

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 916**

21 Número de solicitud: 201330861

51 Int. Cl.:

**G01N 1/30** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

**C09B 13/00** (2006.01)

**C09B 57/02** (2006.01)

**C09B 57/14** (2006.01)

**C07D 311/82** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

10.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.07.2014

Fecha de la concesión:

14.04.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.04.2015

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)  
Hospital Real. Avda. Hospicio s/n  
18071 Granada (Granada) ES

72 Inventor/es:

ÁLVAREZ PEZ, José María;  
CROVETTO GONZÁLEZ, Luis;  
CUERVA CARVAJAL, Juan Manuel;  
GIRÓN GONZÁLEZ, María Dolores;  
JUSTICIA LADRÓN DE GUEVARA, José;  
ORTE GUTIÉRREZ, Ángel;  
RUEDAS RAMA, María José;  
SALTO GONZÁLEZ, Rafael;  
TALAVERA RODRÍGUEZ, Eva María;  
MARTÍNEZ PERAGÓN, Ángela y  
PAREDES MARTÍNEZ, José Manuel

54 Título: **Procedimiento para la estimación de la concentración de fosfatos en células vivas, colorante xanténico y síntesis del mismo**

57 Resumen:

Procedimiento para la estimación de la concentración de fosfatos en células vivas, colorante xanténico y síntesis del mismo.

La presente invención describe un procedimiento de estimación de la concentración de fosfatos presente en células vivas a través de la medición del tiempo de decaimiento de fluorescencia de un colorante xanténico añadido a las células y sometido a una excitación mediante luz láser pulsada. También se describe un nuevo colorante xanténico derivado de la fluoresceína que posee mejores propiedades espectrales que los ya conocidos y un procedimiento de síntesis de dicho colorante.

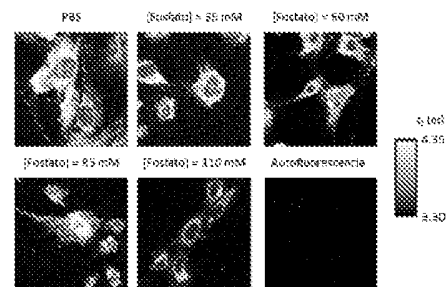


Figura 2

ES 2 474 916 B1

## DESCRIPCIÓN

### PROCEDIMIENTO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATOS EN CÉLULAS VIVAS, COLORANTE XANTÉNICO Y SÍNTESIS DEL MISMO

5

#### SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuentra dentro del sector de la biomedicina, dentro de las técnicas relacionadas con sensores y microscopia de fluorescencia.

10

En particular, se trata de un procedimiento para cuantificar el fosfato soluble en el citoplasma de células vivas mediante la medida de tiempos de vida de fluorescencia y microscopía de imagen de fluorescencia.

15

Asimismo, la invención se enmarca también en el sector químico. En particular se describe la síntesis de una nueva sonda fluorescente derivada del xanteno que se utiliza en el procedimiento de cuantificación de fosfato mencionado.

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

20

La fluoresceína y sus derivados constituyen una familia de colorantes muy empleada como sondas fluorescentes, por sus altos rendimientos cuánticos, solubilidad, fácil bioconjugación y excitación con un láser de ión de argón (488 nm). La fluoresceína, en disolución acuosa se presenta bajo cuatro diferentes formas prototrópicas en función del pH, a saber; catión, neutro, monoanión y dianión. A su vez, la forma neutra se presenta bajo tres formas tautoméricas; lactona, cetona y zwitterión. Los coeficientes de extinción y los rendimientos cuánticos de fluorescencia, son muy distintos para las diferentes especies prototrópicas. A pH cercano al fisiológico solo tiene lugar el equilibrio monoanión/dianión y ambas especies presentan espectros de absorción y de fluorescencia ligeramente diferentes. El dianión posee mayor coeficiente de extinción

30

que el monoanión, medidos cada uno en su correspondiente máximo de absorción. Asimismo, el dianión tiene mayor rendimiento cuántico de fluorescencia, aunque el monoanión también fluoresce con relativa intensidad y con máximo de emisión casi coincidente en longitud de onda con el del dianión (Yguerabide, J.; Talavera, E.M.; Alvarez, J.M.; Quintero, B., Photochem. Photobiol. 1994, 60, 435-441). Debido a las

35

favorables características espectrales de la fluoresceína, se ha sintetizado un número

importante de derivados de esta, que replican aproximadamente sus espectros y presentan características fotofísicas favorables para ciertos fines concretos.

Hace unos años, algunos de los inventores de esta patente, pusieron de manifiesto la existencia de una reacción de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT) entre el monoanión y dianión de fluoresceína (Alvarez-Pez, J.M.; Ballesteros, L.; Talavera, E.M.; Yguerabide, J., J. Phys. Chem. A 2001, 105, 6320-6332), que modifica las características de emisión de fluorescencia de ambas especies. Propusieron un modelo en dos estados en presencia de un dador/aceptor protónico y dedujeron las expresiones teóricas derivadas del modelo que permitieron recuperar los parámetros cinéticos y espectrales del sistema estudiado. Además, se demostró la dependencia de estos dos tiempos de decaimiento con la concentración de fosfato, a distintos valores de pH. También se establecieron las ecuaciones teóricas y el software necesario para aplicar el análisis global compartimental (GCA), una herramienta de cálculo muy potente, a la obtención de los parámetros cinéticos y espectrales correspondientes a la citada reacción ESPT (Crovetto, L.; Orte, A.; Talavera, E.M.; Alvarez-Pez, J.M.; Cotlet, M.; Thielemans, J.; De Schryver, F.C.; Boens, N., J. Phys. Chem. B 2004, 108, 6082-6092).

En resumen, la presencia de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado mediada por un buffer de fosfatos, modula los decaimientos de fluorescencia de la fluoresceína y de sus derivados. Dependiendo de factores experimentales como el pH y la longitud de onda de excitación, los valores de los dos tiempos de decaimiento pueden ser muy diferentes, pudiéndose tunear variando convenientemente los citados factores externos. Sin embargo, la naturaleza biexponencial de los decaimientos de fluorescencia de la fluoresceína, hace difícil su aplicación como sensor mediante la técnica de microscopia de imágenes de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM).

En el año 2005 un grupo japonés sintetizó una serie de derivados de la fluoresceína, que denominaron como Tokyo Green (Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 4888-4894). Dos de los derivados en cuestión, el 9-[1-(2-Metoxi-5-metilfenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (2-OMe-5-Me TG) y el 9-[1-(2-Metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (2-Me-4-OMe TG) tienen interesantes propiedades espectrales. En tales derivados se reemplazó el grupo carboxilo del ácido benzoico de la molécula de fluoresceína por un grupo metilo o metoxilo, lo que implica que solo puede existir una forma aniónica de estas moléculas. Esto disminuye el número de especies prototrópicas en disolución y simplifica el número de equilibrios entre ellas. Además, los derivados 2-OMe-5-Me TG

y 2-Me-4-OMe TG, se pueden considerar como sondas fluorescentes "ON/OFF". En efecto, cuando la mitad xanteno de los derivados está protonada (a pH ácido) el rendimiento cuántico de fluorescencia es igual o muy cercano a cero, mientras que, a pH alcalino, el rendimiento cuántico de la forma aniónica es similar al de la fluoresceína. Esta característica de sondas fluorescentes "ON/OFF" acompañadas de un bajo tiempo de vida de fluorescencia para la especie neutra, nos indicó la posibilidad de conseguir un decaimiento monoexponencial cuando se promueva la reacción ESPT entre la especie neutra y la aniónica, mediante la adición de una concentración suficiente de buffer de fosfatos, a valores de pH cercanos al fisiológico.

10 Por esta razón, se abordó un estudio fotofísico en profundidad de ambos compuestos. Tal como se esperaba, la reacción ESPT entre las especies neutras y los correspondientes aniones solo tiene lugar en presencia de una concentración relativamente baja de un buffer de fosfatos, a pH alrededor de la neutralidad. Los tiempos cortos de ambos decaimientos son del orden del picosegundo y prácticamente se hacen nulos a concentraciones de fosfato mayores de 0,05 M, mientras que los tiempos de decaimiento más largos (entre 2 y 4 ns) resultan dependientes de la concentración de fosfato (Crovetto, L.; Paredes, J.M.; Rios, R.; Talavera, E.M.; Alvarez-Pez, J.M., *J. Phys. Chem. A* 2007, 111, 13311-13320 y Paredes; J.M.; Crovetto, L.; Rios, R.; Orte, A.; Alvarez-Pez, J.M.; Talavera, E.M., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009, 11, 5400-5407). Además, las ventajosas características espectroscópicas del 2-Me-4-OMe TG motivó que con este colorante se extendiera el estudio fotofísico a nivel de moléculas individuales. Así, se obtuvieron los tiempos de decaimiento de fluorescencia recuperados a nivel de conjunto y de moléculas individuales, junto a los valores simulados con el modelo teórico establecido y las constantes cinéticas calculadas mediante GCA. La coincidencia de los tres conjuntos de valores fue excelente. Como resultado cuantitativo de interés se debe de destacar que la sensibilidad del tiempo de decaimiento frente al fosfato, se concreta en que un incremento de concentración de fosfatos desde 0 hasta 0.3 M decrece el tiempo de decaimiento desde 3.7 ns hasta 3.0 ns, a pH 6.5. Esta sensibilidad del tiempo de decaimiento a las condiciones ambientales hace de estos colorantes serios candidatos para sondear la concentración de fosfato a tiempo real en células vivas.

30 El reconocimiento selectivo de aniones de interés biológico ha recibido una gran atención por parte de químicos y biólogos. El ión fosfato juega un importante papel, no solo en el control del pH sanguíneo, sino también en la energética y metabolismo de las células. En este sentido, la regulación y control de la captación de fosfato en osteoblastos es particularmente importante. Asimismo, los aniones fosfato juegan un

papel importante en la transducción de señales y almacenamiento de energía en los sistemas biológicos y muchas de las enzimas comunes, tales como quinasas y fosfatasas, producen o consumen fosfato inorgánico que está también relacionado con la fosforilación de proteínas. De acuerdo con esto, la detección del aumento o  
5 disminución de la concentración de fosfato en los alrededores de estas enzimas es una forma común de monitorizar la actividad enzimática o el proceso de fosforilación proteica. Por este motivo, varios grupos de investigación han puesto su atención en la detección y discriminación de esos aniones. Sin embargo, hasta ahora se conocen muy pocos sensores no invasivos que muestren alta selectividad y sensibilidad en  
10 medios acuosos, pero ninguno que pueda detectar cuantitativamente y a tiempo real el anión fosfato en el citoplasma de células vivas.

### **OBJETO DE LA INVENCION**

15 El primer objeto de la presente invención es un procedimiento para estimar la concentración de fosfato presente en células, preferentemente en el citoplasma de células permeabilizadas, a través de la obtención de los tiempos de decaimiento de fluorescencia de colorantes xanténicos mediante microscopia de fluorescencia con excitación pulsada (FLIM) y la conversión en imágenes microscópicas de esos tiempos  
20 de decaimiento de fluorescencia. A modo de ejemplo, se puede seguir en tiempo real la penetración de fosfato soluble en el citoplasma de osteoblastos en fase de diferenciación celular.

Un segundo objeto de la invención es el empleo del nuevo colorante xanténico  
25 derivado de la fluoresceína, 9-(4-ter-butil-2-metoxifenil)-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona, denominado (2-OMe-4-tBu GG), que posee mejores propiedades espectrales que los ya conocidos y por tanto resulta muy adecuado para llevar el cabo el procedimiento mencionado.

30 Un tercer objeto de la invención es un procedimiento de síntesis del colorante anteriormente citado.

### **DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

35

Figura 1.- Muestra los cambios en el tiempo de decaimiento del 2-Me-4-OMe TG ( $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ ) en el citoplasma de osteoblastos tratados con  $\alpha$ -toxina en PBS adicionado de diferentes concentraciones de fosfato. El decrecimiento de  $\tau$  se calculó con referencia al tiempo de decaimiento recogido en disolución de PBS ([fosfato] =  $10 \times 10^{-3} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ ). La línea continua representa el cambio en el tiempo de decaimiento calculado usando las constante de velocidad estimadas por GCA.

Figura 2.- Muestra las imágenes FLIM en el citoplasma de osteoblastos permeabilizados con  $\alpha$ -toxina.

10

Figura 3.- Muestra los cambios en el tiempo de decaimiento del 2-Me-4-OMe TG ( $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ ) en el citoplasma de osteoblastos recogido durante el periodo de diferenciación de pre-osteoblastos MC3T3-E1 (triángulos), junto al tiempo de decaimiento de fluorescencia en el interior de células CHO no permeabilizadas recogido en el mismo periodo temporal que los pre-osteoblastos (círculos). También se representan los niveles extracelulares de fosfatasa alcalina (ALP) durante la diferenciación de las células MC3T3-E1 (cuadrados). Las líneas continuas se incluyen como referencia visual.

Figura 4.- Muestra las imágenes FLIM de las células CHO de la Figura 3.

Figura 5.- Muestra las imágenes FLIM de las células MC3T3-E1 de la Figura 3.

Figura 6.- Muestra los cambios en el tiempo de decaimiento del 2-OMe-4-*t*Bu GG ( $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ ) en el citoplasma de osteoblastos recogido durante el periodo de diferenciación de pre-osteoblastos MC3T3-E1. Las líneas continuas se incluyen como referencia visual.

### 30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

El procedimiento objeto de la presente invención estima, en tiempo real, la concentración de fosfatos presente en células vivas a través de la medición del tiempo de decaimiento de fluorescencia de un colorante xanténico añadido a las células y sometido a una excitación mediante luz láser pulsada.

35

Utilizando este procedimiento en diferentes instantes de tiempo es posible analizar las variaciones temporales de la concentración de fosfato presente en células vivas.

5 De forma preferente, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

1.- Añadir un colorante xanténico en disolución a la muestra de células.

2.- Excitar el colorante presente en la muestra mediante luz pulsada.

10

3.- Obtener, mediante microscopía de tiempos de vida de fluorescencia, imágenes de la muestra de células de  $X$  píxeles de ancho e  $Y$  píxeles de alto.

15

4.- Generar una matriz de dimensiones  $(X, Y)$ , donde cada elemento  $(x, y)$  contiene el histograma de distribución de tiempos de detección de los fotones recogidos, el cual representa el decaimiento de fluorescencia.

20

5.- Realizar el ajuste del decaimiento de fluorescencia recogido en cada elemento,  $(x, y)$ , a un modelo multiexponencial, preferentemente mediante análisis de mínimos cuadrados no lineal.

25

6.- Generar una matriz, de dimensiones  $(X', Y')$ , en la que cada elemento contiene la estimación, a partir del modelo ajustado en la etapa anterior, del tiempo largo del decaimiento de fluorescencia,  $\tau_2$ , del colorante xanténico.

30

7.- Seleccionar, el conjunto de píxeles de interés para el análisis. En particular se seleccionarán los píxeles correspondientes al citoplasma celular, de una o varias células.

8.- Reconstruir y ajustar el decaimiento de fluorescencia global de la región de interés, en particular del citoplasma celular.

35

9.- Estimar la concentración total de fosfato mediante las ecuaciones procedentes de un modelo cinético de reacción entre los iones de fosfato y el colorante xanténico.

De forma opcional, para una visualización espacial de los resultados, tras la etapa 6, se puede asociar una escala de color arbitrario a los valores contenidos en la matriz anterior y generar una imagen de forma que cada pixel esté coloreado según el valor del tiempo largo del decaimiento de fluorescencia,  $\tau_2$ , calculado en la etapa 6.

La obtención de esta imagen facilita la selección, en la etapa 7, de las regiones de interés para el análisis

10

Repitiendo el procedimiento en diferentes tiempos o estados celulares, las variaciones en  $\tau_2$  permiten establecer variaciones en la concentración de iones de las especies de fosfato.

15

### **Descripción detallada de cada una de las etapas del procedimiento**

#### **1.- Añadir un colorante xanténico en disolución a la muestra de células**

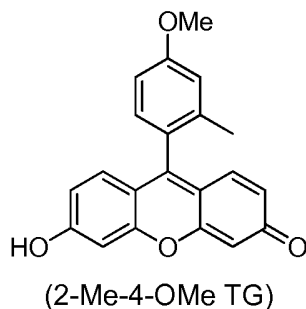
Se añade a la muestra de células una disolución acuosa del colorante xanténico, preferentemente hasta alcanzar una concentración entre  $10^{-5} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$  y  $10^{-9} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ , más preferentemente con una concentración de  $10^{-7} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ . Dado que el colorante xanténico tiene carácter apolar atraviesa de manera espontánea la membrana celular, permaneciendo en el interior de las células mientras dura la recogida de los decaimientos de fluorescencia.

El colorante xanténico utilizado debe tener las siguientes características:

- 1) un único grupo protonable en la estructura xanténica; y
- 2) que se comporte como una sonda binaria o "ON/OFF", es decir que el tiempo de vida de la especie prototrópica protonada sea inferior a 0.2 nanosegundos.

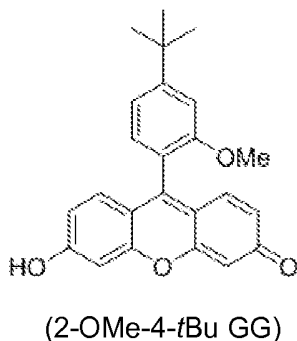
En una realización preferente, el procedimiento utiliza el colorante denominado 2-Me-4-OMe TG (Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 4888-4894).





- 5 En una realización más preferida, el procedimiento utiliza el colorante 9-(4-ter-butil-2-metoxifenil)-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (denominado 2-OMe-4-tBu GG), que también es objeto de la invención, y que posee una estructura adecuada para proporcionar mayor sensibilidad que 2-Me-4-OMe TG.

10



- 15 2.- Excitar el colorante presente en la muestra mediante luz pulsada.

La excitación del colorante añadido a la muestra se realizará con una fuente de luz pulsada, cuya radiación sea preferentemente monocromática con una longitud de onda entre 400 y 500 nanómetros, con una frecuencia de repetición controlable en el rango de 1 a 20 Mhz y una anchura temporal del pulso preferentemente inferior a 500 picosegundos.

20

Aunque se puede utilizar cualquier fuente de luz pulsada, de forma preferente se empleará como fuente de excitación una fuente láser, ya que suelen reunir las características de monocromaticidad y estrecha anchura de pulso. La potencia media de la luz pulsada a la entrada del microscopio deberá ser superior a 5 nano-vatios, e inferior a 1 mW para no provocar el deterioro del colorante.

25

También pueden emplearse lámparas de flash, rellenas de gas hidrógeno o nitrógeno, seleccionando la longitud de onda mediante un monocromador. No obstante, la elevada anchura temporal de estos pulsos no los hace preferentes para su aplicación.

5

3.- Obtener, mediante microscopía de tiempos de vida de fluorescencia, una imagen de la muestra de células de X pixeles de ancho e Y pixeles de alto,

Los elementos necesarios para llevar a cabo esta etapa son los siguientes:

- 10 - Un espejo dicroico adecuado, que refleje la luz de excitación hacia el interior del microscopio y transmita las longitudes de onda de emisión de fluorescencia del colorante.
- 15 - Un microscopio confocal, con un objetivo de al menos 6 aumentos y alta apertura numérica, en el que se coloca el espécimen a estudio, junto con un sistema mecánico de escaneo de regiones con resolución en el rango de los micrómetros.
- 20 - Una lente de focalización de la radiación de fluorescencia que focaliza ésta hacia una apertura confocal de diámetro inferior a 150  $\mu\text{m}$ .
- 25 - Un sistema de detección con sensibilidad suficiente para detectar fotones individuales. Ejemplos pueden ser los fotodiodos de avalancha o dispositivos de carga acoplada (CCD).
- Un sistema electrónico de correlación temporal, capaz de medir el tiempo transcurrido en la escala de nanosegundos, entre el lanzamiento del pulso láser excitatriz y el evento de detección del fotón (modalidad de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo, o TCSPC, y de forma preferente mediante la metodología "*Time-Tagged-Time-Resolved*" ,TTTR).

Se pueden considerar elementos adicionales, que pueden mejorar el rendimiento del procedimiento. Estos elementos pueden ser:

- 30 - Una lámina de onda o retardador para cambiar el plano de polarización de la radiación de excitación, anteriormente a la introducción de ésta en el microscopio.
- Filtros de corte o de paso de banda tras el espejo dicroico, antes de la apertura confocal, o antes del sistema de detección, para eliminar radiación espuria no debida a la emisión de fluorescencia.
- 35 - Un espejo dicroico tras la apertura confocal para dirigir los fotones emitidos a más de un sistema de detección.

Con estos elementos la recolección de la imagen se realiza colocando la muestra de células a analizar, con el colorante xanténico, en el microscopio. La luz pulsada de excitación se dirige mediante los sistemas ópticos a la muestra, enfocándola en una región con células presentes en el vidrio. Mediante el sistema mecánico se escanea un área de entre 20 — 10000  $\mu\text{m}^2$ , acompasando el sistema de detección para construir una matriz con una resolución entre 10 y 50 píxeles por  $\mu\text{m}^2$ . El tiempo de exposición debe ser el necesario para recoger al menos 100 fotones por píxel.

4.- Generar una matriz de dimensiones  $(X, Y)$ , donde cada elemento  $(x, y)$  contiene el histograma de distribución de tiempos de detección de los fotones recogidos, el cual representa el decaimiento de fluorescencia.

En la presente invención, el término “histograma” (asociado a un píxel) se refiere a la distribución de los tiempos de llegada de todos los fotones recogidos en un píxel. Es decir, un conjunto de  $T$  valores bidimensionales  $(t, n_t)$ , donde  $t$  indica un instante, y  $n_t$  representa dimensional el número de fotones emitidos en ese instante por la región de la muestra representada, en la imagen obtenida en la etapa 3, por un píxel. Por “Número de fotones por píxel” se entiende el número total de fotones que se recogen para cada píxel.

El número total de fotones recogidos en cada píxel deben de estar correlacionados en el tiempo con respecto al pulso de excitación, mediante el sistema electrónico de TCSPC. Así, se construye una matriz de dimensiones  $(X, Y)$  en las que cada elemento  $(x,y)$  almacena el histograma temporal de decaimiento de fluorescencia asociado al píxel con coordenadas  $(x,y)$ .

La resolución del histograma TCSPC ha de ser como máximo de 400 picosegundos por división del histograma (o canal).

A modo de ejemplo, una imagen de  $80 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$  tomada con una resolución de  $512 \times 512$  píxeles (41 píxeles por  $\mu\text{m}^2$ ), con un tiempo de exposición de 0.60 ms por píxel, y una resolución de 29 ps por canal en la escala temporal TCSPC.

5.- Estimación de los tiempos de decaimiento de fluorescencia recogidos en cada elemento,  $(x,y)$

Los histogramas individuales asociados a cada píxel de la imagen se ajustan, preferentemente, mediante métodos no lineales a modelos de decaimiento que incluyan entre sus parámetros el tiempo de decaimiento,  $\tau_2$ , del colorante xanténico, que es sensible a la concentración de fosfato en virtud de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado. Preferentemente se utilizarán modelos que representen el decaimiento de fluorescencia,  $w$ , en forma de funciones multi-exponenciales (suma de varios términos exponenciales) en función del tiempo,  $t$ .

El modelo de decaimiento preferido es una función biexponencial de la forma

$$w = A_1 \times e^{-t/\tau_1} + A_2 \times e^{-t/\tau_2} + w_0$$

siendo  $\tau_1$  un parámetro que representa las contribuciones de tiempo corto al decaimiento de fluorescencia (por ejemplo, la autofluorescencia del interior celular);  $\tau_2$  el parámetro ajustable que representa el tiempo de decaimiento del colorante xanténico que es sensible a la concentración de fosfato en virtud de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado;  $A_1$  y  $A_2$  los parámetros ajustables que representan las abundancias relativas de cada tiempo de decaimiento, y  $w_0$  un parámetro ajustable que representa el ruido de fondo.

Para realizar el ajuste se considerará que  $\tau_1$  está comprendido entre 0.5 y 2 ns, preferentemente igual a 1.5 ns.

El ajuste no lineal puede realizarse fundamentalmente por dos metodologías: 1) sin tener en cuenta la influencia de la función de respuesta de la luz de excitación (IRF) mediante la aplicación de una ventana temporal; y 2) mediante métodos de deconvolución iterativa, bien establecidos para el análisis de decaimientos de emisión de fluorescencia, donde se tiene en cuenta la convolución de la función del decaimiento exponencial de fluorescencia con la IRF.

La optimización de los parámetros ajustables puede realizarse mediante minimización de mínimos cuadrados, o bien por estimación por máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood Estimator*, MLE), siendo esta última preferida cuando el número de fotones por píxel es bajo.

Para conseguir ajustes adecuados, se debe de haber recogido al menos unos 1000 fotones por píxel. Si no se llegara a este valor, en este punto pueden llevarse a cabo dos procedimientos para aumentar el número de fotones por píxel (esto consigue mejores ajustes y por tanto mejores resultados en la estimación de los parámetros de interés): 1) se podrá realizar previamente un re-escalado de la imagen acumulando píxeles adyacentes, quedando la matriz en píxeles como  $(X', Y')$  (reduciendo la resolución en píxeles por  $\mu\text{m}^2$ , pero aumentando el número de fotones detectados por píxel); y 2) se podrá reducir la resolución de la escala temporal TCSPC, mejorando la estadística del ajuste no lineal (por ejemplo, si la imagen se ha recogido con una resolución de 29 ps/canal, pueden acumularse cuatro canales consecutivos, hasta una resolución de 116 ps/canal).

A modo de ejemplo, para este análisis se puede emplear el *software* SymPhoTime (PicoQuant).

6.- Generar una matriz, de dimensiones  $(X', Y')$  en píxeles, en la que cada elemento contiene la estimación del tiempo de vida de fluorescencia largo,  $\tau_2$ , del colorante xanténico.

El parámetro de interés, sensible a la concentración de fosfato es el tiempo de decaimiento definido como  $\tau_2$ . Así, se construirá una nueva matriz,  $(X', Y')$ , en la que cada elemento  $(x', y')$  contiene el valor del tiempo de decaimiento  $\tau_2$  obtenido en la etapa anterior. Las dimensiones espaciales de la nueva matriz  $(X', Y')$  serán las mismas que las de la matriz original  $(X, Y)$ , en términos de los  $\mu\text{m}^2$  escaneados. Sin embargo, si se ha procedido al re-escalado de la imagen, juntando píxeles adyacentes (descrito en la etapa anterior), las dimensiones en píxeles de  $(X', Y')$  serán menores que  $(X, Y)$ . Si no se ha realizado re-escalado de la imagen, entonces  $X' = X$  e  $Y' = Y$ .

7.- Seleccionar el conjunto de píxeles de interés para el análisis.

En particular, se seleccionarán las regiones de la imagen que correspondan al citoplasma celular, lugar donde se acumulan principalmente los colorantes xanténicos. Esta selección se podrá realizar manualmente o mediante algoritmos matemáticos adecuados. Se puede realizar la selección de la región de interés de células individuales, o simultáneamente de varias células si aparecieran en la imagen.

Para facilitar la selección de las regiones de interés de forma manual y para mejorar la visualización espacial de los resultados, opcionalmente se puede asociar una escala de color arbitrario a los valores contenidos en la matriz obtenida en la etapa 6 y  
5 generar una imagen de forma que cada pixel esté coloreado según el valor del tiempo de vida del fluoróforo,  $\tau_2$ , calculado en la etapa 5.

Se denominará a la imagen generada en esta etapa imagen FLIM, por "Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy". Para una visualización más realista de la imagen de la  
10 matriz  $(X', Y')$ , la imagen se modulará en intensidad según el número de fotones detectados en cada píxel. A modo de ejemplo, en la Figura 2 se muestra una imagen FLIM coloreada donde se representa, en una escala de colores arbitraria, el tiempo de decaimiento  $\tau_2$  del colorante xanténico 2-Me-4-OMe TG en el interior de células de pre-  
15 ostoblastos permeabilizadas con  $\alpha$ -toxina, para que las concentraciones extracelular e intracelular sean iguales, e inmersas en un medio constituido por buffer PBS a pH 7.35 y diferentes concentraciones añadidas de fosfato.

Altos valores de  $\tau_2$  (representados en las figuras 2, 4 y 5 por el color blanco) indican baja concentración de fosfato, mientras que bajos valores de  $\tau_2$  (representados en las  
20 figuras 2, 4 y 5 por el color gris oscuro) indica una mayor la concentración de fosfato.

#### 9.- Reconstruir y ajustar el decaimiento de fluorescencia total de la región de interés

Una vez seleccionados los píxeles que constituyen la región de interés (citoplasma  
25 celular) se reconstruye el decaimiento de fluorescencia total de los fotones detectados en esta región. Este histograma de decaimiento se obtiene mediante la suma aritmética de los histogramas TCSPC individuales asociados a cada uno de los pixeles que contiene la región en la matriz  $(X, Y)$  original.

30 Este decaimiento de fluorescencia total puede ajustarse mediante los métodos de análisis no lineal y deconvolución iterativa descritos anteriormente, para la obtención del valor promedio final de  $\tau_2$  del colorante xanténico en la región de interés.

La presencia del tiempo de decaimiento corto del colorante,  $\tau_1$ , así como la posible  
35 contribución de autofluorescencia del citoplasma celular, que usualmente tiene

componentes con tiempos de vida cortos, puede minimizarse a través de un análisis retardado en el tiempo (entre 1 y 2 nanosegundos) de la señal fluorescente recogida.

5 10.- Estimar la concentración total de fosfato mediante las ecuaciones procedentes del modelo cinético de reacción entre los iones de fosfato y el colorante xanténico.

La reacción de transferencia protónica en estado excitado entre las especies del tampón fosfato y los colorantes xanténicos, puede describirse adecuadamente con un modelo cinético de reacción en dos estados excitados. Como se ha comentado  
10 previamente, la resolución de estos modelos permite predecir la variación del tiempo de decaimiento de fluorescencia de las sondas mencionadas y relacionarlos con las ecuaciones que se derivan del modelo para obtener de manera precisa y exacta la concentración de fosfato presente en el medio, a cada valor de pH.

Sin embargo, la presencia en el interior celular de un medio acuoso complejo, con  
15 diversas proteínas, orgánulos, sales, etc. produce un ligero aumento (entorno a 0.5 nanosegundos) en el tiempo de decaimiento  $\tau_2$  con respecto a aquel predicho por la teoría, probablemente debido a una mayor protección del colorante al disolvente. No obstante, este efecto no afecta a la variabilidad de este tiempo largo del decaimiento con la concentración de fosfato, ya que el aumento observado es siempre de la misma  
20 magnitud (entorno a 0.5 nanosegundos). Así, el parámetro de interés para la estimación de la concentración de fosfato será el incremento del tiempo de decaimiento largo, con respecto a su valor en ausencia de fosfato en el interior celular,  $\tau_0$ . Este incremento del tiempo de decaimiento se notará como  $\Delta\tau$ .

25 La estimación de la concentración total de fosfato en el interior celular se realizará mediante el empleo de la siguiente ecuación:

$$C^{\text{fosfato}} = \frac{([H^+] + K_a^{\text{fosfato}}) \times [(\Delta\tau + \tau_0) \times [k_{01} + k_{02} + k_{21} + k_{12} \times [H^+]] + (\Delta\tau + \tau_0) \times (k_{02} \times k_{21} - k_{01} \times k_{02} + k_{01} \times k_{12} \times [H^+]) - 1]}{[k_{12}^B \times [H^+]] \times [k_{01} \times (\Delta\tau + \tau_0) - 1] + K_a^{\text{fosfato}} \times k_{21}^B \times [k_{02} \times (\Delta\tau + \tau_0) + 1]} \times (\Delta\tau + \tau_0)$$

en donde la constante de velocidad para los procesos de desactivación viene dada por  
30  $k_{01}$  y  $k_{02}$  para la especie neutra y aniónica, respectivamente.  $k_{21}$  representa la constante cinética de la disociación unimolecular de la especie neutra a la aniónica, mientras que  $k_{12}$  es la constante de segundo orden para el proceso bimolecular de reprotonación del anión.  $k_{21}^B$  y  $k_{12}^B$  son las constantes cinéticas para la transferencia

protónica en el estado excitado mediada por las especies del aceptor/dador protónico. Las unidades de  $\tau$  y  $\Delta\tau$  deben expresarse en segundos.

Ya que el valor de la constante de acidez del fosfato,  $K_a^{\text{fosfato}}$ , es conocida y el valor del pH se mantiene constante, queda como única variable la concentración total de fosfato.

Los valores de las constantes cinéticas de cada colorante se obtienen mediante el análisis global compartimental (GCA) de una superficie de decaimientos de fluorescencia. A modo de ejemplo se muestran los valores de las constantes cinéticas para el 2-Me-4-OMe TG.

**Tabla 1.** Valores estimados por GCA de las constantes cinéticas del 2-Me-4-OMe TG

	2-Me-4-OMe TG
$k_{01} (\text{s}^{-1}) \times 10^{-9}$	$5.2 \pm 0.2$
$k_{02} (\text{s}^{-1}) \times 10^{-9}$	$0.271 \pm 0.002$
$k_{02} (\text{s}^{-1}) \times 10^{-9}$	0
$k_{21} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) \times 10^{-9}$	$0.011 \pm 0.009$
$k_{12}^B (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) \times 10^{-9}$	$0.38 \pm 0.01$
$k_{21}^B (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) \times 10^{-9}$	$1.8 \pm 0.7$

15

Un paso interesante es seguir las variaciones de la concentración de fosfato en el citoplasma en el desarrollo temporal de procesos celulares que alteren las concentraciones intracelulares de fosfato. Para ello, se repetirá el procedimiento en diferentes tiempos o estados celulares, las variaciones en  $\tau_2$  permiten establecer variaciones en la concentración de las distintas especies iónicas de fosfato.

20

A modo de ejemplo, se ha estudiado mediante esta metodología la cinética de incorporación de fosfato inorgánico en el proceso de diferenciación celular de osteoblastos.

25

El procedimiento descrito puede ser implementado por medio de ordenadores y procesos ejecutados en tales equipos que a su vez controlen los distintos dispositivos



necesarios para llevar a cabo el procedimiento, por lo que la invención se extiende igualmente a los programas de ordenador, particularmente los programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora, adaptados para llevar a la práctica la invención. El programa puede tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención.

La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Por ejemplo, la portadora podría incluir un medio de almacenamiento, por ejemplo, una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

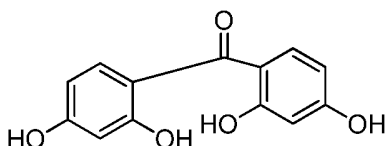
Además, la portadora puede ser una portadora transmisible, por ejemplo, una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio.

20

### **Síntesis del nuevo compuesto xanténico**

El procedimiento de síntesis del compuesto 9-(4-tert-butil-2-metoxifenil)-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (2-OMe-4-tBu GG), objeto de la presente invención comprende las siguientes etapas:

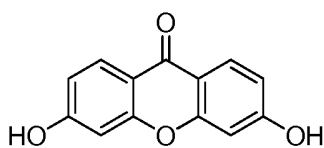
- i) Transformar 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona, I,



I

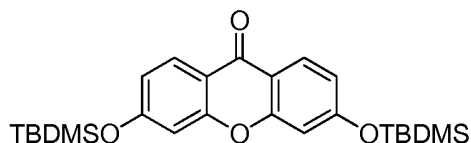
en el compuesto con esqueleto xanténico II mediante tratamiento con agua en tubo de alta presión.

30



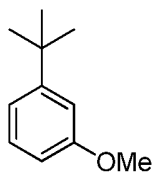
II

- 5 ii) Tratar el compuesto **II** con cloruro de tert-butildimetilsilano e imidazol en diclorometano para proteger sus dos grupos hidroxilo en forma de TBDMS (tert-butildimetilsilil) derivados y obtener el derivado **III**.



III

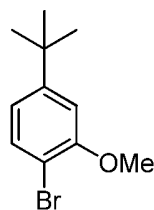
- iii) Tratar el compuesto **V**



V

10

- con NBS para obtener compuesto **IV**



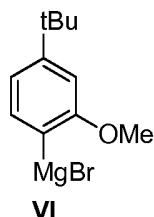
IV

15

- iv) Obtención de un reactivo organometálico a partir del compuesto **IV**.

En una realización preferente, se obtiene litio derivado del compuesto **IV** por reacción del mismo con butil litio (BuLi, 2.5 M en hexano) usando THF como disolvente.

- 5 En otra realización preferente alternativa se obtiene un reactivo de Grignard **VI**, tratando el compuesto **IV** con Mg usando como disolvente THF o éter dietílico.



- 10 v) Hacer reaccionar el compuesto **III** con el reactivo obtenido en la etapa anterior a partir del compuesto **IV**.
- vi) Tratar en ácido fuerte el crudo obtenido en la reacción anterior, para dar el compuesto **2-OMe-4-tBu GG**.

15

En una realización particular, la síntesis del compuesto 9-(4-tert-butil-2-metoxifenil)-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona, (**2-OMe-4-tBu GG**), se realizó a partir del compuesto comercial 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona (**I**) (0.81 mmol), que se transformó en el compuesto con esqueleto xantenico **II** mediante tratamiento con agua a 150 °C en tubo de alta presión (0.68 mmol, 84%). A este compuesto **II** se le protegió selectivamente sus dos grupos hidroxilo en forma de TBDMS (t-butildimetilsilil) derivados, mediante tratamiento con cloruro de tert-butildimetilsilano (4.08 mmol) e imidazol (6.8 mmol) en dimetilformamida (DMF), para dar el derivado **III** (**0.67 mmol, 99%**). El compuesto **III** se trató posteriormente con el litio derivado del compuesto **IV**, que se preparó por reacción de **IV** (**1.31 mmol**) con butil litio (BuLi, 2.5 M en hexano) usando THF como disolvente. Este compuesto **IV** se había sintetizado previamente mediante tratamiento del compuesto **V** (**1.27 mmol**) con NBS (0.635 mmol), para dar el compuesto **IV**. (1.07 mmol, 85%). Finalmente, el crudo de la reacción entre **III** (**0.26 mmol**) y el derivado litiado de **IV** (**1.31 mmol**) se trató en medio ácido fuerte (HCl 36%), para dar el compuesto **2-OMe-4-tBu GG** (**0.25 mmol, 96%**).

20

25

30

## 5 MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

### Estimación de la cantidad de fosfato presente en células permeabilizadas

Las células, de cualquier tipo, se cultivan con su correspondiente medio de cultivo  
10 sobre portas de microscopio de vidrio, y previamente a las medidas se lavan varias  
veces con tampón fosfato salino (PBS). A continuación se incuban con el colorante  
xanténico,  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus* y una disolución reguladora de pH a un  
valor de pH fijo. Esta  $\alpha$ -toxina permeabiliza las células, lo que genera la formación de  
15 poros de 1.5 nm en la membrana celular, permitiendo la difusión de moléculas de bajo  
peso molecular, como el propio colorante y los iones de la disolución reguladora, hacia  
el interior celular.

Posteriormente se realiza el procedimiento de la invención, explicado anteriormente. El  
método requiere de un experimento de referencia para calcular el tiempo de vida de  
20 fluorescencia del colorante xanténico en el interior celular en ausencia de fosfato  
añadido (únicamente con el fosfato que contiene la disolución de PBS). Para ello, las  
células sin permeabilizar se incuban con PBS y el colorante, obteniéndose, en estas  
condiciones, el valor de tiempo de vida de referencia ( $\tau_0$ ). Este  $\tau_0$  es el que se emplea  
para el cálculo de los incrementos de tiempo de vida ( $\Delta\tau$ ) que mediante la ecuación  
25 descrita anteriormente, permite el cálculo de la concentración de fosfato:

A modo de realización concreta de este aspecto se han llevado a cabo medidas en  
células de ovario de rata china (CHO-K1; ATCC No. CCL-61) y una línea de células de  
pre-osteoblastos (MC3T3-E1; ECACC 99072810). Las células (CHO-K1 y MC3T3-E1)  
30 se cultivaron con sus correspondientes medios de cultivo en portas de vidrio de  
microscopía. El medio de cultivo de las células CHO-K1 estaba compuesto de medio  
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% suero de bovino  
fetal (FBS), 2 mmol $\times$ L<sup>-1</sup> glutamina, 100 U $\times$ mL<sup>-1</sup> penicilina y 0.1  $\mu$ g $\times$ mL<sup>-1</sup>  
estreptomycin; y el medio de las células MC3T3-E1 lo formaba el medio de cultivo  
35  $\alpha$ MEM (*alpha Minimum Essential Medium*) suplementado con 10 % FBS, y 1% de

penicilina-estreptomicina. Ambas células se cultivaron en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

5 Previamente a las medidas de microscopía, las células se lavaron dos veces con PBS y se realizó la incubación durante 15 minutos a 37°C con 2 µg×mL<sup>-1</sup> de α-toxina en un buffer de permeabilización compuesto de 20 mmol×L<sup>-1</sup> MOPS potásico pH 7.0, 250 mmol×L<sup>-1</sup> manitol, 1 mmol×L<sup>-1</sup> sal potásica de ATP, 3 mmol×L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> y 5 mmol×L<sup>-1</sup> sal potásica de glutatión. Para demostrar la posibilidad de medir diferentes concentraciones de fosfato en el interior celular, durante la permeabilización de las  
10 células éstas se incubaron también con el colorante 2-Me-4-OMe TG 10<sup>-7</sup> mol×L<sup>-1</sup> y con disoluciones buffer de fosfato a pH 7.35 y diferentes concentraciones de fosfato (intervalo 0-150 mmol×L<sup>-1</sup>). Antes de su uso, todas las disoluciones se pasaron a través de filtros con poros de 0.02 µm (Whatman).

15 Para la obtención de las imágenes de tiempos de vida de fluorescencia se utilizó el sistema de microscopía de tiempos de vida de fluorescencia MicroTime200 (PicoQuant GmbH). La fuente de excitación fue un láser pulsado LDH con una longitud de onda de excitación de 470 nm. Se utilizó una frecuencia de 20 MHz y una intensidad (a la entrada del microscopio) entre 230 y 450 nW. Después de pasar por una lámina λ/4, la  
20 luz se dirige desde un espejo dicróico (510dchr) hacia el objetivo de inmersión (AN: 1.4; 100x) de un microscopio invertido IX-71 (Olympus) que enfoca la luz hacia la muestra y recoge la fluorescencia que posteriormente atraviesa un filtro HP500LP (AHF/Chroma) y se enfoca sobre la apertura confocal de 75 µm. Finalmente atraviesa un divisor 50/50 que divide la señal en dos haces de luz que son enfocados en sendos  
25 detectores fotomultiplicadores SPCM-AQR-14 (Perkin Elmer).

La recogida de datos se realizó con el módulo de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) TimeHarp 200 (PicoQuant), usando la metodología "Time-Tagged-Time-Resolved" (TTTR) que permite reconstruir los  
30 histogramas de tiempos de vida. Las imágenes de 80 µm × 80 µm se adquirieron con una resolución de 512 × 512 píxeles, con un tiempo de exposición de 0.60 ms por píxel, y una resolución de 29 ps por canal en la escala temporal TCSPC.

Para el análisis de datos, se utilizó el software Symphotime (PicoQuant). Para la  
35 obtención de las imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM), se reconstruyó

un IRF teórico a partir de una medida a alta concentración de fluoróforo, que fue empleado para analizar el decaimiento de la imagen completa. Todos los decaimientos fueron ajustados aplicando la estimación por máxima verosimilitud (MLE) que permite obtener parámetros correctos a pesar de una baja intensidad de señal, para lo cual se adoptó un modelo biexponencial con un tiempo fijo de 1.5 ns y otro variable que osciló entre 3.6 y 4.5 ns. Con estos datos, y realizando uniones de 5x5 píxeles y de 4 canales temporales para obtener un número de cuentas más elevado por píxel, se obtuvieron las imágenes de tiempo de vida de fluorescencia. Una vez obtenidas estas imágenes, se seleccionaron los píxeles ubicados en el citoplasma celular para recuperar los decaimientos.

El ajuste de las curvas de decaimiento se llevó a cabo mediante un análisis de cola (*tailfit*) (dejando fuera los primeros 1.5 ns) utilizando un modelo biexponencial con un tiempo fijo a 1.5 ns y el segundo tiempo, dependiente de la concentración de fosfato soluble en el citoplasma, variable.

Este tiempo de vida variable es el que, conociendo el valor del tiempo de vida del colorante de referencia ( $\tau_0$ ), y empleando la ecuación anteriormente descrita, proporciona la concentración de fosfato en el citoplasma celular.

### **Medida de la captación de fosfato soluble durante la diferenciación de osteoblastos**

Dada la capacidad de estos colorantes como sensores de la concentración de fosfato soluble intracelular, también se pueden utilizar para seguir, a tiempo real, la captación de fosfato por osteoblastos en su fase de diferenciación. En este caso, los pre-osteoblastos se incuban durante 15 minutos con el colorante xanténico en PBS a diferentes tiempos de su diferenciación celular, y tras la realización del procedimiento de esta invención se miden los cambios en el tiempo de vida de fluorescencia del colorante en el citoplasma, y por tanto se detecta el aumento de la concentración de ion fosfato en el interior celular tras su captación durante la fase de diferenciación.

Para la demostración de esta aplicación del procedimiento de esta invención se ha seguido la penetración de fosfato en una línea celular de pre-osteoblastos MC3T3-E1, que es un modelo bien establecido de diferenciación de osteoblastos. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la adición única de fosfato a concentraciones entre 4 y

10 mM, incluso en ausencia de ácido ascórbico (AA, un cofactor crítico requerido para la producción de colágeno), reduce el periodo de pre-mineralización a 2 días en las células MC3T3-E1. La utilidad de estas sondas en la detección intracelular del fosfato soluble en el periodo de diferenciación de pre-osteoblastos se ha demostrado  
5 añadiendo 2-Me-4-OMe TG  $10^{-7}$  M a un medio formado por tampón PBS, e incubando las células MC3T3-E1 con este medio durante 15 minutos. Esta metodología se realizó sacando las células MC3T3-E1 de su correspondiente medio de diferenciación (compuesto de medio  $\alpha$ MEM suplementado con 10% FBS,  $3 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$  fosfato,  $50 \mu\text{g} \times \mu\text{L}^{-1}$  AA y  $10 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$   $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ GP) para inducir una mineralización  
10 rápida), desde un tiempo 0 hasta 60 horas de diferenciación, y lavándolas con PBS previamente a la incubación con el colorante y a las medidas de microscopía.

Como control de células que no captan fosfato del medio extracelular, se llevó a cabo la misma metodología con células CHO sin permeabilizar con  $\alpha$ -toxina, y se aplicó el  
15 mismo procedimiento de la invención.

Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 3, en donde se muestran los tiempos de decaimiento de fluorescencia de 2-Me-4-OMe TG en el interior de ambos tipos de células a diferentes tiempos de incubación en el medio de diferenciación  
20 anteriormente citado. Como se puede observar, en el interior de pre-osteoblastos MC3T3-E1 el tiempo de decaimiento de la sonda decae durante las primeras 24 horas aproximadamente, y después de ese tiempo permanece constante. Al mismo tiempo, el tiempo de decaimiento permanece constante en el interior de las células CHO ya que estas no son permeables al anión fosfato en ausencia de  $\alpha$ -toxina. En la Figura 4  
25 se muestran imágenes FLIM en el interior de las células CHO y en la Figura 5 imágenes FLIM en el interior de las MC3T3-E1. En ambos casos se asignó a cada pixel, una escala arbitraria de color proporcional a los tiempos del decaimiento de fluorescencia.

30 Además, como indicador de la diferenciación de las células de osteoblastos, se empleó el ensayo de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en el medio extracelular de cultivo. Los resultados de este ensayo mostraron un aumento del nivel de ALP en el medio extracelular (cuadrados en la Figura 3), paralelo y en concordancia con el incremento de la captación de fosfato en el citoplasma de las  
35 células de osteoblastos.

El conjunto de resultados recuperados muestra que las sondas empleadas y el procedimiento propuesto en esta invención permiten la detección del ion fosfato solubilizado en el interior de células vivas, por lo que permite analizar, por un lado las alteraciones en la homeostasis del fosfato, es decir, el efecto que producen distintas afecciones celulares al flujo de fosfato y, por otro lado, el efecto que puedan causar distintos principios activos sobre la captación de fosfato por parte de células especializadas (osteoblastos).

10

**Otras consideraciones**

En todos los ejemplos referidos anteriormente se puede sustituir el 2-Me-4-OMe TG por otros colorantes con las características adecuadas.

15 En concreto, todos los experimentos descritos se han llevado a cabo también empleando el colorante 9-(4-ter-butil-2-metoxifenil)-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (2-OMe-4-tBu GG) como sonda de fosfato.

A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos con este colorante en la Figura 6.

20



**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento de estimación de la concentración de fosfatos presente en células vivas a través de la medición del tiempo de decaimiento de fluorescencia de un colorante xanténico añadido a las células y sometido a una excitación mediante luz láser pulsada.
- 2.- Procedimiento según reivindicación anterior, que comprende las siguientes etapas:
- i) Añadir un colorante xanténico en disolución a la muestra de células.
  - ii) Excitar el colorante presente en la muestra mediante luz pulsada.
  - iii) Obtener, mediante microscopía de tiempos de vida de fluorescencia, una imagen de la muestra de células de  $X$  píxeles de ancho e  $Y$  píxeles de alto.
  - iv) Generar una matriz de dimensiones  $(X,Y)$ , donde cada elemento  $(x,y)$  contiene el número de fotones detectados y el histograma de distribución de tiempos de detección de cada fotón individual que representa el decaimiento de fluorescencia.
  - v) Realizar el ajuste a una función multiexponencial de los decaimientos de fluorescencia recogidos en cada elemento,  $(x,y)$ ,
  - vi) Generar una matriz, de dimensiones  $(X,Y)$ , en la que cada elemento contiene la estimación, a partir del modelo ajustado en la etapa anterior, del tiempo de vida de fluorescencia largo,  $\tau_2$ , del colorante xanténico.
  - vii) Seleccionar el conjunto de píxeles de interés para el análisis, preferentemente los píxeles correspondientes al citoplasma celular, de una o varias células.
  - viii) Reconstruir y ajustar el decaimiento de fluorescencia global de la región de interés, en particular del citoplasma celular.
  - ix) Estimar la concentración total de fosfato mediante las ecuaciones procedentes de un modelo cinético de reacción entre los iones de fosfato y el colorante xanténico.
- 3.- Procedimiento según reivindicación anterior, caracterizado porque el colorante xanténico se añade en disolución acuosa hasta alcanzar una concentración entre  $10^{-5} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$  y  $10^{-9} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ , preferentemente una concentración de  $10^{-7} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ .
- 4.- Procedimiento según reivindicaciones 2 ó 3, caracterizado porque la luz pulsada utilizada en la etapa ii) tiene una radiación monocromática con una longitud de

onda entre 400 y 500 nanómetros, una frecuencia de repetición controlable en el rango de 1 a 20 Mhz y una anchura temporal del pulso preferentemente inferior a 500 picosegundos.

- 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque los decaimientos se ajustan, en la etapa v), a un modelo de decaimiento no lineal, preferentemente mediante la función

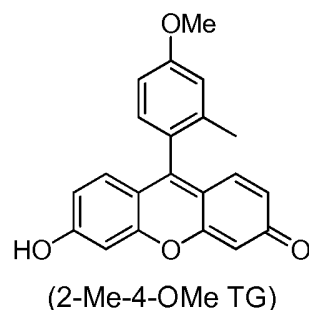
$$w = A_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + A_2 \cdot e^{-t/\tau_2} + w_0$$

siendo  $\tau_1$  un parámetro que representa las contribuciones de tiempo corto al decaimiento de fluorescencia;  $\tau_2$  representa el tiempo de decaimiento del colorante xanténico que es sensible a la concentración de fosfato;  $A_1$  y  $A_2$  los parámetros ajustables que representan las abundancias relativas de cada tiempo de decaimiento, y  $w_0$  un parámetro ajustable que representa el ruido de fondo.

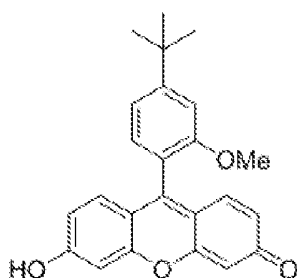
- 6.- Procedimiento según reivindicación anterior, caracterizado porque el ajuste se realiza suponiendo que  $\tau_1 = 1.5$  ns.

- 7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, que además comprende, tras la etapa vi), una etapa en la que se asocia una escala de color arbitrario a los valores contenidos en la matriz anterior para generar una imagen de forma que cada pixel esté coloreado según el valor del tiempo de vida del colorante xanténico,  $\tau_2$ , calculado en la etapa vi)

- 8.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque el colorante xanténico utilizado es **2-Me-4-OMe TG**



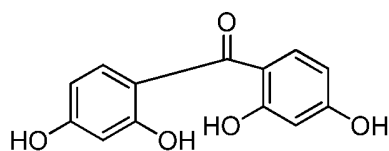
- 9.- Colorante Xanténico 9-(4-ter-butil-2-metoxifenil)-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona de fórmula **2-OMe-4-tBu GG**.



(2-OMe-4-tBu GG)

- 5 10.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el colorante xanténico utilizado es el colorante **2-OMe-4-tBu GG**.
- 11.- Programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ó 10.
- 10 12.- Programa de ordenador de acuerdo con la reivindicación 11, que está incorporado en unos medios de almacenamiento.
- 13.- Programa de ordenador de acuerdo con la reivindicación 11, que esta soportado en una señal portadora.
- 15 14.- Procedimiento de síntesis del compuesto **2-OMe-4-tBu GG**, que comprende las siguientes etapas:

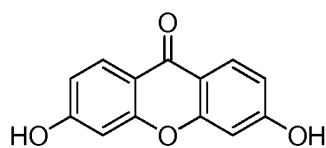
i) Transformar 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona, **I**,



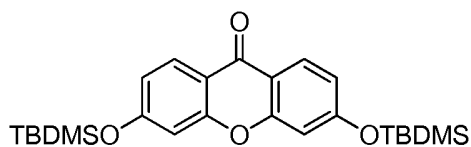
**I**

20

en el compuesto con esqueleto xanténico **II** mediante tratamiento con agua en tubo de alta presión.

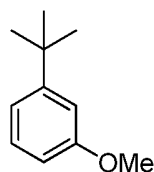
**II**

- ii) Tratar el compuesto **II** con cloruro de tert-butildimetilsilano e imidazol en diclorometano para proteger sus dos grupos hidroxilo en forma de TBDMS (tert-butildimetilsilil) derivados y obtener el derivado **III**.

**III**

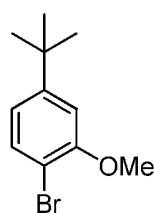
5

- iii) Tratar el compuesto **V**

**V**

10

- con NBS para obtener compuesto **IV**

**IV**

15

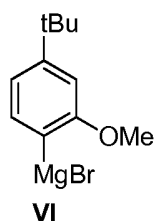
- iv) Obtener un reactivo organometálico a partir del compuesto **IV**.  
 v) Hacer reaccionar el compuesto **III** con el reactivo organometálico obtenido en la etapa anterior.  
 vi) Tratar en ácido fuerte el crudo de la reacción entre **III** y reactivo organometálico obtenido en la etapa anterior para obtener el compuesto **2-OMe-4-tBu GG**.

20

15.- Procedimiento de síntesis del compuesto **2-OMe-4-tBu GG** según reivindicación anterior en la que el reactivo organometálico es el litio derivado del compuesto **IV** obtenido por reacción del mismo con butil litio y usando THF como disolvente.

5

16.- Procedimiento de síntesis del compuesto **2-OMe-4-tBu GG** según reivindicación anterior en la que el reactivo organometálico es un reactivo de Grignard **VI**,



10

obtenido al tratar el compuesto **IV** con Mg usando como disolvente THF o éter dietílico.

17.- Procedimiento de síntesis del compuesto **2-OMe-4-tBu GG** según reivindicación 15 caracterizado porque el butil litio empleado en la etapa iv) es BuLi, en cualquier concentración y disolvente habitual de uso, preferentemente 2.5 M.

15

18.- Procedimiento de síntesis del compuesto **2-OMe-4-tBu GG** según reivindicación 16, caracterizado porque el disolvente empleado en la generación del reactivo de Grignard **VI** es THF o éter dietílico.

20

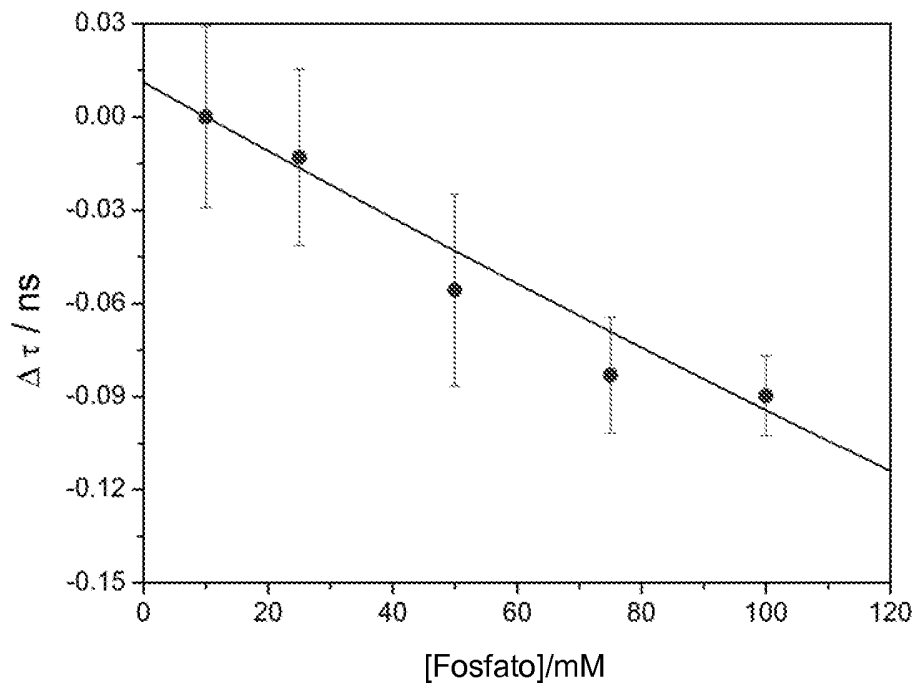


Figura 1

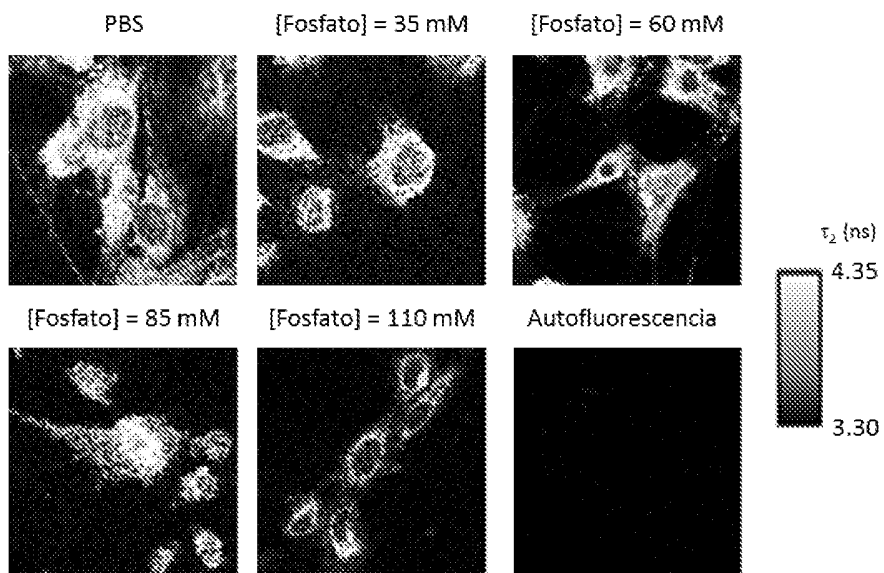


Figura 2

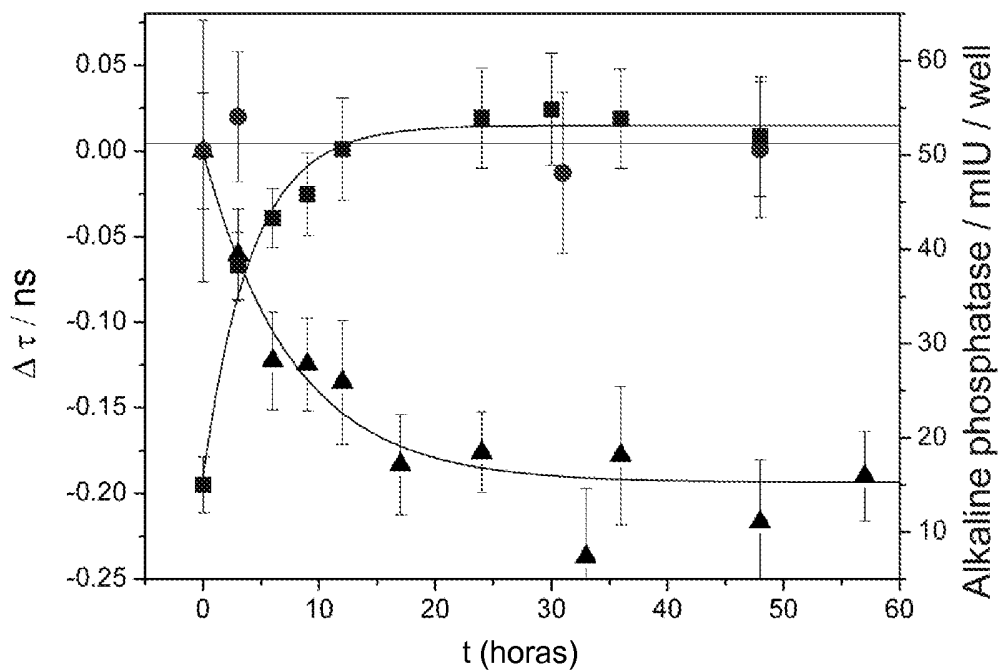


Figura 3

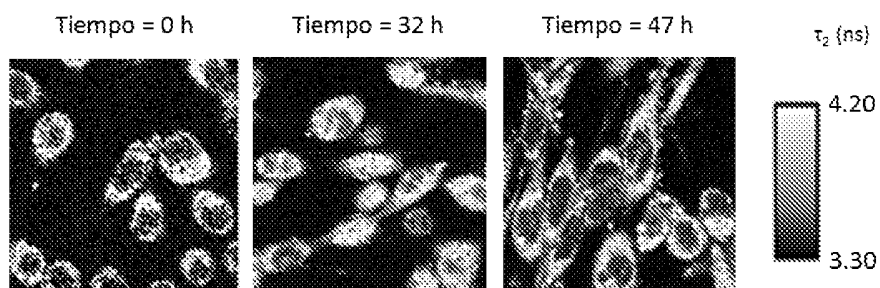


Figura 4

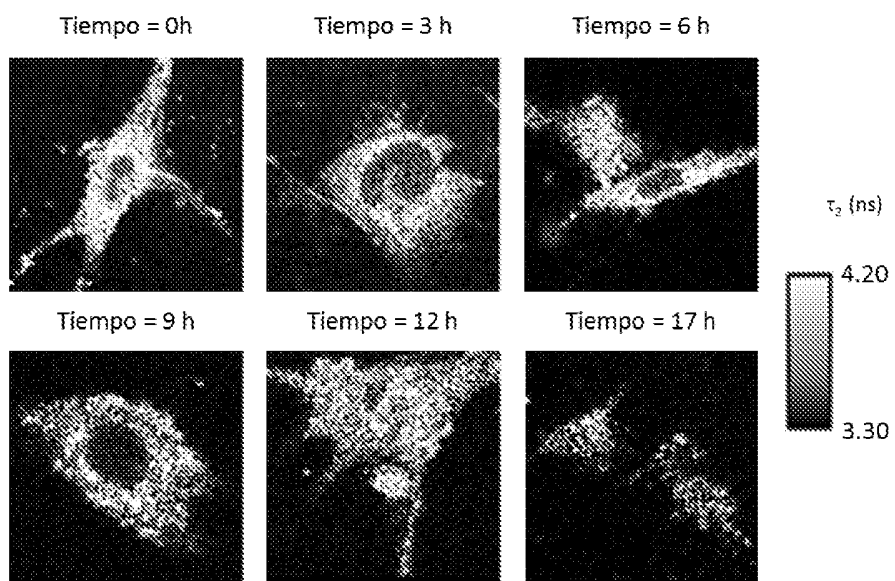


Figura 5

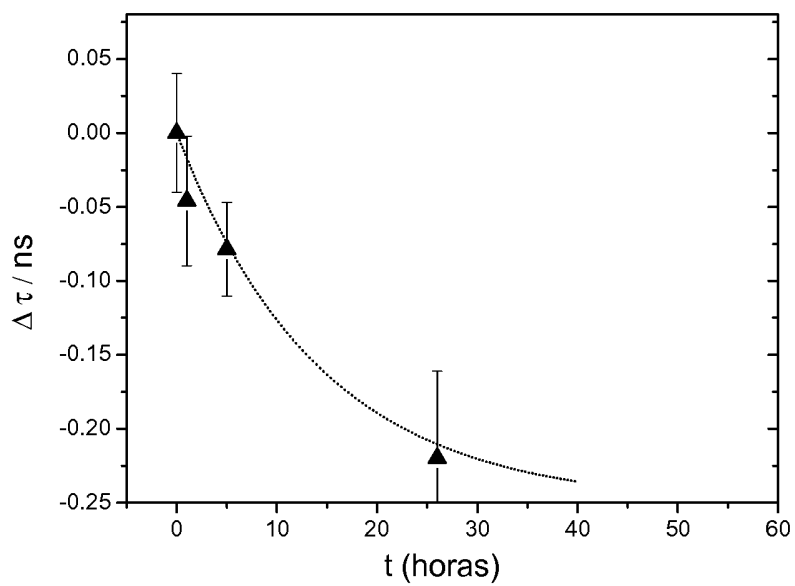


Figura 6





21 N.º solicitud: 201330861

22 Fecha de presentación de la solicitud: 10.06.2013

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PAREDES, J.M. et al. "Tuned lifetime, at the ensemble and single molecule level, of a xanthenic fluorescent dye by means of a buffer-mediated excited-state proton exchange reaction". Physical Chemistry Chemical Physics 2009, Volumen 11, páginas 5400-5407. [Disponible en línea el 23.04.2009]. Ver página 5400, resumen 5403; esquema 1; página, 5406, apartado 3.3.	1-18
A	PAREDES, J.M. et al. "Photophysics of the Interaction between a Fluorescein Derivative and Ficoll". The Journal of Physical Chemistry A 2011, Volumen 115, páginas 13242-13250. [Disponible en línea el 05.10.2011]. Ver página 13242, resumen.	1-18
A	US 20080014602 A1 (NAGANO, T. et al.) 17.01.2008, párrafos [0004],[0007],[0025],[0040]; página 5, compuesto 5.	1-18
A	US 20050014197 A1 (AGNEW, B. et al.) 20.01.2005, párrafo [0003]; reivindicaciones 1-8.	1-18
A	RAJ LOHANI, C. et al. "Colorimetric and fluorescent sensing of pyrophosphate in 100% aqueous solution by a system comprised of rhodamine B compound and Al <sup>3+</sup> complex". Analyst 2010, Volumen 35, páginas 2079-2084. [Disponible en línea el 25.06.2010]. Ver página 2079, resumen.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
30.06.2014

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N1/30** (2006.01)  
**G01N21/64** (2006.01)  
**G01N33/52** (2006.01)  
**C09B13/00** (2006.01)  
**C09B57/02** (2006.01)  
**C09B57/14** (2006.01)  
**C07D311/82** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C09B, C07D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC,WPI,TXTE,REGISTRY,HCAPLUS,BIOSIS,MEDLINE,NPL,XPESP,XPESP2,EMBASE,PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.06.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18 Reivindicaciones	<b>SI</b> <b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18 Reivindicaciones	<b>SI</b> <b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

### 1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PAREDES, J.M. et al. Physical Chemistry Chemical Physics 2009, Vol. 11, pp. 5400-5407.	23.04.2009
D02	PAREDES, J.M. et al. The Journal of Physical Chemistry A 2011, Vol. 115, pp. 13242-13250.	05.10.2011
D03	US 20080014602 A1 (NAGANO, T. et al.)	17.01.2008
D04	US 20050014197 A1 (AGNEW, B. et al.)	20.01.2005
D05	RAJ LOHANI, C. et al. Analyst 2010, Vol. 35, pp. 2079-2084.	25.06.2010

### 2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un procedimiento de estimación de la concentración de **fosfatos** presente en células vivas a través de la medición del tiempo de decaimiento de la **fluorescencia** de un colorante **xanténico** sometido a excitación; un programa de ordenador para llevar a cabo dicho procedimiento; el colorante xanténico 9-(4-ter-butil-2-metoxifenil)-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona; y un procedimiento de síntesis del mismo.

El documento D01 divulga un estudio sobre el comportamiento fotofísico del derivado de fluoresceína 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (**TG-II**, ver página 5403, esquema 1), que incluye absorción y medidas de fluorescencia en estado estacionario, resuelta en el tiempo y de molécula única. La constante de acidez aparente en el estado fundamental del colorante es prácticamente independiente de las concentraciones de tampón y sales añadidas. La fluorescencia decae de modo monoexponencial a valores de pH y concentraciones de fosfato superiores a 6.10 y 0.2M respectivamente (ver página 5400, resumen). La sensibilidad de los tiempos de vida a las condiciones ambientales hace de este compuesto un colorante prometedor para la determinación de la concentración de fosfato en experimentos de molécula única a pH cercanos a los fisiológicos (ver página, 5406, apartado 3.3).

El documento D02 divulga la utilización de Ficoll para mimetizar el medio intracelular en un estudio sobre las características espectrales del sistema Ficoll-**TG-II** (9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona), mediante espectroscopía de absorción, fluorescencia en estado estacionario, fluorescencia resuelta en el tiempo, espectroscopía de emisión resuelta en el tiempo y espectroscopía de correlación de fluorescencia. Este estudio responde al interés suscitado por el compuesto 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona como sensor fluorométrico de iones fosfato en medios intracelulares (ver página 13242, resumen).

En estos documentos se sugiere la posibilidad de utilizar 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (que se recoge en la reivindicación 8 de la solicitud) para la determinación de fosfatos en medios intracelulares. Sin embargo, se considera que el experto en la materia no sería capaz de llegar al procedimiento de la invención sin el desarrollo de la experimentación adecuada, por lo que dicho procedimiento, además de ser nuevo, posee actividad inventiva.

El documento D03 divulga un sensor fluorescente de fórmula (I) que posee el esqueleto tricíclico de xanteno, del que derivan sus propiedades fluorescentes (ver párrafos [0004] y [0007]). Estas moléculas se rompen en presencia de determinados sustratos, objeto de la medida, dando lugar a un compuesto fluorescente, por lo que son útiles para la determinación de dichos sustratos, que pueden tener diferente naturaleza y entre los que se encuentran iones no metálicos, del tipo del carbonato (ver párrafo [0025]). Entre otros compuestos, el documento recoge el compuesto **5** (9-(metoxi-2-metil)-6-hidroxi-3H-xanten-2-ona, ver página 5) (ver página 5), así como un procedimiento de preparación del mismo y compuestos similares diferentemente sustituidos (ver párrafo [0040]).

El documento D04 divulga composiciones quelatantes con metales y métodos para su utilización para la detección y aislamiento de moléculas diana fosforiladas, así como su aplicación en campos como proteómica, biología molecular, *screening* de alta resolución y diagnóstico (ver párrafo [0003]). Como entidad quelatante el método utiliza diversos colorantes, entre los que se encuentran los xantenos, que se unen al metal y a la molécula fosforilada, y que, al ser irradiados con la luz adecuada, permiten la detección de la molécula objeto, que puede ser fosfato inorgánico (ver reivindicaciones 1-8).

El documento D05 divulga un sistema dual (color y cambio fluorescente "Off-On") basado en el complejo entre un derivado de rodamina (colorante xanténico) y  $Al^{3+}$  para la detección de pirofosfato en soluciones 100% acuosas. El sistema presenta una respuesta fluorescente y colorimétrica altamente sensible y selectiva para el ión pirofosfato entre otros iones, sin interferencias de competidores biológicos (ver página 2079, resumen).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, divulga ni contiene sugerencia alguna de la que pueda derivarse de forma inequívoca un procedimiento de estimación de la concentración de fosfatos presente en células vivas a través de la medición del tiempo de decaimiento de la fluorescencia de un colorante xanténico sometido a excitación (reivindicación 1); y por tanto, tampoco un programa de ordenador para llevar a cabo dicho procedimiento (reivindicación 11).

Del mismo modo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia el compuesto 9-(4-ter-butil-2-metoxifenil)-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (reivindicación 9) y, por tanto, tampoco hacia un procedimiento de síntesis del mismo (reivindicación 14).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-18** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.