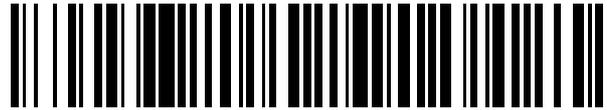


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 001**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2009** **E 09775256 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 2356464**

54 Título: **Prueba de embarazo**

30 Prioridad:

17.11.2008 GB 0820999

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2015

73 Titular/es:

GUY'S AND ST. THOMAS'S NHS FOUNDATION TRUST (50.0%)
The Counting House Great Maze Pond
London SE1 9RT, GB y
MENON-JOHANSSON, ANATOLE SEBASTIAN (50.0%)

72 Inventor/es:

MENON-JOHANSSON, ANATOLE SEBASTIAN

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 543 001 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

Prueba de embarazo

5 Sector de la técnica

La descripción se refiere a un método y dispositivo para establecer la fase aproximada (gestación) de embarazo de una mujer, en base al establecimiento de la concentración de lactógeno placentario humano (hPL) o un fragmento relevante del mismo en una muestra de fluido corporal de dicha mujer. La descripción también se refiere al uso de un anticuerpo anti-hPL para identificar la fase de embarazo.

Estado de la técnica

Las pruebas de embarazo se usan ampliamente por profesionales sanitarios e individuos particulares. Las pruebas de embarazo han estado disponibles en los supermercados y farmacias durante varios años. Una de las marcas más famosas es CLEARBLUE®. Las últimas pruebas se proporcionan como dispositivos consistentes, sencillos (véase por ejemplo el documento EP 0291194) que los individuos pueden usarse fácilmente en su domicilio y que dan un resultado en cuestión de minutos. Las pruebas se basan en la detección de la presencia o ausencia de una hormona humana, la hormona gonadotropina coriónica (hCG) en la orina de la mujer en cuestión.

Tradicionalmente el resultado de la prueba era positivo o negativo, es decir, embarazada o no embarazada. Sin embargo, recientemente se ha lanzado una prueba más sofisticada donde se usa la concentración de hCG para establecer si la gestante está de 1-2, 2-3 ó 3/3+ semanas de embarazo. Esta prueba se describe en la solicitud publicada WO 2006/100415.

Aunque esta nueva prueba es útil, la información proporcionada si el término de embarazo es de más de tres semanas es muy limitada. Es decir, simplemente indica que el término del embarazo es de 3 semanas o más.

Si la fase del embarazo no puede calcularse a partir de la información que la propia gestante puede proporcionar, por ejemplo, a causa de información incompleta o imprecisa, el único otro modo de establecer la fecha del embarazo, actualmente, es un escáner por ultrasonido. Aunque la precisión de los escáneres de ultrasonido para determinar la fase de embarazo es generalmente muy alta, y puede ser precisa en 3 ó 4 días, esta precisión puede reducirse para escáneres realizados antes de la semana 13 del embarazo. Además, no es factible determinar de forma rutinaria la fase del embarazo usando un escáner de ultrasonidos debido a las implicaciones de los recursos y a la carga del sistema de cuidados sanitarios. Actualmente, dada la muy alta demanda de escáneres, el primer escáner de ultrasonido se realiza aproximadamente a las 13 semanas, salvo que se sospechen complicaciones en el embarazo.

Sería muy útil estar en posición de ofrecer la fecha del embarazo sin recurrir a un escáner de ultrasonido, preferiblemente usando una prueba sencilla, no invasiva.

El presente inventor ha descubierto que la fase de un embarazo puede correlacionarse con la concentración de una hormona humana, el lactógeno placentario.

La propia hormona se conoce desde hace varios años y se ha propuesto como biomarcador para anomalías en el embarazo y/o en el feto tal como preeclampsia y aneuploidía cromosómica fetal entre otras cosas, véase por ejemplo la patente de Estados Unidos 7.235.359.

Whittaker et al, 1983. Lancet, 6, 304-306 se refieren a la evaluación precisa de la edad gestacional prematura en mujeres normales y diabéticas mediante la concentración de lactógeno placentario humano en suero.

Whittaker et al, 1987. Am J ObsGyn, 156(1), 178-182 describen un estudio prospectivo para comparar el lactógeno placentario humano en suero en las fechas menstruales para determinar la edad gestacional.

Moser et al, 1973. ClinChem, 19(6), 602-607 describen un radioinmunoensayo de somatomotropina coriónica humana en suero, fluido amniótico y orina.

Biswas et al, 1972. J endocrinol, 54(2), 251-261 se refieren a somatomotropina coriónica humana en suero y orina en diversas fases de embarazo y su correlación con enzimas y estrógenos.

Sin embargo, hasta donde sabemos nunca se ha propuesto como útil para determinar la fase de un embarazo normal.

Objeto de la invención

Por tanto, en un aspecto, se proporciona un método para determinar la fase de un embarazo empleando un

dispositivo manual adecuado para vender al público, donde el método comprende las etapas de cuantificar la cantidad de hormona hPL o un fragmento detectable de la misma en una muestra de orina obtenida de una mujer, y establecer la fase del embarazo correspondiente a la misma.

5 En otro aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo manual adecuado para su venta al público y adaptado para detectar los niveles/cantidad de hPL o un fragmento detectable de la misma en una muestra de orina de una mujer, para establecer la fase de embarazo.

10 En otro aspecto más de la invención, se proporciona el uso de un anticuerpo anti-hPL en un dispositivo manual adecuado para su venta al público para determinar la fase de embarazo de una muestra de orina.

15 La hPL también se conoce como hormona somatomotropina coriónica 1 o coriomamotropinlactógeno. UniProt indica que el péptido es de 217 aminoácidos de longitud, como se muestra en la secuencia ID N° 1, pero también parece existir en una forma de 190 ó 191 aminoácidos de longitud. La hormona tiene dos subunidades.

Descripción de las figuras

20 La Figura 1 muestra el perfil de secreción de hPL en nanomol/l como una función de las semanas de embarazo.

La Figura 2 muestra una realización sencilla de un dispositivo de ensayo adecuado para indicar la fase de embarazo.

25 Las Figuras 3 y 4 muestran diversas disposiciones de un dispositivo con una unidad de pantalla digital.

La Figura 5 muestra una disposición de un dispositivo de lectura de resultados.

Descripción detallada de la invención

30 De forma interesante existe una correlación entre la masa de la placenta y la cantidad de hPL presente y existe la hipótesis de que cada célula trofoblástica sintetiza una cantidad fija de la hPL por día y según aumenta la cantidad de células también lo hace la cantidad de hPL sintetizada y secretada. Por esta razón, se ha sugerido hPL como marcador útil para detectar ciertas anomalías durante el embarazo, especialmente en el periodo de 30-35 semanas, en el tercer trimestre de embarazo. Se secretan solamente niveles muy bajos de la hPL antes de las 6 semanas. Después de 6 semanas, la cantidad secretada aumenta exponencialmente hasta aproximadamente la semana 24 cuando la curva de concentración empieza a aplanarse (véase la figura 1).

40 La fase del embarazo como se emplea en este documento pretende indicar la asociación de un momento puntual con el embarazo, por ejemplo, la cantidad de semanas de gestación, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 semanas o intervalos de las mismas. No se entiende simplemente que haga referencia a proporcionar un resultado binario, es decir, un resultado positivo o negativo, embarazada o no embarazada.

45 La cuantificación de la cantidad de hPL u otra hormona mencionada en este documento puede ser la cantidad absoluta, en masa por unidad de volumen, moles (nano moles, etc.) por unidad de volumen o como unidades internacionales por unidad de volumen, también incluye el establecimiento de la cantidad relativa, por ejemplo por referencia a un patrón. En una realización, el método empleado es semi-cuantitativo.

50 El fragmento de la misma como se emplea en este documento se refiere a un fragmento detectable que corresponde a la cantidad real de hPL presente, y puede incluir una subunidad tal como la subunidad-a.

55 En una realización, el método puede ser capaz de distinguir los siguientes momentos puntuales en un embarazo: 6 semanas o menos, de 6 a 9 semanas, de 10 a 12 semanas, de 13 a 15 semanas, de 16 a 18 semanas, de 19 a 21 semanas, y/o de 21 a 24 semanas.

60 Las fases inferiores a 6 semanas pueden caracterizarse por una concentración de hPL de 2 nmol/l o menos. La fase de 6 semanas hasta 9 semanas puede caracterizarse por una concentración en el intervalo por encima de 2 nmol/l hasta aproximadamente 9 nmol/l. La fase de 10 a 12 semanas puede caracterizarse por una concentración en el intervalo por encima de 9 nmol/l hasta aproximadamente 34 nmol/l. La fase de 13 a 15 semanas puede caracterizarse por una concentración en el intervalo por encima de 80 nmol/l hasta aproximadamente 95 nmol/l. La fase de 16 a 18 semanas puede caracterizarse por una concentración en el intervalo por encima de 95 nmol/l hasta aproximadamente 105 nmol/l. La fase de 19 a 21 semanas puede caracterizarse por una concentración en el intervalo por encima de 105 nmol/l hasta aproximadamente 200 nmol/l. La fase de 22 semanas a 24 semanas puede caracterizarse por una concentración en el intervalo por encima de 200 nmol/l hasta aproximadamente 225 nmol/l.

65 En una realización, el método puede distinguir entre las siguientes fases de embarazo: 6 semanas y menos, 7/8

semanas, 9 semanas, 10/11 semanas, 11/12 semanas, 12/13 semanas, 14/15/16 semanas, 17/18 semanas, 18/19 semanas, 19/20 semanas, 21 semanas, 22 semanas, 23 semanas, y/o 24 semanas y por encima.

5 Una concentración de hPL de 0,04 mg/l o por debajo puede ser indicativa de un embarazo en el periodo de 6 semanas o menos. Una concentración de hPL en el intervalo de 0,04-0,05 mg/l puede ser indicativa de un embarazo de 7/8 semanas. Una concentración de hPL en el intervalo de 0,1 a 0,2 mg/l puede ser indicativa de un embarazo de 9 semanas. Una concentración de hPL en el intervalo de 0,25 a 0,35 mg/l puede ser indicativa de un embarazo de 10/11 semanas. Una concentración de hPL en el intervalo de 0,3 a 0,5 mg/l puede ser indicativa de un embarazo de 11/12 semanas. Una concentración de hPL en el intervalo de 0,65 a 0,7mg/l puede ser indicativa de un embarazo de 12/13 semanas. Una concentración de hPL de aproximadamente 0,9 mg/l puede ser indicativa de un embarazo de 14/15/16 semanas. Una concentración de hPL de aproximadamente 1,5 mg/l puede ser indicativa de un embarazo de 17/18 semanas. Una concentración de hPL de aproximadamente 2,5 mg/l puede ser indicativa de un embarazo de 19/20 semanas.

15 Las cifras identificadas anteriormente se basan en las cantidades de hPL en suero. Aunque hPL tiene una corta semivida en suero, parece que debido al tamaño del péptido, al menos algo de hPL se filtra al glomérulo en la orina. Una vez en la orina la hPL parece protegerse de la degradación o degradación adicional. Por tanto, el perfil de secreción de hPL en orina parece seguir la misma curva que la observada en suero, y aunque las cantidades absolutas de hPL en orina son inferiores a las observadas en suero. Sin embargo, técnicas analíticas sensibles tales como ensayos ELISA son capaces de detectar y cuantificar las cantidades de hPL en orina, que sobre un periodo de 24 horas, en aproximadamente la semana 8 de embarazo, es de aproximadamente 10 µg.

20 El método de este documento puede aplicarse para determinar la fase del embarazo sobre 24 semanas. Las cantidades de hPL en suero hacia el final del embarazo pueden alcanzar un nivel que se aproxima a 5-7 mg/l.

25 Al menos las cantidades de hPL mostradas en la Tabla 1 se han identificado en orina:

Tabla 1

Gestación (semanas)	Gestación (días)	Nivel (microgramos)
8	56	10
14	98	13,1
14,4	101	17,7
19,2	135	56,9
24,3	170	59,5
25,4	178	31,1
28,2	198	100,4
29	203	69,2
31,7	222	76,4
31,9	223	36,5
31,9	223	121,5
34,1	239	93,2
36,6	256	105

30 Las cantidades absolutas de hPL detectadas y/o extraídas de la muestra dependen de las técnicas exactas empleadas. Cuanto más sensible es la técnica, mayor es el valor que puede detectarse finalmente. Por tanto, los niveles de la Tabla 1, pueden ser mayores dependiendo de qué técnica se emplee.

35 La presente descripción es particularmente adecuada para establecer la fase del embarazo cuando una mujer está en el primer o segundo trimestre del embarazo.

40 En una realización, el método es adecuado para distinguir una semana de gestación de otra, en particular cuando las semanas están dentro del intervalo de 7 a 28 semanas.

Los métodos para establecer la fase del embarazo, basados en una hormona (analito) y en algoritmos que pueden adaptarse para su uso en la presente descripción, se describen en el documento WO 2006/100415 (véase en particular de la página 11 a la página 16).

45 Es muy conveniente poder establecer la fase de un embarazo en base a la tecnología de flujo lateral que emplea la

orina como muestra. Por lo tanto, la tecnología descrita en este documento probablemente tiene amplia aplicación, que puede implementarse fácilmente por los especialistas en la técnica en el campo técnico en cuestión.

El ensayo anterior puede, por supuesto, realizarse después de realizar un ensayo basado en los niveles de hCG que ha identificado que la mujer está embarazada. Esto puede ser importante para un embarazo no confirmado en una fase prematura porque un ensayo basado solamente en hPL antes de las 6 semanas por sí solo no es capaz de confirmar el embarazo. Por tanto, en una realización, se proporciona un dispositivo para ensayar las concentraciones de hPL en un kit con un dispositivo diferente que ensaya los niveles de hCG, por ejemplo CLEARBLUE EASY®.

En una realización en el método de acuerdo con la presente invención, se mide una combinación de niveles hormonales, por ejemplo, se mide la concentración de hPL y hCG, por ejemplo de forma concomitante o secuencial, tal como en el mismo dispositivo (o alternativamente en dispositivos diferentes). Esto es particularmente útil cuando el embarazo es en una fase de 6 semanas o menos porque posibilita establecer la fase del embarazo como 1 a 2 semanas, 2 a 3 semanas o 3 a 6 semanas, además de las fases identificables empleando hPL en solitario.

Esto puede conseguirse, por ejemplo, empleando un único dispositivo que comprende múltiples tiras de ensayo diferentes, tales como 2, 3 ó 4.

Como alternativa, o adicionalmente, el método también puede ensayar concentraciones de relaxina. Igual que la hCG, esta hormona se secreta muy poco después del implante y por lo tanto la relaxina y la hPL pueden usarse en combinación para averiguar la fase de los embarazos, por ejemplo hasta e incluyendo la fase de 6 semanas, además de las fases identificables empleando hPL en solitario.

En una realización, se usa relaxina en un ensayo para ensayar si una muestra indica que la mujer relevante, de la cual se obtiene, está embarazada y se realiza una prueba posterior para determinar los niveles de hPL para establecer la fase del embarazo.

Los niveles de relaxina están en niveles superiores alrededor de la semana 10 a 12. Por tanto, en combinación con al menos hPL y opcionalmente otras hormonas, por ejemplo, las descritas en este documento, la relaxina puede ser particularmente útil para distinguir embarazos en la fase de 10 a 12 semanas.

Los niveles de estradiol no conjugado se convierten en significativos a partir de aproximadamente la semana 13 del embarazo y pueden usarse en combinación con al menos hPL y opcionalmente otras hormonas, especialmente las descritas en este documento, para identificar la fase del embarazo en cuestión. La combinación de estradiol y hPL puede ser particularmente útil para, en particular, distinguir embarazos en la fase de 13 semanas.

Hormonas adicionales que pueden analizarse en un método/dispositivo de acuerdo con la presente descripción incluyen hormona luteinizante y/u hormona foliculoestimulante.

En una realización, el método de este documento es adecuado para identificar una fase de embarazo en el intervalo de 6 a 28 semanas, por ejemplo de 7 a 24 semanas tales como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 semanas o combinaciones de las mismas.

En una realización alternativa, por ejemplo que implique el análisis de al menos dos hormonas (analitos) puede identificarse una fase del embarazo en el intervalo de 1-2, 2-3, 3-6 semanas, donde las fases restantes son identificables según una cualquiera de las realizaciones descritas en este documento.

Los métodos para medir los niveles hormonales incluyen serie de proteínas, HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), SDS-Page, transferencia de Western, e inmunoensayos. Existen diferentes formas de inmunoensayos, por ejemplo, empleando enzimas y/o fluorescencia. Una forma particularmente sensible de inmunoensayo es un ensayo ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), a veces mencionado como ensayo tipo sándwich. El hecho de que el ensayo emplee dos anticuerpos distintos dirigidos contra la misma diana, aumenta la precisión/especificidad del ensayo.

Ejemplos de tecnología adecuada que puede adaptarse para implementar la presente descripción se describen en el documento EP 0219194, véase en particular la página líneas 14-23, que describe tiras de ensayo, página 2 líneas 27-36 que describe un dispositivo típico, página 2 líneas 37-55 que describe la fase sólida porosa adicionalmente y ensayos "tipo sándwich" y competitivos, página 3 líneas 34-39 que analiza propiedades adecuadas del vehículo poroso, tales como nitrocelulosa, en el contexto de permitir el movimiento de los marcadores/partículas. El último ensayo también analiza marcadores adecuados que estarán generalmente en el intervalo de tamaño de 0,05 a 0,5 micrómetros.

Los marcadores adecuados también incluyen partículas coloreadas de material, por ejemplo sol de oro, sol de colorante o un polímero coloreado tal como latex, que se acumula proporcionando una señal/resultado, en particular en una zona de detección. Véase por ejemplo el documento EP 0219194 página 5 líneas 2-15, la

preparación de sol de oro, sol de colorante, y partículas coloreadas en la página 12, y el acoplamiento de un anticuerpo a uno de dichos marcadores se describe en la página 13 líneas 10-19 del mismo.

5 Como alternativa, para ensayos realizados por profesionales entonces el marcador en el anticuerpo, por ejemplo, empleado en el inmunoensayo puede ser un radiomarcador.

Como alternativa los niveles de hPL pueden establecerse de forma indirecta empleando por ejemplo QPCR para medir los niveles de ARNm en una muestra de sangre.

10 En una realización de la descripción, la muestra es sangre, suero o plasma.

En la invención la muestra es una muestra de orina.

15 Generalmente el método, ensayo y/o dispositivo debe tener una sensibilidad de 50 ui/l (unidades internacionales por litro) tales como 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ó 45 ui/l.

20 Los principios de un ensayo ELISA son sencillos porque se fija un anticuerpo específico para la molécula diana a una perla insoluble (que puede estar coloreada) o superficie. Después, se introduce la muestra de ensayo y si están presentes moléculas diana, el anticuerpo se une a las mismas. Finalmente, se introduce un segundo anticuerpo diferente, que está marcado de modo que pueda detectarse (o puede estar presente en el recipiente de ensayo), y se une a la molécula diana en una localización diferente al primer anticuerpo formando de ese modo un sándwich de la diana. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede estar dirigido al primer anticuerpo. Una vez unido, un marcador se activa o puede detectarse, medirse y cuantificarse, si así se desea.

25 En una realización, el dispositivo es un dispositivo de flujo lateral que comprende un medio de transporte de líquidos, por ejemplo, un vehículo poroso tal como nitrocelulosa.

30 En algunos ensayos sencillos, tales como las pruebas de embarazo de primera generación, un resultado positivo era simplemente una línea azul que aparecía en la ventana de ensayo. En una realización sencilla de la presente descripción, pueden proporcionarse tiras de ensayo que comprenden los reactivos necesarios en forma de momentos puntuales y marcarse con la fase del embarazo en cuestión como se muestra en la Figura 2. Esto usa la tecnología descrita en el documento EP 291194 y las técnicas de cuantificación descritas en el documento WO 2006/100415. La lectura de dicha prueba es bastante sencilla. Por lo tanto, en una realización el dispositivo comprende múltiples ventanas de resultado, por ejemplo, donde cada ventana de resultado está marcada con un momento puntual de modo que el usuario pueda leer fácilmente el resultado de la misma y establecer la fase sin ninguna interpretación. La acumulación de perlas coloreadas en la ventana o ventanas relevantes puede indicar el resultado.

40 Sin embargo, las lecturas de densidad óptica pueden tomarse en dispositivos digital en el laboratorio o en dispositivos desechables manuales, por ejemplo como se describe en el documento WO 2007/017648. En una realización de la presente descripción, el dispositivo es como se muestra en la siguiente Figure 3 o 4, concretamente un dispositivo de aproximadamente 12 cm de longitud y 2 cm. El dispositivo comprende una carcasa (2), por ejemplo formada a partir de un material de plástico opaco. En un extremo de la carcasa se proporciona una abertura estrecha a través de la cual puede sobresalir un transportador o vehículo de líquidos más allá de la carcasa para contactar con un fluido de muestra.

45 Hay una pantalla (6) para presentar información al usuario fijada de forma desprendible al dispositivo, de modo que pueda retirarse del dispositivo después de generar un resultado de ensayo. La presión descendente sobre el gancho deformable de forma elástica (8) facilita dicha retirada. La pantalla es tal que el resultado y cualquier otra información en la misma, pueda retenerse después de retirar la pantalla del dispositivo, para futura referencia.

50 La carcasa del dispositivo comprende un ensamblaje analítico marcado (10), que comprende un circuito impreso (12) que soporta dos LED y dos fotodiodos (14), alineados con una zona de ensayo de una tira de flujo lateral de tira de nitrocelulosa (16) que está en comunicación de flujo de líquidos con la parte de muestreo (4) del transportador o vehículo de líquidos. La zona de ensayo es la zona en que se acumula un reactivo marcado en presencia (o ausencia, según lo apropiado) del analito de interés. Esta acumulación afecta a la propiedad óptica de la tira de ensayo (16), tal como su reflectancia o transmisividad, una propiedad que puede medirse por la disposición de LED/fotodiodo. La disposición produce una corriente de entrada, cuya magnitud está relacionada con la cantidad de marcador acumulado en la zona de ensayo.

60 El ensamblaje analítico (10) también comprende una fuente de energía eléctrica (pilas de botón 18) para proporcionar energía a la pantalla (6) cuando está fijada a la carcasa (2).

65 Se proporcionan surcos (20) en la parte superior de la carcasa para acomodar una parte ligeramente rebordeada de la pantalla (6). La pantalla (6) se retiene en la carcasa en una abertura adecuadamente conformada y dimensionada mediante el gancho (8). Cuando están posicionados correctamente, los conectores eléctricos en la pantalla entran en contacto con los conectores eléctricos (22) provistos en la carcasa, asegurando de ese modo las conexiones

eléctricas en la pantalla (6) y el ensamblaje analítico (10).

El miembro analítico (10) comprende componentes de transducción de señales (24), que comprenden una memoria intermedia de almacenamiento de datos, un converso analógico a digital (ADC) y un microprocesador o microcontrolador. La pantalla (6) es sensible a una salida desde el microprocesador o microcontrolador.

La detección de flujo para determinar los resultados de ensayo se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N°: 2005/037511. Se muestran dispositivos y métodos de ensayo en la publicación de solicitud de Estados Unidos N°: 2008/213875.

En una realización la descripción proporciona un dispositivo adaptado para establecer la fase aproximada de un embarazo a partir de la concentración de al menos hPL en una muestra, por ejemplo que comprende uno o más elementos descritos en este documento. El dispositivo puede proporcionar opcionalmente un resultado positivo o negativo, en relación al embarazo, por ejemplo basado en hCG. En esta realización, un dispositivo empleado puede comprender reactivos para el análisis de hPL y hCG.

De forma ventajosa, el análisis puede repetirse en diferentes momentos puntuales para proporcionar evidencias de que el embarazo está progresando y el feto está creciendo.

En una realización, el resultado se presenta como un número o intervalo en una ventana, por ejemplo en forma de una pantalla digital.

En la invención, el dispositivo es un dispositivo manual, por ejemplo, un dispositivo manual desechable.

En un aspecto, el dispositivo comprende un anticuerpo anti-lactógeno placentario humano, por ejemplo un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede estar opcionalmente marcado, por ejemplo como se ha analizado anteriormente.

En una realización, el dispositivo comprende un anticuerpo diferente adicional contra el lactógeno placentario, por ejemplo, anticuerpo monoclonal, donde dicho anticuerpo adicional está marcado para permitir la detección de la unión a hPL o un fragmento relevante del mismo.

Como alternativa, un anticuerpo secundario empleado puede ser un anticuerpo anti-anticuerpo y por ejemplo puede estar dirigido a la región Fc del primer anticuerpo. Este segundo anticuerpo puede estar marcado.

Cuando se emplean un primer y segundo anticuerpos entonces cada anticuerpo puede estar marcado.

Un anticuerpo anti-lactógeno placentario humano empleado en este documento pretende hacer referencia a un anticuerpo específico para dicho antígeno (hPL).

En una realización, se emplea una combinación de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales en mezcla, dirigidos contra las hormonas específicas.

En una realización, un anticuerpo empleado tiene un marcador fluorescente. En una realización, se emplea un anticuerpo adicional, por ejemplo contra una hormona distinta, con un marcador fluorescente que emite luz a una longitud de onda distinta del primer anticuerpo marcado de forma fluorescente.

En la invención, el dispositivo es para su venta al público, por ejemplo, en ventanilla en farmacias y supermercados. El ensayo en el mismo debe ser suficientemente contundente para manejar un intervalo apropiado de concentración de hormonas relevantes, probablemente para detectarlas y proporcionar un resultado al usuario final.

Puede ser recomendable realizar el ensayo sobre la primera muestra de orina del día que pasa por la mujer. Por lo tanto, en una realización, el dispositivo viene acompañado de instrucciones que le explican esto último.

Habiendo dicho esto, si el dispositivo tiene que suministrarse a hospitales y a doctores puede ser importante saber de forma muy precisa si el embarazo es de menos de 9 semanas, menos de 12 semanas, menos de 18 semanas, 21 semanas y/o 24 semanas. En este caso el ensayo, kit, dispositivo y/o reactivo de acuerdo con la descripción pueden proporcionarse como entidades optimizadas por separado para cada momento puntual relevante. La optimización puede implicar la modificación de la concentración de reactivos empleados y/o la combinación de hormonas empleada.

En una realización adicional, el método empleado en este documento puede adaptarse para detectar una disminución en los niveles de hPL en una mujer, como un medio para controlar la pérdida o terminación del feto. El control adecuado de lo último puede ser problemático para los profesionales médicos. Por lo tanto sería muy útil un ensayo rutinario para identificar la disminución en los niveles de hPL.

En una realización, la descripción proporciona el uso de un anticuerpo anti-hPL tal como anticuerpo monoclonal, por ejemplo un anticuerpo murino, porcino, ovino, bovino, de cabra, camello, rata, conejo u otro anticuerpo, para su uso en la cuantificación del hPL en una muestra fluida, tal como una muestra de sangre, suero, plasma u orina, derivada de una mujer, por ejemplo con el fin de estimar la fase del embarazo.

5 En una o más realizaciones de la descripción, el anticuerpo empleado se refiere a la subunidad α de hPL.

En el mercado se dispone de varios anticuerpos monoclonales, por ejemplo:

10 Anticuerpo monoclonal de ratón anti-lactógeno placentario humano (epítipo 2), no conjugado, clon INN-hPL-37 de Abcam, anticuerpo monoclonal de ratón anti-lactógeno placentario humano, no conjugado, clon INN-hPL-5 de AbD Serotec, y anticuerpo monoclonal de ratón anti-lactógeno placentario (hPL), no conjugado, clon LIP-603 de Acris Antibodies GmbH.

15 Como alternativa, los anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, pueden prepararse fácilmente por técnicas rutinarias en el campo técnico en cuestión, por ejemplo, por inmunización de un hospedador con hPL conjugado con un vehículo adecuado, tal como ovoalbúmina o similares. El anticuerpo empleado debe ser específico para hPL, por ejemplo, tener una reactividad cruzada del 1% o menos o según lo apropiado en las circunstancias.

20 En una realización, la descripción proporciona un kit que comprende un dispositivo y/o reactivo para ensayar la concentración de hPL en una muestra corporal fluida, obtenida de una mujer, con el fin de establecer la fase del embarazo.

25 En una realización se proporciona un kit adaptado para identificar una bajada en los niveles de hPL después de pérdida o terminación de un feto.

30 Dado que el ensayo descrito en este documento depende de la correlación entre la masa de la placenta y la concentración de la secreción de hPL, entonces si la mujer está fecundada con dos o más fetos entonces el presente método puede presentar el resultado como una fase posterior del embarazo que lo apropiado. Habiendo dicho esto, se observaría que la fecundación múltiple representa sólo el 3% de los embarazos y, por lo tanto, el ensayo/método/dispositivo y usos de la presente descripción representan un etapa práctica hacia proporcionar información a los individuos de un modo conveniente, rentable y eficaz.

35 Se prevé que una o más realizaciones descritas en este documento pueden combinarse, según lo técnicamente apropiado.

En el contexto de esta memoria descriptiva "que comprende" debe interpretarse como "que incluye".

40 Los aspectos de la descripción que comprenden ciertos elementos también pretenden extenderse a realizaciones alternativas "que consisten en" o "que consisten esencialmente en" los elementos relevantes.

Ejemplos

45 Se ilustra una realización de un dispositivo de lectura de resultado de ensayo que tiene ambos fotodetectores "compartidos" y zonas "de lectura común" en la FIG. 5. El dispositivo de lectura es de aproximadamente 12 cm de largo y aproximadamente 2 cm de ancho y generalmente tiene forma de dedo o cigarro. En realizaciones preferidas, la carcasa no es mayor de aproximadamente 12 cm de longitud, aproximadamente 2,5 cm de anchura, y aproximadamente 2,2 cm de altura. Sin embargo, puede emplearse cualquier forma conveniente, tal como un lector con forma de tarjeta de crédito. El dispositivo comprende una carcasa 1 formada a partir de un material sintético impermeable a la luz (por ejemplo, policarbonato, ABS, poliestireno, polietileno de alta densidad, o polipropileno o poliestirol que contiene un pigmento apropiado de bloqueo de la luz, tal como carbono). En un extremo del dispositivo de lectura hay una ranura o abertura estrecha 3 por la cual puede insertarse una tira de ensayo (no mostrada) en el lector. En su cara superior el lector tiene dos aberturas con forma oval. Una abertura acomoda la pantalla de una pantalla de cristal líquido 5 que presenta información a un usuario por ejemplo los resultados de un ensayo, en términos cualitativos o cuantitativos. La otra abertura acomoda un accionador de mecanismo eyector 7 (en forma de un botón presionable), que cuando se acciona, expulsa de forma forzada un dispositivo de ensayo insertado desde el dispositivo de lectura del ensayo.

60 La tira de ensayo para su uso con el dispositivo de lectura es generalmente una varilla de ensayo de flujo lateral convencional por ejemplo del tipo descrito en la patente de Estados Unidos N° 6.156.271, la patente de Estados Unidos N° 5.504.013, el documento EP 728309, o el documento EP 782707. La tira de ensayo y una superficie o superficies de la ranura en el lector, en que se inserta la tira de ensayo, se conforman y dimensionan de tal modo que la tira de ensayo sólo pueda insertarse satisfactoriamente en el lector en la orientación apropiada. El dispositivo de ensayo y una superficie o superficies de la ranura en el lector, en que se inserta el dispositivo de ensayo, también pueden conformarse y dimensionarse de modo que haya una alineación tridimensional precisa del lector y un dispositivo de ensayo insertado, que asegura que el resultado del ensayo pueda leerse correctamente en el lector.

Cuando una tira de ensayo se inserta correctamente en el lector, se cierra un conmutador que activa el lector desde un modo "latente", que es el estado normal adoptado por el lector, reduciendo de ese modo el consumo de energía.

5 Encerrados dentro de la carcasa del lector (y por lo tanto no visibles en la FIG. 5) hay varios componentes adicionales, incluyendo un lector que comprende tres LED. Cuando se inserta una tira de ensayo en el lector, cada LED se alinea con una zona respectiva de la tira de ensayo. El primer LED se alinea con la zona de ensayo, el segundo LED se alinea con la zona de referencia y el tercer LED se alinea con la zona de control. Dos fotodiodos detectan la luz reflejada desde las diversas zonas y generan una corriente, cuya magnitud es proporcional a la cantidad de luz incidente sobre los fotodiodos. La corriente se convierte en un voltaje, se amortigua por la memoria intermedia y se suministra a un conversor de analógico a digital (ADC). La señal digital resultante se lee por el microcontrolador. En algunas realizaciones, se proporciona un fotodiodo diferente para detectar desde cada zona (es decir la cantidad de fotodiodos es igual a la cantidad de zonas desde las que se hacen las mediciones de luz reflejada).

15 En otras realizaciones, la cantidad de fotodetectores es menor que la cantidad de zonas. Un fotodiodo detecta la luz reflejada desde la zona de ensayo y algo de la luz reflejada desde la zona de referencia. El otro fotodiodo detecta algo de la luz reflejada desde la zona de referencia y la luz reflejada desde la zona de control. El microcontrolador conmuta los LED uno cada vez, de modo que se ilumina solamente una de las tres zonas en cualquier momento dado - de este modo pueden discriminarse las señales generadas por la luz reflejada desde las zonas respectivas en una base temporal.

20 Un conmutador que se cierra mediante la inserción de un dispositivo de ensayo en el lector, y que activa el microcontrolador. El dispositivo comprende adicionalmente una fuente de energía (típicamente una pila de botón o dos pilas de botón), y un dispositivo LCD sensible a la salida desde el microcontrolador.

25 En uso, se inserta una tira de ensayo seca (es decir antes de contactar con la muestra) en el lector, esto cierra el conmutador que activa el dispositivo lector, que después realiza una calibración inicial. La intensidad de la entrada de luz desde diferentes LED raramente es idéntica. Asimismo, los fotodetectores probablemente no tienen sensibilidades idénticas. Como dicha variación podría afectar a la lectura del ensayo, se realiza una calibración inicial, en que el microcontrolador ajusta la longitud del tiempo que cada uno de los tres LED está iluminado, de modo que la señal medida desde cada una de las tres zonas (ensayo, referencia y control) sea aproximadamente la misma y en una posición de funcionamiento adecuada esté en una región lineal del perfil de respuesta del sistema (de modo que un cambio en la intensidad de la luz reflejada desde las diversas zonas produzca un cambio directamente proporcional en la señal).

35 Después de realizar la calibración inicial, el dispositivo realiza una calibración adicional más fina. Esto implica tomar una medición ("valor de calibración") de la intensidad de la luz reflejada para cada zona mientras la tira de ensayo en las mediciones posteriores a sequedad ("valores de ensayo") se normalizan por referencia al valor de calibración para las zonas respectivas (es decir valor normalizado = valor de ensayo/valor de calibración).

40 Para realizar un ensayo, se pone en contacto una parte que recibe muestra de la tira de ensayo con la muestra líquida. En este caso de una muestra de orina por ejemplo, la parte que recibe muestra puede mantenerse en un chorro de orina, o una muestra de orina recogida en un receptáculo y la parte que recibe muestra se sumerge brevemente (aproximadamente 5-10 segundos) en la muestra. El muestreo puede realizarse mientras la tira de ensayo se inserta en el lector o, menos preferiblemente, la tira puede retirarse brevemente del lector para el muestreo y después se reintroduce en el lector. Las mediciones de la intensidad de la luz reflejada desde una o más (preferiblemente las tres) zonas comienza entonces, típicamente después de un intervalo programado específico después de la inserción de la tira de ensayo en el lector. De forma deseable, las mediciones se toman a intervalos regulares (por ejemplo, a intervalos entre 1-10 segundos, preferiblemente a intervalos entre 1-5 segundos). Las mediciones se hacen como una secuencia de muchas lecturas sobre cortos periodos de tiempo (10 milisegundos o menos), intercaladas zona por zona, minimizando de ese modo cualquier efecto debido a la variación de la intensidad de la luz ambiental que pueda penetrar en el interior de la carcasa del lector.

Referencias

55 Sorenson et al (1995) Human reproduction 10: 453-458
Kaplan et al (1965) Science 147: 751
Josimovich et al (1964) Am J. Obst & Gynec 88:867-879

60 SECUENCIA ID N° 1

ES 2 543 001 T3

10 20 30 40 50 60
MAPGSR^TSL^L LAFALL^LCLP^W LQEAGAV^QT^V PLSRLFD^HAM LQAHRAHQ^LA IDTYQEF^EET
70 80 90 100 110 120
YIPK^DQKYS^F LHDSQ^TSFC^F SDSIPT^PSN^M EETQ^QKS^NLE LLRIS^LLL^LIE SWLE^PVR^FLR
130 140 150 160 170 180
SMFAN^NL^VYD TSDS^DDDY^HLL KDLE^EGI^QTL MGR^LEDG^SRR TGQ^ILK^QTY^S KFD^TNS^HN^HD
190 200 210
ALL^KNY^GLL^LY CFR^KD^MD^KV^E TFL^RT^VQ^CR^S VEG^SCG^F

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Dr. Anatole Sebastian Menon-Johansson
Dr. Anatole Sebastian Menon-Johansson y Guy's and St Thomas's NHS Foundation Trust
- <120> Prueba de embarazo
- 10 <130> P8318.WOP
- <150> GB0820999.1
- <151> 17-11-2008
- 15 <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
- <211> 217
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 543 001 T3

Met Ala Pro Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Ala Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Ala Gly Ala Val Gln Thr Val Pro Leu
20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp His Ala Met Leu Gln Ala His Arg Ala His Gln
35 40 45

Leu Ala Ile Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Thr Tyr Ile Pro Lys
50 55 60

Asp Gln Lys Tyr Ser Phe Leu His Asp Ser Gln Thr Ser Phe Cys Phe
65 70 75 80

Ser Asp Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Met Glu Glu Thr Gln Gln Lys
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Glu Ser Trp
100 105 110

Leu Glu Pro Val Arg Phe Leu Arg Ser Met Phe Ala Asn Asn Leu Val
115 120 125

Tyr Asp Thr Ser Asp Ser Asp Asp Tyr His Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Arg Arg
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Leu Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165 170 175

His Asn His Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180 185 190

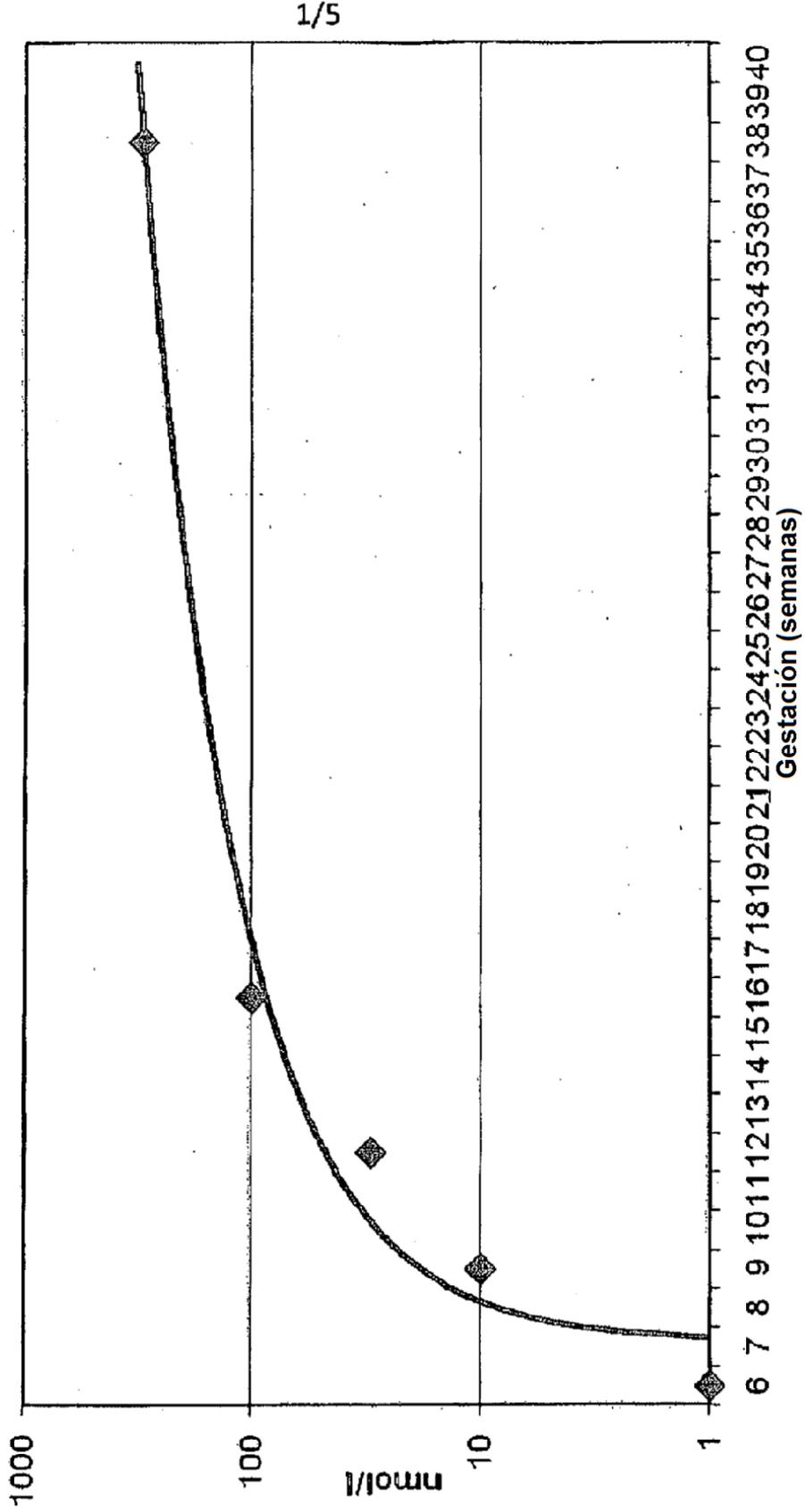
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Thr Val Gln Cys
195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210 215

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar la fase de un embarazo empleando un dispositivo manual adecuado para su venta al público, en el que el método comprende las etapas de cuantificar la cantidad de la hormona hPL o un fragmento detectable de la misma en una muestra de orina de una mujer, y establecer la fase del embarazo correspondiente a la misma.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que también incluye la etapa de cuantificar la cantidad de una segunda hormona.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la segunda hormona se selecciona entre hCG, estradiol no conjugado, relaxina o una combinación de los mismos.
- 15 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la cuantificación emplea detectar la presencia de la hormona u hormonas empleando uno o más anticuerpos específicos para cada hormona.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dispositivo es un dispositivo de flujo lateral.
- 20 6. Un dispositivo manual adecuado para su venta al público y adaptado para detectar los niveles/cantidad de hPL o un fragmento detectable de la misma en una muestra de orina de una mujer, para establecer la fase del embarazo.
7. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el dispositivo comprende una pantalla para presentar el resultado o los resultados de analizar una muestra.
- 25 8. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el dispositivo comprende una zona de ensayo en la que se acumula un reactivo marcado en presencia de hPL.
- 30 9. Un dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en el que el resultado se presenta como un número o intervalo en una ventana y la pantalla es digital.
10. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la detección de los niveles o cantidades de la hormona u hormonas emplea uno o más anticuerpos específicos para cada hormona.
- 35 11. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el dispositivo comprende reactivos para el análisis de hPL y hCG.
12. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que el dispositivo es un dispositivo de flujo lateral.
- 40 13. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que el dispositivo es desechable.
- 45 14. Uso de un anticuerpo anti-hPL en un dispositivo manual adecuado para su venta al público para determinar la fase del embarazo a partir de una muestra de orina.
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el anticuerpo anti-hPL es monoclonal.
- 50 16. Uso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en el que el anticuerpo anti-hPL se emplea en combinación con un anticuerpo seleccionado entre un anticuerpo anti-hCG, anti-relaxina y/o anti-estradiol no conjugado.

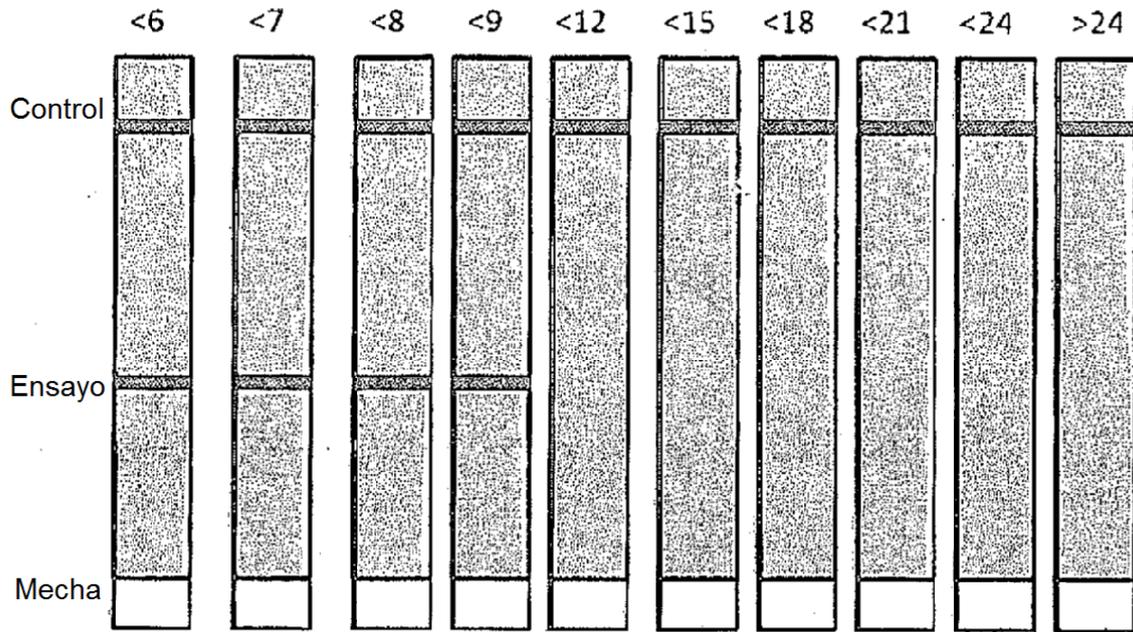
La concentración de HPL durante la gestación



6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Gestación (semanas)

2/5

FIGURA 2



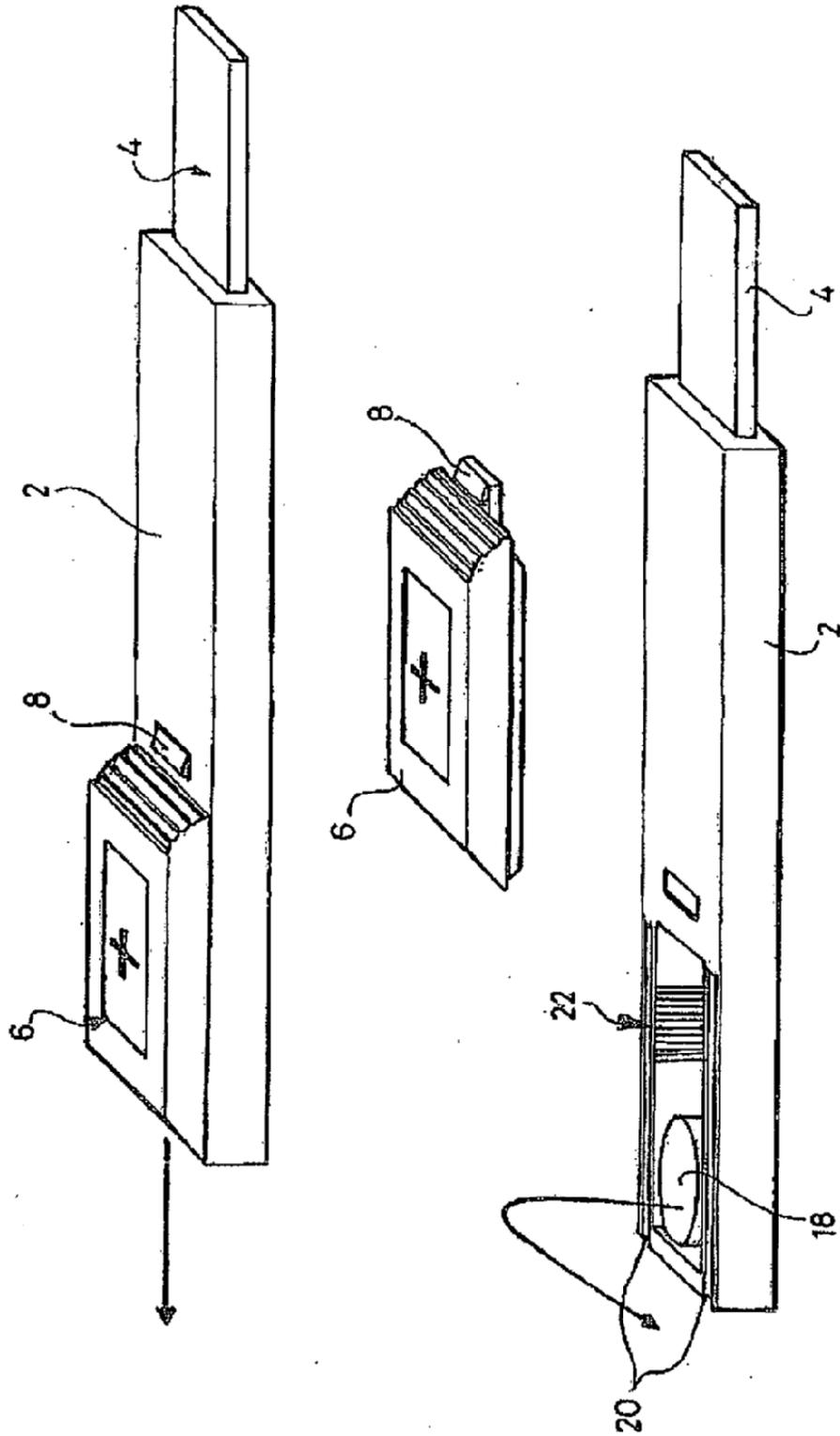


FIGURA 3

FIGURA 4

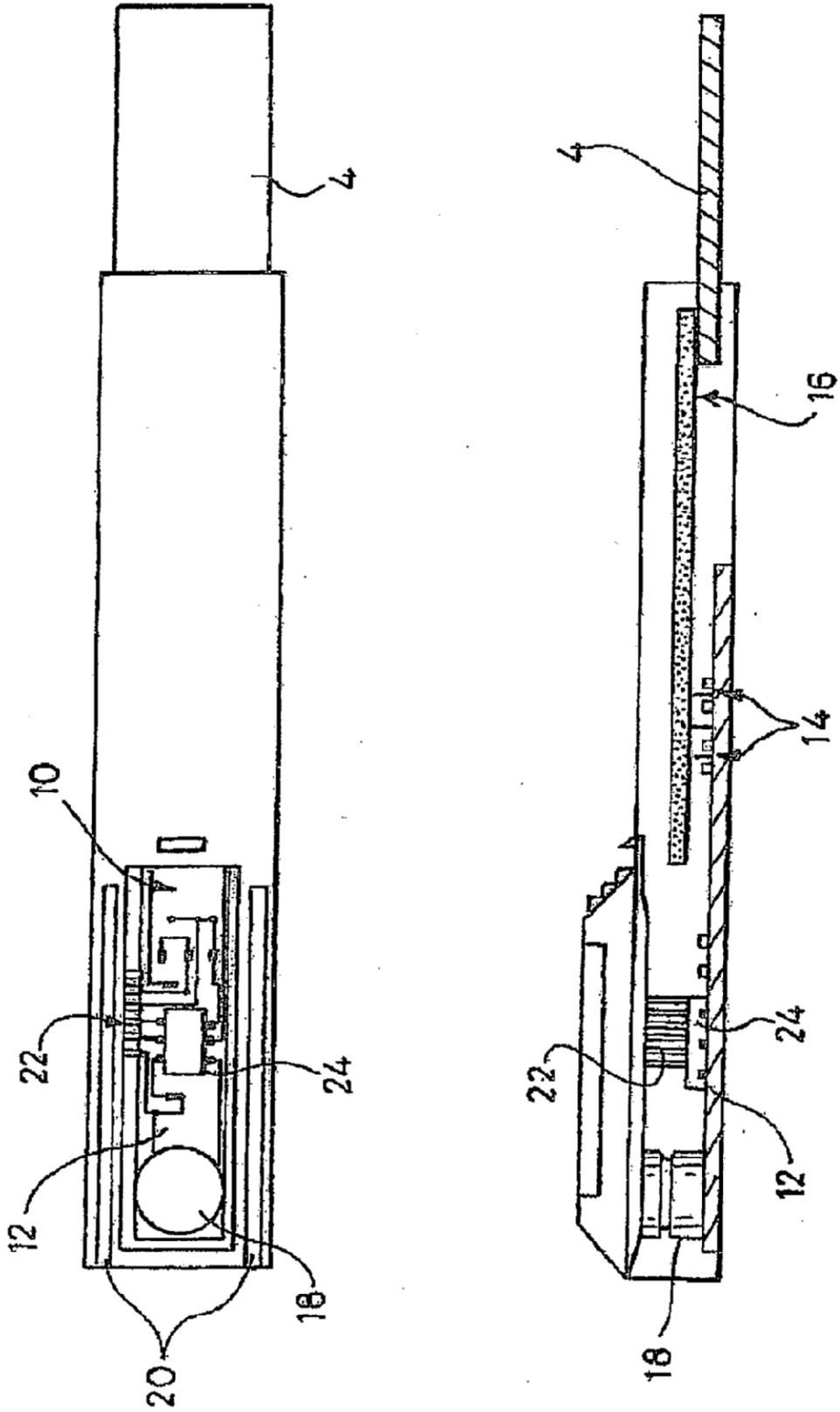


FIGURA 5

