

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 597**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014 PCT/IB2014/067057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15092726**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014 E 14828534 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 3084434**

54 Título: **Método para detectar células tumorales circulantes (CTCS)**

30 Prioridad:

**19.12.2013 IT RM20130700**

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

**25.06.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI UDINE (50.0%)**

**Via Palladio, 8**

**33100 Udine, IT y**

**STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCOLES, GIACINTO;**

**DEL BEN, FABIO;**

**TURETTA, MATTEO;**

**HUCK, WILHELM y**

**PIRUSKA, AIGARS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 673 597 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**

Método para detectar células tumorales circulantes (CTCS)

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para detectar células tumorales circulantes (CTC) en fluidos corporales, preferiblemente en sangre y linfa.

10 En particular, el método para detectar células tumorales circulantes en un fluido corporal comprende una etapa de detectar un cambio en el pH y/o en una concentración de al menos una molécula seleccionada de ácido láctico, iones lactato, protones dentro de un volumen aislado de dicho fluido corporal en donde se ha encapsulado una célula.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Actualmente, existe un acuerdo generalizado de que la posibilidad de detectar y contar las CTC puede conducir a información importante en el campo médico.

20 En particular, esta información puede usarse para definir un diagnóstico, un tratamiento y un sistema de monitorización de muchas formas de cáncer.

25 Algunos procedimientos conocidos para aislar y detectar las CTC de la sangre incluyen, por ejemplo, el uso de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos capaces de reconocer marcadores de superficie celular específicos. Ejemplos de tecnologías comerciales basadas en una interacción anticuerpos/marcadores de superficie incluyen el CellSearch System™ fabricado por Veridex.

30 Sin embargo, el uso de proteínas de superficie como dianas para aislar y detectar CTC adolece de diferentes problemas que son, por ejemplo, la falta de biomarcadores únicos en CTC, el aislamiento/detección exclusivos de las células epiteliales EpCAM+ y la imposibilidad de usar las celdas aisladas para un análisis posterior. Otros problemas vinculados a esta metodología son la baja velocidad (con CellSearch System™ solo se pueden realizar 8 análisis por día) y el alto coste (aproximadamente 350\$ por análisis de materiales solamente, 650\$ incluyendo asistencia técnica para realizar el análisis [Datos del Instituto Oncológico Veneto, Padua] debido al hecho de que se requieren anticuerpos purificados para el aislamiento/detección.

35 Otros métodos conocidos para detectar CTC usan propiedades físicas (tales como tamaño o dureza) para discriminar células tumorales de células no tumorales. Estos métodos, sin embargo, no han sido validados clínicamente.

40 Se pueden encontrar revisiones de la tecnología actual para detectar CTC en: " Circulating Tumour Cells: Liquid Biopsy of Cancer, C. Alix-Panabieres and K. Pantel, Clinical Chemistry 59: 1110-118 (2013); y " Techniques for Label-Free Separation of Circulating Tumour Cells: from Historical Foundations to Recent Developments ", C. Jin et al., Lab Chip, 2013, DOI: 10.1039/C3LC50625H.

45 Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar metodologías alternativas capaces de mejorar la detección de células tumorales circulantes, que permitan superar los inconvenientes de los métodos descritos en el estado de la técnica.

RESUMEN DE LA INVENCION

50 El problema técnico resuelto por la presente invención es proporcionar un método que permita detectar y aislar las CTC en un fluido corporal utilizando una metodología alternativa que permita superar los inconvenientes mencionados anteriormente.

55 La invención se basa en la observación de que la bioquímica de las células tumorales es diferente a la de las células normales. Más en particular, en condiciones aeróbicas, la mayoría de las células cancerosas muestran un fenómeno conocido como efecto Warburg (Koppenol, W.H., P.L. Bounds and C.V. Dang, Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nat Rev Cancer, 2011. 11(5): p.325-37), es decir, una alta tasa de glucólisis en el citosol con producción de lactato incluso en presencia de oxígeno, en comparación con células normales que tienen un índice bajo de glucólisis, oxidación de piruvato en las mitocondrias y ninguna producción de lactatos. Para evitar la acidificación del pH intracelular, el ácido producido glicolíticamente debe ser extrudido por células tumorales a través de varios transportadores de protones, como la V-ATPasa, el intercambiador de Na+/H+ (NHE), las anhidrasas carbónicas, el transportador de monocarboxilato unido a protones MCT, los intercambiadores de C1-/HCO3 y la ATP sintasa. El aumento de la actividad de estos transportadores provoca la inversión de los gradientes de pH intra-extracelulares normales, de modo que las células cancerosas producen una acidificación significativa del microambiente extracelular, a la vez que mantienen internamente un pH normal o ligeramente alcalino.

65

En un estudio relativamente reciente sobre el metabolismo de una línea celular tumoral, se demostró que las células tumorales individuales secretan hasta  $3.68 \times 10^{-13}$  moles de ácido por hora (DeBerardinis, R.J., et al., " Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis ", Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(49): p. 19345-50).

La secreción de ácidos por células tumorales raras en fluidos corporales como la sangre no se puede detectar directamente ya que los protones se diluyen extremadamente en el plasma. Aunque este cambio en el entorno extracelular no puede detectarse, los inventores han observado que cuando se aísla una célula tumoral en un volumen muy pequeño, pueden detectarse significativamente cambios en la composición química dentro de dicho volumen y como resultado de la diferente bioquímica de la célula tumoral.

Así, en un aspecto, la invención descrita en el presente documento se refiere a un método para detectar células tumorales circulantes como se define en la reivindicación 1.

Más en particular, el método para detectar células tumorales circulantes (CTC) en un fluido corporal comprende los siguientes pasos:

- encapsular una célula en un volumen de aproximadamente 10 pL a 10 nL de dicho fluido;
- incubar dicho volumen a una temperatura de 4°C a 37°C durante al menos 1 minuto;
- detectar un cambio en el pH y/o en una concentración de al menos una molécula seleccionada de ácido láctico, iones lactato, protones dentro de dicho volumen incubado,

en donde una disminución en dicho pH y/o un incremento en la concentración de dicha al menos una molécula, con respecto a un pH y/o una concentración que determina el mismo volumen antes de dicha etapa de incubación, indica la presencia de células tumorales circulantes en dicho fluido corporal.

Otras ventajas y características de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las mismas realizaciones de la invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1a y 1b muestran, respectivamente, un chip de microfluído y un dispositivo de detección de fluorescencia **para implementar una realización** de un método de acuerdo con la invención;

Las Figuras 2a y 2b muestran, respectivamente, una micrografía de fluorescencia de una emulsión (estacionaria) muy compacta en un dispositivo de microfluído y una sección transversal a través de una célula tumoral (A549) contenida dentro de una gotita dentro de un dispositivo de microfluído, que ilustra la fluorescencia de la gota; y

La Figura 3 muestra una comparación de la intensidad de fluorescencia de un tinte sensible al pH en gotas que contienen células tumorales (A549) y glóbulos blancos (PBMC), que muestran la intensidad de fluorescencia promedio por gota, dispersando datos a lo largo del eje X para visualizar mejor los puntos de datos.

Figura 4 - Ensayo enzimático de lactato fluorescente. La parte superior izquierda, una gotita más brillante, está rodeando a una célula cancerosa, la mayoría de las gotas están vacías, mientras que las dos gotitas que contienen las células a la derecha están rodeando PBMC (células mononucleares de sangre periférica). Téngase en cuenta que hay más de una PBMC presente en las gotitas, y esto no hace que la gota sea más brillante en comparación con las gotas con una sola célula cancerosa.

Las Figuras 5A-5D muestran la diferente distribución de células cancerosas y glóbulos blancos en un gráfico en donde se reporta la relación de emisión 580/630 (la relación más alta, el pH más bajo) en el eje y, y la anchura pico en el eje x. En particular, la figura 5A se refiere a glóbulos blancos; la figura 5B se refiere a células de cáncer de mama triple negativas; figura 5C a células de carcinoma metastásico de mama; figura 5D a células de adenocarcinoma colorrectal.

Las Figuras 6A-6B muestran la diferente distribución de células de cáncer de ovario circulantes y glóbulos blancos en un gráfico en donde se informa la relación de emisión 580/630 (la relación más alta, el pH más bajo) en el eje y.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere a un método y a un aparato para detectar células tumorales circulantes (CTC) en fluidos corporales.

Método para detectar células tumorales circulantes (CTC)

El método para detectar células tumorales circulantes en un fluido corporal, como ya se indicó anteriormente, comprende los siguientes pasos:

- encapsular una célula en un volumen de aproximadamente 10 pL a 10 nL de dicho fluido;
- incubar el volumen aislado a una temperatura de 4°C a 37°C durante al menos 1 minuto;
- detectar un cambio en el pH y/o en una concentración de al menos una molécula seleccionada de ácido láctico, iones lactato y protones dentro de dicho volumen incubado,

en donde una disminución en dicho pH y/o un incremento en la concentración de dicha al menos una molécula, con respecto a un pH y/o una concentración que determina el mismo volumen antes de dicha etapa de incubación, indica la presencia de células tumorales circulantes en dicho fluido corporal.

El método de la invención también puede comprender una etapa de dilución del volumen de fluido corporal con reguladores que contienen agua o sal.

En una realización preferida de la invención, el volumen aislado está en forma de una gota dentro de un dispositivo de microfluído basado en gotitas. En la presente descripción, la expresión "volumen aislado" y "volumen encapsulado" son intercambiables.

El dispositivo de microfluído para gotitas permite la manipulación de paquetes de fluido discretos en forma de gotas de picolitros y aborda la necesidad de menores costes, mayor rendimiento y mayor sensibilidad a la que pueden realizarse los ensayos. La técnica está bien adaptada para realizar operaciones y manipulaciones en serie, como la encapsulación y el cribado. En particular, el dispositivo de microfluído para gotitas permite filtrar gotitas individuales usando técnicas basadas en fluorescencia o espectrometría de masas, para distinguir las gotitas de otras gotitas, almacenarlas, reinyectarlas en otros dispositivos de microfluidos, fusionar gotitas con otras gotitas y cultivar células en gotitas. Por lo tanto, al encapsular todas las células, por ejemplo, de 1 mL a 10 mL de sangre en gotitas individuales, las CTC se pueden aislar fácilmente, proporcionando así aplicaciones de diagnóstico económicas y células individuales para estudios posteriores.

En particular, las gotitas pueden ser parte de una emulsión acuosa en un dispositivo de microfluído. En una realización, la gotita está en una emulsión de agua en aceite (emulsión W/O), pero en principio se puede emplear una doble emulsión. La emulsión se puede formar en chip o por separado. Dado que el efecto Warburg se produce principalmente en condiciones aeróbicas, puede ser ventajoso emplear como componente oleoso de la emulsión un aceite fluorado que ayuda a almacenar oxígeno disuelto. Además, se puede agregar un tensioactivo al aceite fluorado. Aceites fluorados adecuados como los descritos en el estado de la técnica tales como, por ejemplo, FC-77 y FC-40 de 3M™.

El método de la invención, como se indicó anteriormente, se lleva a cabo para detectar CTC en fluidos corporales. En una realización de la invención, dicho fluido corporal se selecciona del grupo que comprende sangre, suero, linfa, fluido pleural, fluido peritoneal, fluido cerebroespinal. En una realización preferida, el fluido corporal es sangre.

En el caso de sangre que puede contener aproximadamente  $4-11 \times 10^6$  de glóbulos blancos por ml y  $10^9$  glóbulos rojos, el método también puede comprender una etapa de eliminación de glóbulos rojos con el fin de acelerar el rendimiento.

El método de la invención también comprende una etapa de incubación del volumen aislado (encapsulado). Más en particular, la etapa de incubación puede llevarse a cabo a una temperatura desde una temperatura ambiente hasta 37°C.

El tiempo de incubación puede ser de al menos un minuto hasta 48 h. En particular, puede ser de al menos un minuto en el caso de detección de lactato o pH. Este tiempo puede variar con el ajuste de las condiciones (por ejemplo, los medios) en los que se administran las células.

La etapa de incubación puede llevarse a cabo en el chip o fuera del chip.

Un cálculo aproximado de la influencia de protones secretados (el ácido láctico se disocia parcialmente en agua en el anión lactato y  $H^+$ ) en un volumen de 100 pL muestra que incluso después de un corto período de incubación, el pH del volumen aislado disminuye. En particular, los inventores observaron que una secreción de  $H^+$  de aproximadamente  $3.68 \times 10^{-13}$  moles por 100 pL de volumen en 1 h daría como resultado un cambio de concentración de aproximadamente 3.68 mM, que si se comenzara con agua pura, daría lugar a una gota de pH de pH 7 hasta pH 2.4 después de 1 hora de incubación.

Como se mencionó previamente, de acuerdo con una realización del método descrito aquí, la presencia de CTC en un fluido corporal se puede mostrar detectando un cambio en el valor de pH dentro del volumen aislado después de

la etapa de incubación. Este cambio se puede detectar usando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia que sea adecuada para detectar un cambio en los valores de pH.

El cambio en los valores de pH puede determinarse mediante un indicador de pH.

El indicador de pH puede ser un tinte sensible al pH o un indicador que cambia su espectro de absorción/emisión a medida que cambia el pH. Ejemplos de estos indicadores son pHrodo™ Green (Life Technologies), que fluoresce verde a pH ácido, SNARF®-4F 5-(y-6) ácido carboxílico (Life Technologies), con una relación entre 580 nm y 640 nm de fluorescencia que aumenta a pH ácido y sal inorgánica sensible al pH, que se agrega para formar microcristales.

Además, el método también puede comprender una etapa de irradiación del volumen incubado mediante un láser en la longitud de onda de excitación del colorante con el fin de detectar la señal del indicador de pH. Puede apreciarse que, incluso en esta realización, el cambio en los valores de pH es función de la señal emitida después de la irradiación.

Como se indicó anteriormente, la detección de CTC también puede llevarse a cabo determinando la concentración de al menos una molécula seleccionada de ácido láctico, iones lactato y protones (el ácido láctico se disocia parcialmente en agua en el anión lactato y H<sup>+</sup>) dentro del volumen incubado. La concentración puede determinarse usando cualquier técnica conocida por la persona experta para tal fin. A manera de ejemplo, el ácido láctico puede determinarse mediante indicadores fluorescentes (kit de detección de lactato Fluoro de Cell Technology, Inc.).

Aún más, alternativamente, la detección puede basarse en las propiedades mecánicas de una gotita y/o en la detección de un cambio de viscosidad de los contenidos, en cuyo caso el indicador puede comprender un monómero que experimenta una polimerización inducida por pH. Dependiendo de la secreción (o absorción) monitorizada, también se pueden emplear otros indicadores.

El método también puede comprender una etapa de clasificación del volumen aislado que comprende las CTC detectadas para, por ejemplo, cultivar las células tumorales circulantes, o caracterizarlas desde un punto de vista genético o proteómico, o con fines de detección de fármacos.

#### Aparato para detectar células tumorales circulantes (CTC)

Se describe aquí también un aparato para detectar células tumorales circulantes (CTC).

En particular, el aparato para detectar células tumorales circulantes en un fluido corporal comprende:

- medios para encapsular una célula en un volumen de aproximadamente 10 pL a 10 nL;

- medios para detectar un cambio en el pH y/o en una concentración de al menos una molécula seleccionada de ácido láctico, iones lactato, protones dentro de dicho volumen incubado. En una realización de la invención, dicho medio para aislar el volumen es un dispositivo de microfluído basado en gotitas.

Como ya se ha descrito anteriormente con referencia al método, el volumen de una gota puede estar en el rango de pL a nL, por ejemplo, menos de 10 nL, 5 nL, 1 nL o 500 pL; un volumen preferido es, en realizaciones, del orden de 100 pL. En un dispositivo de microfluído, la dimensión máxima de un canal es preferiblemente menor que 1000, 500, 300, 200 o 100 micrómetros.

En una realización, la gota es una gota acuosa en una emulsión de agua en aceite (emulsión W/O) dentro del dispositivo de microfluído. La emulsión se puede formar en chip o por separado. Dado que el efecto Warburg se produce principalmente en condiciones aeróbicas, puede ser ventajoso emplear como componente oleoso de la emulsión un aceite fluorado que ayuda a almacenar oxígeno disuelto. Preferiblemente, se agrega un tensioactivo al aceite fluorado. Aceite fluorado adecuado como los descritos en el estado de la técnica tales como, por ejemplo, FC-77 y FC-40 de 3M™.

En una realización de la invención, dichos medios para detectar comprenden un colorante sensible al pH y/o un indicador que cambia su espectro de adsorción mientras cambia el pH. Ejemplos de estos indicadores son pHrodo™ Green (Life Technologies), que produce fluorescencia verde a pH ácido (Life Technologies), SNARF®-4F 5-(y-6) ácido carboxílico (Life Technologies), con una relación entre 580 nm y 630 nm de fluorescencia aumentando a pH ácido, y sal inorgánica sensible al pH que se agrega para formar microcristales.

En una realización de la invención, dichos medios para detectar pueden ser medios capaces de determinar la concentración de al menos una molécula seleccionada de ácido láctico, iones lactato, protones dentro de dicho volumen incubado (el ácido láctico se disocia parcialmente en agua en el anión lactato y H<sup>+</sup>) dentro del volumen incubado. A manera de ejemplo, el ácido láctico puede determinarse mediante indicadores fluorescentes (kit de detección de lactato Fluoro de Cell Technology, Inc.).

En una realización, los medios de detección también se pueden incluir directamente en las gotitas. La detección de cambios en los valores de pH dentro de la gota también puede realizarse pasando las gotitas a través de un canal en el dispositivo de microfluído que comprende un dispositivo sensor, por ejemplo, una disposición de detección fluorescente.

Además, el aparato puede comprender un láser capaz de emitir una longitud de onda en el intervalo de excitación del fluoróforo con el fin de detectar la señal del indicador de pH. Puede apreciarse que, incluso en esta realización, el cambio en los valores de pH es función de la señal emitida después de la irradiación. El aparato puede comprender un detector tal como un fotomultiplicador.

## EJEMPLOS EXPERIMENTALES

### 1. Materiales

PhRodo Green (Invitrogen Inc.), colorante sensible al pH, fluorescencia verde a pH ácido

Kit de detección de Fluoro lactato (Cell Technology, Inc.)

D-glucosa (Sigma-Aldrich)

HFE-7500 (3M Inc)

FC-40 (3M), aceite fluorado

Regulador PBS (solución salina regulada con fosfato)

Solución de NaCl al 0.9% en agua desionizada

Kit PDMS (polidimetilsilicona) (Dow Corning)

SNARF-5F o 4F (Invitrogen)

### 2. Soluciones

Fase oleosa: 2% (p/p) de SS01 en HFE-7500 (un disolvente hidrofluoroéter)

Solución madre de colorante: 1 mg/ml de pHrodo Green (Invitrogen Inc.) en agua DI (desionizada);

Solución madre de colorante: SNARF-5F o 4F 2 mM;

Solución madre de Glucosa: glucosa 0.5 M en agua DI;

Los reguladores de incubación para pHrodo Green: PBS y NaCl al 0.9% se mezclaron en relación volumétrica 1:3 y 1:5 (concentración de iones reguladores ( $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4$ ) aproximadamente 3 y 2 mM). Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de solución madre de glucosa y 20  $\mu\text{L}$  de solución madre de colorante por cada mL de la solución reguladora resultante (concentración final de glucosa 25 mM y 20  $\mu\text{g/ml}$  de pHrodo Green);

Regulador de incubación para SNARF-5F o 4F: HBSS, glucosa 10 mM, EMEM modificado de Joklik.

### 3. Células

Se cultivaron células A549 (carcinoma de pulmón humano, laboratorio Hubrecht) en DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco, un medio de cultivo) por 10 min a +10% de suero bovino fetal, se separaron usando 0.25% de tripsina-EDTA y se resuspendieron en el regulador de incubación.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por separación por gradiente de densidad Ficoll (marca registrada). Se toma una capa brillante de sangre completa con anticoagulante y se diluye aproximadamente 4.5x. Se agrega Ficoll debajo de la sangre y las células se centrifugan a temperatura ambiente durante 25 minutos a 800 g. La interfase se retira y se lava dos veces (10 min a 650 g, y 5 min a 550 g). Finalmente, las células se resuspenden en RPMI libre de suero (medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute).

### 4. Fabricación del dispositivo PDMS

Se usó fotolitografía para fabricar patrones para la replicación de PDMS. Se hiló una capa de SU8-2025 de 25  $\mu\text{m}$  de espesor en una oblea de silicio, se horneó, se expuso a través de una máscara de transparencia, se horneó de nuevo y se desarrolló. Se usaron las condiciones de procesamiento sugeridas por el fabricante para todo el proceso.

El prepolímero de PDMS y el agente de reticulación se mezclaron en una relación en masa de 10:1 (p/p); se vertió una mezcla en un patrón, se desgasificó y se curó a 65°C durante al menos 2 h.

5 La réplica se separó del patrón y los depósitos se taladraron usando una aguja hipodérmica roma. Una réplica de PDMS se lavó en agua jabonosa y etanol, y se secó por soplado con nitrógeno. Un portaobjetos de vidrio limpio y una réplica limpia de PDMS se trataron con plasma de oxígeno y se unieron. El dispositivo se silanizó con (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrooctilo)-1-triclorosilano al 1% en FC-40, que se introdujo en canales de microfluidos (suficiente para humedecer por completo la red de microfluidos y luego se guardó el dispositivo a 95°C durante al menos 30 min.

10

5. Detección

Observación de gotitas estáticas: se utilizó un microscopio de epifluorescencia invertida Olympus IX81 para mediciones de fluorescencia. El microscopio estaba equipado con la lámpara xCite 120Q (Lumen Dynamics Group Inc.), el conjunto de filtros y la cámara iXon 897 (Andor). Observación de las gotas que fluyen: Como se muestra en la Figura 1, se usa un microscopio invertido Olympus IX71 para analizar las gotas que fluyen una por una. Se expandió un rayo láser (Cube, Coherent Inc.) (~ 10x) y se enfocó hacia abajo en el medio del canal de detección. La señal de fluorescencia de las gotitas excitadas se detectó mediante un detector de PMT (H8249, Hamamatsu).

15

20 6. Detección de cambio de pH.

El valor de pH se evaluó por separado para células cancerosas y glóbulos blancos. En un experimento, se emulsionaron de 30 a 50 µL de suspensión celular en el regulador de incubación en un dispositivo de microflujo de unión en T (altura: 25 µm, los parámetros de fase continua y dispersión fueron 20 µm). La velocidad de flujo de la fase dispersa fue de 120 µL/h; la velocidad de flujo de la fase continua fue de 600 µL/h. La emulsión se recuperó en un vial de plástico y posteriormente se incubó a 37°C durante 1 h. Para la observación las gotitas a) se colocaron en un portaobjetos de microscopio o b) se inyectaron en un dispositivo de microflujo. La detección fue llevada a cabo por PhrodoGreen o SNARF-5F o 4F. El primero aumenta la fluorescencia cuando el pH es más bajo, los SNARF cambian su espectro de absorción cuando cambia el pH y más en particular, aumentan la fluorescencia a 580 nm y disminuyen la fluorescencia a 640 nm cuando el pH disminuye. En consecuencia, cuanto mayor sea la relación 580/630, menor será el pH. La fluorescencia se detecta usando un microscopio de epifluorescencia invertida.

25

30

Resultados

35 Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6 y en la tabla 1 a continuación.

En particular, como ya se indicó anteriormente, cuanto mayor sea la relación 580/630, más bajo es el pH. Las células cancerosas están en un rango de 7.4 a 6.4 mientras que los glóbulos blancos no están por debajo de un pH de 7.0

40

Tabla 1

Relación 580/630	Valor pH
1	7.4
1.5	7.0
2	6.8
2.5	6.6
3	6.4
3.5	6.2
4	6
4.5	5.8
5	5.6
5.5	5.22

Con referencia a las figuras 6A-6B, puede apreciarse que el umbral de  $x < 7$  e  $y > 1.5$  ofrece un 100% de especificidad en la detección de células cancerosas con respecto a las células sanguíneas.

45

7. Detección de la secreción de ácido láctico

5 La secreción de ácido láctico se evaluó usando suspensiones mixtas de células cancerosas (A549) y glóbulos blancos a partir de una solución lisada de glóbulos rojos. Se utilizó un circuito de microfluído de arquitectura de tres canales: un canal que lleva la suspensión celular, uno que lleva las enzimas para el ensayo de lactato y el otro que lleva la fase oleosa. La etapa de emulsificación se realizó a 4°C para detener el metabolismo celular y evitar la contaminación por lactato de toda la solución por las células cancerosas. Con este dispositivo de microfluído podríamos exponer las células a las enzimas del ensayo de lactato solo después de la encapsulación en las microgotas, para evitar la activación inespecífica antes de la encapsulación. Las imágenes se tomaron 15 minutos después de la emulsificación, a temperatura ambiente.

Resultados

15 La fluorescencia debida al cambio de pH en la célula que contiene gotitas se muestra en la Figura 2. Las gotitas que contienen una célula tumoral A549 se distinguen de las gotitas vacías. En un experimento separado, las PBMC se incubaron en presencia de glucosa. En la Figura 3 se muestra una comparación de A549 y PBMCs: las gotas vacías y las que contienen células se seleccionaron manualmente a partir de micrografías de fluorescencia, y las mediciones de las gotas vacías se incluyeron para la comparación de ambos experimentos. Ambos tipos de células muestran una disminución en el pH (aumento en la intensidad de fluorescencia), pero esto es sustancialmente más pronunciado en el caso de las células tumorales A549.

20 En el caso del ensayo de lactato, los resultados análogos se pueden ver en la figura 4.

25 Por lo tanto, puede apreciarse que las realizaciones del método descrito en este documento facilitan un método libre de anticuerpos para la detección y el conteo rápido de CTC. Las realizaciones del método objeto de la presente divulgación se pueden usar para pronóstico, monitorización de la terapia y aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, el método puede emplearse para la estratificación y/o la monitorización en tiempo real de terapias, así como para estimar el riesgo de recaída metastásica y/o progresión metastásica.

30 La presente invención se ha descrito hasta ahora con referencia a realizaciones preferidas. Se pretende que pueda haber otras realizaciones que se refieran al mismo núcleo de la invención, cayendo todas dentro de la protección de las reivindicaciones expuestas a continuación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar células tumorales circulantes en un fluido corporal que comprende los siguientes pasos:
- 5 - encapsular una célula en un volumen de aproximadamente 10 pL a 10 nL de dicho fluido;
- incubar dicho volumen a una temperatura de 4°C a 37°C durante al menos 1 minuto;
- 10 - detectar un cambio en el pH y/o en una concentración de al menos una molécula seleccionada entre ácido láctico, iones lactato y protones dentro de dicho volumen incubado, en donde una disminución en dicho pH y/o un incremento en la concentración de dicha al menos una molécula, con respecto a un pH y/o una concentración que determina el mismo volumen antes de dicha etapa de incubación, indica la presencia de células tumorales circulantes en dicho fluido corporal.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho volumen está en forma de una gota dentro de un dispositivo de microfluído basado en gotitas.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha gota es una gota acuosa en una emulsión W/O.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el componente oleoso de dicha emulsión es un aceite fluorado, preferiblemente con la adición de un tensioactivo.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además una etapa de dilución de dicho volumen con reguladores que contienen agua o sal.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho fluido corporal se selecciona del grupo que comprende sangre, suero, linfa, fluido pleural, fluido peritoneal, fluido cerebroespinal.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho cambio de pH se detecta usando un indicador de pH.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho indicador de pH es un colorante sensible al pH o un indicador que cambia su espectro de adsorción/emisión a medida que cambia el pH.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que comprende además una etapa de irradiar dicho volumen incubado mediante un láser que emite longitudes de onda visibles; siendo dicho cambio función de una señal emitida de dicho volumen irradiado.
- 40 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicha etapa de incubación se lleva a cabo a una temperatura de 4°C a 37°C y durante un tiempo de incubación de al menos 1 minuto.

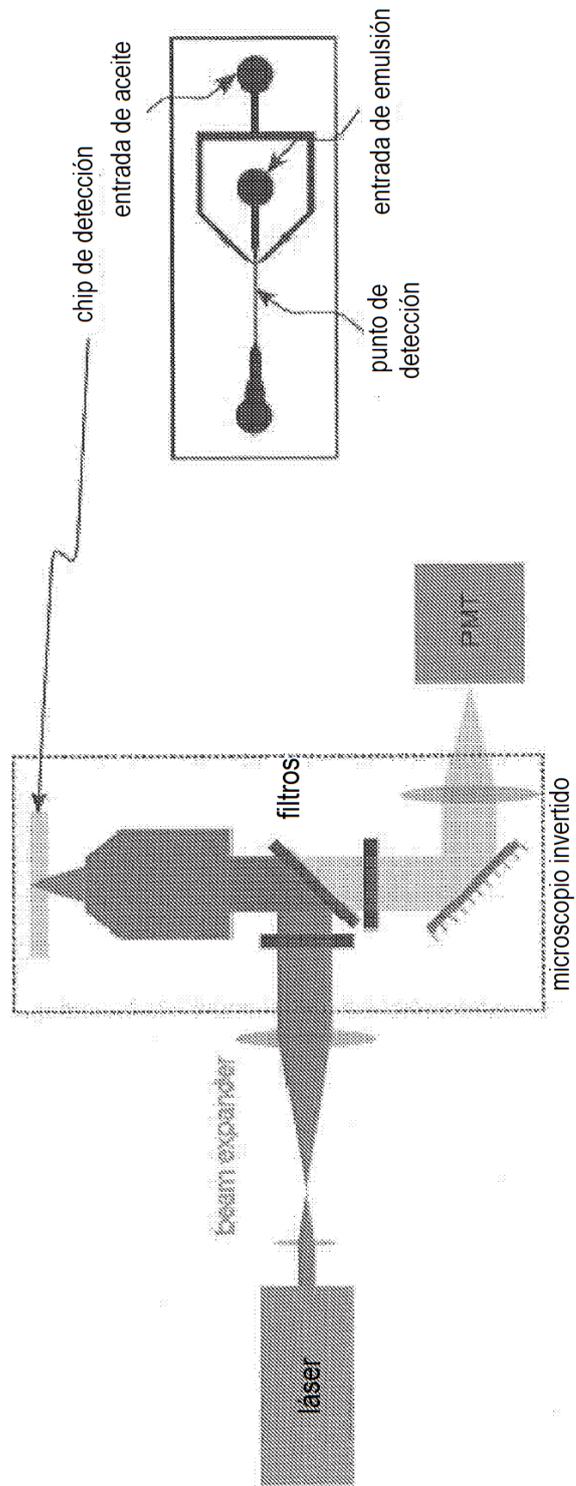


Figura 1b

Figura 1a

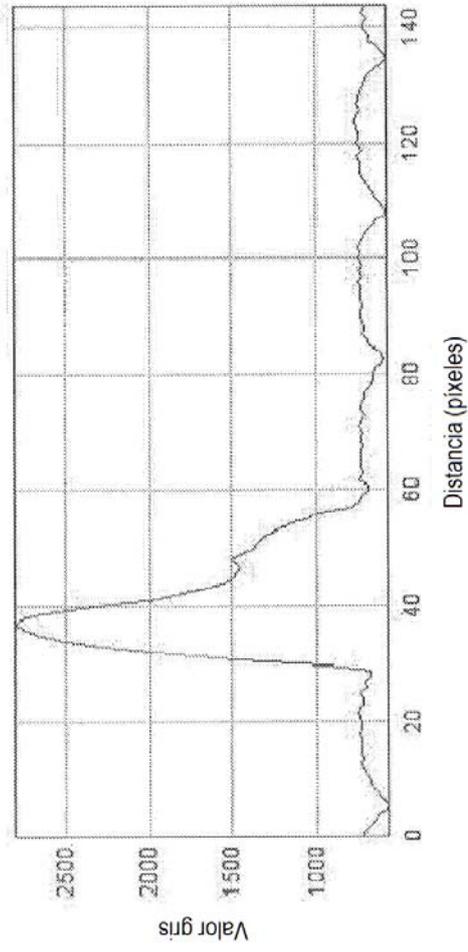


Figura 2a

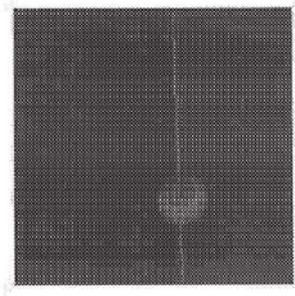


Figura 2b

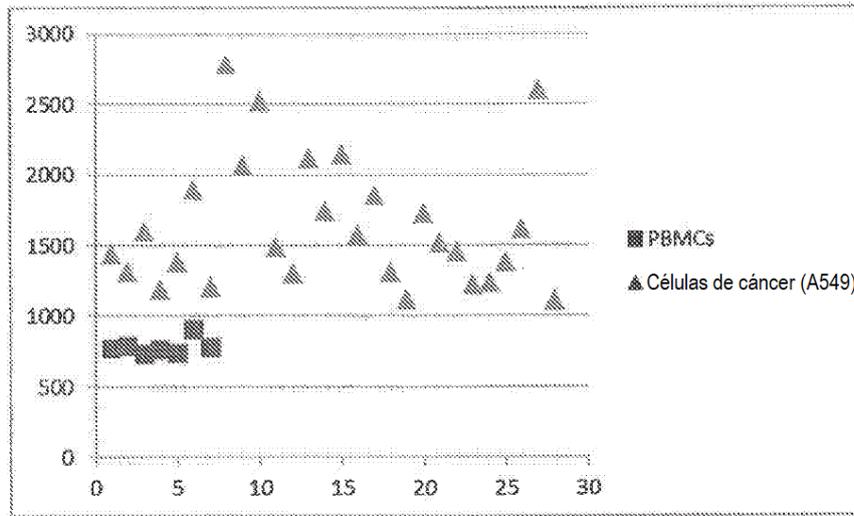


Figura 3

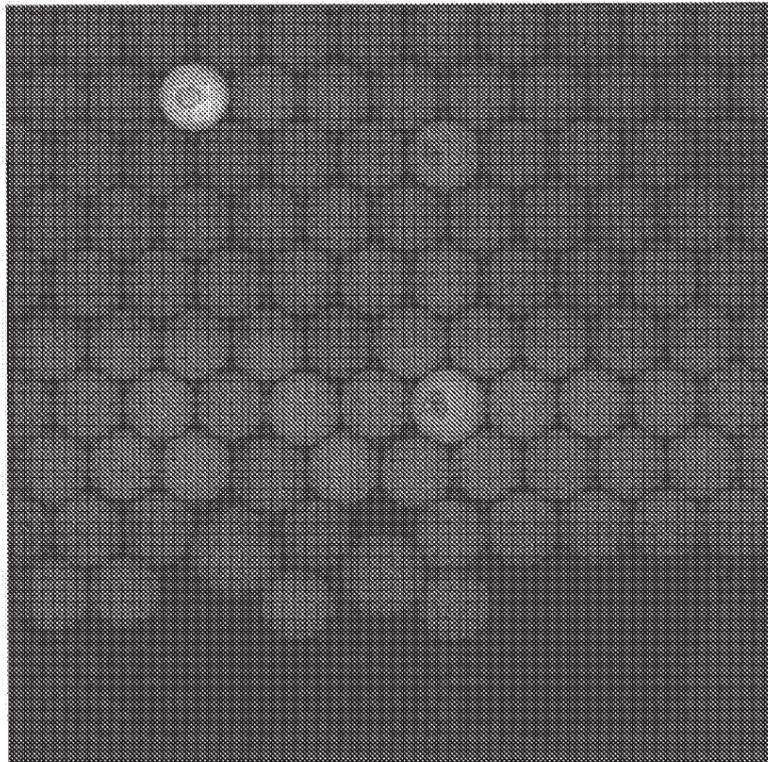


Figura 4

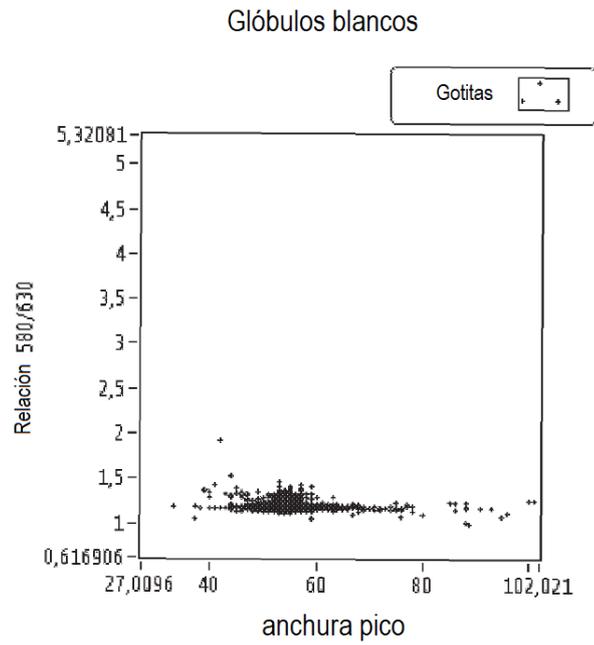


Figura 5A

MDA-MB-231  
(células de cáncer de mama triple negativas)

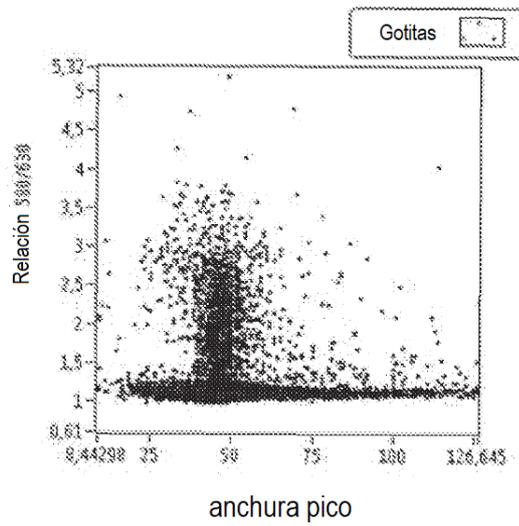


Figura 5B

Carcinoma metastásico de mama

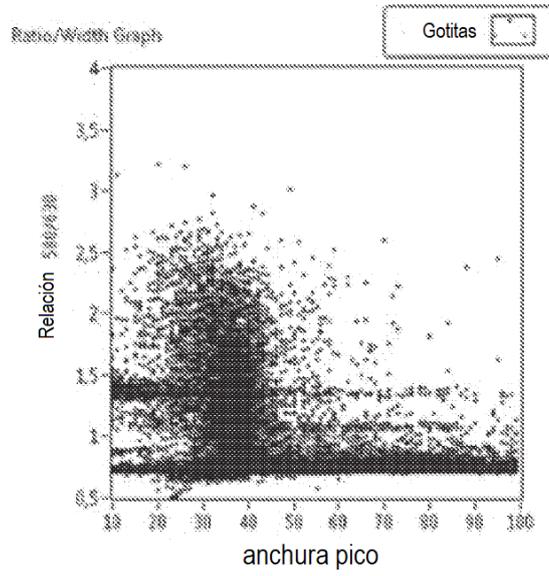


Figura 5C

Adenocarcinoma colorrectal

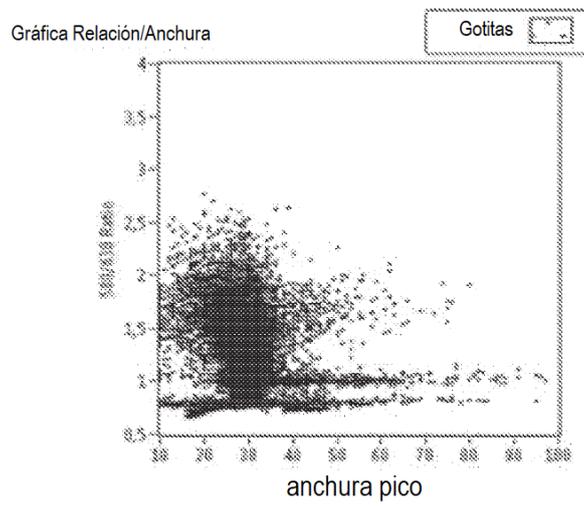


Figura 5D

Glóbulos blancos

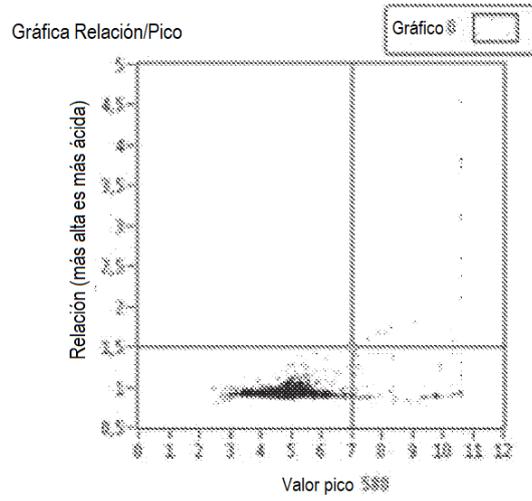


Figura 6A

Línea celular de cáncer de ovario

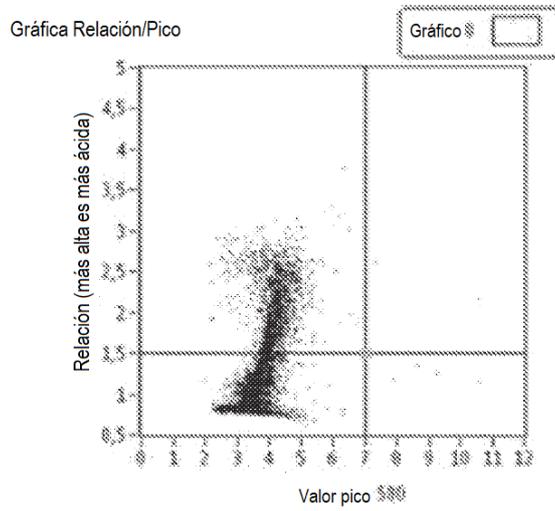


Figura 6B