

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **1 269 514**

21 Número de solicitud: 202130908

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01) **C12Q 1/00** (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD

U

22 Fecha de presentación:

14.07.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.06.2021

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
(50.0%)
Plaza Cronista Isidoro Valverde, s/n Ed. La
Milagrosa
30202 CARTAGENA (Murcia) ES y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ARÉVALO PÉREZ, Beatríz;
AZNAR POVEDA, Juan;
BELTRÁN SÁNCHEZ, José Francisco;
CAMPUZANO RUIZ, Susana;
GARCÍA HARO, Juan;
GARCÍA SÁNCHEZ, Antonio Javier;
LÓPEZ PASTOR, José Antonio;
PINGARRÓN CARRAZÓN, José Manuel;
SERAFÍN GONZÁLEZ-CARRATO, Verónica y
YÁÑEZ-SEDEÑO ORIVE, María Paloma**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

54 Título: **Dispositivo para determinación simultánea y rápida en saliva de las hormonas de fertilidad
estradiol, progesterona, hormona luteinizante y prolactina**

ES 1 269 514 U

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para determinación simultánea y rápida en saliva de las hormonas de fertilidad estradiol, progesterona, hormona luteinizante y prolactina

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención está relacionada con el ámbito de la fertilidad de la mujer. Más concretamente la invención se refiere a un dispositivo para la detección y/o cuantificación de diferentes hormonas relacionadas con procesos de fertilización en muestras de saliva, mediante un sensor electroquímico basado en el uso de partículas magnéticas modificadas con neutravidina, con el objetivo de monitorizar de forma rápida procesos de fertilidad y/o estado reproductivo.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La realización de analíticas para la medición de hormonas es un procedimiento habitual, necesario e imprescindible en los tratamientos relacionados con la infertilidad femenina. En ellos, se requiere medir la concentración de hormonas en dos de sus fases principales; en la fase de la estimulación ovárica con objeto de la extracción de ovocitos y en la fase de preparación de la paciente para la transferencia embrionaria.

De entre todas las hormonas que son controladas durante los tratamientos de fertilidad, el estradiol (17β -estradiol), la progesterona (P4), la hormona luteinizante (LH) y la prolactina (PRL) son consideradas de las más relevantes. Estas hormonas son indicadores de la reserva ovárica y, además, expresan el nivel de preparación del cuerpo de la paciente sometida al tratamiento de fertilidad ante la transferencia embrionaria. En función del nivel de estas hormonas en el cuerpo de la paciente en cuestión, el personal médico es capaz de determinar: (i) el momento idóneo para realizar la extracción de la reserva ovárica; (ii) el mejor día para realizar la transferencia embrionaria.

Hasta la fecha, el procedimiento habitual para la medición de las citadas hormonas se basa en técnicas invasivas, es decir, se extrae una muestra de sangre de la paciente y se realiza una analítica de la misma. Tras la precipitación de las proteínas, la determinación de los niveles hormonales se realiza en la fase sérica de la sangre. Para ello, se emplean técnicas tales como la cromatografía de gases (Havlíková et al., 2006; Burger et al., 2007; Susan S.-

C et al., 2006) o la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Zhao, et al., 2010; Makin et al 2010, Gower et al., 2010; Ričanyová et al., 2010). Aunque se trata de procedimientos estándar de laboratorio, estas metodologías presentan los siguientes inconvenientes: (i) alto coste por análisis, (ii) necesidad de personal cualificado, (iii) elevado tiempo de análisis, (iv) alto número de reactivos requeridos para cada análisis y, (v) notable coste del equipamiento, requerido para llevar a cabo las analíticas.

Además de estos inconvenientes, existe un problema adicional relativo a la frecuencia de realización de dichos análisis. Al tratarse de una técnica invasiva que requiere de una extracción de sangre y debido al estrés al que se encuentran sometidas muchas de las pacientes durante los tratamientos de reproducción asistida, en la mayoría de los casos el personal médico solamente realiza una determinación semanal de los niveles hormonales, ya que estos biomarcadores pueden variar en situaciones de estrés y ansiedad. Esta periodicidad es inferior a la deseada por los médicos responsables de los tratamientos; un control diario (o incluso varias determinaciones al día), permitiría conseguir una mayor precisión sobre cuándo llevar a cabo la extracción de la reserva ovárica, así como sobre la indicación más exacta del día idóneo para realizar la transferencia embrionaria.

Debido a los inconvenientes de los métodos de determinación tradicionales y a las necesidades actuales de los tratamientos de fertilidad, la comunidad científica está trabajando en nuevos procedimientos no invasivos, más rápidos, sensibles y selectivos para la determinación de las hormonas de interés. Los inmunosensores electroquímicos presentan una serie de ventajas, ya que pueden emplearse de manera sencilla para detectar simultáneamente múltiples compuestos diana en muestras de naturaleza y complejidad muy variables, además, también ofrecen otras características de valor añadido tales como, una alta sensibilidad, utilización de pequeños volúmenes de muestra y rápida respuesta. Además, bajo requisitos adicionales de instrumentación de coste bajo o asequible, hacen que éstos resulten muy adecuados para diseñar dispositivos portátiles y compactos para empleo en entornos descentralizados y/o de recursos limitados.

Un sistema electroquímico portátil para la detección de hormonas es el propuesto por los mismos autores de esta solicitud en la publicación “Enhanced determination of fertility hormones in saliva at disposable immunosensing platforms using a custom designed field-portable dual potentiostat Sensors and Actuators, V. Serafín, B. Arévalo, G. Martínez-García, J. Aznar-Poveda, J.A. Lopez-Pastor, J.F. Beltrán-Sánchez, A.J. Garcia-Sanchez, J. Garcia-Haro, S.Campuzano, P.Yáñez-Sedeño, J.M.Pingarrón, B 299 (2019) 126934”. Dicho

sistema permite la determinación de dos hormonas de forma simultánea. En esta publicación se indica que se pueden utilizar tantos circuitos potencioestáticos basados en el chip LMP91000 como canales de medición y cuantificar así cada una de las hormonas requeridas. En el diseño planteado en esta publicación se utiliza el chip LMP91000, un
5 componente especialmente diseñado para la realización de medidas potencioestáticas en un solo canal, compartiéndose los electrodos auxiliar y de referencia de uno de los chips con todos los electrodos de trabajo necesarios del resto de los chips (tantos como sustancias a medir). Esta configuración da lugar a efectos indeseados: (i) la incapacidad de suministrar suficiente corriente para varias amperometrías simultáneas; (ii) el flujo de una elevada
10 corriente por uno de los potencioestatos y no por el resto produce cambios sustanciales de temperatura que resultan en una pérdida de sensibilidad. Además, medir la concentración de más de dos hormonas con este dispositivo se hace imposible, dado que el amplio rango de corrientes de las diferentes amperometrías que comparten los mismos electrodos interferiría entre ellos, modificando el voltaje en el electrodo de referencia. El resultado de
15 estos efectos resultaría en medidas inexactas junto con una notable pérdida de precisión del equipo.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 El objeto de la presente invención es el de proporcionar un dispositivo capaz de detectar las cuatro hormonas características del ciclo fértil mediante un pequeño volumen de saliva manteniendo la fiabilidad y con un equipo compacto. Para detectar el estradiol, progesterona, hormona luteinizante y prolactina, la invención propone un dispositivo provisto de un biosensor con cuatro electrodos de trabajo, otro de referencia y otro auxiliar
25 disponiendo además de los medios para permitir la multiplexación de circuitos. El dispositivo está provisto de un único circuito potencioestático, de un solo canal, que comparte los electrodos auxiliar y de referencia, y medios para multiplexar los cuatro electrodos de trabajo en el mismo canal. Ventajosamente, el proceso y tiempos de multiplexado según cada una de las hormonas bajo estudio y la corriente que se espera medir en ellas son optimizados.
30 En este sentido, medios de programa asociados a un controlador calculan los tiempos óptimos que permiten: (i) la estabilización de cada corriente (asegurando el tiempo mínimo para que actúe el amplificador de control ante un cambio de corriente junto con el retraso en la estabilización que introduce el propio biosensor, del orden de las decenas de milisegundos); (ii) una adecuada frecuencia de muestreo (asegurando una frecuencia que
35 permita medir la variación temporal para cada una de las hormonas del orden de las

decenas de milisegundos) y, (iii) el tiempo que asegura que la señal no multiplexada no se vea afectada por la interrupción del flujo de corriente en los electrodos no muestreados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención y para complementar esta descripción, se acompañan como parte integrante de la misma las siguientes figuras, cuyo carácter es ilustrativo y no limitativo:

10 La figura 1 muestra un diagrama del dispositivo para la medición de hormonas, objeto de la presente invención.

La figura 2 es un detalle del biosensor según la invención.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La detección electroquímica se basa en la modificación de partículas magnéticas (MBs) de tamaño nano o micro-métrico ($\varnothing=10$ nm – 10 μ m) con neutravidina, lo que permite la inmovilización de biomoléculas sobre las partículas magnéticas modificadas. Por aplicación del formato de inmunoensayo adecuado para cada biomolécula, los inmunoreactivos seleccionados se inmovilizan sobre la superficie de estas partículas magnéticas para la determinación de cada hormona. Los formatos de inmunoensayo pueden ser: i) tipo sándwich, donde se usan dos anticuerpos diferentes que reconocen distintos epítomos en el antígeno a determinar, ii) competitivo directo, se hace competir la hormona a determinar y la hormona marcada enzimáticamente por los centros limitados de unión del anticuerpo de captura y, iii) competitivo indirecto, se inmoviliza la hormona sintética en la superficie de las partículas magnéticas y se añade un exceso de anticuerpo marcado previamente unido al antígeno de interés.

30 Para llevar a cabo la transducción electroquímica, las MBs modificadas se resuspenden en 5 μ L de 0.05 M de disolución reguladora fosfato de pH 6.0. A continuación, dicha disolución se deposita sobre la superficie de trabajo de un electrodo serigrafiado de carbono colocado previamente sobre una carcasa que contiene un imán de neodimio encapsulado para asegurar su captura magnética de forma estable y reproducible.

35

Una vez capturadas las MBs modificadas magnéticamente, la detección electroquímica se realiza mediante amperometría en presencia de hidroquinona (HQ) como mediador redox y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como sustrato enzimático. La regeneración de la forma reducida de la enzima se produce a través de la forma reducida de la hidroquinona (HQred).

5 La forma oxidada de la hidroquinona (HQoxi) se reduce electroquímicamente cuando el potencial aplicado es más negativo que el potencial formal del par redox HQred/HQoxi.

En referencia las figuras 1 y 2, el dispositivo diseñado para la determinación de las hormonas de la presente invención comprende un biosensor (10), cuatro electrodos de trabajo (12-15), un electrodo auxiliar (11) y un electrodo de referencia (16) que se encuentran impresos sobre una superficie cerámica. Las partículas magnéticas modificadas con neutravidina y con los inmunocomplejos adecuados para cada hormona diana se inmovilizan, como descrito previamente, con ayuda de un imán sobre los electrodos de trabajo.

15 El dispositivo permite dos métodos de trabajo diferentes: i) aplicar un barrido lineal de diferentes potenciales o, ii) aplicar un potencial fijo a lo largo del tiempo. Seleccionando esta última forma de trabajo se aplica un potencial constante de entre 0 y -0.5 V, por ejemplo de -0.2 V, obteniéndose la lectura de la variación de la corriente catódica generada por la reacción de reducción enzimática en cada electrodo de trabajo. La magnitud de la corriente catódica producida será proporcional a la concentración de cada hormona presente en la muestra de saliva analizada.

25 En particular, el método de análisis consiste en depositar una gota del volumen adecuado de saliva pretratada sobre la superficie del electrodo de trabajo, en el que previamente se han depositado las MBs modificadas. La hidroquinona cubrirá los electrodos de referencia (16), auxiliar (11) y los 4 electrodos de trabajo (12, 13, 14, 15). Para la deposición de la gota se puede emplear una micropipeta configurable con dicha cantidad o cualquier otro sistema que permita obtener dicha cantidad exacta de líquido.

30 Para que el dispositivo funcione de forma correcta y precisa, las rectas de calibración para cada hormona que se desea analizar han sido obtenidas previamente con estándares adecuados. Es decir, en la memoria del controlador (6) se encuentra precargada la recta de calibración para cada una de las hormonas a medir (estradiol, progesterona, hormona luteinizante y prolactina). Gracias a estas rectas de calibración, que se encuentran

35

almacenadas o cargadas previamente en el dispositivo, se pueden determinar las concentraciones de estas hormonas a partir del valor de corriente medido.

5 Cuando las MBs modificadas se han depositado sobre la superficie del biosensor (10) y han sido capturadas por el imán de neodimio encapsulado sobre los electrodos de trabajo (12-15), un controlador (6) comienza a ejecutar un proceso de amperometría a un potencial fijo en un rango de 0 a -500 mV frente a un electrodo de referencia de, por ejemplo, plata (Ag), aunque también se pueden emplear un electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) o un electrodo saturado de calomelanos (SCE). El voltaje de la amperometría se envía desde el controlador (6) al conversor digital-analógico (7) que actúa como un generador de la función de tensión a aplicar en el circuito potencioestático (2).

15 En el circuito potencioestático (2) se aplica el voltaje de la amperometría entre los electrodos de trabajo (12, 13, 14, 15) y referencia (16), dando lugar a la reacción de reducción, que genera una corriente a medir. La corriente generada es convertida a un valor de tensión con un amplificador de transimpedancia (4) y este valor es a su vez adquirido por el controlador (6) a través del conversor analógico-digital (5).

20 Al utilizarse un único canal para la lectura de las diferentes corrientes asociadas a cada hormona, es necesario configurar la electrónica de medición de corriente, variando de forma dinámica según la hormona los rangos de trabajo del amplificador de transimpedancia y del conversor analógico-digital (5), para que funcione con suficiente precisión.

25 En el dispositivo de la presente invención, se ha combinado la electrónica de estimulación y lectura de las señales correspondientes a las cuatro hormonas en un solo canal, utilizado un único circuito potencioestático y amplificador de transimpedancia, que comparte los electrodos auxiliar y de referencia. Para ello se utiliza un multiplexor electrónico (3) que dirige hacia el amplificador de transimpedancia (4) y la etapa de lectura de la señal las corrientes que circulan a través de cada uno de los electrodos de trabajo y multiplexa la señal de los cuatro electrodos en un único canal, alternando entre ellos para medir los 30 cuatro valores de corriente de manera cuasi simultánea.

35 El circuito potencioestático (2) funciona manteniendo el potencial del electrodo de trabajo a un nivel constante respecto al potencial del electrodo de referencia (16) mediante el ajuste de la corriente en el electrodo auxiliar (11). El circuito potencioestático (2) debe mantener el mismo potencial para las 4 hormonas a medir (entre 0V y -0.5V); cada una de ellas necesita un

rango de corriente diferente, acotado entre cientos de nano amperios hasta decenas de miliamperios, para funcionar en el potencial establecido. Se hace necesario configurar el rango de voltaje del fondo de escala y los tiempos de lectura del amplificador de transimpedancia (4) y del conversor analógico-digital (5). Para ello, el controlador (6) realiza los cálculos de los rangos de trabajo en tiempo real y de manera iterativa, con objeto de ajustar con suficiente precisión los valores de corriente según la hormona a determinar.

En este sentido, el controlador (6) calcula los tiempos óptimos de conmutación (del orden de milisegundos) entre las señales multiplexadas con objeto de: (i) estabilizar cada corriente tras cada cambio (asegurando el tiempo mínimo para que actúe el amplificador de control ante un cambio de corriente junto con el retardo en la estabilización que introduce el propio biosensor), (ii) computar la frecuencia de muestreo que permita medir la variación de cada una de las hormonas y, (iii) que la señal no multiplexada no se vea afectada por la interrupción del flujo de corriente en los electrodos no muestreados.

Los resultados de la medida se mostrarán en una interfaz gráfica (8) y/o guardarán en una memoria interna. Una interfaz de conectividad inalámbrica (9) que puede incluir protocolos Bluetooth, WiFi, LoRa o ZigBee, permitirá establecer conexiones con servidores remotos, donde guardar y consultar el valor presente o el histórico de los resultados, así como establecer conexiones con dispositivos portátiles como smartphones o tablets donde poder consultar los resultados sin necesidad de pantalla física adicional o de controlar el proceso.

A la vista de esta descripción y figuras, el experto en la materia podrá entender que la invención ha sido descrita según algunas realizaciones preferentes de la misma, pero que múltiples variaciones pueden ser introducidas en dichas realizaciones preferentes, sin exceder el objeto de la invención tal y como ha sido reivindicada.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la determinación simultánea y rápida de las hormonas de fertilidad estradiol, progesterona, hormona luteinizante y prolactina en saliva que comprende un biosensor (10) provisto de cuatro electrodos de trabajo (12, 13, 14, 15), un electrodo auxiliar (11) y un electrodo de referencia (16), caracterizado porque comprende un único circuito potencioestático (2) de un solo canal, que comparte los electrodos auxiliar y de referencia, un multiplexor (3) para multiplexar las señales procedentes de los cuatro electrodos de trabajo, un amplificador de transimpedancia (4), un conversor de señal analógico-digital (5) y un controlador (6).
2. Dispositivo para la detección simultánea de hormonas según la reivindicación 1 caracterizado por que el controlador (6) está adaptado para calcular el tiempo mínimo de conmutación entre las señales multiplexadas.
3. Dispositivo para la detección simultánea de hormonas según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 caracterizado por que dispone además de una interfaz de conectividad inalámbrica (9) que permite establecer conexiones con servidores remotos donde guardar y consultar los resultados de la medición y/o establecer conexiones con dispositivos portátiles.

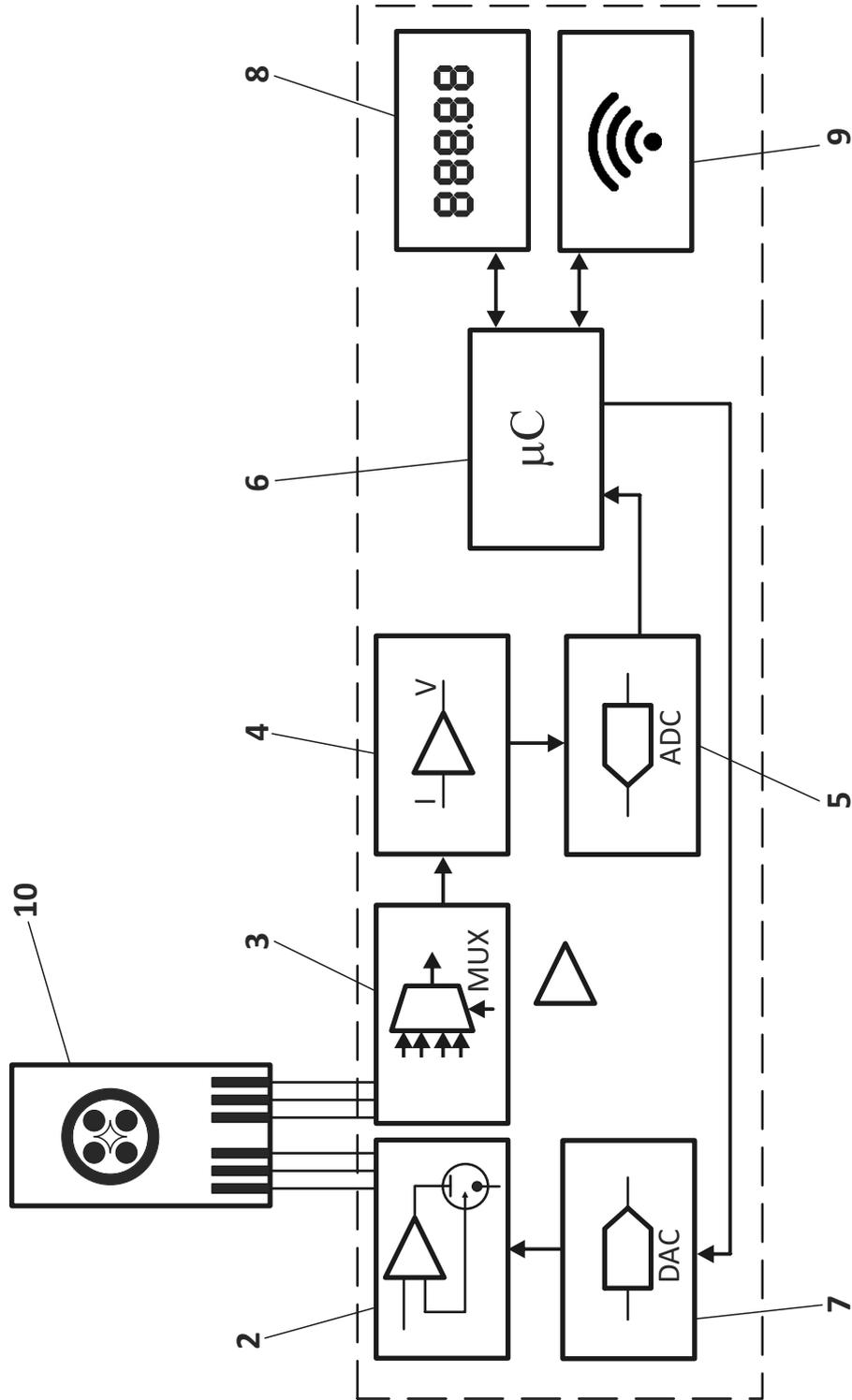


FIG. 1

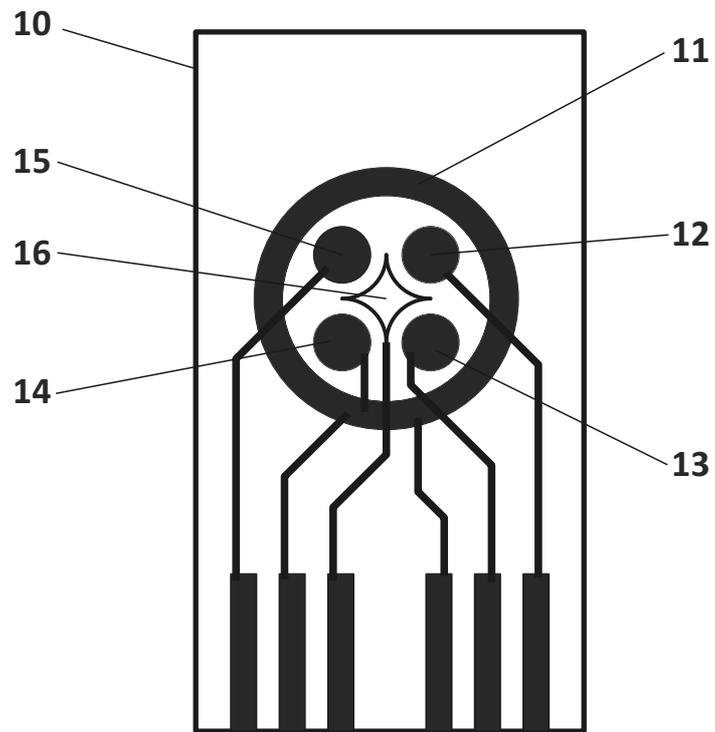


FIG. 2