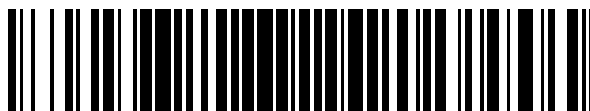


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 232**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/72** (2006.01)  
**G01N 33/542** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07733572 .7**  
96 Fecha de presentación: **23.03.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2005164**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **Análisis fluorescente**

30 Prioridad:  
**31.03.2006 GB 0606450**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.03.2012**

73 Titular/es:  
**Quotient Diagnostics Limited**  
**55 Central Avenue West Molesey**  
**Surrey KT8 2QZ, GB**

72 Inventor/es:  
**VESSEY, John, Phillip y**  
**GRAY, Adrian, Richard**

74 Agente/Representante:  
**Izquierdo Faces, José**

ES 2 377 232 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Análisis de fluorescencia

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a métodos para realizar un análisis para una sustancia no-fluorescente en una muestra, y además se refiere al aparato para la realización de análisis de acuerdo a tales métodos.
- 10 **[0002]** La Patente Europea número EP 0.772.779 describe el análisis de proteínas glicosiladas por extinción de fluorescencia. El estado de la técnica como se ejemplifica en este documento describe el análisis de hemoglobina glicosilada usando la extinción de la fluorescencia producida cuando la mencionada hemoglobina glicosilada se enlaza a un conjugado producido por el enlace químico de fluoróforos a grupos de ácido borónico. Esta extinción dependiente de la concentración es después comparada con una medición de la hemoglobina total hecha por medios fotométricos convencionales, que está establecida en el estado de la técnica.
- 15 **[0003]** Sin embargo durante el método del estado de la técnica hay un nivel no específico inevitable de extinción de fluorescencia que no es causado por el enlace del mencionado conjugado a la hemoglobina glicosilada sino por un efecto de filtro inherente. Este efecto de filtro inherente es causado por la molécula de hemoglobina de por sí absorbiendo tanto la radiación excitante como la luz fluorescente emitida causada por superposición espectral del espectro de absorción de la hemoglobina con la excitación de fluorescencia y el espectro de emisión. Esta extinción de fluorescencia de fondo debe ser compensada en el cálculo para permitir la cuantificación de la extinción específica que es atribuida solamente a la concentración de hemoglobina glicosilada y por la tanto a su parte. Los inventores de la EP 0.772.779 consiguieron esto determinando la densidad óptica de la solución de la reacción a una longitud de onda adecuada (por ejemplo 405 nm o 415 nm) y restando un elemento *a prorrata* de la extinción de fluorescencia total dependiendo de su medición de densidad óptica.
- 20 **[0004]** En el método revelado en la EP 0.772.779 la concentración total de hemoglobina se mide usando métodos fotométricos convencionales como la absorbancia a 405 nm o 415 nm. Para que ese método funcione como se describe en la misma el usuario debe hacer dos mediciones independientes en instrumentos separados: un fotómetro para medir la densidad óptica total y un fluorímetro para medir la extinción de fluorescencia. Para que las pruebas tengan alguna utilidad comercial, por ejemplo en el tratamiento de la diabetes, cualquier instrumento diseñado y fabricado específicamente para la prueba debe por consiguiente tener una funcionalidad dual de tanto fluorímetro como fotómetro. Esto es costoso, más complejo e indeseable.
- 25 **[0005]** La extinción de la fluorescencia por la hemoglobina como se describe en la EP 0.772.779 tiene dos componentes. El primero, una caída instantánea inicial en la fluorescencia asociada con el espécimen de hemoglobina actuando como un filtro de densidad neutro en la excitación de la fluorescencia y en las longitudes de onda de emisión; y el segundo una extinción dependiente del tiempo de la señal de fluorescencia asociada con el curso temporal del enlace químico de la hemoglobina glicosilada con el reactivo conjugado fluorescente.
- 30 **[0006]** La presente invención pretende superar los problemas del método del estado de la técnica, como se ha descrito anteriormente y se detalla más adelante, con la esperanza de desarrollar un método de análisis significativamente mejorado, así como diseñar instrumentos automáticamente para conseguir los resultados deseados. Como un resultado de este estudio cuidadoso. Los presentes inventores han comprobado que siguiendo el curso temporal de alteración de la fluorescencia mientras la reacción del análisis progresa, la alteración de la fluorescencia de fondo, es decir, una disminución o aumento instantáneo no dependiente de la química de la reacción, puede ser determinada separadamente de la extinción de la fluorescencia dependiente del tiempo atribuida al enlace químico del compuesto objetivo con el reactivo fluorescente. Por lo anterior han descubierto también que una alteración en la fluorescencia detectada, en particular un efecto de extinción, cuando una sustancia es añadida al reactivo fluorescente puede ser usada para calcular la concentración de esa sustancia que no es fluorescente por sí misma.
- 35 **[0007]** De acuerdo a un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para llevar a cabo un análisis para una sustancia no fluorescente en una muestra, este método comprende:
- 40 (a) llevar a cabo una reacción en una solución entre una sustancia no fluorescente en una muestra del análisis y un compuesto marcador fluorescente, la muestra y el compuesto marcador siendo combinados en el momento para;
- 45 (b) excitar la fluorescencia en el compuesto marcador, en donde la naturaleza del marcador y la naturaleza de la excitación son tales que la mencionada fluorescencia tiene lugar a una longitud de onda a la que la mencionada fluorescencia es alterada por la reacción del compuesto marcador con la sustancia no fluorescente;
- 50 (c) detectar, en múltiples puntos temporales, la fluorescencia resultante mientras progresa la reacción;
- 55 (d) calcular de la fluorescencia detectada los valores de  $F_0$  siendo la fluorescencia en el momento  $t_0$  y  $F_\infty$  siendo la fluorescencia en el momento  $t_\infty$  que es el punto en el que toda la sustancia no fluorescente ha reaccionado con el compuesto marcador, o la reacción ha alcanzado el equilibrio, por ajuste de la curva de la fluorescencia detectada y extrapolando la curva al momento  $t_0$  y  $t_\infty$ ;

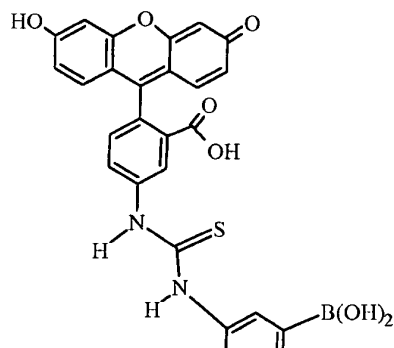
(f) determinar de los valores calculados y un algoritmo de calibración adecuado la concentración de sustancia no fluorescente presente en la muestra en el  $t_0$  antes de reaccionar con el compuesto marcador fluorescente.

5 [0008] Como se usa en la presente, cuando se hace referencia a una sustancia a ser ensayada (el analito) el término no fluorescente no significa que la sustancia es totalmente no fluorescente. En cambio significa que tienen un espectro de excitación y/o emisión diferente al del compuesto marcador fluorescente en las longitudes de onda de excitación y emisión relevantes.

10 [0009] Un uso principalmente pretendido de la presente invención es en el análisis de la hemoglobina glicosilada en sangre. De hecho, la génesis de la presente invención reside en mejorar un proceso para este análisis, y en particular analizar la cantidad o proporción de hemoglobina glicosilada (es decir, hemoglobina a la que la glucosa se ha vuelta enlazada no enzimáticamente) dentro de una muestra. Por esta razón la siguiente descripción describirá a menudo la invención respecto a esto, aunque la presente invención es igualmente aplicable para el análisis de muchas sustancias diferentes – en particular sustancias donde las características de absorción de los contenidos de la muestra son propensas a interferir con las características fluorescentes de un fluoróforo apropiado.

15 [0010] El primer aspecto de la presente invención requiere un compuesto marcador que es específico para la sustancia a ser analizada y la fluorescencia de la cual está apropiadamente alterada (posiblemente aumentada, pero más habitualmente disminuida) por el enlace del marcador con la sustancia.

20 [0011] El compuesto marcador habitualmente comprenderá un fluoróforo y un grupo de enlace adaptado para enlazar selectivamente con la sustancia. La selección de un fluoróforo apropiado y combinación de grupo de enlace para una sustancia objetivo particular puede ser hecha en base a prueba experimental o a las características conocidas de los fluoróforos y grupos de enlace existentes en relación a la sustancia a ser analizada. Una variedad de fluoróforos se menciona en la EP 772.779, el contenido de la cual está incorporado en la presente por referencia. Para una proteína glicosilada como la hemoglobina glicosilada un marcador adecuado podría incluir un grupo de ácido borónico enlazado por un grupo conector con un derivado de la fluoresceína. El ácido borónico enlaza en grupo cis-diol de una proteína glicosilada pero no es específico de la proteína. Se prefiere que el método se adapte específicamente para la detección de hemoglobina glicosilada y un marcador adecuado para esto podría tener la fórmula:



50 [0012] El algoritmo de calibración usado en la sección (f) puede ser de la forma  $y = mx + c$ , donde  $m$  y  $c$  son las constantes de calibración de intersección y pendiente y  $x = (F_0 - F_\infty)/F_0$ . La sustancia no fluorescente objetivo puede ser una subespecie (por ejemplo, hemoglobina glicosilada) de una sustancia principal (por ejemplo, la hemoglobina total en todas las formas), y las subespecies serán reactivas selectivamente con el compuesto marcador en comparación con la sustancia principal. En tal caso puede ser deseable conocer la concentración total de la sustancia principal (incluyendo las subespecies) presente en la muestra en el  $t_0$  antes de reaccionarla con el compuesto marcador fluorescente. Esto se puede determinar de los valores calculados y un algoritmo de calibración adecuado de la forma  $y = m'x + c'$ ; donde  $m'$  y  $c'$  son las constantes de calibración de intersección y pendiente y  $x = \text{Log}(F_{\text{En blanco}}/F_0)$ .

60 [0013] El cálculo de los valores de  $F_0$  y  $F_\infty$  en el paso (d) incluye preferiblemente trazar los datos de fluorescencia detectados en el paso (c) contra el tiempo, y aplicar una curva de mejor ajuste a los puntos trazados. El trazado puede ser físico o incluso manual, pero a menudo se consigue automáticamente y matemáticamente ajustando la función matemática de una curva de mejor ajuste a los datos y extrapolando esa función al momento  $t_0$  y  $t_\infty$  sin la generación de un gráfico como tal. El ajuste de la curva se puede conseguir por cualquier método matemático adecuado, y dos particularmente apropiados se describen más tarde en la especificación. Usando estos regímenes los datos registrados se usan para minimizar la varianza y después la curva es extrapolada para proporcionar valores para  $F_0$  y  $F_\infty$ .

5 [0014] En un sistema instrumental completamente automatizado, donde la sangre es añadida al reactivo y mezclada por el instrumental, la extinción inicial puede ser posiblemente determinada dentro de los 5 primeros segundos más o menos tras la adición y el mezclado de la sangre. Sin embargo, en un sistema no automatizado, la monitorización de la reacción de enlace inicial es además retrasada debido al tiempo limitado requerido por un operario físicamente para añadir el espécimen de sangre a la cubeta de reacción que contiene el reactivo, mezclar y devolver la cubeta de la reacción al fluorímetro. Por lo tanto, el nivel de fluorescencia real en el  $t_0$ , inmediatamente tras la adición del espécimen de sangre, no puede ser medido directamente en el sistema manual o en el automático. Para superar esto, el nivel de fluorescencia  $F_0$  en el momento  $t_0$ , es decir, inmediatamente tras la adición y mezclado de la muestra pero antes de que tenga lugar la reacción, se determina por extrapolación hacia atrás de una curva ajustada a los datos de fluorescencia en el curso del tiempo, en base a la tasa de la ecuación de la reacción de enlace químico. Además, por extrapolación hacia delante de este ajuste de curva más allá del periodo de recogida de datos, el nivel de fluorescencia  $F_\infty$  en el momento  $t_\infty$  se determina también el punto final de la reacción. Determinando los niveles de fluorescencia en el  $t_0$  y el  $t_\infty$  de esta manera ha demostrado que produce resultados precisos y fiables.

15 [0015] El periodo de tiempo sobre el cual la fluorescencia de la reacción se mide puede ser cualquiera adecuado para lo que se hace el análisis. Un periodo largo da mayor precisión pero un proceso de análisis más lento, mientras que un periodo corto es conveniente, pero puede llevar a resultados menos precisos ya que la cantidad de datos de los que extrapolar se vuelve más dispersa. La duración adecuada del periodo de medición dependerá de la sustancia que está siendo analizada y el perfil temporal de su reacción con el marcador fluorescente. Respecto al enlace del boronato de la hemoglobina con los grupos cis diol, un periodo de medición de alrededor de 3 minutos es habitualmente apropiado.

20 [0016] Se prefiere que antes de que la muestra sea combinada con el compuesto marcador en el paso (a), el compuesto marcador sólo (que está habitualmente en la forma de una solución de reactivo) sea excitado por radiación electromagnética incidente de una longitud de onda adecuada  $\lambda_n$  (es decir, la misma a la que la excitación tiene lugar durante la reacción con la muestra) y la fluorescencia inicial resultante ( $F_{En\ blanco}$ ) en la frecuencia de emisión es detectada en la ausencia de la sustancia no fluorescente. Esto en combinación con el valor de  $F_0$  puede ser usado para calcular la alteración inicial en la fluorescencia, que a su vez puede ser usada para calcular la densidad óptica de fluorescencia (FOD) usando la ecuación:

$$FOD = \text{Log} [F_{En\ blanco}/F_0] \quad (\text{Ecuación 1})$$

25 [0017] Esta función logarítmica de la alteración de fondo inicial (habitualmente un efecto de la extinción) está diseñado como la FOD. Se ha descubierto que la FOD es directamente proporcional a la densidad óptica de la solución de la reacción a una longitud de onda dada. En el ejemplo donde el análisis se refiere a la hemoglobina, es proporcional a la densidad óptica medida a 415 nm (Ver Figura 3). Como la densidad óptica, a 415 nm, es a su vez proporcional a la concentración total de hemoglobina, la medición de la extinción de la fluorescencia de fondo puede por lo tanto ser usada para determinar la concentración total de hemoglobina. Esta determinación de la extinción de la fluorescencia de fondo de la hemoglobina total puede por lo tanto ser usada para reemplazar la determinación de la densidad óptica, hecha de otra forma por un aparato fotométrico separado.

30 [0018] Puede no ser necesario determinar el  $F_{En\ blanco}$  antes de cada análisis, ya que este valor puede ser un valor estándar o constante dependiendo de la cubeta de reacción y del reactivo del compuesto de marcador usado.

35 [0019] De acuerdo a un segundo aspecto de la presente invención también se proporciona un método para determinar la concentración de una sustancia no fluorescente, comprendiendo excitar un reactivo fluorescente que concuerde con la excitación y un espectro de emisión que se superpone al espectro de absorción de la sustancia no fluorescente; detectar la fluorescencia resultante; añadir la sustancia no fluorescente al reactivo fluorescente concordante de tal forma que la sustancia reacciona con el reactivo fluorescente para alterar la fluorescencia a lo largo del tiempo; detectar un intervalo de los valores de fluorescencia durante un periodo de tiempo comenzando al menos 5 segundos después de la adición; usar el intervalo de valores de fluorescencia medidos para extrapolar un valor para la fluorescencia directamente tras la adición de la sustancia en el momento  $t$ ; y calcular la concentración de la sustancia no fluorescente de la diferencia entre la fluorescencia detectada antes y después de la adición de la sustancia no fluorescente.

40 [0020] Es bien conocido el calcular la concentración de una sustancia en solución usando mediciones de densidad ópticas en comparación con los estándares establecidos. Sin embargo el segundo aspecto de la presente invención permite a una concentración ser derivada experimentalmente sin el uso de un fotómetro.

45 [0021] El método del segundo aspecto de la invención puede ser usado donde no hay reacción entre la sustancia no fluorescente y el reactivo, que puede ser similar al compuesto marcador descrito anteriormente. Sin embargo, preferiblemente hay una reacción dependiente del tiempo que altera (ya sea que aumente o disminuya) la fluorescencia detectada. Monitorizando esto y trazando un gráfico (ya sea realmente o teóricamente) como se describe respecto al primer aspecto, el valor del efecto de alteración inicial puede ser estimado precisamente por extrapolación de los datos medidos.

**[0022]** Cuando se mide la concentración de una sustancia que no reacciona con el marcador para cambiar la fluorescencia, no hay necesidad de extrapolar ya que la medición de la fluorescencia tomada algún tiempo después de la adición de la muestra será la misma que la inmediatamente después de eso. Pero cuando la muestra y el reactivo reaccionan, la extrapolación de retroceso a  $t_0$  puede ser usada para superar la incapacidad de medir el valor de  $F_0$  directamente.

**[0023]** Como los varios aspectos de la presente invención describen medios para hacer una determinación precisa de la cantidad o de la concentración de la sustancia presente o de la cantidad de una subespecie de esa sustancia (como el nivel de hemoglobina glicosilada dentro de la hemoglobina total) que está presente para el análisis de los datos de fluorescencia solos, el diseño y la construcción de cualquier instrumento asociado se simplifica mucho, con costes sustancialmente reducidos como una consecuencia. En particular, se pueden usar aparatos más simples no incluyendo un espectrofotómetro para dar mejores resultados.

**[0024]** De acuerdo a un tercer aspecto de la presente invención se proporciona además un aparato para el análisis de una sustancia en una muestra y usar un compuesto marcador fluorescente, este aparato comprende:

(a) un recipiente de reacción adaptado para contener una cantidad de compuesto marcador fluorescente y una muestra de análisis, el compuesto marcador junto con la sustancia en la muestra experimentan una reacción comenzando en el momento  $t_0$  y finalizando en el momento  $t_\infty$  cuando toda la sustancia no fluorescente ha reaccionado con el compuesto marcador que altera las características fluorescentes del compuesto marcador;

(b) una fuente de radiación electromagnética que tiene una longitud de onda  $\lambda_n$  para excitar la fluorescencia en el compuesto marcador;

(c) medios de detección para medir la fluorescencia resultante en múltiples puntos temporales mientras la reacción progresa; y

(d) un procesador adaptado: (1) para calcular de la fluorescencia medida los valores de  $F_0$  siendo la fluorescencia en el momento  $t_0$  y  $F_\infty$  siendo la fluorescencia en el momento  $t_\infty$  cuando toda la sustancia ha reaccionado con el compuesto marcador; (2) para calcular cualquier cambio en la fluorescencia atribuible a la reacción entre la sustancia y el compuesto marcador; y (3) para determinar de los valores calculados la cantidad de sustancia no fluorescente y/o una subespecie de la misma presente en la muestra en  $t_0$ .

**[0025]** Los medios de detección, en el paso (c), pueden también ser adaptados para detectar la fluorescencia inicial  $F_{En\ blanco}$  y el procesador, en el paso (d) puede ser adaptado para calcular cualquier cambio de fondo en la fluorescencia no atribuible a la reacción con el compuesto marcador.

**[0026]** Para que los aspectos de la presente invención tengan un beneficio, al menos un elemento constituyente de la muestra – sea la sustancia que se va a cuantificar, una sustancia relacionada que necesita cuantificación en contraste con la sustancia deseada, o un contaminante – debe tener un espectro de absorción que se superponga en algún grado con el espectro de excitación y de emisión del marcador / reactivo fluorescente. Por lo tanto la longitud de onda de la radiación excitante y la naturaleza del marcador fluorescente deben concordar entre sí y ser seleccionadas en base a la naturaleza del análisis a ser realizado, que a su vez incluye las características de la sustancia a ser cuantificada y otras sustancias propensas a ser encontradas en la muestra.

**[0027]** Muchas modificaciones de los métodos y los aparatos de la presente invención descrita en la presente serán aparentes para el experto y estas modificaciones caen dentro del ámbito de la presente invención. Sin embargo para que estos principios puedan ser entendidos mejor, pero a modo de ejemplo solamente, la presente invención será descrita ahora en detalle en referencia a ciertos ejemplos y donde sea apropiado a los dibujos acompañantes en los que:

La **Figura 1** es un gráfico que recoge la relación entre la densidad óptica (OD) a 415 nm y la cantidad de hemoglobina añadida;

La **Figura 2** es un plano del curso temporal de la señal de fluorescencia durante una reacción de enlace de hemoglobina / ácido eosina-borónico;

La **Figura 3** es un gráfico mostrando la relación entre la OD a 415 nm y la FOD derivada de la extinción de la fluorescencia de fondo;

La **Figura 4** es un gráfico mostrando las diferencias espectrales entre los diferentes tipos de hemoglobinas;

La **Figura 5** es un gráfico mostrando el espectro de absorción de la bilirrubina;

La **Figura 6** es un plano gráfico de los datos de fluorescencia contra el tiempo para la muestra 1 en el Ejemplo 1;

La **Figura 7** es un plano de la concentración de hemoglobina glicosilada contra la extinción específica para el Ejemplo 1; y

La **Figura 8** es un plano de la concentración total de hemoglobina contra la Densidad Óptica de Fluorescencia (FOD) para el Ejemplo 1.

**[0028]** La presente invención puede ser usada para analizar la hemoglobina y en particular la hemoglobina glicosilada en sangre. En dicho método el compuesto marcador fluorescente, que puede ser ácido fluorosceína-

borónico o como en este ejemplo un compuesto de ácido eosina-borónico, se introduce en una cubeta y antes de la introducción de un espécimen sanguíneo, se excita en un fluorímetro por radiación EM a una longitud de onda adecuada (510 nm) y la fluorescencia en blanco ( $F_{En\ blanco}$ ) se mide detectando la emisión a 580 nm. Estas longitudes de onda fueron elegidas porque don un movimiento del máximo de excitación de la Eosina Y se consigue un mejor rendimiento del análisis. La longitud de onda de excitación elegida correspondiente a un punto donde el espectro de absorción de muchas especies de hemoglobina diferentes encontradas en la sangre (es decir carboxi-hemoglobina, oxi-, deoxi-, met-, etc.) tiene la variación más pequeña. Igualmente la longitud de onda monitorizada, 580 nm (con un paso de banda de 40 n), se elige para minimizar las diferencias entre la absorción integrada, sobre el paso de banda de emisión, para las varias especies de hemoglobina. La cubeta es retirada del fluorímetro o dejada en su lugar y la muestra de sangre es inmediatamente añadida y mezclada y se detecta y se registra la fluorescencia durante un curso de tiempo. Estos datos se trazan y una curva es ajustada al conjunto de datos. La Figura 2 muestra dicho perfil temporal de la reacción donde la fluorescencia inicial  $F_{En\ blanco}$  etiquetada 10 es registrada antes de la introducción de la muestra en el  $t_0$  (11). Los datos de la fluorescencia experimental reales para la reacción son registrados durante el tiempo (habitualmente en intervalos de 1 segundo) desde la reintroducción de la cubeta en un sistema manual o tras la mezcla en un sistema automático en el punto 13 hasta que ha transcurrido un periodo adecuado. Por extrapolación hacia atrás, se determina el nivel de fluorescencia  $F_0$  (ver punto marcado como 14) en el  $t_0$  (11), es decir el punto cuando la muestra fue añadida pero no tuvo lugar reacción con el marcador. Por extrapolación hacia adelante (que no se muestra porque el final de los datos de la medición están fuera del gráfico en la Figura 2) se determina de forma similar el nivel de fluorescencia  $F_\infty$  (15.) en el punto final de la reacción  $t_\infty$ .

[0029] Dos de muchas rutinas de ajuste de curva potenciales han mostrado ser efectivas en la estimación extrapolada de  $F_0$  y  $F_\infty$  y la posterior derivación de la FOD y la extinción específica.

[0030] En la primera se hace una estimación  $F_{t-estimada}$  en base a la fluorescencia medida  $F_{t-real}$  en cada uno de los puntos de medición de un segundo a lo largo del análisis de 3 minutos, usando una rutina de ajuste de curvas basada en la ecuación de tasa general siguiente (Ecuación 2).

$$F_t = F_0 + (F_\infty - F_0) \times (1 - e^{-t/\theta}) \quad \text{Ecuación 2}$$

donde,  
 $F_t$  = Fluorescencia en el momento t segundos  
 $F_0$  = Fluorescencia en el momento cero  
 $F_\infty$  = Fluorescencia en el momento infinito (es decir al final de la reacción)  
 $e = 2,7813$  (base logarítmica natural)  
 $\theta$  = constante de tasa  
 con  $F_0$ ,  $F_\infty$ , y  $\theta$  siendo determinados iterativamente minimizando la suma de las diferencias al cuadrado entre el valor ajustado y el medido a cada punto temporal de un segundo, es decir,  $\sum (F_{t-real} - F_{t-estimado})^2$  es minimizado por la rutina de ajuste.

[0031] El segundo enfoque usa la ecuación de tasa para una reacción química de segundo orden en lugar de la ecuación de tasa general (Ecuación 2) usada anteriormente, por la que:



$$V_0 = k[A][B]$$

donde,  
 $V_0$  es la tasa de reacción,  
 $k$  = constante de tasa

[0032] La constante de tasa  $k$ , se define por

$$k = A \cdot e^{-E/(RT)}$$

donde,  
 $E$  = constante,  
 $A$  = energía de activación,  
 $R$  = constante de gas y  
 $T$  = temperatura absoluta

[0033]  $V_0$  se usa para calcular la intensidad de fluorescencia para cada segundo, las concentraciones de los reactivos modificados y  $V_0$  después se recalculan para el siguiente punto temporal. Un procedimiento iterativo

minimiza la suma de las varianzas al cuadrado entre el valor estimado y el valor medido ajustando los valores para E, A y R como en el ejemplo anterior.

5 **[0034]** Sin embargo, debe tenerse en cuenta que al menos respecto a la cuantificación de la hemoglobina la presente invención se refiere a los principios de estimar la caída de la fluorescencia inicial causada por la extinción de la fluorescencia debido al efecto filtro inherente de la hemoglobina, y después posiblemente usar esto para estimar la concentración de la sustancia o en realidad cualquier material de la extinción en la muestra. El modelo matemático de los datos se puede conseguir por otros métodos de ajuste de curvas que pueden ser igualmente aceptables en la práctica.

10 **[0035]** El parámetro FOD, densidad óptica de fluorescencia, se determina por la siguiente expresión:

$$\text{FOD} = \text{Log} [F_{\text{En blanco}}/F_0] \quad (\text{Ecuación 1})$$

15 **[0036]** Se ha descubierto que la FOD está linealmente relacionada con la concentración total de hemoglobina. Se ha demostrado que la concentración de hemoglobina es proporcional a la densidad óptica de una muestra de sangre y 415 nm y la Figura 3 muestran que la FOS es directamente proporcional a la OD de la muestra. La alteración inicial, que cuando se analizan muestras de sangre para la hemoglobina es una caída (o extinción), cuando se calcula como una función logarítmica (FOD), se correlaciona con la medición de hemoglobina por fotometría de absorción en otras longitudes de onda.

20 **[0037]** Además de los beneficios comentados anteriormente, la presente invención también tiene otras consecuencias benéficas importantes particularmente en el análisis de sangre para la presencia de cuantos de hemoglobina glicosilada. La hemoglobina en los glóbulos rojos existe en una variedad de estados dependiendo del estado de oxigenación de la sangre del donante y su condición fisiológica. La deoxihemoglobina, la oxihemoglobina, la carboxihemoglobina, la sulfhidrilo hemoglobina y la met-hemoglobina son algunos de los tipos, o modificaciones químicas de la hemoglobina que pueden estar presentes en las muestras de sangre en cantidades diversas dependiendo de su edad y fuente. Cada tipo de hemoglobina se caracteriza por un espectro de absorción único cuando se somete a la luz de longitudes de ondas diversas (ver Figura 4 para una comparación de la oxihemoglobina y la deoxihemoglobina). Las muestras de sangre procesadas y almacenadas acumulan en particular una proporción significativa de met-hemoglobina donde el ión férrico está oxidado, cambiando su espectro de absorción y explicando su coloración rojal marrón profunda.

25 **[0038]** El estado de la técnica como se ejemplifica por la EP 0.772.779 no aprecia o contrarresta la influencia del estado de la molécula de hemoglobina con su espectro de absorción asociado, o su capacidad para extinguir la fluorescencia tanto en virtud de su absorción intrínseca como en virtud de su superposición espectral con el conjugado fluorescente. En cambio espera que una medición de la hemoglobina a 405 o 415 nm prediga precisamente la caída por extinción inicial causada por la presencia de hemoglobina en la muestra. Esto sólo es verdad para muestras de hemoglobina que tienen un espectro idéntico ya que la caída por extinción inicial es causada por los máximos de absorción de la hemoglobina secundarios que corresponden con las longitudes de onda de excitación y emisión  $\lambda_n$  del fluoróforo usado. Son los máximos de absorción secundarios los que muestran más variabilidad entre los estados de la hemoglobina.

30 **[0039]** Estas diferencias en los tipos de hemoglobina en el análisis son tan significativas que para calibrar el análisis, se deben usar los estándares que tienen la misma composición de tipos de hemoglobina que las muestras desconocidas bajo investigación. Por supuesto, en la práctica, el estado de un perfil de hemoglobina de un individuo es desconocido a la hora de la medición incluso si esa muestra está recién extraída ya sea de una punzada en el dedo o de una venopunción y, por lo tanto, la utilidad del análisis como método de cuidado está comprometida, ya que no pueden tener lugar imprecisiones inaceptables.

35 **[0040]** Además, los análisis clínicos de la HbA1c y otras hemoglobinas glicosiladas son a menudo sujetas a un proceso de verificación que implica la distribución de muestras de sangre almacenadas por un laboratorio central y su análisis simultáneo por sistemas diferentes. Si el análisis no se realiza idénticamente entre muestras recientes de pacientes y almacenadas o muestras de sangre manipuladas por laboratorios, tendrá lugar una tendencia inaceptable y el análisis fallará en conseguir los valores correctos.

40 **[0041]** Por lo tanto, además de la simplificación de los requisitos de instrumentación y medición, un beneficio adicional de la presente invención es el hecho de que una medición de la medición óptica basada en la extinción de la fluorescencia intrínseca de la muestra (FOD) reduce los errores que pueden ser introducidos en la metodología de prueba por las variaciones en el espectro compuesto de un perfil de hemoglobina de un individuo dado porque los espectros de los varios tipos de hemoglobina a estas longitudes de onda se asemeja más.

45 **[0042]** Un beneficio final de la presente invención es la reducción de errores causados por la presencia de muchos factores que interfieren que pueden influenciar las mediciones de absorción a 405 ó 415 nm. Por ejemplo, los pacientes que sufren de enfermedades de hígado que se manifiestan en la ictericia (es decir amarillamiento de la piel y los glóbulos oculares) tienen unos niveles circulantes altos de bilirrubina. La bilirrubina es un subproducto

5 circulante del metabolismo de la hemoglobina y tiene una absorción de superposición significativa con los máximos principales de la hemoglobina (Figura 5). El método del estado de la técnica, que estimaba la extinción de la fluorescencia de fondo de una medición de la densidad óptica de la hemoglobina a sus máximos de absorción principales, puede ser influenciado por altos niveles de circulación de bilirrubina. La presente invención, estimando la hemoglobina total por la extinción de la fluorescencia de fondo a longitudes de onda mayores que 500 nm, elimina esta fuente de error potencial.

**Ejemplo 1**

10 **[0043]** Se introdujo un volumen conocido (2,5 mL) de reactivo que comprendía un regulador (principalmente HEPES) y un compuesto fluorescente (Eosina Boronato) en una cubeta de reacción. Esto fue introducido en un aparato de acuerdo a la presente invención y fue sacada a 510 nm. Las lecturas de fluorescencia en blanco fueron tomadas a intervalos de 1 segundo.

15 **[0044]** Después, se introdujo un volumen de sangre, cuyo contenido/concentración de hemoglobina total y porcentaje de hemoglobina glicosilada se conoce, en una cubeta en el momento  $t_0$  y se mezcló. La fluorescencia a 510 nm fue después medida cada segundo hasta 3 minutos del tiempo de reacción. El tiempo necesario para llevar a cabo los resultados de la mezcla en la fluorescencia sólo se registraron desde alrededor del 7° segundo en adelante.

20 **[0045]** Las lecturas en blanco y de sangre de la señal y referencia de fluorescencia se exponen en la Tabla 1 siguiente.

**Tabla 1**

Número de Lectura (Segundos)	Datos de Fluorescencia Brutos		Señal de Fluorescencia Menos Fluorescencia de Fondo	Señal de Fluorescencia / Referencia de Fluorescencia	Ajuste
	Señal	Referencia			
Espacios en blanco					
1	3564362	51585883	3563988	0.069088436	
2	3564298	51585628	3563924	0.069087537	



ES 2 377 232 T3

(continuación)

	Número de Lectura (Segundos)	Datos de Fluorescencia Brutos		Señal de Fluorescencia Menos Fluorescencia de Fondo	Señal de Fluorescencia / Referencia de Fluorescencia	Ajuste
		Señal	Referencia			
5	3	3564874	51585846	3564500	0.069098411	
	4	3566215	51586743	3565841	0.069123205	
10	5	3565496	51586091	3565122	0.069110141	
	Sangres					
	1	0	0	-374		0.0575
15	2	0	0	-374		0.0575
	3	0	0	-374		0.0575
	4	0	0	-374		0.0574
20	5	0	0	-374		0.0574
	6	0	0	-374		0.0574
	7	2955821	51583592	2955447	0.057294323	0.0573
25	8	2955062	51582679	2954688	0.057280623	0.0573
	9	2953008	51583518	2952634	0.057239873	0.0573
	10	2949933	51582543	2949559	0.057181341	0.0572
30	11	2949493	51583139	2949119	0.057172151	0.0572
	12	2946591	51582599	2946217	0.05711649	0.0572
	13	2945289	51583468	2944915	0.057090287	0.0571
35	14	2944638	51583291	2944264	0.057077863	0.0571
	15	2943483	51583517	2943109	0.057055222	0.0571
	16	2941483	51582296	2941109	0.057017799	0.0571
40	17	2939910	51584175	2939536	0.056985229	0.0570
	18	2938487	51583010	2938113	0.056958929	0.0570
	19	2937585	51582202	2937211	0.056942334	0.0570
45	20	2935457	51583227	2935083	0.056899949	0.0569
	21	2934545	51584002	2934171	0.056881415	0.0569
	22	2933246	51582555	2932872	0.056857827	0.0569
50	23	2932307	51583308	2931933	0.056838794	0.0569
	24	2930244	51583334	2929870	0.056798771	0.0568
	25	2928809	51583527	2928435	0.05677074	0.0568
55	26	2928925	51582154	2928551	0.0567745	0.0568
	27	2927934	51582712	2927560	0.056754674	0.0568
	28	2925072	51583693	2924698	0.056698112	0.0567
60	29	2924539	51582904	2924165	0.056688646	0.0567
	30	2924052	51583196	2923678	0.056678884	0.0567
	31	2921778	51582587	2921404	0.056635469	0.0567
65	32	2921581	51583313	2921207	0.056630853	0.0567

ES 2 377 232 T3

(continuada)

	Número de Lectura (Segundos)	Datos de Fluorescencia Brutos		Señal de Fluorescencia Menos Fluorescencia de Fondo	Señal de Fluorescencia / Referencia de Fluorescencia	Ajuste
		Señal	Referencia			
5	33	2918178	51581710	2917804	0.05656664	0.0566
	34	2918348	51581902	2917974	0.056569725	0.0566
10	35	2916054	51582192	2915680	0.056524934	0.0566
	36	2915194	51582289	2914820	0.056508155	0.0566
	37	2914844	51582120	2914470	0.056501555	0.0565
15	38	2914629	51581901	2914255	0.056497627	0.0565
	39	2912071	51581619	2911697	0.056448345	0.0565
	40	2911685	51581776	2911311	0.056440689	0.0565
20	41	2909430	51580144	2909056	0.056398757	0.0565
	42	2909121	51581358	2908747	0.056391439	0.0564
	43	2908666	51581300	2908292	0.056382681	0.0564
25	44	2906914	51581161	2906540	0.056348867	0.0564
	45	2905229	51581336	2904855	0.056316009	0.0564
	46	2904469	51581125	2904095	0.056301506	0.0564
30	47	2903867	51580515	2903493	0.0562905	0.0564
	48	2903108	51580361	2902734	0.056275954	0.0563
	49	2902382	51580998	2902008	0.056261184	0.0563
35	50	2900836	51580764	2900462	0.056231466	0.0563
	51	2899915	51580441	2899541	0.056213963	0.0563
	52	2899699	51580109	2899325	0.056210137	0.0563
40	53	2899117	51579994	2898743	0.056198979	0.0563
	54	2898402	51579715	2898028	0.056185421	0.0562
	55	2896664	51580326	2896290	0.05615106	0.0562
45	56	2897052	51580613	2896678	0.05615827	0.0562
	57	2896426	51580073	2896052	0.056146722	0.0562
	58	2895070	51580024	2894696	0.056120486	0.0562
50	59	2894867	51579530	2894493	0.056117088	0.0562
	60	2893832	51579129	2893458	0.056097458	0.0562
	61	2893835	51578832	2893461	0.056097839	0.0561
55	62	2893142	51580065	2892768	0.056083062	0.0561
	63	2891979	51579300	2891605	0.056061346	0.0561
	64	2891624	51580313	2891250	0.056053363	0.0561
60	65	2889838	51579562	2889464	0.056019553	0.0561
	66	2890166	51579307	2889792	0.056026189	0.0561
	67	2888871	51579263	2888497	0.05600113	0.0561
65	68	2888266	51579055	2887892	0.055989626	0.0560

ES 2 377 232 T3

(continuada)

Número de Lectura (Segundos)	Datos de Fluorescencia Brutos		Señal de Fluorescencia Menos Fluorescencia de Fondo	Señal de Fluorescencia / Referencia de Fluorescencia	Ajuste	
	Señal	Referencia				
5	69	2887788	51578116	2887414	0.055981378	0.0560
	70	2887371	51578675	2886997	0.055972686	0.0560
10	71	2887694	51578175	2887320	0.055979491	0.0560
	72	2887040	51578384	2886666	0.055966585	0.0560
	73	2886642	51577925	2886268	0.055959366	0.0560
15	74	2885106	51577596	2884732	0.055929943	0.0560
	75	2884262	51576184	2883888	0.05591511	0.0560
	76	2884732	51577237	2884358	0.055923081	0.0560
20	77	2884096	51577591	2883722	0.055910366	0.0559
	78	2883331	51576616	2882957	0.055896591	0.0559
	79	2882382	51577518	2882008	0.055877214	0.0559
25	80	2883826	51577070	2883452	0.055905696	0.0559
	81	2882045	51577415	2881671	0.055870792	0.0559
	82	2881718	51577408	2881344	0.055864459	0.0559
30	83	2881424	51577078	2881050	0.055859116	0.0559
	84	2881564	51576485	2881190	0.055862473	0.0559
	85	2882487	51575751	2882113	0.055881164	0.0559
35	86	2879464	51575861	2879090	0.055822432	0.0559
	87	2879806	51575495	2879432	0.055829459	0.0558
	88	2878031	51575609	2877657	0.05579492	0.0558
40	89	2877710	51576230	2877336	0.055788025	0.0558
	90	2876336	51576600	2875962	0.055760985	0.0558
	91	2877713	51576006	2877339	0.055788325	0.0558
45	92	2877616	51576122	2877242	0.055786319	0.0558
	93	2877104	51578012	2876730	0.055774348	0.0558
	94	2874740	51577685	2874366	0.055728868	0.0558
50	95	2875728	51576443	2875354	0.055749366	0.0558
	96	2874720	51576213	2874346	0.055730071	0.0558
	97	2875418	51576641	2875044	0.055743142	0.0558
55	98	2875735	51576325	2875361	0.055749629	0.0558
	99	2875128	51576472	2874754	0.055737701	0.0557
	100	2874927	51576492	2874553	0.055733783	0.0557
60	101	2874846	51576435	2874472	0.055732274	0.0557
	102	2873640	51576098	2873266	0.055709255	0.0557
	103	2873382	51575645	2873008	0.055704742	0.0557
65	104	2872954	51576065	2872580	0.05569599	0.0557

ES 2 377 232 T3

(continuación)

	Número de Lectura (Segundos)	Datos de Fluorescencia Brutos		Señal de Fluorescencia Menos Fluorescencia de Fondo	Señal de Fluorescencia / Referencia de Fluorescencia	Ajuste
		Señal	Referencia			
5	105	2872727	51575160	2872353	0.055692566	0.0557
	106	2871226	51575773	2870852	0.055662801	0.0557
	107	2872402	51575375	2872028	0.055686032	0.0557
10	108	2872774	51576582	2872400	0.055691942	0.0557
	109	2870911	51575349	2870537	0.055657151	0.0557
	110	2871892	51575295	2871518	0.05567623	0.0557
15	111	2870390	51575094	2870016	0.055647325	0.0557
	112	2870840	51576083	2870466	0.055654983	0.0557
	113	2870388	51575798	2870014	0.055646526	0.0556
20	114	2869947	51574332	2869573	0.055639557	0.0556
	115	2870353	51573855	2869979	0.055647944	0.0556
	116	2869297	51574060	2868923	0.055627247	0.0556
25	117	2868911	51573600	2868537	0.055620259	0.0556
	118	2868895	51573772	2868521	0.055619763	0.0556
	119	2868030	51573821	2867656	0.055602939	0.0556
30	120	2868701	51574367	2868327	0.05561536	0.0556
	121	2866233	51574457	2865859	0.05556741	0.0556
	122	2867978	51573835	2867604	0.055601915	0.0556
35	123	2867313	51573376	2866939	0.055589516	0.0556
	124	2867172	51573576	2866798	0.055586566	0.0556
	125	2866858	51573178	2866484	0.055580907	0.0556
40	126	2867058	51573583	2866684	0.055584348	0.0556
	127	2867722	51573210	2867348	0.055597625	0.0556
	128	2867285	51574328	2866911	0.055587947	0.0556
45	129	2858225	51574505	2857851	0.055412088	0.0556
	130	2867356	51573382	2866982	0.055590343	0.0556
	131	2863993	51573955	2863619	0.055524518	0.0555
50	132	2865453	51573157	2865079	0.055553687	0.0555
	133	2865181	51574269	2864807	0.055547215	0.0555
	134	2864123	51573728	2863749	0.055527283	0.0555
55	135	2864932	51572876	2864558	0.055543887	0.0555
	136	2863379	51572485	2863005	0.055514195	0.0555
	137	2863690	51573048	2863316	0.055519619	0.0555
60	138	2864278	51572945	2863904	0.055531132	0.0555
	139	2864629	51572443	2864255	0.055538478	0.0555
65	140	2862974	51573092	2862600	0.055505689	0.0555

ES 2 377 232 T3

(continuada)

	Número de Lectura (Segundos)	Datos de Fluorescencia Brutos		Señal de Fluorescencia Menos Fluorescencia de Fondo	Señal de Fluorescencia / Referencia de Fluorescencia	Ajuste
		Señal	Referencia			
5	141	2863867	51572498	2863493	0.05523644	0.0555
	142	2863679	51573115	2863305	0.05519334	0.0555
10	143	2862000	51572406	2861626	0.055487541	0.0555
	144	2862424	51573097	2862050	0.055495019	0.0555
	145	2861464	51572506	2861090	0.05547704	0.0555
15	146	2862311	51572555	2861937	0.055493411	0.0555
	147	2862304	51571108	2861930	0.055494832	0.0555
	148	2862010	51571937	2861636	0.05548824	0.0555
20	149	2859734	51572024	2859360	0.055444014	0.0555
	150	2860693	51571533	2860319	0.055463137	0.0555
	151	2860913	51571985	2860539	0.055466917	0.0555
25	152	2862295	51572314	2861921	0.05549336	0.0555
	153	2861267	51571491	2860893	0.055474312	0.0555
	154	2861138	51572499	2860764	0.055470727	0.0555
30	155	2860113	51570936	2859739	0.055452532	0.0555
	156	2859600	51571386	2859226	0.055442101	0.0555
	157	2860578	51571930	2860204	0.05546048	0.0555
35	158	2858371	51571186	2857997	0.055418485	0.0554
	159	2859688	51570801	2859314	0.055444436	0.0554
	160	2860773	51571318	2860399	0.055464919	0.0554
40	161	2857694	51570305	2857320	0.055406304	0.0554
	162	2859769	51570656	2859395	0.055446163	0.0554
	163	2859690	51571693	2859316	0.055443516	0.0554
45	164	2859449	51570510	2859075	0.055440115	0.0554
	165	2860192	51570519	2859818	0.055454513	0.0554
	166	2858530	51569196	2858156	0.055423707	0.0554
50	167	2858942	51570525	2858568	0.055430268	0.0554
	168	2858447	51570477	2858073	0.055420721	0.0554
	169	2857559	51570836	2857185	0.055403116	0.0554
55	170	2857736	51570526	2857362	0.055406881	0.0554
	171	2857315	51569676	2856941	0.055399631	0.0554
	172	2857600	51569981	2857226	0.055404829	0.0554
60	173	2858461	51570608	2858087	0.055420851	0.0554
	174	2856840	51570008	2856466	0.055390063	0.0554
	175	2857004	51569874	2856630	0.055393387	0.0554
65	176	2856544	51569621	2856170	0.055384739	0.0554

Número de Lectura (Segundos)	Datos de Fluorescencia brutos		Señal de Fluorescencia Menos Fluorescencia de Fondo	Señal de Fluorescencia / Referencia de Fluorescencia	Ajuste
	Señal	Referencia			
177	2856786	51569880	2856412	0.055389154	0.0554
178	2856348	51570223	2855974	0.055380292	0.0554
179	2857336	51569511	2856962	0.055400215	0.0554
180	2857080	51570092	2856706	0.055394627	0.0554

**[0046]** Además de los datos de fluorescencia brutos, la Tabla 1 también muestra varias operaciones matemáticas llevadas a cabo en esos datos. La primera operación matemática es restar esta fluorescencia de fondo ( $F_{Bgd}$ ) de los datos de fluorescencia bruta, para tanto las lecturas en blanco y de sangre. La señal de fondo de fluorescencia ( $F_{Bgd}$ ) se deriva de una lectura de la solución reguladora, sin la presencia de un reactivo marcador fluorescente y que ha sido previamente medida. Es predominantemente una constante del lector, este fondo es principalmente el cero eléctrico del fluorímetro; ya que los filtros ópticos del fluorímetro han sido optimizados para reducir la "penetración del filtro" del regulador efectivamente a "cero".

**[0047]** Las tres últimas de las lecturas en blanco se promedian para establecer el  $F_{En\ blanco}$ .

**[0048]** Los datos de fluorescencia corregidos son después divididos por la referencia. Si esto se traza contra el tiempo produce una curva como se muestra en la Figura 6. Una curva se ajusta a estos valores usando un algoritmo adecuado como se ha mencionado anteriormente y los valores (como se muestran en la columna de la derecha) son también trazados en el gráfico en la Figura 6. Los valores de  $F_0$  y  $F_\infty$  se pueden derivar de esta muestra por extrapolación hacia atrás y hacia adelante de los datos ajustados a  $t_0$  y a  $t_\infty$  respectivamente.

**[0049]** La Tabla 2 muestra los resultados de una tanda de análisis equivalente en 20 muestras. El análisis de la muestra (muestra 1) mostrado en la Tabla 1 se acompaña con otros 19 que también tenían cantidades de referencia conocidas de Hemoglobina total (Total Hb), concentración de hemoglobina glicosilada ([A1c]) y porcentaje de hemoglobina glicosilada (%A1c).

**[0050]** La  $F_{En\ blanco}$  (corregida) es la media de los valores de "Señal de Fluorescencia/Referencia de Fluorescencia" para los espacios en blanco en la Tabla 1.

**[0051]** Para cada muestra, se calculan la Densidad Óptica de Fluorescencia (FOD) y la Extinción Específica (SQ) de  $F_{En\ blanco}$ ,  $F_0$  y  $F_\infty$  usando las fórmulas siguientes:

$$FOD = \text{Log} [(F_{En\ blanco} - F_{Bdg}) / (F_0 - F_{Bdg})] \quad \text{[Ecuación 1B]}$$

$$SQ = (F_0 - F_\infty) / (F_0 - F_{Bdg}) \quad \text{[Ecuación 3]}$$

**[0052]** De De FOS y SQ se calculan las concentraciones de hemoglobina total y hemoglobina glicosilada (a1c) respectivamente por.

$$[Hb\ Total] = m.FOD + c \quad \text{[Ecuación 4]}$$

$$[A1c] = m'.SQ + c' \quad \text{[Ecuación 5]}$$

**[0053]** Las constantes de calibración  $m$ ,  $m'$ ,  $c$  y  $c'$  se derivan de los datos de la análisis de la curva estándar (línea recta) usando muestras de concentraciones [A1c] y [Hb Total] conocidas. Para los datos de la muestra proporcionado  $c$  y  $c'$  son cero ya que los datos han sido restringidos en ambos trazados a ir hacia cero.

**[0054]** El porcentaje de hemoglobina glicosilada en la muestra es después calculado así:

$$\%A1c = ([A1c] / [Hb]) * 100\% \quad \text{[Ecuación 6]}$$

$$\%A1c = ((m'.SQ + c') / (m.FOD + c)) * 100 \quad \text{[Ecuación 7]}$$

**[0055]** Si el valor de la concentración de Hemoglobina Total es trazado contra la FOD se ha descubierto que son directamente proporcionales y el gráfico puede ser resumido de acuerdo a la ecuación  $y = mx + c$  en la que  $y$  es la concentración total de Hemoglobina y  $x$  es la FOD.  $m$  y  $c$  pueden ser entonces calculadas para un conjunto particular de parámetros de reacción específicos para dar la curva de calibración estándar. La Figura 8 muestra [Hb Total] contra FOD por las muestras 1 a 20 con la línea ajustada a la misma siendo resumida por la ecuación  $y = mx + c$ .

**[0056]** Igualmente se ha descubierto que la Extinción Especifica (SQ) es directamente proporcional a la concentración de A1c, y el gráfico puede ser resumido de acuerdo a la ecuación  $y = m'x + c'$  en la que  $y$  es la concentración de Hemoglobina glicosilada y  $x$  es la extinción específica.  $m'$  y  $c'$  pueden entonces ser calculadas para un juego particular de condiciones de reacción específicas para dar estándares adicionales. La Figura 7 muestra [a1c] contra SQ para las muestras 1 a 20 con la línea ajustada a la misma siendo resumida por la ecuación  $y = m'x + c'$ .

**[0057]** Para este ejemplo los estándares derivados de estas se muestran a continuación en la Tabla 3.

**Tabla 3**

[A1c] -vs.- SQ Pendiente = $m'$	0.1302
[A1c] - vs. - SQ Intercepción = $c'$	0
[Total Hb] - vs. - FOD Pendiente = $m$	1.318
[Total Hb] - vs. - FOD Intercepción = $c$	0

**[0058]** Estas constantes de calibración son derivadas para un juego particular de criterios de reacción, y estos pueden ser usados para análisis posteriores usando los mismos criterios. Condiciones de reacción diferentes pueden requerir diferentes constantes de calibración para ser derivadas.

**[0059]** La Tabla 2 muestra los valores calculados de % de Hemoglobina Glicosilada y una comparación con el valor conocido indica la naturaleza precisa del análisis de la presente invención. De hecho la desviación estándar del error en el conjunto de los datos de la muestra es sólo 0,4% A1c, demostrando la precisión de la presente invención.

Tabla 2

Número de Muestra	%A1c de Referencia	[A1c]de Referencia	[Total Hb] de Referencia	F <sub>Esblanco</sub> (corregido)	F <sub>0</sub> Derivado	F <sub>n</sub> Derivado	Extinción de Fluorescencia Inherente	Extinción de Fluorescencia Especifica	FOD	%A1c Medido
1	5.65%	0.0059	0.1052	0.06863	0.05757	0.05525	16.12%	4.01%	0.07636	5.19%
2	5.05%	0.0045	0.0881	0.06487	0.05545	0.05354	14.52%	3.44%	0.06812	5.00%
3	11.05%	0.0125	0.1135	0.07210	0.06003	0.05448	16.74%	9.25%	0.07955	11.49%
4	10.25%	0.0110	0.1077	0.06689	0.05540	0.05078	17.18%	8.33%	0.08188	10.05%
5	5.95%	0.0054	0.0913	0.06983	0.05987	0.05741	14.26%	4.10%	0.06683	6.06%
6	6.35%	0.0063	0.0987	0.06716	0.05661	0.05404	15.72%	4.54%	0.07426	6.03%
7	8.95%	0.0077	0.0864	0.06802	0.05867	0.05509	13.75%	6.11%	0.06426	9.39%
8	8.75%	0.0065	0.0744	0.06656	0.05796	0.05490	12.92%	5.28%	0.06009	8.67%
9	6.85%	0.0064	0.0928	0.06544	0.05560	0.05283	15.03%	4.99%	0.07075	6.96%
10	6.55%	0.0044	0.0675	0.07662	0.06797	0.06537	11.30%	3.81%	0.05205	7.24%
11	6.75%	0.0064	0.0952	0.06598	0.05575	0.05289	15.51%	5.13%	0.07318	6.93%
12	11.55%	0.0109	0.0944	0.06622	0.07268	0.06664	15.70%	8.31%	0.07415	11.07%
13	7.60%	0.0075	0.0993	0.06407	0.05362	0.05074	16.31%	5.38%	0.07734	6.87%
14	6.80%	0.0064	0.0944	0.06394	0.05443	0.05165	14.87%	5.11%	0.06993	7.22%
15	7.05%	0.0069	0.0963	0.06689	0.05628	0.05326	15.87%	5.36%	0.07503	7.06%
16	6.85%	0.0054	0.0795	0.06779	0.05683	0.05606	13.22%	4.70%	0.06158	7.54%
17	12.95%	0.0135	0.1045	0.07168	0.05956	0.05325	16.92%	10.59%	0.08048	13.00%
18	6.10%	0.0060	0.0977	0.06451	0.05436	0.05194	15.73%	4.44%	0.07435	5.90%
19	5.90%	0.0062	0.1046	0.06804	0.05667	0.05419	16.71%	4.37%	0.07942	5.44%
20	9.00%	0.0084	0.0934	0.06681	0.05813	0.05421	15.52%	6.74%	0.07324	9.09%



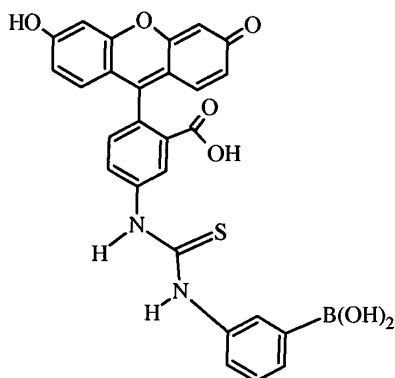
## REIVINDICACIONES

1. Un método para llevar a cabo un análisis para una sustancia no fluorescente en una muestra de análisis, este método comprende:
- 5 (a) llevar a cabo una reacción en una solución entre una sustancia no fluorescente en una muestra de análisis y un compuesto marcador fluorescente, la muestra y el compuesto marcador siendo combinadas en el momento  $t_0$ ;
- 10 (b) excitar la fluorescencia en el compuesto marcador, en donde la naturaleza del marcador y la naturaleza de la excitación son tales que la mencionada fluorescencia tiene lugar a una longitud de onda en la que dicha fluorescencia es alterada por la reacción del compuesto marcador con la sustancia no fluorescente;
- (c) detectar, en múltiples puntos temporales la fluorescencia resultante mientras progresa la reacción;
- 15 (d) calcular de la fluorescencia detectada los valores de  $F_0$  siendo la fluorescencia en el momento  $t_0$  y  $F_\infty$  siendo la fluorescencia en el momento  $t_\infty$  cuando toda la sustancia no fluorescente ha reaccionado con el compuesto marcador, por ajuste de curva de la fluorescencia detectada y extrapolar la curva al momento  $t_0$  y al  $t_\infty$ .
- (e) calcular de los valores de  $F_0$  y  $F_\infty$  el cambio en la fluorescencia atribuible a la reacción en el paso (a); y
- (f) determinar de los valores calculados y un algoritmo de calibración adecuado la concentración de la sustancia no fluorescente presente en la muestra en  $t_0$  antes de reaccionar con el compuesto marcador fluorescente.
- 20 2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el antes del paso (a) el compuesto marcador es excitado y la fluorescencia resultante inicial ( $F_{En\ blanco}$ ) se detecta en ausencia de la sustancia no fluorescente.
- 25 3. Un método como se reivindica en la reivindicación 2, en el que los valores de  $F_0$  y  $F_{En\ blanco}$  se usan para calcular la densidad de fluorescencia óptica (FOD) usando la ecuación:
- $$FOD = \text{Log} [F_{En\ blanco}/F_0] \quad (\text{Ecuación 1})$$
- 30 4. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el cálculo de los valores  $F_0$  y  $F_\infty$  en el paso (d) incluye ajustar una función matemática de una curva de mejor ajuste a los datos de fluorescencia detectados en el paso (c) y extrapolar esa función al momento  $t_0$  y  $t_\infty$ .
- 35 5. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el algoritmo de calibración usado en la sección (f) es de la forma  $y = mx + c$ , donde  $m$  y  $c$  son las constantes de calibración de pendiente e intercepción, y es la concentración de la sustancia no fluorescente en el  $t_0$  y  $x = (F_0 - F_\infty)/F_0$ .
- 40 6. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la sustancia no fluorescente es una subespecie de una sustancia principal, y la subespecie es selectivamente reactiva con el compuesto marcador, y en donde la concentración total de la sustancia principal y la subespecie presente en la muestra en el  $t_0$  antes de reaccionar con el compuesto marcador fluorescente, se determina de los valores calculados y un algoritmo de calibración adecuado de la forma  $y = m'x + c'$ ; donde  $m'$  y  $c'$  son las constantes de calibración de pendiente e intercepción, y es la concentración total de la sustancia principal incluyendo la subespecie presente en la muestra en el  $t_0$   $x = \text{Log}(F_{En\ blanco}/F_0)$ .
- 45 7. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la sustancia a ser analizada es una proteína glicosilada, y preferiblemente es hemoglobina glicosilada.
- 50 8. Un método como se reivindica en la reivindicación 7, en donde el compuesto marcador contiene un grupo de ácido borónico capaz de enlazar selectivamente con el grupo cis-diol de la proteína glicosilada.
9. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto marcador fluorescente tiene una longitud de onda de excitación principal en el intervalo de 200 nm a 800 nm, y preferiblemente de aproximadamente 510 nm.
- 55 10. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador fluorescente es seleccionado del grupo consistente de compuestos que contienen residuo de fluoresceína; compuestos de la fórmula  $F-NH-CS-NH-Ph-B(OH)_2$  donde Ph es un grupo fenilo y F es un residuo de fluoresceína; y un compuesto de la fórmula I:
- 60
- 65

5

10

15



20

11. Un método como es reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra es una muestra sanguínea, una muestra de plasma, una muestra de suero, o una muestra de orina.

25

12. Aparato para el análisis de una sustancia, en una muestra, que comprende:

30

- (a) un suministro de un compuesto marcador fluorescente;
- (b) un recipiente de reacción adaptado para mantener una cantidad del compuesto marcador fluorescente y una muestra de análisis, que juntos experimentan una reacción comenzando en el momento  $t_0$  y finalizando en el momento  $t_\infty$  cuando toda la sustancia no fluorescente ha reaccionado con el compuesto marcador que altera las características de fluorescencia de compuesto marcador;
- (c) una fuente de radiación electromagnética que tiene una longitud de onda  $\lambda_n$  para excitar la fluorescencia en el compuesto marcador;
- (d) medios de detección para medir la fluorescencia resultante en múltiples puntos temporales mientras progresa la reacción; y
- (e) un procesador adaptado para calcular de la fluorescencia medida los valores de  $F_0$  siendo la fluorescencia en el momento  $t_0$ , y  $F_\infty$  siendo la fluorescencia en el momento  $t_\infty$  cuando toda la sustancia ha reaccionado con el compuesto marcador; para calcular cualquier cambio en la fluorescencia atribuible a la reacción entre la sustancia y el compuesto marcador; y para determinar de esos valores calculados la cantidad y/o concentración de la sustancia no fluorescente y/o una subespecie de la misma presente en la muestra en el momento  $t_0$ .

40

13. Un aparato como se reivindica en la reivindicación 12, que está adaptado para recibir una muestra derivada sanguínea y para realizar un análisis para determinar la cantidad de hemoglobina glicosilada.

45

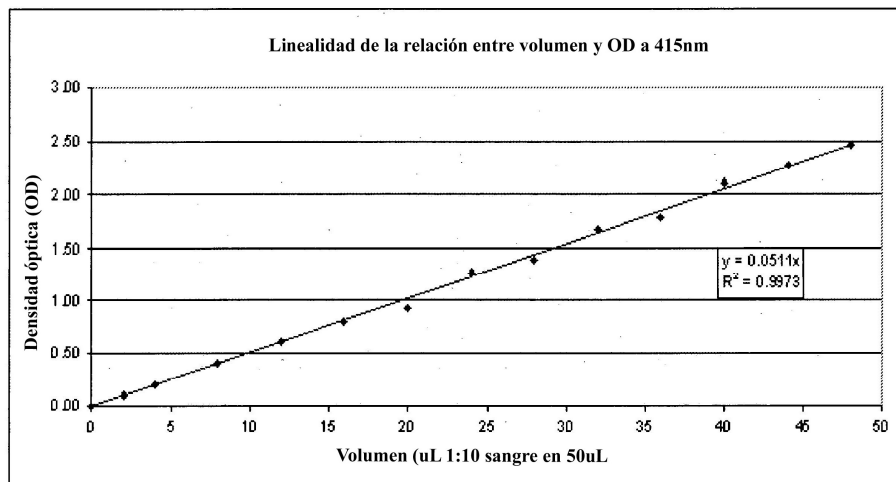
14. Un método de determinar la concentración de una sustancia no fluorescente, que comprende excitar un reactivo fluorescente concordante, el espectro de excitación y de emisión del cual se superpone al espectro de absorción de la sustancia no fluorescente; detectar la fluorescencia resultante; añadir la sustancia no fluorescente al reactivo fluorescente concordante de tal forma que la sustancia reaccione con el reactivo fluorescente para alterar la fluorescencia a lo largo del tiempo; detectar un intervalo de los valores de fluorescencia durante un periodo de tiempo comenzando al menos 5 segundos después de la adición; usar el intervalo de valores de fluorescencia medidos para extrapolar un valor para la fluorescencia directamente tras la adición de la sustancia en el momento  $t_0$ ; y calcular la concentración de la sustancia no fluorescente de la diferencia entre la fluorescencia detectada antes y después de la adición de la sustancia no fluorescente.

55

60

65

FIGURA 1



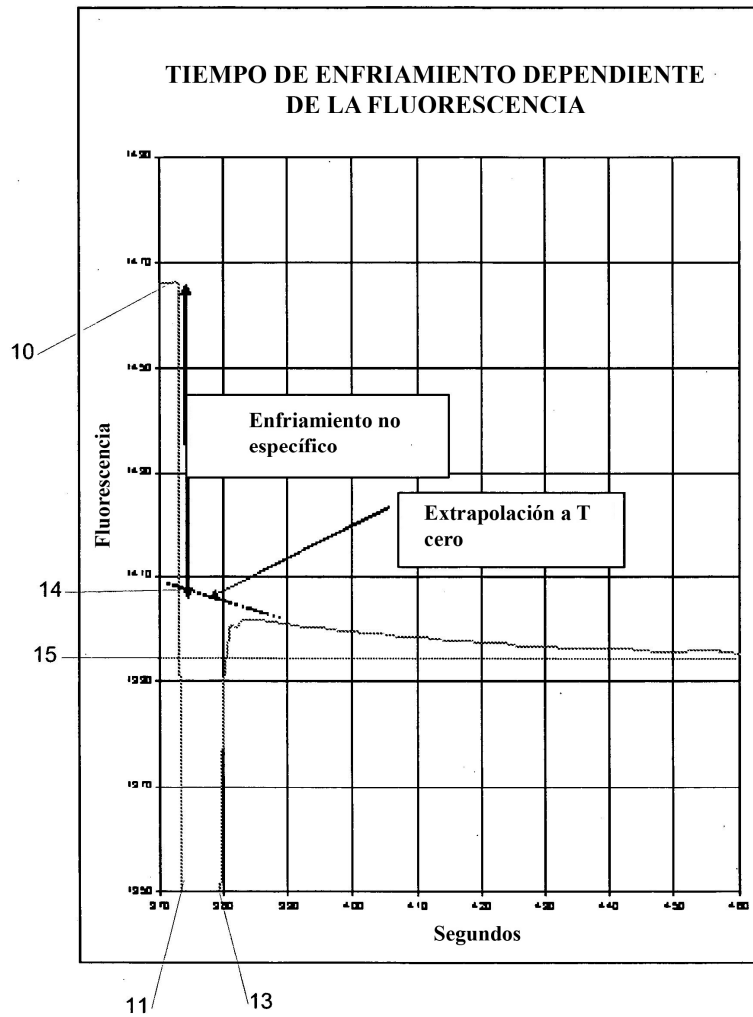


FIGURA 2

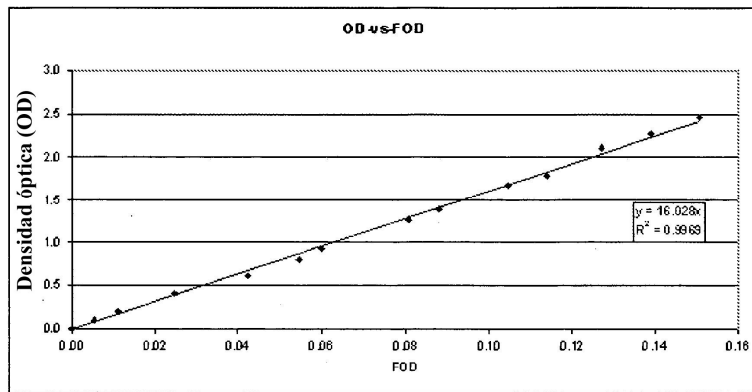


FIGURA 3

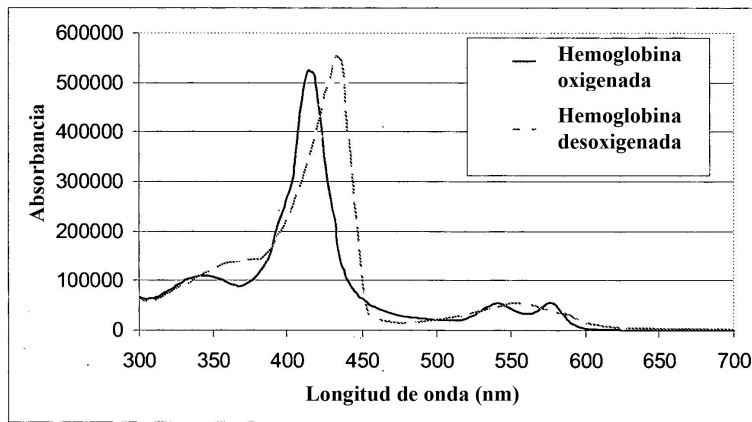


FIGURA 4

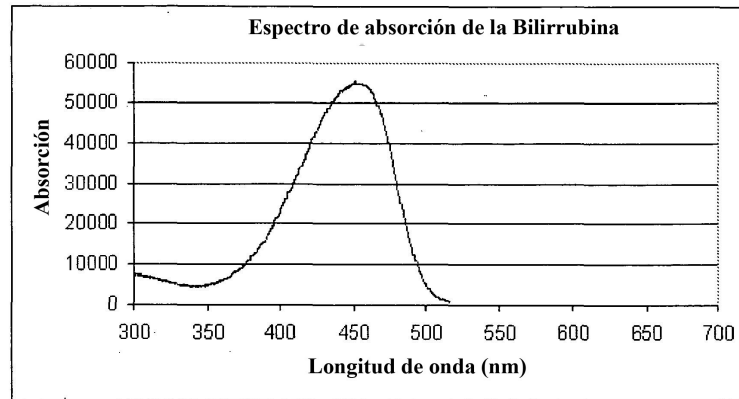


FIGURA 5

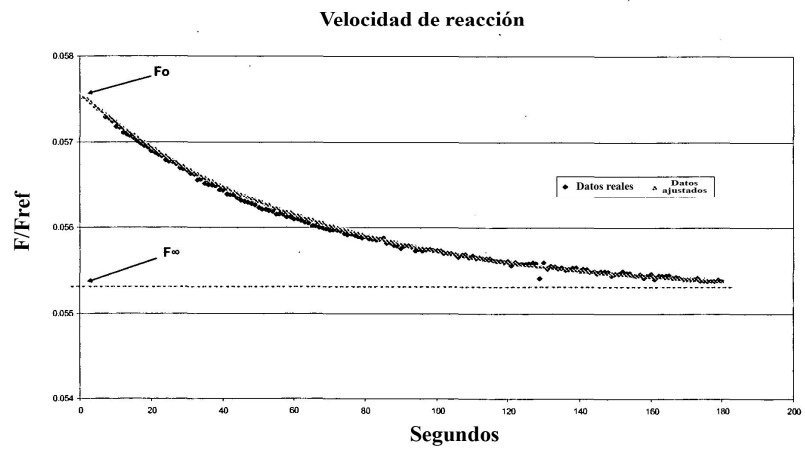


FIGURA 6

[Alc] Concentración -vs- SQ

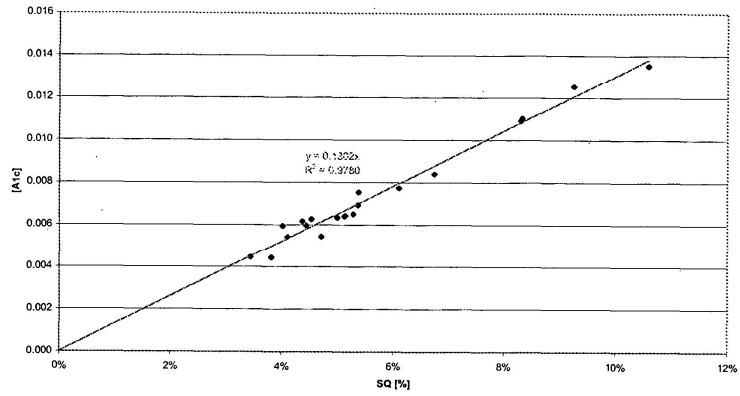


FIGURA 7

[Total Hb] -vs- FOD

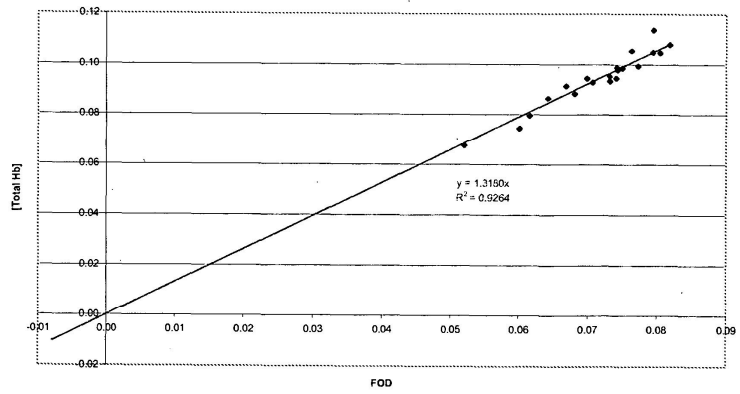


FIGURA 8