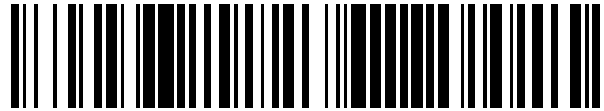


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 757**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2006 E 06750582 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1877104**

54 Título: **Procedimiento para el análisis de la función renal**

30 Prioridad:

19.04.2005 US 672708 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2013

73 Titular/es:

**INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND
TECHNOLOGY CORPORATION (100.0%)
351 WEST 10TH STREET
INDIANAPOLIS IN 46202, US**

72 Inventor/es:

**YU, WEIMING;
MOLITORIS, BRUCE, A. y
SANDOVAL, RUBEN, M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 413 757 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

Procedimiento para el análisis de la función renal

5 La presente solicitud de patente reivindica prioridad a y el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/672.708 titulada "Method and Apparatus For Kidney Function Analysis" [Procedimiento y aparato para el análisis de la función renal], que fue presentada el 19 de abril de 2005, cuya totalidad se incorpora expresamente en el presente documento como referencia.

Antecedentes de la invención

La presente divulgación se refiere, en general, a procedimientos y aparatos para el diagnósticos de órganos y, más particularmente, a procedimientos y aparatos para diagnósticos renales.

10 La medición de las funciones renales es una etapa importante en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades renales. Una de dichas mediciones de la función renal es la tasa de filtración glomerular (GFR). La GFR se define como el volumen de sangre (plasma sanguíneo) filtrado por el riñón dentro de un periodo dado y se mide normalmente en mililitros por minuto (ml/min). El procedimiento clínico habitual usado para medir la GFR es la medición de la depuración de creatinina en orina. La creatinina es un producto metabólico del cuerpo. Sin embargo,
15 la GFR estimada midiendo el nivel de creatinina en la orina es solamente una estimación y no una medición directa de la GFR real. Esto es debido a que la creatinina es producida por el cuerpo de forma constante y secretada a la orina además de la filtración. Las mediciones de GFR típicas requieren al menos de 6 horas a 24 horas para completarse. Sin embargo, las mediciones de GFR pueden no ser posibles cuando los niveles de creatinina en suero no están en equilibrio tal como durante insuficiencia renal aguda. Las técnicas de medición de GFR típicas requieren
20 recoger muestras de orina y/o extraer muestras de sangre.

Existen muchas enfermedades que afectan al riñón o a las funciones del riñón. La proteinuria es un marcador de enfermedad crónica. Un animal (por ejemplo, un paciente humano) con proteinuria puede desarrollar insuficiencia renal, y la detección temprana de la proteinuria es beneficiosa en el tratamiento de muchas enfermedades subyacentes. El procedimiento de diagnóstico típico para proteinuria es la medición del nivel de albúmina en la orina.
25 Dicha medición se realiza normalmente de forma semi-cuantitativa usando varillas de medición del nivel de orina o midiendo químicamente la relación urinaria de proteína con respecto a creatina. El análisis cuantitativo normalmente requiere una recogida de orina durante 24 horas. Sin embargo, incluso una recogida de orina de 24 horas puede dar como resultado un diagnóstico retardado debido a la eliminación de proteínas de la orina por reabsorción por células de los túbulos proximales. Por ejemplo, las proteínas pueden pasar a través de los glomérulos (barrera de filtración renal), entrar en el filtrado renal y ser reabsorbidas por las células tubulares renales dejando de pocas a ninguna proteína en la orina. Esto puede ser particularmente preocupante en nefropatía diabética cuando la detección más temprana de una permeabilidad glomerular a proteínas alterada es crucial para el inicio de la terapia.

Los niveles de glucosa en sangre y orina también se usan como medición de diagnóstico. Los niveles anormales de glucosa en sangre están relacionados directamente con diabetes y otras enfermedades. Los procedimientos típicos
35 usados para determinar los niveles de glucosa en sangre y orina requieren la extracción de sangre y/o la medición del contenido de glucosa en la orina. Estos procedimientos son relativamente lentos y no permiten monitorización en tiempo real de los niveles de glucosa en sangre.

Además, en muchas aplicaciones, es deseable conocer la farmacocinética de un fármaco. Los procedimientos típicos usados para medir la farmacocinética de un fármaco requieren la extracción de sangre de un animal (por ejemplo, un paciente humano) lo que puede ser doloroso y lento. Otros procedimientos usados para medir la farmacocinética de un fármaco incluyen el uso de dispositivos de imagenología médica pesados y costosos tales como IRM.
40

Sumario de la invención

45 La presente invención comprende una o más de las características mencionadas en las reivindicaciones adjuntas y/o las siguientes características que, en solitario o en combinación, pueden constituir materia patentable:

Se proporciona un procedimiento para determinar un diagnóstico fisiológico de un animal. El procedimiento puede incluir la etapa de inyectar una mezcla de una serie de primeras moléculas y una serie de segundas moléculas al animal. El peso molecular de la segunda molécula puede ser mayor que el de la primera molécula. Las primera y segunda moléculas pueden ser sondas fluorescentes. El procedimiento también puede incluir la etapa de determinar
50 una relación molecular de las primeras moléculas y las segundas moléculas. La relación molecular puede ser una relación de intensidad fluorescente de las primera y segunda moléculas. El procedimiento puede incluir, además, determinar datos fisiológicos. Los datos fisiológicos pueden ser, por ejemplo, una constante de velocidad de depuración en plasma de un fármaco o compuesto químico, una tasa de filtración glomerular, una resistencia a la filtración, una velocidad de depuración de glucosa, un valor de resistencia a la filtración de glucosa, un índice metabólico de glucosa y/o un índice metabólico de un fármaco. El índice metabólico de glucosa o de un fármaco puede determinarse basándose en la velocidad de depuración de la glucosa o del fármaco y el valor de resistencia a la filtración de la glucosa o del fármaco, respectivamente.
55

También se proporciona un aparato para determinar un diagnóstico fisiológico de un animal. El aparato puede incluir una serie de aberturas para recibir a un dedo. El aparato también puede incluir una serie de fuentes de luz y una serie de receptores de luz asociados. Cada una de la serie de fuentes de luz y receptores de luz asociados puede estar asociada con una de la serie de aberturas para recibir a un dedo. Las fuentes de luz pueden ser diodos emisores de luz, láseres, láseres de diodo y/o fuentes de luz blanca acopladas con ópticos de selección de longitud de onda. El aparato puede incluir, además, un circuito de generación de luz acoplado a la serie de fuentes de luz y un circuito de detección de luz acoplado a la serie de receptores de luz asociados. El circuito de generación de luz puede incluir un circuito convertidor digital a analógico. El circuito de detección de luz puede estar configurado para detectar una serie de señales ópticas procedentes de los receptores de luz. El circuito de detección de luz también puede incluir una serie de amplificadores y/o una serie de filtros. El aparato puede incluir, adicionalmente, un circuito de recuento de pulsos fotónicos. El circuito de recuento de pulsos fotónicos puede usar TTL para la detección de una señal digital. El circuito de recuento de pulsos puede estar acoplado al circuito de detección de luz. El circuito de recuento de pulsos puede estar configurado para determinar un valor de diagnóstico fisiológico basándose en el número de señales ópticas. Como alternativa, en algunas realizaciones, un circuito convertidor analógico a digital puede usarse y configurarse para la detección de señales analógicas. El aparato puede incluir, además, una interfaz del usuario acoplada eléctricamente al circuito de recuento de pulsos. La interfaz del usuario puede incluir una pantalla de visualización para mostrar el valor de diagnóstico fisiológico. El circuito de recuento de pulsos (o un circuito convertidor analógico a digital) puede estar acoplado de forma que pueda comunicarse de manera inalámbrica al circuito de detección de luz. Además, el circuito de generación de luz, el circuito de recuento de pulsos, o el circuito convertidor analógico a digital, y la interfaz del usuario pueden formar parte de un ordenador personal.

Las anteriores y otras características de la presente divulgación, que en solitario o en cualquier combinación pueden constituir materia patentable, serán evidentes a partir de la siguiente descripción y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La descripción detallada se refiere, particularmente, a las siguientes figuras, en las que:

La figura 1 es un diagrama de flujo del procedimiento de un algoritmo para determinar un diagnóstico renal;

La figura 2 es un diagrama de flujo del procedimiento de una realización del algoritmo de la figura 1 para determinar una tasa de filtración glomerular de un riñón;

La figura 3 es un diagrama de flujo del procedimiento de una realización del algoritmo de la figura 1 para determinar una resistencia a la filtración de proteínas;

La figura 4 es un diagrama de flujo del procedimiento de una realización del algoritmo de la figura 1 para determinar una velocidad de depuración de glucosa en sangre y un índice metabólico;

La figura 5 es un diagrama de flujo del procedimiento de una realización de un algoritmo para determinar una tasa de filtración glomerular de un riñón usando un volumen de distribución calculado;

La figura 6 es una vista en perspectiva de un cabezal de medición de un aparato para determinar diagnósticos fisiológicos;

La figura 7 es una vista en planta superior del cabezal de medición de la figura 6;

La figura 8 es una vista en perspectiva de una realización alternativa del cabezal de medición de la figura 6; y

La figura 9 es una ilustración esquemática de una unidad de control de un aparato para determinar diagnósticos fisiológicos para su uso con el cabezal de medición de la figura 6 o la figura 8.

Descripción detallada de los dibujos

Aunque los conceptos de la presente divulgación son susceptibles de diversas modificaciones y formas alternativas, realizaciones a modo de ejemplo de la misma se han mostrado a modo de ejemplos en los dibujos y se describirán en el presente documento en detalle. Debe entenderse, sin embargo, que no existe ninguna intención de limitar los conceptos de la presente divulgación a las formas particulares desveladas sino que, por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que están dentro del espíritu y el alcance de la divulgación.

Con referencia a la figura 1, se muestra un algoritmo 10 para determinar datos fisiológicos, tales como datos de diagnóstico renal. El algoritmo 10 puede usarse para determinar la tasa de filtración glomerular de los riñones, la resistencia a la filtración molecular de una molécula y/o partículas con tamaños predeterminados, y otras mediciones de diagnóstico renal. Para hacer esto, en la etapa 12 del procedimiento, una mezcla de dos (o más) moléculas, es decir A & B (o más), se inyectan en un animal vivo. Tal como se usa en el presente documento, el término "animal" pretende incluir seres humanos. Las dos (o más) moléculas son de diferentes tamaños (es decir, diferente peso molecular). Las moléculas con grandes pesos moleculares (MW) normalmente son retenidas en el torrente

sanguíneo durante un largo periodo de tiempo (de horas a días) en animales (por ejemplo, pacientes seres humanos) con funciones renales relativamente normales. Si una de las dos o más moléculas es de un peso molecular grande (por ejemplo molécula A >70 kiloDalton), la filtración de la otra molécula o moléculas (por ejemplo, molécula B) puede monitorizarse y la velocidad de depuración de la molécula B puede calcularse basándose en ésta.

En la etapa 14 del procedimiento, se determina la relación molecular de las moléculas. La relación molecular (o polaridad generalizada (GP)) de B/A, $R_{B/A}$, medida en el torrente sanguíneo en función del tiempo está relacionada directamente con las tasas de filtración relativas (velocidades de depuración) de estas moléculas, A & B (o más). La señal que representa la relación molecular, $R_{B/A}$, incluye cualesquiera propiedades que pueden medirse a partir de A y B y pueden determinarse basándose en la siguiente ecuación:

$$R_{B/A} = \frac{S_B}{S_A} \quad (1)$$

donde, S_A es uno cualquiera de una serie de tipos de señales medidos a partir de A y S_B es uno cualquiera de una serie de tipos de señales medidas a partir de B. Los tipos de señales, S_A y S_B , pueden incluir, aunque no se limitan a, intensidad fluorescente, cualquier señal de dispersión (dispersión de Rayleigh, Raman, dispersión coherente antichoque, etc.) de luz incidente (a una o más longitudes de onda), fracción de tiempos de vida de fluorescencia (en este caso, la señal de relación $R_{B/A}$ es una relación entre la contribución fraccional del tiempo de vida de fluorescencia de B y la contribución fraccional del tiempo de vida de fluorescencia de A), absorbancia y polarización. Esta señal de relación (entre A y B o más) también incluye cualesquiera combinaciones entre cualesquiera tipos de señales procedentes de A y B, por ejemplo relación entre señal fluorescente procedente de A y señal de dispersión procedente de B. Además, puede usarse una señal de relación, $R_{B/A} = S_B$, cuando $S_A = 1$ (una señal estacionaria de A normalizada a 1).

En la etapa 16 del procedimiento, el diagnóstico renal de interés se determina basándose en la relación de moléculas. Por ejemplo, la función de descomposición de $R_{B/A}(t)$ (o GP(t)) después de la infusión inicial de la mezcla de A, B (o más) puede describirse con un modelo matemático (ecuación):

$$R_{B/A}(t) = c + \sum_{i=1}^N a_i \exp(-k_i t) \quad (2)$$

donde $R_{B/A}(t)$ es la relación molecular de moléculas B y A medida en función del tiempo; N es el número total de procedimientos exponenciales implicados incluyendo cualquier procedimiento de filtración glomerular, procedimiento de distribución de las moléculas de sonda en el torrente sanguíneo, pérdida no específica de moléculas de sonda en el cuerpo, etc.; c es un constante; a_i es un factor pre-exponencial o una amplitud; y k_i es la constante de descomposición relativa (o constante de velocidad) de procedimientos individuales, respectivamente. Los valores individuales de k pueden determinarse realizando ajuste por mínimos cuadrados lineal (o no lineal si se desea) de la serie temporal $R_{B/A}(t)$ (o GP(t)).

Cuando solamente está presente el procedimiento de filtración glomerular, la función de descomposición $R_{B/A}(t)$ es una única exponencial:

$$R_{B/A}(t) = c + a \exp(-kt) \quad (3)$$

donde $R_{B/A}(t)$ es la relación molecular de moléculas B y A medida en función del tiempo, c es una constante y a es el factor pre-exponencial o la amplitud y k es la constante de descomposición relativa (o constante de velocidad). Tal como se ha descrito anteriormente, si la molécula A tiene un peso molecular grande (por ejemplo, mayor de aproximadamente 70 kD) y, por lo tanto, es retenida en el riñón, la concentración de la molécula A en el torrente sanguíneo puede considerarse estacionaria. Realizando ajuste lineal (o no lineal si se desea) por mínimos cuadrados de la serie temporal $R_{B/A}(t)$ (o GP(t)), el valor de k puede determinarse. La constante de velocidad k (del procedimiento de filtración glomerular) está relacionada directamente con la tasa de filtración glomerular (GFR) y el volumen total de plasma sanguíneo, V_{plasma} y la resistencia molecular, ξ , de acuerdo con la siguiente relación:

$$k = \xi \frac{GFR}{V_{plasma}} \quad (4)$$

El valor de resistencia a la filtración molecular ξ es una medida de la dificultad con la que puede pasar una molécula a través del riñón. Si una molécula (o sustancia) tiene $\xi = 1$, la molécula (o sustancia) puede pasar libremente a través de la barrera de filtración renal sin resistencia. Si una molécula (o sustancia) tiene $\xi < 1$, la molécula (o

sustancia) no puede pasar libremente a través de la barrera de filtración renal. Si una molécula (o sustancia) tiene $\xi > 1$, la molécula (o sustancia) está pasando activamente a través de (debido a mecanismos de transporte activo) la barrera de filtración renal.

El volumen de plasma, V_{plasma} , es proporcional al peso corporal W_b y estos tienen la siguiente relación:

$$V_{plasma} = \rho(\eta W_b) \quad (5)$$

donde η es un factor de peso-volumen de sangre completa (incluyendo tanto plasma como células sanguíneas) y ρ es un factor de porcentaje del volumen de plasma sanguíneo del volumen de sangre completa. Los valores promedio de ρ y η de ser humano son conocidos o pueden medirse. En otras realizaciones, pueden usarse otros procedimientos de determinación del volumen de plasma, V_{plasma} . Por ejemplo, el V_{plasma} puede determinarse usando uno o más cualquiera de los procedimientos de determinación y/o ecuaciones descritas en detalle a continuación en relación con la etapa 60 del procedimiento del algoritmo 50, que se ilustra en la figura 5.

Por consiguiente, basándose en la relación molecular según lo determinado mediante la ecuación 1 descrita anteriormente, la GFR del riñón y la resistencia a la filtración molecular ξ , pueden determinarse para cualesquiera moléculas (o sustancias) usando una o más de las ecuaciones 2-5 tal como se ha descrito anteriormente.

En la siguiente descripción de la constante de descomposición k , tasa de filtración molecular, velocidad de depuración, y constante de velocidad se usan de forma sinónima. La separación molecular relativa entre la molécula A y la molécula B puede cuantificarse usando la Polaridad Generalizada basándose en la siguiente ecuación:

$$GP = \frac{I_{A(\text{grande})} - I_{B(\text{pequeña})}}{I_{A(\text{grande})} + I_{B(\text{pequeña})}} \quad (6)$$

donde $I_{A(\text{grande})}$ es la señal de la molécula más grande e $I_{B(\text{pequeña})}$ es la señal de la molécula más pequeña. $GP = 1$, cuando solamente hay señal de la molécula más grande (solamente la molécula A está presente), y $GP = -1$ cuando solamente hay señal de la molécula más pequeña (solamente la molécula B está presente).

Como alternativa, GP también puede definirse como $GP = (I_{B(\text{pequeña})} - I_{A(\text{grande})}) / (I_{A(\text{grande})} + I_{B(\text{pequeña})})$. Para los fines de convención y descripción, se usa la definición de GP en la Ecuación 6, pero otras definiciones de GP pueden usarse en otras realizaciones. El valor de GP puede usarse para cuantificación de la potencia relativa (concretamente la polaridad de ocupación relativa de la molécula A y la molécula B) de las dos señales individuales de la molécula A y B, respectivamente.

Debe apreciarse que el algoritmo 10 puede usarse para determinar uno cualquiera de una serie de diagnósticos renales. Por ejemplo, con referencia ahora a la figura 2, se muestra un algoritmo 20 para determinar una tasa de filtración glomerular de un riñón. El algoritmo 20 incluye la etapa 22 del procedimiento en la que una mezcla de dos sondas fluorescentes (A y B) disueltas en solución salina u otras soluciones acuosas se inyecta en el torrente sanguíneo de un animal. Las sondas fluorescentes son de diferentes tamaños. Por ejemplo, una de las sondas fluorescentes (por ejemplo, la sonda A) puede tener un peso molecular (WM) de más de 70 kD tal como un dextrano marcado con fluorescencia de 70 kD o 500 kD. La señal fluorescente de la sonda A se usa como señal de referencia. La otra sonda fluorescente (sonda B) tiene un peso molecular más pequeño que no se metaboliza en el cuerpo. Por ejemplo, la sonda B fluorescente puede ser moléculas fluorescentes pequeñas tales como fluoresceína, azul cascada, inulina marcada con fluorescencia, u otros compuestos no tóxicos.

En la etapa 24 del procedimiento, se determina la relación de intensidad de fluorescencia para las sondas inyectadas. La relación de intensidad de fluorescencia puede determinarse de acuerdo con la ecuación: $R_{B/A}(t) = I_B(t)/I_A(t)$, donde $I_B(t)$ e $I_A(t)$ son intensidades de fluorescencia de las moléculas B y A medidas en función del tiempo, respectivamente. La relación de intensidad de fluorescencia se mide a partir del torrente sanguíneo (vaso sanguíneo/vasos) en función del tiempo después de la inyección de la mezcla colorante inicial. En la etapa 26 del procedimiento, la GFR se calcula usando las ecuaciones descritas anteriormente 1-5 y ajustes por mínimos cuadrados, suponiendo que ξ para la sonda más pequeña está cerca de la unidad ($\xi = 1$).

Adicionalmente, el algoritmo 10 puede usarse como una medida de diagnóstico para Proteinuria. Por ejemplo, con referencia a la figura 3, se muestra un algoritmo 30 para determinar una resistencia a la filtración de proteínas como medición de diagnóstico para Proteinuria. El algoritmo 30 incluye una etapa 32 del procedimiento en la que una mezcla de tres sondas fluorescentes (A, B y C) disueltas en solución salina u otras soluciones acuosas se inyecta en el torrente sanguíneo. Las sondas A y B son análogas a A y B descritas anteriormente en relación con el algoritmo 20. La sonda C es una proteína marcada con fluorescencia (la proteína marcadora) de cualquier tipo (proteínas globulares o no globulares), por ejemplo, una albúmina conjugada a Rojo Texas o FITC (isotiocianato de fluoresceína).

En la etapa 34 del procedimiento, las señales fluorescentes de las sondas A, B y C en los vasos sanguíneos se registran en función del tiempo. Al realizar el ajuste por mínimos cuadrados de la relación de intensidad de fluorescencia, $R_{B/A}(t) = I_B(t)/I_A(t)$, usando la ecuación descrita anteriormente 2 ó 3, puede determinarse la constante de velocidad k_f de la sonda B. Análogamente, ajustando la relación de intensidad, $R_{C/A}(t) = I_C(t)/I_A(t)$, puede determinarse la constante de velocidad k_2 de C (la proteína). En la etapa 36 del procedimiento, se determina la resistencia a la filtración. La resistencia relativa a la filtración $\xi_{C/B}$ puede calcularse directamente de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\xi_{C/B} = \frac{k_2}{k_1} \quad (7)$$

Si $\xi_B = 1$, la resistencia relativa a la filtración $\xi_{C/B} = \xi_C$ (resistencia a la filtración de la proteína marcadora).

La resistencia a la filtración puede usarse como un indicador de los niveles de dificultad de la proteína marcadora para pasar a través de la barrera de filtración renal. Un valor más pequeño de ξ_C indica un mayor nivel de dificultad para que la proteína pase a través de la barrera de filtración renal. Esta propiedad de resistencia a la filtración de proteínas ξ puede usarse para diagnosticar Proteinuria. Si un animal (por ejemplo, un paciente humano) tiene un valor de resistencia a la filtración (de la proteína marcadora) mayor que el valor de resistencia a la filtración de proteínas promedio de individuos sanos $\xi_{\text{paciente}} > \xi_{\text{promedio}}$, es probable que el animal haya desarrollado Proteinuria.

En una realización alternativa, la resistencia a la filtración de proteínas puede determinarse usando dos inyecciones diferentes y mediciones asociadas. En la primera etapa de inyección y medición, una mezcla que incluye solamente las sondas A y B se inyecta y la constante de velocidad k_f se determina a continuación. Posteriormente, una mezcla que incluye solamente las sondas A y C se inyecta y la constante de velocidad k_2 se determina a continuación.

Adicionalmente, el algoritmo 10 puede usarse como una medición de diagnóstico para la glucosa en sangre. Por ejemplo, con referencia a la figura 4, se muestra un algoritmo 40 para determinar una velocidad de depuración de glucosa en sangre y un índice metabólico. El algoritmo 40 incluye una etapa 42 del procedimiento, en la que una mezcla de tres sondas fluorescentes (A, B y C1) disueltas en solución salina u otras soluciones acuosas se inyecta en el torrente sanguíneo. Las sondas A y B son análogas a A y B descritas anteriormente en relación con el algoritmo 20. La sonda C1 es un análogo de glucosa fluorescente (L-glucosa) donde la glucosa tiene una quiralidad levógira (Levo-glucosa en latín). La L-glucosa no es dulce y no es metabolizada por el cuerpo. En la etapa 44 del procedimiento, se determinan la velocidad de depuración k_f y la resistencia a la filtración ξ_f de glucosa (obtenida de L-glucosa). La velocidad de depuración k_f y la resistencia a la filtración ξ_f de glucosa pueden determinarse usando el algoritmo 30 descrito anteriormente en relación con la figura 3.

En la etapa 44 del procedimiento, se determina el índice metabólico de glucosa. Para D-glucosa (Dextro-glucosa, que tiene una quiralidad dextrógira), el cuerpo metabolizará esta glucosa así como la depurará (filtrará) de la sangre. Si una mezcla de tres sondas fluorescentes (A, B y C2) con C2 siendo un análogo de glucosa fluorescente, tal como 2-NBDG [2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-desoxiglucosa] o 6-NBDG, donde la glucosa tiene una quiralidad dextrógira, la relación de intensidad de fluorescencia $R_{C2/A}(t) = I_{C2}(t)/I_A(t)$ medida en función del tiempo puede determinarse basándose en la siguiente ecuación:

$$R_{C2/A}(t) = c + a \exp(-k_f t) + M(k_m, t) \quad (8)$$

donde k_f es la tasa de filtración de glucosa exclusivamente debida a filtración, y $M(k_m, t)$ es una función que describe la cinética del metabolismo de la glucosa, y k_m es el índice metabólico de glucosa. k_f se conoce de la etapa 42 del procedimiento, descrita anteriormente, usando el análogo fluorescente L-glucosa. El índice metabólico de glucosa, k_m , puede determinarse en la etapa del procedimiento 44 ajustando la función metabólica de la glucosa $M(k_m, t)$.

Como alternativa, el índice metabólico de glucosa puede determinarse usando una única inyección de mezcla de sonda fluorescente (A, C1 y C2) con A siendo la molécula fluorescente más grande (dextrano >70 kD), siendo C1 el análogo fluorescente L-glucosa, y siendo C2 el análogo fluorescente D-glucosa. La función metabólica de glucosa puede determinarse a continuación basándose en la siguiente ecuación:

$$M(k_m, t) = R_{C2/A}(t) - R_{C1/A}(t) = \frac{I_{C2}(t) - I_{C1}(t)}{I_A(t)} \quad (9)$$

Además, el algoritmo 10 puede usarse para determinar la velocidad de depuración y/o el índice metabólico de un fármaco. Por ejemplo, la farmacocinética de fármacos metabólicos y no metabólicos puede monitorizarse y medirse usando el algoritmo 30 descrito anteriormente en relación con la figura 3. Para fármacos no metabólicos (en los que solamente se considera la velocidad de depuración del fármaco), C1 de la mezcla de sondas fluorescentes (A, B y

C1) descrita anteriormente en relación con el algoritmo 30 se sustituye por un compuesto de fármaco para medir la velocidad de depuración k y la resistencia a la filtración ξ de este fármaco. Para un fármaco metabólico, el algoritmo 40 descrito anteriormente en relación con la figura 4 puede usarse sustituyendo la glucosa por un compuesto de fármaco respectivo para determinar su velocidad de depuración y el índice metabólico.

5 Debe apreciarse que la determinación de la tasa de filtración glomerular (GFR) de los riñones, y la resistencia a la filtración molecular de una molécula si se desea, pueden mejorarse considerando mecanismos de depuración no renales (es decir, considerando la parte de depuración no renal de k de la ecuación 3 anteriormente). Además, dichas determinaciones pueden mejorarse calculando el volumen de distribución, V_D , del animal (por ejemplo, un paciente humano) que se está sometiendo al ensayo en lugar de basar el volumen de distribución en valores promedio tal como se ha descrito anteriormente en relación con la ecuación 5. Para hacer esto, puede usarse un algoritmo 50 para determinar una tasa de filtración glomerular de un riñón, tal como se ilustra en la figura 5.

El algoritmo 50 comienza con la etapa 52 del procedimiento en la que una mezcla de dos sondas fluorescentes (A y B) disueltas en solución salina u otras soluciones acuosas se inyecta en el torrente sanguíneo de un animal. Las sondas fluorescentes son de diferentes tamaños. Por ejemplo, una de las sondas fluorescentes (por ejemplo, la sonda A) puede tener un peso molecular (WM) de más de 70 kD tal como un dextrano marcado con fluorescencia de 70 kD o 500 kD. La señal fluorescente de la sonda A se usa como señal de referencia. La otra sonda fluorescente (sonda B) tiene un peso molecular más pequeño que no se metaboliza en el cuerpo. Por ejemplo, la sonda fluorescente B puede ser moléculas fluorescentes pequeñas tales como fluoresceína, azul cascada, inulina marcada con fluorescencia u otros compuestos no tóxicos.

20 En la etapa 54 del procedimiento, se determina la relación de intensidad de fluorescencia para las sondas inyectadas. La relación de intensidad de fluorescencia puede determinarse de acuerdo con la ecuación:

$$R_{B/A}(t) = I_B(t) / I_A(t) \quad (10)$$

donde $I_B(t)$ e $I_A(t)$ son intensidades de fluorescencia de las moléculas B y A medidas en función del tiempo, respectivamente. La relación de intensidad de fluorescencia se mide a partir del torrente sanguíneo (vaso sanguíneo/vasos) en función del tiempo después de la inyección inicial de la mezcla de colorantes. La relación de intensidad de fluorescencia puede determinarse usando cualquier aparato de análisis por imaginología adecuado. Por ejemplo, en una realización particular, puede usarse el aparato 100 ilustrado en y descrito a continuación en relación con las figuras 6-9.

30 Como alternativa, en otra realización, la relación de intensidad puede determinarse generando en primer lugar imágenes microvasculares del riñón usando un sistema de microscopio de barrido de fluorescencia con láser de dos fotones tal como un microscopio MRC-1024P, disponible en el mercado de Bio-Rad Laboratories de Hercules, CA, equipado con un microscopio invertido Nikon Diaphot, que esta disponible en el mercado de Fryer Company Incorporated de Huntley, Illinois, y detectores externos (por ejemplo, detectores de 440-470 nm, 500-550 nm, y 560-650 nm). Posteriormente, las imágenes pueden ser analizadas para determinar la relación de intensidad de fluorescencia usando cualquier sistema de análisis de imaginología adecuado. Por ejemplo, en una realización particular, las imágenes pueden analizarse para determinar la relación de intensidad de fluorescencia usando el software Meta Imaging Series de la Versión 6, que está disponible en el mercado de Universal Imaging Corporation de West Chester, Pennsylvania. Para hacer esto, el nivel umbral de cada canal de detección (es decir, cada detector) puede ajustarse accediendo al valor de píxeles promedio de una zona de la imagen sin autofluorescencia significativa de imágenes tomadas antes de la infusión de colorante. Los valores de píxeles promedio de la relación de intensidad, R , de una región de interés pueden exportarse a continuación a un programa de análisis y representación gráfica de datos tal como PSI-PLOT Versión 6, que está disponible en el mercado de Poly Software International de Pearl River, Nueva York, para análisis.

45 Una vez que se ha determinado la relación de intensidad de fluorescencia, la velocidad de depuración en plasma global se determina en la etapa 56 del procedimiento. Tal como se ha descrito anteriormente en relación con la ecuación 3, cuando solamente está presente el procedimiento de filtración glomerular, la función de descomposición $R_{B/A}(t)$ es una única serie temporal exponencial. La velocidad de depuración en plasma global puede determinarse realizando ajuste lineal (o no lineal si se desea) por mínimos cuadrados de esta única serie temporal exponencial. Por ejemplo, puede usarse la siguiente función de descomposición, $R_{vaso}(t)$.

$$50 \quad R_{vaso}(t) = a \exp(-k_A t) + c \quad (11)$$

donde $R_{vaso}(t)$ es el valor de píxeles promedio de la relación de intensidad de una zona dada (es decir, de una región de la luz de un vaso sanguíneo dado) extraída en puntos temporales diferentes, a es la amplitud o el factor pre-exponencial, c es una constante, t es el tiempo, y k_A es la velocidad de depuración en plasma global. Tal como se ha descrito anteriormente, el valor de k_A puede determinarse realizando ajuste no lineal por mínimos cuadrados en la ecuación 11.

Debe apreciarse que la velocidad de depuración en plasma global, k_A , incluye tanto la velocidad de depuración renal, k_A^r como la velocidad de depuración no renal (por ejemplo, captación por el hígado), k_A^n . Como tal, para mejorar la precisión de los cálculos basándose en la velocidad de depuración, tal como determinar la tasa de filtración glomerular y/o la resistencia a la filtración molecular, la velocidad de depuración no renal puede restarse de la velocidad de depuración en plasma global o considerarse de otro modo. Para hacer esto, puede usarse la siguiente ecuación:

$$k_A = k_P + k_T \quad (12)$$

$$k_P = k_A - k_T \quad (13)$$

en la que k_A es la velocidad de depuración en plasma global, k_P es la constante de velocidad de la depuración en plasma intrínseca (es decir, la depuración renal), y k_T es la constante de velocidad de distribución tisular no específica de una molécula filtrada libremente (es decir, la depuración no renal). Tal como se ha descrito anteriormente, el valor de k_A puede determinarse usando la ecuación 11 y, en realizaciones en las que el animal en el que está siendo realizado el procedimiento de análisis de riñón es un animal no humano, el valor de la constante de velocidad de distribución tisular no específica, k_T , puede determinarse mediante un procedimiento de nefrectomía de riñón completa doble. Dado que el valor de la velocidad de depuración en plasma global, k_A , y el valor de la constante de velocidad de distribución tisular no específica (es decir, la velocidad de depuración no renal), k_T , son conocidos, el valor de la constante de velocidad de la depuración en plasma intrínseca (es decir, la velocidad de depuración renal), k_P , puede determinarse mediante la ecuación 13.

Como alternativa, en realizaciones en las que el animal en el que se está realizando el procedimiento de análisis de riñón es un paciente humano, las velocidades de depuración tanto renal como no renal pueden determinarse usando modelos de múltiples componentes para considerar procedimientos cinéticos individuales. Por ejemplo, puede usarse la siguiente ecuación:

$$R_{B/A}(t) = c + a \exp(-k_{renal} t) + f(k_{no\ renal} t) \quad (14)$$

en la que $R_{B/A}(t)$ es la relación de intensidad, a y c con constantes, t es el tiempo, k_{renal} es la constante de velocidad de depuración en plasma renal, f es una función que incluye todos los procedimientos cinéticos que no forman parte de la depuración renal (por ejemplo, distribución de la sonda, absorción tisular no específica, etc.), y $k_{no\ renal}$ es la constante de velocidad de depuración en plasma no renal. Las velocidades de depuración, k_{renal} y $k_{no\ renal}$, pueden determinarse realizando un procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados de múltiples componentes en la ecuación 14. Una de una serie de diferentes funciones puede usarse para realizar modelos de la cinética de depuración en plasma no renal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede usarse una única ecuación exponencial de la siguiente manera:

$$f(k_{no\ renal} t) = b \exp(-k_{no\ renal} t) \quad (15)$$

en la que b es una constante.

La precisión de la determinación de las velocidades de depuración renal y no renal puede mejorarse realizando múltiples ensayos en el paciente humano para determinar múltiples valores o pistas de depuración en plasma global y posteriormente realizando un ajuste por mínimos cuadrados de las múltiples pistas de depuración en plasma global (es decir, realizando un procedimiento de ajuste global en la ecuación 14). Por ejemplo, pueden obtenerse múltiples valores o pistas de depuración realizando una serie de ensayos usando diversas relaciones de concentración de las moléculas marcadoras (por ejemplo, moléculas A y B). La depuración no renal promedio, $k_{no\ renal}$, puede determinarse a continuación para un paciente humano promedio, en base estadísticamente a los múltiples ensayos. Posteriormente, la constante de velocidad de depuración en plasma renal, k_{renal} , puede determinarse directamente usando una única inyección de las moléculas marcadoras (por ejemplo, moléculas A y B) basándose en la siguiente ecuación:

$$k_{renal} = k_{global} - k_{no\ renal\ promedio} \quad (16)$$

en la que k_{renal} es la constante de velocidad de depuración en plasma renal, k_{global} es la velocidad de depuración en plasma promedio obtenida ajustando las múltiples pistas de depuración con una única función exponencial, y $k_{no\ renal\ promedio}$ es la velocidad de depuración no renal promedio.

En la etapa 60 del procedimiento, se determina el volumen de distribución, V_D . Dado que al menos una de las sondas o moléculas marcadoras (por ejemplo, sonda/molécula A) es relativamente grande (por ejemplo, un dextrano marcado con fluorescencia de 500 kD), esta molécula o sonda no es filtrada por el riñón. Como tal, el volumen de distribución, V_D , puede expresarse de la siguiente manera de acuerdo con el principio de conservación:

$$V_D = V_{antes} * [C_{grande}]_{antes} / [C_{grande}]_{plasma} \quad (17)$$

5 en la que V_D es el volumen de distribución (es decir, el volumen de plasma), V_{antes} es el volumen de la sonda o molécula grande (por ejemplo, la sonda de dextrano grande) antes de la infusión en el paciente, $[C_{grande}]_{antes}$ es la concentración de la sonda o molécula grande antes de la infusión en el paciente, y $[C_{grande}]_{plasma}$ es la concentración en plasma de la sonda o molécula grande después de que se ha obtenido el equilibrio. Dado que la intensidad de fluorescencia, I_L , de la sonda o molécula más grande (por ejemplo, sonda A) es proporcional a su concentración, $[C_{grande}]$, el volumen de distribución (es decir, el volumen de plasma), V_D , puede determinarse de la siguiente manera:

$$V_D = V_{antes} * [I_L]_{antes} / [I_L]_{plasma} \quad (18)$$

10 en la que V_D es el volumen de distribución (es decir, el volumen de plasma), V_{antes} es el volumen de la sonda o molécula grande (por ejemplo, la sonda de dextrano grande) antes de la infusión en el paciente, $[I_L]_{antes}$ es los valores de intensidad totales de la sonda o molécula grande medidos antes de la infusión, y $[I_L]_{plasma}$ es los valores de intensidad totales de la sonda o molécula grande medidos después de la infusión. El valor de volumen de la sonda o molécula grande, V_{antes} , es conocido y el valor de $[I_L]_{plasma}$ puede determinarse a partir de las imágenes de la serie temporal adquiridas o usando medición por espectroscopía de fluorescencia de muestras de sangre extraídas
15 tomadas después de un periodo predeterminado (por ejemplo, 10 minutos) para permitir que la concentración en plasma se estabilice. Por ejemplo el valor de $[I_L]_{plasma}$ puede determinarse basándose en el promedio de tres a cinco tiempos, o más, mediciones de puntos temporales. El valor de $[I_L]_{antes}$ puede determinarse usando los mismos ajustes del instrumento que los usados para determinar el $[I_L]_{plasma}$.

20 En algunas realizaciones, el volumen de distribución (es decir, el volumen de plasma), V_D , puede determinarse basándose en el peso corporal del animal (por ejemplo, un paciente humano) en lugar del uso de la ecuación 18 provisto anteriormente. Es decir, el volumen de sangre completa del animal puede estimarse como el 5,5 % del peso corporal total. El volumen de plasma total, V_D , puede estimarse a continuación como el 50 % del volumen de sangre completa.

25 Aunque las etapas 56-60 del procedimiento se ilustren en la figura 5 en orden secuencial, debe apreciarse que la velocidad de depuración renal y el volumen de distribución pueden determinarse en cualquier orden uno con respecto al otro o de forma contemporánea entre sí. Por ejemplo, el volumen de distribución puede determinarse antes de la determinación de la velocidad de depuración renal en algunas realizaciones. En otras realizaciones, el volumen de distribución puede determinarse de forma contemporánea con la determinación de la velocidad de depuración renal.
30

Una vez que la velocidad de depuración renal k_p (o k_{Renal}) y ese volumen de distribución, V_D , se han determinado en las etapas 58 y 60 del procedimiento, respectivamente, la tasa de filtración glomerular (GFR) puede determinarse en la etapa 62 del procedimiento basándose en estos. Para hacer esto, puede usarse la siguiente ecuación:

$$GFR = k_p * V_D \quad (19)$$

35 en la que GFR es la tasa de filtración glomerular, k_p es la constante de velocidad de depuración en plasma intrínseca (es decir, la velocidad de depuración renal), y V_D es el volumen de distribución. Tal como se ha descrito anteriormente, el valor de k_p puede determinarse usando las ecuaciones 12-13 ó 14-16 y el valor de V_D puede determinarse usando las ecuaciones 17-18 o estimarse tal como se ha descrito anteriormente en detalle.

40 Además de la tasa de filtración glomerular, en algunas realizaciones, la resistencia a la filtración molecular también puede determinarse en la etapa 64 del procedimiento. Para hacer esto, puede usarse la siguiente ecuación.

$$\xi = k_{Pf} / k_p \quad (20)$$

45 en la que ξ es la resistencia a la filtración molecular, k_{Pf} es la velocidad de depuración en plasma intrínseca (es decir, la velocidad de depuración en plasma intrínseca del riñón), y k_p es la velocidad de depuración en plasma intrínseca de la molécula o sonda grande (por ejemplo, sonda A). Dado que las moléculas de gran tamaño normalmente no pasan libremente a través de la barrera de filtración glomerular, la depuración de las moléculas de gran tamaño de la sangre requerirá un tiempo más largo que la de una molécula filtrada libremente. Como tal, la tasa de filtración molecular puede usarse para determinar el grado de lesiones glomerulares usando moléculas grandes de tamaños variables. Dado que la resistencia a la filtración molecular de moléculas más pequeñas (por ejemplo, aquellas moléculas de un tamaño suficiente para ser filtradas libremente a través de la barrera de filtración glomerular) puede
50 ser sustancialmente similar en riñones que tienen daño glomerular menor y grave, las moléculas más pequeñas normalmente no se usan para determinar la resistencia a la filtración molecular.

En otras realizaciones, la resistencia a la filtración molecular de la molécula grande (por ejemplo, moléculas >20 kD), $\xi_{PGrande}$, puede determinarse usando la siguiente ecuación:

$$\xi_{PGrande} = \xi_{FITC-inulina} * [k_{AP(FITC-inulina)} - k_{TP(FITC-inulina)}] / [k_{APGrande} - k_{TPGrande}] \quad (21)$$

en la que $\xi_{PGrande}$ es la resistencia a la filtración molecular de la molécula grande (por ejemplo, sonda A), $\xi_{FITC-inulina}$ es el valor de resistencia a la filtración de FITC-inulina medido a partir de un grupo de animales de control, $[k_{AP(FITC-inulina)} - k_{TP(FITC-inulina)}]$ es la velocidad de depuración en plasma intrínseca de FITC-inulina medida a partir de animales con nefrosis en un día dado después del tratamiento con PAN, y $[k_{APGrande} - k_{TPGrande}]$ es la constante de velocidad de depuración de la molécula grande de interés (por ejemplo, sonda A). Debe apreciarse que el valor de la resistencia a la filtración molecular, $\xi_{PGrande}$, puede compararse con los valores correspondientes de relación medida de proteína urinaria con respecto a creatinina para determinar la correlación entre $\xi_{PGrande}$ y la secreción de proteína urinaria y la sensibilidad de usar el valor de $\xi_{PGrande}$ para la detección temprana de proteinuria. Debe apreciarse que, en la realización descrita anteriormente, FITC-inulina se usa como un marcador de GFR (por ejemplo, como molécula/sonda B). Sin embargo, en otras realizaciones, pueden usarse otros tipos de moléculas/sondas marcadoras de GFR, tales como otras moléculas marcadoras fluorescentes o no fluorescentes. En dichas realizaciones, la ecuación 20 descrita anteriormente puede usarse para determinar la resistencia a la filtración molecular.

Después de la inyección de la mezcla de sonda fluorescente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, pueden realizarse mediciones usando un microscopio de fluorescencia de barrido de láser multifotónico. La ubicación de las mediciones microscópicas puede realizarse en cualquier punto en el cuerpo, por ejemplo, en los labios donde la piel es relativamente fina para permitir la fácil observación de los vasos sanguíneos. La imagen de fluorescencia de cada una de las sondas fluorescentes inyectadas se adquiere posteriormente. El valor de intensidad promedio de las regiones del vaso sanguíneo se calcula y se representa gráficamente en función del tiempo. Estas series temporales de intensidad de estas sondas fluorescentes se usan para ajustar y recuperar las k , ξ y GFR correspondientes.

Sin embargo, otros tipos de dispositivo pueden usarse para medir la intensidad de fluorescencia a partir del torrente sanguíneo del animal. Por ejemplo, instrumentos existentes, tales como instrumentos que usan principios de tomografía óptica coherente o migración (difusión) de fotones, pueden adaptarse para realizar las mediciones.

Con referencia a continuación a la figura 6, se muestra una realización de un aparato 100 para determinar datos fisiológicos relacionados con un animal. Los datos fisiológicos pueden usarse para una serie de propósitos de análisis incluyendo propósitos de diagnóstico tales como diagnósticos renales, ensayos, investigación de fármacos, desarrollo de fármacos, y similares. El aparato 100 permite la medición no invasiva de las funciones renales, así como otras funciones fisiológicas, usando señales ópticas. El aparato 100 incluye un cabezal de medición 102 y una unidad controladora 120. La unidad controladora 120 se ilustra y se describe a continuación en relación con la figura 9. El cabezal de medición 102 está diseñado de forma ilustrativa para medir señales de las puntas de los dedos de manos humanas. Sin embargo, en otras realizaciones, el cabezal de medición 102 puede estar configurado para medir señales de otras partes del cuerpo de un paciente humano y/o animal incluyendo, por ejemplo, de los dedos de los pies, las orejas, la muñeca, etc.

El cabezal de medición 102 incluye una serie de receptores del dedo 104 designados como H1-H4. Los receptores del dedo están configurados para encajar con la anatomía de los dedos de una mano humana y pueden estar realizados como aberturas cilíndricas. Por ejemplo, tal como se ilustra en la figura 7, cada uno de los receptores del dedo 104 se extiende en un ángulo, con respecto a un eje vertical, para igualar el ángulo de los dedos de una mano humana cuando los dedos están ligeramente separados. El cabezal de medición 102 está hecho de un material que limita el paso de la luz ambiente a través del cabezal 102. El cabezal de medición 102 incluye una serie de fuentes E1a-E4a de fibra óptica, acopladas a una serie respectiva de fuentes de luz L1-L4, de la unidad controladora (véase la figura 9). Las fuentes E1a-E4a de fibra óptica, suministran una luz de iluminación al lado de la palma de las puntas de los dedos. El cabezal de medición 102 incluye una serie de receptores E1-E4 de fibra óptica, que recogen señales ópticas generadas por las fuentes E1a-E4a de fibra óptica. Los receptores E1-E4 de fibra óptica, recogen las señales ópticas procedentes del lado opuesto de las puntas de los dedos (es decir, el lado con la uña del dedo). Los contactos entre la fibra E1a-E4a y E1-E4 óptica y las puntas de los dedos pueden ajustarse para garantizar un buen contacto para iluminación y detección de señales ópticas. Esto puede conseguirse ajustando directamente las posiciones de la fibra. Además, el contacto entre la fibra óptica y las uñas de los dedos puede mejorarse usando un lubricante de acoplamiento no fluorescente, tal como gel de sacarosa.

Con referencia a continuación a la figura 8, en una realización alternativa, el aparato 100 incluye un cabezal de medición 110 que tiene una serie de LED (diodos emisores de luz) 114, L1a-L4a, como fuentes de luz. Las fuentes L1a-L4a de luz, están en contacto con, o cerca de contacto con, el lado de la palma de las puntas de los dedos cuando los dedos del animal (por ejemplo, del paciente humano) están insertados en los receptores 112 del dedo. Similar al cabezal de medición 102, el cabezal de medición 110 incluye una serie de receptores E1-E4 de fibra óptica, para recoger las señales ópticas generadas desde las puntas de los dedos mediante iluminación (excitación) procedente de las fuentes L1a-L4a de luz, respectivamente. Los receptores de fibra óptica están situados en el lado opuesto de las puntas de los dedos desde las fuentes de luz (es decir, el lado con la uña del dedo). La intensidad de los LED puede estar controlada por el controlador 120 mediante convertidores digital a analógico (convertidores D/A). Dado que las fuentes L1a-L4a de luz, están situadas en el cabezal de medición 110, la pérdida de la luz de

iluminación se reduce.

El aparato 100 también incluye una unidad controladora 120. La unidad controladora 120 determina el diagnóstico fisiológico mediante recuento fotónico. El recuento fotónico se usa normalmente en aplicaciones que requieren detección de señales sensible. En la realización ilustrativa, tal como se ilustra en la figura 9, la unidad controladora 120 incluye una parte óptica 122 y una parte de control 124. En algunas realizaciones, la parte óptica 122 y la parte de control 124 están integradas en una única unidad portátil. En otras realizaciones, la parte óptica 122 está integrada en una unidad portátil y la parte de control 124 está incluida en un ordenador personal. Debe apreciarse que la parte de control 124 puede estar incluida en el ordenador personal como dispositivos de hardware diferentes, algoritmos de software diferentes, o una combinación de dispositivos de hardware y algoritmos de software.

En realizaciones que incluyen un cabezal de medición 102, la parte óptica 122 de la unidad controladora 120 incluye una serie de fuentes de luz 125, L1-L4, tales como LED. Las fuentes 125 de luz emiten luz a la misma o a diferentes longitudes de onda. Las fibras ópticas están acopladas a los LED que suministran luz al cabezal de medición 102. La parte óptica 122 también incluye una serie de detectores 126, D1-D4. Para la detección de fluorescencia y otras señales ópticas, los detectores pueden realizarse como tubos fotomultiplicadores, fotodiodos, CCD u otro dispositivo capaz de detectar la fluorescencia y otras señales ópticas. Las señales ópticas son suministradas a los detectores a través de fibras ópticas que acoplan el cabezal de medición 102 a la unidad controladora 120. Además, la parte óptica 122 incluye una serie de filtros 128, F1-F4 ópticos. Los filtros 128 ópticos filtran las señales ópticas rechazando o filtrando el ruido y las señales no deseadas. La unidad controladora 120 también incluye una serie de amplificadores 130, A1-A4, que amplifican las señales analógicas recibidas de los detectores 126. La unidad controladora 120 incluye una serie de discriminadores 132, B1-B4, que discriminan pulsos fotónicos individuales y generan salidas individuales a partir de ellos. De forma ilustrativa, las señales de salida son señales TTL (lógica transistor a transistor) (llamada señal digital). Sin embargo, debe apreciarse que, en otras realizaciones, los discriminadores 132 pueden generar otros tipos de señales de salida.

Las señales TTL generadas por los discriminadores 132 son transmitidas a la parte de control 124 mediante una serie de enlaces de comunicación 134. Los enlaces de comunicación 134 pueden estar realizados como cualquier tipo de enlace de comunicación incluyendo cables discretos, pistas PCB, o similares. Adicionalmente, en otras realizaciones, los enlaces de comunicación 134 pueden estar realizados como enlaces de comunicación inalámbricos que usan cualquier protocolo de comunicación inalámbrica adecuado tal como, por ejemplo, Bluetooth. Una vez que las señales de salida son recibidas por la parte de control 124, las señales de salida son procesadas por un circuito de recuento 136 de pulsos y procesadas adicionalmente para visualización a través de una interfaz del usuario 138 (por ejemplo una pantalla de ordenador o un panel de visualización en la unidad controladora). La parte de control 124 también incluye convertidores digital a analógico 140 (DAC). Los DAC 140 pueden usarse para ajustar los niveles de voltaje de los LED y, de este modo, controlar la intensidad de iluminación. Debe observarse que, en realizaciones en las que se usa cabezal de medición 110, las fuentes de luz L1a-L4a están ubicadas en el cabezal de medición 110 en lugar de en la parte óptica 122. Como tales, las fuentes de luz L1a-L4a están acopladas directamente al bloque DAC 140 mediante una serie de interconexiones eléctricas, tales como cables discretos. Debe apreciarse también que, aunque la realización ilustrativa incluye solamente cuatro fuentes de luz o fuentes de fibra óptica y receptores de fibra óptica asociados, otras realizaciones pueden incluir cualquier número de fuentes de luz/fuentes de fibra óptica y receptores de fibra óptica asociados.

En una realización alternativa, los dispositivos de adquisición y procesamiento de señales digitales pueden sustituirse por dispositivos de adquisición y procesamiento de señales analógicas. Por ejemplo, los discriminadores 132 pueden retirarse o sustituirse por amplificadores analógicos y el circuito electrónico de recuento de pulsos 136 puede sustituirse por circuitos de conversión analógico a digital. Debe apreciarse también que, aunque la realización ilustrativa incluye solamente cuatro fuentes de luz o fuentes de fibra óptica y receptores de fibra óptica asociados, otras realizaciones pueden incluir cualquier número de fuentes de luz/fuentes de fibra óptica y receptores de fibra óptica asociados.

Las fuentes de luz L1a-L4a y L1-L4 pueden estar realizadas como LED, láseres de diodo, lámparas de arco de Xenón con filtros apropiados, u otro tipo de fuente de luz utilizable en la medición de diagnóstico. La longitud de onda de iluminación usada se selecciona de acuerdo con las sondas fluorescentes disponibles. Para moléculas marcadas con FITC, se usa una iluminación a aproximadamente 488 nm para la excitación de la molécula. Una combinación de filtros de bloqueo (que bloquean la luz de excitación a 488 nm) y paso de banda que permiten el paso a través de luz de 500-550 nm puede colocarse frente al detector/detectores correspondientes usados para la detección de fluorescencia de FITC. En realizaciones que usan señal de dispersión, el filtro en frente del detector puede permitir que la luz de iluminación pase a su través. Los ejemplos de configuraciones para las fuentes de luz, los filtros, las sondas fluorescentes y los detectores se proporcionan a continuación en la tabla 1.

TABLA 1

Ejemplo 1			
Sondas (fluorescentes o no fluorescentes)	Fuentes de luz (longitud de onda)	Filtros (paso)	Detectores
Azul cascada-dextrano	L1 (350-372 nm)	F1 (400-460 nm)	D1 (PMT)
FITC-dextrano	L2 (465-490 nm)	F2 (500-550 nm)	D2 (PMT)
Rojo Texas-dextrano	L3 (594 nm)	F3 (605-650 nm)	D3 (PMT)
Cy5-dextrano	L4 (630-640 nm)	F4 (655-700 nm)	D4 (PMT sensible al rojo)
Ejemplo 2			
Sondas (fluorescentes o no fluorescentes)	Fuentes de luz (longitud de onda)	Filtros (paso)	Detectores
FITC-dextrano	L1 (465-490 nm)	F1 (500-550 nm)	D1(PMT)
Rojo Texas-dextrano	L2 (594 nm)	F2 (605-650 nm)	D2 (PMT)
Cy5-dextrano	L3 (630-640 nm)	F3 (655-700 nm)	D3 (PMT sensible al rojo)
Dispensor	L4 (735 nm)	F4 (725-745 nm)	D4 (PMT sensible al rojo)
Ejemplo 3			
Sondas (fluorescentes o no fluorescentes)	Fuentes de luz (longitud de onda)	Filtros (paso)	Detectores
FITC-dextrano	L1 (465-490 nm)	F1 (500-550 nm)	D1 (PMT)
Cy5-dextrano	L3 (632 nm)	F3 (655-700 nm)	D3 (PMT sensible al rojo)
Dispensor	L4 (632 nm)	F4 (620-650 nm)	D4 (PMT sensible al rojo)

- Por consiguiente, debe apreciarse que el aparato 100 puede usarse en una serie de aplicaciones para determinar diagnósticos fisiológicos. Por ejemplo, el aparato 100 puede usarse para determinar una tasa de filtración glomerular (GFR) para el diagnóstico de la función renal, determina una resistencia a la filtración de proteínas para el diagnóstico de Proteinuria y/o otras enfermedades, determinar una velocidad de depuración de glucosa en sangre y/o un índice metabólico de glucosa, y/o determina una velocidad de depuración de un fármaco y/o un índice metabólico de un fármaco. Debe apreciarse que, en algunas realizaciones, el aparato 100 puede incluir solamente uno o un número limitado de canales de iluminación y canales de detección respectivos para una aplicación dada (por ejemplo, medición de GFR usando una sonda fluorescente.).
- 5 Aunque la divulgación se ha ilustrado y descrito en detalle en los dibujos y en la descripción anterior, dicha ilustración y descripción debe considerarse como ejemplar y de carácter no restrictivo, entendiéndose que se han mostrado y descrito solamente realizaciones ilustrativas y que se desea que todos los cambios y modificaciones que estén dentro del espíritu de la divulgación estén protegidos.
- 10 Existen una pluralidad de ventajas de la presente divulgación que surgen de las diversas características de los procedimientos y aparatos descritos en el presente documento. Se observará que realizaciones alternativas de los procedimientos y aparatos de la presente divulgación pueden no incluir todas las características descritas, aunque seguir beneficiándose de al menos algunas de las ventajas de dichas características. Los expertos en la materia pueden diseñar fácilmente sus propias implementaciones de los procedimientos y aparatos que incorporan una o más de las características de la presente invención y están dentro del espíritu y alcance de la presente divulgación tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.
- 15
- 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la constante (k) de velocidad de depuración de un compartimento corporal de una primera molécula por un órgano en un animal, comprendiendo el procedimiento:

5 administrar la primera molécula y una segunda molécula al compartimento corporal del animal, en el que el órgano depura la segunda molécula del compartimento corporal a una velocidad inferior a la velocidad a la que el órgano depura la primera molécula del compartimento corporal;
determinar la relación molecular (R_B/R_A) de la primera molécula con respecto a la segunda molécula en el compartimento corporal durante un periodo de tiempo para obtener una serie temporal de relaciones moleculares ($(R_B/R_A)_{(t)}$), determinándose la relación molecular (R_B/R_A) usando la siguiente ecuación:

10
$$R_B/R_A = I_B/I_A,$$

en la que I_B es el nivel de la primera molécula en el compartimento corporal y I_A es el nivel de la segunda molécula en el compartimento corporal; y
realizar un ajuste por mínimos cuadrados de la serie temporal de relaciones moleculares ($(R_B/R_A)_{(t)}$) para obtener la constante (k) de velocidad de depuración de un compartimento corporal usando la ecuación:

15
$$(R_B/R_A)_{(t)} = c + a * \exp(-kt)$$

en la que c es una constante, a es un factor pre-exponencial y t es el tiempo.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compartimento corporal es el sistema vascular del animal.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el órgano se selecciona entre el grupo constituido por el riñón, el hígado, el pulmón, el bazo, el páncreas, el cerebro, el corazón, el músculo y el intestino.

20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la depuración del compartimento corporal del órgano se debe a al menos a uno de filtración, reabsorción, ósmosis, metabolismo y secreción activa.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el nivel de la primera molécula se determina basándose en la intensidad de una señal generada por la primera molécula y el nivel de la segunda molécula se basa en la intensidad de una señal generada por la segunda molécula.

25 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la señal generada por la primera molécula es de un tipo diferente a la señal generada por la segunda molécula.

7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la señal generada por la primera molécula y la señal generada por la segunda molécula se seleccionan entre el grupo constituido por fluorescencia, una señal de dispersión de luz incidente, fracción de tiempos de vida de fluorescencia, absorbancia y polarización.

30 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera molécula y la segunda molécula se administran en una mezcla.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la relación molecular (R_B/R_A) de la primera molécula con respecto a la segunda molécula se sustituye por la polaridad generalizada (GP) de la primera molécula y la segunda molécula, determinándose la polaridad generalizada (GP) usando una ecuación seleccionada entre el grupo
35 constituido por:

$$GP = (I_A - I_B)/(I_A + I_B)$$

y

$$GP = (I_B - I_A)/(I_A + I_B),$$

en las que I_A es el nivel de la segunda molécula en la sangre e I_B es el nivel de la primera molécula en la sangre.

40 10. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además determinar la tasa de filtración glomerular (GFR) del órgano usando la siguiente ecuación:

$$GFR = (k * V_{plasma}) / \xi$$

en la que V_{plasma} es el volumen de plasma del animal, ξ es la resistencia a la filtración molecular de la primera molécula y el órgano es el riñón.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la resistencia a la filtración molecular de la primera molécula tiene un valor de aproximadamente 1.

12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la segunda molécula es una molécula marcada por fluorescencia que tiene un peso molecular de más de 70 kD.

5 13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la segunda molécula tiene un peso molecular mayor que la primera molécula.

14. Un procedimiento para determinar la resistencia a la filtración molecular (ξ) de una molécula en un animal, comprendiendo el procedimiento:

10 determinar la tasa de filtración glomerular (GFR) del animal de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 10;
determinar la constante de velocidad de depuración del compartimento corporal (k_2) en el animal de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1 con la molécula siendo la primera molécula; y
determinar la resistencia a la filtración molecular (ξ) de la molécula usando la siguiente ecuación:

$$\xi = (k_2 * V_{\text{plasma}})/\text{GFR}$$

15 en la que V_{plasma} es el volumen de plasma del animal.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la molécula es una proteína.

16. Un procedimiento para diagnosticar permeabilidad glomerular alterada en un animal, que comprende:

20 determinar la resistencia a la filtración molecular (ξ) de una proteína de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 15; y
comparar el valor de la resistencia a la filtración molecular (ξ) del animal con una resistencia a la filtración molecular de un animal de control, en el que un valor más grande de resistencia a la filtración molecular (ξ) del animal en comparación con el del animal de referencia es indicativo de que el animal tiene permeabilidad glomerular alterada.

25 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la constante de velocidad de depuración es la constante de velocidad de filtración de la D-glucosa por el riñón (k_f), en el que la primera molécula es un análogo no metabolizante de D-glucosa.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el análogo no metabolizante de glucosa es una L-glucosa.

19. Un procedimiento para determinar el índice metabólico de una molécula de ensayo en un animal, comprendiendo el procedimiento:

30 administrar una primera molécula y una segunda molécula al vaso sanguíneo del animal y determinar la constante de velocidad de depuración del compartimento corporal de la primera molécula (k_1) de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera molécula no es metabolizada por el órgano;
administrar la molécula de ensayo para la determinación del índice metabólico y la segunda molécula a un vaso sanguíneo del animal y determinar la relación molecular de la molécula de ensayo con respecto a la segunda molécula ($R_{C/A}$) durante un periodo de tiempo para obtener una serie temporal de relaciones moleculares de la molécula de ensayo con respecto a la segunda molécula ($(R_{C/A})_{(t)}$); y
35 realizar un ajuste por mínimos cuadrados de la serie temporal de relaciones moleculares de la molécula de ensayo con respecto a la segunda molécula ($(R_{C/A})_{(t)}$) para obtener la función metabólica de la molécula de ensayo ($M_{(km,t)}$) de acuerdo con la ecuación:

$$40 \quad (R_{C/A})_{(t)} = c + a * \exp(-k_1 t) + M_{(km,t)}$$

en la que c es una constante, k_1 es la constante de velocidad de depuración de la primera molécula, a es un factor pre-exponencial y t es el tiempo.

45 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la molécula de ensayo, la primera molécula y la segunda molécula se administran simultáneamente, y la función metabólica $M_{(km,t)}$ se determina de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$M_{(km,t)} = (R_{C/A})_{(t)} - (R_{B/A})_{(t)} = (I_{C(t)} - I_{B(t)})/I_{A(t)}$$

en la que $(R_{C/A})_{(t)}$ es la serie temporal de las relaciones moleculares de la molécula de ensayo con respecto a la segunda molécula, $(R_{B/A})_{(t)}$ es la serie temporal de las relaciones moleculares de la primera molécula con respecto a

la segunda molécula, $I_{C(t)}$ es la serie temporal de los niveles de la molécula de ensayo en la sangre, $I_{B(t)}$ es la serie temporal de los niveles de la primera molécula en la sangre y $I_{A(t)}$ es la serie temporal de los niveles de la segunda molécula en la sangre.

5 21. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la molécula de ensayo es un análogo metabolizante de D-glucosa y el índice metabólico es el índice metabólico de D-glucosa.

22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que el análogo metabolizante de D-glucosa es [2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-desoxiglucosa] (2-NBDG) o [6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-desoxiglucosa] (6-NBDG).

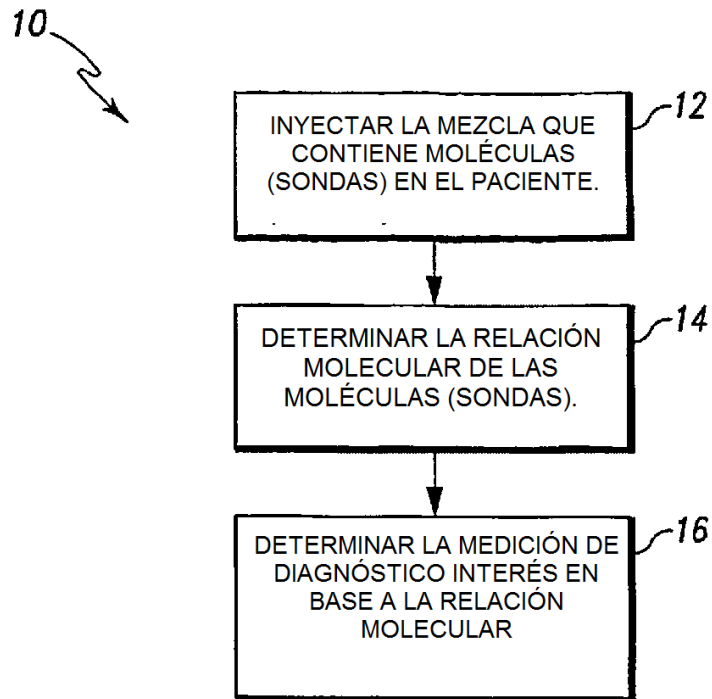


Fig. 1

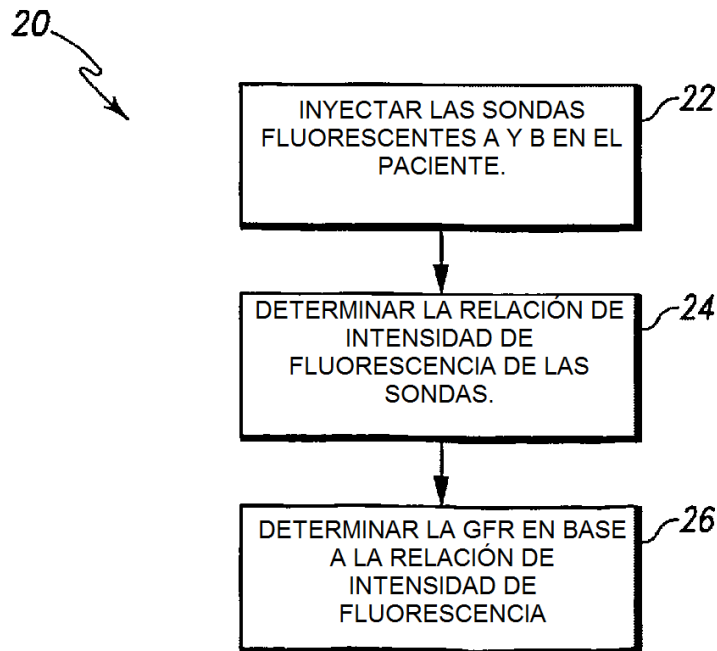


Fig. 2

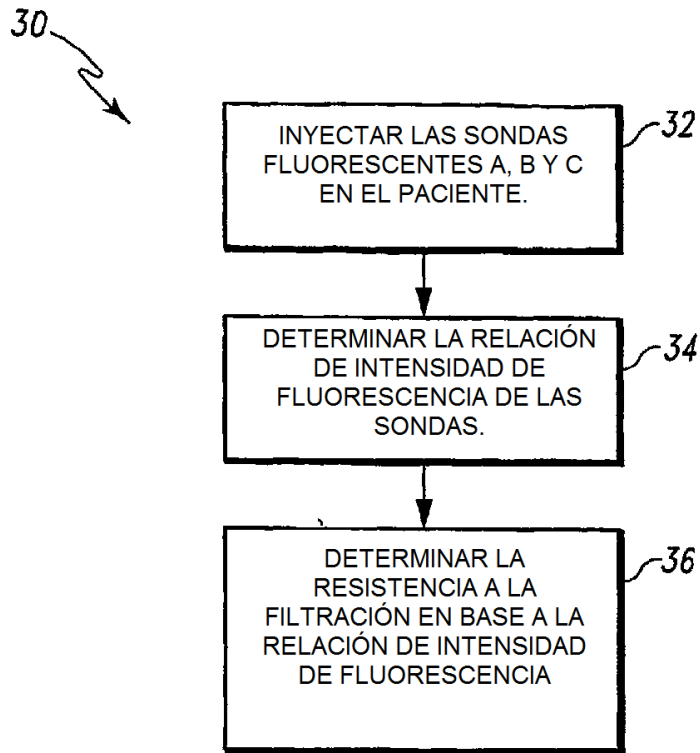


Fig. 3

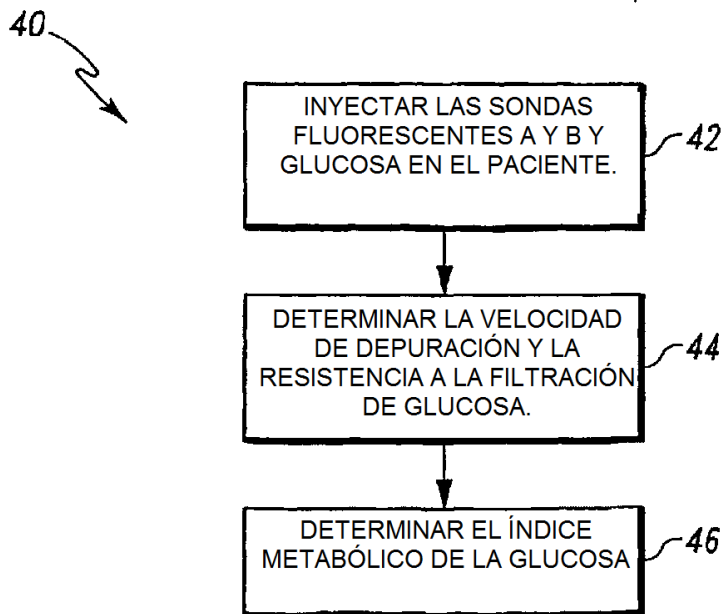


Fig. 4

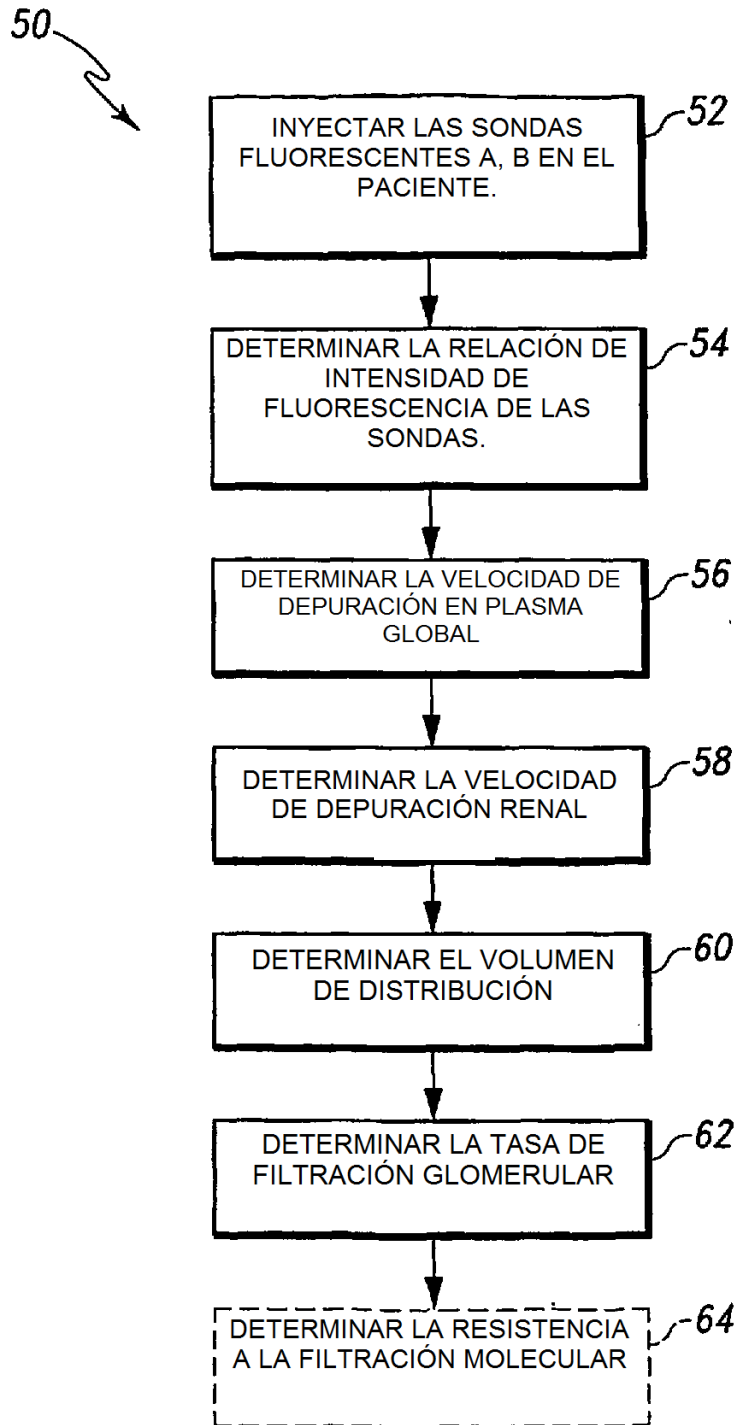


Fig. 5

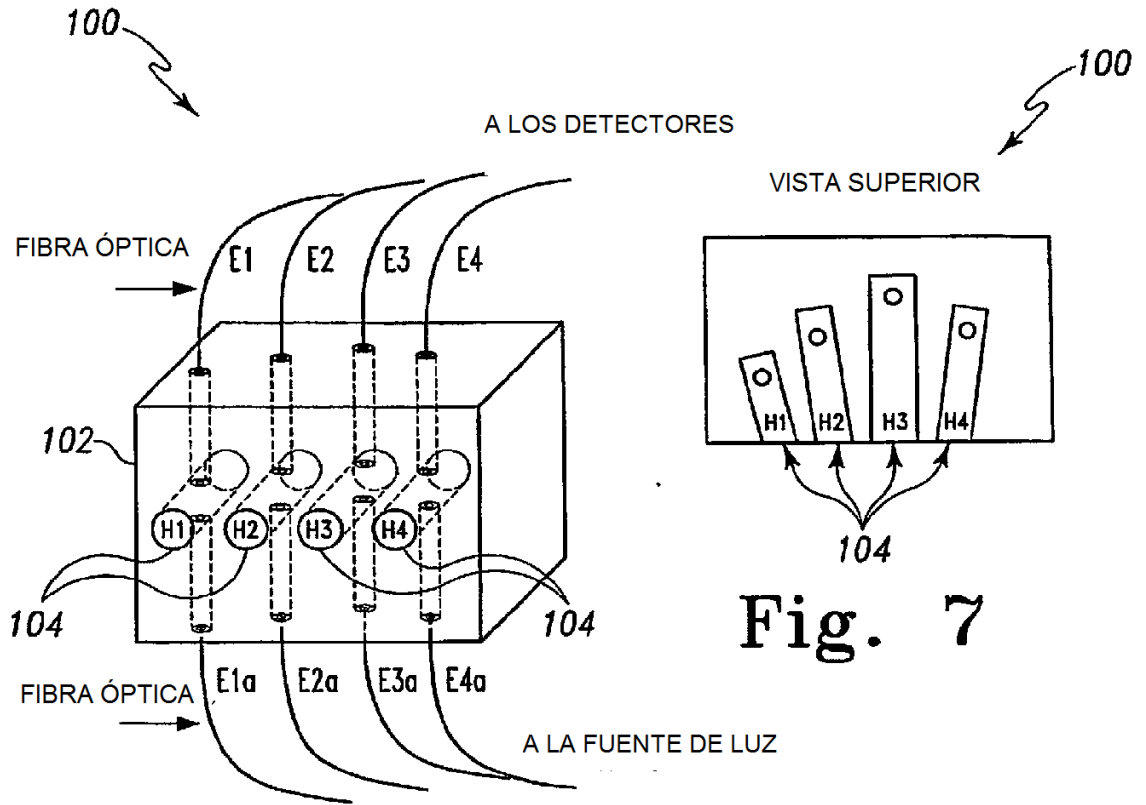


Fig. 6

Fig. 7

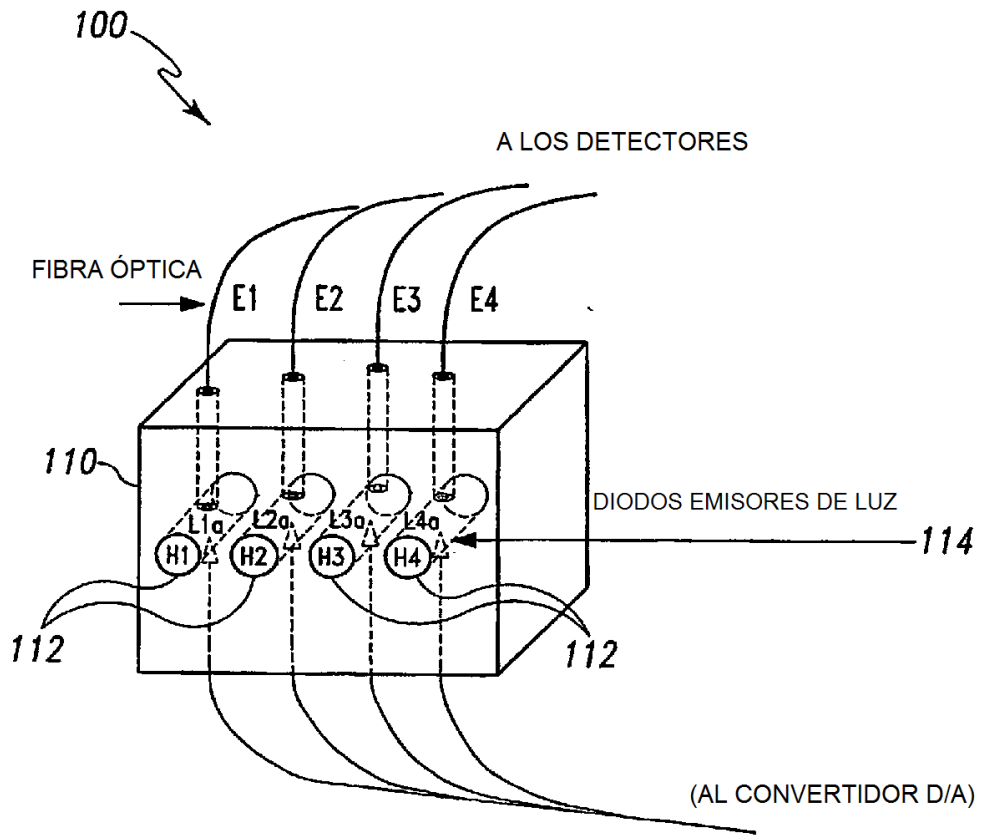


Fig. 8

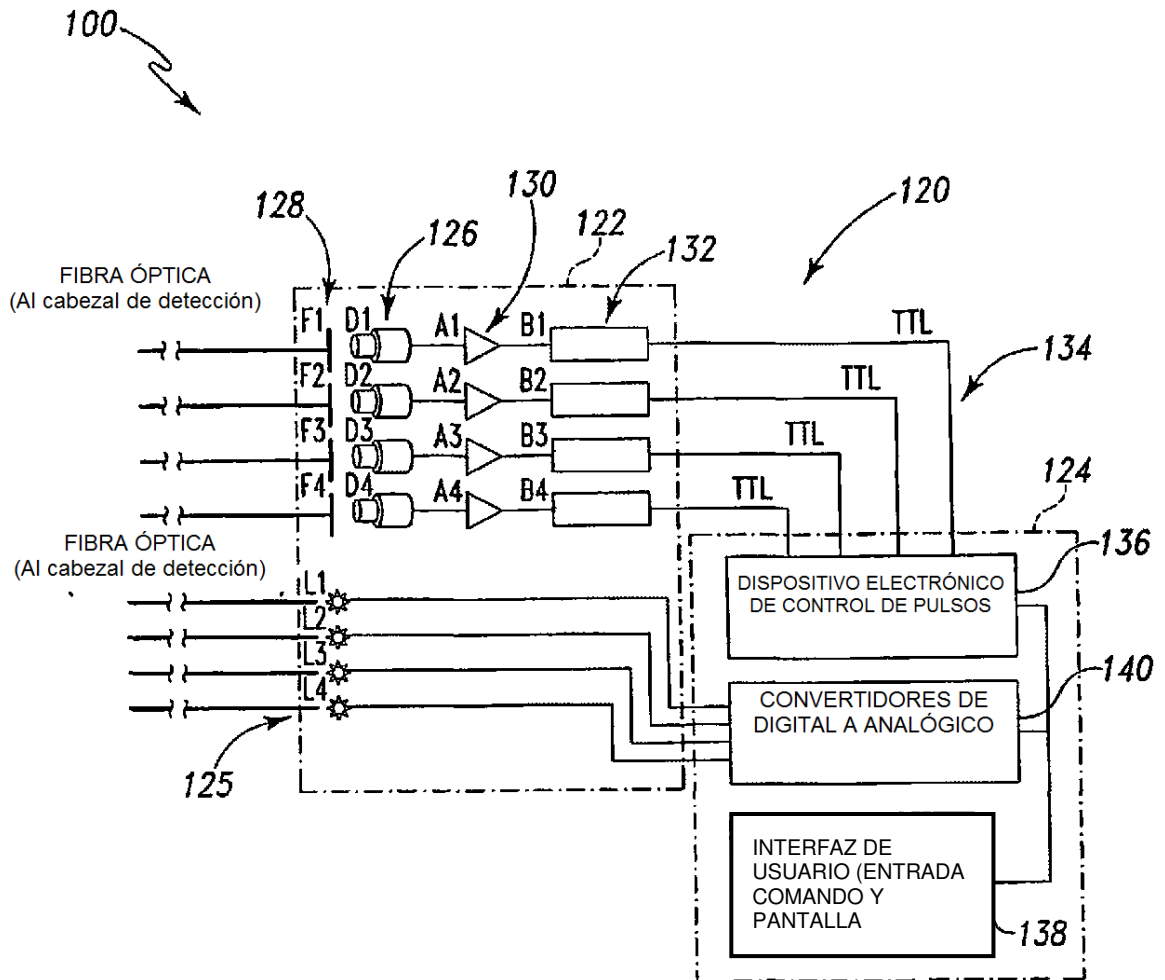


Fig. 9