

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 309**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2012 PCT/FR2012/050610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12127175**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2012 E 12717367 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2688880**

54 Título: **Complejos metálicos dinucleares injertados, y su uso como sensores de micropartículas celulares**

30 Prioridad:

**23.03.2011 FR 1100873**

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

**03.06.2019**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

**3, rue Michel-Ange**

**75016 Paris, FR;**

**UNIVERSITÉ DE CAEN BASSE NORMANDIE  
(33.3%) y**

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BELLE, CATHERINE;**

**GELLON, GISÈLE;**

**PLAWINSKI, LAURENT;**

**DOEUVRE, LOÏC y**

**ANGLES CANO, EDUARDO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 715 309 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

Complejos metálicos dinucleares injertados, y su uso como sensores de micropartículas celulares

5 La invención se refiere a nuevos complejos metálicos dinucleares injertados y su uso como sensores en un método de detección y/o caracterización de micropartículas celulares en medio soportado (o heterogéneo) o en solución.

Las expresiones « micropartícula celular » o « microvesícula celular » se pueden usar indistintamente. Por comodidad, en lo sucesivo en la descripción se usará el término « micropartícula » o « micropartícula celular ».

10 Las micropartículas celulares son microvesículas membranas liberadas en los fluidos biológicos durante la activación de las células, o durante la apoptosis, en el transcurso de estados patológicos variados, entre los cuales se encuentran la inflamación o enfermedades asociadas a la alteración de la función vascular.

15 Estas micropartículas se liberan en el espacio extracelular después de una remodelación de la membrana celular, exponiendo de ese modo, en el estrato externo, la fosfatidilserina, normalmente presente en el estrato interno, así como otros marcadores de identidad de su origen celular.

20 Las micropartículas celulares tienen un tamaño inferior al micrómetro (0,1-1  $\mu\text{m}$ ). Aunque están presentes en los fluidos biológicos corporales, en particular en la sangre circulante, de sujetos sanos, su presencia en tasa elevada está asociada a diversas patologías trombóticas, inflamatorias o metabólicas y en el cáncer. Además del cáncer, estas patologías son numerosas y van desde la diabetes y sus complicaciones vasculares en las enfermedades inflamatorias, incluyendo la aterosclerosis. Se trata, en particular, de las enfermedades cardiovasculares con aumento del riesgo trombótico o incluso de los accidentes isquémicos neurovasculares.

25 Las micropartículas celulares por lo tanto se pueden considerar marcadores precoces que permiten diagnosticar y evaluar el riesgo del desarrollo de diversas patologías, en particular trombóticas, inflamatorias y/o metabólicas, y permitir de ese modo el seguimiento terapéutico.

30 Los accidentes neurovasculares y las enfermedades o exclusivas cardiovasculares constituyen, justo después del cáncer, causas principales de morbilidad y de mortalidad. Estas patologías conllevan, en Europa y en Estados Unidos, gastos importantes en materia social y económica y en términos de sanidad pública.

35 Estos accidentes oclusivos son el resultado de un trombo formado *in situ* o de una embolia. La formación de un trombo oclusivo se ha asociado a un defecto de fibrinólisis localizada. Sin embargo, a pesar de este contexto fisiopatológico, en la actualidad no se dispone de metodología fiable para evaluar la actividad fibrinolítica en el espacio intravascular que permita la evaluación de los riesgos y la prevención.

40 Varios estudios han mostrado que las concentraciones elevadas de micropartículas celulares tenían un buen valor de pronóstico.

45 Se han establecido métodos de detección. Entre las varias técnicas disponibles figuran la citometría de flujo, que es la que se usa en mayor medida. Este método permite parcialmente el fenotipado y la cuantificación parcial de las micropartículas celulares con la ayuda de perlas de calibración. Este método aprovecha la afinidad de la fosfatidilserina con la anexina A5, una proteína celular. Más generalmente, se usan anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos expuestos sobre sus membranas.

50 Las micropartículas celulares se pueden detectar en particular mediante medición de la fluorescencia emitida por la anexina A5 o por anticuerpos marcados con un compuesto fluorescente.

Sin embargo la sensibilidad de este método nos permite la identificación de micropartículas celulares de tamaño inferior a 500 nm.

55 La anexina A5 también se usa en un ensayo de "capturaba/cuantificación" en el que las micropartículas celulares que exponen la fosfatidilserina son capturadas por el intermediario de la anexina A5 inmovilizada en la superficie de pocillos de placas de microtitulación (ensayo desarrollado por la compañía Hyphen Biomed).

60 Sin embargo esta técnica no permite obtener el fenotipo y el reparto de los elementos. Además, su realización es pesada y depende de numerosos factores experimentales. La captura de las micropartículas celulares por la anexina A5 es muy dependiente de los iones cálcicos y es muy sensible a las variaciones experimentales (proteólisis, interacciones con diversos ligandos, etc.).

65 El artículo de Kwon *et al.*, Chem. Eur. J., 2008, 14, 9613-9619 describe la detección selectiva de un nucleótido particular, la timidina 5'-trifosfato (TTP).

Esta detección se realiza con un sistema dador / aceptor en el que se detecta un aumento de la fluorescencia debido a la unión de la unidad de timina del TTP con, por una parte, un complejo de cinc (mCP-Zn<sup>2+</sup> -ciclono) que sirve de dador y, por otra parte, un compuesto trinuclear 2 que comprende un motivo del complejo de iridio (motivo aceptor) y el motivo de complejo de cinc.

5 Por lo tanto, las técnicas de detección disponibles carecen de precisión y de sensibilidad. Además, a menudo son de coste muy elevado.

10 Por lo tanto se busca poder detectar, cuantificar y caracterizar, en particular formar fenotipos, de manera precisa y estandarizada de las micropartículas celulares en los fluidos biológicos.

15 Por « fluido biológico » se hace referencia a todo líquido corporal extraíble entre los cuales, por ejemplo, se encuentra la sangre, del plasma sanguíneo, el líquido cefalorraquídeo, el líquido bronco-alveolar, la orina, el líquido sinovial, la leche materna, la saliva, las lágrimas, el líquido seminal, los líquidos de ascitis, el líquido amniótico y los derrames (pleural u otros).

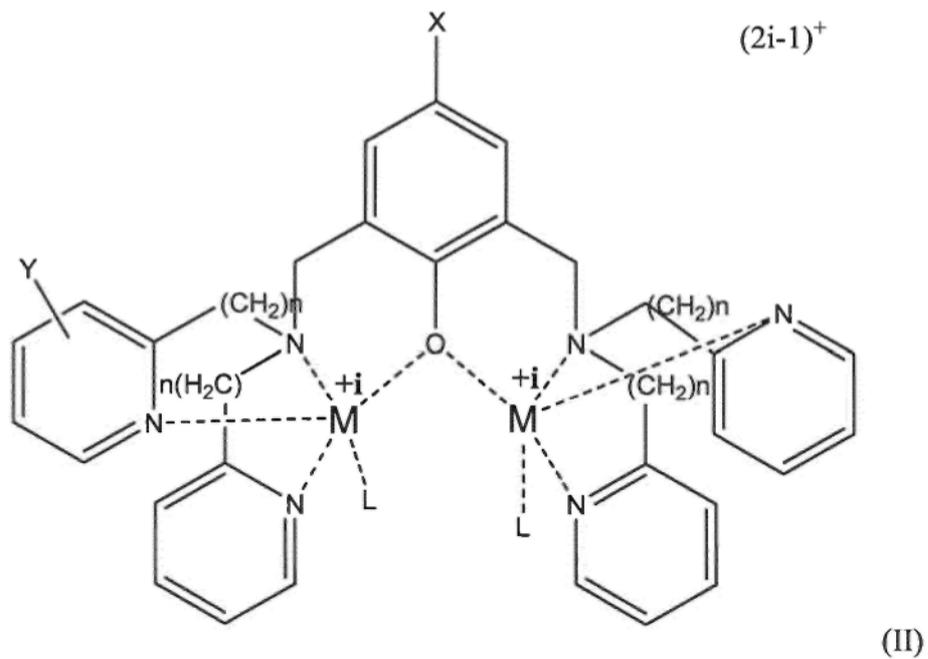
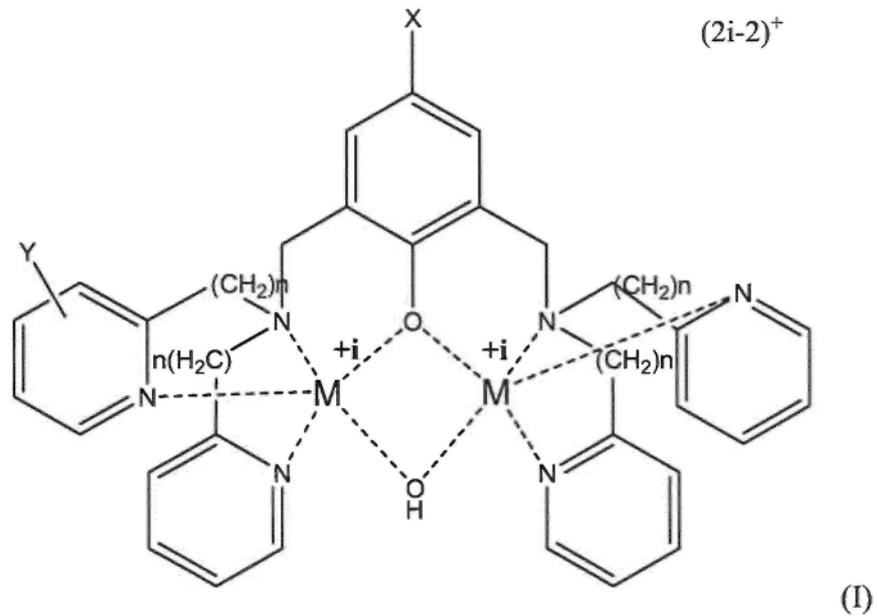
Los inventores han desarrollado en la actualidad un método de detección y/o caracterización en el que las micropartículas celulares son captadas por un ligando sintético.

20 El método de acuerdo con la invención permite la detección y/o la caracterización de las micropartículas celulares sea cual sea su tamaño. Además, el uso de un ligando sintético permite evitar los inconvenientes relacionados con el uso de una molécula biológica, tales como, por ejemplo, la interferencia con otros ligandos, en particular anticuerpos, la proteólisis o incluso la sensibilidad al calcio.

25 De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere por lo tanto a complejos metálicos dinucleares injertados susceptibles de reconocer y fijar de forma específica la fosfatidilserina externalizada en la superficie de las micropartículas.

30 En lo sucesivo en la descripción, la expresión « complejos metálicos dinucleares injertados » o « sensores » se usará indistintamente para definir los compuestos de fórmula (I) o (II) que siguen a continuación.

Por lo tanto la invención tiene como objeto un compuesto de las siguientes fórmulas (I) o de fórmula (II):



en las que

- 5
- $M^{+i}$  representa un ion metálico e  $i$  es 1, 2 o 3
  - L representa un ligando intercambiable
  - X representa un grupo  $-(CH_2)_m-NH-A$ , o un grupo  $-CH_2-NHC(O)-R-NH-A$  en el que R es un grupo alquilo en C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, de preferencia en C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, lineal o ramificado y A es H o un grupo fluoróforo
  - $m = 1$  a 12

10

  - $n = 1, 2$  o 3
  - $i$  representa la carga del metal y es 1, 2 o 3
  - Y representa  $(CH_2)_p-NH_2$  en el que  $p = 0$  a 12.

De preferencia, M se elige entre Zn, Cu, Mn, Co, Ni y Fe, Zn o Cu siendo preferentes.

15 En solución acuosa, los compuestos de fórmula (I) y (II) pueden estar en equilibrio, en función del pH del medio. Por ejemplo para  $X = CH_3$ ,  $n = 1$  y  $M = Cu$  o  $Zn$ , se observa que a pH fisiológico, las dos especies están presentes.

Se trata de compuestos catiónicos en los que el contraión se puede elegir, por ejemplo, entre los aniones tosilato, nitrato, sulfato, sulfonato, tiosulfato, halogenuro, hexafluorofosfato, tetrafenilborato, tetrafluoroborato, etc.

5 Par « ligando intercambiable », se hace referencia a una molécula que interactúa de manera débil con los iones metálicos y que está disponible para el intercambio con la solución del entorno, tal como por ejemplo una molécula de disolvente, en particular una molécula de H<sub>2</sub>O o de otro disolvente tal como, por ejemplo acetonitrilo, o incluso una molécula disuelta en el disolvente.

10 En efecto, las moléculas presentes en la solución pueden tener una afinidad hacia un ion metálico dado, lo que se traduce en efectos competitivos a nivel de los ligandos intercambiables.

15 En lo sucesivo en la descripción, por « ligando » se hará referencia a la parte dinuclear del compuesto de fórmula (I) o (II) antes de formar complejos con el ion metálico, y por « complejo metálico dinuclear » o « sensor » se hace referencia a ligando que ha formado el complejo.

20 Los compuestos de fórmula (I) o (II) se pueden preparar adaptando los métodos que se describen en C. Belle *et al.*, Tetrahedron Letters, 1994, 35, 7019-7022, para la parte ligando, y en K. Selmeczi *et al.*, Chem. Eur. J., 2007, 13, 9093-9106, para lo que se refiere a la formación de complejos. El aislamiento del complejo final se adapta en función de la forma del compuesto obtenido, mediante técnicas habituales (precipitación opcional, recuperación de un polvo, de un aceite, etc.).

El método de preparación de los compuestos de fórmula (I) o (II) puede comprender en particular las siguientes etapas:

25 a) síntesis de un precursor de ligando cuya función amino, cuando A = H, está protegido por un grupo poder protector a partir de bis(2-piridilmetil)amina o BPA y de 2-[3,5-Bis(clorometil)-4-hidroxibencil]isoindol-1,3-di-ona, b) desprotección del ligando obtenido de ese modo, a continuación c) formación de complejos de este último por el ion metálico.

30 Como grupo protector del grupo funcional amino, se usará, por ejemplo, un grupo de ftalimido, terc-butiloxicarbonio (BOC), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetilo, tosilato o carbamato.

35 La BPA está disponible en el mercado y la 2-[3,5-Bis(clorometil)-4-hidroxibencil]isoindol-1,3-di-ona se describe en la publicación de M. Johansson *et al.*, Inorg. Chem. 2003, 42, 7502-7511.

La síntesis de un precursor de ligando cuya función amino está protegida con un grupo ftalimido a partir de la BPA y de 2-[3,5-Bis(clorometil)-4-hidroxibencil]isoindol-1,3-di-ona se puede realizar, por ejemplo, tal como se indica en los ejemplos 1 y 2.

40 El grupo X y/o el grupo Y, si existe(n), también denominado(s) « grupo colgante », se puede (pueden) injertar en la unidad fenol del ligando antes de la formación de complejos del ion metálico, es decir, en el esquema 1, partiendo del compuesto 4.

45 De acuerdo con un aspecto de invención, el grupo colgante injertado sobre la unidad fenol del complejo metálico dinuclear comprende un grupo fluoróforo, tal como, por ejemplo, ficoeritrina (PE) o fluoresceína, en particular isotiocianato de fluoresceína (FITC).

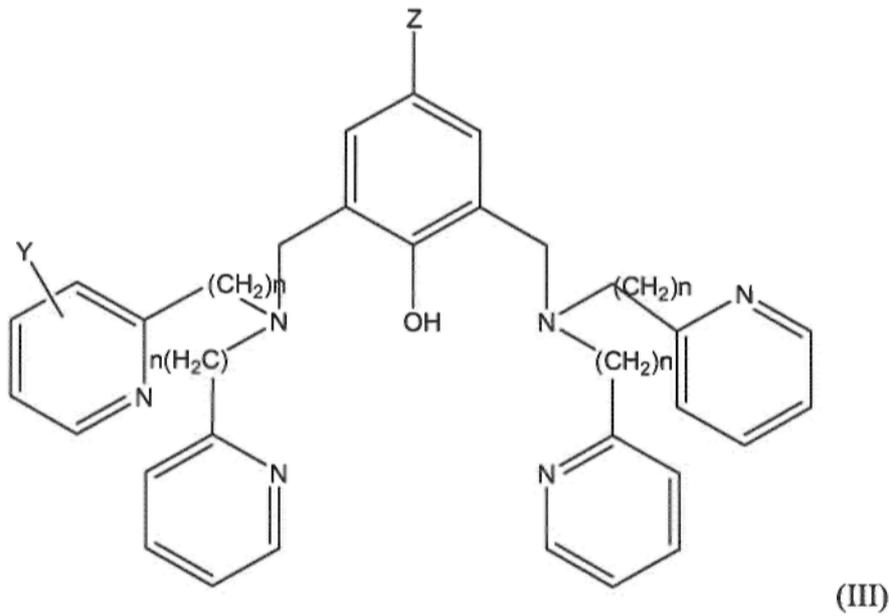
Los compuestos preferentes de fórmula (I) o (II) son aquellos en los que:

50 - M representa Zn o Cu  
 - X representa  $-(CH_2)_m-NH-A$  en el que  $m = 1$ , A representa H,  $n = 1$  y  $p = 0$ ;  
 - X representa  $-(CH_2)_m-NH-A$  en el que  $m = 1$ , A representa H,  $n = 2$  y  $p = 0$ .  
 - X representa  $-CH_2-NHC(O)-R-NH-A$ , A representa H,  $n = 1$  y  $p = 0$ .

55 Cuando  $p = 0$ , el grupo piridino no está sustituido por Y.

La invención también se refiere, de acuerdo con otro aspecto, a los ligandos que se pueden usar como compuestos intermedios en la síntesis de los complejos metálicos dinucleares de fórmula (I) o (II).

60 Por lo tanto la invención también tiene como objeto los compuestos de fórmula (III) que sigue a continuación



en la que

- 5 - Z representa  $\text{NH}_2$  o un grupo  $-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-A}$ , o un grupo  $-\text{CH}_2\text{-NHC(O)-R-NH-A}$  en el que R es un grupo alquilo en  $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ , de preferencia en  $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ , lineal o ramificado y A es H o un grupo fluoróforo, con la condición de que, cuando  $m = 2$ , A sea diferente a H
- $m = 1$  a 12
- $n = 1, 2$  o 3
- 10 - Y representa  $(\text{CH}_2)_p\text{-NH}_2$  en el que  $p = 0$  a 12.

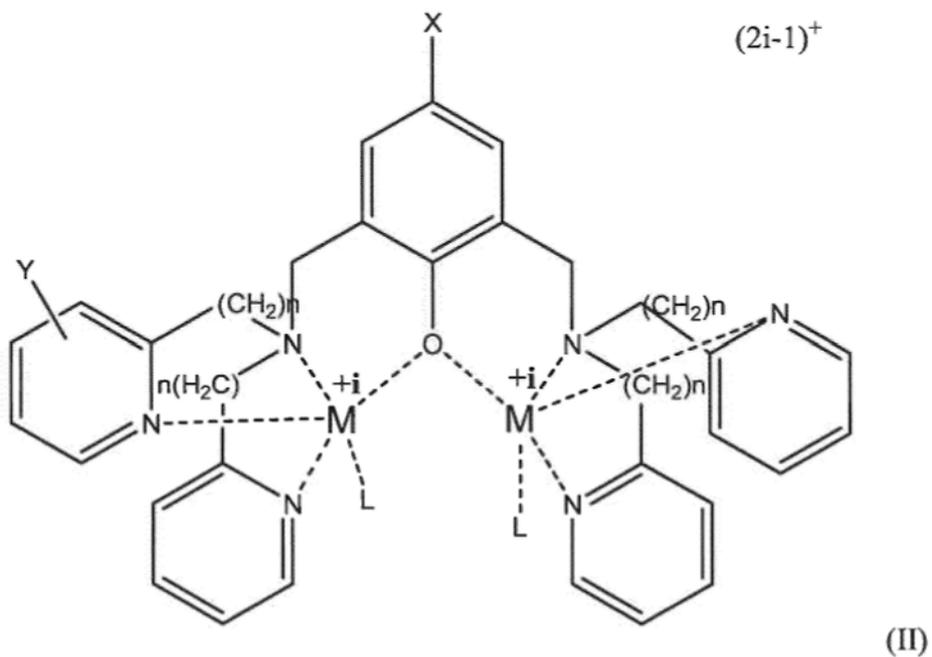
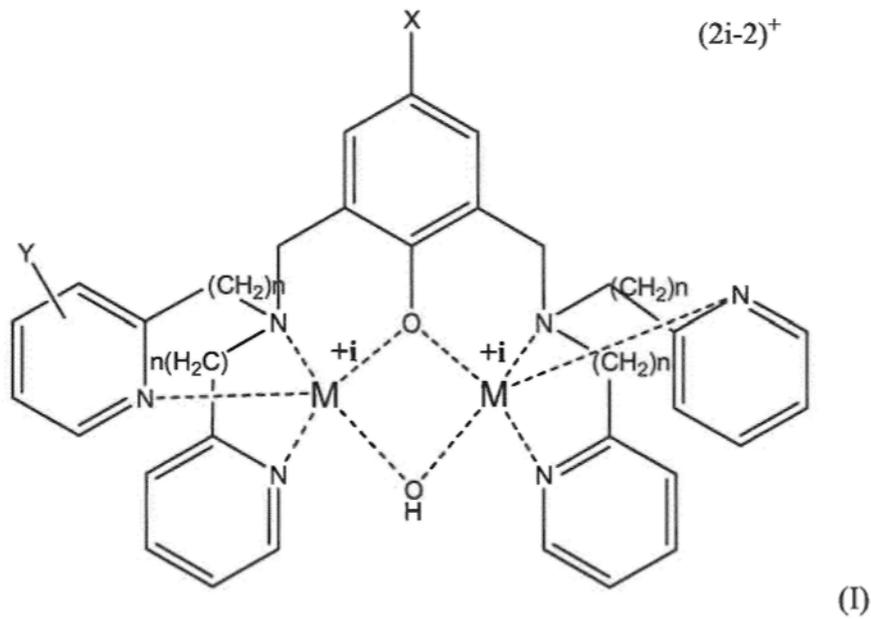
De acuerdo con un aspecto de la invención, el grupo colgante injertado en la unidad fenol del complejo metálico dinuclear comprende un grupo fluoróforo, tal como, por ejemplo, la ficoeritrina (PE) o fluoresceína, en particular isotiocianato de fluoresceína (FITC).

15 Los compuestos preferentes de fórmula (III) son aquellos en los que:

- Z representa  $-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-A}$  en el que  $m = 1$ , A representa H,  $n = 1$  y  $p = 0$ ; o
- Z representa  $-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-A}$  en el que  $m = 1$ , A representa H,  $n = 2$  y  $p = 0$ ; o
- 20 - Z representa  $-\text{CH}_2\text{-NHC(O)-R-NH-A}$ , A representa H,  $n = 1$  y  $p = 0$ .

Estos compuestos se pueden preparar de acuerdo con las etapas a) y b) del método que se ha indicado anteriormente.

- 25 De acuerdo con un aspecto posterior, la invención se refiere a un método de detección y/o caracterización de micropartículas celulares, que comprende la puesta en contacto de un compuesto de fórmula (I) o (II)



5 tal como se han definido anteriormente, con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares y la detección y/o la caracterización de las micropartículas capturadas por dicho compuesto de fórmula (I) o (II).

10 Si fuera necesario, los fosfatos orgánicos e inorgánicos opcionalmente presentes en el fluido biológico, en particular en el plasma sanguíneo, pueden formar quelatos con agentes de quelación, tales como por ejemplo sales de magnesio o de lantano.

15 Por « detección de las micropartículas celulares », se hace referencia a la determinación cualitativa y/o cuantitativa de la presencia de dichas micropartículas celulares en el fluido biológico.

Por « caracterización de las micropartículas celulares », se hace referencia a la identificación, en particular el tipado, en particular el fenotipado de dichas micropartículas celulares, así como, en particular, la detección de biomoléculas opcionalmente presentes en las micropartículas, la detección de actividades enzimáticas y la determinación de los ARN.

De acuerdo con un aspecto preferente, el compuesto de fórmula (I) o (II), en una primera etapa, se inmoviliza sobre un soporte sólido.

5 A modo de ejemplos no limitantes, un soporte de ese tipo se puede elegir entre el grupo constituido por placas de microtitulación, láminas, conos, tubos, pocillos, perlas, partículas o incluso tiras.

Por lo tanto la invención se refiere a un método de detección y/o caracterización de micropartículas celulares, que comprende las siguientes etapas:

- 10 - inmovilización de un compuesto de fórmula (I) o (II) tal como se ha definido anteriormente sobre la superficie del soporte sólido,  
 - puesta en contacto con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares  
 15 - captura de las micropartículas celulares sobre dicho compuesto de fórmula (I) o (II), y  
 - detección y/o caracterización de las micropartículas celulares capturadas.

De acuerdo con una variante preferente, se usa un soporte sólido cuya superficie se ha activado previamente, tal como, por ejemplo, una placa de microtitulación.

20 De acuerdo con esta variante, dicho método de detección y/o caracterización de micropartículas celulares comprende las siguientes etapas:

- 25 - activación de un soporte sólido,  
 - inmovilización de un compuesto de fórmula (I) o (II) tal como se han definido anteriormente sobre la superficie del soporte activado,  
 - puesta en contacto con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares  
 30 - captura de las micropartículas celulares sobre dicho compuesto de fórmula (I) o (II), y  
 - detección y/o caracterización de las micropartículas celulares capturadas.

La activación del soporte se puede realizar con métodos habituales, tales como, por ejemplo, usando poliglutaraldehído. Su estructura política permite una adsorción estable del poliglutaraldehído sobre el soporte. El glutaraldehído comprende sitios reactivos que reaccionan con los grupos amino (es decir, -NH<sub>2</sub>) formando enlaces covalentes. La etapa de activación comprende la formación de enlaces covalentes entre al menos uno de los sitios reactivos del poliglutaraldehído inmovilizado sobre el soporte sólido y los grupos funcionales -NH<sub>2</sub> del ligando. Como activador se puede usar, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida.

En el transcurso de la etapa de inmovilización, el compuesto de fórmula (I) o (II) se fija sobre soporte activado formando enlaces covalentes.

40 El grupo amino (es decir, NH<sub>2</sub>) que se encuentra en el extremo de el grupo colgante X permite la formación de enlaces imino reaccionando con los grupos aldehído de la superficie del soporte activo.

45 La captura de las micropartículas celulares se puede realizar con incubación de un fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares con los compuestos de fórmula (I) o (II), por ejemplo, por puesta en suspensión en un tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin etanosulfónico) la continuación incubación con los sensores a temperatura ambiente.

50 Las micropartículas capturadas a continuación se pueden revelar usando por ejemplo técnicas de detección usando anticuerpos marcados específicos (análisis fotorométrico o fluorométrico), un marcado enzimático (análisis cromogénico) o técnicas de amplificación tales como PCR cuantitativa o q-PCR.

Por ejemplo, se pueden usar:

- 55 a) anticuerpos marcados específicos, es decir
- o bien anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de la célula de origen a partir de la cual se liberan las micropartículas celulares, denominadas CD (para « Cluster of Differentiation »), por ejemplo, los anticuerpos CD14 para los monocitos o CD105 (endoglin) para las células endoteliales;
  - 60 - o bien anticuerpos dirigidos contra biomoléculas activas, por ejemplo anticuerpos dirigidos contra el factor tisular (FT, activador de la coagulación) o anticuerpos dirigidos contra los activadores del plasminógeno de tipo tisular (tPA) o de tipo uroquinasa (uPA). Estas moléculas no son exclusivas de un tipo celular dado, pero es importante saber en el plano fisiopatológico si están presentes en la micropartícula;

Los anticuerpos pueden estar marcados con una enzima, tal como, por ejemplo, la peroxidasa, y a continuación se pueden detectar con análisis fotométrico usando un sustrato adecuado. Estos anticuerpos también se pueden marcar con un fluorocromo y a continuación se pueden detectar mediante fluorescencia;

b) un ensayo cromogénico: este ensayo permite detectar la actividad de una enzima con la ayuda de un sustrato sintético. Por ejemplo, los activadores del plasminógeno tPA o uPA transforman el plasminógeno en plasmina (enzima fibrinolítica y trombolítica) y esta plasmina se puede detectar con la ayuda de un sustrato cromogénico. Por lo tanto, añadiendo plasminógeno a las micropartículas capturadas y un sustrato sintético cromogénico sensible a la plasmina, se podrá detectar la actividad del tPA y del uPA. Esta técnica permite detectar las moléculas que tengan una actividad enzimática que se encuentren en la superficie de las micropartículas.

c) la técnica de q-PCR: los ARNm y microARN presentes en el interior de las micropartículas capturadas se pueden detectar mediante cebadores específicos. Los ARN se liberan mediante separación de las micropartículas con la ayuda de un gradiente de temperatura durante el primer ciclo de temperatura de la q-PCR, y a continuación se amplifican de forma específica con la ayuda de los cebadores con los cuales se ponen en contacto sobre soporte y de la acción de la polimerasa.

De acuerdo con una variante del método de detección que se ha mencionado anteriormente, se inmoviliza sobre el soporte sólido, tal como se ha definido anteriormente, un compuesto de fórmula (III) tal como se ha definido anteriormente, es decir, un ligando, y se incuba el conjunto de soporte-ligando en presencia de ion metálico, con el fin de que el complejo dinuclear metálico de fórmula (I) o (II) se forme *in situ*.

En esta variante, por ejemplo, se puede inmovilizar el ligando de fórmula (III) sobre el soporte sólido mediante incubación durante un período de tiempo de aproximadamente 2 h a temperatura ambiente, del orden de 20 °C a 25 °C, y a continuación eliminar el exceso de ligando, e incubar el ion metálico con el conjunto de soporte-ligando durante aproximadamente 2 h a la misma temperatura.

El método de detección comprende a continuación las etapas que se han mencionado anteriormente, es decir

- la puesta en contacto de dicho compuesto de fórmula (I) o (II) con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares,
- la captura de las micropartículas celulares sobre dicho compuesto de fórmula (I) o (II), y
- la detección y/o la caracterización de las micropartículas celulares capturadas.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el compuesto de fórmula (I) o (II) se usa en solución.

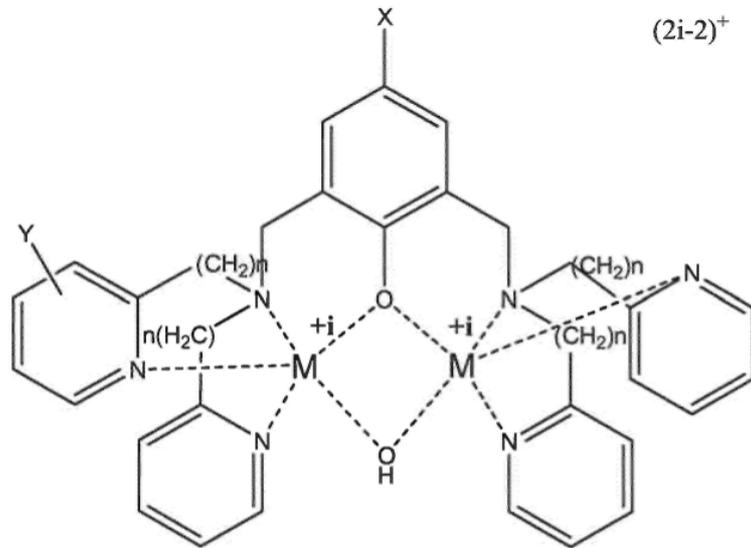
Entonces se usará, de preferencia, un compuesto de fórmula (I) o (II) en la que X representa  $-(CH_2)_m-NH-A$ ,  $-CH_2-NHC(O)-R-NH-A$  en el que R es un grupo alquilo en  $C_2-C_{10}$ , de preferencia en  $C_6-C_{10}$ , sustituido o sin sustituir, lineal o ramificado y A es un grupo fluoróforo.

Las micropartículas capturadas se pueden detectar, por ejemplo, mediante medición de fluorescencia con la ayuda de anticuerpos específicos, opcionalmente marcados con fluoróforos.

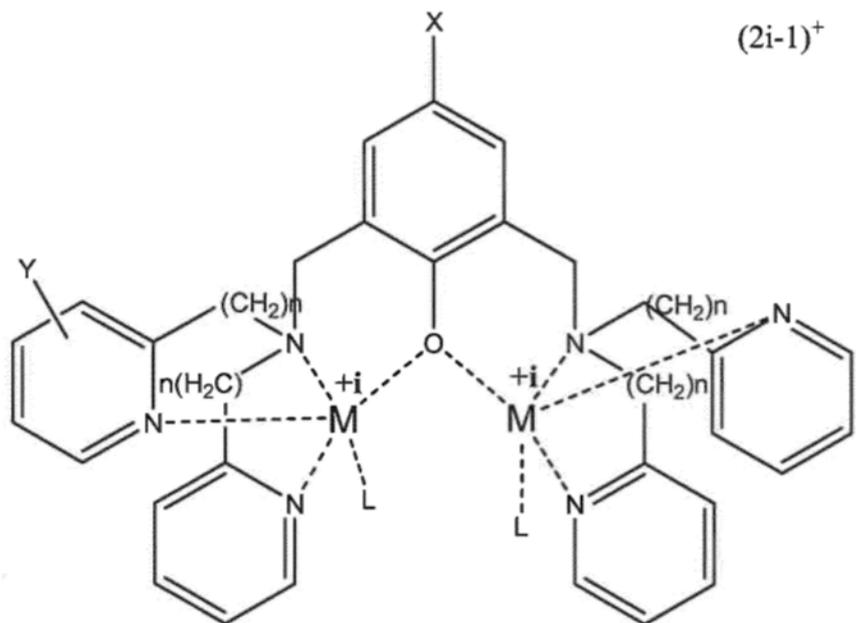
La invención también se refiere, de acuerdo con un aspecto posterior, a un método de detección y/o caracterización de micropartículas celulares que permite la evaluación del riesgo de desarrollo y/o el seguimiento terapéutico de diversas patologías, en particular trombóticas, inflamatorias y/o metabólicas, o incluso enfermedades o accidentes cardiovasculares o neurovasculares, o enfermedades tales como diabetes, cáncer, enfermedad de Alzheimer u otras patologías.

De forma ventajosa, dicho método de detección y/o caracterización de micropartículas celulares que permite la evaluación del riesgo de desarrollo y/o el seguimiento terapéutico de diversas patologías comprende las siguientes etapas:

- la puesta en contacto de un compuesto de fórmula (I) o (II)



(I)



(II)

- 5 tal como se han definido anteriormente con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares,
- la detección y/o la caracterización de las micropartículas capturadas por dicho compuesto de fórmula (I) o (II), y
  - la comparación del resultado de la medición realizada en la etapa precedente con el resultado de una medición idéntica realizada sobre una muestra de ensayo de fluido biológico de control.

10 La invención también se refiere un método de diagnóstico, de evaluación del riesgo de desarrollo y/o de seguimiento terapéutico de diversas patologías, en particular trombóticas, inflamatorias y/o metabólicas, o incluso a enfermedades o accidentes cardiovasculares o neurovasculares, o enfermedades tales como diabetes, cáncer, enfermedad de Alzheimer u otras patologías que comprenden las siguientes etapas:

- 15
- la puesta en contacto de un compuesto de fórmula (I) o (II) tal como se han definido anteriormente con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares,
  - la detección y/o la caracterización de las micropartículas capturadas por dicho compuesto de fórmula (I) o (II), y
  - la comparación del resultado de la medición realizada en la etapa precedente con el resultado de una medición idéntica realizada sobre una muestra de ensayo de fluido biológico de control.
- 20

Las condiciones de puesta en contacto del compuesto de fórmula (I) o (II) con las micropartículas celulares, así como de captura, detección y/o caracterización de dichas micropartículas celulares son tal como se han definido anteriormente.

5 De forma ventajosa, el fluido biológico de control es un fluido biológico idéntico al sometido a ensayo, pero que proviene de un individuo que se considera sano. Como alternativa, el fluido biológico de control proviene del mismo individuo que el fluido biológico sometido a ensayo, pero resulta de una toma de muestra anterior.

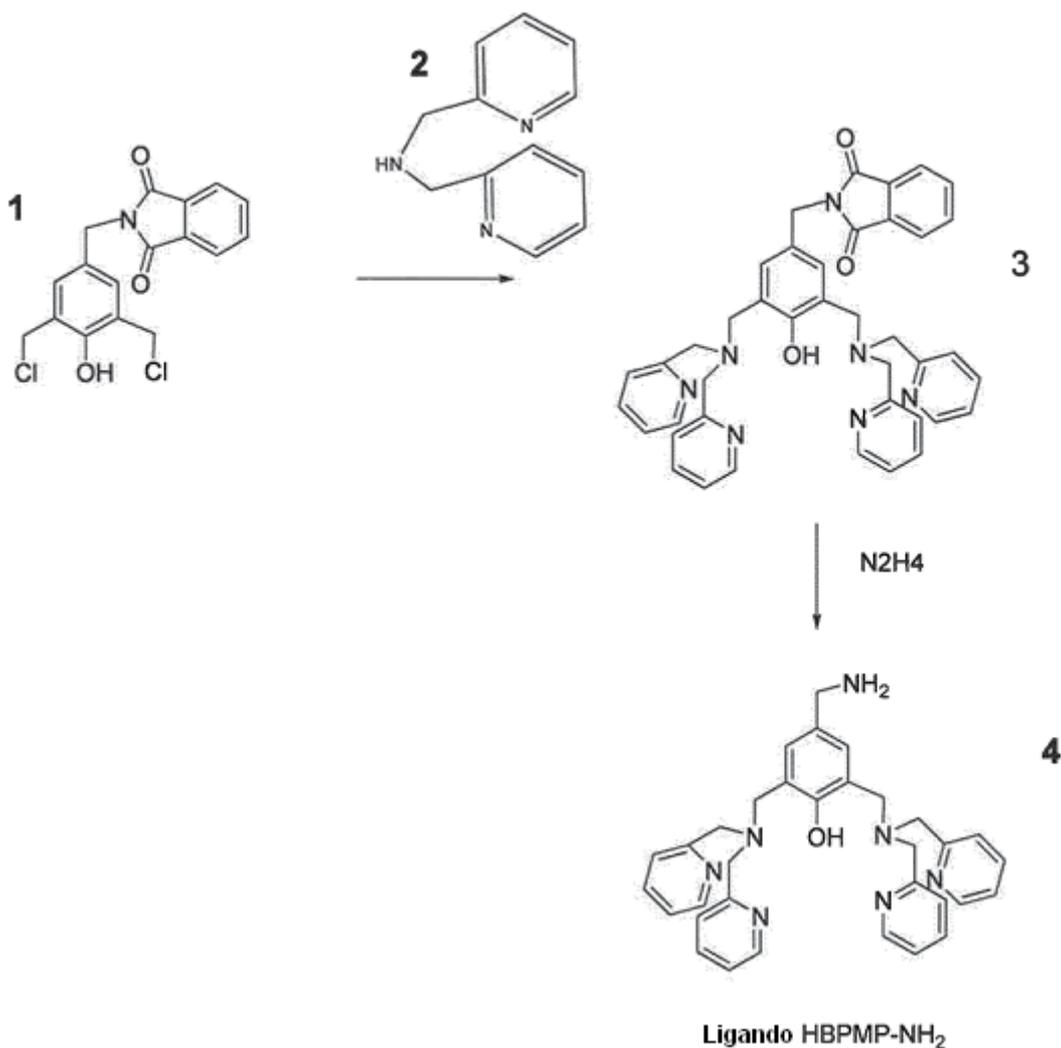
10 Algunos usos potenciales del método de detección y/o caracterización de micropartículas celulares de acuerdo con la invención son, por ejemplo, el diagnóstico precoz y el seguimiento terapéutico de un riesgo trombótico, que puede causar un infarto de miocardio o un accidente vascular cerebral, o enfermedades tales como diabetes, cáncer, enfermedad de Alzheimer u otras patologías.

La invención se ilustra de manera no limitante con los siguientes ejemplos.

15

Ejemplo 1: preparación del ligando de fórmula (III)

4-(aminometil)-2,6-bis[[bis(2-piridilmetil)amino]metil]fenol HBPMP-NH<sub>2</sub>



20

1) 2-(4-hidroxi-3,5-bis[[bis(2-piridilmetil)amino]metil]bencil)isoindol-1,3-diona. (3)

25

El compuesto 1 se describe en la publicación de M. Johansson *et al.*, Inorg. Chem., 2003, 42, 7502-7511.

En un globo tricol de 500 ml en atmósfera inerte de argón y sumergido en un baño de hielo, se introducen 6,5 g (1 equiv.) del precursor diclorado (1) en 120 ml de THF seco. Se coloca en el vial con adición 60 ml de THF seco en

los que se han disuelto 6,9 g (2 equiv.) de BPA (compuesto 2) así como 10 ml de trietilamina (4 equiv.). La adición se realiza gota a gota a 0 °C.

Al final de la adición, la suspensión de color marrón obtenida se deja con agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Después de filtración y aclarado con THF, se recupera el filtrado que se evapora.

5 El sólido obtenido se purifica en columna de alúmina neutra (altura: 11 cm; diámetro: 4,5 cm) desactivada con una mezcla de un 1 % de H<sub>2</sub>O, 10 ml de MeOH, 150 ml de EtOAc y 200 ml de ciclohexano. Los disolventes de elución son: EtOAc + ciclohexano 1/2, v/v, EtOAc + ciclohexano 1/1, v/v, EtOAc y EtOAc con MeOH de un 1 a un 2 %.

10 Después de evaporación, se recuperan 7,85 g (66 %) de producto 3 puro en forma de un sólido de color blanco.  
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, δ ppm): 11,15 (s, 1H, OH); 8,43 (d, 4H, Py-N-CH); 7,83 (m, 4H, Pht); 7,59 (td, 4H, Py); 7,41 (d, 4H, Py-C-CH); 7,20 (s, 2H, Ar-H); 7,15 (m, 4H, Py-N-CH-CH); 4,46 (s, 2H, Pht-CH<sub>2</sub>); 3,84 (s, 8H, Py-CH<sub>2</sub>); 3,77 (s, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-N).

15 RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN, δ ppm): 168,3 (C=O); 159,4 (Py-C); 155,9 (C-OH); 149,0 (Py-N-CH); 136,8 (Py); 134,1 (Py); 132,5 (CO-C); 129,8 (Py-C-CH); 126,6 (Ar-C-CH<sub>2</sub>); 124,6 (Ar-C-CH<sub>2</sub>); 123,5 (Pht-CH); 123,3 (Pht-CH); 122,2 (Ar-CH); 60,1 (Ar-CH<sub>2</sub>-Pht); 54,8 (Py-CH<sub>2</sub>); 41,6 (Ar-CH<sub>2</sub>-N).

Espectro de masas ESI, *m/z* = 676 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 2) 4-(aminometil)-2,6-bis[[bis(2-piridilmetil)amino]metil]fenol (4)

20 En un globo de 500 ml con un refrigerante en la parte superior, se introducen 6,5 g del producto protegido (3) (1 equiv.) y 250 ml de etanol absoluto. Se añaden 20,5 ml de hidracina monohidratada (4 equiv.) en 10 ml de etanol absoluto gota a gota, a continuación el medio de reacción se calienta a reflujo y se deja con agitación durante dos horas y a continuación durante una noche a temperatura ambiente.

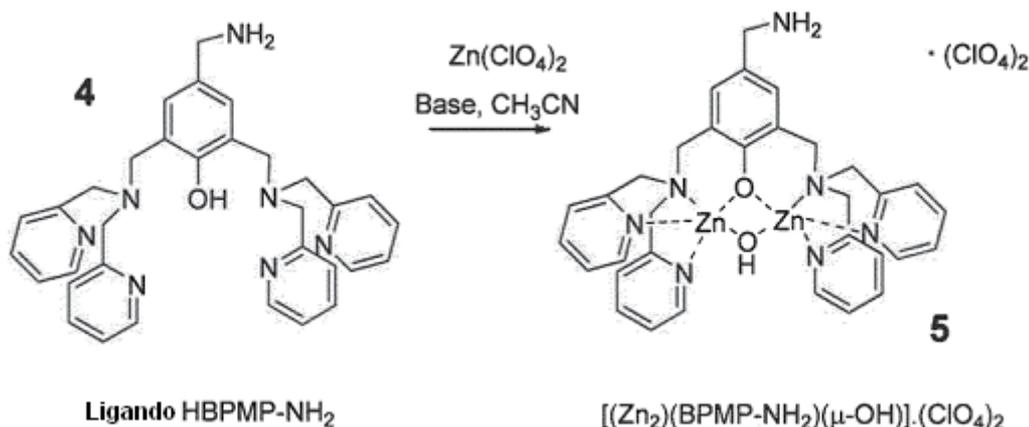
25 La suspensión de color blanco obtenida se filtra, se aclara con etanol y la fracción filtrada se evapora. El residuo se recoge en 150 ml de una solución de sosa 2 N y se deja con agitación dos horas. El medio de reacción se neutraliza con una solución de HCl 4 N hasta pH 7. La solución se extrae tres veces con diclorometano, a continuación se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora.

30 Se obtienen 5 g (95 %) del compuesto 4 en forma de un sólido de color blanco.  
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 8,55 (d, 4H, Py-N-CH); 7,57 (t, 4H, Py); 7,45 (d, 4H, Py-N-C-CH); 7,16 (s, 2H, Ar-H); 7,10 (t, 4H, Py); 5,29 (s, 1H, OH); 3,98 (s, 2H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 3,84 (d, 8H, Py-CH<sub>2</sub>); 3,77 (s, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 2,89 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

35 RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 159,6 (Py-C); 155,3 (C-OH); 148,8 (Py-N-CH); 136,6 (Py-N-C-CH-CH); 130,0 (Ar-C-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 129,0 (Ar-CH); 124,1 (Ar-C-CH<sub>2</sub>-N); 123,1 (Pyr-C-CH); 122,0 (Py-N-CH-CH); 59,8 (Py-CH<sub>2</sub>); 54,7 (Ar-CH<sub>2</sub>-N); 45,1 (NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

Espectro de masas ESI, *m/z* = 568 (M+Na)<sup>+</sup>, 546 (M+H)<sup>+</sup>.

40 Ejemplo 2: preparación del complejo [μ-[4-(aminometil)-2,6-bis[[bis(2-piridilmetil)amino]metil]-fenolato]]-μ-hidroxo, dicinc, diperclorato. (5)[(Zn<sub>2</sub>)(BPMP-NH<sub>2</sub>)(μ-OH)]·(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.



45 En un globo de 25 ml se introduce el ligando 4 (0,4 g, 1 equiv.) disuelto en 8 ml de acetonitrilo y 0,155 g (2,1 equiv.) de trietilamina.

Ahí se añaden 0,57 g (2,1 equiv.) de perclorato de cinc hexahidratado disuelto en 6 ml de acetonitrilo gota a gota. Al final de la adición del perclorato, se deja en agitación a temperatura ambiente. La solución se evapora parcialmente

con el fin de obtener un volumen de aproximadamente 5 ml y a continuación se añade éter etílico hasta observar una turbidez y se deja a -20 °C durante una noche.

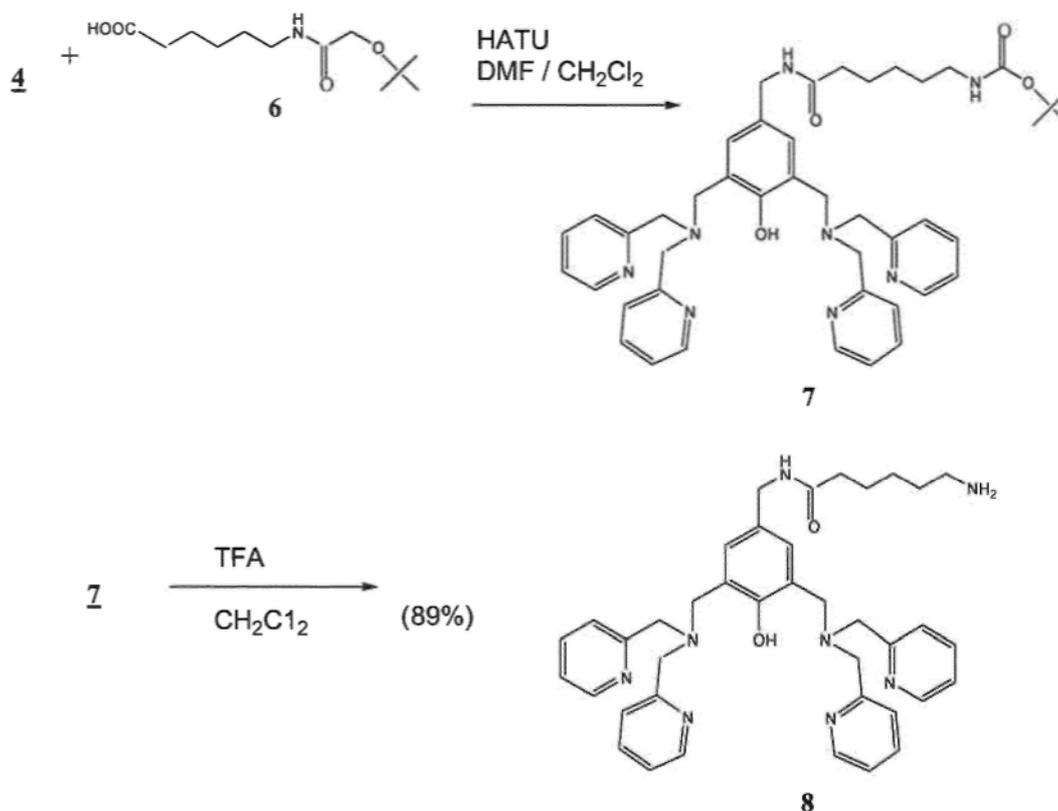
Se obtiene un precipitado que se filtra, se aclara con éter etílico y se seca. La fracción filtrada se vuelve a someter al mismo tratamiento, lo que permite al final recuperar 280 mg (43 %) del compuesto 5 en forma de un polvo de color amarillo pálido.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, δ ppm): 8,98 (d, 4H, Py-H) ; 8,05 (t, 4H, Py-H) ; 7,65 (t, 4H, Py-H) ; 7,53 (d, 4H, Py-H); 7,09 (s, 2H, Ar-H) ; 4,01 (s, 8H, Py-CH<sub>2</sub>) ; 3,91 (d, 2H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 3,84 (s, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-N).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN, δ ppm): 163,4 (Ar-CO) ; 156,5 (Py) ; 149,5 (Py) ; 142,5 (Py) ; 133,8 (Ar-C-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 126,0 (Py) ; 125,9 (Ar) ; 125,3 (Ar) ; 123,2 (Py-N-CH-CH) ; 61,0 (NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 59,0 (Ar-CH<sub>2</sub>-N) ; 58,1 (Py-CH<sub>2</sub>).

Espectro de masas ESI, *m/z* = 791 (M-CIO<sub>4</sub>)<sup>+</sup>.

Ejemplo 3: preparación del ligando de fórmula (III) 6-amino-*N*-(3,5-bis((bis(2-piridilmetil)amino)metil)-4-hidroxibencil)hexanamida (8) HBPMP-C<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>



El compuesto 6 se describe en la publicación de M. B. Doughty *et al.*, 1993, J. Med. Chem, 36, 272-279.

20 1) 6-terc-butyl-*N*-(3,5-bis((bis(2-piridilmetil)amino)metil)-4-hidroxibencilamino)-6-oxohexilcarbamato (7)

En un globo tricolor de 250 ml secado en el horno, con un vial de adición en la parte superior y un globo de argón y colocado en un baño de hielo se introducen 835 mg (1,2 equiv.) de ácido 6-terc-butoxicarbonilamino-hexanoico y 40 ml de diclorometano seco. Se añaden 1,37 g (1,2 equiv.) de HATU (Hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) en 6 ml de DMF (dimetilformamida) y 1,5 ml (3 equiv.) de trietilamina (NEt<sub>3</sub>) antes de dejar 30 minutos en agitación (siempre en el baño de hielo). Se añade el ligando 4 (1,52 g, 1 equiv.) disuelto en 40 ml de diclorometano seco) gota a gota. Se deja agitar a 0 °C durante una hora y a continuación a temperatura ambiente durante una noche y un día.

30 Después de la evaporación del diclorometano y de la DMF a vacío, se obtienen 4,6 g de un aceite espeso que se purifica mediante cromatografía en columna de alúmina neutra (altura: 5,5 cm; diámetro: 4,5 cm). La columna se desactiva con una solución de 2 gotas de agua destilada con 10 ml de MeOH, 300 ml de EtOAc y 150 ml de ciclohexano. Los disolventes de elución son: EtOAc + ciclohexano, EtOAc, EtOAc + de un 1 a un 5 % de MeOH.

Después de la evaporación se recuperan 1,9 g de un producto de color blanco pegajoso. Se recoge en agua, se raspa, se decanta y se extrae con diclorometano. Después de secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtración y evaporación se recuperan 1,7 g (80 %) del compuesto 7 en forma de un sólido de color beige.

5 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ ppm): 11,12 (s, 1H, OH) ; 8,53 (m, 4H, Py) ; 7,60 (m, 7H, Py) ; 7,48 (m, 5H, Py); 7,27 (m, 2H Ar) ; 5,79 (s, 1H, NH) ; 4,32 (d, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH) ; 4,13 (d, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-N) ; 3,86 (s, 10H, Py-CH<sub>2</sub>) ; 2,16 (t, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 1,86 (d, 5H, CH<sub>2</sub>) ; 1,64 (t, 3H, CH<sub>2</sub>) ; 1,42 (s, 9H, tBu).

10 RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ ppm): 172,8 (CH<sub>2</sub>-C=O-NH) ; 159,4 (O-C=O) ; 155,8 (Ar-C-OH) ; 149,2 (Py-N-CH) ; 136,9 (Py) ; 129,3 (Ar-CH) ; 128,3 (O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 124,6 (Ar-C-CH<sub>2</sub>-NH) ; 123,3 (Py-C-CH) ; 122,3 (Py-N-CH-CH) ; 60,1 (Py-CH<sub>2</sub>) ; 55,0 (Ar-CH<sub>2</sub>) ; 43,7 (O-CO-NH-CH<sub>2</sub>) ; 36,9 (NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 30,1 (CH<sub>2</sub>) ; 28,8 (CH<sub>3</sub>) ; 26,7 (CH<sub>2</sub>) ; 25,6 (CH<sub>2</sub>).

Espectro de masas ESI, *m/z* = 781 (M+Na)<sup>+</sup>, 759 (M+H)<sup>+</sup>

2) 6-amino-N-(3,5-bis((bis(2-piridilmetil)amino)metil)-4-hidroxibencil)-hexanamida (8)

15 En un globo de 250 ml con un refrigerante en la parte superior, se introducen 1,69 g del producto protegido (7) (1 equiv.) y 200 ml de diclorometano seco. La mezcla se enfría con un baño de hielo y a continuación se añaden gota a gota 9 ml de ácido trifluoroacético (46 equiv.) en 10 ml de diclorometano seco. El medio de reacción se deja en agitación durante una noche a temperatura ambiente.

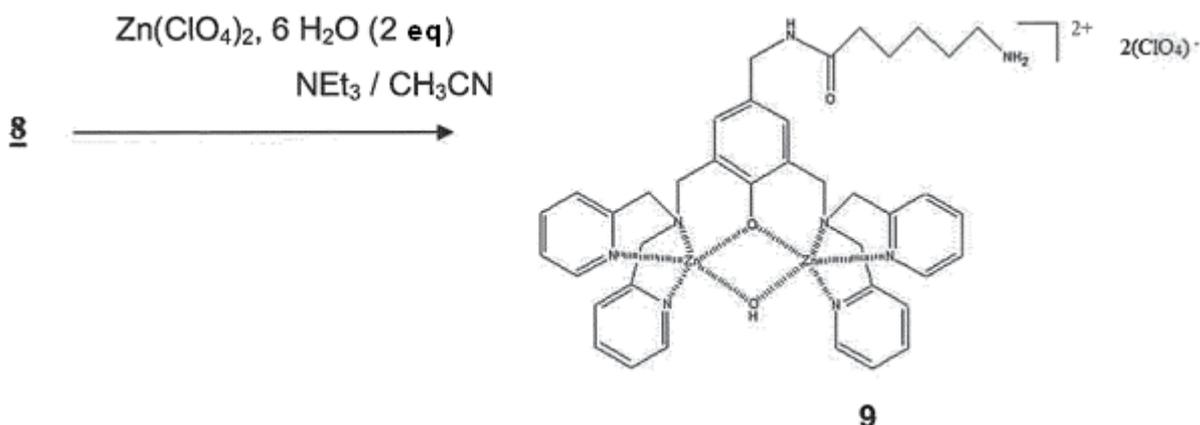
20 La solución obtenida se neutraliza hasta pH 9 con una solución de sosa 2 N y a continuación con una solución de NaHCO<sub>3</sub> saturado. La mezcla se extrae tres veces con diclorometano, a continuación se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora. Se obtiene un polvo que se solubiliza en caliente en acetonitrilo. Después de filtración en caliente, la solución se evapora y se obtienen 1,2 g (82 %) del compuesto 8 en forma de un sólido de color amarillo pálido.

25 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ ppm) ; 8,51 (d, 4H, Py) ; 7,56 (t, 4H, Py) ; 7,37 (d, 4H, Py) ; 7,13 (t, 4H, Py), 7,04 (s, 2H Ar) ; 4,24 (d, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH) ; 3,83 (s, 8H, Py-CH<sub>2</sub>) 3,70 (s, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-N) ; 2,90 (t, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 2,24 (t, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 1,75 (t, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 1,66 (t, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 1,26(t, 2H, CH<sub>2</sub>)

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ ppm): 172,9 (-C=O) ; 158,6 (Py-N-CH), 155,0 (Ar-C-OH) ; 148,8 (Py) ; 136,7 (Py) ; 129,4 (Ar-CH) ; 128,8 (Ar-CH) ; 122,2 (Py) ; 123,3 (Py) ; 122,3 (Py) ; 59,9 (Py-CH<sub>2</sub>) ; 54,7 (Ar-CH<sub>2</sub>) ; 42,9 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-) ; 39,7 (-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) ; 35,6 (CH<sub>2</sub>) ; 27,6 (CH<sub>2</sub>) ; 25,3 (CH<sub>2</sub>) ; 24,8 (CH<sub>2</sub>).

30 Espectro de masas ESI, *m/z* = 681 (M+Na)<sup>+</sup>, 659 (M+H)<sup>+</sup>, 330 (M+2H)<sup>2+</sup>.

Ejemplo 4: preparación del complejo [μ-[6-amino-N-(3,5-bis((bis(2-piridilmetil)amino)-metil)-4-hidroxibencil)hexanamida]]-μ-hidroxo, dicinc, diperclorato. (9) [(Zn<sub>2</sub>)(BPMP-C<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)(m-OH)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.



35 En un globo de 100 ml se introducen el ligando 8 (0,4 g, 1 equiv.) disuelto en 10 ml de acetonitrilo (se calienta un poco para disolver totalmente) y 0,13 g (2,1 equiv.) de trietilamina.

40 Ahí se añaden 0,9 g (2,1 equiv.) de perclorato de cinc hexahidratado disuelto en 4 ml de acetonitrilo gota a gota. Al final de la adición del perclorato, se deja en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución se evapora parcialmente con el fin de obtener un volumen de aproximadamente 5 ml y a continuación se añade éter etílico hasta observar una turbidez y se deja a -20 °C durante una noche.

45 Se obtiene un precipitado que se filtra, se aclara con éter etílico y se seca. La fracción filtrada se vuelve a someter al mismo tratamiento, lo que permite al final recuperar 270 mg (43 %) del compuesto 9 en forma de un sólido de color amarillo pálido.

50 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO, δ ppm): 8,96 (d, 4H, Py-H) ; 8,80 (s, 1H, OH), Py-H) ; 8,11 (t, 4H, Py-H) ; 7,68 (t, 4H, Py-H), 7,59 (d, 4H, Py-H) ; 6,83 (s, 2H, Ar-H) ; 6,64 (s, 1H, NH-CO) ; 4,01 (s, 8H, Py-CH<sub>2</sub>) ; 3,91 (d, 2H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 3,84 (s, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-N) ; 4,11 (m, 12H, CH<sub>2</sub>-N) ; 2,12 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 1,52 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>) ; 1,29 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO, δ ppm): 171,4 (-C=O) ; 155,0 (Py-N-C) ; 154,9 (Ar-C-OH), 147,5 (Py-CH) ; 140,8 (Py); 140,2 (Ar-C-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) ; 130,8 (Ar-CH) ; 129,8 (Ar-CH) ; 126,0 (Ar-C) ; 126,3 (Ar-C) ; 124,6 (Py-CH) ; 123,7 (CH); 122,9 (C) ; 121,1 (CH) ; 58,8 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-CO) ; 57,7 (Ar-CH<sub>2</sub>-N) ; 56,7 (Py-CH<sub>2</sub>), 41,1 (CH<sub>2</sub>) ; 35,4 (CH<sub>2</sub>) ; 29,7 (CH<sub>2</sub>); 26,0 (CH<sub>2</sub>) ; 25,4 (CH<sub>2</sub>) ; 24,6 (CH<sub>2</sub>).

5 Espectro de masas ESI, *m/z* = 905 (M-ClO<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 403 (M-2ClO<sub>4</sub>)<sup>2+</sup>.

Ejemplo 5: dosificación colorimétrica de micropartículas celulares por inmovilización del complejo del ejemplo 4 sobre una placa de microtitulación (estudio de la sensibilidad)

a) Reactivos:

- 10
- Glutaraldehído al 25 %
  - Etanolamina a 16,5 M
  - Tampón bicarbonato (Bic Na), pH 9,5 a 1 M, a realizar únicamente mediante titulación de una solución de NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 8,3) con una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a pH 11,6.
- 15
- Tampón HEPES 10 mM a pH 7,4; NaCl 0,15 M)
  - (hBPMP/Cinc)-C<sub>6</sub>NH<sub>2</sub> a 150 μM

b) Protocolos:

- 20
- Polimerización del glutaraldehído: Se preparan 50 ml de una solución de glutaraldehído a un 2,5 % en Bic Na 0,1 M, y a continuación la mezcla se coloca en un frasco cerrado a 37 °C durante 2 h.
  - Adsorción del poliglutaraldehído sobre la superficie de cloruro de polivinilo: Se usa una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se depositan 100 μl por pocillo de glutaraldehído al 2,5 % y se deja 2 h a 22 °C. El poliglutaraldehído se elimina y se aclara la superficie 3 veces con agua.
- 25
- Inmovilización del complejo [(Zn<sub>2</sub>)(BPMP-C<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)(m-OH)]·(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. El complejo en HEPES 0,1 M, pH 8,2 se inmoviliza en la superficie de la placa de cloruro de polivinilo durante 24 h a +22 °C: Los grupos aldehído libres se saturan con etanolamina 0,3 M mediante incubación de la superficie con esta solución durante 2 h a 22 °C, y a continuación se elimina la etanolamina mediante lavado con agua y a continuación con 3 lavados en tampón HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M. Las placas se conservan a 4 °C.
- 30
- Una solución tampón (HEPES 10 mM, NaCl al 0,9 %) que contiene las micropartículas se incuba durante 12 h, a continuación las placas se aclaran con la solución tampón. Las micropartículas se obtienen a partir de la activación de cultivo celular de células endoteliales microvasculares humanas HMEC1 por el TNF-α, como se describe en R. Lacroix *et al.*, Blood, 2007, 110, 2432-2439.

c) Detección

La revelación se realiza mediante análisis fotométrico. Se incuba con un anticuerpo anti-CD105 específico de las micropartículas estudiadas durante 3 h, a continuación se realiza un aclarado con HEPES 10 mM + 40 mg/ml de BSA.

A continuación se incuba con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, después se realiza un aclarado con HEPES 10 mM + 40 mg/ml de BSA.

La revelación se realiza con 1 mg/ml ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) si se usa un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.

La lectura se realiza con espectrofotómetro.

Los resultados se informan en la figura 1 que representa la detección mediante análisis fotométrico de una dilución de micropartículas con respecto a la cantidad de proteínas.

La señal obtenida se expresa en mOD/min que corresponde a la velocidad inicial (Vi) de la reacción de degradación del sustrato por la peroxidasa.

La señal obtenida en función de la cantidad de micropartículas muestra una respuesta a la dosis específica .

Ejemplo 6: Estudio de la especificidad de los complejos de Zn de los ejemplos 2 y 4 con método inmunoquímico sobre una placa de microtitulación

Una solución de glutaraldehído al 2,5 % diluida en Bic Na (0,1 M; pH 9,5) se deposita en cada pocillo de la placa de microtitulación y se deja durante 4 h a 22 °C. Después de la eliminación del glutaraldehído y varios aclarados con agua, el complejo a someter a ensayo, es decir, [(Zn<sub>2</sub>)(BPMP-NH<sub>2</sub>)(m-OH)]·(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (ejemplo 2) o [(Zn<sub>2</sub>)(BPMP-C<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)(m-OH)]·ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (ejemplo 4), se incuba a la concentración de 500 nm (concentración determinada por titulación). A continuación con el complejo se elimina mediante aclarado con una solución de HEPES 10 mM. por

último, los grupos aldehído libres se saturan con una solución de etanolamina a 0,3 M seguido por varios aclarados con tampón HEPES 10 mM.

Una solución tampón (HEPES 10 mM, NaCl al 0,9 %) que contiene micropartículas (obtenidas a partir de la activación de cultivo celular de células HMEC1) a continuación se incuba durante 1 h y después se elimina mediante aclarado con la solución tampón.

Se usa un método inmunológico indirecto (anticuerpo primario anti-CD105 a 1 µg/ml; anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa a 160 ng/ml y ABTS a 1 mg/ml) para analizar la presencia del antígeno endotelial CD105 en las micropartículas.

La lectura se realiza con espectrofotómetro a 405 nm.

Los resultados se informan en la figura 2 que representa la detección mediante análisis fotométrico de una dilución de micropartículas con respecto a la cantidad de proteínas.

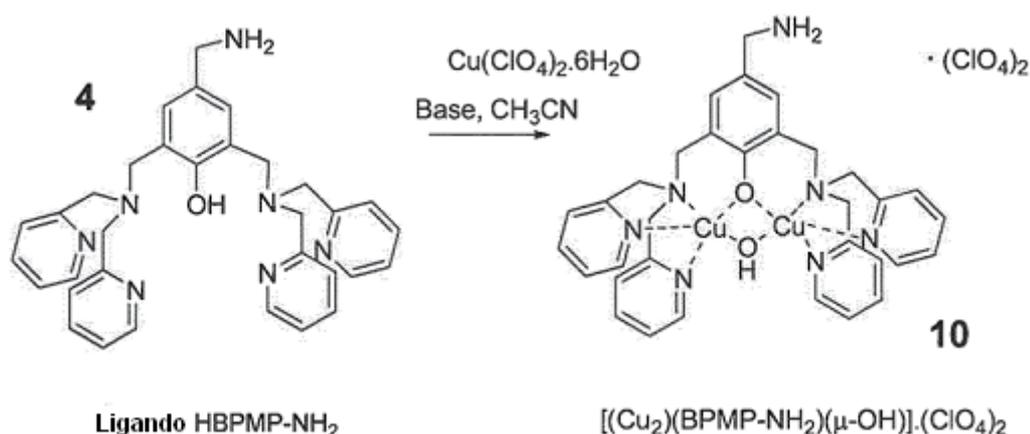
La señal obtenida se expresa en mOD/min que corresponde a la velocidad inicial ( $V_i$ ) de la reacción de degradación del sustrato por la peroxidasa, y se representa en color gris oscuro para el complejo del ejemplo 2 y en gris claro para el complejo del ejemplo 4.

La presencia (signo +) o la ausencia (signo -) de los reactivos en el medio de medición se indica en la parte inferior del eje de abscisas.

La señal obtenida muestra que el complejo de acuerdo con la invención reconoce de forma específica las micropartículas durante una revelación inmunológica.

Además, parece que la metodología no genera más que un ruido de fondo débil, tal como muestra la señal muy débil medida en ausencia de las micropartículas.

Ejemplo 7: preparación del complejo  $[\mu\text{-}[4\text{-aminometil-}2,6\text{-bis}[\text{bis}(2\text{-piridilmetil)omino]metil-]fenolato}]]\text{-}\mu\text{-hidroxo, dicúprico, diperclorato. (10) }[(\text{Cu}_2)(\text{BPMP-NH}_2)(\mu\text{-OH})]\cdot(\text{ClO}_4)_2$ .



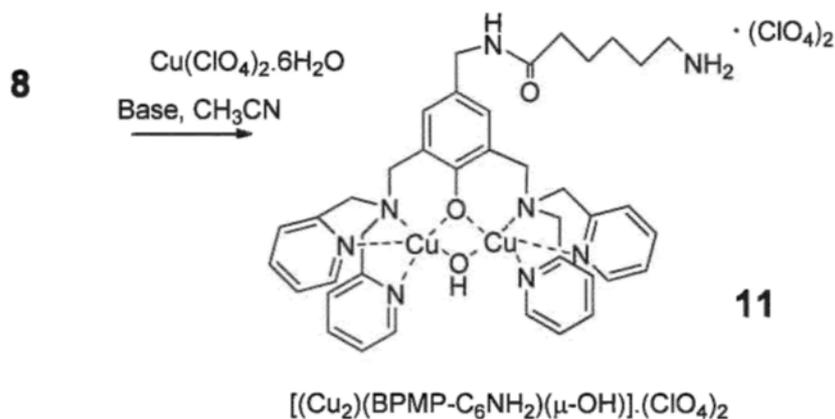
En un globo de 25 ml se introducen el ligando 4 (0,146 g, 1 equiv.) disuelto en 10 ml de acetonitrilo y 77 µl (2 equiv.) de trietilamina.

Ahí se añaden 0,21 g (2 equiv.) de perclorato cúprico hexahidratado disuelto en 3 ml de acetonitrilo gota a gota. Al final de la adición de la sal de cobre, se deja en agitación a temperatura ambiente 30 mn. La solución se evapora parcialmente con el fin de obtener un volumen de aproximadamente 5 ml a continuación se añade tetrahidrofurano hasta observar una turbidez y se deja a -20 °C durante tres días.

Se obtiene un precipitado que se filtra y a continuación se aclara con éter etílico. El sólido recuperado vuelve a poner en solución en acetonitrilo y se vuelve a precipitar como se ha hecho anteriormente con tetrahidrofurano a -20 °C. Después de filtración, aclarado y secado, se recuperan 118 mg (36 %) del compuesto 10 en forma de un polvo de color verde.

Espectro de masas ESI,  $m/z = 806$  ( $z = 1$ )  $[\text{M}-\text{ClO}_4^- + \text{H}_2\text{O}]$ ;  $353,5$  ( $z = 2$ )  $[\text{M}-2\text{ClO}_4^- + 2\text{H}_2\text{O}]$ ; UV/vis (DMSO/agua, pH = 7; 30/70):  $\lambda_{\text{máx}} (\epsilon) \approx 340$  (sh), 425 (sh), 700 ( $191 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Ejemplo 8: preparación del complejo  $[\mu\text{-[6-amino-N-(3,5-bis((bis(2-piridilmetil)amino)metil)-4-hidroxibencil)hexanamida]]-\mu\text{-hidroxo, dicúprico, diperclorato. (11) [(Cu}_2\text{)(BPMP-C}_6\text{NH}_2\text{)(}\mu\text{-OH)]}\cdot(\text{ClO}_4)_2$ .



5 En un globo de 25 ml, se introducen el ligando 8 (0,350 g, 1 equiv.) disuelto en 12 ml de acetonitrilo y 0,118 g (2,2 equiv.) de trietilamina.

Ahí se añaden 0,43 g (2,1 equiv.) de perclorato cúprico hexahidratado disuelto en 8 ml de acetonitrilo gota a gota. Al final de la adición de la sal de cobre, se deja en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución se evapora parcialmente con el fin de obtener un volumen de aproximadamente 5 ml a continuación se añade tetrahidrofurano hasta observar una turbidez y se deja a  $-20^\circ\text{C}$ .

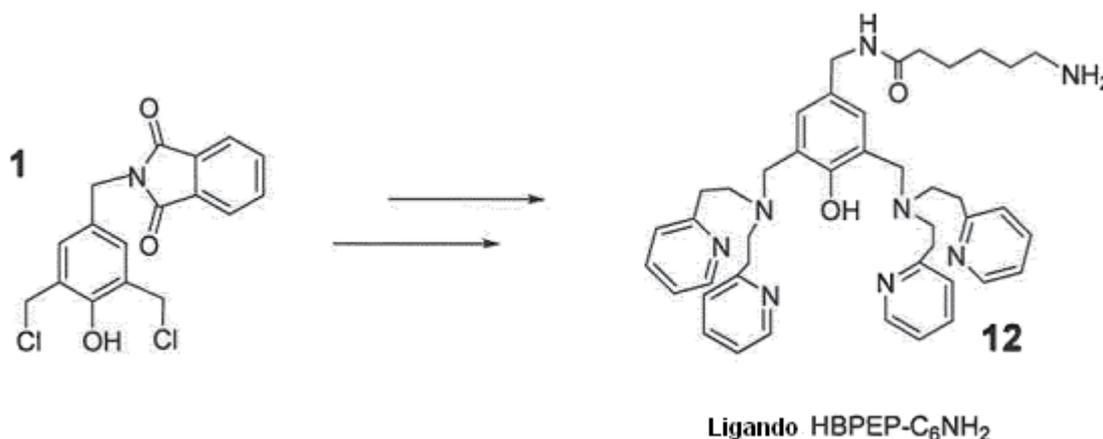
Se deposita un aceite espeso. El sobrenadante se elimina y se añaden 5 ml de éter etílico y el aceite se raspa con una varilla de vidrio. Un polvo de color verde precipita: se filtra, se aclara con éter etílico y se seca. La fracción filtrada se lleva a  $-20^\circ\text{C}$  y se deposita una segunda fracción de aceite. Ésta se trata como se ha hecho anteriormente. Al final se recuperan 246 mg (46 %) del compuesto 11 en forma de un polvo de color verde.

Espectro de masas ESI,  $m/z = 400$  ( $z = 2$ )  $[\text{M}-2\text{ClO}_4]$ ; UV/vis (DMSO/agua, pH = 7; 30/70):  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ )  $\approx 350$  (sh), 450 (316), 700 ( $202 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

20 Ejemplo 9: preparación del ligando de fórmula (III)

6-amino-N-(3,5-bis((bis(2-piridiletíl)amino)metil)-4-hidroxibencil)-hexanamida (12) HBPEP-C<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>

25 El ligando 12 se prepara de manera similar a la del ligando 8 en cuatro etapas a partir del compuesto 1 sobre el que se condensa la bis(2-piridiletíl) amina cuya preparación se describe en la publicación de M. A. Halcrow *et al.*, 2003, Dalton Trans., 4224-4225.



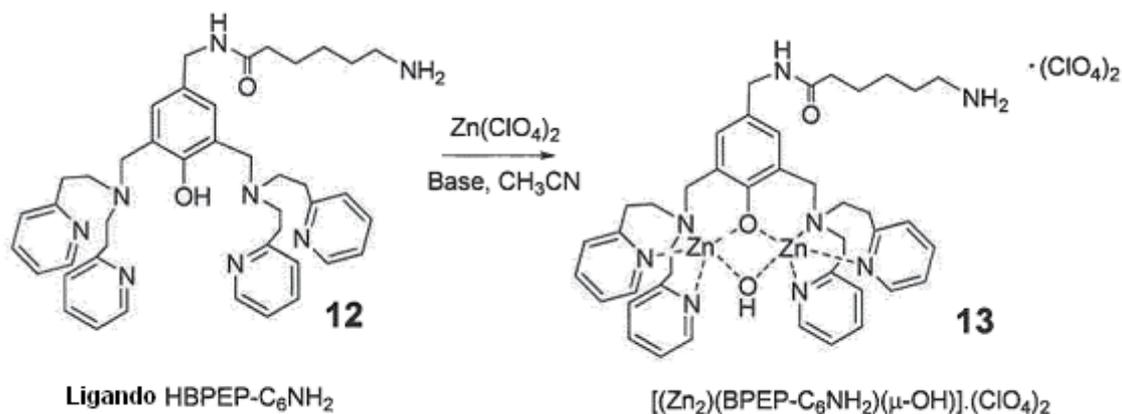
30 RMN <sup>1</sup>H (300, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 8,42 (d, 4H, Py-H) ; 7,52 (td, 4H, Py-H) ; 7,07 (m, 8H, Py-H) ; 6,93 (s, 2H, Ar-H) ; 6,85 (t, 1H, NH-CO) ; 4,22 (d, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-) ; 3,80 (s, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-N) ; 2,99 (m, 16H, Py-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N) ; 2,79 (m, 2H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 2,16 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>) ; 1,58 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>) ; 1,32 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 172,9 (-C=O) ; 159,6 (Py-N-C) ; 155,3 (Ar-C-OH) ; 149,0 (Py-N-CH) ; 136,4 (Py-C) ; 128,6 (Ar-C-CH<sub>2</sub>-NH) ; 128,4 Ar-CH ; 123,4 (Py-N-CH-CH) ; 122,8 (Ar-C-CH<sub>2</sub>-N) ; 121,3 (Py-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 54,7 (Ar-CH<sub>2</sub>-

NH) ; 53,3 (Py-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 42,9 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH) ; 40,0 (NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 35,7 (CO-CH<sub>2</sub>) ; 34,8 (Py-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 28,3 (NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 25,5 (CH<sub>2</sub>) ; 24,8 (CH<sub>2</sub>).

Espectro de masas ESI, *m/z* = 715 [M + H<sup>+</sup>]

- 5 Ejemplo 10: preparación del complejo [μ-[6-amino-*N*-(3,5-bis((bis(2-piridiletill)amino)metil)-4-hidroxibencil)hexanamida]]-μ-hidroxo, dicinc, diperclorato. (13) [(Zn<sub>2</sub>)(BPEP-C<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)(μ-OH)]·(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.



- 10 En un globo de 50 ml se introducen el ligando 12 (551 mg, 0,77 mmol, 1 equiv.) disuelto en 15 ml de acetonitrilo y 280 μl (2,5 equiv.) de trietilamina. Ahí se añaden gota a gota 724 mg de perclorato de cinc hexahidratado (2,5 equiv.) disuelto en 8 ml de acetonitrilo. Al final de la adición de la sal de cinc, se deja en agitación a temperatura ambiente durante 5 horas. La solución se evapora parcialmente con el fin de obtener un volumen de aproximadamente 5 ml y a continuación se añade tetrahidrofurano hasta observar una turbidez y se deja a -20 °C durante una noche.

- 15 Se obtiene un precipitado pastoso que se filtra, se aclara con éter etílico y se seca. Se recupera un sólido que se raspa con una varilla de vidrio en presencia de éter etílico y a continuación la solución se elimina y la operación vuelve a comenzar tres veces. Al final, después de secado, se recuperan 218 mg (27 %) del compuesto 13 en forma de un sólido de color amarillo pálido.

- 20 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN + DMSO, δ ppm): 8,48 (d, 4H, Py-*H*) ; 7,99 (m, 4H, Py-*H*) ; 7,45 (m, 8H, Py-*H*) ; 7,40 (s, 1H, NH-CO) ; 6,86 (s, 2H, Ar-*H*) ; 4,05 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-) ; 3,62 (t, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-N) ; 3,05 (m, 8H, Py-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N) ; 2,79 (m, 10H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, Py-CH<sub>2</sub>) ; 2,09 (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 1,56 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>) ; 1,30 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>).

- 25 RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>CN + DMSO, δ ppm): 173,1 (-C=O) ; 161,6 (Py-N-C) ; 158,3 (Ar-C-OH), 149,7 (Py-N-CH) ; 141,8 (Py-C) ; 132,0 (Ar-C-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) ; 132,0 Ar-CH) ; 126,3 (Py-N-CH-CH) ; 124,7 (Py-N-C-CH) ; 123,1 (Ar-C-CH<sub>2</sub>-N) ; 47,3 (Py-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 36,2 (Py-CH<sub>2</sub>) ; 32,7 (CO-CH<sub>2</sub>) ; 27,5 (NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 26,5 (CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 25,6 (CH<sub>2</sub>).

Espectro de masas ESI, *m/z*; 961 (*z* = 1) [M-ClO<sub>4</sub>]; 431 (*z* = 2) [M-2ClO<sub>4</sub>]

- 30 Ejemplo 11: Estudio de la sensibilidad del sistema de relación de las micropartículas por los complejos de Zn de los ejemplos 4 y 10 y el complejo de Cu del ejemplo 8 por medición de la generación de plasmina

- 35 El principio de la medición consiste en medir la actividad fibrinolítica que resulta de la generación de plasmina por las micropartículas celulares obtenidas a partir de la activación de cultivo celular de células HMEC1. Estas micropartículas llevan en su superficie uroquinasa (o enzima activadora de plasminógeno - uPA), que permite la transformación del plasminógeno en plasmina, la cual produce la lisis de la fibrina.

- La generación de plasmina se detecta por la escisión de un sustrato cromogénico, metilmalonil-hidroxi-propil-arginil-paranitroanilida (CBS) por la plasmina (medición espectrofotométrica).

- 40 a) Protocolos

- Preparación de la placa de microtitulación

Se usa una placa de 96 pocillos de PVC con fondos en U.

- 45 Se prepara un tampón de ensayo de la siguiente composición:

	Solución de reserva	Volumen de reserva para 1 l de tampón	Solución final
Fosfato pH = 7,4	0,5 M	100 ml	50 mM

## ES 2 715 309 T3

	Solución de reserva	Volumen de reserva para 1 l de tampón	Solución final
NaCl	5 M	16 ml	80 mM
BSA	40 g/l	2 g o 50 ml a un 40 %	2 g/l
Tween 20	10 %	1 ml	0,01 %
NaN <sub>3</sub> o timerosal	10 %	1 ml	0,01 %
csp H <sub>2</sub> O		Csp 832 ml de H <sub>2</sub> O	

Se incuban 150 µl de tampón de ensayo en pocillos durante 30 min a temperatura ambiente.

- Preparación del plasminógeno a 4 µM para una placa entera

5

Se usan 48,3 µl de una solución madre de plasminógeno a 103,5 µM y se añaden 1201,7 µl de tampón de ensayo.

- Preparación del CBS0065 a 3 mM para una placa entera

10

Se usa una solución madre de CBS0065 a 7,5 mM y se añaden 750 µl de tampón de ensayo.

b) Detección

15

La placa que contiene el tampón de ensayo se voltea para vaciar los pocillos, a continuación se seca con papel absorbente.

20

La solución de plasminógeno a 4 µM se mezcla con la solución de CBS0065 a 3 mM, a continuación se incuban 25 µl de una solución tampón (HEPES 10 mM, NaCl al 0,9 %) que contiene las micropartículas (obtenidas a partir de la activación de cultivo celular de células HMEC1) durante 1 h a 37 °C. Se añaden 12,5 µl de CBS0065 y 12,5 µl de plasminógeno (respectivamente 2 µM y 1,5 mM final), y la placa se sella.

La lectura se realiza con espectrofotómetro a 405 nm y 490 nm a 37 °C durante 18 h.

25

Los resultados se informan en la figura 3 que representa la detección de la generación de plasmina por dosificación de la actividad fibrinolítica

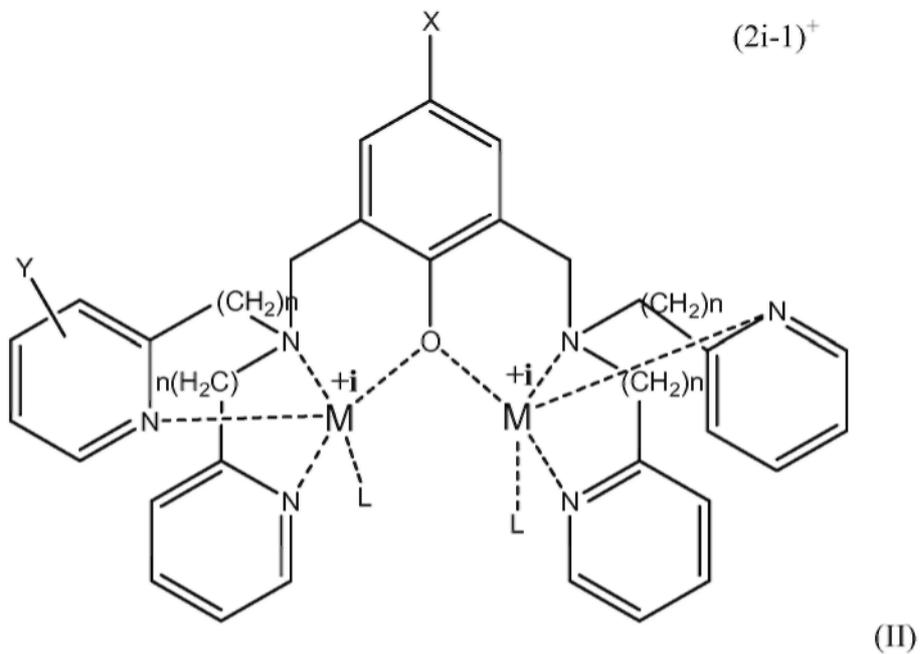
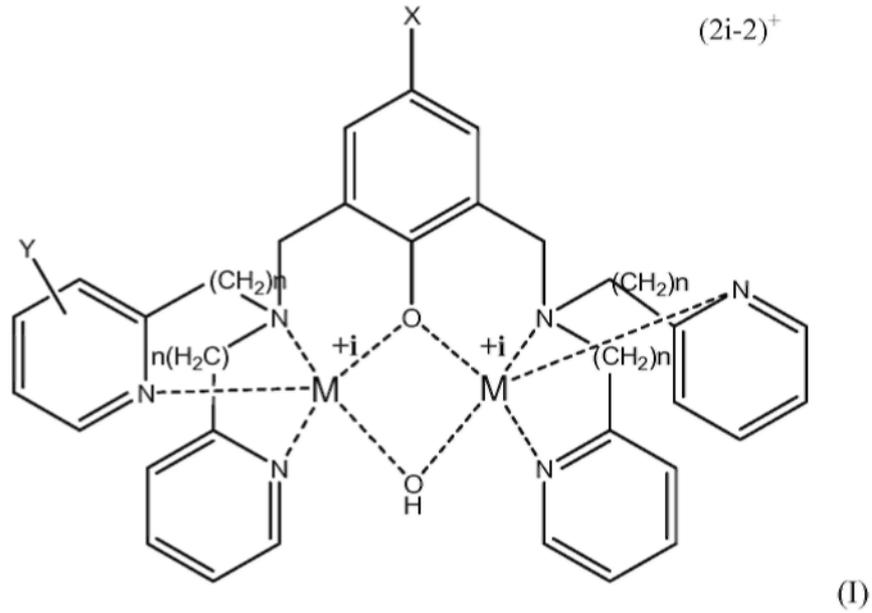
La señal obtenida se expresa en mOD/min.

30

Los resultados muestran que la inmovilización de las micropartículas por los complejos metálicos de acuerdo con la invención permite su dosificación funcional. También se observa una variación de los resultados en su de la longitud del « el grupo colgante » relacionado con el grupo piridino y del tipo de ion metálico.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II):



5

en la que

- M<sup>+i</sup> representa un ion metálico e i es 1, 2 o 3
- L representa un ligando intercambiable constituido por una molécula que interactúa de manera débil con los iones metálicos y que está disponible para intercambio con la solución del entorno,
- X representa un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-A, o un grupo -CH<sub>2</sub>-NHC(O)-R-NH-A en el que R es un grupo alquilo en C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, de preferencia en C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, lineal o ramificado y A es H o un grupo fluoróforo
- m = 1 a 12
- n = 1, 2 o 3
- Y representa (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NH<sub>2</sub> en el que p = 0 a 12.

10

15

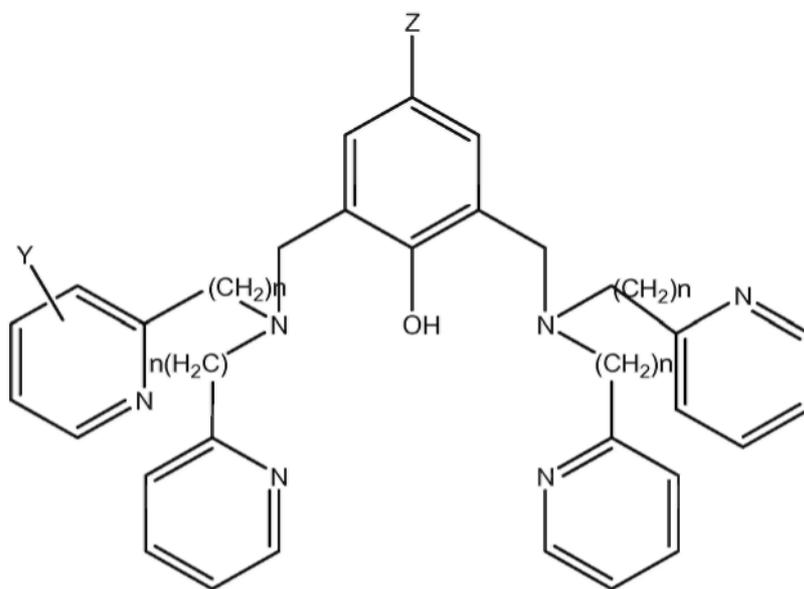
2. Compuesto de fórmula (I) o (II) de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que M se elige entre Zn, Cu, Mn, Co, Ni y Fe.

3. Compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2 de fórmula (I) o (II) en la que:

- M representa Zn o Cu
- X representa  $-(CH_2)_m-NH-A$  en el que  $m = 1$ , A representa H,  $n = 1$  y  $p = 0$ ; o
- X representa  $-(CH_2)_m-NH-A$  en el que  $m = 1$ , A representa H,  $n = 2$  y  $p = 0$ , o
- X representa  $-CH_2-NHC(O)-R-NH-A$ , A representa H,  $n = 1$  y  $p = 0$ .

4. Compuesto de fórmula (I) o (II) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en la que X representa  $-(CH_2)_m-NH-A$ ,  $-CH_2-NHC(O)-R-NH-A$  en el que R es un grupo alquilo en  $C_2-C_{10}$ , de preferencia en  $C_6-C_{10}$ , lineal o ramificado y A es un grupo fluoróforo.

5. Compuesto de fórmula (III)



(III)

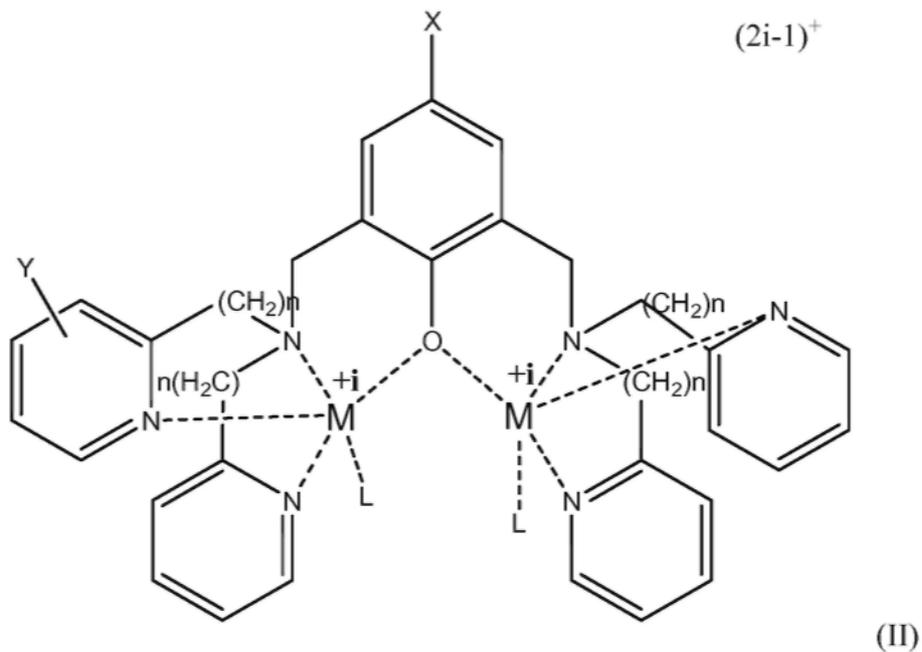
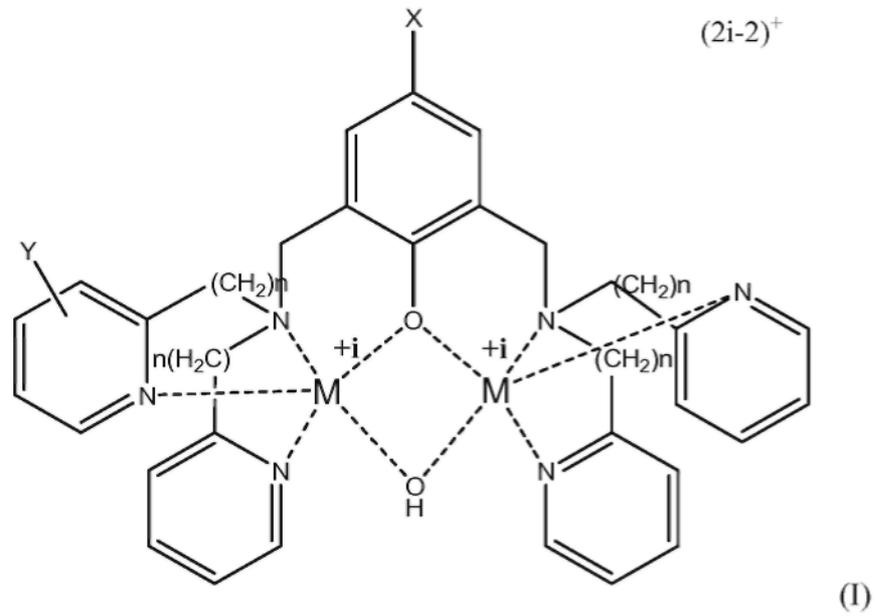
en la que

- Z representa  $NH_2$  o un grupo  $-(CH_2)_m-NH-A$ , o un grupo  $-CH_2-NHC(O)-R-NH-A$  en el que R es un grupo alquilo en  $C_2-C_{10}$ , de preferencia en  $C_6-C_{10}$ , lineal o ramificado y A es H o un grupo fluoróforo, con la condición de que, cuando  $m = 2$ , A sea diferente de H
- $m = 1$  a 12
- $n = 1, 2$  o 3
- Y representa  $(CH_2)_p-NH_2$  en el que  $p = 0$  a 12.

6. Compuesto de fórmula (III) de acuerdo con la reivindicación 5, en la que

- Z representa  $-(CH_2)_m-NH-A$  en el que  $m = 1$ , A representa H,  $n = 1$  y  $p = 0$ ; o
- Z representa  $-(CH_2)_m-NH-A$  en el que  $m = 1$ , A representa H,  $n = 2$  y  $p = 0$ ; o
- Z representa  $-CH_2-NHC(O)-R-NH-A$ , A representa H,  $n = 1$  y  $p = 0$ .

7. Método de detección y/o caracterización de micropartículas celulares, caracterizado por que comprende la puesta en contacto de un compuesto de fórmula (I) o (II)



5 tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares y la detección y/o la caracterización de las micropartículas capturadas por dicho compuesto de fórmula (I) o (II).

8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que el compuesto de fórmula (I), en una primera etapa, se inmoviliza sobre un soporte sólido.

10 9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

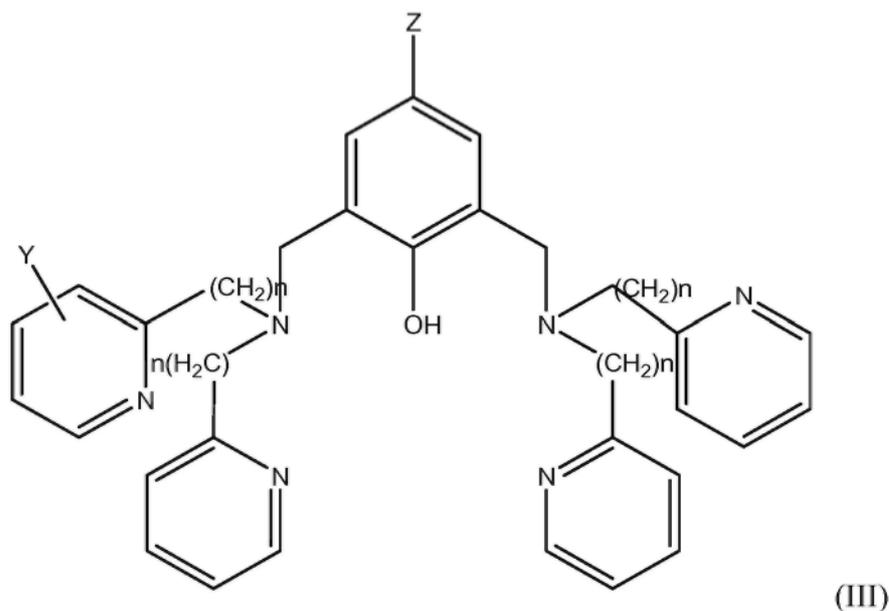
- inmovilización de un compuesto de fórmula (I) o (II) sobre la superficie del soporte sólido,
- puesta en contacto con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares
- 15 - captura de las micropartículas celulares sobre dicho compuesto de fórmula (I) o (II), y
- detección y/o caracterización de las micropartículas celulares capturadas.

10. Método de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- activación de un soporte sólido,
- inmovilización de un compuesto de fórmula (I) o (II) tal como se han definido anteriormente sobre la superficie del soporte activado,
- puesta en contacto con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares
- captura de las micropartículas celulares sobre dicho compuesto de fórmula (I) o (II), y
- detección y/o caracterización de las micropartículas celulares capturadas.

11. Método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que comprende las siguientes etapas

- inmovilización de un compuesto de fórmula (III)



en la que

- Z representa NH<sub>2</sub> o un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-A, o un grupo -CH<sub>2</sub>-NHC(O)-R-NH-A en el que R es un grupo alquilo en C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, de preferencia en C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, lineal o ramificado y A es H o un grupo fluoróforo, con la condición de que, cuando m = 2, A sea diferente de H
- m = 1 a 12
- n = 1, 2 o 3
- Y representa (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NH<sub>2</sub> en el que p = 0 a 12 sobre un soporte sólido

- incubación del conjunto soporte-ligando en presencia de ion metálico, con el fin de que el complejo dinuclear metálico de fórmula (I) o (II) se forme *in situ*
- puesta en contacto de dicho compuesto de fórmula (I) o (II) con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares,
- captura de las micropartículas celulares sobre dicho compuesto de fórmula (I) o (II), y
- detección y/o caracterización de las micropartículas celulares capturadas.

12. Método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que el compuesto de fórmula (I) o (II) se usa en solución.

13. Método de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que se usa un compuesto de fórmula (I) o (II) en la que X representa -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-A, -CH<sub>2</sub>-NHC(O)-R-NH-A en el que R es un grupo alquilo en C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, de preferencia en C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> lineal o ramificado y A es un grupo fluoróforo.

14. Método de detección y/o caracterización de micropartículas celulares de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, que permite la evaluación del riesgo de desarrollo y/o el seguimiento terapéutico de diversas patologías, que comprende las siguientes etapas:

- la puesta en contacto de un compuesto de fórmula (I) o (II) tal como se define en la reivindicación 7 con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares,
  - la detección y/o la caracterización de las micropartículas capturadas por dicho compuesto de fórmula (I), y
  - la comparación del resultado de la medición realizada en la etapa precedente con el resultado de una medición idéntica realizada sobre una muestra de ensayo de fluido biológico de control.
- 5
15. Método de diagnóstico, de evaluación del riesgo de desarrollo y/o de seguimiento terapéutico de diversas patologías, que comprende las siguientes etapas:
- la puesta en contacto de un compuesto de fórmula (I) o (II) tal como se define en la reivindicación 7 con una muestra de ensayo de fluido biológico susceptible de contener micropartículas celulares,
  - la detección y/o la caracterización de las micropartículas capturadas por dicho compuesto de fórmula (I), y
  - la comparación del resultado de la medición realizada en la etapa precedente con el resultado de una medición idéntica realizada sobre una muestra de ensayo de fluido biológico de control.
- 10
- 15
16. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 o 15, caracterizado por que, o bien el fluido biológico de control es un fluido biológico idéntico al sometido a ensayo, pero que proviene de un individuo que se considera sano, o bien el fluido biológico de control proviene del mismo individuo que el fluido biológico sometido a ensayo, pero resulta de una toma de muestra anterior.
- 20
17. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, caracterizado por que dicha patología se elige entre las patologías trombóticas, inflamatorias y/o metabólicas, las enfermedades o accidentes cardiovasculares o neurovasculares, diabetes, cáncer o enfermedad de Alzheimer.
- 25
18. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, caracterizado por que las micropartículas capturadas se revelan usando anticuerpos marcados específicos que se pueden detectar usando un análisis fotométrico o medición de fluorescencia.

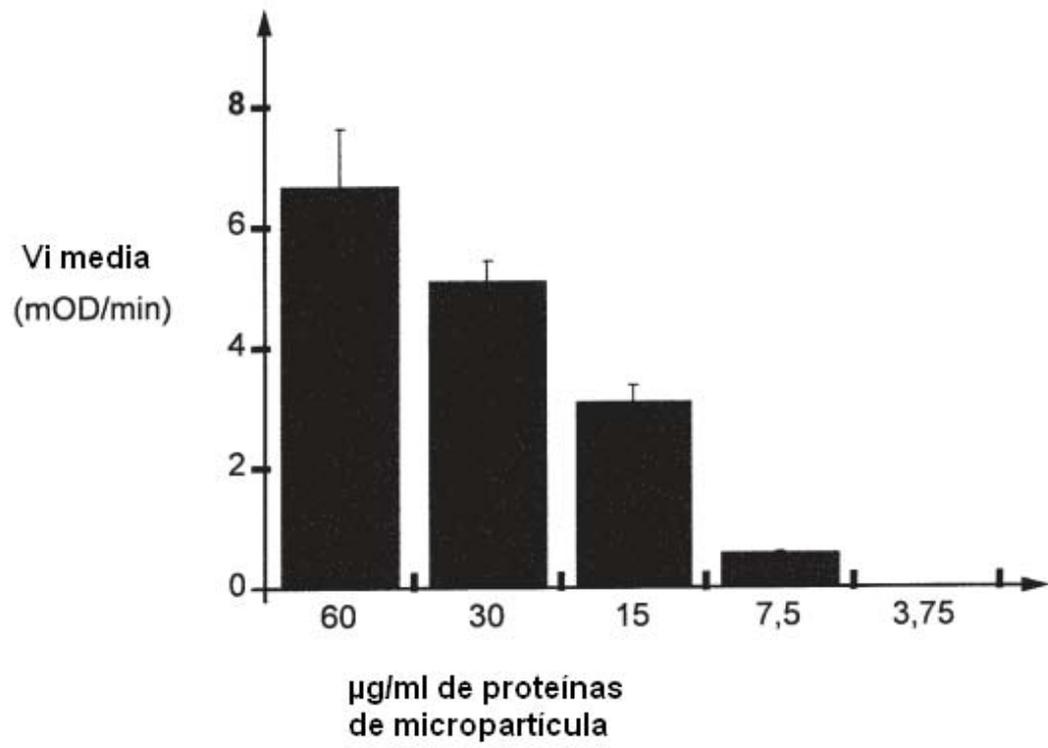
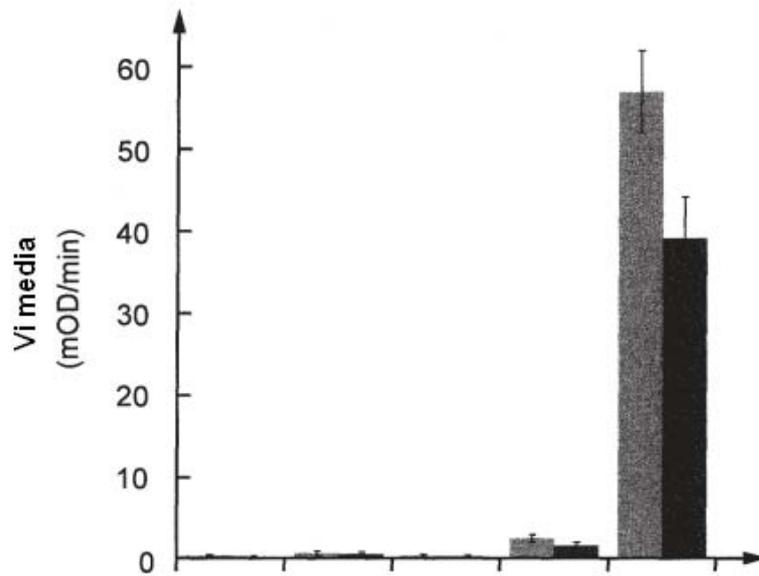


Fig. 1

Fig. 2



ABTS	+	+	+	+	+
Anticuerpo anti-CD105	-	+	-	+	+
Anticuerpo secundario	-	-	+	+	+
Microparticulas	-	-	-	-	+

Fig. 3

