular, existe la necesidad de composiciones y dispositivos que puedan mantener un campo magnético durante una mayor cantidad de tiempo. Por lo tanto, es un objetivo de la invención proporcionar materiales y métodos para potenciar la retención de células en las superficies del dispositivo.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar materiales y métodos para potenciar la reparación tisular, particularmente en sitios de lesión.

También es un objetivo de la invención proporcionar materiales y métodos para reducir o prevenir la reestenosis, la trombosis temprana o tardía, la trombosis dentro del stent, la neointima y/o para potenciar o aumentar la reparación vascular después de una lesión.

También es un objetivo de la invención proporcionar materiales y métodos para el seguimiento de la reparación tisular, la acumulación de células en el dispositivo o injerto y la evaluación no invasiva o invasiva del estado del dispositivo.

55 **Sumario de la invención**

Se ha descubierto que pueden dispersarse partículas de hierro/platino (Fe/Pt) en un polímero y aplicarse como recubrimiento en o sobre, o unirse directamente a, dispositivos médicos y magnetizarse. Los dispositivos magnetizados se usan para atraer, capturar y/o retener células marcadas magnéticamente en la superficie del dispositivo *in vivo*. Los dispositivos magnéticos son particularmente útiles para capturar y retener células expuestas a las tensiones y fuerzas del flujo de fluidos biológicos, por ejemplo, en stents implantados después de una angioplastia, para formar una superficie endotelial patente para evitar que se produzca la reestenosis. También pueden usarse para aumentar la integración tisular en el sitio de implantación de una prótesis, tal como una prótesis de cadera o rodilla de superficie metálica, o disminuir la erosión ósea que rodea un tornillo, vástago o placa de hueso metálico. Los dispositivos pueden estar hechos de metal, polímero o una combinación de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un dispositivo recubierto con un polímero, en donde las partículas magnetizables están unidas al polímero o encapsuladas dentro del mismo, y en donde las partículas magnetizables son ferromagnéticas y comprenden una aleación de hierro y platino que tiene una fase cristalina L1₀.

- 5 Las partículas magnéticas que están unidas al dispositivo tienen un núcleo de hierro/platino. Las versiones anteriores no estaban recocidas (es decir, no se habían calentado para crear la fase cristalina L1₀ necesaria para mantener un momento magnético). Como tales, eran superparamagnéticas y, por lo tanto, no mostraban histéresis en la curva de magnetización (es decir, no eran ferromagnéticas). El recocido del Fe/Pt es muy importante para introducir la fase cristalina interior L1₀. El recocido debe tener lugar a temperaturas superiores a 600 °C. La
10 introducción de la fase cristalina interior L1₀ cambia el material de un material paramagnético a un material ferromagnético, de manera que se convierte en un imán permanente cuando se expone a un campo magnético. En una realización preferida, las partículas se recuecen a 700 °C durante 30 min.

- En determinadas aplicaciones, puede ser ventajoso tener un dispositivo que pueda magnetizarse permanentemente. Por ejemplo, esto puede ser útil en el caso de la administración repetida de células, o en el caso de que el acceso a un campo magnético sea difícil. Además, existen ventajas para evitar la magnetización *in situ*, puesto que la magnetización *in situ* puede provocar que el dispositivo se mueva, lo que puede provocar problemas fisiológicos. La desintegración de las partículas puede minimizarse recubriendo el Fe/Pt con Silice y después calentando para evitar la desintegración de las partículas. La relación molar Fe/Pt para la creación de la fase cristalina es importante y debe estar en un intervalo en el que las partículas Fe/Pt estén en un estado cristalino L1₂ o L1₀. Preferentemente, deberían estar en una fase cristalina L1₀. El experto en la materia conocerá la relación molar necesaria para formar esta fase cristalina, pero un intervalo preferido, expresado como una relación molar composicional promedio de Fe a Pt, está en el intervalo de 40:60 +/- 10:10 % en moles, y preferentemente +/- 5:5.

- 25 La fuerza magnética en su conjunto puede medirse con un "Dispositivo de Interferencia Cuántica Superconductor", que es un magnetómetro sensible. La fuerza magnética global está preferentemente en el intervalo de 0,01 a 2,0 Tesla, preferentemente de 0,01 a 1,5 Tesla. Son límites superiores preferidos adicionales 1,0 o 0,5 T. El experto comprenderá que la fuerza magnética debe adaptarse a la aplicación. Por ejemplo, sería adecuada una fuerza magnética pequeña, si hay un número pequeño de células y si es necesario atraer esas células solo durante un período de tiempo corto. El límite superior de la fuerza magnética es importante ya que, a niveles superiores, la fuerza magnética podría ser fisiológicamente perjudicial.

- Las partículas de Fe/Pt pueden encapsularse en una partícula polimérica o aplicarse como recubrimiento al implante. Las partículas de Fe/Pt pueden encapsularse con y/o funcionalizarse con grupos reactivos, agentes de formación de imágenes o de contraste tales como yodo y/o agentes terapéuticos o profilácticos. El implante se compone preferentemente de un metal no magnetizable, tal como magnesio o una aleación de magnesio. En realizaciones preferidas, el polímero que forma las partículas o recubrimientos es un poliéster, más preferentemente un polímero de polihidroxácido, mucho más preferentemente poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) o poli-L-lactida (PLLA). Las partículas magnéticas están normalmente entre el 1 % y el 30 % del polímero en peso, ambos inclusive, para partículas de Fe/Pt de más del 50 % de Fe por partícula de Fe/Pt, y entre el 5 % y el 30 % para las partículas de Fe/Pt de menos del 50 % de Fe por partícula de Fe/Pt del polímero en peso. El espesor del recubrimiento polimérico puede ser, por ejemplo, de entre aproximadamente 1 µm y 1000 µm inclusive, o de entre aproximadamente 10 µm y 100 µm inclusive.

- 45 Las células se magnetizan mediante la unión a partículas, o la incorporación de partículas, tales como partículas de óxido de hierro u otras partículas metálicas que se unen a Fe/Pt que se han magnetizado. Existen varios reactivos comerciales que contienen partículas de óxido de hierro acopladas a anticuerpos que se unen específicamente a ligandos en las superficies celulares. Las partículas de óxido de hierro también pueden incorporarse en células fagocíticas mediante el cultivo en medio celular que contiene las partículas de óxido de hierro. Pueden usarse sistemas disponibles en el mercado para el aislamiento de las células que contienen partículas de óxido de hierro que o se han unido a las mismas.

- Los ejemplos demuestran la biodistribución de partículas de Fe/Pt encapsuladas en una formulación de polímero y solas. Las partículas se decoraron directamente con un colorante infrarrojo para su visualización. También se realizaron estudios de toxicología con diferentes dosis de partículas de Fe/Pt. También se determinó la repercusión de diversos parámetros en la captura de células, incluyendo el caudal, la concentración celular inicial y la densidad celular.

- Los resultados muestran que el 5-30 % en peso de partículas de Fe/Pt con respecto al polímero es el intervalo de trabajo para producir un recubrimiento de dispositivo suficientemente magnético para capturar y/o retener células magnéticas en el dispositivo o adyacentes al mismo durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días, semanas o meses con flujo biológico *in vivo*. El flujo de fluido biológico puede ser, por ejemplo, un flujo vascular de al menos 10 ml/min, 25 ml/min o 50 ml/min. En realizaciones preferidas, el número de células que pueden ser capturadas y/o retenidas es eficaz para cubrir una lesión vascular *in vivo*. Si existe un porcentaje demasiado alto de partículas, entonces el dispositivo puede volverse inestable. Si existen muy pocas partículas, entonces es posible que el dispositivo no funcione.

También se desvelan métodos de fabricación de dispositivos magnetizados. En una realización particular, el método incluye electronebulizar un dispositivo con partículas de Fe/Pt dispersas en una solución, suspensión o emulsión de polímero, y exponer el dispositivo recubierto con polímero a un campo magnético externo durante un período de tiempo suficiente para magnetizar el dispositivo. El dispositivo puede magnetizarse, por ejemplo, exponiendo el dispositivo al campo magnético creado mediante un escáner de formación de Imágenes por Resonancia Magnética (IRM). El dispositivo también puede volver a magnetizarse mediante la aplicación de un campo magnético externo, tal como, mediante la exposición del dispositivo *in situ* al campo magnético creado mediante un escáner de IRM.

También se proporcionan métodos de tratamiento que usan los dispositivos desvelados. Por ejemplo, un método de tratamiento de una lesión vascular puede incluir implantar un stent magnético en un sujeto que lo necesite en el sitio de la lesión o adyacente al mismo, y administrar al sujeto una cantidad eficaz de células endoteliales, células precursoras endoteliales u otras células pluripotentes o células madre magnéticas para aumentar o potenciar la reparación en el sitio de la lesión. Un método de tratamiento de la aterosclerosis puede incluir implantar un stent magnético en un sujeto que lo necesite en un sitio de aterosclerosis. Un método de este tipo también puede incluir administrar al sujeto una cantidad eficaz de células endoteliales magnéticas o células precursoras endoteliales para reducir o prevenir la reestenosis en el sitio de despliegue del stent. Algunas realizaciones incluyen adicionalmente administrar al sujeto un agente o agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico con las células magnéticas para potenciar o aumentar la reparación de la lesión vascular, reducir o prevenir la reestenosis, trombosis temprana o tardía y/o reducir o prevenir la formación de neoíntima.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra la fabricación de una partícula de hierro/platino (Fe/Pt) de ejemplo.

La Figura 2 muestra las curvas de magnetización para partículas de Fe/Pt y para partículas de óxido de hierro.

La Figura 3A es un gráfico de barras que muestra el número de células magnéticas capturadas/mm² a lo largo del tiempo (minutos) en un stent recubierto con 0 µg/mm², 2,5 µg/mm² o 5 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas. La Figura 3B es un gráfico de barras que muestra el número de células magnéticas capturadas/mm² a lo largo del tiempo (minutos) en un stent recubierto con 5 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas en condiciones de caudal de 50 ml/min y 25 ml/min. La Figura 3C es un gráfico de barras que muestra el % de células magnéticas capturadas/mm² a lo largo del tiempo (minutos) en un stent recubierto con 5 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas cuando la aportación de células era de 1,0x10⁶ o 0,3x10⁶. La Figura 3D es un gráfico de barras que muestra el número de células magnéticas capturadas/mm² después de una pasada sobre un stent recubierto con 0 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas a un caudal de 50 ml/min cuando la aportación de células era de 1,0x10⁶ y un stent recubierto con 2,5 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas a un caudal de 50 ml/min cuando la aportación de células era de 1,0x10⁶, un stent recubierto con 5,0 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas a un caudal de 50 ml/min cuando la aportación de células era de 1,0x10⁶ y un stent recubierto con 5,0 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas a un caudal de 25 ml/min cuando la aportación de células era de 1,0x10⁶ y un stent recubierto con 5,0 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas a un caudal de 50 ml/min cuando la aportación de células era de 0,3x10⁶.

La Figura 4A es un gráfico de barras que muestra el número de células magnéticas capturadas/mm² a lo largo del tiempo (horas) en un stent recubierto con 0 µg/mm², 2,5 µg/mm² o 5 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas. La Figura 4B es un gráfico de barras que muestra los 5 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas en condiciones de caudal de 50 ml/min y 25 ml/min. La Figura 4C es un gráfico de barras que muestra el % de células magnéticas capturadas/mm² a lo largo del tiempo (horas) en un stent recubierto con 5 µg/mm² de partículas de Fe/Pt magnéticas cuando la aportación de células era de 1,0x10⁶ o 0,3x10⁶.

Descripción detallada de la invención

I. Partículas magnéticas, dispositivos y células

Se ha desarrollado un sistema para la adherencia selectiva de células a superficies metálicas de dispositivos de implantes en un cuerpo.

Los dispositivos pueden estar formados total o parcialmente por un metal o una aleación de metal, preferentemente no magnéticos. Estos incluyen stents, marcapasos, tornillos, vástagos y placas para hueso, articulaciones/prótesis artificiales y placas de titanio para reconstrucción craneal y facial.

Los dispositivos tienen acoplados directamente a los mismos, o están recubiertos con, partículas de Fe/Pt que tienen una estructura cristalina que les permite magnetizarse tras la exposición a una fuente magnética externa antes de la implantación. Las partículas de Fe/Pt muestran histéresis en la curva de magnetización (es decir, son ferromagnéticas).

Las células se adhieren a los dispositivos después de la implantación mediante la administración de células que tienen incorporadas en las mismas o unidas a las mismas partículas magnéticas tales como óxido de hierro.

A. Partículas magnéticas

Existen dos tipos de partículas magnéticas: aquellas unidas al dispositivo que deben ser ferromagnéticas y aquellas que se incorporan en o sobre las células que se unen a los dispositivos. "Partículas magnetizables" son partículas que son susceptibles de magnetizarse cuando se colocan en un campo magnético externo. Se conocen en la técnica métodos para de magnetización de partículas con un campo magnético externo. La etapa de magnetización puede ocurrir antes, durante o después de que las partículas magnéticas se incorporen en el dispositivo o célula. El magnetismo de las partículas magnéticas puede ser permanente o transitorio. Las partículas magnéticas pueden volver a magnetizarse.

Partículas magnéticas para la unión o la incorporación en células

Las partículas magnéticas pueden ser partículas ferromagnéticas (es decir, partículas que contienen hierro capaces de conservar un momento magnético neto en ausencia de un campo magnético externo). Las partículas ferromagnéticas adecuadas incluyen óxidos de metal magnéticos que contienen hierro (paramagnéticos o superparamagnéticos), por ejemplo, aquellos que incluyen hierro ya sea como Fe (II), Fe (III) o una mezcla de Fe (II)/Fe (III). Los ejemplos no limitantes de dichos óxidos incluyen FeO, γ -Fe₂O₃ (maghemita) y Fe₃O₄ (magnetita). Las partículas magnéticas también pueden ser un óxido de metal mixto del tipo M₁xM₂3-xO₄, donde M1 representa un ion de metal divalente y M2 representa un ion de metal trivalente. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden ser ferritas magnéticas de fórmula M1Fe₂O₄, donde M1 representa un ion divalente seleccionado entre Mn, Co, Ni, Cu, Zn o Ba, puros o mezclados entre sí o mezclados con iones ferrosos. Otros óxidos de metal incluyen óxido de aluminio, óxido de cromo, óxido de cobre, óxido de manganeso, óxido de plomo, óxido de estaño, óxido de titanio, óxido de cinc y óxido de circonio, y los metales adecuados incluyen Fe, Cr, Ni o aleaciones magnéticas.

Las partículas pueden ser partículas de Co (por ejemplo, *J. Appl. Phys.* 1999, 85, 4325), partículas de aleación de Fe/Pt (por ejemplo, *Science* 2000, 287, 1989), partículas de Fe/Pd o Co/Pd (por ejemplo, *J. Appl. Phys.* 2002, 91,8477), partículas de Mn₃O₄ o MnO (por ejemplo, *Angew. Chem. Int. Ed* 2004, 43, 1115), partículas de Ni (por ejemplo, *Adv. Mater.* 2005, 17, 429), partículas de (Y_{1-x}Gd_x)₂O₃, en donde x es de 0 a 1, (por ejemplo, *Chem. Mater.* 2008, 20, 2274).

Pueden usarse partículas magnéticas disponibles en el mercado, tales como el nanopulvo de aleación Hierro55-níquel45 (<100 nm) disponible en Aldrich, el nanopulvo de óxido de hierro y níquel 98 % Fe₂NiO₄ 20-30 nm disponible en Aldrich, nanopulvo de óxido de hierro Fe₃O₄ >98 % 20-30 nm disponible en Merck, nanopulvo de óxido de níquel y cobalto 99 % NiO CoO <30 nm disponible en Aldrich, nanopulvo de óxido de cobalto (II III) 99,8 % 20-30 nm disponible en Merck, nanopulvo de óxido de níquel (II) 99,8 % 10-20 nm disponible en Merck, nanopulvo de óxido de gadolinio (III) 99,9 % <40 nm disponible en Aldrich, nanopulvo de óxido de hierro, cinc y níquel 99 % disponible en Aldrich, nanopulvo de óxido de cobre, cinc y hierro, <80 nm, 98,5 % disponible en Aldrich, nanopulvo de óxido de cobre y hierro 98,5 % disponible en Aldrich, o similar, pero sin limitación a los mismos.

Las partículas magnéticas incluyen una aleación tal como Fe/Pt, Fe/Co o Co/Pt. Las partículas preferidas específicas se revisan en Ho, *et al.*, *Acc Chem Res.*, 44(10): 875-882 (2011) e incluyen partículas de magnetita (Fe₃O₄), ferrita MFe₂O₄ (M = Mn, Zn); Au-Fe₃O₄, Fe metálico, aleación de Fe/Pt, aleación de Fe/Co, o una combinación de las mismas.

Partículas magnetizables para la unión a dispositivos o para la aplicación como recubrimiento sobre los mismos

Las partículas magnetizables para la unión a los dispositivos o para la aplicación como recubrimiento sobre los mismos son partículas de hierro/platino (Fe/Pt). Se conocen en la técnica métodos de preparación de partículas magnetizables. Véase, por ejemplo, Sun, *et al.*, *IEEE Trans. Magn.*, 37: 1239-1243 (2001), que describió partículas de Fe/Pt preparadas por reducción de Pt(acac)₂ y la descomposición de Fe(CO)s. Otros métodos incluían la adición de Ag, Co a las partículas de Fe/Pt para mejorar sus propiedades físicas y magnéticas (Shevchenko, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 124(38): 11480-11485 (2002), Kang, *et al.*, *Nano Lett.*, 2(3): 1033-1036 (2002)), la formación de partículas de Fe/Pt por la reducción simultánea de FeCl₂ y Pt(acac)₂ y acetilacetato de Fe y Pt (Sol, *et al.*, *IEEE Trans. Magn.*, 37: 1239-1243 (2001), Jeyadevan, *et al.*, *J. Appl. Phys.*, 93(10): 7574 (2003)). El tamaño de partícula producido mediante los métodos mencionados anteriormente es generalmente de aproximadamente 3-4 nm. Un método de preparación de partículas de Fe/Pt de dos nm se describe en Elkins, *et al.*, *Nano Letters*, 3(12): 1647-49 (2003).

Por ejemplo, la síntesis puede incluir la reducción química simultánea de Pt(acac)₂ y Fe(acac)₃ por 1,2-hexadecanodiol a temperatura elevada (por ejemplo, 250 °C) en fase de solución, con técnicas convencionales sin aire en una atmósfera de argón. Por ejemplo, se mezcla una relación molar de aproximadamente 1:2:10 de Pt(acac)₂:Fe(acac)₃:1,2-hexadecanodiol (por ejemplo, 0,5 mmol:1,0 mmol:5,0 mmol). Se añade un volumen adecuado de dióctil éter y se mezcla mientras se purga con Ar. La mezcla se calienta a una temperatura adecuada, por ejemplo 100 °C, y se mantiene durante un período de tiempo adecuado (por ejemplo, 20 min). Durante esta

espera, se inyectan cantidades adecuadas de oleilamina y ácido oleico (por ejemplo, 0,05 mmol (0,17 ml) de oleilamina y 0,05 mmol (0,16 ml) de ácido oleico) en la mezcla mientras continúa la purga de Ar. Después de la espera, la mezcla se mantiene en una manta de Ar y se calienta adicionalmente (por ejemplo, a aproximadamente 250 °C) a una velocidad adecuada (por ejemplo, aproximadamente 7 °C por minuto (reflujo)), y la temperatura se mantiene durante un período de tiempo adecuado (por ejemplo, aproximadamente 30 min) antes de enfriar a temperatura ambiente en la manta de Ar. Después, toda la manipulación puede realizarse abierta a la atmósfera.

La purificación puede incluir mezclar la dispersión con alcohol etílico (EtOH), recoger el precipitado y desechar el sobrenadante. El precipitado puede volver a dispersarse en hexano y EtOH (por ejemplo, relación de 2:1). Puede añadirse opcionalmente una cantidad pequeña adicional de oleilamina y ácido oleico para ayudar a volver a dispersar las partículas. El sobrenadante de la redispersión puede recogerse y transferirse a un nuevo tubo de centrifuga, desechar cualquier precipitado que se separe. Puede añadirse EtOH adicional a esta dispersión. El sobrenadante puede desecharse y el precipitado de color pardo oscuro restante se vuelve a dispersar en hexano o se seca para su almacenamiento.

Las partículas de Fe/Pt pueden recubrirse con SiO₂ por formación de sílice catalizada por una base a partir de tetraetilortosilicato en una microemulsión de agua en aceite con el fin de reducir la agregación térmica de las partículas de Fe/Pt durante el recocido a temperatura elevada. Dichos métodos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Lee, *Silicon Nanowires, Carbon Nanotubes, and Magnetic Nanocrystals: Synthesis, Properties, and Applications*, ProQuest Information and Learning Comp., Ann Arbor, MI (2007). Por ejemplo, puede mezclarse Igepal CO-520 con ciclohexano. Las partículas de Fe/Pt dispersas en ciclohexano pueden inyectarse en la solución de ciclohexano/Igepal. Puede añadirse solución acuosa NH₄OH al 30 %, seguido de la adición de tetraetilortosilicato (TEOS). La mezcla normalmente se agita durante varios días (por ejemplo, 72 h) antes de añadir metanol para recoger partículas. Las partículas pueden precipitarse con hexano en exceso y recogerse (por ejemplo, mediante centrifugación). Las partículas pueden volver a dispersarse en etanol. Las partículas de Fe/Pt/SiO₂ pueden "lavarse" usando este procedimiento al menos tres veces para retirar el exceso de tensioactivo.

Las partículas de Fe/Pt/SiO₂ pueden recocerse a temperatura elevada, por ejemplo, usando un horno de tubo. Las partículas pueden fundirse por goteo sobre una oblea de Si, se colocan en un tubo de cuarzo y después se colocan en el horno de tubo. El recocido puede realizarse purgando el tubo y la muestra con flujo de H₂ al 7 %/N₂ al 93 % a 700 °C. Después del recocido, el recubrimiento de SiO₂ puede retirarse tratando las partículas con una solución de ácido fluorhídrico (HF) al 1 %.

Los Ejemplos que se analizan a continuación ilustran que las partículas de Fe/Pt preparadas mediante este proceso tienen una retención magnética de al menos 60 días, lo que proporcionará suficiente tiempo, por ejemplo, para la atracción de células progenitoras (PC) marcadas con hierro a un stent magnetizado después de la implantación. Se conocen en la técnica métodos de preparación de dichas partículas magnéticas como se describe adicionalmente a continuación incluyendo métodos de ejemplo para sintetizar partículas de Fe/Pt.

En algunas realizaciones, las partículas de Fe/Pt tienen una relación molar de Fe:Pt en el intervalo de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1. En una realización preferida, la composición de partículas de Fe/Pt tiene una relación molar de Fe:Pt de aproximadamente 1:1. En determinadas realizaciones, el porcentaje molar de Fe de la partícula de Fe/Pt puede ser tan bajo como del 5-10 % y aun así se consigue suficiente magnetización de partículas.

En una realización preferida, la relación molar composicional promedio de Fe con respecto a Pt, está en el intervalo de 40:60 +/- 10:10 % en moles, y preferentemente +/- 5:5.

En realizaciones preferidas, las partículas de Fe/Pt se forman poniendo en contacto una sal de hierro, una sal de platino y un reactivo reductor. En determinadas realizaciones, se añaden adicionalmente moléculas de tensioactivo u otros ligandos durante la síntesis de partículas para evitar la aglomeración de las partículas de Fe/Pt formadas. Las fuentes de hierro adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales de hierro tales como acetilacetato de Fe (II), acetilacetato de Fe (III), cloruro de Fe (II), cloruro de Fe (III), acetato de Fe (II), bromuro de Fe (II), bromuro de Fe (III), fluoruro de Fe (II), fluoruro de Fe (III), yoduro de Fe (II) y sulfuro de hierro (II). Las fuentes de platino adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales de platino tales como acetilacetato de Pt (II), acetato de Pt (II), cloruro de Pt (II), bromuro de Pt (II), yoduro de Pt (II) y cianuro de Pt (II). En una realización preferida, la sal de hierro es acetilacetato de Fe (III) y la sal de platino es acetilacetato de Pt (II). Las cantidades relativas de sales de hierro y sales de platino pueden seleccionarse basándose en la composición de relación molar de Fe con respecto a Pt final deseada de la partícula de Fe/Pt. Los reactivos reductores adecuados incluyen dioles de cadena larga tales como, pero sin limitación, 1,2-hexadecanodiol, 1,2-dodecanodiol y 1,2-octanodiol. En una realización preferida, el reactivo reductor es 1,2-hexadecanodiol. También pueden añadirse tensioactivos adecuados e incluyen, pero sin limitación, ácido oleico, oleilamina, ácido hexanoico, dodecil-benceno sulfato de sodio y dodecilsulfonato de sodio. En una realización preferida, se usan oleilamina y/o ácido oleico como tensioactivos. La reacción para formar las partículas de Fe/Pt puede realizarse a una temperatura adecuada en el intervalo de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 300 °C. La velocidad a la que se calienta la reacción, ya sea a una temperatura intermedia (si la hubiera) o a la temperatura a la que se calienta la reacción en última instancia, puede afectar al tamaño de las

partículas. Las velocidades de calentamiento típicas pueden ser de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 °C/min. La reacción se realiza normalmente en presencia de uno o más disolventes, tales como un disolvente orgánico (es decir, dioctil éter o fenil éter), en atmósfera inerte, durante cualquier cantidad de tiempo adecuada que pueda ser necesaria para producir las partículas de Fe/Pt finales deseadas de una composición, tamaño y forma dados. Las partículas de Fe/Pt finales pueden purificarse, según sea necesario, de acuerdo con cualquier técnica adecuada conocida en la técnica.

Las partículas de Fe/Pt tienen un tamaño promedio en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 nm, más preferentemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 nm. En algunas realizaciones, las partículas de Fe/Pt formadas pueden ser sustancialmente mono-dispersas, en donde el término "mono-dispersa" significa que la desviación típica del diámetro de partícula sobre el diámetro de partícula promedio es inferior a aproximadamente el 10 por ciento. Las partículas de Fe/Pt preparadas pueden tener formas seleccionadas entre esférica, esferoide, varilla, elipsoide achatado y otras formas. En algunas realizaciones, la forma de las partículas se selecciona para aumentar la probabilidad de una distribución de partículas de orden superior y/o de un aumento de la distribución de partículas. En algunas circunstancias, puede ser adecuado referirse a las partículas de Fe/Pt como "nanopartículas".

Las partículas de Fe/Pt formadas de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente pueden incluir opcionalmente otros metales tales como, pero sin limitación, plata, cobalto y níquel para aumentar las propiedades de magnetización y/o mejorar las propiedades físicas de las partículas. Por ejemplo, pueden añadirse sales de metal tales como acetilacetato de Co (II), acetato de Ag (I) y acetilacetato de Ni (II) para sustituir al menos algunas de las sales de metal de Fe y/o Pt utilizadas en la síntesis de las partículas.

Como alternativa, en algunas realizaciones, las partículas de Fe/Pt pueden formarse por descomposición de pentacarbonilo de hierro ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) y reducción *in situ* de acetilacetato de Pt (II) a una temperatura elevada en el intervalo de aproximadamente 250 °C a aproximadamente 300 °C, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Recocido con recubrimiento de sílice

Para reducir o prevenir la desintegración durante el recocido, las partículas de Fe/Pt se recubren con una cubierta de sílice. El recubrimiento de partículas magnéticas con sílice reduce la formación de agregados; potencia la estabilidad, disminuye las alteraciones no deseadas en las propiedades magnéticas; y reduce la biodegradación cuando se usa *in vivo* (Santra, Langmuir, 17: 2900-06 (2001)). Se conocen en la técnica métodos de recubrimiento de partículas magnéticas con sílice y normalmente incluyen microemulsiones preparadas con un tensioactivo no iónico y tetraetilortosilicato (TOES), seguido de recocido. Después del recocido, la sílice puede retirarse con ácido fluorhídrico. En los ejemplos se proporciona un método de ejemplo.

La estructura cristalina es una característica importante. Las partículas de Fe/Pt se recubren con sílice (SiO_2) por formación de sílice catalizada por una base, o algún otro método adecuado conocido en la técnica, con el fin de reducir o inhibir la agregación térmica y/o la desintegración de las partículas de Fe/Pt antes de aplicar un tratamiento de recocido a las partículas a una temperatura elevada. Estas partículas, denominadas partículas de Fe/Pt en SiO_2 , pueden aislarse y purificarse de acuerdo con cualquier técnica adecuada conocida en la técnica.

Las partículas de Fe/Pt en SiO_2 pueden recocerse a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 °C, mucho más normalmente de aproximadamente 600 a aproximadamente 750 °C. En una realización preferida, las partículas de Fe/Pt en SiO_2 se recuecen a aproximadamente 700 °C. El Fe/Pt en SiO_2 puede purgarse con una mezcla de uno o más gases. En algunas realizaciones, el gas de purga es una mezcla de gas reductor (es decir, una mezcla de hidrógeno gaseoso y nitrógeno gaseoso) durante el tratamiento de recocido. El tratamiento de recocido puede aplicarse durante una cantidad de tiempo suficiente para inducir una fase cristalina interior en las partículas, tal como la fase $L1_0$. Las cubiertas de sílice permiten la formación de un núcleo de Fe/Pt unificado y de ordenamiento $L1_0$ dentro de cada partícula y permiten evitar la coalescencia de los núcleos de Fe/Pt de partículas adyacentes. En una realización preferida, la etapa de recocido a 700 °C se realiza durante de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente una hora. La etapa de recocido puede realizarse al aire, bajo el flujo de un gas de purga o en atmósfera inerte. Después del tratamiento de recocido, la capa de recubrimiento de sílice puede retirarse y las partículas de Fe/Pt pueden aislarse y purificarse.

Las propiedades magnéticas de las partículas de Fe/Pt recocidas y sintetizadas de este modo pueden caracterizarse usando un magnetómetro sensible, tal como un "dispositivo de interferencia cuántica superconductor" (SQUID, por sus siglas en inglés) para determinar la coercitividad de la curva de magnetización de las partículas. Coercitividad, como se usa en el presente documento, es una medida de la resistencia de un material ferromagnético a desmagnetizarse cuando se expone a un campo magnético externo. En realizaciones preferidas, las partículas de Fe/Pt recocidas tienen una coercitividad en el intervalo de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 25.000 amperios por metro (A/m), o en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 Tesla. La coercitividad elevada en las partículas recocidas puede atribuirse al ordenamiento $L1_0$ en las partículas de Fe/Pt inducido por el tratamiento de recocido.

Estas partículas magnéticas de Fe/Pt pueden ser neutras o tener carga negativa o positiva. Las partículas magnéticas de Fe/Pt pueden tener un potencial zeta en el intervalo de aproximadamente -60 mV a aproximadamente +60 mV. En una realización preferida, las partículas de Fe/Pt recocidas no tienen carga.

- 5 Las partículas magnéticas de Fe/Pt recocidas pueden dispersarse en una solución, suspensión o emulsión de polímero que se usa para recubrir o impregnar un dispositivo, o de manera que cuando el polímero se polimerice, las partículas magnéticas queden inmovilizadas por la matriz polimérica en o sobre el dispositivo, tal como un stent.

Magnetización de las partículas

- 10 Para aplicaciones vasculares, las partículas para la unión o la incorporación al dispositivo deben incluir hierro y platino y estar recocidas para formar una estructura cristalina para proporcionar suficiente atracción para atraer y mantener las células sobre el dispositivo dentro del lumen vascular. Las partículas magnéticas tienen un núcleo de Fe/Pt. Las versiones anteriores no estaban recocidas (es decir, no se habían calentado para crear la fase cristalina L1₀ necesaria para mantener un momento magnético). Como tales, eran superparamagnéticas y, por lo tanto, no mostraban histéresis en la curva de magnetización (es decir, no eran ferromagnéticas). El recocido del Fe/Pt es muy importante para introducir una estructura cristalina de fase cristalina interior L1₀. El recocido se realiza a temperaturas superiores a 600 °C. En una realización preferida, las partículas se recuecen a 700 °C durante 30 min. Esto crea la magnetización. La desintegración de las partículas se minimiza recubriendo el Fe/PT con Sílice y después calentando para evitar la desintegración de las partículas. La relación molar Fe:Pt para la creación de la fase cristalina es importante y una relación molar composicional promedio de Fe a Pt está en el intervalo de 40:60 +/- 10:10 % en moles, y preferentemente +/- 5:5.

- 25 La fuerza magnética en su conjunto puede medirse con un "Dispositivo de Interferencia Cuántica Superconductor", que es un magnetómetro sensible. La fuerza magnética global está en el intervalo de 0,1 a 2,0 Tesla.

- Normalmente, las partículas se ponen en un campo magnético para magnetizarlas o volver a magnetizarlas. El campo magnético puede ser el de un imán permanente o un electroimán. En una realización particular, las partículas se magnetizan en un escáner clínico, por ejemplo, un campo magnético generado por un escáner de formación de imágenes por resonancia magnética (IRM). La intensidad y la duración del magnetismo que presentan las partículas pueden ajustarse mediante la intensidad del imán externo y el tiempo utilizado para magnetizar las partículas. El campo magnético puede aplicarse cuando las partículas están *in situ*, *ex vivo*, *in vivo*, o una combinación de los mismos. Se prefiere que las partículas se apliquen al dispositivo antes de la magnetización.

- 35 Preferentemente, las partículas tienen un campo magnético/intensidad y duración adecuados para conseguir la aplicación deseada. Por ejemplo, se podría usar una intensidad de campo magnético de entre 0,1 y 5 T, o entre 0,5 y 3 T para magnetizar las partículas. Las partículas preferentemente permanecen magnéticas *in vivo* durante al menos entre aproximadamente 1 y 25, 1 y 50, 1 y 75, o entre aproximadamente 1 y 100 días, mucho más preferentemente al menos 60 días, cada una inclusive después de retirarlas de un campo magnético.

- 40 El facultativo puede seleccionar la partícula magnética basándose en las propiedades deseadas, incluyendo la intensidad y la duración del magnetismo, como se ha analizado anteriormente y se analiza con mayor detalle a continuación. En determinadas aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable que las partículas sean ferromagnéticas, es decir, mantener un campo magnético. Para la mayoría de las aplicaciones *in vivo*, el campo magnético estará entre 0,1 y 2,0 Tesla, más preferentemente entre 0,05 y 0,3 Tesla. Los Ejemplos ilustran que se cree que las partículas de Fe/Pt tienen una retención magnética de al menos 60 días, lo que proporcionará suficiente tiempo, por ejemplo, para la atracción de células progenitoras CD34+ o células progenitoras endoteliales (EPC) marcadas con hierro a un stent magnetizado después de la implantación.

50 B. Encapsulación o recubrimiento con polímero y funcionalización

- Las partículas magnéticas pueden aplicarse como recubrimiento o impregnarse directamente en un dispositivo. Sin embargo, las partículas normalmente se dispersan en un polímero y se aplican como recubrimiento o se impregnan en el dispositivo, o se encapsulan en partículas, para aumentar la densidad de Fe/Pt y adherir el Fe/Pt al dispositivo. Como alternativa, las partículas pueden dispersarse en una única capa del recubrimiento con la aplicación de una o más capas adicionales sin partículas, en un proceso conocido como "laminación". Se conocen en la técnica métodos de recubrimiento y funcionalización de polímeros magnéticos. Véase, por ejemplo, Akbarzadeh, *et al.*, *et al.*, *Nanotech., Sci., Applic.*, 5: 13-25 (2012) y Businova, *et al.*, *NanoCon11* (Sept. 21-3, 2011, Brno, República Checa, UE), 6 páginas.

60 Modificación de la superficie de las partículas

- La superficie de la partícula puede modificarse a través de la creación de unas pocas capas atómicas de superficies orgánicas (polímero) o inorgánicas (metal u óxido), y después es adecuada para la funcionalización adicional con agentes terapéuticos, profilácticos y/o de diagnóstico. Estos pueden ser agentes activos de molécula pequeña o biomacromoléculas, tales como proteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos. Los agentes activos de molécula

pequeña adecuados incluyen compuestos orgánicos y organometálicos. Los agentes activos de molécula pequeña pueden ser un compuesto hidrófilo, hidrófobo o anfífilo.

5 También puede ser ventajoso incorporar sobre o dentro de la partícula, un agente de contraste, marcadores radiopacos, colorante fluorescente u otros aditivos para permitir la formación de imágenes de las partículas *in vivo* para el seguimiento, la colocación y otros fines.

10 En algunas realizaciones, las partículas magnéticas se dispersan en una solución, suspensión o emulsión de polímero que se usa para recubrir o impregnar un dispositivo, o de manera que cuando el polímero se polimerice, las partículas magnéticas queden inmovilizadas por la matriz polimérica dentro o sobre el dispositivo. También pueden añadirse agentes activos incluyendo agentes terapéuticos, profilácticos y/o de diagnóstico, tales como aquellos analizados anteriormente, a la solución, suspensión o emulsión de manera que el agente activo también se incorpore en el recubrimiento polimérico (por ejemplo, un stent de elusión de fármaco).

15 En general, el médico puede seleccionar el polímero o los polímeros basándose en las propiedades deseadas y la aplicación en la que se van a usar. La matriz polimérica puede formarse a partir de polímeros no biodegradables o biodegradables; sin embargo, preferentemente, la matriz polimérica es biodegradable. La matriz polimérica puede seleccionarse para que se degrade durante un período de tiempo que varía de un día a un año. En una realización preferida, la integridad estructural del stent se pierde entre 6 y 12 meses después de su colocación en el cuerpo. En una realización más preferida, el 80 % del dispositivo se pierde entre 6 y 12 meses después de su colocación en el cuerpo.

25 En general, se prefieren los polímeros sintéticos, aunque pueden usarse polímeros naturales. Los polímeros representativos incluyen poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-ácidos glicólicos), polihidroxialcanoatos tales como poli3-hidroxibutirato o poli4-hidroxibutirato; policaprolactonas; poli(ortoésteres); polianhídridos; poli(fosfacenos); poli(láctida-co-caprolactonas); poli(glicolida-co-caprolactona); policarbonatos tales como policarbonatos de tirosina; poliamidas (incluyendo las poliamidas sintéticas y naturales, polipéptidos y poli(aminoácidos); poliésteramidas; otros poliésteres biocompatibles; poli(dioxanonas); poli(alquilatos de alquileño); poliéteres hidrófilos; poliuretanos; poliéter-ésteres; poliacetales; policianoacrilatos; polisiloxanos; copolímeros de poli(oxietileno)/poli(oxipropileno); policetales; polifosfatos; polihidroxicvaleratos; oxalatos de polialquileño; poli(succinato de alquileño); poli(ácidos maleicos), alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidona; poli(óxidos de alquileño) tales como polietilenglicol (PEG); celulosas derivatizadas tales como alquilcelulosas (por ejemplo, metilcelulosa), hidroxialquilcelulosas (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa), éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ácido acrílico, ácido metacrílico o copolímeros o derivados de los mismos, incluyendo ésteres, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo) (denominados conjuntamente en el presente documento "ácidos poliacrílicos"), así como derivados, copolímeros y mezclas de los mismos.

40 Como se usa en el presente documento, "derivados" incluyen polímeros que tienen sustituciones, adiciones de grupos químicos y otras modificaciones de las cadenas principales poliméricas descritas anteriormente realizadas habitualmente por los expertos en la materia.

45 C. Dispositivos

Las partículas de Fe/Pt se aplican como recubrimiento o se impregnan en un dispositivo, tal como un dispositivo médico. El dispositivo puede ser uno que se inserte en el sujeto transitoriamente o uno que se implante permanentemente. En algunas realizaciones, el dispositivo es un dispositivo quirúrgico.

50 En las realizaciones más preferidas, el dispositivo es un dispositivo médico implantable, tal como un stent, injerto, válvula, marcapasos, prótesis ortopédica tal como un vástago, placa, tornillo o reemplazo de articulación, o placas utilizadas para reparación craneal o facial. Mucho más preferentemente, el dispositivo es un stent.

55 Los stents están disponibles en el mercado y por lo demás son conocidos en la técnica. Los stents pueden formarse, es decir, grabarse o cortarse, a partir de un tubo delgado de material adecuado, o a partir de una placa delgada de material adecuado y enrollarse en un tubo. En las realizaciones más preferidas, el stent comprende magnesio y/o una aleación de magnesio, pero también pueden usarse muchos otros materiales. Los materiales adecuados para preparar stents incluyen, pero sin limitación, acero inoxidable, iridio, platino, oro, wolframio, tántalo, paladio, plata, niobio, circonio, aluminio, cobre, indio, rutenio, molibdeno, niobio, estaño, cobalto, níquel, cinc, hierro, galio, manganeso, cromo, titanio, aluminio, vanadio y carbono, así como combinaciones, aleaciones y/o laminaciones de los mismos. Por ejemplo, el stent puede formarse a partir de una aleación de magnesio, preferentemente una aleación de magnesio reabsorbible. En una realización, la aleación de magnesio reabsorbible consiste en del 96 al 97,9 % p/p de magnesio, del 1,6 al 2 % p/p de manganeso y del 0,5 al 2 % p/p de metal de tierras raras. Para este fin, se usan preferentemente el neodimio o el cerio como metales de tierras raras. En particular, se prefiere una composición que comprenda el 97,45 % p/p de magnesio, el 1,8 % p/p de manganeso y el 0,75 % p/p de cerio. En

otras realizaciones, el stent comprende una aleación de cobalto, tal como L605 o MP35N®, Nitinol (aleación de memoria de forma de níquel-titanio), ABI (aleación de paladio-plata), Elgiloy® (aleación de cobalto-cromo-níquel), etc.

- 5 El stent puede formarse a partir de dos o más materiales que se laminan juntos, tales como el tántalo laminado con MP35N®. Los stents también pueden formarse a partir de alambres que tienen capas concéntricas de diferentes metales, aleaciones u otros materiales. Los stents pueden formarse a partir de tubos huecos o tubos que se han rellenado con otros materiales.
- 10 Los stents también pueden estar compuestos por y/o recubiertos con uno o más materiales degradables. Por ejemplo, se describen materiales absorbibles para fabricar stents y recubrimientos de stent en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.059.211 y 5.306.286. La Patente de los EE.UU. N.º 5.935.506 describe un método para fabricar un stent absorbible a partir de poli-3-hidroxi-butarato (P3HB); la Patente de los EE.UU. N.º 6.045.568 describe stents absorbibles fabricados a partir de hilos de tejer de ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poliglactina
- 15 (P(GA-co-LA)), polidioxanona (PDS), poligliconato (un copolímero de bloque de ácido glicólico y carbonato de trimetileno, P(GA-co-TMC)) y un copolímero de ácido glicólico o ácido láctico con ϵ -caprolactona (P(GA-co-CL) o P(LA-co-CL)); y Laaksovirta *et al.*, describe un stent autoexpandible, biodegradable y autoreforzado de P(GA-co-LA) para su uso en aplicaciones uretrales (*J Urol*. Agosto de 2003; 170 (2 Pt 1): 468-71). Tanguay, J. F. *et al.*, *Cardiology Clinics*, 12: 699-713 (1994), describe el uso de polímeros de polianhídrido y poliortoéster para fabricar stents absorbibles. El documento WO 98/51812 de Williams *et al.* proporciona métodos para retirar pirógenos de polihidroxialcanoatos y la fabricación de stents con estos materiales despirogenados, y el documento WO 99/32536 de Martin *et al.* y el documento WO 00/56376 de Williams *et al.* desvelan métodos para preparar polihidroxialcanoatos con velocidades de degradación controladas y la fabricación de stents con estos materiales.
- 20 Van der Giessen *et al.* (*Marked Inflammatory Sequelae to Implantation of Biodegradable and Nonbiodegradable Polymers in Porcine Coronary Arteries*, *Circulation*, 94: 1690-1697 (1996)) evaluaron recubrimientos de un copolímero de ácido glicólico y ácido láctico (P(GA-co-LA)), policaprolactona (PCL), poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV), un poliortoéster y un poli(óxido de etileno)-tereftalato de polibutileno en stents metálicos, y publicaron que los recubrimientos indujeron reacciones inflamatorias notables dentro de la arteria coronaria. La Solicitud Publicada de los EE.UU. 2009/0234538 describe recubrimientos tisulares poliméricos multifuncionales. Otros materiales de stents bioabsorbibles incluyen hierro, magnesio, cinc y sus aleaciones.

- En algunas realizaciones, el stent está compuesto por dos o más polímeros bioabsorbibles. En algunas realizaciones, el stent está recubierto con uno o más polímeros bioabsorbibles. El stent puede estar compuesto por, y recubierto con, los mismos o diferentes polímeros. Se describen métodos de fabricación y recubrimiento de stents
- 35 absorbibles en la Patente de los EE.UU. N. 7.618.448. Los stents pueden incluir dos o más recubrimientos, por ejemplo, un recubrimiento base y uno o más recubrimientos superiores compuestos por los mismos o diferentes polímeros.

- En una realización particularmente preferida, el stent está compuesto por un metal no magnetizable, mucho más preferentemente magnesio o una aleación de magnesio.
- 40

- En algunas realizaciones, el stent es un stent "de elución de fármaco". Se conocen en la técnica diversos "stents de elución" de fármaco que entregan simultáneamente una sustancia terapéutica al sitio de tratamiento mientras proporcionan un soporte radial artificial al tejido de la pared. Los dispositivos endoluminales, incluyendo los stents,
- 45 en ocasiones se recubren en sus superficies externas con una sustancia tal como un agente liberador de fármaco, factor de crecimiento o similar. También se han desarrollado stents que tienen una estructura tubular hueca con agujeros o puertos cortados a través de la pared lateral para permitir la elución del fármaco desde un lumen central. Aunque la naturaleza hueca del stent permite que el lumen central se cargue con una solución de fármaco que se entrega a través de los puertos u orificios en la pared lateral del stent, la estructura tubular hueca puede no tener una
- 50 resistencia mecánica adecuada para proporcionar un armazón adecuado en el vaso.

- En algunas realizaciones, los dispositivos se recubren o se impregnan con partículas magnéticas y uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo, pero sin limitación, agentes antiplaquetarios, agentes anticoagulantes, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos, agentes antimetabólicos, agentes anti-neointima adicionales,
- 55 agentes antiproliferativos adicionales, inmunomoduladores, agentes antiproliferativos, agentes que afectan a la migración y a la producción de matriz extracelular, agentes que afectan a la deposición de plaquetas o a la formación de trombos y agentes que promueven la curación vascular y la reendotelización, tales como aquellos y otros descritos en Tanguay *et al.* *Cardiology Clinics*, 12: 699-713 (1994), J. E. Sousa, *et al.*, *Circulation*, 107 (2003) 2274 (Parte I), 2283 (Parte II), Salu, *et al.*, *Acta Cardiol*, 59 (2004) 51.
- 60

- Los ejemplos de agentes antitrombina incluyen, pero sin limitación, Heparina (incluyendo heparina de bajo peso molecular), R-Hirudina, Hirulog, Argatroban, Efgatran, Péptido anticoagulante de garrapata y Ppack.

- Los ejemplos de agentes antiproliferativos incluyen, pero sin limitación, paclitaxel (Taxol), vincristina QP-2, metotrexato, angioproteína, mitomicina, BCP 678, c-myc antisentido, ABT 578, actinomicina-D, RestenASA, 1-Cloro-desoxiadenosina, Ribozima PCNA y celecoxib.
- 65

Los ejemplos de agentes antireestenosis incluyen, pero sin limitación, inmunomoduladores tales como sirolimus (rapamicina), tacrolimus, Biorest, mizoribina, ciclosporina, Interferón- γ 1b, leflunomid, tranilast, corticoesteroide, ácido micofenólico y bifosfonato.

5 Los ejemplos de agentes antimigratorios y moduladores de la matriz extracelular incluyen, pero sin limitación, halofuginona, Inhibidores de la propilhidroxilasa, Inhibidores de la C-proteinasa, Inhibidores de MMP, batimastat, probucol.

10 Los ejemplos de agentes de cicatrización de heridas y promotores de la endotelización incluyen factor de crecimiento epitelial vascular ("VEGF"), 17 β -Estradiol, Inhibidores de Tkasa, BCP 671, estatinas, donadores de óxido nítrico ("NO") y anticuerpos contra células progenitoras endoteliales ("EPC", por sus siglas e inglés).

15 Además de las aplicaciones coronarias, pueden incorporarse agentes terapéuticos y profilácticos en el stent o el recubrimiento del stent para otras indicaciones. Por ejemplo, en aplicaciones urológicas, pueden incorporarse agentes antibióticos en el stent o recubrimiento del stent para la prevención de infecciones. En aplicaciones gastroenterológicas y urológicas, pueden incorporarse agentes activos en el stent o el recubrimiento del stent para el tratamiento local del carcinoma.

20 También pueden incorporarse en el stent agentes de contraste tales como marcadores radiopacos, u otros aditivos, para permitir la formación de imágenes del stent *in vivo* para el seguimiento, la colocación y otros fines. Dichos aditivos podrían añadirse a la composición absorbible utilizada para fabricar el stent o el recubrimiento del stent, o absorberse en, fundirse sobre o pulverizarse sobre la superficie de parte o de todo el stent. Los aditivos preferidos para este fin incluyen plata, yodo y compuestos marcados con yodo, sulfato de bario, óxido de gadolinio, derivados de bismuto, dióxido de circonio, cadmio, wolframio, tántalo dorado, bismuto, platino, iridio y rodio. Estos aditivos
25 pueden ser, pero sin limitación, partículas o partículas de tamaño micro o nano. Las partículas pueden ser iguales o diferentes de las partículas magnetizadas analizadas anteriormente. La radioopacidad puede determinarse mediante fluoroscopia o mediante análisis por rayos X. Se analizan con mayor detalle a continuación modificaciones para potenciar la formación de imágenes y el contraste, tales como la conjugación de yodo a la partícula.

30 Se ha desarrollado un vector adenovírico que codifica Neuropilina-1 (NRP1) que puede entregarse eficientemente y expresarse transitoriamente en las arterias *in vivo*. Se ha demostrado la entrega y la expresión eficiente y transitoria de un vector adenovírico que codifica NRP1 humano de tipo silvestre (Ad.NRP1) y se ha caracterizado su expresión en células usando arterias carótidas de rata lesionadas con globo *in vivo*, respaldando de este modo el uso de este
35 vector adenovírico para la expresión eficiente de NRP1 en arterias coronarias humanas. Estos datos se incluyen en la solicitud de patente del RU no publicada número 1408210.1 presentada el 9 de mayo de 2014 por el cesionario de algunos de los inventores de la presente solicitud.

40 Se realizaron experimentos que comparan las propiedades de entrega de genes *in vivo* del poloxámero (PLURONIC®, copolímeros de bloque de óxido de polietileno) y poliésteres tales como los polihidroxiácidos biodegradables como geles de poli(ácido láctico-co-glicólico (PLGA) para determinar el mejor material para recubrir el stent. Ambos polímeros presentan termogelificación reversible y se han utilizado como vehículos para la entrega de oligonucleótidos, péptidos y genes desnudos. La ventaja del PLGA sobre el gel de poloxámero es que su integridad dura más de un mes en el sitio de administración, en comparación con 2-4 días para el gel de poloxámero,
45 por lo tanto, el PLGA es un polímero más adecuado.

El agente o agentes pueden añadirse en el material absorbible antes del procesamiento y/o el recubrimiento de la superficie del stent con el agente o agentes. La velocidad de liberación del agente o agentes puede controlarse mediante varios métodos, incluyendo la variación de la relación del material absorbible con respecto al agente o
50 agentes, el peso molecular del material absorbible, la composición del agente o agentes, la composición del polímero absorbible, el espesor del recubrimiento, el número de capas de recubrimiento y sus espesores relativos y/o la concentración de agente. También pueden aplicarse recubrimientos superiores de polímeros y otros materiales, incluyendo polímeros absorbibles, a recubrimientos de agente activo para controlar la velocidad de liberación.

55 Los stents de ejemplo que pueden usarse con las composiciones y métodos que se desvelan en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aquellos descritos en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.891.108, 6.918.929, 6.923.828, 6.945.992, 6.986.785, 7.060.090, 7.144.419, 7.163.555, 7.323.008, 7.651.527, 7.655.034, 7.678.141, 7.744.645, 7.942.917, 8.001.925, 8.001.925, 8.034.099, 8.048.149, 8.066.760, 8.100.960, 8.157.855, 8.172.893, 8.182.524, 8.187.284, 8.187.322, 8.197.528, 8.206.432, 8.221.490, 8.231.669, 8.236.044, 8.252.048, 8.252.065, 8.257.425, 8.257.431, 8.292.945, 8.298.278, 8.298.280, 8.348.991, 8.348.992, 8.348.993, 8.353.952, 8.359.998, 8.361.140, 8.372.134, 8.372.138, 8.377.112, 8.388.676, 8.398.695, 8.414.637, 8.414.639 y 8.414.656.

65 Los stents adecuados también incluyen aquellos descritos en los documentos WO 2014/067656, WO 2011/107243, WO 2010/118883, WO 2007/006562, WO 2005/104990, WO 2005/099967, WO 2005/046522, WO 2004/062533, de Qualimed Innovative Medizinprodukte GMBH, y aquellos revisados en García-García, *Archivos de Cardiología*, de

México, 76(3): 297-319 (2006).

En algunas realizaciones, los stents se conforman y/o se pliegan de acuerdo con los dispositivos y métodos proporcionados en los documentos WO 99/008623 y/o WO 2005/099967.

5

Métodos de recubrimiento e impregnación de dispositivos

Las partículas magnéticas pueden aplicarse como recubrimiento o impregnarse en el dispositivo usando cualquier medio adecuado. Los métodos comunes de recubrimiento de stents incluyen, por ejemplo, deposición por haz iónico, deposición química por vapor, tecnología de vacío de plasma, atomización, inmersión, ultrasonidos, impresión por inyección de tinta, deposición en fase gaseosa, electrohilado y electronebulización. En realizaciones particularmente preferidas, una solución, suspensión o emulsión de polímero/partícula se aplica al dispositivo mediante un método basado en pulverización, tal como electronebulización o electro-nanonebulización. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.746.869 y Puskas, *et al.*, "Drug-eluting Stent Coatings", *WIRES Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12 páginas (2009), que proporciona polímeros preferidos para el recubrimiento de stents y una revisión de métodos de recubrimiento por electro-nanonebulización.

El espesor del recubrimiento polimérico también depende del uso previsto. Preferentemente, el recubrimiento tiene entre aproximadamente 1 µm y 1.000 µm inclusive, o de entre aproximadamente 5 µm y 500 µm inclusive, o de entre aproximadamente 10 µm y 100 µm inclusive. En una realización particular, el espesor del recubrimiento es de aproximadamente 10 µm, 25 µm, 50 µm o 75 µm. Los recubrimientos de stent de magnesio tienen preferentemente un espesor de 40 a 60 µm.

Mucho más normalmente, el dispositivo tendrá un campo magnético eficaz y permanecerá magnetizado durante una cantidad de tiempo suficiente para atraer una cantidad eficaz de células magnetizadas al sitio diana para potenciar una función del tejido y/o tratar una lesión tisular en el sitio diana.

Como se ha analizado con mayor detalle, los materiales y métodos que se desvelan en el presente documento son particularmente adecuados para potenciar la reparación de lesiones del tejido cardíaco y vascular y otros tejidos expuestos a fuerzas y tensiones provocadas por el flujo de fluido biológico. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, el dispositivo tendrá un campo magnético eficaz y permanecerá magnetizado durante un tiempo suficiente para atraer, capturar y/o retener una cantidad eficaz de células magnetizadas en el sitio diana para potenciar la reparación de una lesión tisular, por ejemplo, una lesión vascular o cardíaca. Algunos sitios de lesión y, por lo tanto, el dispositivo que se usa para tratar la lesión, están bajo las fuerzas y/o tensiones del flujo sanguíneo vascular o cardíaco. En algunas realizaciones, el dispositivo tendrá un campo magnético eficaz y permanecerá magnetizado durante un tiempo suficiente para atraer, capturar y/o retener una cantidad eficaz de células magnetizadas en el sitio diana con un caudal de fluido de al menos 1 ml/min, 5 ml/min, 10 ml/min, 25 ml/min, 50 ml/min, 75 ml/min, 100 ml/min, 150 ml/min, 250 ml/min, 500 ml/min, 750 ml/min, 1.000 ml/min.

Preferentemente, el dispositivo tendrá un campo magnético eficaz y permanecerá magnetizado durante un tiempo suficiente para atraer, capturar y/o retener una cantidad eficaz de células magnetizadas en el sitio diana durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días, semanas o meses, mucho más preferentemente 60 días para aplicaciones cardiovasculares.

Los ejemplos a continuación demuestran que mediante el uso de la metodología desvelada, pueden recubrirse stents de aleación de magnesio (Mg60 y Mg80) con recubrimiento de PLLA y PLGA con espesores de 60 µm y 40 µm. Los estudios también demuestran que los recubrimientos de 60 µm tenían un 5-20 % en peso de Fe/Pt y consiguieron un campo magnético de 0,05-0,3 T.

E. Células atraíbles magnéticamente

Las partículas de Fe/Pt magnéticas se usan para atraer, capturar y/o retener células diana en un sitio diana que necesite terapia celular, *in vivo* en un sujeto que lo necesite. Normalmente, las células se marcan o etiquetan con un material magnético o atraíble magnéticamente como se ha descrito anteriormente por lo que son atraídas al campo magnético presentado por el dispositivo magnético.

55

Células que han de magnetizarse

En las realizaciones más preferidas, los dispositivos se usan en combinación con células atraíbles magnéticamente. Las células adecuadas incluyen, pero sin limitación, células primarias y estirpes celulares establecidas, células embrionarias (sin embargo, se prefiere que no se usen éstas en la invención), células inmunitarias, células madre y células diferenciadas incluyendo, pero sin limitación, células derivadas del ectodermo, endodermo y mesodermo, incluyendo fibroblastos, células parenquimatosas, células hematopoyéticas, células epiteliales, células mesenquimatosas, células neuronales, células endoteliales, mioblastos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de médula ósea, células madre, células sanguíneas del cordón umbilical o una combinación de los mismos. Como se usa en el presente documento, las células madre incluyen células unipotentes, células multipotentes y células pluripotentes; y células madre adultas tales como células madre hematopoyéticas, células madre

mesenquimatosas, células madre epiteliales y células satélite musculares. Las células pueden ser células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés).

Las células pueden ser autólogas o alogénas. Las células autólogas pueden ser aquellas que se encuentran de forma natural en el donante o células modificadas *ex vivo*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células se han modificado de forma recombinante para que contengan uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifique productos proteínicos deseados. En algunas realizaciones, las células son células madre aisladas de un donante y expandidas y/o diferenciadas *ex vivo*.

Una gran cantidad de pruebas indican que las células que expresan los marcadores de superficie CD133 y CD34 constituyen una población fenotípica y funcionalmente definida de PC circulantes que puede desempeñar una función en la angiogénesis regenerativa. Las células CD34+ pueden aislarse de una fuente humana disponible que se sabe que está enriquecida en células progenitoras (sangre del cordón umbilical humano y médula ósea, por ejemplo).

En una realización preferida, las células que han de magnetizarse son células CD34+ derivadas de médula ósea.

Marcado magnético de células

Puede usarse cualquier material magnético o atraíble magnéticamente adecuado para marcar las células. Preferentemente, el material es biocompatible y no es tóxico para las células o para el sujeto al que está destinada la terapia. Se conocen en la técnica células magnéticas y atraíbles magnéticamente y métodos para prepararlas. Véase, por ejemplo, Nkansah, *et al.*, *Magn Reson Med.*, 65 (6): 1776-1785 (2011), así como las referencias citadas en el mismo. Los métodos pueden incluir incubar las células con el material magnético en condiciones adecuadas para ser internalizadas por la célula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el material magnético se internaliza por endocitosis o pinocitosis. Pueden unirse anticuerpos marcados con fluoróforos o perlas magnéticas, tales como óxido de hierro, a células diana basándose en el reconocimiento de anticuerpos/antígenos específicos, lo que permite la separación celular basada en inmunomarcaje usando citometría de flujo o clasificación celular activada magnéticamente. En algunos casos, también es posible marcar células magnéticamente sin usar partículas.

Uno de los primeros trabajos en captura magnética usando imanes en masa usa un Clasificador de Células Magnéticas (MACS, por sus siglas en inglés) de Miltenyi Biotec para separar las células marcadas con partículas magnéticas de las células no marcadas. Pueden observarse tres etapas básicas: los objetos de interés se marcan con partículas magnéticas; la solución pasa a través de la columna de MACS, en la que las células marcadas son capturadas por los imanes mientras que las demás se recogen en la salida de la columna; las células capturadas se retiran del alcance de acción del campo magnético y se recogen. Hoshino *et al.* usaron el mismo principio para desarrollar sistemas microfluidos en los que se disponen imanes en masa con magnetización antiparalela uno al lado del otro para crear un gradiente de campo mayor [K. Hoshino, *et al.*, *Lab on Chip*, 11, 3449-3457, 2011. Este sistema se usa para capturar células cancerosas marcadas magnéticamente y para observarlas dentro del canal microfluído.

Varias empresas tales como Miltenyi Biotec, Dynal Biotech, Polysciences, Ademtech o Chemicell han desarrollado partículas superparamagnéticas de tamaño controlado, recubiertas con anticuerpos específicos y dedicadas a la separación biomagnética. Algunas de estas partículas incluso están compuestas por materiales biodegradables, reduciendo su impacto en las células.

El enriquecimiento inmunomagnético de las células puede realizarse usando diferentes equipos comerciales, tales como el sistema de reactivos CliniMACS® CD34 (Miltenyi Biotec), CellSearch System (anteriormente Veridex, Warren, Nueva Jersey, disponible a través de Janssen Diagnostics, LLC) y la serie de separadores MPC (Dynal AS). También han surgido enfoques publicados recientemente basados en la combinación de magnetismo y microfluidos como alternativas viables de alto rendimiento y coste bajo a los equipos de separación potentes pero voluminosos y caros, tales como los sistemas FACS (Clasificador de Células Activadas por Fluorescencia, por sus siglas en inglés) o CellSearch®. Una estrategia habitualmente utilizada consiste en colocar un imán permanente en masa en las proximidades de un canal de microfluidos para desviar las dianas marcadas magnéticamente fuera de la corriente principal. El sistema CliniMACS®, es el sistema preferido.

Los materiales adecuados para marcar células incluyen partículas magnéticas tales como las partículas magnéticas analizadas en detalle anteriormente. Realizaciones particulares incluyen el marcaje de células basado en óxido de hierro, por ejemplo, ferumóxidos o partículas pequeñas de óxido de hierro (SPIO, por sus siglas en inglés) recubiertas con dextrano, que se han utilizado clínicamente para ayudar a identificar tumores en el hígado (Nkansah, *et al.*, *Magn Reson Med.*, 65 (6): 1776-1785 (2011)). Una formulación de ferumóxido clínicamente aprobada es FERIDEX®. También se han usado partículas de óxido de hierro de tamaño micrométrico disponibles en el mercado (MPIO, Bangs Labs) para el marcaje de células magnéticas Shapiro, *et al.*, *Magnetic Resonance in Medicine*, 53(2): 329-338 (2005). Se han preparado más normalmente partículas magnéticas encapsuladas con polímero biodegradables, usando polímeros tales como poli(láctida-co-glicolida) (PLGA) y poli(ácido láctico) (PLA), para la entrega dirigida de cargas útiles encapsuladas de fármaco y la confirmación por formación de imágenes (Nkansah,

et al., *Magn Reson Med.*, 65 (6): 1776-1785 (2011)). Se analizan partículas de óxido de hierro de microgel con un amplio intervalo de diámetros hidrodinámicos (86-766 nm) y un contenido sustancial de magnetita (hasta el 82 % en peso) para marcar células progenitoras endoteliales en (Lee, *et al.*, *Biomaterials*, 31(12): 3296-3306 (2010)). Se analizan partículas biodegradables de poli(ácido DL-láctico-co-ácido α,β -málico)/magnetita de 100 nm para el marcaje magnético de células en Wang, *et al.*, *Biomaterials*, 31 (13): 3502-3511 (2010) y se analizan núcleos de magnetita encapsulados dentro de PLGA a ~ 150 nm de diámetro total en Lim, *et al.*, *Small*, 4(10): 1640-1645 (2008). Las células pueden marcarse con micropartículas y partículas biodegradables de las que pueden formarse imágenes magnéticas y fluorescentes o de rayos X, compuestas por PLGA o celulosa. Se describen métodos para preparar dichas células marcadas en Nkansah, *et al.*, *Magn Reson Med.*, 65 (6): 1776-1785 (2011). Se describen otras composiciones y métodos adecuados en Arbab, *NMR in Biomedicine*, 18(6): 383-389 (2005), Arbab, *et al.*, *Molecular Imaging*, 3(1): 24-32 (2004) y Hsiao, *Magnetic Resonance in Medicine*, 58(4): 717-724 (2007).

Composiciones farmacéuticas para células

Las células pueden administrarse al sujeto en una composición farmacéutica. En general, las composiciones farmacéuticas incluyen cantidades eficaces de células y opcionalmente incluyen diluyentes farmacéuticamente aceptables, normalmente solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), solución de Ringer, dextrosa al 5 % en agua (D5W) y solución salina normal/fisiológica (NaCl al 0,9 %). También pueden incluirse en la composición terapéutica electrolitos tales como, pero sin limitación, cloruro de sodio y cloruro de potasio. Preferentemente, la composición farmacéutica tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4. En otra realización más, la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 7,4. Se conoce una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composición farmacéutica (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 22ª ed. 2012).

En una realización, las células se administran junto con G-CSF (por ejemplo, Granocyte® (lenograstim)). El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citocina potente utilizada con frecuencia con el fin de premovilizar células progenitoras.

Kits

En una realización, un dispositivo como se describe en el presente documento se proporciona junto con células atraíbles magnéticamente, como se ha descrito anteriormente, o reactivos mediante los cuales pueden prepararse células y volverse atraíbles magnéticamente, en forma de un kit. El kit puede incluir o estar envasado con instrucciones de uso que describen un método de administración como se describe en el presente documento.

II. Métodos de uso

A. Métodos de administración

Los dispositivos magnéticos pueden implantarse o administrarse de otro modo a un sujeto para atraer células magnéticas o atraíbles magnéticamente, partículas atraíbles magnéticamente funcionalizadas con agentes activos y combinaciones de las mismas. Mucho más normalmente, el dispositivo se implanta en un sitio que necesita terapia celular de manera que las células magnéticas o atraíbles magnéticamente administradas por separado al sujeto sean atraídas magnéticamente al sitio *in vivo*. Adicionalmente, o como alternativa, pueden sembrarse células magnéticas o atraíbles magnéticamente sobre o en el dispositivo *ex vivo* y el campo magnético producido por el dispositivo retiene las células en o cerca del dispositivo después de que se implanta en un sujeto *in vivo*. Se apreciará que los dispositivos y células desvelados pueden usarse en diversas combinaciones en una amplia gama de aplicaciones terapéuticas. El dispositivo y el tipo celular pueden ser seleccionados por el médico basándose en el sujeto que ha de tratarse y la enfermedad o trastorno que ha de tratarse.

En algunos enfoques *in vivo*, las células se administran a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una dosis suficiente para tratar, inhibir o aliviar uno o más síntomas del trastorno que se está tratando o para proporcionar de otro modo un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Por ejemplo, las células pueden administrarse en una cantidad eficaz para potenciar una función tisular. En realizaciones preferidas, las células se administran en una cantidad eficaz para potenciar la reparación tisular de una lesión.

En algunas realizaciones, el efecto de la composición sobre un sujeto se compara con un control. Por ejemplo, el efecto de la composición sobre un síntoma particular, indicador farmacológico o fisiológico puede compararse con un sujeto sin tratar o con el estado del sujeto antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el síntoma, indicador farmacológico o fisiológico se mide en un sujeto antes del tratamiento y nuevamente una o más veces después de iniciado el tratamiento. En algunas realizaciones, el control es un nivel de referencia o un promedio determinado basándose en la medición del síntoma, indicador farmacológico o fisiológico en uno o más sujetos que no tienen la enfermedad o afección que se trata (por ejemplo, sujetos sanos). En algunas realizaciones, el efecto del tratamiento se compara con un tratamiento convencional que se conoce en la técnica, tal como uno de los que se analizan en el presente documento.

Las células se administran preferentemente mediante inyección o catéter, por vía parenteral, por vía intraarterial o intravenosa. En determinadas realizaciones, las composiciones se administran localmente, por ejemplo, por inyección directamente en o adyacente a un sitio que se ha de tratar.

En algunas realizaciones, las composiciones se inyectan, se aplican por vía tópica o se administran de otro modo directamente en la vasculatura o sobre el tejido vascular en o adyacente al sitio de la lesión, cirugía o implantación. Por ejemplo, las composiciones se aplican por vía tópica al tejido vascular que se expone, durante un procedimiento quirúrgico, de implantación o de trasplante. Normalmente, la administración local provoca un aumento de la concentración localizada de las composiciones que es superior al que puede conseguirse mediante la administración sistémica.

En una realización preferida, la estasis en el flujo sanguíneo en el sitio del stent se establece antes de la administración de las células. La estasis se induce preferentemente durante aproximadamente 3 minutos, preferentemente a través del inflado de un catéter de globo colocado distal al sitio de colocación del stent. Las células pueden entregarse directamente en el lumen del stent a través de un catéter adecuado mientras que hay estasis en el flujo sanguíneo. El flujo sanguíneo se restablece desinflando y retirando el globo.

B. Tratamientos

Los materiales y métodos son particularmente útiles para aumentar, potenciar o mejorar la función tisular, proporcionando soporte mecánico y promoviendo procesos de curación y reparación tisular. Los materiales y métodos también pueden ser eficaces para reducir, aliviar o calmar, uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno asociados a un tejido dañado. Además, el término tratamiento incluye la prevención o el aplazamiento del desarrollo de enfermedades o trastornos asociados a un tejido dañado.

En realizaciones particulares, el tejido es un tejido vascular, un tejido miocárdico, un tejido muscular, un tejido renal, un tejido cartilaginoso, un tejido óseo o un tejido dérmico. El tejido dañado puede ser uno que esté funcional y/o estructuralmente alterado, tal como, pero sin limitación, un endotelio lesionado o reestenótico, miocardio infartado (después de un IM), un miocardio isquémico, un músculo isquémico, un cartílago isquémico, un hueso isquémico o una dermis isquémica.

Dos realizaciones particulares que se analizan con mayor detalle a continuación incluyen métodos de tratamiento o prevención de la reestenosis/reendotelización y el infarto de miocardio.

Reestenosis y reendotelización

La angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) es un procedimiento en el que se hace pasar un catéter pequeño con punta de globo por una arteria coronaria estrechada y después se expande para reabrir la arteria. Se realiza en aproximadamente 250.000-300.000 pacientes cada año. La principal ventaja de esta terapia es que los pacientes en los que el procedimiento tiene éxito no necesitan someterse al procedimiento quirúrgico más invasivo del injerto de derivación de arteria coronaria. Una dificultad importante de la ACTP es el problema del cierre del vaso después de la angioplastia, tanto inmediatamente después de la ACTP (reoclusión aguda) como a largo plazo (reestenosis).

La reestenosis también es un evento adverso común de los procedimientos endovasculares. Los procedimientos que se usan frecuentemente para tratar el daño vascular de la aterosclerosis y el estrechamiento y el reestrechamiento (reestenosis) relacionados de los vasos sanguíneos incluyen la cirugía vascular, la cirugía cardíaca y la angioplastia. La "reestenosis en el stent" o ISR, por sus siglas en inglés, se refiere a la reestenosis que se produce durante/después de la colocación de un stent. Si la reestenosis se produce después de una angioplastia con globo, se denomina reestenosis postangioplastia o PARS.

El mecanismo de reoclusión aguda parece implicar varios factores y puede ser resultado del retroceso vascular con el cierre resultante de la arteria y/o el depósito de plaquetas sanguíneas a lo largo de la longitud dañada del vaso sanguíneo recién abierto seguido de la formación de un trombo de fibrina/eritrocito. La reestenosis (recierre crónico) es un proceso más gradual que la reoclusión aguda: El 30 % de los pacientes con lesiones subtotales y el 50 % de los pacientes con lesiones totales crónicas continuarán a reestenosis después de la angioplastia. Aunque todavía se están determinando los procesos hormonales y celulares exactos que promueven la reestenosis, actualmente se entiende que el proceso de ACTP y de la colocación de stents, además de abrir la arteria obstruida ateroscleróticamente, también lesiona las células musculares lisas (CML) arteriales coronarias residentes. En respuesta a esta lesión, las plaquetas adheridas, los macrófagos infiltrados, los leucocitos o las propias células musculares lisas (CML) liberan factores de crecimiento derivados de células con la consiguiente proliferación y migración de CML mediales a través de la lámina elástica interna al área de la íntima del vaso. La proliferación adicional e hiperplasia de CML de la íntima y, de manera mucho más significativa, la producción de grandes cantidades de matriz extracelular durante un período de 3-6 meses, da como resultado el llenado y el estrechamiento del espacio vascular lo suficiente para obstruir significativamente el flujo sanguíneo coronario.

El tratamiento de la reestenosis requiere procedimientos adicionales, generalmente más invasivos, incluyendo el injerto de derivación de arteria coronaria (IDAC) en casos graves. Por consiguiente, se persiguen agresivamente métodos para prevenir la reestenosis o para tratar las formas incipientes.

5 En una realización particularmente preferida, los materiales y métodos desvelados se usan para potenciar la recuperación de lesiones vasculares o procedimientos quirúrgicos y/o para tratar o prevenir la reestenosis, la trombosis temprana o tardía u otros trastornos proliferativos vasculares después de una lesión o diversos procedimientos quirúrgicos, mediante la potenciación de la recuperación de la lesión endotelial, la reducción o
10 inhibición de la proliferación de células musculares lisas, la migración, o una combinación de las mismas en una cantidad eficaz para reducir o inhibir la formación de neoíntima y, de este modo, tratar o prevenir la reestenosis en el sujeto.

15 En algunas realizaciones, el sujeto ha experimentado, está experimentando o experimentará un traumatismo vascular. Los traumatismos vasculares incluyen aquellos asociados a intervenciones médicas, tales como cirugía o angioplastia, así como lesiones tanto contundentes como penetrantes incluyendo, pero sin limitación, laceraciones, heridas punzantes, lesiones por aplastamiento, heridas de bala, heridas de cuchillo, lesiones ocupacionales, caídas y accidentes de vehículos de motor. La arteriopatía crónica del trasplante (ATC) es una causa importante de pérdida
20 tardía del aloinjerto después del trasplante de corazón o riñón (Taylor, *et al.*, *J. Heart Lung Transplant.*, 24: 945-955 (2005), Burke, *et al.*, *Transplantation*, 60: 1413-1417 (1995); Cornell y Colvin, *Curr. Opin. Nephrol Hypertens.*, 14: 229-234 (2005)). Por lo tanto, el sujeto se ha sometido, se está sometiendo o se someterá a un trasplante.

25 En algunas realizaciones, los materiales y métodos se usan para tratar o prevenir la reestenosis después de que se ha producido la lesión vascular. En algunas realizaciones, los materiales y métodos desvelados provocan la lesión, pero, no obstante, reducen o previenen la aparición de una reestenosis asociada.

30 En un método normal, se selecciona un stent magnetizado o magnetizable. El médico puede seleccionar el tamaño y la forma del stent basándose en el tamaño y la ubicación en la que se implantará, así como en la afección para cuyo tratamiento se está usando. Una realización particularmente preferida se ejemplifica a continuación usando un stent recubierto con partículas magnéticas de Fe/Pt en una matriz de PLLA. En una realización más específica, el stent es un stent de magnesio Mg120 (espesor del puntal de aleación de magnesio de 120 µm) en donde el recubrimiento de PLLA tiene un espesor de aproximadamente 40 µm.

35 El stent se implanta en un sujeto que lo necesite. El stent puede magnetizarse antes o después de la implantación, pero preferentemente se magnetiza antes de la implantación. Se administra al sujeto una cantidad eficaz de células magnetizadas para potenciar la reparación de la lesión provocada por la implantación de un stent y/u otra intervención vascular. Las células pueden administrarse al sujeto por separado de la implantación del stent, durante la implantación del stent y/o la célula puede sembrarse en el stent *ex vivo* antes de la implantación. Preferentemente, las células son células endoteliales o células progenitoras magnéticas o atraíbles magnéticamente. El stent
40 magnetizado atrae las células y/o retiene las células en el sitio de la lesión.

45 El progreso de la reparación puede controlarse *in vivo* a lo largo del tiempo y al sujeto pueden administrárseles células una o más veces adicionales si es necesario. En consecuencia, en algunas realizaciones, las células se administran en dos o más ocasiones. En algunas realizaciones, las células se administran de acuerdo con una pauta posológica regular en donde se administran rondas sucesivas de células con uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más días, semanas, meses o años de diferencia.

50 En algunas realizaciones, las células se administran en el lumen arterial o directamente en el sitio del stent mediante inyección o infusión (por ejemplo, usando un catéter). En algunas realizaciones, las células se introducen en el lumen del stent. Se prefiere que haya estasis del flujo sanguíneo local cuando se estén entregando las células.

En algunas realizaciones, el stent y/o las células o ambos están marcados para potenciar la formación de imágenes *in vivo*.

55 En algunas realizaciones, el método incluye la administración de partículas terapéuticas, magnéticas y/o uno o más de otros tratamientos convencionales para lesiones vasculares, por ejemplo, compuestos antiinflamatorios que bloquean la invasión/activación local de monocitos evitando, por lo tanto, la secreción de factores de crecimiento que pueden desencadenar la proliferación y migración de CML, agentes antiproliferativos que pueden inhibir la proliferación y migración de CML, tales como rapamicina y paclitaxel. En algunas realizaciones, el stent es un stent de elución de fármaco que eluye uno o más agentes terapéuticos convencionales.
60

Formación de imágenes

65 Adicionalmente, o como alternativa, a las aplicaciones terapéuticas desveladas, los materiales y métodos que se desvelan en el presente documento pueden adaptarse para la formación de imágenes y el seguimiento *in vivo*. Mucho más normalmente, un marcador o agente de contraste detectable se conjuga o se incorpora de otro modo a

uno o más de los materiales desvelados. Por ejemplo, cualquiera de los dispositivos o células desvelados puede marcarse de acuerdo con métodos que se conocen en la técnica. Se conocen en la técnica marcadores detectables comunes e incluyen, por ejemplo, moléculas fluorescentes, metales (por ejemplo, oro) e isótopos radiactivos. Los agentes clínicos de contraste y de formación de imágenes de diagnóstico incluyen gadolinio, diacetil-bis(N⁴-metiltiosemicarbazona) de ⁶⁴Cu (⁶⁴Cu-ATSM), ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa (FDG), ¹⁸F-fluoruro, ¹⁸F-fluoromisonidazol (FMISO), galio, tecnecio-99m, talio, bario, gastrografina, agentes a base de yodo.

Los marcadores detectables en diferentes materiales pueden ser iguales o diferentes, pueden tener las mismas, similares o diferentes frecuencias de excitación y/o emisión, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, un marcador detectable que marca las células puede ser igual o diferente de un marcador detectable en un dispositivo, injerto o depósito, lo que permite distinguir las diferentes sondas cuando se forman imágenes, no distinguirlas cuando se formen imágenes o una combinación de ambas cosas (por ejemplo, cuando, por ejemplo, se usan tres o más sondas de formación de imágenes).

En las realizaciones más preferidas, los materiales se marcan de forma detectable marcando las partículas magnéticas aplicadas como recubrimiento sobre los mismos o conjugadas con ellos.

En una realización particularmente preferida, las partículas se funcionalizan con yodo. El yodo puede conjugarse con una partícula magnética usando métodos convencionales, por ejemplo, reacciones de conjugación de carboxilo a amina analizadas anteriormente.

La presente invención se comprenderá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de stents magnetizados para el tratamiento de la reestenosis. Materiales y métodos

Síntesis de partículas de hierro/platino

La síntesis implica la reducción química simultánea de Pt(acac)₂ y Fe(acac)₃ por 1,2-hexadecanodiol a temperatura elevada (250 °C) en fase de solución. La síntesis se manipuló con técnicas convencionales sin aire en una atmósfera de argón. Los reactivos se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron sin purificación adicional. Una mezcla de 0,5 mmol de Pt(acac)₂, 1,0 mmol de Fe(acac)₃, y 1,2-hexadecanodiol (5,0 mmol) se añadió a un matraz europeo de 125 ml que contenía una barra de agitación magnética recubierta con PTFE. Después, se transfirió dioctil éter (30 ml) al matraz y el contenido se agitó mientras se purgaba con Ar durante 20 min a temperatura ambiente. Después, el matraz se calentó a 100 °C y se mantuvo a 100 °C durante 20 min. Durante esta espera, se inyectaron 0,05 mmol (0,17 ml) de oleilamina y 0,05 mmol (0,16 ml) de ácido oleico en el matraz mientras continuaba la purga de Ar. Después de la espera de 20 min, la mezcla se mantuvo en una manta de Ar y se calentó a 250 °C a una velocidad de aproximadamente 7 °C por minuto (reflujo). El matraz se mantuvo a esta temperatura durante 30 min antes de enfriarse a temperatura ambiente en la manta de Ar. Después, toda la manipulación se realizó abierta a la atmósfera.

Para la purificación, se añadieron 5 ml de la dispersión extraída del matraz a 20 ml de alcohol etílico (EtOH) y la mezcla se centrifugó (3400 rpm durante 15 min). El sobrenadante se desechó y el precipitado se volvió a dispersar en 10 ml de hexano y 5 ml de EtOH. Podría añadirse una pequeña cantidad adicional de oleilamina y ácido oleico para ayudar a volver a dispersar las partículas. Esta dispersión se centrifugó durante 15 min a 3400 rpm. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga, desechando cualquier precipitado que se separase. Se añadieron 15 ml adicionales de EtOH a esta dispersión y la mezcla se centrifugó de nuevo. El sobrenadante se desechó y el precipitado de color pardo oscuro restante se volvió a dispersar en hexano o se secó para su almacenamiento.

Las partículas de Fe/Pt se recubrieron con SiO₂ por formación de sílice catalizada por una base a partir de tetraetilortosilicato en una microemulsión de agua en aceite con el fin de reducir la agregación térmica de las partículas de Fe/Pt durante el recocido a temperatura elevada. Se mezcló Igepal CO-520 (8 ml) con 170 ml de ciclohexano en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y la mezcla se agitó. Las partículas de Fe/Pt se dispersaron en ciclohexano a una concentración de 1 mg/ml y después se inyectaron en la solución de ciclohexano/Igepal. Después se añadieron gota a gota aproximadamente 1,3 ml de una solución acuosa de NH₄OH al 30 % y la mezcla se agitó durante 2-3 min, seguido de la adición de 1,5 ml de tetraetilortosilicato (TEOS). La mezcla se agitó durante 72 h antes de añadir metanol para recoger las partículas. Las partículas se precipitaron con hexano en exceso y se recogieron por centrifugación. Las partículas se volvieron a dispersar en etanol. El Fe/Pt en SiO₂ se "lavó" usando este procedimiento al menos tres veces para retirar el exceso de tensioactivo.

Las partículas de Fe/Pt en SiO₂ se recocieron en un horno de tubo. Las partículas se fundieron por goteo sobre una oblea de Si, se colocaron en un tubo de cuarzo de 2,54 (1 pulgada) de diámetro y después se colocaron en el horno de tubo. El recocido se realizó purgando el tubo y la muestra durante 30 min con flujo de H₂ al 7 %/N₂ al 93 % a 700 °C. Las muestras recocidas en aire no se purgaron. Las muestras se recocieron a las temperaturas publicadas

durante 1 h. Después del recocido, se retiró el recubrimiento de SiO_2 tratando las partículas con una solución de HF al 1 % durante 5 min.

La Figura 1 es un diagrama que ilustra el método general ejemplificado de preparación de partículas de Fe/Pt.

Recubrimiento de stent polimérico con partículas de Fe/Pt incrustadas

Se recubrieron por pulverización stents de diversos tamaños con partículas de Fe/Pt dispersas en polímero de PLLA o PLGA.

Resultados

Se diseñaron stents biodegradables/magnetizables para servir como plataforma para atraer y/o capturar células progenitoras que se marcan *in vitro* con partículas de hierro. Una aplicación para esta tecnología es el tratamiento/prevenición de la reestenosis. El diseño del stent incluye un recubrimiento con polímeros degradables tales como poli(ácido láctico) (PLA) o ácido poliglicólico (PGA) o copolímeros, lo que permite la magnetización del stent mediante la incrustación de nanocompuestos de hierro/platino en la capa polimérica.

Por tanto, los materiales se ensamblaron como un núcleo de aleación de magnesio recubierto con el polímero degradable, lo que permitió la incorporación de partículas magnetizables en la estructura del stent para conseguir las propiedades magnéticas y el rendimiento de degradación requeridos, además de las funciones habituales del stent.

Los estudios adicionales se centraron en la selección de la aleación de magnesio adecuada del recubrimiento polimérico del stent. Los polímeros biodegradables, tales como los poliésteres, son muy adecuados para este fin. El recubrimiento de poli-L-lactida (PLLA) es el más preferido para facilitar la incorporación de las partículas magnetizables ya que permite la adición de un 19,92 % en peso de partículas de hierro en el recubrimiento del stent, lo que debería ser suficiente para la inducción de una magnetización en el stent para la atracción de células en diversas condiciones de flujo.

El trabajo de desarrollo inicial se realizó usando solamente partículas de óxido de hierro, sin embargo, incluso si la magnetización inicial de las partículas de óxido de hierro fuera lo suficientemente fuerte y la concentración dentro del recubrimiento de PLLA fuera lo suficientemente elevada, se descubrió durante los experimentos *in vitro* y los cálculos que el magnetismo retenido de dichas partículas puede ser insuficiente, en determinadas circunstancias, para ser útil para tratar/prevenir la reestenosis. Estas partículas superparamagnéticas demostraron ser inadecuadas para la magnetización del stent a medio o largo plazo. La magnetización que quedó en los stents cargados con partículas se redujo rápidamente después de la retirada de un campo magnético externo. Puesto que es necesario un período de magnetización más largo después de la retirada del campo magnético, se desarrolló una segunda generación de partículas basándose en Fe/Pt. Estas partículas tienen una retención magnética suficiente de al menos 60 días, lo que es beneficioso para la atracción de células progenitoras (PC) marcadas al stent después de la implantación. El stent también puede volver a magnetizarse usando un escáner de IRM de 1,5 T *in situ* si surge la necesidad. Estas partículas mantienen un campo magnético durante al menos 60 días después de la magnetización en un imán de 1,5 T durante 24 horas.

Las Figuras 2A, 2B y 2C ilustran las propiedades de las partículas de Fe/Pt.

La dispersión de luz dinámica de las partículas de Fe/Pt después del recubrimiento con sílice y el recocido mostró un diámetro medio de 180 nm. La dispersión de luz dinámica de las partículas de Fe/Pt se realizó antes del recubrimiento con sílice y el recocido. El diámetro medio fue de 7 nm.

Se observó directamente la composición de Fe y Pt en las partículas. La microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM, por sus siglas en inglés) de partículas de Fe/Pt mostró la composición de Fe:Pt por partícula. Se usó tomografía de STEM de campo oscuro anular de ángulo elevado (HAADF, por sus siglas en inglés) con plasma acoplado inductivamente (ICP, por sus siglas en inglés). La relación molar de composición promedio de Fe con respecto a Pt estaba en el intervalo de 40:60 +/- 5:5 % en moles.

Se observó directamente la estructura cristalina de rayos X de las partículas de Fe/Pt. Las partículas recocidas a 700 °C durante diferentes períodos de tiempo se montaron y se expusieron a rayos X monocromáticos para observar la composición cristalina. El aumento de tiempos condujo a un aumento en la fase de estructura cristalina ordenada $L1_0$.

Se realizó la medición del dispositivo de interferencia cuántica superconductora (SQUID, por sus siglas en inglés) de Fe/Pt (ferromagnético) en comparación con nanopartículas de Fe_3O_4 (superparamagnéticas). Un campo magnético externo fue capaz de magnetizar las partículas, de manera similar a las partículas superparamagnéticas. Sin embargo, la susceptibilidad magnética de Fe/Pt fue muy superior a la del óxido de hierro superparamagnético (Fe_3O_4) solo como lo demuestra la histéresis en la curva de magnetización de Fe/Pt frente a la del Fe_3O_4 . Se muestran los bucles de histéresis en el plano para las muestras fabricadas (Figura 2A). La coercitividad de la

muestra indica una anisotropía magnetocristalina elevada de la fase fct Fe/Pt.

Se realizó un análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) de partículas de Fe/Pt. El TGA de Fe/Pt muestra la transición y la formación de agregados cristalinos. El recubrimiento orgánico se retiró de las partículas (4-10 nm) durante las etapas de recocido seguido de la agregación de partículas. Estas etapas confirmaron la transición del material de partículas recubiertas estabilizadas a agregados de aleación cristalizada con un tamaño mayor (100-300 nm)

Los stents se recubrieron con partículas de Fe/Pt cargadas con polímero. El polímero (poli(L-lactida) se disuelve en diclorometano o acetato de etilo y las partículas de Fe/Pt se electro-nebulizan sobre la superficie del stent. Después de la evaporación del disolvente y el endurecimiento de la mezcla de polímero/Fe/Pt, el stent se magnetiza en un imán de 4 T durante 24 horas para inducir un campo magnético permanente. Dado que el recubrimiento polimérico contiene partículas de Fe/Pt, pueden incorporarse agentes adicionales en el recubrimiento, tales como fármacos o agentes de formación de imágenes hidrófobos.

La formación de stents magnetizables puede realizarse como se indica a continuación: Los lípidos o ácidos grasos facilitan la encapsulación y la retención potenciadas de partículas de Fe/Pt en el recubrimiento polimérico. Los stents de Mg recubiertos con polímero se convierten en imanes permanentes después de la exposición a un campo magnético fuerte.

En los experimentos de recubrimiento utilizando Mg60 (espesor del puntal de magnesio de 60 µm) y Mg80 (espesor del puntal de magnesio de 80 µm) se consiguieron recubrimientos de PLLA y PLGA de 60 µm y 40 µm de espesor. Fue posible incrustar el 5-20 % en peso de partículas de Fe/Pt en un recubrimiento de 60 µm de espesor consiguiendo un campo magnético en el intervalo de 0,05-0,3 T.

Se recogieron datos sobre lo siguiente:

Inspección visual de los stents desnudos y recubiertos antes del plegado;

Medición del espesor del puntal y el ancho del puntal;

Evaluación de la capacidad de plegado;

Medición del perfil de plegado;

Expansión a presión nominal y presión de estallido calculada (RBP, por sus siglas en inglés) con un catéter de globo convencional (2,75 mm x 20 mm); Inspección visual con respecto a cualesquier grietas o escamas del recubrimiento, así como roturas en los puntales del stent después de la expansión; Medición del acortamiento del stent;

Medida del retroceso del stent;

Medición de la resistencia radial y la fuerza de deformación (método de medición convencional por placas);

Expansión adicional en un catéter de 4,0 mm a su presión nominal. Inspección visual con respecto a cualesquier grietas o escamas del recubrimiento, así como roturas en los puntales del stent después de la expansión adicional a la presión nominal;

Expansión adicional en un catéter de 4,0 mm hasta su presión de estallido calculada RBP; e

Inspección visual con respecto a cualesquier grietas o escamas del recubrimiento, así como roturas en los puntales del stent después de la expansión adicional a RBP.

Tabla 1: Resultados del ensayo del stent magnético:

N.º de muestra	Mg125 Stent	Stent Mg80	Mg80GA40	Mg80LA40	Stent Mg60	Mg60GA60	Mg60LA60	Mg60LA60NP
Tamaño (mm)	2,75x20,0	2,75x20,0	2,75x20,0	2,75x20,0	2,75x20,0	2,75x20,0	2,75x20,0	2,75x20,0
Lote/N.º de Stent	166500,3	168776,1	Mg80-012	Mg80-002	168775,1	Mg60-014	Mg60-003	Mg60-009
Lote	124604	124604	124604	124604	124604	124604	124604	124604
Diseño	QM836-19	QM839-18	Stent Mg80 recubierto	Stent Mg80 recubierto	QM839-18	Stent Mg60 recubierto	Stent Mg60 recubierto	Stent Mg60NP recubierto
Longitud del stent primario [mm]	19,03	17,70	17,24	17,70	17,70	17,70	17,92	17,70
Longitud del stent expandido [mm]	19,01	17,68	17,24	17,70	17,66	17,69	17,81	17,70
Perfil de plegado [mm]	1,13	0,95	1,02	1,04	0,96	1,04	0,97	1,04
Stent abierto a [kPa (bar)]	<=100 (1)	<=100 (1)	<=100 (1)	<=100 (1)	<=100 (1)	<=100 (1)	<=100 (1)	<=100 (1)
Expansión a presión nominal (900 kPa (9 bar))	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado
Expansión a RBP(1800 kPa (18 bar))	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado
Recubrimiento			PLGA	PLLA		PLGA	PLLA	PLLA con partículas de hierro
Intervalo de retroceso de...a..	3,461 -> 3,152	3,566 -> 3,385	3,647 -> 3,437	3,537 -> 3,307	3,450 -> 3,254	3,543 -> 3,176	3,526 -> 3,317	3,265 -> 3,256
% de Retroceso	8,93	5,08	5,76	6,50	5,68	10,36	5,93	0,28
Resistencia radial F(máx) mN	1552	341	505	589	130	301	307	336
% de Deformación radial consistente	13,61	19,93	15,53	9,42	25,89	9,93	7,08	7,99
Espesor del puntal (EP, objetivo) [µm]	125 µm	80 µm	120 µm	120 µm	60	120 µm	120 µm	120 µm
Espesor del puntal (EP, medido) [µm]	133,94	64,34	136 [c]	62,46	50,52	110,88 [c]	118,65 [c]	129,86 [c]
Ancho del puntal (AP, medido) [µm]	123,86	82,59	92,74	85,17	62,90	111,13 [c]	115,42 [c]	118,01 [c]
Expansión a presión nominal (900 kPa (9 bar))	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado	aprobado
Expansión a RBP(1600 kPa (16 bar))	suspension	aprobado	aprobado	Suspension	aprobado	suspension	aprobado	aprobado

Basándose en los resultados de ensayo en una gama de stents, Se cree que los stents pueden conseguir una configuración final que tenga propiedades adecuadas para funcionar adecuadamente *in vivo*. Un stent preferido es el stent Mg120 (espesor del puntal de aleación de magnesio de 120 µm) recubierto con un recubrimiento de PLLA de 40 µm que contiene partículas de Fe/Pt hasta aproximadamente el 20 % en peso.

Ejemplo 2: Las células magnetizadas se retienen en stents magnetizados *in vitro*

Materiales y métodos

Liberación de colorante

La estabilidad de recubrimiento de la capa polimérica en presencia de partículas de Fe/Pt, partículas de dendrímero yodado (DI) o ambas se estudió midiendo la liberación de colorante. Se disolvió rodamin B (al 1 % en peso) en la solución en cloroformo de PLA y se añadieron las partículas a la solución. Las soluciones con o sin partículas se vertieron sobre los cubreobjetos y se secaron durante la noche. Los cubreobjetos se incubaron en PBS a 37 °C y se extrajo PBS (1 ml) para medir el colorante liberado en los puntos temporales deseados.

Aclaramiento corporal

Se prepararon partículas de PLGA que encapsulaban el colorante DiR ((Yoduro de 1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-Tetrametilindotricarboianina), Life Technologies) y/o Fe/Pt con un método de emulsión típico. En resumen, se disolvieron PLGA (75 mg), Fe/Pt (25 mg) y colorante diR (1 mg) en cloroformo y después se añadieron gota a gota a alcohol polivinílico al 5 % (PVA). La mezcla se sometió a ultrasonidos tres veces y después se añadió a una solución de PVA al 0,2 %. El disolvente se evaporó durante 2 h con agitación y las partículas de PLGA se centrifugaron antes de la liofilización. Se administraron partículas de PLGA (48 mg/kg) que contenían 12 mg de Fe/Pt en PBS (250 µl) por vía intraperitoneal en ratones y se escanearon con Bruker después de 8 h, 1 d, 2 d, 4 d, 7 d y 10 d. Los ratones se sacrificaron para tomar muestras de la sangre y los órganos y se midió la fluorescencia (ex 740 nm, em 790 nm).

Toxicología

Se realizaron estudios de toxicidad aguda en ratones hembra C57BL/6 de 10 semanas de edad. Se dosificó a los ratones con los grupos de tratamiento indicados el día 0. Se midieron concentraciones séricas de ALKP, ALT, tBIL y BUN usando reactivos de Teco Diagnostics los días 1, 7 y 14. Los ratones C57BL/6 recibieron 3 dosis diferentes de partículas y se compararon con un grupo de PBS. Las analíticas clínicas séricas estuvieron dentro del intervalo fisiológico normal para la fosfatasa alcalina (62-209 UI/L), la alanina transferasa (28-152 UI/L), la bilirrubina total (0,1-0,9 mg/dl) y el nitrógeno ureico en sangre (18-29 mg/dl). No se observó toxicidad hepática ni renal. Los intervalos de referencia fisiológicos de ratón son de *IDEXX VetTest Operator's Reference Manual* (2007). El tamaño de la muestra es n = 5 ratones por grupo. El peso corporal era normal. Se analizó sangre anticoagulada con EDTA para determinar la hematotoxicidad. Todas las mediciones de CBC estuvieron dentro del intervalo de referencia normal para leucocitos (1,8 - 10,7 K/µl), plaquetas (592 - 2971 K/µl) y hemoglobina (11,0 - 15,1 g/dl). Los intervalos de referencia de CBC de ratón son de *Drew Scientific Hemavet 950 Reference Ranges* (2010). El tamaño de la muestra es n = 5 ratones por grupo.

Para determinar los niveles de citocinas agudas que pueden inducirse como resultado del tratamiento, Se midieron el TNF-α, el IFN-γ y la IL-4 de macrófagos derivados de médula ósea (BMM, por sus siglas en inglés) 3 días después del tratamiento con partículas de 24 h en función de la concentración de partículas. La IL-4 se midió como representante para las posibles respuestas alérgicas y el TNF-α y el IFN-γ para las respuestas inflamatorias. Los grupos de partículas se compararon con el grupo de PBS (control negativo) así como con el grupo de lipopolisacáridos (LPS) (control positivo) en los niveles de citocinas. No se detectaron aumentos estadísticamente significativos de TNF-α e IL-4, y solo la partícula de dosis más alta (1 mg/ml) indujo más IFN-γ.

Los stents magnéticos se colocaron en un biorreactor (un dispositivo para analizar la dinámica de la atracción y la captura de células magnetizadas sobre un stent magnetizado en condiciones de flujo fisiológico en comparación con las observadas *in vivo*) en serie con stents no magnéticos comparables para evaluar la eficiencia de captura celular en función de los ciclos de circulación, la densidad en superficie de partículas de Fe/Pt, el caudal, el número de células de magnetita inyectadas. La magnetita y las células fluorescentes (células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés)) se prepararon incorporando partículas de PLGA encapsuladas con partículas de SPIO y un fluoróforo. Las partículas de PLGA se prepararon mediante un método de emulsión simple y se estabilizaron en la superficie con poli(alcohol vinílico) (PVA). Las partículas se incubaron con las células durante 1 h a 37 °C y se lavaron con PBS fresco. Las células con magnetitas se separaron magnéticamente y se usaron para los estudios de captura de células.

Resultados

Se desarrolló un sistema *in vitro* para someter a ensayo la capacidad de los stents magnetizados para retener células magnetizadas en condiciones de flujo vascular simulado.

Los stents utilizados para el estudio fueron Mg100 (espesor de puntal de magnesio de 100 μm , recubrimiento de PLLA de 40 μm) en el sistema *in vitro* en el que las células magnetizadas se hacen fluir a través del stent en diversos números y a diversos caudales. La retención de las células en el stent se midió en ensayos a corto plazo (minutos) (Figura 3A-3D) y ensayos a largo plazo (horas/días) (Figura 4A-4C).

El stent se convirtió en un imán permanente cuando se recubrió con partículas de Fe/Pt y se magnetizó en un escáner clínico de IRM de 4,7 T. Se incorporaron partículas de SPIO ($0,783 \pm 0,135$ mg/millón de células) en las células y no se observó ninguna citotoxicidad significativa. Cuando las células se hicieron pasar secuencialmente a través de stents no magnéticos y después stents magnéticos en el biorreactor, las células de magnetita se capturaron selectivamente principalmente en el stent magnético y no mucho en los stents de control. A la velocidad de flujo de 50 ml/min (flujo sanguíneo fisiológico normal en la arteria coronaria proximal), se atrajeron más de 47.000 células por mm^2 y el 10 % de las células se capturaron en la primera circulación. Las células se capturaron más eficientemente (4 veces) y rápidamente (10 veces) cuando el caudal se redujo a 25 ml/min. Una cantidad menor de partículas de Fe/Pt aplicadas en el stent reclutó menos células.

Ejemplo 3: Encapsulación de células magnetizadas en partículas de PLGA

Las células (tales como las células endoteliales, los macrófagos o las células progenitoras) pueden hacerse magnéticamente susceptibles mediante la incorporación intracelular de óxido de hierro o la unión a la superficie.

Materiales y métodos

Para facilitar la carga potenciada de óxido de hierro en las células, las partículas de PLGA se fabrican mediante el método de emulsión doble que encapsula una concentración elevada de óxido de hierro y un colorante (Cumarina 6). Se prepararon partículas de PLGA que encapsulaban óxido de hierro superparamagnético hidrófobo (SPIO) y se funcionalizaron en la superficie con avidina-ácido palmítico. En resumen, se disolvieron PLGA (107 mg) y SPIO hidrófobo (26 mg) en cloroformo (2 ml) y después se añadieron gota a gota a una solución agitada con formación de vórtice de PVA al 5 % (4 ml) y la mezcla resultante se sometió a ultrasonidos tres veces durante 10 s a una amplitud del 38 % (400 W). Después, la mezcla se añadió gota a gota a 100 ml de PVA al 0,2 % y se dejó en agitación durante 3 h para evaporar el disolvente. Las partículas se recogieron por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C y después se lavaron tres veces con agua desionizada. Las partículas se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su uso. Se prepararon partículas funcionalizadas en la superficie con avidina de manera idéntica con palmitato de avidina incorporado en la solución de PVA al 5 %. Se fabricaron partículas que encapsulaban Cumarina-6 y se funcionalizaron con avidina usando una variación de emulsión doble modificada de la técnica de agua-aceite-agua.

Se incubaron macrófagos o células endoteliales a (10^5) células por ml con 100 μg de partículas de PLGA que encapsulaban SPIO durante 1 h a 37 °C. Después, las células se lavaron y se sometieron a ensayo para determinar la susceptibilidad magnética usando un imán de neodimio de 1,27 cm (0,5 pulgadas).

Los stents magnéticos se fabricaron pulverizando una solución de poli(ácido L-láctico) (PLLA) y partículas de Fe/Pt sobre stents de Mg y después se magnetizaron en un imán de 4 T durante 24 horas. Las células de magnetita (macrófagos o HUVEC) se prepararon incorporando partículas de óxido de hierro superparamagnético (SPIO) y se marcaron con un fluoróforo. Se incorporaron partículas de SPIO ($0,783 \pm 0,135$ mg/millón de células) en las células y no se observó ninguna citotoxicidad a esta concentración. Los stents magnéticos se colocaron en un sistema de circulación de medios y se compararon con los stents no magnéticos con respecto a la capacidad de captura de células en función de: A) densidad en superficie de partículas de Fe/Pt, B) caudal, C) número de células de magnetita inyectadas. D) El stent se convirtió en un imán permanente cuando se recubrió con partículas de Fe/Pt, se capturaron selectivamente células marcadas con hierro principalmente en el stent magnético cuando las células se hicieron pasar secuencialmente a través de stents no magnéticos y después stents magnéticos en el sistema de flujo. A la velocidad de flujo de 50 ml/min (flujo sanguíneo en la arteria coronaria), se atrajeron más de 47000 células por mm^2 y el 10 % de las células se capturaron en la primera circulación. Las células se capturaron muy eficientemente (4 veces) y rápidamente (10 veces) cuando el caudal era tan lento como de 25 ml/min. Una cantidad menor de partículas de Fe/Pt aplicadas en el stent capturó menos células.

Se realizaron ensayos a largo plazo (2-72 h) de la repercusión de Fe/Pt conc. sobre la captura de células. Se realizó el mismo experimento excepto por que la circulación de células continuó durante 3 días (72 horas). La cantidad de células capturadas en el stent se cuantificó mediante microscopía de fluorescencia dado que las células marcadas estaban marcadas con fluorescencia. El número de células capturadas por área cuadrada en la superficie del stent se determinó usando un patrón que relacionaba los niveles de fluorescencia con el número de células.

La migración de células hacia el imán indicó una susceptibilidad a campos magnéticos pequeños en el intervalo (0,02 T a 0,05 T).

Ejemplo 4: Incorporación de TC/TCEFU de formación de imágenes no invasivas en la síntesis de partículas.

Con frecuencia se aplica formación de imágenes híbridas o multimodales, con el fin de aprovechar las ventajas únicas y complementarias de las modalidades de formación de imágenes individuales. Este enfoque de formación de imágenes híbrida no invasiva puede proporcionar información crítica sobre la ubicación del stent y la degradación del stent en combinación con la función fisiológica. El acceso a todo el potencial de esta técnica requiere la incorporación de agentes de contraste multimodales que potencian el proceso de formación de imágenes. Con ese objetivo, las partículas pueden convertirse en agentes de formación de imágenes para la formación de imágenes tanto por tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU) como por tomografía computarizada de rayos X (TC), lo que facilita la formación de imágenes por TCEFU de alta sensibilidad y por TC de alta resolución espacial.

Materiales y métodos

Las partículas sintetizadas con restos triyodados y quelados ^{99m}Tc , proporcionan una potenciación del contraste eficaz y simultánea tanto en TC como en TCEFU, respectivamente. Las partículas secas con aminas en superficie se disuelven en primer lugar en DMSO anhidro con agitación magnética en atmósfera de argón. Se activa ácido triyodobenzoico (TIBA) para la conjugación con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) (EDC). La reacción transcurrió durante 24 horas a 25 °C en una atmósfera de argón en ausencia de luz. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 10 volúmenes de agua desionizada y posteriormente se filtró con un sistema de filtración al vacío de PES de 0,22 μm . El filtrado se purificó en agua desionizada por ultrafiltración usando filtros MWCO 10K y se liofilizó. A continuación, esto se añadió a tampón de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9,0) a una concentración final de 10 mg/ml con agitación magnética. Después, se disolvieron cuatro equivalentes molares de ácido 2-(4-isotiocianatobencil)diethylentriaminopentaacético en DMSO anhidro y se añadieron. El pH de la mezcla de reacción se ajustó inmediatamente a 8,5 con NaOH 1N y la reacción transcurrió durante 18 horas a 25 °C en ausencia de luz. Después, el producto se purificó por ultrafiltración con agua desionizada usando filtros MWCO 10K y se liofilizó de nuevo. El producto final caracterizado es una partícula con concentración en superficie equimolar de quelante y yodo. Los grupos amina restantes en las partículas se acetilaron con acetato de N-hidroxisuccinimida. Por tanto, este producto es un agente de contraste de TC/TCEFU o TC/RM magnetizable y multimodal.

Se midió la captura a corto plazo (0-10 min) de células magnéticamente susceptibles mediante stents recubiertos con Fe/Pt: Los stents magnéticos se fabricaron pulverizando una solución de poli(ácido L-láctico) (PLLA) y partículas de Fe/Pt sobre stents de Mg y después se magnetizaron en un imán de 4 T durante 24 horas, como se ha analizado anteriormente. Se prepararon células endoteliales cargadas con magnetita mediante la incubación de partículas de óxido de hierro superparamagnético (SPIO), se marcaron con un fluoróforo con células durante 1 h a 37 °C, seguido de lavado celular y retirada del exceso de SPIO. Como se ha descrito anteriormente, los stents magnéticos se colocaron en un sistema de circulación de medio y se compararon con stents no magnéticos con respecto a la capacidad de captura de células en un período de tiempo muy corto (0-10 min).

Resultados

Se examinaron tres parámetros. A) Efecto de la densidad en superficie de las partículas de Fe/Pt. 5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ mostró una mayor eficiencia de captura en comparación con 2,5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ o stents blanco. B) caudal (se demostró que 50 ml/min potencia la captura en comparación con 25 ml/min), C) número de células de magnetita inyectadas. Un número de células de aportación más alto (10^6 en comparación con $0,3 \times 10^6$) mostró una mayor eficiencia de captura a 25 ml/min y 5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de Fe/Pt en el stent.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo médico recubierto con un polímero, en donde las partículas magnetizables están unidas al polímero o encapsuladas dentro del mismo, y en donde las partículas magnetizables son ferromagnéticas y comprenden una aleación de hierro y platino que tiene una fase cristalina L1₀.
5
2. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dispositivo es un dispositivo implantable.
3. Un dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde las partículas magnetizables están magnetizadas.
10
4. Un dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde las partículas magnetizables se han magnetizado de manera que retienen una fuerza magnética de 0,1 a 2,0 Tesla durante al menos 24 horas.
5. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la aleación puede obtenerse mediante un proceso que comprende recocer un material de partida que comprende partículas de hierro y platino, a una temperatura superior a 600 °C.
15
6. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la aleación puede obtenerse mediante un proceso que comprende recubrir las partículas de hierro y platino con una cubierta de sílice antes del recocido.
20
7. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la relación molar composicional promedio de Fe con respecto a Pt, está en el intervalo 40:60 +/- 10:10 % en moles.
8. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que se compone de un metal no magnetizable, tal como magnesio o una aleación de magnesio.
25
9. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el polímero es un polímero de poliéster seleccionado entre el grupo que consiste en poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(láctida-co-glicolida) (PLGA) y poli-L-láctida (PLLA).
30
10. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el recubrimiento polimérico comprende entre el 1 % y el 50 % inclusive de las partículas magnetizables en peso; opcionalmente en donde el recubrimiento polimérico comprende entre 5 % y 25 % en peso inclusive de las partículas magnetizables.
35
11. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el espesor del recubrimiento polimérico es de entre 1 µm y 1000 µm inclusive; o en donde el espesor del polímero es de entre 10 µm y 100 µm inclusive.
12. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que es un stent.
40
13. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que es bioabsorbible.
14. Un método de fabricación del dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende aplicar a un dispositivo partículas magnetizables dispersas en una solución, una suspensión o una emulsión de polímero, en donde las partículas magnetizables son ferromagnéticas y comprenden una aleación de hierro y platino que tiene una fase cristalina L1₀.
45
15. Un método para proporcionar un dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o un dispositivo fabricado de acuerdo con la reivindicación 14, en los que las partículas magnetizables se magnetizan, que comprende exponer el dispositivo recubierto con polímero a un campo magnético durante un período de tiempo suficiente para magnetizar las partículas magnetizables; opcionalmente en donde la magnetización se realiza usando un escáner clínico de IRM.
50
16. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, adaptado para su uso en el tratamiento o la prevención de una lesión vascular, preferentemente en donde la lesión vascular es reestenosis o trombosis temprana o tardía.
55
17. Un kit que comprende un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y células madre, células progenitoras, células endoteliales o células precursoras magnetizables o reactivos adecuados para la preparación de dichas células.
60
18. Un kit de acuerdo con la reivindicación 17, en donde las células madre, las células progenitoras, las células endoteliales o las células precursoras magnetizables o los reactivos adecuados para la preparación de dichas células comprenden partículas magnetizables, y en donde dichas partículas magnetizables son ferromagnéticas y comprenden una aleación de hierro y platino que tiene una fase cristalina L1₀.
65

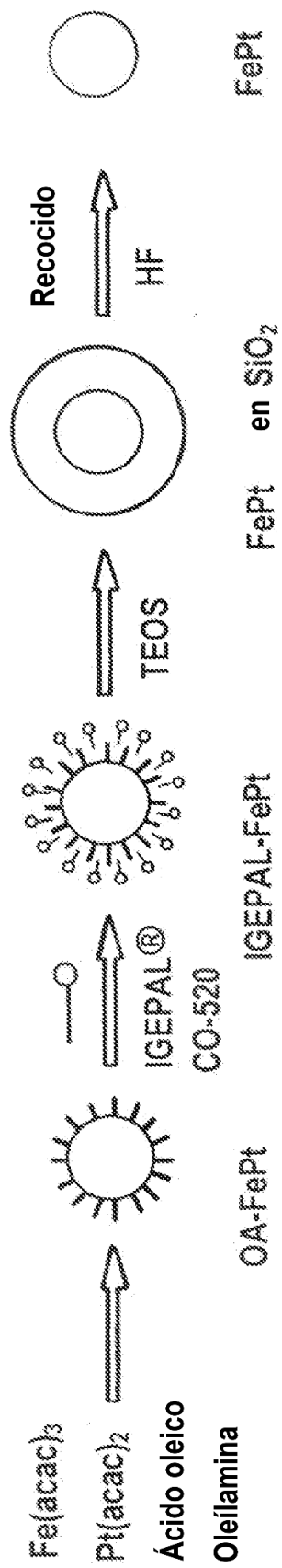


FIG. 1

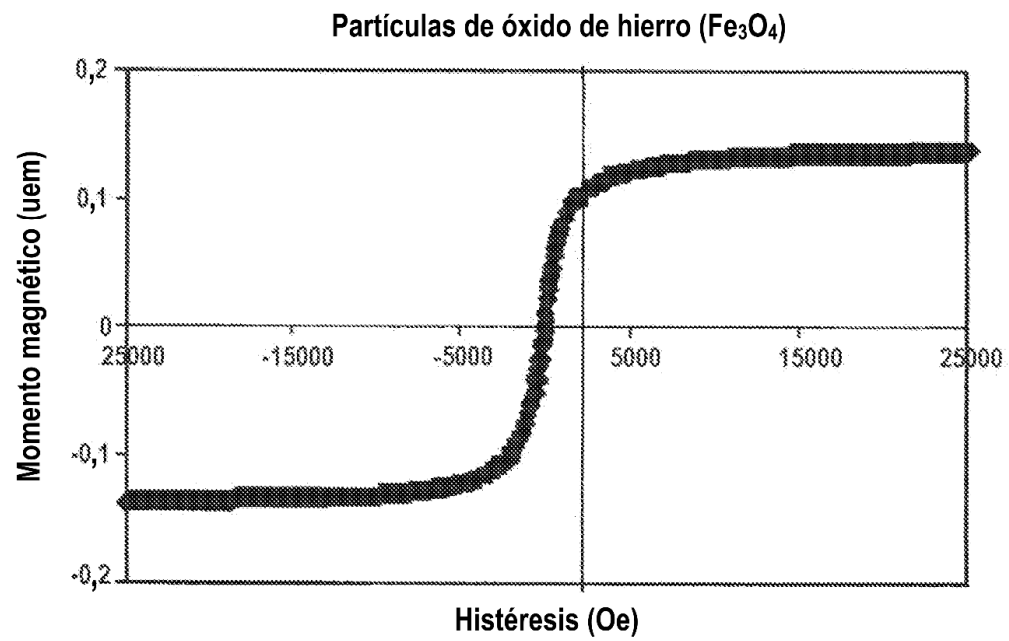
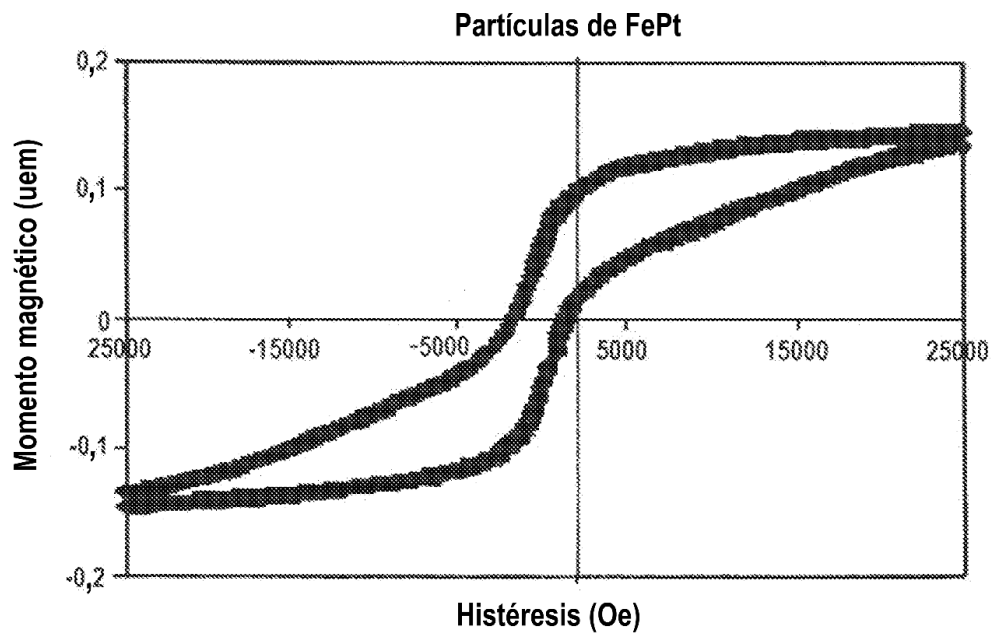


FIG. 2

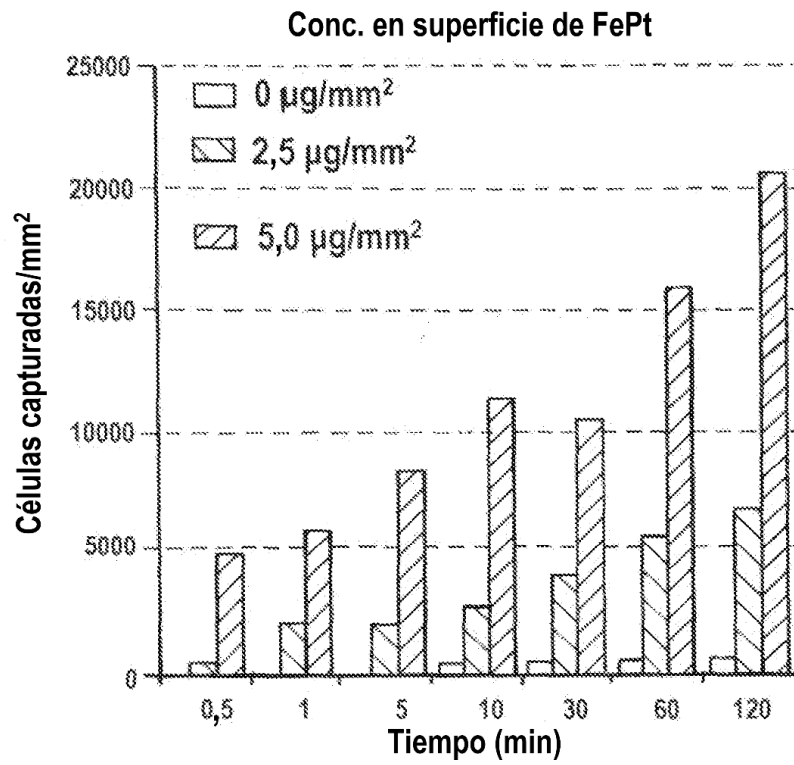


FIG. 3A

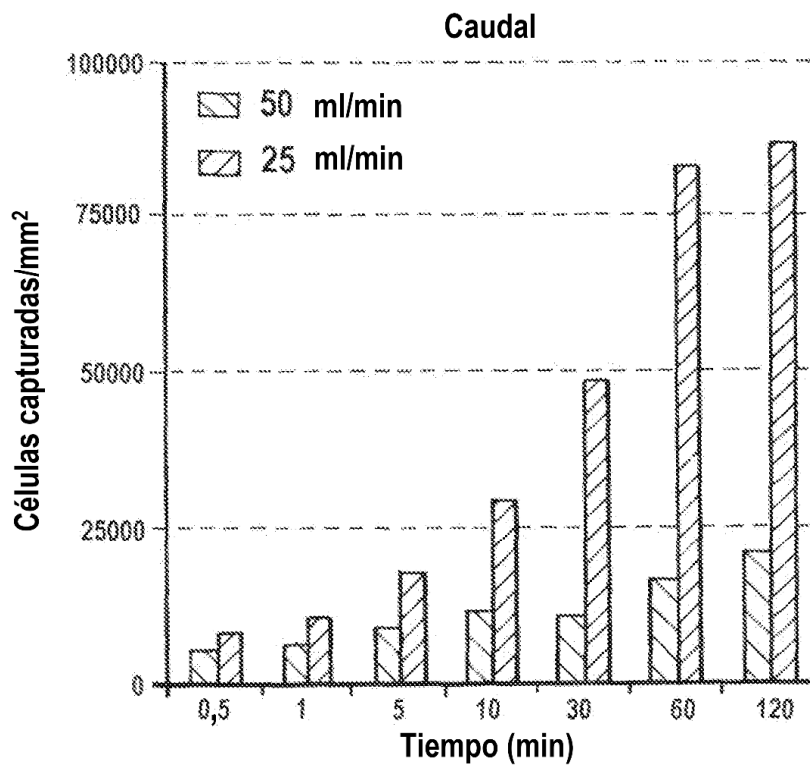
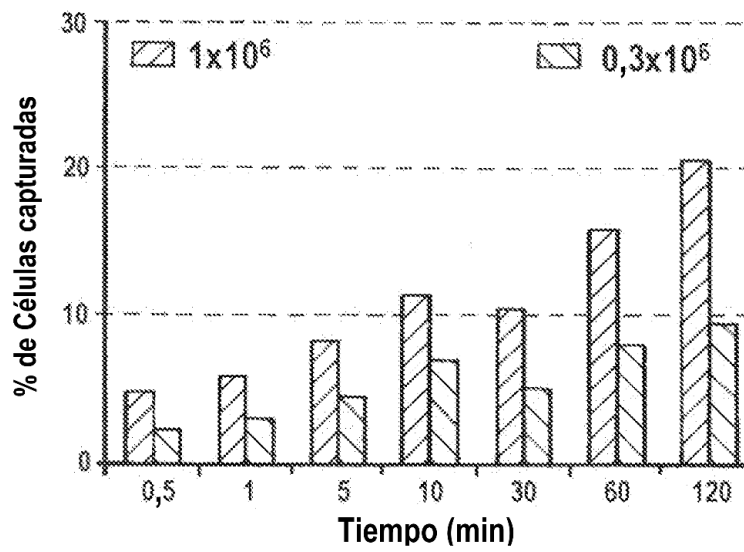


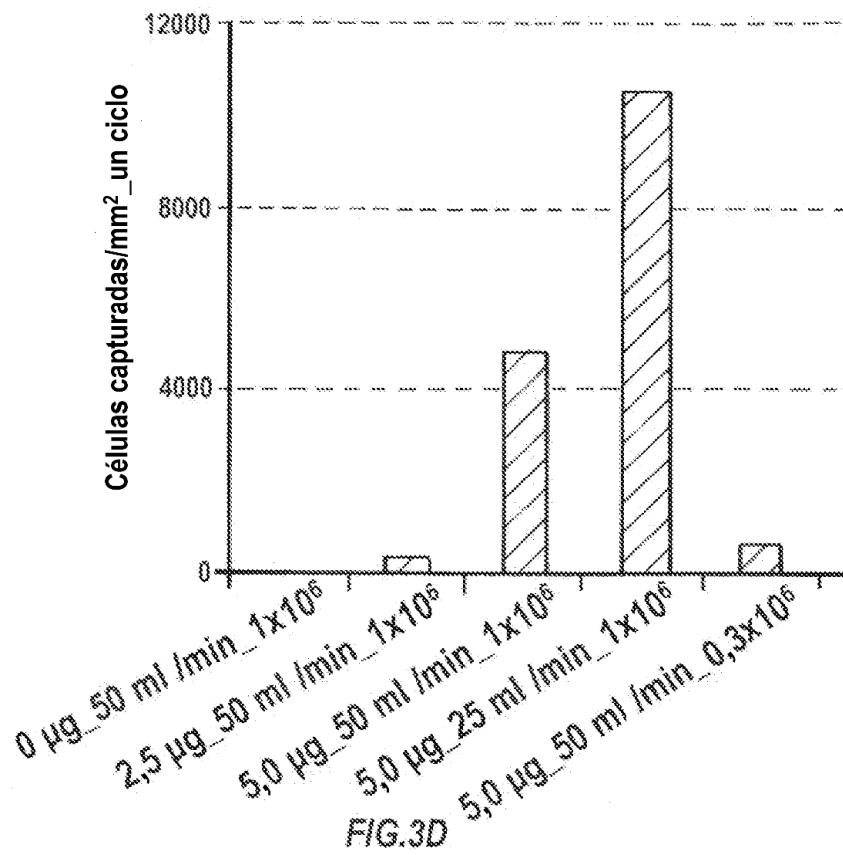
FIG. 3B

Número de aportación de células



0,783 ± 0,135 mg de SPIO en 1x10⁸ células

FIG. 3C



Conc. en superficie de FePt

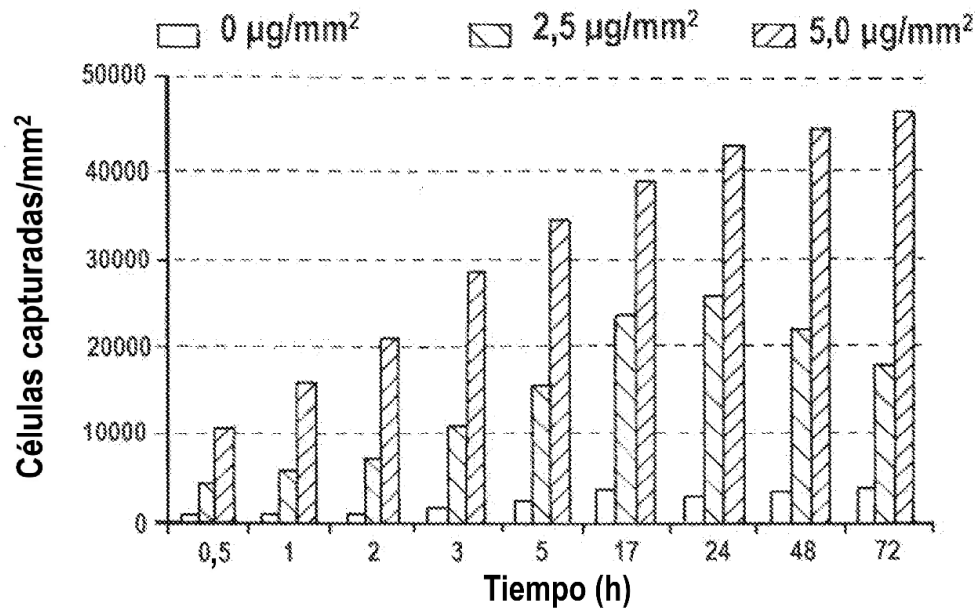


FIG. 4A

Caudal

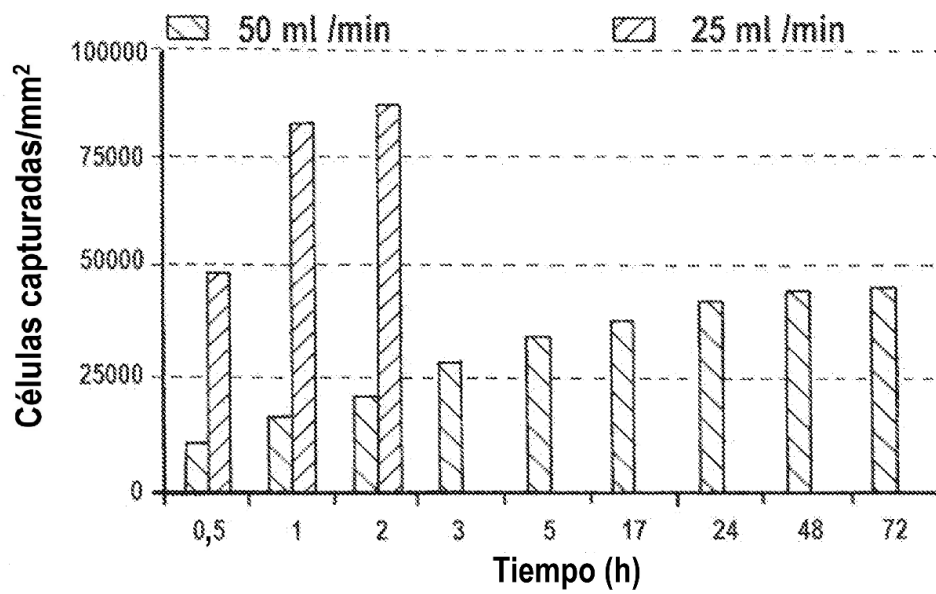


FIG. 4B

Número de aportación de células

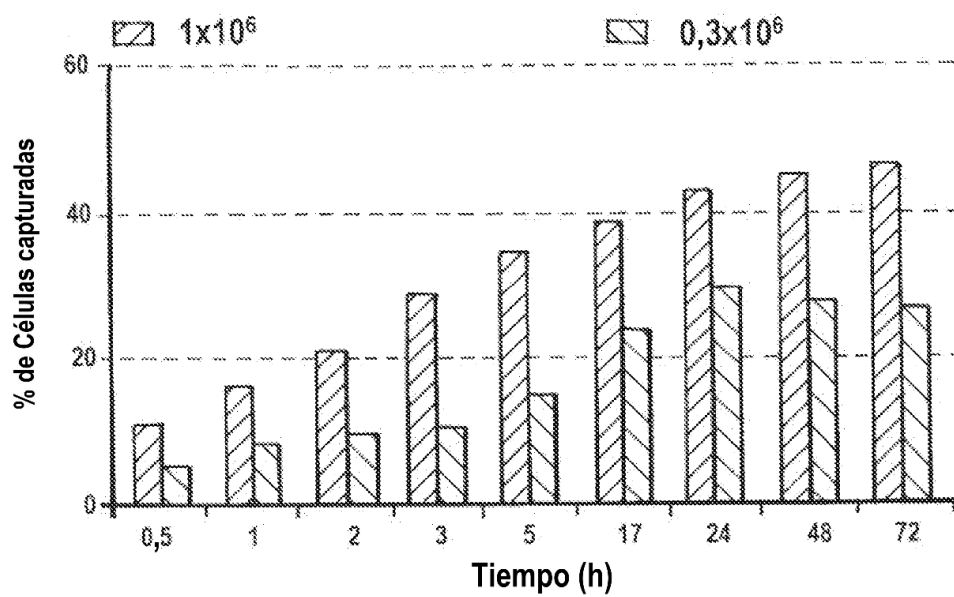


FIG. 4C