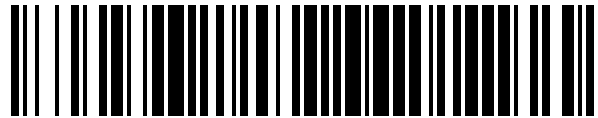


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **1 244 899**

21 Número de solicitud: 202030033

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01L 7/00** (2006.01)

**G01N 15/02** (2006.01)

12

SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD

U

22 Fecha de presentación:

**27.10.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.04.2020**

71 Solicitantes:

**MONDRAGON GOI ESKOLA POLITEKNIKOA J.M.  
ARIZMENDIARRIETA S. COOP (50.0%)  
C/ Loramendi, 4  
20500 ARRASATE-MONDRAGON (Gipuzkoa) ES y  
ASOCIACIÓN CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
COOPERATIVA EN BIOCENCIAS - CIC BIOGUNE  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOUALI SAIDI, Mohammed Mounir y  
MARTIN MAYOR, Alain**

74 Agente/Representante:

**IGARTUA IRIZAR, Ismael**

54 Título: **Dispositivo microfluídico de extracción de exosomas**

ES 1 244 899 U

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfluídico de extracción de exosomas

5

### SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con dispositivos microfluídicos de extracción de  
10 partículas biológicas.

### ESTADO ANTERIOR DE LA TÉCNICA

15 Los exosomas son pequeñas vesículas que las células fabrican y secretan al medio extracelular conteniendo información (ácidos nucleicos, lípidos, metabolitos, péptidos, proteínas, etc.) relevante acerca del origen y el estado en el que se encuentran. Estas pequeñas vesículas han sido extraídas de diversos fluidos biológicos por su gran interés como fuente biológica para identificar y definir biomarcadores no invasivos de  
20 enfermedades. Además, estas partículas biológicas están directamente implicadas en el desarrollo de diversas patologías incluyendo cáncer, enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

En la actualidad el aislamiento y purificación de los exosomas es un procedimiento  
25 que consiste en varios pasos tediosos y dificulta el avance de estas investigaciones hacia su aplicación clínica.

En el estado de la técnica se conocen sistemas microfluídicos que se utilizan para detectar, capturar, separar y enriquecer partículas que están suspendidas o dispersas  
30 en un fluido. A modo de ejemplo, US20140030788A1 describe un método y dispositivo para la separación de tres poblaciones de partículas biológicas con distintos diámetros cada población, en el que la muestra es introducida en una trayectoria de fluido que comprende unos obstáculos que retienen una de las poblaciones y permiten el flujo del resto de las poblaciones en base a la porosidad de los obstáculos.

35

WO2015139019A1 también describe un sistema microfluídico en el que los exosomas son capturados mediante la unión de estos exosomas a "microbeads" magnéticos.

## 5 EXPOSICIÓN DE LA INVENCION

El objeto de la invención es el de proporcionar un dispositivo microfluídico de extracción de exosomas, tal como se define en las reivindicaciones.

- 10 El dispositivo microfluídico de extracción de exosomas de la invención extrae los exosomas en función de su diámetro y comprende:
- al menos un canal que comprende al menos una entrada para la muestra fluida y al menos dos orificios distribuido a lo largo del canal que permite la salida de una población de exosomas y una salida para la muestra fluida restante; y
  - 15 - medios para generar un gradiente de temperatura, provocando la salida de cada población a través de un orificio distinto.

El dispositivo de la invención permite la extracción de los exosomas basados en el diámetro de una manera más simple y menos costosa que en el estado de la técnica, ya que el canal central no presenta ni obstáculos ni tampoco requiere el uso de reactivos tales como elementos específicos de unión para el exosoma.

20

Por otro lado, la extracción de los exosomas se realiza al momento en el que la primera población de exosomas sale del orificio del canal sin tener que esperar a que la muestra entera fluya por el canal. Este hecho permite tener un control de la separación y extracción de las poblaciones de exosomas durante el procesamiento de la muestra y no a la finalización del mismo. Este control es de gran importancia para los procesos de extracción en flujo constante de volúmenes grandes de muestras fluidas, en los que se simplifica el proceso, se reducen los tiempos muertos y se obtiene un mejor rendimiento del proceso.

25

30

Estas y otras ventajas y características de la invención se harán evidentes a la vista de las figuras y de la descripción detallada de la invención.

35

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un esquema del dispositivo microfluídico según una primera realización de la invención.

5

La figura 2 muestra un esquema del dispositivo microfluídico según una segunda realización de la invención.

La figura 3 muestra un esquema del dispositivo microfluídico según una tercera  
10 realización de la invención.

La figura 4 muestra un esquema del dispositivo microfluídico según una cuarta  
realización de la invención.

15

## EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En el dispositivo microfluídico de la invención se implementa un método de extracción  
de exosomas que comprende las siguientes etapas:

20

- introducir una muestra fluida que comprende al menos dos poblaciones de  
exosomas con un diámetro distinto cada uno en un dispositivo microfluídico 10  
como el mostrado por ejemplo en la figura 1, el cual comprende:

25

- al menos un canal 1 que comprende al menos una entrada 2 para la  
muestra fluida y al menos dos orificios 3 distribuidos a lo largo del canal  
1 que permiten la salida de las poblaciones de exosomas y al menos  
una salida 5 para la muestra fluida restante, y

30

- medios 6 para generar un gradiente de temperatura en el canal 1; y  
- hacer fluir la muestra fluida a través del canal 1 mientras se aplica en el canal  
1 un gradiente de temperatura, provocando la salida de cada población a  
través de un orificio 3 distinto.

35

En el contexto de la invención, por exosoma se entiende una micropartícula o  
nanopartícula de base lipídica y/o proteica presente en una muestra, por ejemplo un  
fluido biológico obtenido de un sujeto o de un cultivo celular, bacteriano o fúngico. El

término exosoma hace también referencia a estructuras de origen sintético o biológico formadas por una o varias capas lipídicas que pueden contener tanto en su superficie como en su interior distintas proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, metabolitos, y/o fármacos. Estos exosomas pueden ser vesículas extracelulares, microvesículas, nanovesículas, argosomas, ectosomas, dexosomas, cuerpos apoptóticos y vesículas sintéticas. El diámetro o tamaño de los exosomas puede variar entre 20 nm y 5000 nm, dependiendo de su origen.

En el contexto de la invención, por población de exosomas se entiende un conjunto de exosomas que tienen un rango de diámetro o tamaño determinado.

Este método permite la extracción de poblaciones de exosomas con diámetros o tamaños que se diferencian en al menos 50 nm. Esta diferencia también aplica a diferencias de diámetros hidrodinámicos que alcancen al menos los 50 nm.

La muestra fluida que comprende las poblaciones de exosomas se refiere a una muestra de fluido biológico vegetal o animal, tal como una muestra de sangre, suero, orina, saliva, lágrima, flujo vaginal, flujo seminal, fluido cerebroespinal, fluido cerebral, sudor, esputo, lavado cervical, secreciones del tracto respiratorio, intestinal, sinobial, y líquido amniótico; o bien un fluido, preferiblemente un fluido líquido, en el que se han dispersado distintas poblaciones de exosomas.

Dependiendo de la naturaleza de la muestra fluida, así como de su composición, es conveniente tratarla previamente antes de someterla al método de la invención. Ejemplos de tratamiento previo de la muestra fluida podrían ser: un enriquecimiento en exosomas o en partículas de la muestra que favorezcan la extracción de las poblaciones de exosomas de interés, una dilución de la muestra fluida o una eliminación de impurezas que afecten a la extracción de los exosomas, entre otras.

En el contexto de la invención, por dispositivo microfluídico se entiende aquel dispositivo que usa flujos volumétricos de líquido en el rango de nanolitros o microlitros por minuto en un procesador, también conocidos como sistemas microfluídicos basados en chips.

Tal como se ha indicado ya con referencia a la figura 1, el dispositivo microfluídico

de la invención comprende un canal 1. En el contexto de la invención el canal 1 es un pasaje por el que fluye la muestra. En una realización preferente el canal 1 es un conducto. Este canal 1 puede estar no cubierto o cubierto.

- 5 El canal 1 tiene unas dimensiones de acuerdo a las condiciones de procesamiento de la muestra: el caudal o velocidad de flujo, el gradiente de temperatura, la concentración y diámetro o tamaño de los exosomas y la composición del fluido.

En una realización particular, el canal 1 tiene una profundidad de al menos cinco veces la altura y una longitud de al menos seis veces la profundidad. Estas dimensiones permiten la generación de unas líneas de corriente estables a lo largo del canal 1.

A modo de ejemplo, el canal 1 tiene una altura aproximadamente de entre 1600  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 1600  $\mu\text{m}$ , 800  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$  o 20  $\mu\text{m}$ ; una profundidad de entre 8000  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , y una longitud de entre 0.6mm y 48 mm.

El canal 1 de la invención puede estar construido con cualquier material polimérico, cerámico y/o metálico, preferiblemente con materiales que sean buenos conductores térmicos y compatibles con las muestras a procesar.

A modo de ejemplo no limitativo, un material polimérico puede ser una poliolefina, tal como el copolímero de olefina cíclica, el polietileno de baja o alta densidad, el polipropileno o el caucho etileno-propileno.

A modo de ejemplo no limitativo, un material cerámico puede ser el óxido de berilio, el grafito, el diamante, el vidrio borosilicatado o el dióxido de silicio.

A modo de ejemplo no limitativo, un material metálico puede ser el acero inoxidable, la plata, las aleaciones de cobalto, de cromo o de titanio.

En una realización preferente, el canal 1 comprende un copolímero de olefina cíclica.

En ocasiones la muestra fluida puede contener elementos interferentes para la

extracción que conviene retenerlos en el canal 1. A modo de ejemplo no limitativo, los elementos interferentes pueden ser: metabolitos, ácidos grasos o agregados proteicos. Por lo tanto, en una realización particular, la cara interna del canal 1, en donde la muestra fluida entra en contacto, comprende elementos de retención de  
5 estos elementos interferentes, pudiendo estos elementos ser físicos, químicos o biológicos.

Respecto a la entrada 2 y la salida 5 del canal 1, en una realización preferente, éstas están localizadas al inicio y al final del canal 1 respectivamente. En una realización  
10 preferente la entrada y/o la salida se disponen en una dirección axial del canal 1. En otra realización, en el que el canal es un conducto cubierto, la entrada y/o salida están en una dirección ortogonal a la dirección del fluido de la muestra.

El canal 1 además comprende los orificios 3, por los cuales las poblaciones de los  
15 exosomas 20 salen según van acercándose a dichos orificios 3.

Los orificios 3 son aberturas o conductos conectados a un reservorio específico en el que se acumulan los exosomas extraídos. Estas aberturas o conductos también pueden estar conectados a otro dispositivo u otro instrumento de medición. A modo  
20 de ejemplo, este dispositivo o instrumento detecta y/o cuantifica los exosomas o partículas para el control extraídos durante el proceso de extracción.

En el caso de que el orificio sea un conducto, en una realización particular éste está dispuesto en un ángulo de entre 30° y 90° respecto a la dirección del flujo de la  
25 muestra fluida, preferentemente a 60°.

Los orificios 3 pueden tener iguales o distintos tamaños. Independientemente de si son orificios iguales o distintos, preferiblemente, el tamaño máximo del orificio es la mitad de la altura del canal 1 o de la ramificación en caso de un canal 1 ramificado.  
30

El número de orificios 3 puede variar en función del número de poblaciones 20 que se quieran extraer.

Tal y como se muestra en la figura 1, en una realización preferente estos orificios 3  
35 están dispuestos de manera alineada a lo largo del canal 1.

En otra realización, tal y como se muestra en la figura 2, el canal central está ramificado, en donde los orificios 3 se disponen a lo largo de cada ramificación 9 o en el extremo distal de la ramificación 9, coincidiendo con la salida 5 de la ramificación.

5

Los orificios 3 están separados entre sí y la distancia de separación se fija en función de los requerimientos de cada caso, a modo de ejemplo, la altura del canal, del gradiente aplicado, el flujo aplicado y/o el diámetro de las poblaciones de exosomas a extraer.

10

La entrada y la salida de la muestra y el flujo de la muestra se realizan por medios conocidos por el experto en la materia.

La temperatura de la muestra fluida en el momento de ser introducida en el canal 1 puede variar dependiendo de la naturaleza de la misma y del gradiente de temperatura a aplicar. En una realización preferente, la muestra en el momento de ser introducida en el canal 1 tiene una temperatura menos dañina para el exosoma, siendo esta temperatura de entre 4°C y 37°C, preferiblemente de entre 5°C y 15°C.

20 Tal y como se muestra en las figuras 1 a 3, el dispositivo microfluídico comprende unos medios para generar el gradiente de temperatura 12.

Los medios para generar el gradiente de temperatura 12 pueden ser de manera no limitativa, un baño termostático, un sistema peltier o unos electrodos.

25

Dependiendo de la naturaleza de dichos medios, éstos pueden disponerse en contacto con el canal 1 o sobre el canal 1. A su vez, estos medios pueden disponerse a lo largo del canal 1 o en zonas concretas del canal 1 en donde se quiera generar el gradiente de temperatura.

30

En una realización preferente, el gradiente de temperatura 12 se genera a través de electrodos.

Este gradiente de temperatura 12 puede aplicarse en distintos ángulos respecto a la dirección del flujo de la muestra.

35



En una realización preferente, el gradiente de temperatura 12 es perpendicular a la dirección del flujo de la muestra.

- 5 En una realización preferente, el gradiente de temperatura perpendicular a la dirección del flujo que se genera es al menos de 0.5°C.

Los exosomas tienden a desplazarse a la zona del canal 1 en donde la temperatura del gradiente es menor, por lo que, en una realización preferente, los orificios 3 se disponen en dicha zona. Los exosomas de mayor diámetro se difunden y desplazan a la zona de menor temperatura antes que los exosomas del siguiente diámetro, es por ello que la primera población de exosomas en salir es el de mayor diámetro, seguido del resto de las poblaciones en el orden de mayor a menor diámetro.

- 10
- 15 Dependiendo del origen y del tamaño de los exosomas, de la composición del fluido, de las dimensiones y de la forma del canal 1 y el caudal, conviene modular el gradiente de temperatura a lo largo del canal 1, es por ello que en una realización particular, el gradiente de temperatura es variable a lo largo del canal 1.

- 20 En el caso de un canal 1 ramificado, tal y como se muestra en la figura 2, los medios 6 que generan el gradiente de temperatura se disponen en el canal 1 y en cada ramificación 9, pudiendo generar distintos gradientes de temperatura en cada ramificación del canal 1.

- 25 En una realización particular, tal y como se muestra en la figura 3, el canal 1 comprende al menos una entrada 4 adicional a través de la cual se introduce un fluido 7 en el canal 1 junto con la muestra fluida para desplazar dicha muestra fluida a una zona de interés 8. De esta manera los exosomas son introducidos en un área más limitado, correspondiendo a la zona de interés 8 del canal 1, y por tanto se consigue que el gradiente afecte de una manera más uniforme a todas las poblaciones de exosomas.

El fluido 7 puede ser de manera no limitativa un tampón acuoso. En una realización de la invención, el fluido 7 es tampón fosfato salino.

35

En otra realización particular, el canal 1 comprende al menos una segunda entrada 4 adicional a través de la cual se introduce un segundo fluido 7 en el canal 1 junto con la muestra fluida, de esta manera la muestra es introducida en el canal envuelta en un primer y segundo fluido 7. Al igual que en la realización anterior, los exosomas son  
5 introducidos en un área más limitado, correspondiendo a la zona de interés 8 del canal 1, y por tanto se consigue que el gradiente afecte de una manera más uniforme a todas las poblaciones de exosomas.

Dependiendo del origen y del tamaño de los exosomas, de la composición de la muestra fluida, de las dimensiones y de la forma del canal 1, el primer y segundo  
10 fluido 7 pueden ser iguales o distintos.

En una realización particular, la muestra fluida es introducida envuelta en el fluido 7. A modo de ejemplo, pero no limitativo, la entrada de la muestra fluida se realiza a  
15 través de un citómetro 13 de flujo que está conectado a la entrada 2 del canal 1. El citómetro 13 de flujo comprende dos o tres entradas, dependiendo de si se quiere introducir la muestra cubierta por uno de los lados o envuelta por el fluido 7. En el caso de la muestra envuelta, tal y como se muestra en la figura 4, el citómetro 13 comprende tres entradas; desde las entradas superior e inferior se introduce el fluido  
20 7 y de la entrada del centro se introduce la muestra fluida. El uso del citómetro simplifica la estructura del dispositivo ya que requiere una única entrada 2 del canal 1 para que la muestra sea introducida envuelta o cubierta por el fluido 7.

En las realizaciones en donde la muestra fluida es introducida envuelta o cubierta por  
25 el fluido 7, el caudal de cada uno puede variar. En una realización preferente, la muestra fluida es introducida envuelta en un fluido 7, en donde el caudal de entrada de la muestra fluida es 40 veces inferior que el caudal total de entrada.

Dependiendo de la naturaleza y de la concentración de las poblaciones de los  
30 exosomas presentes en la muestra fluida, ésta puede ser sometida a más de un ciclo del método de la invención, hasta la completa extracción de las poblaciones de exosomas. Esta iteración de ciclos puede realizarse sobre un único dispositivo de la invención o bien sobre varios dispositivos de la invención interconectados.

35 Por otro lado, en una realización particular la muestra fluida puede contener unas

partículas para el control del método de extracción de tal manera que permitan detectar in situ que el método de extracción se está realizando correctamente.

5 En una realización preferente, las partículas para el control son partículas que tienen características físicas equiparables a las poblaciones de exosomas a extraer. Estas características físicas hacen que las partículas control tengan un comportamiento similar o equiparable de la población de exosoma a extraer, pudiendo ser como el tamaño, el peso, etc.

10 En una realización preferente, estas partículas además son identificables y/o diferenciables de las poblaciones de exosomas a extraer. Por ejemplo, una manera de identificarlos y diferenciarlos de los exosomas sería marcándolos para posteriormente ser detectados.

15 El dispositivo microfluídico 10 de la invención, que está configurado para la extracción de exosomas en función de su diámetro, es tal y como se ha descrito haciendo referencia al método de extracción.

20 En una realización particular, el canal 1 está dividido en partes ensamblables entre sí, teniendo cada parte al menos un orificio para un diámetro de población de exosoma determinado, configurándose el canal 1 con las partes necesarias según el tipo de muestra fluida y/o el número de poblaciones de exosomas a separar.

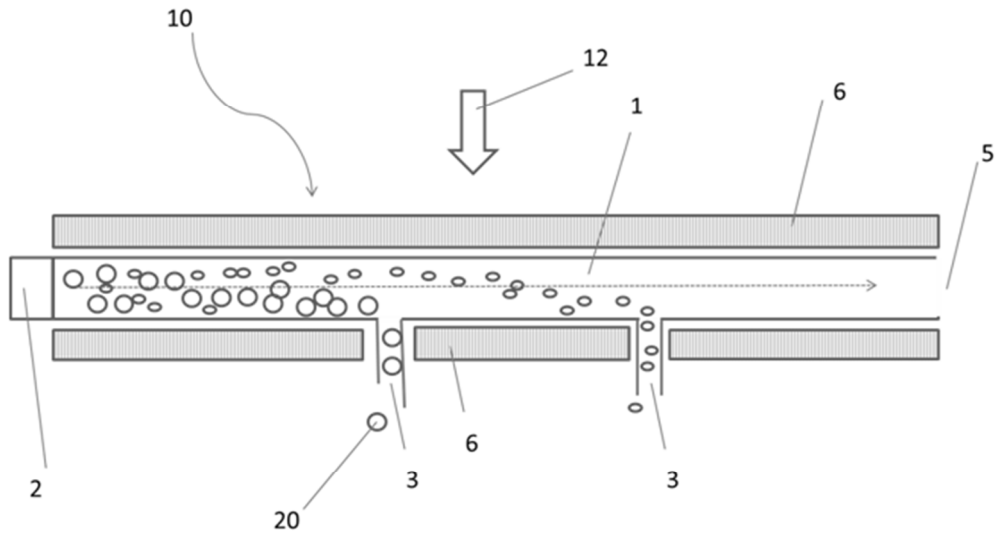
25 En una realización particular, el dispositivo microfluídico comprende además un citómetro de flujo según las características descritas anteriormente, por el cual la muestra fluida y el fluido 7 son introducidos en el canal 1.

30 El dispositivo microfluídico de la invención se utiliza para la extracción de exosomas en función de su diámetro. Esta extracción puede tener múltiples finalidades o usos, tales como la eliminación total de exosomas de una muestra fluida, la concentración de la muestra fluida en un exosoma de tamaño determinado en donde los exosomas a extraer serán aquellos que no interesa mantener en la muestra fluida, o bien para el diagnóstico de enfermedades mediante el aislamiento y detección de exosomas que son biomarcadores de dichas enfermedades.

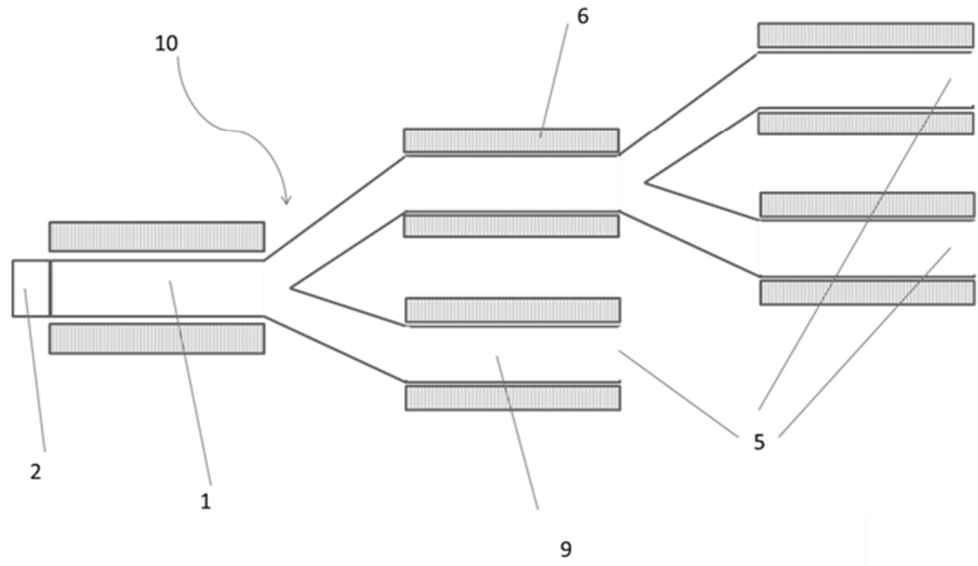
35

## REIVINDICACIONES

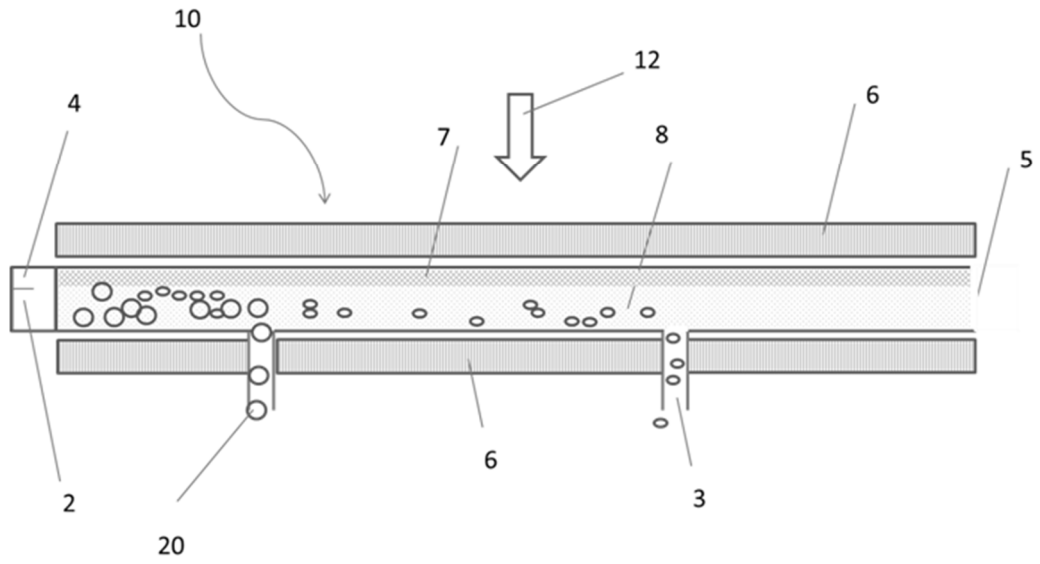
1. Dispositivo microfluídico de extracción de exosomas en función de su diámetro, **caracterizado porque** comprende:
  - 5 - al menos un canal (1) que comprende al menos una entrada (2) para la muestra fluida y al menos dos orificios (3) distribuidos a lo largo del canal (1) que permiten la salida de las poblaciones de exosomas y una salida (5) para la muestra fluida restante; y
  - 10 - medios (6) para generar un gradiente de temperatura en el canal (1), provocando la salida de cada población a través de un orificio (3) distinto.
  
2. Dispositivo microfluídico de extracción de exosomas según la reivindicación 1, en donde el gradiente de temperatura es perpendicular a la dirección del flujo en el canal (1).  
15
  
3. Dispositivo microfluídico de extracción de exosomas según la reivindicación 1 o 2, en donde los orificios (3) se disponen en la zona del canal (1) en donde la temperatura del gradiente es menor, los orificios (3) preferiblemente estando dispuestos de manera alineada a lo largo del canal (1).  
20
  
4. Dispositivo microfluídico de extracción de exosomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el canal (1) comprende al menos una entrada (4) adicional a través del cual se introduce un fluido en el canal (1) junto con la muestra fluida para desplazar dicha muestra fluida a una zona de interés (8).  
25
  
5. Dispositivo microfluídico de extracción de exosomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el canal (1) está dividido en partes ensamblables entre sí, teniendo cada parte al menos un orificio para un diámetro de población de exosoma determinado, configurándose el canal (1) con las partes necesarias según el tipo de muestra fluida y/o el número de poblaciones de exosomas a separar.  
30



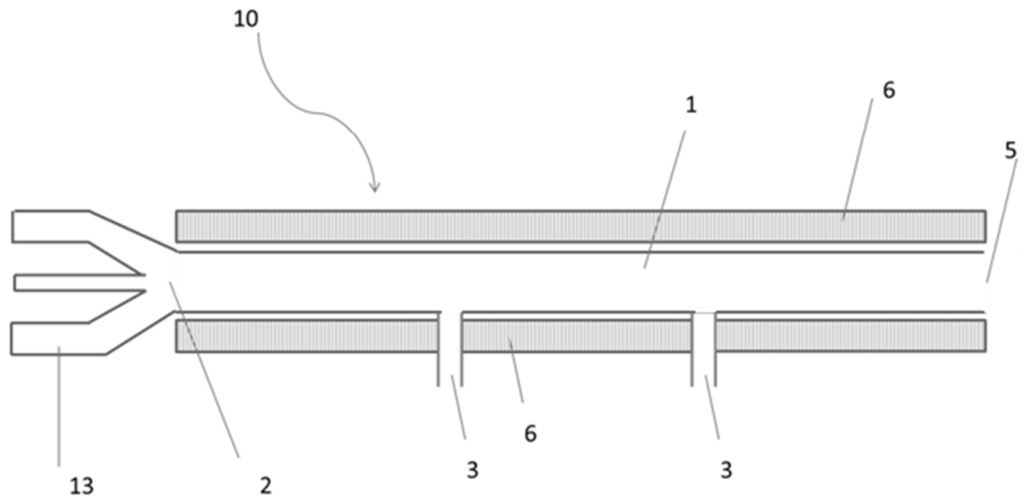
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**