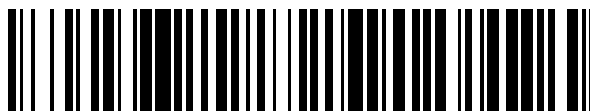


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 001**

51 Int. Cl.:

G01N 21/05 (2006.01)

G01N 21/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2011** **PCT/US2011/051220**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012** **WO12034120**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2011** **E 11824237 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 2614136**

54 Título: **Sistema de flujo de fase múltiple para detectar y aislar sustancias**

30 Prioridad:

10.09.2010 US 381809 P
08.09.2011 US 201113228428

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2019

73 Titular/es:

CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI
(100.0%)
340A Christopher S. Bond Life Sciences Center
1201 East Rollins Road
Columbia MO 65211, US

72 Inventor/es:

O'BRIEN, CHRISTINE, MARY;
GUPTA, SAGAR, K.;
VIATOR, JOHN, ANDREW;
SENGUPTA, SHRAMIK;
MOSLEY, JEFF y
ROOD, KYLE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 710 001 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

Sistema de flujo de fase múltiple para detectar y aislar sustancias

Antecedentes de la invención

El melanoma es la forma más mortal de cáncer de piel. Aunque el melanoma tiene una tasa de mortalidad relativamente baja en comparación con otros tipos de cáncer, ya que generalmente es fácil de ver en la piel y se puede extirpar fácilmente, rápidamente se vuelve mortal si el tumor superficial hace metástasis en otras partes del cuerpo. En metástasis, las células de melanoma circulantes (CMC, por sus siglas en inglés), las células que se han desprendido del sitio del tumor original y se mueven a través de la sangre o el sistema linfático, pueden plantarse en otros lugares y crear tumores secundarios que luego son la causa del melanoma terminal. En consecuencia, el diagnóstico temprano probablemente será la cura para el cáncer, ya que los tratamientos tienen mayores posibilidades de éxito porque el cáncer aún no se ha manifestado completamente.

Además, se prevé que en 2010 más de 68 000 estadounidenses serán diagnosticados con la enfermedad y más de 8000 pacientes con melanoma morirán a causa de la enfermedad. Sin embargo, el melanoma se puede curar fácilmente si se detecta temprano y se elimina rápidamente de la piel; sin embargo, si hace metástasis, el cáncer puede llegar a ser letal. Teniendo en cuenta que un tumor de 1 mm de diámetro generalmente consiste en un millón de células, los tumores más grandes y visibles generalmente pueden consistir en miles de millones de células. Dicho esto, un paciente diagnosticado de un tumor grande tendrá opciones reducidas y necesitará un tratamiento más exigente físicamente que un paciente diagnosticado antes de que puedan formarse tumores secundarios. Desafortunadamente, los pacientes actualmente deben esperar meses para saber si el tumor del melanoma superficial se ha diseminado, debido a que los métodos actuales para diagnosticar el cáncer metastásico son a través de técnicas de generación de imágenes, que requieren la presencia de un tumor metastásico visible. En consecuencia, los pacientes a menudo son diagnosticados demasiado tarde.

Los métodos actuales para diagnosticar el cáncer metastásico incluyen biopsias de ganglios linfáticos y técnicas de generación de imágenes. Sin embargo, las biopsias de ganglios linfáticos pueden producir falsos negativos si el cáncer no interactúa con el sistema linfático y no se puede realizar varias veces para la monitorización de la enfermedad. Dicho esto, las células tumorales circulantes pueden ser una excelente fuente de información para el diagnóstico y la monitorización del melanoma metastásico y otras enfermedades patológicas si pueden detectarse en el sistema linfático o el torrente sanguíneo. Por esa razón, se están investigando muchas técnicas para detectar y aislar estas células con fines de diagnóstico y monitorización de enfermedades. Ya se han realizado algunas investigaciones para encontrar CMC, incluyendo RT-PCR, inmunohistoquímica, clasificación magnética de células, tecnologías de escaneo con matrices de fibra óptica y microfiltros; sin embargo, las altas tasas de falsos negativos, la marcación y los procedimientos prolongados limitan las posibilidades de implementación clínica.

Desafortunadamente, los métodos actuales utilizados para diagnosticar la enfermedad metastásica no son sensibles a las células metastásicas individuales. Los pacientes deben esperar hasta que se formen tumores secundarios antes de poder diagnosticarlos y comenzar un tratamiento que les salve la vida.

El documento WO2008/008402 describe la detección de células tumorales circulantes (CTC) utilizando análisis fotoacústico junto con una celda de flujo.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describe en detalle a continuación con referencia a las Figuras de dibujos adjuntas, en donde:

La FIGURA 1 es una vista en perspectiva de un sistema de flujo de múltiples fases para aislar sustancias de acuerdo con una realización de la invención;

La FIGURA 2A es una vista ampliada de una conexión de un sistema de flujo de fase múltiple con la parte superior del cuerpo retirada para exponer el canal y los fluidos de acuerdo con una realización de la invención;

La FIGURA 2B es una vista ampliada de una conexión de un sistema de flujo de fase múltiple que incluye la parte superior del cuerpo retirada para exponer el canal, los fluidos y la guía de onda óptica de acuerdo con una realización de la invención;

Las FIGURAS 3A y 3B son vistas ampliadas de un tubo que contiene dos fluidos, donde la cantidad de cada fluido alterno varía de acuerdo con las realizaciones de la invención;

La FIGURA 4 es una vista en perspectiva ampliada de una cámara de detección de un sistema de flujo de fase múltiple de acuerdo con una realización de la invención;

Las FIGURAS 5A-5F son vistas gráficas de amplitudes fotoacústicas de varias muestras en concordancia con realizaciones de la invención.

La FIGURA 6 es una vista gráfica de una amplitud fotoacústica de una muestra de glóbulos blancos irradiados, con una gota aislada de la suspensión celular que muestra un glóbulo blanco, de acuerdo con realizaciones de la invención; y

- 5 La FIGURA 7 es una vista gráfica de una amplitud fotoacústica de una muestra de células de melanoma irradiadas entre glóbulos blancos, con una gota aislada de la suspensión de células que muestra la presencia de células de melanoma pigmentadas, de acuerdo con realizaciones de la invención.

Descripción detallada de la invención

- 10 Las realizaciones de la presente invención se dirigen a un método sin etiqueta para detectar el melanoma in vitro en combinación con un método de aislamiento que es simple, tiene un margen de error bajo y es efectivo. Las células de melanoma metastásico se detectan y luego se aíslan de una muestra de paciente, tal como una muestra de sangre centrifugada. El aislamiento de las células del melanoma ayudará no solo en el diagnóstico temprano del paciente, sino que existe una correlación positiva entre la cantidad de células tumorales circulantes presentes en la sangre y el pronóstico del paciente. La detección de células de melanoma circulantes, células que se han desprendido del sitio del tumor original y se mueven a través de la sangre o el sistema linfático, pueden ser herramientas de diagnóstico y
- 15 monitoreo del cáncer. La capacidad de aislar y contar células de melanoma podría usarse para monitorear las terapias de pacientes con cáncer; los recuentos celulares altos indican un pronóstico grave, mientras que los recuentos celulares bajos indican que el tratamiento está funcionando bien.

- 20 La detección del melanoma metastásico en la sangre es imperativa porque elimina la pérdida de tiempo para los pacientes con cáncer. Usando realizaciones de la presente invención, los pacientes pueden tener una muestra de sangre simple escaneada en busca de cáncer con la frecuencia que se desee, en lugar de esperar meses para ver si un tumor es visible en una exploración. Estos meses se podrían haber pasado brindando a los pacientes terapias para salvar vidas, en lugar de esperar a ver si el cáncer se ha diseminado, o monitorizar si las terapias actuales están funcionando.

- 25 Las realizaciones de la presente invención hacen disminuir el error potencial involucrado con un sistema de flujo normal y permiten el aislamiento preliminar del melanoma metastásico de la muestra del paciente. En una realización, el detector incluye un láser, un transductor y un osciloscopio.

- Habiendo descrito brevemente una visión general de las realizaciones de la presente invención, se describen Figuras de ejemplo que representan realizaciones de la presente invención con el fin de proporcionar un contexto general para diversos aspectos de la presente invención. Con referencia a las Figuras 1-4 en particular, donde los números de
- 30 referencia iguales identifican elementos similares en las distintas vistas, se ilustra un sistema 10 de flujo de fase múltiple de ejemplo. El sistema 10 de flujo de fase múltiple generalmente incluye una primera bomba 12, una segunda bomba 14, un primer tubo 24 de fluido, un segundo tubo 26 de fluido, un conector 28, un tubo 30 de fluido múltiple y un detector 32 de sustancias. Aunque se describe con dos bombas, se apreciará que el sistema 10 de flujo de fase múltiple puede incluir cualquier número de bombas. La primera bomba 12 y la segunda bomba 14 se representan en
- 35 la FIGURA 1 como bombas de jeringa. Sin embargo, se apreciará que cualquier tipo de dispositivo que se use para el movimiento de fluidos puede ser utilizado como una bomba. El caudal del sistema de flujo de fase múltiple utilizado varía de 0 a 1000 $\mu\text{L/s}$. En realizaciones adicionales, el movimiento de fluidos a través del sistema de flujo de múltiples fases se basa en la presión que conduce el flujo del fluido respectivo a través del sistema. Por ejemplo, el uno o más fluidos pueden estar fluyendo a través del sistema de flujo de múltiples fases con base en la gravedad, dando como
- 40 resultado una cabeza de elevación para el fluido.

Con referencia a la Figura 2, los tubos 24, 26 y 30 son un objeto largo, hueco y típicamente cilíndrico, utilizado para el paso de fluidos. En una realización, los tubos 24, 26 y 30 son tubos de silicona.

- Haciendo referencia brevemente a la Figura 4, la cámara 33 de flujo dentro de la cámara 38 de detección está hecha de gel de acrilamida en forma redondeada un cable u otro tubo. Se permite que el gel de acrilamida se endurezca o
- 45 se solidifique y el alambre se retira para crear un canal, como la cámara 33 de flujo definida por una pared interna, para que el fluido fluya cuando está dentro de la cámara 38 de detección. Se apreciará que se puede usar una variedad de otros métodos y materiales para crear la cámara 33 de flujo, para que fluya el fluido. En realizaciones, la cámara 33 de flujo está hecha de un material que tiene una impedancia acústica cercana a la impedancia acústica del agua. El sistema 10 de flujo de fase múltiple tiene un diámetro de flujo interno de la cámara 33 de flujo de aproximadamente
- 50 0-10 mm de diámetro. La acrilamida se utiliza como un camino acústico desde la célula excitada hasta el sensor acústico.

- Con referencia a las Figuras 1 y 2, un primer fluido 20 y un segundo fluido 22 se alimentan desde sus respectivos tubos 24 y 26 al tubo 30 de fluido común utilizando un conector 28. Un fluido es cualquier estado de materia la cual puede fluir con relativa facilidad y tiende a asumir la forma de su envase y puede incluir un líquido, gas o plasma. En
- 55 esta realización, el primer fluido 20 es diferente del segundo fluido 22 y es inmiscible y/o crea burbujas con el segundo fluido 22. Por ejemplo, el primer fluido 20 puede ser aire, mientras que el segundo fluido 22 es agua u otro fluido que crea burbujas de gas del primer fluido 20 dentro del segundo fluido 22. En otro ejemplo, el primer fluido 20 es aceite, mientras que el segundo fluido 22 es agua o líquido hidrófilo. Mientras que las Figuras 1 y 2 se representan con un

primer y segundo fluido, se apreciará que puede utilizarse cualquier número de múltiples fluidos diferentes en realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, un tercer fluido puede fluir hacia el tubo 30 de fluido común a través del conector 28.

El primer fluido 20 y el segundo fluido 22 se alimentan a un tubo 30 de fluido común utilizando un conector 28. El tubo 30 de fluido común es un canal común para que los fluidos fluyan. El conector 28 representado en las Figuras 1 y 2 es un conector en Y. Se apreciará que el conector puede tener cualquier forma, incluido un conector en Y o un conector en T que permita que el primer fluido 20 y el segundo fluido 22 sean forzados juntos en una única trayectoria de flujo sin mezclarse entre sí. En una realización, el sistema de flujo de fase múltiple puede usar tres fluidos, dos de los cuales se mezclan en el tubo 30 de fluido común mientras se mantienen separados del tercer fluido. Por ejemplo, si los tres fluidos son agua, alginato y aire, el agua y el alginato se pueden mezclar para formar un compartimiento discreto de gel y este permanece separado del compartimiento discreto de aire. En otras formas de realización, en lugar de dos tubos que se juntan en un tubo común, se puede crear un flujo de múltiples fases en base a múltiples tubos que se juntan en el tubo 30 de fluido común.

El primer fluido 20 y el segundo fluido 22 esencialmente se turnan para ingresar al tubo 30 de fluido común debido a la inmiscibilidad (por ejemplo, aceite y agua) y/o la creación de burbujas de gas (por ejemplo, aire y agua) de los dos fluidos. En una realización, la inmiscibilidad se debe a la hidrofobicidad del primer fluido (tal como aceite) y la hidrofiliidad del segundo fluido (tal como fluido soluble en agua). Cuando el primer fluido 20 entra en el tubo 30 de fluido común, el segundo fluido 22 acumula presión hasta que el primer fluido 20 deja de fluir y el segundo fluido 22 tiene su turno para fluir. Esto crea compartimentos discretos alternos del primer fluido 20 y segundo fluido 22 respectivamente. Al introducir dos fluidos a través de un conector, como una unión en T en una sola vía de flujo, una sustancia se compartimenta. Esto es ideal porque el compartimento discreto exacto de un primer fluido o segundo fluido en donde se encuentra la sustancia que se va que se va que se va a detectar se puede identificar y extraer fácilmente. Se apreciará que los compartimentos discretos del primer fluido 20 y el segundo fluido 22 como se muestra en las Figuras 3A y 3B pueden variar en tamaño dependiendo del diámetro del tubo 30 de fluido común y la velocidad de flujo de los fluidos puede ser de 0-1 ml/s de tamaño. Además, se pueden utilizar más de dos fluidos y los fluidos biológicos de múltiples pacientes también se pueden usar y separar en compartimentos discretos alternos.

En realizaciones, el primer fluido 20 es un fluido separador tal como aire, gas y/o aceite para crear compartimentos discretos del segundo fluido 22. El segundo fluido 22 puede incluir cualquier tipo de fluido que incluya una sustancia que se va a detectar. En una realización, el segundo fluido 22 puede ser cualquier tipo de fluido que contenga un material o sustancia biológica, como células cancerosas (cáncer de mama, melanoma, cáncer de próstata y similares), tejidos, células, patógenos, microorganismos (como la malaria), enfermedades infecciosas, pigmentos, sustancias no absorbentes ópticamente con inducción de color (por ejemplo, tintes agregados a células cancerosas no coloreadas o nanopartículas de oro agregadas a las células), compuestos, sustancias no biológicas y/o cuerpos extraños de una muestra biológica de un individuo, incluidos pero no limitándose a, sangre, saliva, orina, materia fecal, suero, plasma, tejido y fluido espinal. En otra realización, el segundo fluido 22 es un fluido no biológico que contiene sustancias biológicas o no biológicas tales como la detección de plomo (sustancia) en agua (segundo fluido). Como se describirá con más detalle a continuación, en una realización, el segundo fluido 22 es una solución de glóbulos blancos centrifugada de un individuo la cual puede o no contener células de melanoma. En una realización, se toman muestras de sangre completa de pacientes con melanoma y se centrifugan, dejando cualquier melanoma en una suspensión de glóbulos blancos.

Los compartimentos discretos alternos del primer fluido 20 y el segundo fluido 22 fluyen a través del tubo 30 común hacia la cámara 33 de flujo dentro de la cámara 38 de detección del detector 32. Con referencia a las Figuras 1 y 4, el generador 34 es una fuente de láser fotoacústico. La cámara 38 de detección incluye una pared 36 interna que define un interior abierto de la cámara 38 de detección. La fuente 34 de láser incluye un láser 40 y un pulsador 42. Aunque la fuente 34 de láser está representada como un detector fotoacústico, se apreciará que el generador 34 puede incluir cualquier variedad de dispositivos de excitación y/o mecanismos para convertir energía en algo que pueda procesarse aún más para obtener información que incluya radiación, láser, agentes químicos, semiconductores eléctricos, fluorescencia, ondas de radio, magnéticas, tomografía, termografía y detección por ultrasonido.

En una realización, un detector fotoacústico puede detectar o determinar si un fluido contiene o no sustancias que tienen pigmento como el melanoma metastásico que contiene inherentemente melanina, un gránulo pigmentado pequeño. Cuando un componente individual discreto de fluido pasa a través de la cámara 33 de flujo, es irradiado por la fuente 34 de láser fotoacústico con un rápido pulso de luz. Se apreciará que la luz láser puede dirigirse transversalmente al flujo o a lo largo del eje del flujo usando una guía de onda óptica como se describe con respecto a la FIGURA 2B. Cuando el melanoma se irradia con un pulso rápido de luz láser intensa, la melanina experimenta una expansión termoelástica. Por lo tanto, si el componente discreto que pasa a través de la cámara 33 contiene melanoma, la melanina en el melanoma sufre una expansión termoelástica y, en última instancia, crea una onda fotoacústica. Las células de melanoma irradiadas producen ondas fotoacústicas que se detectan con un transductor piezoeléctrico, mientras que los glóbulos blancos no generan señales porque son ópticamente transparentes. Se apreciará que se puede usar un detector para determinar si un fluido que pasa a través del detector en un sistema de flujo de fase múltiple contiene o no una sustancia particular.

En esta realización, como se muestra y se explica con más detalle a continuación con respecto a las Figuras 5A a 5F, el volumen de irradiación para cada compartimento discreto que se ha irradiado con luz láser intensa puede comunicarse desde un sensor acústico (u otro tipo de sensor) dentro de la cámara 33 de flujo a través de la conexión 50 al dispositivo 52 de visualización de ordenador u otro dispositivo de salida. El volumen de irradiación para el compartimento discreto se muestra en el dispositivo 52 de visualización y se muestra y describe con más detalle a continuación con respecto a las FIGURAS 5A-5F. Las visualizaciones gráficas del volumen de irradiación incluyen un espectrómetro antes del punto de irradiación para garantizar que el medio esperado esté produciendo señales. El uso de los volúmenes de irradiación puede permitir el aislamiento de una sola célula de melanoma, ya que cuando se detecta una célula de melanoma, se puede ver visualmente en qué compartimento discreto de fluido residen las células de melanoma.

Se pueden extraer compartimentos discretos específicos detectados para contener la sustancia que se está analizando, como las células de melanoma. Con referencia a la Figura 1, se puede usar un contenedor 48 de recolección para recolectar el compartimento discreto de la salida 46 del tubo. Se apreciará que a la vez que la recolección del compartimento discreto de fluido identificado porque contiene la sustancia que se está probando, se representa de la manera en que se realiza manualmente en contenedor 48 de recolección en la Figura 1, se puede usar cualquier variedad de mecanismos de recolección, automática o manual, para recolectar el compartimento discreto. Además, se pueden usar recipientes separados alternativos (que no se muestran) para recolectar otros compartimentos discretos que no han resultado positivos para la sustancia que se está analizando. Los volúmenes de fluido que contienen sustancias, como las células de melanoma, pueden ser secuestrados por burbujas, lo que permite el aislamiento de pequeños volúmenes de líquido. Considerando que, utilizando un flujo continuo sin burbujas es difícil determinar qué volumen de líquido se debe recolectar, los compartimentos discretos recolectados de fluidos se pueden enviar para una variedad de pruebas o se pueden diluir más.

El compartimento discreto extraído se puede diluir y volver a pasar a través del sistema 10 y repetir hasta que cada volumen de extracción separado del segundo fluido 22 contenga una única célula de melanoma y no glóbulos blancos. Como tal, el análisis de las muestras puede realizarse de forma iterativa hasta que se detecte y/o aísle una concentración deseada de una sustancia deseada. En una realización, cada iteración de la separación repetida reduce la concentración de partículas no deseadas (como los glóbulos blancos) por un factor particular de dilución. Por ejemplo, un compartimento discreto que demuestra un efecto fotoacústico (lo que indica que el compartimento discreto contiene una célula de melanoma) se puede diluir y volver a pasar a través del sistema 10 de forma iterativa hasta que la célula de melanoma deseada se aísle de otras partículas no deseadas. La célula de melanoma aislada (u otra partícula deseada) puede analizarse para realizar pruebas particulares, como pruebas de expresión génica, PCR y similares.

En realizaciones, la pigmentación se detecta debido a la expansión termoelástica fotoacústica cuando un absorbente es impactado con un rápido pulso de luz; las partículas incoloras permanecen acústicamente transparentes, lo que permite que numerosas células crucen el haz de detección a la vez. Por consiguiente, se proporciona una técnica de flujometría multifásica con detección fotoacústica para detectar y capturar CMCs in vitro. La captura de las células de melanoma detectadas no solo verifica que el melanoma realmente se está detectando; también proporcionará a los biólogos del cáncer los CMCs en etapa temprana para su estudio.

Con referencia a la Figura 2B, una guía 54 de onda óptica es producida por el fluido que tiene un índice óptico de refracción más alto que el material circundante. El líquido que contiene las células podría tener un índice de refracción de 1.39 mediante la adición de azúcar o polietilenglicol y la cámara de flujo de acrilamida circundante puede tener un índice de refracción de 1.35. Este desajuste permite una reflexión interna total, lo que hace que una guía de onda óptica sea muy parecida a una fibra óptica. Esto permite que los componentes alternos sean una guía de onda óptica, de modo que la luz láser esté llenando todo el tubo y cada compartimento discreto se llene con luz láser. La luz láser puede irradiar toda la muestra debido a la reflexión interna total. La reflexión interna total ocurre cuando la luz incide en un material que tiene un índice de refracción más bajo que el material por el que se está moviendo la corriente. Esto permite que la luz láser permanezca dentro del medio de elección siempre que se cumpla con el índice de parámetros de refracción. Por lo tanto, el canal de flujo es una guía de onda óptica para garantizar que todos los compartimentos discretos se irradian sin desperdiciar energía láser. Esto se hace en una realización mediante la adición de azúcar, polietileno u otra sustancia para incrementar el índice de refracción al segundo fluido para incrementarlo más alto que el índice de refracción de la acrilamida.

El sistema 10 de flujo de fase múltiple permite que una muestra de interés se procese a través de un detector para identificar si ciertos analitos y/o sustancias están presentes en la muestra. Millones de células pueden fluir más allá del detector a la vez debido a la transparencia fotoacústica de los glóbulos blancos. Esto permite escanear grandes volúmenes muy rápidamente para detectar células de melanoma circulantes.

Ejemplo 1: Diseño de flujo de fase múltiple

El sistema de flujo de fase múltiple utilizado en el Ejemplo 1 comprende tubos cilíndricos de silicona. Sin embargo, se apreciará que podrían usarse otras formas tales como cuadrada o rectangular. El sistema de flujo de fase múltiple tiene un diámetro de flujo interno del canal de aproximadamente 1.6 mm de diámetro. El sistema de flujo de fase múltiple utilizado osciló entre 200 y 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Sin embargo, los glóbulos que se formaron eran solo de 2 a 3

microlitros y el número de Capillary y Reynolds se mantuvo en condiciones de microfluidos. Además, se utilizaron altas ratas de flujo para poder examinar rápidamente un gran volumen de sangre.

El sistema utilizó un transductor de "clip" de fluoruro de polivinilideno (PVDF). El sensor puede ser cualquier material piezoeléctrico u otro sensor de sonido no piezoeléctrico. Se apreciará que se puede usar cualquier material siempre que conduzca corriente eléctrica. Se cortaron dos láminas de bronce con un orificio en el medio y se soldaron a un conector de cable coaxial BNC. Se separaron con cinta las hojas de bronce y se colocó PVDF entre el bronce que cubría los orificios. El transductor se colocó en una carcasa de polidimetilsiloxano (PDMS) que mantuvo el transductor y la cámara de flujo estacionarios. El transductor se ajustó en la ranura y se colocó un anillo de PDMS sobre el transductor, exponiendo el PVDF pero cubriendo el bronce. El PDMS se usó para prevenir las reflexiones acústicas del bronce que podrían interferir con la detección del melanoma.

A continuación, la cámara de flujo se colocó en la parte superior del anillo de PDMS, de manera que la cámara se alineó directamente con el elemento de PVDF. Un láser Nd:YAG (Continuo) con conmutación Q de frecuencia fue disparado al lado de la cámara de flujo en ángulo recto desde el transductor. El láser se pulsó a 532 nm, 20 Hz y entre 5 y 8 mJ para una duración de pulso de 5 ns.

La cámara de flujo estaba conectada a dos bombas de jeringa; una jeringa contenía las muestras de células y la otra contenía aire. El aire se bombea a 0.2 mL/min y las muestras celulares se bombean a 0.1 mL/min. La bomba de jeringa que albergaba las celdas se ajustó verticalmente para garantizar que las celdas no se asentaran en el fondo, por lo que el aire necesitaba un caudal más alto para compensar el aumento de presión.

Ejemplo 2: Preparación de la muestra

El flujo de dos fases se creó utilizando una unión en T, que combina las dos fases separadas en una sola ruta de flujo, manteniendo las fases distinguibles. Las fases elegidas para usar en el Ejemplo 2 fueron tanto agua como aceite, y aire y agua. El aire y el agua producían un glóbulo de agua que podía extraerse fácilmente sin contaminar la muestra con la fase vecina. Sin embargo, cuando se usa aire y agua, los líquidos acumulan presión y purgan el sistema. Se utilizó Tween 20 en el sistema de flujo de dos fases aire/agua para reducir la tensión interfase entre las fases. Se usó un Tween 20 al 2% en regulador PBS como fase acuosa. Se apreciará que otros tensioactivos, tales como el Tween 80 al 2%, también se pueden usar para reducir la tensión entre las fases.

Ejemplo 3: Preparación de la muestra

Se utilizaron muestras biológicas para mostrar que el sistema de múltiples fases es aplicable a un entorno clínico. Las células de melanoma se cultivaron en la Universidad de Missouri y todas las muestras de glóbulos blancos se obtuvieron de sangre completa donada por miembros del laboratorio. Las técnicas de cultivo celular y enriquecimiento se describen a continuación. Células de melanoma fueron suspendidas en PBS.

Se cultivó una línea celular de melanoma HS 936 para uso en experimentos fotoacústicos. Las células se fijaron en etanol y se resuspendieron en PBS. Aproximadamente 15 minutos antes de los experimentos, las células se diluyeron con una solución salina regulada con fosfato (PBS) + Tween 20 (Fisher Scientific) al 2% hasta la concentración celular deseada. Las células fueron contadas manualmente utilizando un hemocitómetro.

Glóbulos blancos suspendidos en PBS y melanoma.

Los glóbulos blancos suspendidos en PBS se prepararon al obtener sangre completa libre de cáncer donada por los miembros del laboratorio. La sangre se vertió en un tubo de centrífuga que contenía Histopaque 1077, un material cuyo valor de densidad se encuentra entre el de los glóbulos blancos y los glóbulos rojos, y luego se centrifugó. La capa de glóbulos blancos y los contenidos adyacentes a ella se eliminaron y luego se agregaron a un tubo de centrifugadora de diámetro más pequeño. Este tubo se centrifugó de nuevo y la capa de glóbulos blancos se eliminó y se diluyó con PBS.

Las muestras de glóbulos blancos enriquecidas con melanoma suspendido en PBS se prepararon al obtener sangre completa donada por los miembros del laboratorio. La sangre se vertió de nuevo en un tubo de centrífuga que contenía Histopaque 1077. Se agregaron células de melanoma cultivadas de la línea HS 936 en el mismo tubo de centrífuga. El proceso de centrifugación y el procedimiento de separación siguieron siendo los mismos que la preparación de glóbulos blancos de arriba. Las células de melanoma y los glóbulos blancos se asientan en la misma capa después de la centrifugación debido a sus densidades similares. Esta capa se aisló y se diluyó con PBS.

Ejemplo 4: Diseño de la cámara de flujo

El sistema de flujo de fases múltiples fotoacústico utilizó un transductor piezoeléctrico PVDF mientras que el láser impactó a 90° desde el elemento del transductor. La alternativa es introducir la luz láser a lo largo del eje de flujo utilizando la naturaleza de guía de onda óptica del sistema. Una sola celda se considera una fuente de punto óptico y, por lo tanto, emitirá ondas fotoacústicas de forma radial en todas las direcciones por igual. La cámara de flujo se mantuvo unida con un anillo acrílico que tenía tres orificios perforados a 90° entre sí. Se introdujo tubería Masterflex a través de los orificios y un cable con el mismo diámetro exterior que el diámetro interior del tubo se suspendió a través

de los dos orificios opuestos, mientras que un segundo cable se introdujo a través del tercer orificio para evitar que la acrilamida ingresara en el orificio del tubo.

Una vez que se preparó el anillo acrílico, se estiró Parafilm a través de la parte inferior del anillo y se vertió acrilamida transparente en el anillo, formando gel alrededor del tubo y el alambre. La acrilamida se elaboró a partir de 10 mL de solución de acrilamida al 20% (Sigma Aldrich), 0.04 g de persulfato de amonio (Sigma Aldrich) y 20 µL de TEMED (Fisher Scientific). Después de agregar el TEMED, la mezcla se vertió inmediatamente para evitar la gelificación prematura.

Después de la gelificación, se retiraron los cables, y el tubo utilizado para sujetar la fibra óptica se extrajo aproximadamente 4 mm. La cámara de flujo estaba entonces lista para ser utilizada en el sistema.

10 Ejemplo 5: Estudio ciego

Con el fin de demostrar que cualquier médico puede operar con éxito este sistema, se realizó un estudio ciego para determinar si las muestras que no contienen melanoma pueden distinguirse fácilmente de las muestras que sí lo contienen.

Se obtuvieron veinte valores Booleanos aleatorios utilizando un programa corto hecho en MATLAB: "0" representaba PBS + 2% p/v solución de Tween 20, y "1" representaba 10 células de melanoma/µL suspendidas en PBS + 2% p/v Tween 20.

Dos científicos inicialmente prepararon las muestras sin revelar cuáles muestras contenían melanoma y cuáles no. Luego, dos científicos diferentes analizaron las muestras a través del sistema de flujo y se les pidió que determinaran cuáles muestras tenían células de melanoma y cuáles no se, basándose en las ondas fotoacústicas que se observaron en el osciloscopio.

Los científicos identificaron correctamente las 20 muestras, como se ve en la Tabla 1. Las señales fotoacústicas de una línea de base y una muestra de células detectadas se muestran en las Figuras 6 y 7. Además de las amplitudes más grandes, las células de melanoma producen señales transitorias, mientras que los picos de línea de base permanecen constantes en todo el flujo.

25 Tabla 1. Los 20 valores Booleanos aleatorios utilizados para el estudio ciego.

Muestra #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Contenido	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1
Resultados de la prueba	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+

Ejemplo 6: Detección fotoacústica y captura de melanoma entre los glóbulos blancos:

El sistema de flujo se preparó utilizando tres entradas separadas: una bomba de jeringa contenía aire, una bomba de jeringa contenía WBC en PBS + Tween 20 y una jeringa contenía células de melanoma cultivadas en PBS. El WBC + PBS y se utilizaron los glóbulos formados por aire en todo el sistema para mostrar que no se produjeron señales fotoacústicas a partir de burbujas de aire o de WBC. La bomba de jeringa que contenía glóbulos blancos se detuvo y la jeringa que contenía melanoma se usó para introducir manualmente una burbuja de melanoma en el sistema de flujo con la esperanza de crear ondas fotoacústicas y luego aislarlas del sistema.

Resultados

35 Flujo en dos fases: Agua y aceite.

Se observó que el flujo de dos fases con aceite y aire producía burbujas uniformes y consistentes sin ningún retraso del sistema de flujo.

Agua y aire.

40 Se observó que el flujo de dos fases con agua y aire producía un flujo inconsistente y la acumulación de presión ocasionalmente purga el sistema de flujo.

Después de agregar 2% de Tween 20 al agua, se produjeron burbujas consistentes y uniformes sin sufrir ningún retraso.

Ejemplo 7: Señales de melanoma fotoacústico por concentración:

El sistema produjo una señal fotoacústica de las burbujas de melanoma y se mantuvo en la línea de base para el WBC y las burbujas de aire como se ve en las Figuras 5A-5F. La burbuja de melanoma detectada se aisló luego, ya que goteaba fuera del sistema y se generaron imágenes de la burbuja junto con una burbuja de control de WBC.

Las Figuras 5A-5E son representaciones gráficas de señales fotoacústicas de diferentes concentraciones de células de melanoma de compartimiento discreto detectadas utilizando el sistema de flujo de múltiples fases descrito anteriormente. Las Figuras 5A-5E se representan gráficamente como amplitud fotoacústica (mV) vs. tiempo (μ s). La Figura 5A es una representación gráfica de señales fotoacústicas de una muestra libre de células de melanoma. La Figura 5B es una representación gráfica de una señal fotoacústica de una muestra que contiene 10 células/ μ L de melanoma. La Figura 5C es una representación gráfica de una señal fotoacústica de una muestra que contiene 25 células/ μ L de melanoma. La Figura 5D es una representación gráfica de una señal fotoacústica de una muestra que contiene 100 células/ μ L de melanoma. La Figura 5E es una representación gráfica de una señal fotoacústica de una muestra que contiene 800 células/ μ L de melanoma.

La FIGURA 5F es una representación gráfica de una imagen de la respuesta de voltaje frente a la concentración celular. La amplitud de las señales fotoacústicas siguió la linealidad con la concentración hasta concentraciones de 10 células/ μ L como se muestra en la FIGURA 5F.

Si bien la formación exitosa de burbujas se logró con el uso de aceite/agua y aire/ agua + tensioactivo, debido a la facilidad con la cual se pueden extraer las células de melanoma del sistema de flujo, el agua y el aire con la adición de un tensioactivo serán los fluidos de elección para estudios posteriores. La adición de Tween 20 fue efectiva debido a su capacidad para hacer disminuir la tensión interfases entre las dos fases permitiendo que el agua se deslice más allá del aire cuando se acumula presión.

El estudio de concentración mostró una correlación lineal entre la amplitud de voltaje y la concentración hasta que se investigaron concentraciones muy bajas. Esto se esperaba porque las células no se diseminan de manera homogénea, lo que se hace evidente a bajas concentraciones. Además, como era de esperar, el control PBS + Tween 20 no produjo ninguna señal fotoacústica.

El estudio ciego confirmó que este método se puede utilizar en un entorno clínico para detectar el melanoma. La captura de células de melanoma demostró además que el sistema puede aislar eficazmente las células de melanoma detectadas del sistema. Además, este es un paso significativo hacia una técnica de monitorización de enfermedades eficiente y permitirá a los científicos estudiar estas células metastásicas con la esperanza de descubrir los mecanismos por los cuales hacen metástasis, sobreviven en la sangre y los sistemas linfáticos y se asientan en otros tejidos, de manera que se puedan desarrollar mejores terapias para pacientes con cáncer y otros tipos de enfermedades.

Ejemplo 8: Captura y aislamiento de melanoma

El sistema no produjo señales para la línea de base de PBS y produjo señales fotoacústicas de cada concentración diferente de glóbulos de melanoma. Las Figuras 6 y 7 muestran la respuesta fotoacústica de 1 célula de melanoma/ μ L en comparación con la línea de base de PBS. Los glóbulos que produjeron señales fotoacústicas se aislaron y luego se tiñeron con la tinción de Fontana Masson, pero los mejores resultados fueron de las muestras de 100 células/ μ L, probablemente debido al fuerte procedimiento de tinción que requiere que los portaobjetos se laven varias veces, el núcleo se tiñó de rojo y la melanina teñida de negro. Como se muestra en la FIGURA 6, una vista gráfica 600 de una amplitud fotoacústica de una muestra de glóbulos blancos irradiados no produce ningún efecto fotoacústico, con una gota aislada de la suspensión celular que muestra un glóbulo blanco 610. En la FIGURA 7, una vista gráfica 700 de una amplitud fotoacústica de una muestra de células de melanoma irradiadas entre los glóbulos blancos produce ondas fotoacústicas. Una gota aislada de la suspensión celular que muestra ondas fotoacústicas indica la presencia de células de melanoma pigmentadas 710.

De lo anterior, se verá que esta invención está bien adaptada para alcanzar todos los fines y objetos expuestos anteriormente junto con otras ventajas que son obvias y que son inherentes a la estructura.

Se entenderá que ciertas características y subcombinaciones son de utilidad y pueden emplearse sin hacer referencia a otras características y subcombinaciones. Esto está contemplado por y está dentro del alcance de las reivindicaciones.

Dado que se pueden hacer muchas realizaciones posibles de la invención sin apartarse del alcance de la misma, debe entenderse que toda la materia expuesta en este documento o mostrada en los dibujos adjuntos debe interpretarse como ilustrativa y no en un sentido limitativo.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de flujo múltiple para detectar sustancias en un fluido, comprendiendo el sistema: un primer tubo de fluido que contiene un primer fluido; un segundo tubo de fluido que contiene un segundo fluido, en donde el primer fluido es diferente del segundo fluido, en donde el primer y segundo fluidos son inmiscibles; un tubo de fluido común; un conector acoplado al primer tubo de fluido, el segundo tubo de fluido y el tubo de fluido común, en donde el fluido fluye desde el primer tubo de fluido y el segundo tubo de fluido hacia el tubo de fluido común a través del conector de manera tal que se alternen compartimentos discretos del primer fluido y el segundo flujo de fluido a través del tubo de fluido común; y un detector de sustancia acoplado al tubo de fluido común, en donde el detector de sustancia comprende una cámara de flujo que tiene una pared interna, en donde los compartimentos discretos alternos fluyen a través de la cámara de flujo y son analizados por el detector de sustancias,
- 5 en donde el detector de sustancias comprende además: un láser; y un pulsador,
- 10 en donde el láser es un láser fotoacústico, en donde el detector de sustancias está configurado para detectar sustancias en los compartimentos discretos del primer y segundo fluidos que fluyen a través de la cámara de flujo utilizando imágenes generadas con el láser fotoacústico, en donde el sistema de flujo múltiple está configurado para detectar células tumorales circulantes.
- 15 2. El sistema de la reivindicación 1, en donde la cámara de flujo está hecha de un material que tiene una impedancia acústica cercana a una impedancia acústica del agua.
3. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además un tercer tubo de fluido que contiene un tercer fluido, en donde el tercer tubo de fluido está acoplado al conector, en donde el fluido que fluye desde el segundo y tercer tubo de fluido se combina para formar una mezcla de fluidos, en donde compartimentos discretos alternos de la mezcla de fluidos fluyen a través del tubo común separados de compartimentos discretos alternos del primer fluido que fluye a través del tubo de fluido común.
- 20 4. El sistema de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un dispositivo para el movimiento de fluido.
- 25 5. El sistema de la reivindicación 4, en donde la cámara de flujo está hecha de un material que tiene una impedancia acústica cercana a una impedancia acústica del agua, en donde el material tiene un índice de refracción, en donde el segundo fluido tiene un índice de refracción, en donde el índice de refracción del segundo fluido se incrementa hasta un índice de refracción que es más alto que el índice de refracción del material.
- 30 6. El sistema de la reivindicación 4, que comprende además: un tercer tubo de fluido que contiene un tercer fluido, en donde el tercer tubo de fluido está acoplado al conector, en donde el tercer fluido se mezcla con el segundo fluido para formar una mezcla de fluidos, en donde la mezcla de fluidos no se mezcla con el primer fluido, en donde compartimentos discretos alternos de la mezcla de fluidos y compartimentos discretos alternos del primer fluido fluye a lo largo de una única trayectoria de flujo en el tubo de fluido común, en donde se alternan los compartimentos discretos de la mezcla de fluidos y los primeros fluidos son analizados por el detector de sustancias.
- 35 7. Un método para detectar sustancias en un fluido, comprendiendo el método:
 - recibir un primer fluido de un primer tubo de fluido a través de un conector; recibir un segundo fluido desde un segundo tubo de fluido a través del conector, en donde el primer y segundo fluidos son inmiscibles, en donde recibir el primer y segundo fluidos a través del conector comprende recibir compartimentos discretos alternos del primer fluido y el segundo fluido; y detectar al menos una sustancia en uno o más de los compartimentos discretos alternos recibidos
 - 40 utilizando un detector de sustancias, en el donde el detector de sustancias comprende una cámara de flujo que tiene una pared interna, en donde los compartimentos discretos alternos del primer fluido y el segundo fluido fluyen a través de la cámara de flujo,
 - en el cual el detector de sustancias comprende además: un dispositivo de excitación para analizar los compartimentos discretos alternos recibidos, en el cual el dispositivo de excitación es una fuente de láser fotoacústico; y un pulsador,
 - 45 en el cual el método es para detectar células tumorales circulantes.
 8. El método de la reivindicación 7, en donde recibir compartimentos discretos alternos del primer fluido y el segundo fluido comprende recibir los compartimentos discretos alternos del primer fluido y el segundo fluido a través de un tubo de fluido común acoplado al conector.
 9. El método de la reivindicación 7, en donde la cámara de flujo está hecha de un material que tiene una impedancia acústica cercana a una impedancia acústica del agua.
 - 50 10. El método de la reivindicación 9, que comprende además aumentar un índice de refracción del segundo fluido a un índice de refracción que es más alto que un índice de refracción del material.

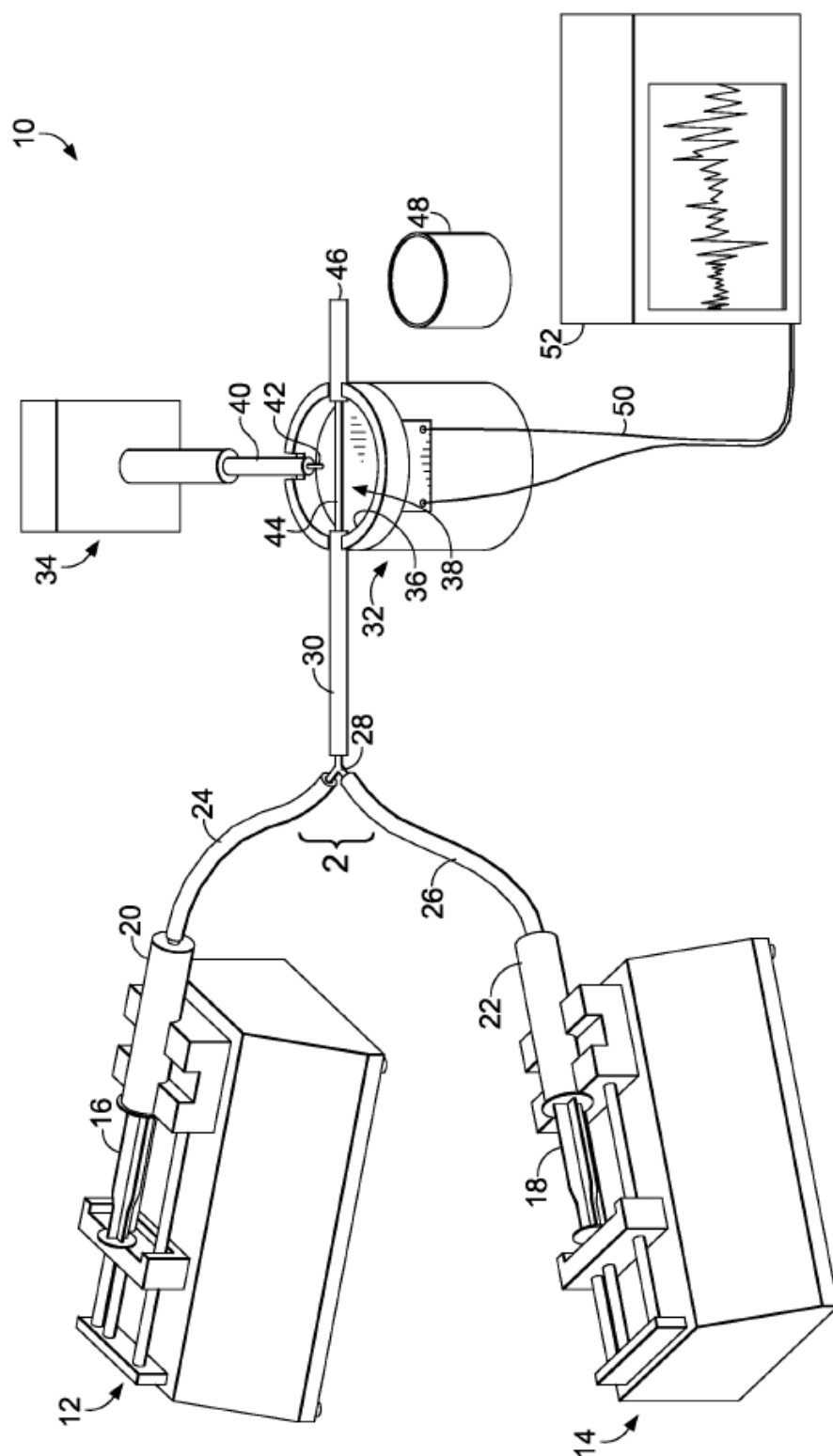
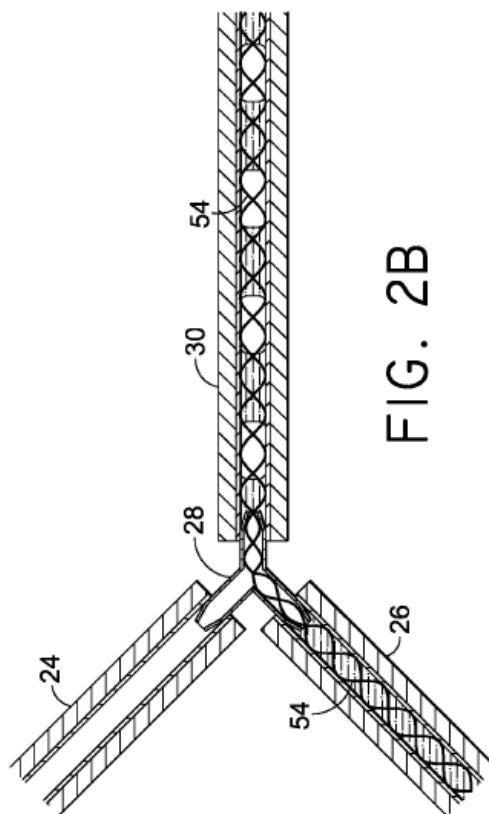
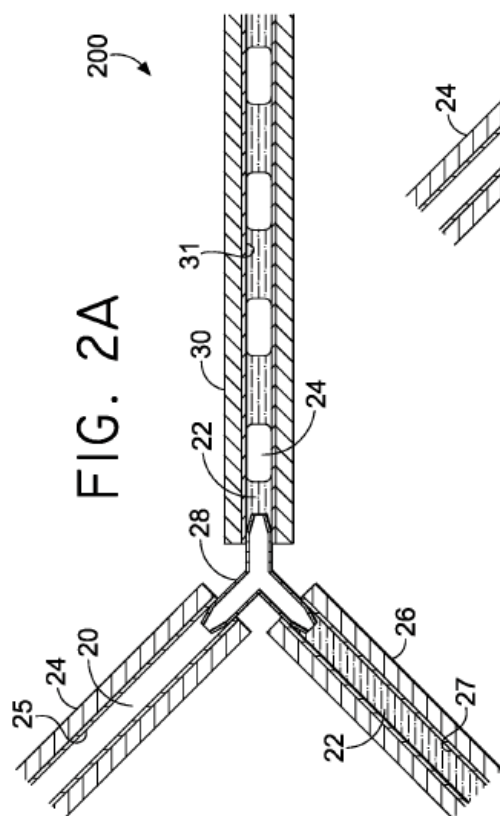


FIG. 1



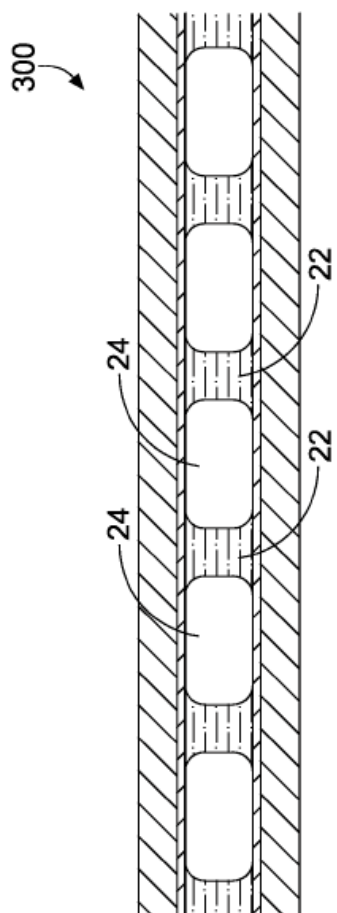


FIG. 3A

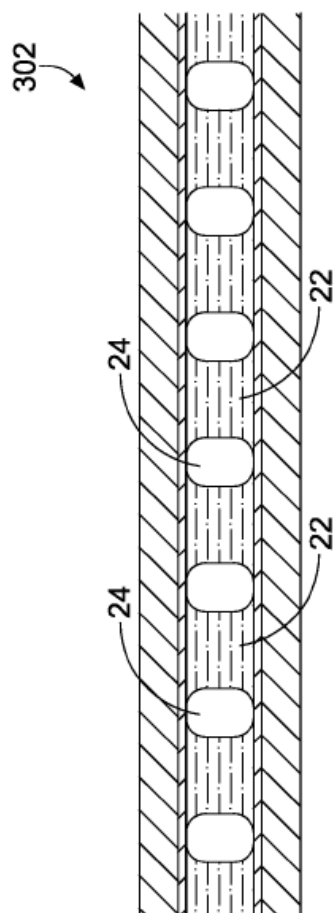
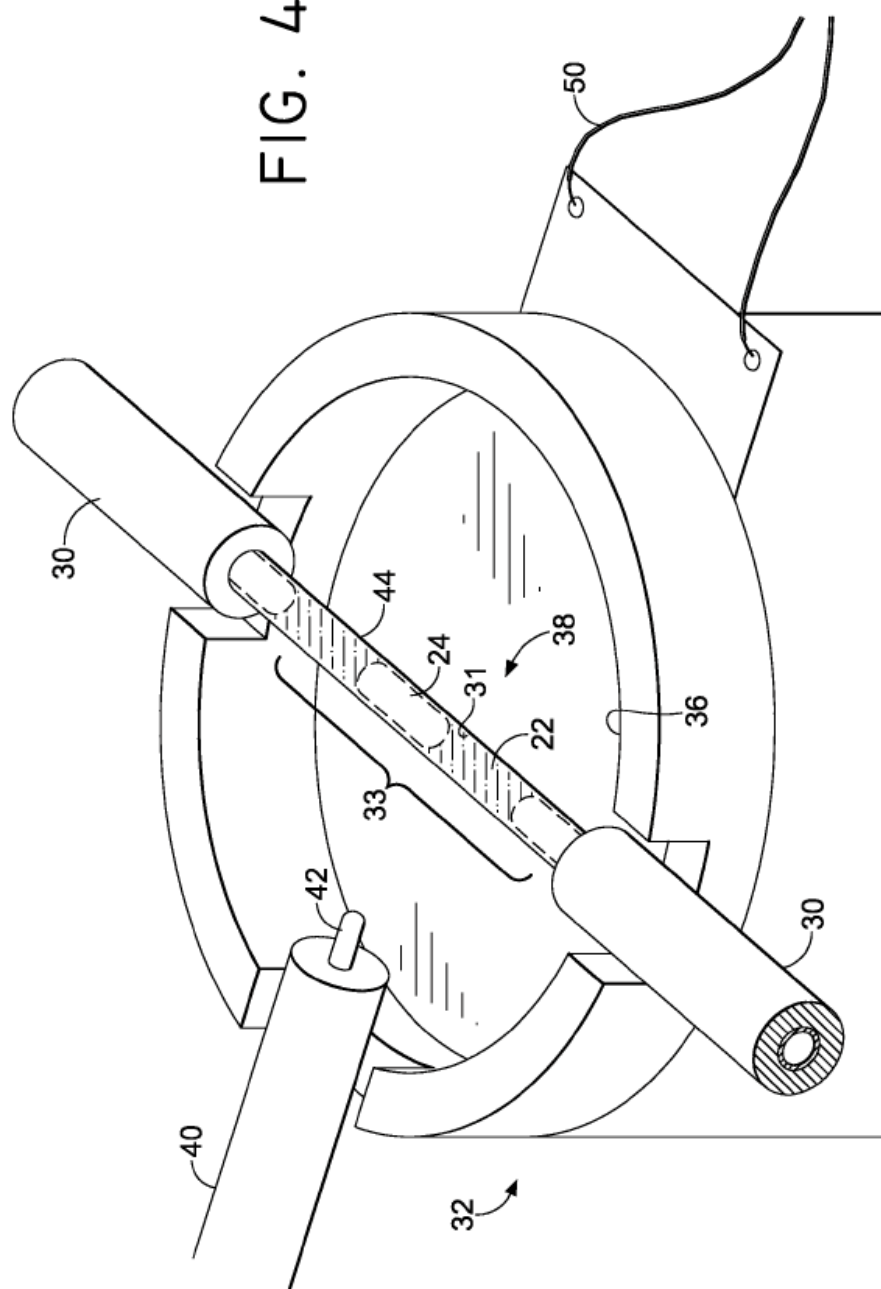


FIG. 3B



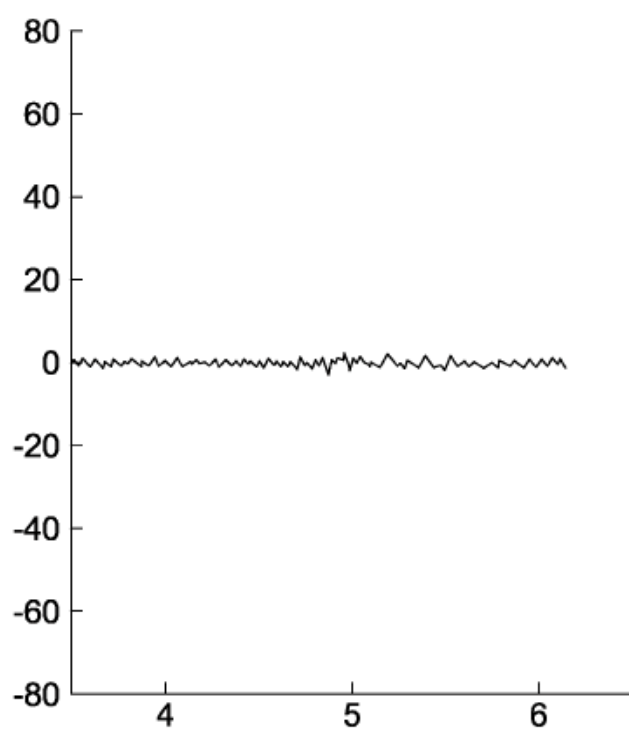


FIG. 5A

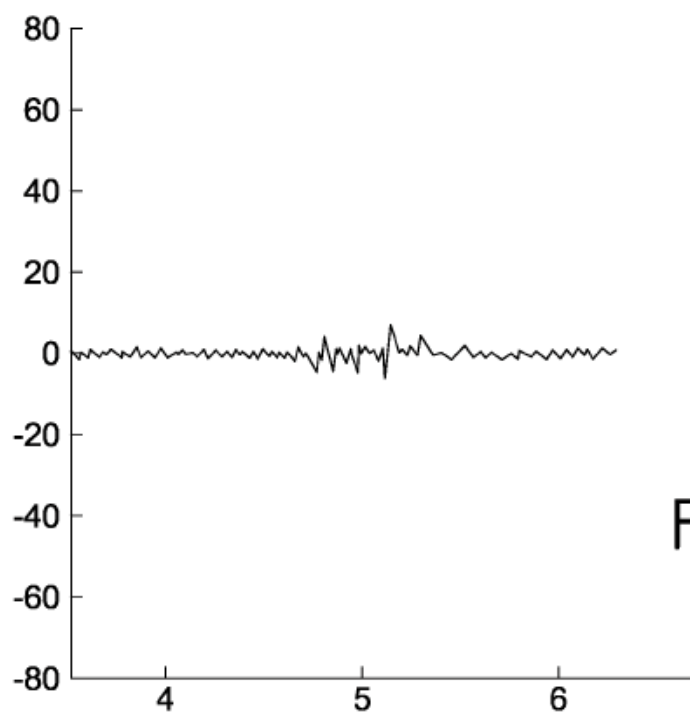


FIG. 5B

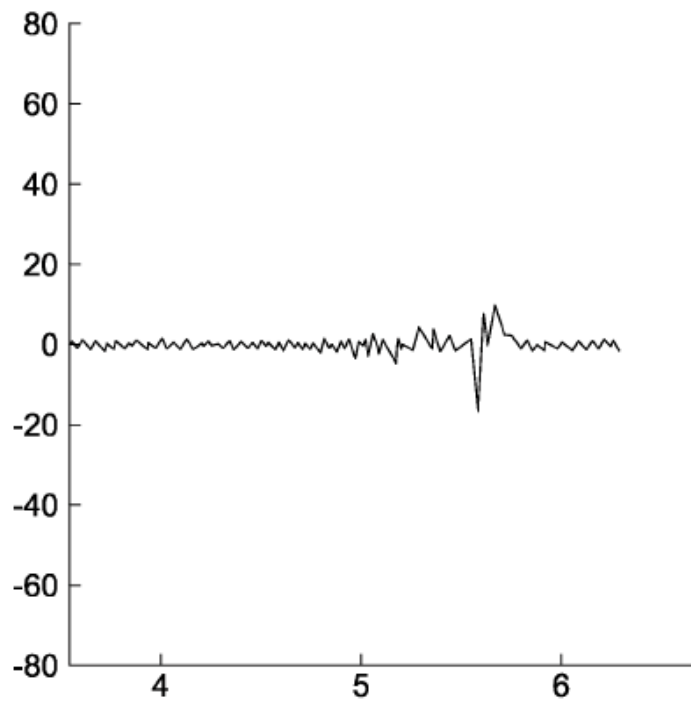


FIG. 5C

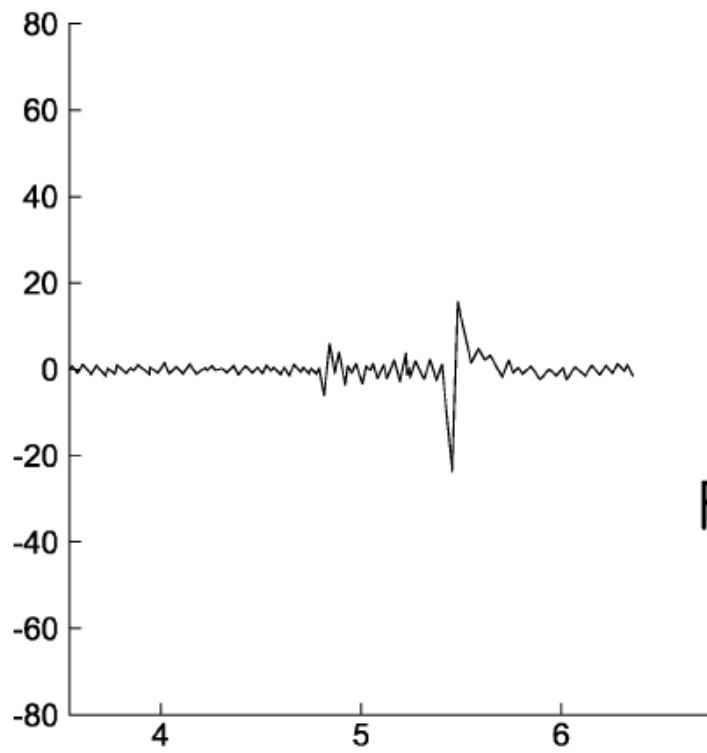


FIG. 5D

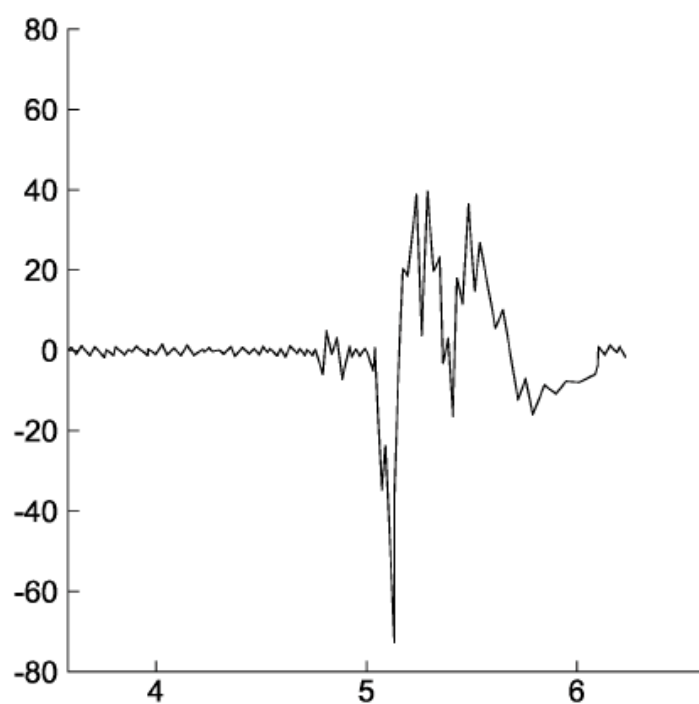


FIG. 5E

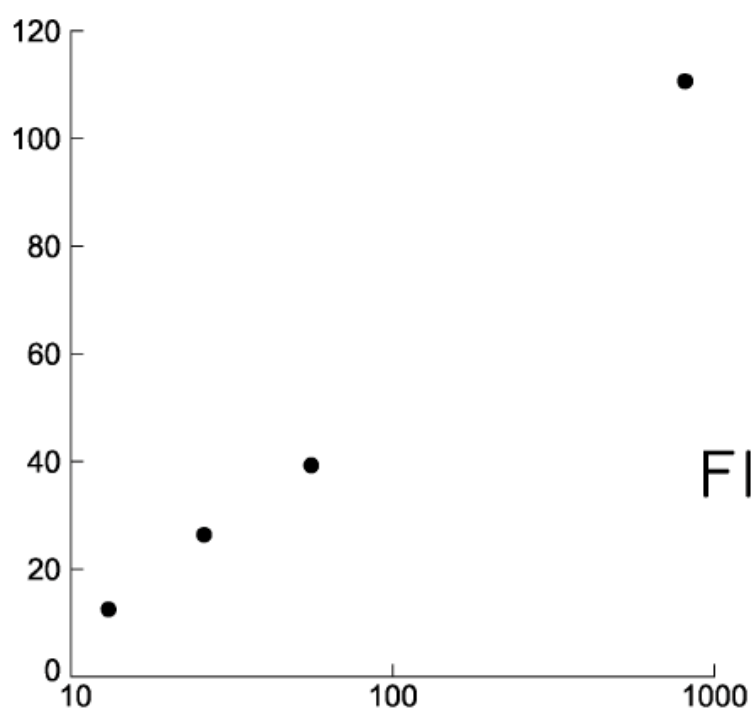


FIG. 5F

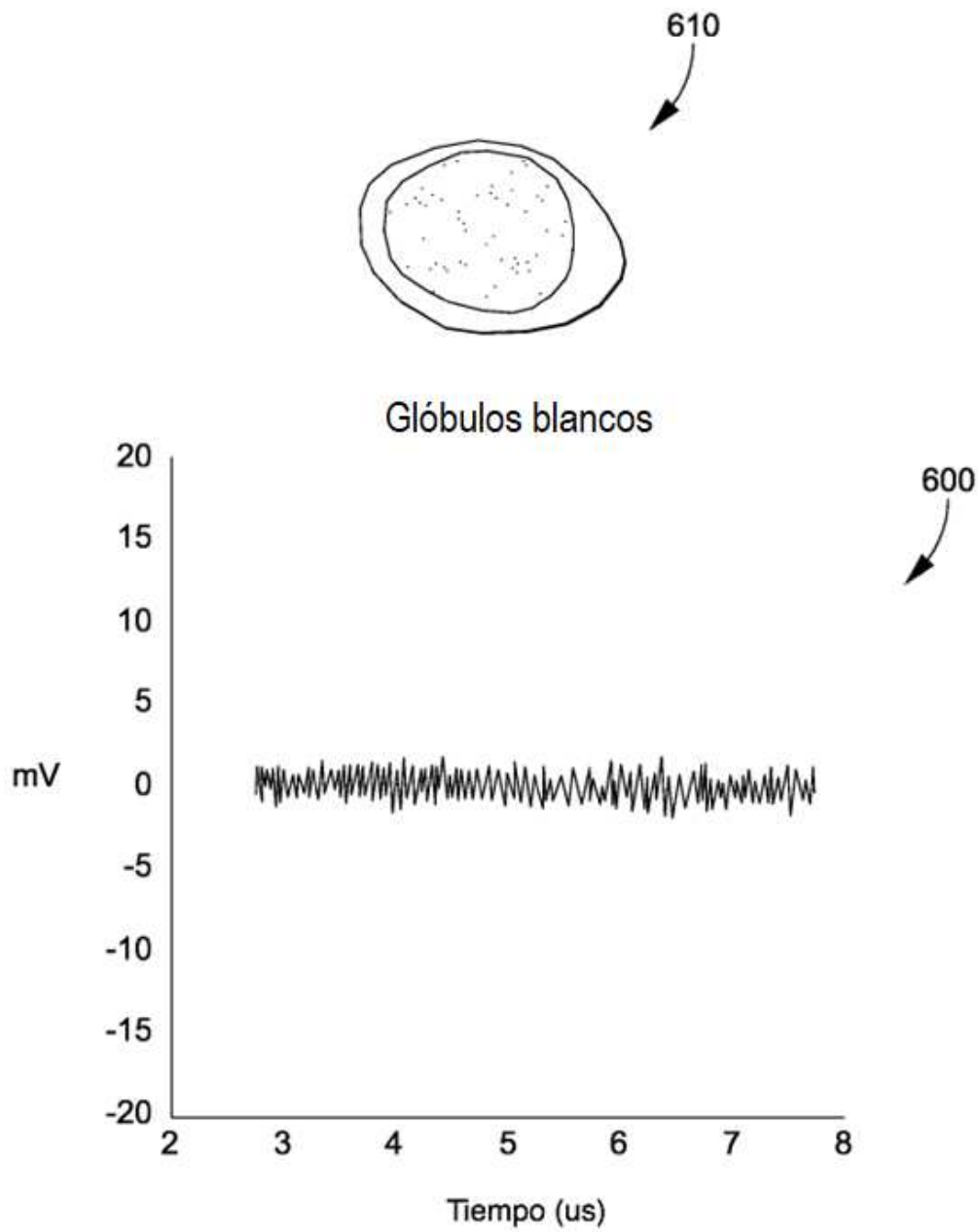


FIG. 6

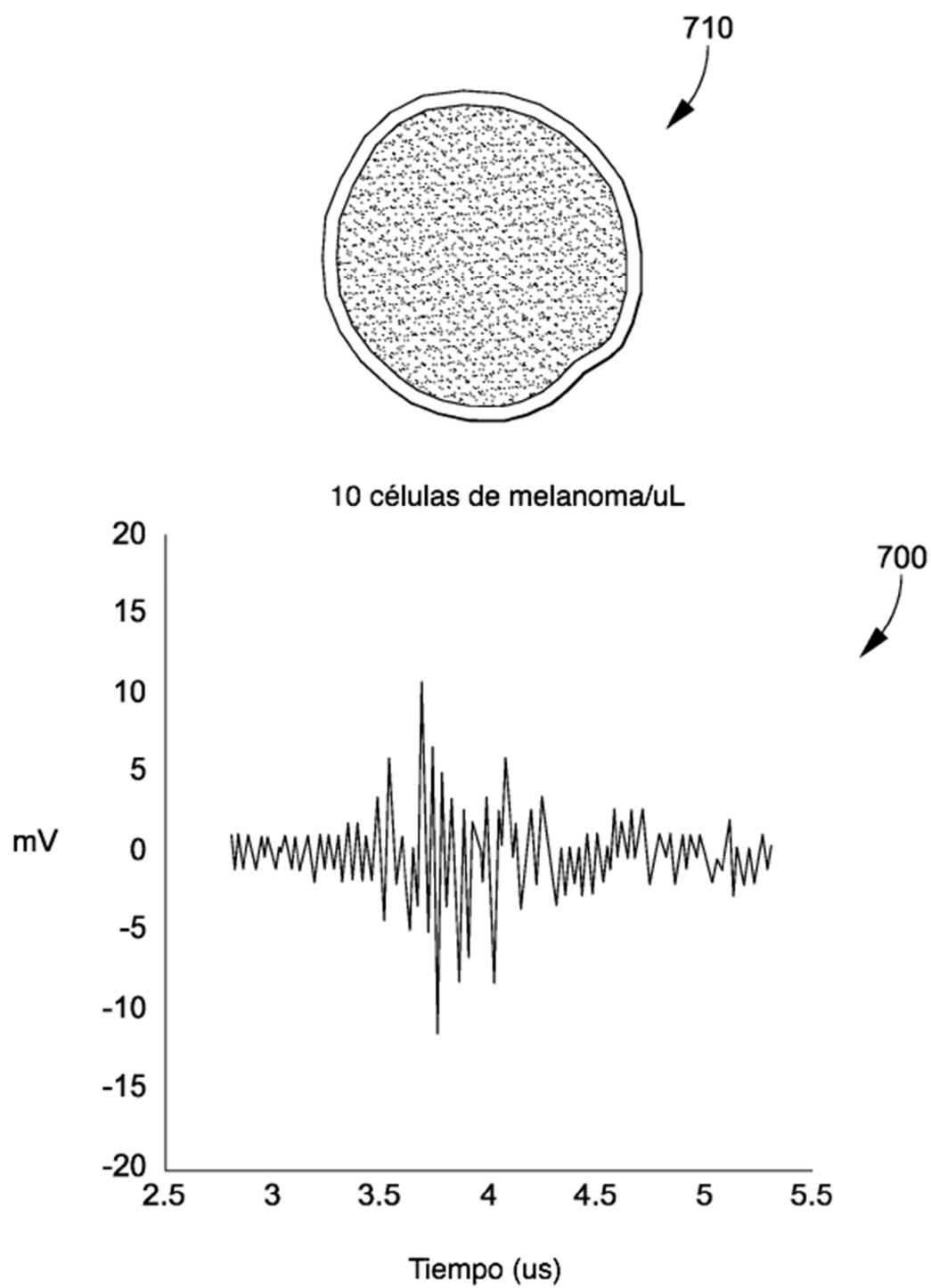


FIG. 7