

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 302 605**

21 Número de solicitud: 200600668

51 Int. Cl.:
C08B 37/18 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **02.03.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.07.2008

71 Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

72 Inventor/es: **Louzao Ojeda, María del Carmen;**
Espiña Barbeitos, Begoña;
Rodríguez Vieytes, Mercedes y
Botana López, Luis Miguel

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Método para la detección de glucógeno por fluorescencia.**

57 Resumen:

Método para la detección de glucógeno por fluorescencia. Se basa en la incorporación de un indicador fluorescente de glucosa al glucógeno. Se puede realizar en homogenizados de tejidos o en células vivas obtenidas a partir de órganos o de cultivos celulares. Consiste en varias etapas de rápida ejecución. 1) Preparación de la muestra 2) Marcate fluorescente del glucógeno 3) Registro de la fluorescencia. Cuanto mayor es la intensidad de la fluorescencia más elevado es el contenido de glucógeno. Tiene aplicación científico-sanitaria, como evaluación de fármacos.

ES 2 302 605 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de glucógeno por fluorescencia.

- 5 El método se basa en la incorporación de un derivado fluorescente de la glucosa al glucógeno mediante la acción de las enzimas celulares. Es de aplicación en farmacología, química y medicina, y permite valorar el efecto de diversos fármacos sobre el glucógeno, evaluar patologías, etc.

Estado de la técnica

- 10 El glucógeno constituye un almacén de grandes cantidades de glucosa que pueden ser movilizadas de manera muy rápida (Ferrer *et al.* 2003, FEBS Lett 546, 127-132). Se acumula en el cuerpo de los mamíferos en las células del músculo esquelético y del hígado; en otras células se almacena en bajas cantidades.

15 *Síntesis del glucógeno*

- El glucógeno es un polímero ramificado de α -D-glucosa que puede llegar a tener una masa molecular de 10^8 Da. Se almacena en gránulos citoplásmicos denominados glicosomas que contienen la mayoría de las enzimas necesarias para su síntesis y degradación.

- 20 La síntesis del glucógeno ocurre en el citoplasma, y requiere de energía proporcionada por el adenosina trifostato (ATP), para la fosforilación de la glucosa y del uridin trifostato (UTP) (Alonso *et al.* 1995, FASEB J. 8, 1126-1137). La α -D-glucosa unida a uridin difostato (UDP) es la fuente de todos los residuos de glucosa que se agregarán a la molécula de glucógeno. La UDP-glucosa es sintetizada a partir de glucosa 1-fostato y UTP por la UDP-glucosa pirofosforilasa. Al igual que para otras vías del metabolismo de los carbohidratos, la glucosa-6-fostato en esta vía es isomerizada a glucosa-1-fostato por la fosfoglucomutasa. En el glucógeno, los enlaces glucosídicos principales son α -1,4 que son generados por la glucógeno sintetasa. Cada intervalo de entre 8 y 10 residuos con enlaces α -1,4, hay uno enlazado en posición α -1,6, a esto se le conoce como una ramificación. Las ramificaciones se obtienen por la acción de la enzima ramificante o amilo-(α -1,4-a1,6) transglucosidasa, comúnmente llamada glucosil α -4,6 transferasa.

30 *Degradación de glucógeno*

- La vía degradativa que moviliza al glucógeno almacenado en el hígado y músculo esquelético involucra a un juego de enzimas dando como producto primario la glucosa-1-fostato que se obtiene por la fractura de los enlaces alfa1-4; cuando la ramificación que se rompe es la alfa1-6, se libera glucosa libre directamente (Bollen, M., *et al.* 1998, Biochem J 336: 19-31).

- La glucógeno fosforilasa rompe los enlaces glucosídicos alfa1-4 entre los residuos que están en los extremos no reductores por simple fosforólisis hasta que quedan sólo cuatro residuos de glucosa en la ramificación. La glucosa-1-fostato producida por la glucógeno fosforilasa es convertida en glucosa-6-fostato por la fosfoglucomutasa.

Regulación de síntesis-degradación del glucógeno

- La síntesis del glucógeno es estimulada cuando los niveles de energía y sustratos son elevados. Así el glucógeno del hígado se incrementa durante el estado de buena alimentación debido a que la glucógeno sintetasa es activada alostéricamente por glucosa-6-fostato, mientras que la glucógeno fosforilasa es inhibida alostéricamente por la glucosa-6-fostato, así como por el ATP. Por el contrario, la degradación del glucógeno ocurre en condiciones de demanda energética, por ejemplo durante el ayuno. Tanto la síntesis como la degradación de glucógeno son procesos concomitantes, y determinan los niveles de glucógeno almacenado (Ainscow and Brand 1999, Eur. J. Biochem. 265, 1043-1055). La detección de las fluctuaciones de glucógeno en las células ayuda a la identificación de alteraciones metabólicas.

Enfermedades relacionadas con el glucógeno

- La inadecuada utilización de glucosa para su incorporación al glucógeno parece ser un defecto metabólico común en ambos tipos de diabetes mellitus (Tipo I y Tipo II) (Bogardus and Lillioja 1990, N. Engl. J. Med. 322, 262-263; Vaag *et al.* 1992, Diabetes 41, 174-182). Además, existe un grupo de enfermedades debidas a anomalías genéticas que provocan un defecto en alguna enzima requerida para la síntesis o degradación del glucógeno (se clasifican en enfermedades tipo O, IA, IB, II-VII). Los síntomas son causados por: a.- formación de glucógeno con una estructura anormal o, b.- la acumulación de grandes cantidades de glucógeno normal en tejidos específicos (Van Hoof *et al.* 1972, Biochimie 54, 745-752). La severidad de las enfermedades va desde fatal en la infancia hasta desórdenes moderados que no afectan tan drásticamente la vida. A pesar de que ya se han utilizado algunos fármacos con éxito para tratar estas enfermedades, sigue existiendo la necesidad de nuevos compuestos que incrementen la utilización de glucosa regulando la síntesis de glucógeno. Asimismo, se necesitan sistemas de detección de la síntesis y degradación de glucógeno.

Métodos de detección de glucógeno

En la actualidad hay algunos métodos para medir el glucógeno en tejidos y células de mamíferos.

5 *El método del yodo.* Se basa en que el glucógeno reacciona con una mezcla yodada, yodo y cloruro cálcico, formando un pigmento ámbar en solución ácida que tiene una absorción lineal en un rango específico. El glucógeno debe ser extraído de los tejidos con sistemas que emplean reactivos químicos agresivos (ácido perclórico, hidróxido potásico, etanol o cloruro de amonio) y requieren mucho tiempo.

10 *Tinción Schiff-Ácido Periódico (P.A.S.).* Se trata de una reacción histoquímica en la cuál el ácido periódico oxida las uniones entre carbonos formando aldehídos que reaccionan al ácido sulfuroso-fucsina dando color magenta. La tinción PAS es comúnmente utilizada para la detección de glucógeno en tejidos seccionados y fijados (Schaart *et al.* 2004, *Histochem. Cell. Biol.* 122, 161-169), pero no se puede emplear en células vivas.

15 Existen otros tipos de técnicas de marcaje de glucógeno basados en tinciones histológicas como la técnica del ácido crómico de Bauer o la tinción con Best's carmina, que han quedado obsoletas o son poco usadas (Graf and Klenssen 1981, *Histochemistry* 73, 225-232).

20 *Métodos de hidrólisis enzimática del glucógeno.* El principio de estos métodos consiste en que el glucógeno se hidroliza a glucosa, y ésta se puede medir por diversas técnicas que cuantifican la glucosa libre. El método de la aminoglucosidasa de Dreiling *et al.* (Carr and Neff 1984, *Comp. Biochem. Physiol B* 77, 447-449) es uno de ellos, aunque se pueden utilizar también otras enzimas. En este caso también es necesario homogenizar el tejido con reactivos agresivos como el ácido perclórico, siendo inútil para determinaciones de glucógeno *in vivo*.

25 *Detección mediante inmunocitoquímica.* Este sistema de detección de glucógeno implica un doble marcaje mediante un anticuerpo que reconoce específicamente moléculas de glucógeno (desarrollado por *O. Baba*) al que se une a su vez un segundo anticuerpo específico que lleva asociado un fluoróforo, lo que permite que todo el complejo sea detectable mediante fluorescencia. Este método requiere que las células estén previamente fijadas y permeabilizadas (García-Rocha *et al.* 2001, *Biochem. J.* 357, 17-24), de forma que no se puede marcar el glucógeno *in vivo*.

30 *Marcaje radiactivo de glucógeno.* Basado en poner a disposición de la célula D-glucosa, precursor de la molécula de glucógeno, marcada con isótopos radiactivos, como puede ser el C¹⁴. Se obtiene glucógeno marcado con radiactividad, siendo ésta una técnica que requiere medidas especiales debido al uso de radioisótopos y sus efectos nocivos (Fernandez-Novell *et al.* 1997, *Biochem. J.* 321, 227-231; Fernandez-Novell *et al.* 2002, *FEBS Lett* 531, 222-228).

Todos los métodos anteriores presentan inconvenientes como:

- 40 a) no se detecta el glucógeno sino sus metabolitos, requiriendo por tanto la destrucción del mismo.
- b) no se puede detectar el glucógeno en tejidos o células vivas puesto que el método requiere la fijación del tejido o la permeabilización celular.
- 45 c) se emplean reactivos agresivos, nocivos o que requieren medidas especiales debido al uso de radiactividad.

Por el contrario, la presente invención permite una determinación dinámica y a tiempo real del glucógeno puesto que no implica su destrucción. Se puede determinar el glucógeno en células vivas procedentes de tejidos o cultivos celulares ya que se emplean derivados fluorescentes de la glucosa. Estos marcadores fluorescentes no son agresivos y son captados por las propias células sin alterar su fisiología ni su morfología. Debido a estas características los derivados fluorescentes de glucosa, como el 2-NBDG, se consideran buenos indicadores de viabilidad celular (Yoshioka *et al.* 1996, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 400-404; Yamada *et al.* 2000 *J. Biol. Chem.* 275, 22278-22283). Así en la patente US6207136 (Matsuoka 2001) se describe un método específicamente en tejido vivo que se ha empleado para evaluar la captación de sacáridos en base a que el 2-NBDG penetra en las células por las mismas vías que la glucosa (Leira *et al.* 2002, *Toxicol in vitro* 16, 267-273; Louzao *et al.* 2003, *J. Receptor Signal Tr. R.* 23, 211-224; Louzao *et al.* 2005 *Mini Rev. Med. Chem.* 5, 207-215). En este sentido, la patente WO0177140 (Friederichs *et al.* 2001) establece la utilización del 2-NBDG para medir la absorción celular de nutrientes. En la patente US20040106163 (J.J. Workman and Ch.R. Lambert 2004) se proponen técnicas no invasivas para la determinación *in vivo* de la concentración de glucosa en sangre basada en la medida de algunos parámetros en la piel, y entre los marcadores se sugiere el 2-NBDG.

60 En la presente invención partimos del hecho ampliamente documentado de que los derivados fluorescentes de la glucosa entran en la célula como lo haría la propia glucosa. La novedad es que comprobamos que estos derivados se incorporan estructuralmente al glucógeno mediante un enlace glucosídico transformando al glucógeno en fluorescente y haciendo que sea un novedoso y eficaz método de detección.

65

Explicación de la invención

La presente invención describe un método para la detección de glucógeno por fluorescencia. Consiste en la administración a:

- a) homogeneizados de tejidos o células, o
- b) células vivas obtenidas a partir de un tejido o de cultivos celulares,

de un derivado fluorescente de glucosa que gracias al sistema enzimático celular se incorpora mediante un enlace glucosídico para formar el glucógeno fluorescente. Es un método no agresivo para las células o los tejidos ya que no implica la utilización de material radiactivo ni reactivos destructivos. Además, debido a que no interfiere en la actividad normal del sistema enzimático celular y que no requiere la destrucción del carbohidrato permite muestrear e identificar procesos o compuestos que aumenten o disminuyan la síntesis de glucógeno.

El método de detección de glucógeno propuesto es específico puesto que se fundamenta en la síntesis y degradación del oligosacárido que sucede en el citoplasma. Por esta razón es selectivo dado que solamente se marca con fluorescencia el glucógeno.

El método para la detección de glucógeno por fluorescencia comprende, en general, varias etapas de rápida ejecución:

1) *Obtención y preparación de la muestra.* Las células vivas se aíslan a partir de órganos o tejidos, o se obtienen de cultivos celulares. Los sistemas libres de células se consiguen homogenizando los órganos o tejidos, o realizando una lisis por sonicación de células procedentes de cultivos.

2) *Marcaje fluorescente del glucógeno.* Se basa en la incorporación al glucógeno celular de un derivado fluorescente de la D-glucosa, como el 2-NBDG. Tanto los sistemas libres de células como las células vivas se incuban con el derivado fluorescente de la glucosa a 37°C. En primer lugar, el derivado fluorescente de la D-glucosa se transforma en el derivado fluorescente de la glucosa-6-fosfato por acción de la enzima hexoquinasa en presencia de ATP. El derivado fluorescente de la glucosa-6-fosfato es isomerizado a derivado fluorescente de la glucosa-1-fosfato por la enzima fosfoglucomutasa. A partir de esta glucosa 1-fosfato fluorescente y de UTP por la UDP-glucosa pirofosforilasa se sintetiza el derivado fluorescente de la UDP-glucosa. Por último, este derivado se agrega a la molécula de glucógeno como una UDP-glucosa más. De esta forma el glucógeno se hace fluorescente. (Figura 1).

3) *Registro de la fluorescencia.* La detección del glucógeno fluorescente en los sistemas libres de células se realiza en un lector de placas de fluorescencia. En este caso, finalizada la incubación con el derivado fluorescente de la glucosa, el homogenizado celular se filtra para que el glucógeno fluorescente formado quede retenido en filtros que se depositan en placas de fluorescencia. El glucógeno fluorescente formado en las células vivas se detecta utilizando un microscopio de fluorescencia o confocal. En ambos casos, la intensidad de la fluorescencia aumentará a medida que se incorporen más moléculas del 2-NBDG inicial al glucógeno, es decir al ir sintetizándose más oligosacárido. Esto se comprueba cuando se registra la fluorescencia obtenida al incubar homogenizados celulares con 2-NBDG a distintos tiempos. (Figura 2). Asimismo, el glucógeno tendrá una intensidad de fluorescencia que irá disminuyendo a medida que se fragmente y pierda residuos que inicialmente eran 2-NBDG. La vía degradativa que moviliza al glucógeno almacenado involucra a un juego de enzimas dando como producto primario la glucosa-1-fosfato que se obtiene por la fractura de los enlaces alfa-1-4; cuando la ramificación que se rompe es la alfa-1-6, se libera glucosa libre directamente. Si partimos de glucógeno fluorescente la molécula liberada será el derivado fluorescente de la glucosa (Figura 3). El 2-NBDG que no se incorpora al glucógeno sigue la ruta de la glucólisis perdiendo su fluorescencia (Figura 4).

La presente invención proporciona un rápido, específico y sensible método de detección de glucógeno de aplicación científico-sanitaria. Con esta metodología se pueden detectar alteraciones metabólicas que afecten al glucógeno, pero también evaluar la eficacia de algunos tratamientos en enfermedades relacionadas con este oligosacárido. En este sentido, aquellos fármacos, como la insulina, que incrementen la síntesis de glucógeno, producirán un aumento de la fluorescencia del oligosacárido (Figura 5). Por el contrario, los fármacos que favorezcan la degradación del glucógeno, como la adrenalina, salbutamol o glucagón provocarán una disminución de la fluorescencia del oligosacárido (Figura 5).

Modo de realización de la invención

La presente invención describe un método para la detección de glucógeno caracterizado por la utilización de un marcador fluorescente de la glucosa que se incorpora al polisacárido por un enlace glucosídico y que se puede realizar en tejidos o células vivas. El registro de la fluorescencia se lleva a cabo en un detector de fluorescencia o en un microscopio de fluorescencia o confocal.

Ejemplos

El método de detección de glucógeno fluorescente se puede desarrollar: 1) en un sistema libre de células, homogenizado celular o tisular, o; 2) en células vivas obtenidas a partir de tejidos o cultivos celulares. Se aporta un ejemplo de cada caso.

ES 2 302 605 A1

1.- Método para la detección de glucógeno por fluorescencia en un sistema libre de células

El procedimiento comprende varias etapas.

- 5 1) *Obtención de las células.* Se parte de hepatocitos de rata de la línea Clone 9. El cultivo de estas células se realiza en frascos con medio de cultivo situados en una cámara de incubación a 37°C y con una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Una vez alcanzada la confluencia en los frascos de cultivo se retiran las células en una solución tampón mediante arrastramiento con un raspador. Al final se recoge en un tubo una suspensión de 1 mL de solución
10 tampón en la que irán las células correspondientes a 2 frascos de cultivo (unos 6x10⁶ en total).
- 2) *Lisis celular.* Las células recogidas en el tubo se mantienen en frío (en un baño de hielo) y se someten a la acción de un ultrasonidos durante un ciclo de 30 s. Este proceso desencadena la rotura celular y no altera la maquinaria intracelular de los hepatocitos. Cada mL de este lisado celular se reparte en 2 tubos (500 µL/tubo).
- 15 3) *Marcaje fluorescente.* Se incuba cada tubo de lisado celular con 500 µM del indicador fluorescente 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-desoxi-D-glucosa (2-NBDG) en un agitador termostatzado a 100 U/minuto de agitación durante 150 minutos a 37°C. En este tiempo el derivado fluorescente de la glucosa se incorpora al glucógeno convirtiéndolo en fluorescente.
- 20 4) *Filtración.* Finalizada la incubación se pasan 250 µL del lisado celular a través de un filtro con capacidad para retener partículas de 1,2 µm de diámetro que posteriormente se lava con 40 mL de etanol al 70% en un baño de hielo. En este filtro queda retenido el glucógeno mientras que el 2-NBDG libre se lava con el etanol.
- 5) *Registro de fluorescencia.* Cada filtro conteniendo el glucógeno fluorescente se deposita en un pocillo de una
25 placa de 12. La lectura de la fluorescencia de cada pocillo se realiza en un lector de fluorescencia de placas a una λ de excitación de 480 nm y λ de emisión de 530 nm. Cuanto mayor es la fluorescencia más elevado es el contenido de glucógeno en las muestras.

30 2.- Método para la detección de glucógeno por fluorescencia en células vivas

El procedimiento comprende varias etapas.

- 35 1) *Preparación de las células.* Se parte de hepatocitos de rata de la línea Clone 9. El cultivo de estas células se realiza en frascos con medio de cultivo situados en una cámara de incubación a 37°C y con una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. A partir de estos cultivos las células se pasan a cubreobjetos, situados en pocillos de una placa de 8 conteniendo medio de cultivo, y se mantienen en una cámara de incubación a 37°C con una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Una vez alcanzada la confluencia se retira el medio de cultivo de las células. Se añade la solución tampón en un volumen de 800 µL.
- 40 2) *Marcaje fluorescente.* Se añade el derivado fluorescente de la glucosa (2-NBDG) a los pocillos que contienen el cubreobjetos con las células. En cada pocillo se incuban los hepatocitos con 500 µM de 2-NBDG durante 150 minutos a 37°C. En este tiempo las células captan el derivado fluorescente de la glucosa y lo incorporan al glucógeno transformándolo en fluorescente.
- 45 3) *Registro de la fluorescencia.* Se registra la fluorescencia de las células que contienen el glucógeno marcado con el 2-NBDG mediante un microscopio confocal utilizando un láser de Argón (λ 488 nm). A mayor fluorescencia, mayor contenido de glucógeno. En este caso además se consiguen imágenes que permiten visualizar la localización de los depósitos de glucógeno.

50 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1. Esquema de la síntesis de glucógeno fluorescente. El derivado fluorescente de la glucosa 2-NBDG es el primer compuesto del esquema. Estructuralmente es una molécula de glucosa con un radical fluorescente situado en el carbono 2. El 2-NBDG sigue la ruta de formación de glucógeno como lo haría la glucosa. Atendiendo especialmente a la localización del radical fluorescente, se observa que el carbono 2 no se ve afectado en ninguna de las reacciones de la ruta, por lo tanto el radical se mantiene formando parte del 2-NBDG hasta la formación de glucógeno fluorescente.

Figura 2: Representación gráfica de la fluorescencia obtenida cuando los lisados de células hepáticas son incubados a 37°C con 2-NBDG durante distintos periodos de tiempo. Los valores de fluorescencia son más elevados a medida que aumenta la cantidad de glucógeno fluorescente formado.

Figura 3. Esquema de la degradación del glucógeno fluorescente. Partiendo del glucógeno marcado con el 2-NBDG se representa la vía metabólica de glucogenolisis. Se observa que al final de la ruta se obtienen moléculas de 2-NBDG de la misma forma que en condiciones metabólicas normales se liberaría glucosa.

Figura 4. Esquema de Glucólisis. Tal y como ocurriría en la célula con la glucosa, las moléculas de 2-NBDG que no se incorporan al glucógeno serían lisados. En esta ruta es particularmente importante la reacción de la aldolasa.

ES 2 302 605 A1

Siguiendo la trayectoria del carbono 2 del 2-NBDG original se comprueba la lisis del compuesto y la pérdida del radical fluorescente.

5 Figura 5: Diagrama de barras que representa el efecto de fármacos que aumentan los niveles de glucógeno como la insulina y fármacos que los disminuyen como la adrenalina, el glucagón o el salbutamol. Los lisados de células hepáticas se incuban a 37°C con 2-NBDG durante 150 minutos para obtener glucógeno fluorescente. Posteriormente se añaden los fármacos y se deja que actúen durante 30 minutos. Los valores de fluorescencia se presentan en forma de porcentaje respecto al control (lisado de células hepáticas sin tratamiento farmacológico).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 302 605 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Método para la detección de glucógeno por fluorescencia en homogenizados de tejidos o células vivas que comprende las siguientes etapas:

1) Obtención y preparación de la muestra de tejidos o células,

2) Marcaje del glucógeno con el indicador fluorescente, y

10 3) Registro de la fluorescencia en un fluorímetro.

2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque según el apartado 1) la obtención de la muestra se consigue homogeneizando los órganos o tejidos, o realizando una lisis por sonicación de células procedentes de cultivos.

15 3. Método, según la reivindicación 1, porque según el apartado 2) el marcaje fluorescente está **caracterizado** por la incorporación al glucógeno celular de un derivado fluorescente de la D-glucosa, como el 2-NBDG.

20 4. Método, según la reivindicación 1 **caracterizado** porque según el apartado 3) la detección del glucógeno fluorescente en los sistemas libres de células se realiza en un lector de placas de fluorescencia.

5. Método, según la reivindicación 1 **caracterizado** porque según el apartado 3) la detección del glucógeno fluorescente formado en las células vivas se realiza utilizando un microscopio de fluorescencia o confocal.

25 6. Uso del método, según las reivindicaciones 1 a 5 en aplicaciones científico-sanitarias, como sistema de evaluación de fármacos o para detectar alteraciones metabólicas que impliquen al glucógeno.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

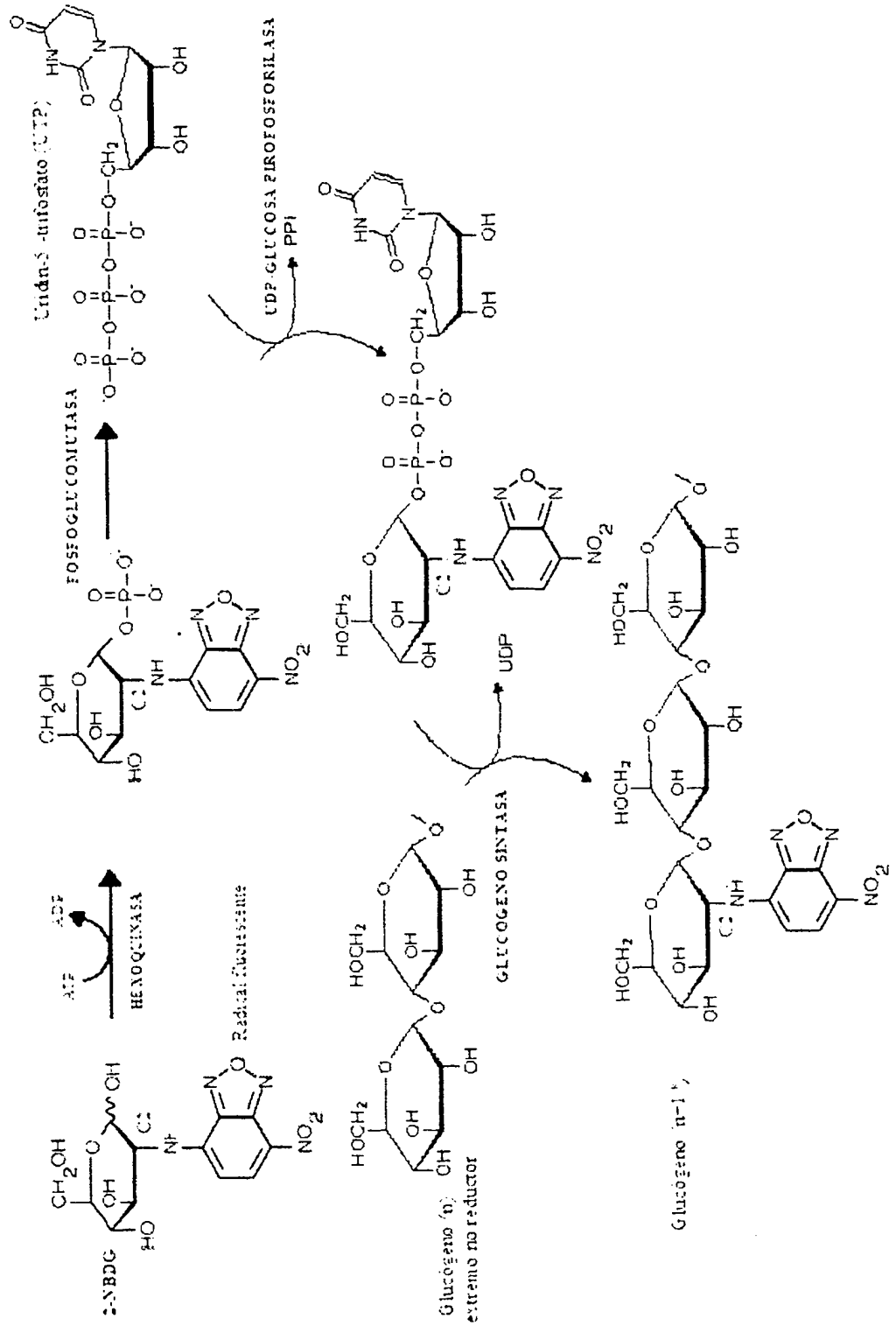


FIGURA 2

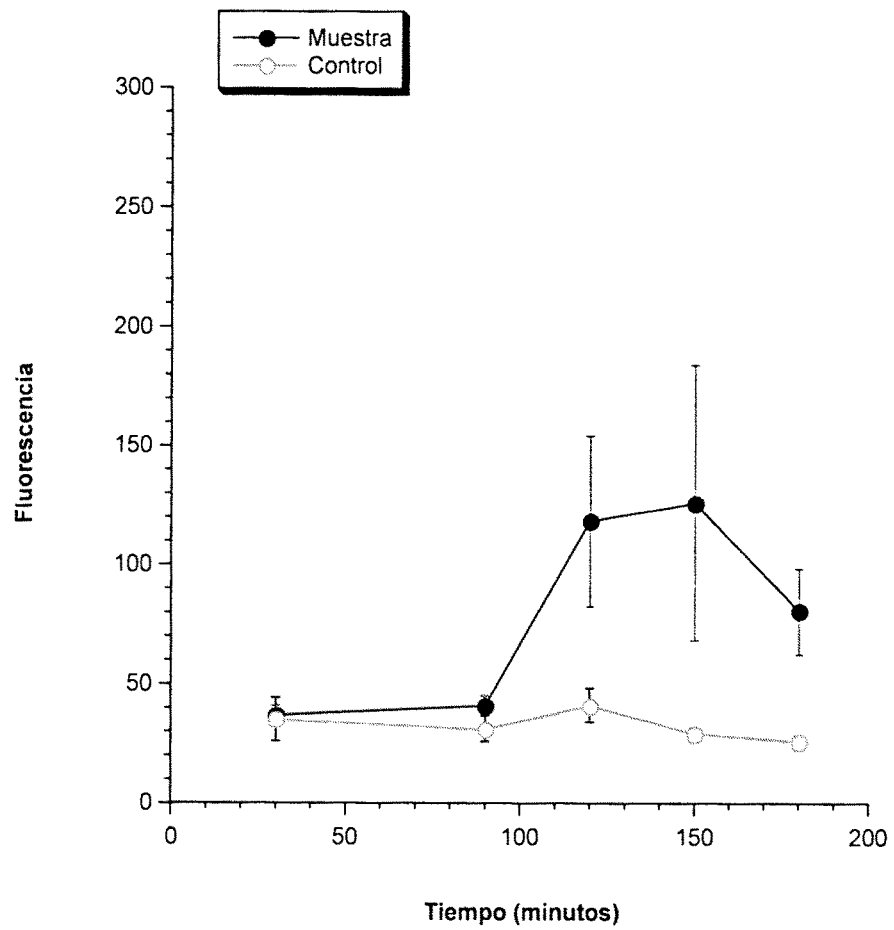


FIGURA 3

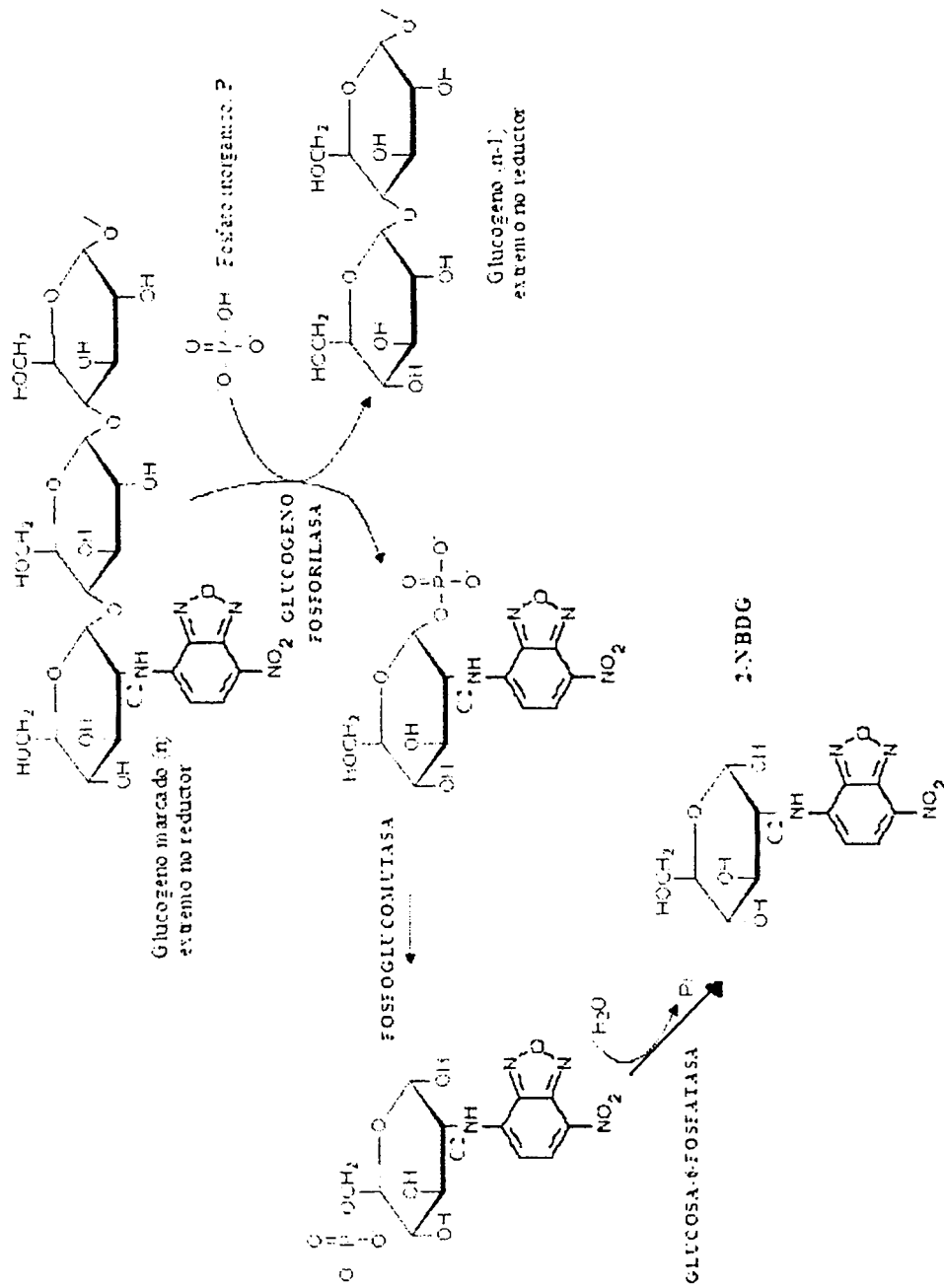


FIGURA 4

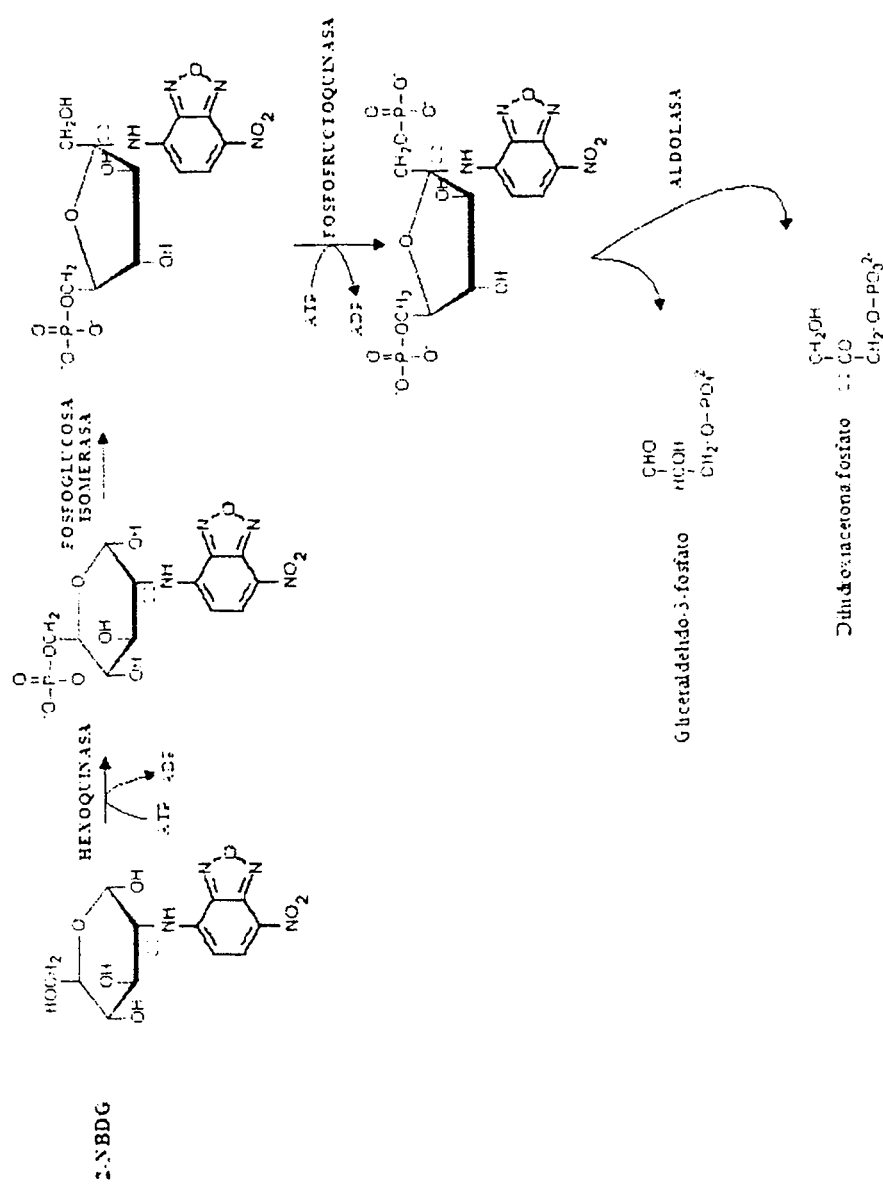
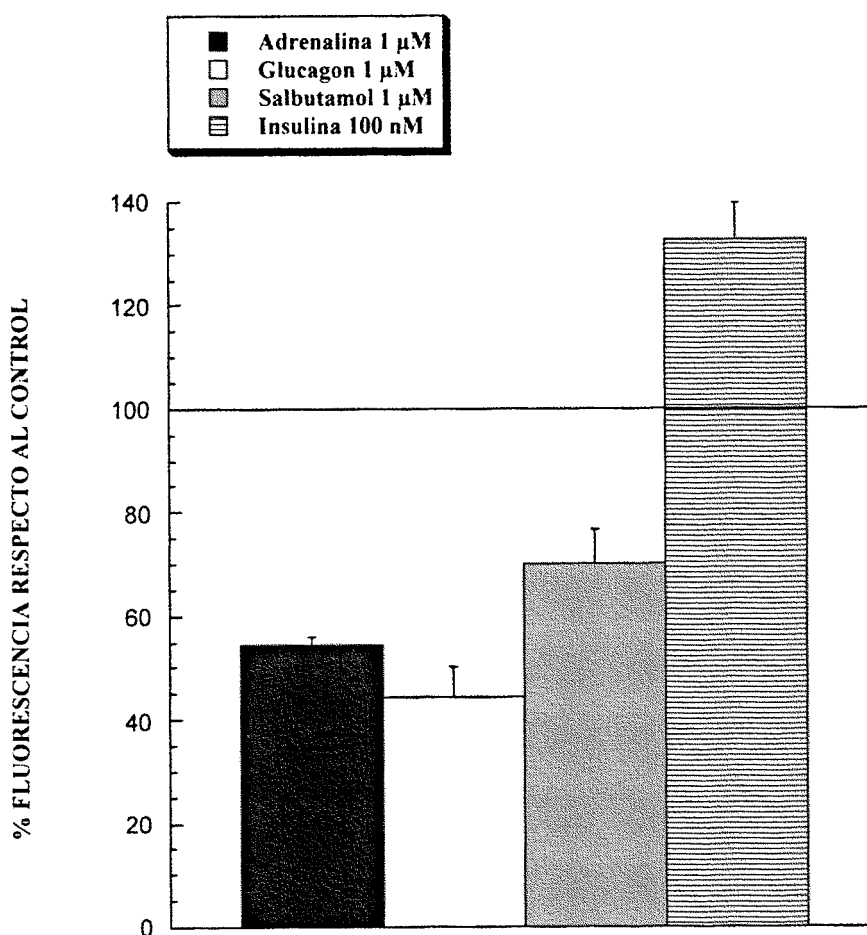


FIGURA 5





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 302 605

② N° de solicitud: 200600668

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.03.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 6207136 B1 (MATSUOKA) 27.03.2001, todo el documento.	1-6
A	WO 0177140 A2 (FRIEDERICH, S. et al.) 18.10.2001, todo el documento.	1-6
A	ZOU, C. et al., "2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement.", J. BIOCHEM. BIOPHYS. METHODS, 2005, Vol. 64, No. 3, páginas 207-215. Todo el documento.	1-6
A	LLOYD, P.G. et al., "Examining glucose transport in single vascular smooth muscle cells with a fluorescent glucose analog.", PHYSIOL. RES., 1999, Vol. 48, No. 6, páginas 401-410. Todo el documento.	1-6
A	SCHAART, G. et al., "A modified PAS stain combined with immunofluorescence for quantitative analyses of glycogen in muscle sections.", HISTOCHEM. CELL BIOL., 2004, Vol. 122, No. 2, páginas 161-169. Todo el documento.	1-6
A	PASSONNEAU, J. V. et al., "A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues.", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1974, Vol. 60, No. 2, páginas 405-412. Todo el documento.	1-6

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 18.06.2008	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/2
---	--	----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C08B 37/18 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)