

DESCRIPCIÓN

KIT DE AISLAMIENTO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto portátil y combinado
5 que permitirá obtener moléculas de exosomas activadas, nanopartículas o moléculas de proteínas en ciertos tamaños de diversas fuentes, incluyendo cultivo celular, material biológico, planta, plasma sanguíneo.

En particular, la presente invención se refiere a un producto
10 alternativo único o reutilizable que usa filtración de extremo muerto y sistema de filtración de flujo tangencial, que puede usarse con un único dispositivo médico sin perturbar las condiciones de sistema cerrado para obtener perlas de vidrio para su activación, concentrando moléculas de exosomas, nanopartículas o moléculas de proteína en ciertos intervalos
15 de tamaño para obtener moléculas de exosomas activadas y filtradas, nanopartículas o moléculas de proteína en ciertos intervalos de tamaño.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El desarrollo de estrategias terapéuticas para reparar y regenerar
20 tejidos dañados y restaurar sus funciones normales se ha convertido en el objetivo más importante de la medicina regenerativa con la creciente incidencia de enfermedades degenerativas y traumáticas debido al envejecimiento de la población humana. El desarrollo de tecnologías

innovadoras que pueden regular funciones celulares y activar potenciales de regeneración innatos basados en la ciencia e ingeniería de materiales es una tendencia ascendente y un futuro prometedor dentro del marco de este objetivo.

5

Los organismos multicelulares secretan mensajes químicos que pueden viajar largas distancias a medida que necesitan comunicarse para miles de millones de células para realizar sus funciones simultáneamente. Esta comunicación que las células establecen a través de las moléculas que secretan puede clasificarse como distancia local y larga. La comunicación local es la comunicación de células con otras células en su entorno y cuando llega a reguladores locales tales como neurotransmisores, hormonas y vesículas extracelulares están implicadas activamente en la comunicación a larga distancia. Las vesículas extracelulares son nanovesículas de capa lipídica que secretan sus contenidos biológicos ricos que consisten en microARN, ARNm, ADN y proteínas en el entorno extracelular y también realizan funciones críticas tales como transducción de señales intercelulares y transferencia de material genético. Las vesículas extracelulares se dividen en tres grupos como cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas según su formación biológica, tamaño y origen celular.

20

Durante los últimos años, el potencial de terapias basadas en exosomas ha atraído un gran interés en la medicina regenerativa Cuando

se descubrió por primera vez, aunque el material no deseado por la célula se denominó residuos celulares, se ha demostrado que los exosomas tienen un papel positivo grande en el sistema inmunitario, supresión de la inflamación, aumento de la actividad mitocondrial y muchos eventos metabólicos como resultado de las investigaciones. Los exosomas son vesículas entre 20-130 nm de tamaño, producidas en el plasma por todas las células y segregadas fuera de la célula. El tamaño nanométrico de los exosomas evita que sean fagocitados por macrófagos mononucleares y también les permite pasar fácilmente a través de diversas barreras biológicas tales como la pared del vaso sanguíneo y la barrera hematoencefálica. Los exosomas aceleran la reparación tisular aumentando la proliferación celular, así como la reparación de la piel, el rejuvenecimiento de la piel, reduciendo así la inflamación. También tienen aplicaciones terapéuticas para permitir la regulación de la función inmunológica en el caso de supresión autoinmunitaria e inmunosupresión debido a sus propiedades inmunosupresoras e inmunomoduladoras. Mientras tanto, los exosomas tienen un gran potencial para medicina regenerativa libre de células y son prometedores para realizar nuevos estudios.

20

Aunque los exosomas se liberan de muchos tipos de células, incluyendo células madre, células inmunitarias, células dendríticas, células endoteliales y epiteliales, células cancerosas, también pueden obtenerse a partir de diversos fluidos fisiológicos tales como suero, líquido cerebral y orina, etc. Sin embargo, la introducción de vesículas

25

extracelulares obtenidas por cultivo celular en la práctica clínica se ha evitado por los altos requisitos de regulación para la expansión de células ex vivo. El uso de plaquetas ofrece algunas ventajas en comparación con los EV, especialmente en términos de seguridad y preocupaciones reguladoras. Por un lado, las plaquetas alogénicas se pueden obtener a partir de donaciones de sangre completa como subproducto de la obtención de glóbulos rojos a nivel clínico. Por otro lado, la inhibición de la expansión de células ex vivo, que es de origen humano, y la falta de componentes del medio de crecimiento reduce las preocupaciones sobre la contaminación o la seguridad inmunológica en comparación con las otras fuentes celulares. Por estas razones, aunque comparativamente poca atención se ha dado hasta ahora al uso terapéutico de las EV plaquetarias (pEVs), las plaquetas y sus concentrados ofrecen un recurso potencial para medicina regenerativa que supera las limitaciones de otras fuentes de EV.

Los últimos estudios preclínicos en medicina regenerativa se han centrado en células madre mesenquimales (MSC) durante más de una década debido a su capacidad de diferenciación, potentes propiedades inmunomoduladoras y capacidad de ser cultivadas y manipuladas apropiadamente. Además de la médula ósea, las MSC pueden aislarse de una variedad de tejidos adultos, incluyendo tejido adiposo, líquido amniótico, pulpa dental, placenta, sangre del cordón umbilical, gel de Wharton, e incluso cerebro, riñón, hígado, pulmón, bazo, páncreas y timo. Las MSC pueden diferenciarse en diferentes linajes de origen mesenquimal,

así como múltiples linajes no mesenquimatosos tales como adipocitos, células endoteliales, cardiomiocitos, condrocitos y osteoblastos, así como hepatocitos y células similares a neuronas. La capacidad única de las MSC para proliferar y diferenciarse en diversos fenotipos celulares in vitro ofreció una gran oportunidad para su uso como agentes terapéuticos para curar células necróticas o apoptóticas del tejido conectivo. En última instancia, las MSC se han usado ampliamente en ensayos clínicos como un agente regenerativo para tratar diversas afecciones tales como osteoartritis, fibrosis pulmonar, lesión de la médula espinal, lesión miocárdica, lesión del cartílago de la rodilla, regeneración de la pulpa dental y trasplante de órganos. Además de esto, hay algunos límites a su aplicación de MSC. Aunque se realiza el trasplante de células directas, es difícil predecir la supervivencia celular después de la inyección celular para mantener los efectos resultantes de las interacciones intercelulares y para mantener un almacenamiento celular adecuado. Un número creciente de estudios han revelado que los potentes efectos terapéuticos de las MSC se deben principalmente a sus efectos paracrinos. Los EV extracelulares son los principales efectores paracrinos de MSC y juegan un papel crucial en la comunicación intercelular que se encuentra en diversos fluidos corporales y sobrenadantes celulares. Los EV derivados de MSC tienen una amplia gama de posibles aplicaciones terapéuticas con ventajas sobre la terapia celular, porque tienen la función de protocélulas y tienen menor inmunogenicidad. Numerosos estudios han demostrado que los EV derivados de MSC son curativos en diversas enfermedades incluyendo tumores,

enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, reparación de heridas, etc.

Las células madre adiposas (ASCs) aisladas de tejidos adiposos han surgido como una terapia prometedora para curar múltiples tejidos tales como cicatrización de heridas, injerto de grasa, rejuvenecimiento de la piel, cartílago y regeneración ósea. Las ASCs son particularmente valiosas ya que están fácilmente disponibles del paciente debido a su abundancia en el cuerpo y propiedades de separación favorables. Las ASCs no son solo los precursores de los adipocitos, sino que también son progenitores multipotentes de diversas células, incluyendo osteoblastos, condrocitos, miocitos, células epiteliales y células neuronales. Los exosomas derivados de ASC llevan el contenido específico de las ASCs principales, incluyendo ADN, ARN, lípidos, citocinas y enzimas. Los exosomas ASC pueden proteger su carga intacta, son altamente estables en suero y sangre, administrando así eficazmente la carga a las células diana. Los exosomas ASC se usan como vehículos para la reparación y regeneración de células dañadas y se piensa que organizan los eventos necesarios para la regeneración tisular, la función inmunitaria, la homeostasis tisular y el desarrollo del destino celular. Por esta razón, aunque los exosomas ASC no son capaces de diferenciación, pueden imitar la capacidad de las ASCs para terapia innovadora sin células tales como regeneración y reparación de tejidos, reducción de lesiones e inflamación. Los exosomas de ASC son agentes terapéuticos potencialmente más seguros que los ASCs. Además, tienen ciertas ventajas sobre las ASCs en la producción, almacenamiento, vida

útil, suministro y productos biológicos potencialmente listos para usar. Los exosomas de ASC pueden evitar los problemas asociados con la terapia celular, incluyendo la supervivencia celular limitada, la eficacia de rechazo inmune y la inestabilidad genética relacionada con el envejecimiento en comparación con las ASCs.

PRP, que significa plasma rico en plaquetas, es un derivado autólogo de altas cantidades de plaquetas humanas en un pequeño volumen de plasma obtenido a partir de la centrifugación de sangre completa, se usa en el tratamiento de diversas enfermedades tales como la cicatrización de heridas y la reparación del tejido conectivo aumentando la proliferación celular y, por lo tanto, la frecuencia de su aplicación está aumentando. Las plaquetas se usan ampliamente en aplicaciones terapéuticas ya que secretan moduladores de la matriz extracelular, junto con biomoléculas tales como factores de crecimiento y citocinas, que soportan la proliferación celular, revascularización y restauración del tejido dañado y la activación de células madre mesenquimales. Aunque se usa principalmente para fines cosméticos y antienvjecimiento, recientemente se ha comenzado a usarse particularmente en enfermedades del sistema musculoesquelético. Los resultados de los estudios clínicos no solo mostraron que los tratamientos de PRP son prometedores, sino que también revelaron que hay algunas desventajas y limitaciones con respecto a su uso que deben tenerse en cuenta. El uso clínico de concentrados de plaquetas es realmente limitado, principalmente debido a sus desventajas principales tales como métodos de separación no estandarizados,

variabilidad entre donantes, o falta de reproducibilidad debido a condiciones de almacenamiento. Además, algunos pacientes, tales como pacientes con cáncer o usuarios de tabaco, pueden no ser apropiados para tales intervenciones debido a su historial médico. Estas desventajas, combinadas con la falta de control de calidad, conducen a una alta heterogeneidad de los concentrados obtenidos. Por esta razón, las vesículas extracelulares derivadas de plaquetas (pEVs) son una alternativa prometedora para eliminar las limitaciones de PRP y otros concentrados de plaquetas ya que proporciona un producto controlado listo para usar.

Los pEVs, definidos como partículas procoagulantes liberadas por plaquetas activadas, ofrecen un potencial importante en los tratamientos de medicina regenerativa. Los estudios en este campo también han aumentado con el creciente interés en p-EVs, se ha entendido que los pEVs están implicados en la hemostasia, la integridad vascular, la inmunorregulación y la regulación inflamatoria y tienen diversas funciones. En particular, se han evaluado diferentes enfoques en casos de lesión y traumatismo, y también se ha observado que tiene efectos restaurativos en el sistema musculoesquelético y entorno neuronal. Se considera que los p-EVs pueden superar las limitaciones del concentrado de plaquetas e incluso pueden proporcionar algunas ventajas deseables que pueden aumentar los beneficios de su uso clínico. Por ejemplo, los pEVs no solo comparten la función plaquetaria, sino que también son más fuertes en términos de coagulación o capacidad osteogénica. Cuando se considera más allá de la

hemostasia, el contenido de pEVs es increíblemente diverso y puede incluir lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y orgánulos implicados en muchos otros procesos biológicos. Además, aunque las plaquetas no pueden atravesar barreras de tejido, sus EV pueden entrar en la linfa, médula ósea y líquido sinovial y, de manera similar a los otros tipos de EV, se espera que sean capaces de atravesar otras barreras de tejido, incluyendo la barrera hematoencefálica. Esto permite la transferencia de contenido derivado de plaquetas a receptores celulares y órganos a los que no se puede acceder mediante plaquetas.

10

Una de las principales áreas de aplicación de pEVs, que proporciona un potencial importante en los tratamientos de medicina regenerativa, es lesiones y heridas. El proceso de cicatrización de heridas está relacionado con un aumento en la migración y proliferación de fibroblastos y células de queratinocitos in vitro. Se cree que estos efectos están relacionados con la carga de pEVs positivas para diferentes factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores básicos de crecimiento de fibroblastos (FGF2), el factor de crecimiento transformante-(TGF β) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Un estudio en un modelo de rata diabético confirma que los pEVs pueden mejorar la proliferación, migración y angiogénesis de células endoteliales vasculares a través de la activación de la proteína asociada a Sí (YAP) y, por lo tanto, confirma que promueve la cicatrización de heridas in vivo. Además de sus propiedades de cicatrización de heridas, los pEVs también están

25

implicados en la respuesta inflamatoria. Los estudios informan que los pEVs ofrecen un efecto antiinflamatorio en macrófagos estimulados, reduciendo la liberación de citocinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o la interleucina 10 (IL -10). Además de estos, se ha informado que los pEVs están implicados en la respuesta neuroregenerativa y la regeneración musculoesquelética. Los estudios de condrocitos tratados con pEV han demostrado que los pEVs provocan un aumento en la proliferación y la migración celular mediante la activación de la vía de señalización de Wnt/catenina, también una disminución en la respuesta proinflamatoria y la tasa de apoptosis inducida por afecciones inflamatorias. Cuando se tienen en cuenta los resultados del estudio preclínico mencionados anteriormente, es posible decir que las terapias basadas en PRP-EV son prometedoras para futuras aplicaciones clínicas de regeneración tisular.

15

El proceso de activación de plaquetas está estrechamente relacionado con la liberación de exosomas derivados de plaquetas. Los métodos de activación química se han usado ampliamente como el método de activación en la bibliografía. Existen diversos métodos de activación mecánica tales como sonicación y centrifugación como una alternativa a los métodos químicos. La activación de plaquetas causada por diferentes factores de activación (físico/químico) conduce a la liberación de pEVs que difieren en tamaño y contenido, pero también aumenta la liberación del exosoma.

25

Las vesículas liberadas por las plaquetas bajo fuerzas mecánicas o en presencia de reactivos bioquímicos tales como trombina difieren en términos de su contenido y propiedades. Por ejemplo, mientras que la activación de plaquetas por trombina o colágeno crea diferencias visibles en términos de proteínas en el contenido de exosomas, las plaquetas activadas por métodos mecánicos proporcionan más liberación de exosomas al entorno externo bajo la tensión que están expuestas.

Hoy en día, existen nuevos métodos y nuevos kits desarrollados para aislar exosomas y EV Diferencial y ultracentrifugación, inmunoafinidad, cromatografía de eliminación de tamaño, ultrafiltración y precipitación basada en polímero se encuentran entre los métodos más ampliamente usados para obtener EV y exosomas de fuentes animales y vegetales Sin embargo, cada método de aislamiento afecta a los exosomas dependiendo del tipo de aislamiento de acuerdo con la densidad, forma, escala y proteínas de superficie. Mientras tanto, dado que los exosomas varían en función, tamaño y contenido y son complejos en estructura, la probabilidad de obtener exosomas completamente aislados de alta pureza es baja. En particular, la principal desventaja del método de ultracentrifugación es que no aísla los exosomas puros y la recuperación final del exosoma es un bit bajo, también el proceso tarda 2-3 días. Es difícil usar el método de precipitación de polímero clínicamente porque hay una fase de eliminación de polímero en la misma. La principal desventaja del método de cribado de tamaño es el tiempo de proceso largo, que limita las aplicaciones de aislamiento cromatográfico para procesar una pluralidad

de muestras biológicas. El método de aislamiento de afinidad inmunitaria no es aplicable para grandes volúmenes de muestra. Además, las vesículas aisladas pueden perder su actividad funcional.

5 Debido a las desventajas mencionadas anteriormente y a la insuficiencia de los diseños de productos actuales con respecto a la materia objeto, se requiere un desarrollo en el campo técnico relevante.

OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a un kit de aislamiento que cumple con los requisitos mencionados anteriormente, elimina todas las desventajas y aporta algunas ventajas adicionales.

15 El objetivo principal de la presente invención es permitir la activación, filtración y concentración de un material biológico en un entorno cerrado con un único dispositivo. El dispositivo proporciona facilidad de uso en un entorno tal como una sala de operaciones porque puede funcionar en un entorno cerrado y es portátil.

20 Otra ventaja indirecta de la presente invención es que mientras se obtiene una molécula de un cierto tamaño, el volumen del líquido se reduce, concretamente, su concentración se incrementa filtrando las

moléculas de tamaños no deseados y filtrando el exceso de agua. La filtración se lleva a cabo típicamente para separar, clarificar, modificar y/o concentrar una solución, mezcla o suspensión líquida. La filtración proporciona que los tamaños de partícula no deseados y las moléculas solubles se separan de los exosomas. La población de exosomas se concentra por el elemento de filtro durante el proceso. La filtración de flujo tangencial (TFF) es un método que combina filtración y flujo de membrana permeable para obtener una concentración eficiente de EV a partir de una matriz coloidal. El TFF difiere de la filtración tradicional ya que fluye tangencialmente a lo largo de la superficie del líquido y evita la formación de torta de filtración, permitiendo así que se obtengan exosomas con alta eficiencia.

Otro objetivo de la invención es asegurar que las moléculas en los intervalos de tamaño deseados se puedan obtener proporcionando que las moléculas de tamaño no deseado y el agua en el líquido puedan evacuarse.

El objetivo principal de la presente invención es asegurar que se puedan obtener exosomas, nanopartículas o moléculas de proteína con alta capacidad de activación, especialmente para su uso en la producción de nanopartículas sin cambiar el medio a partir del cual se toman fluidos biológicos, por ejemplo, sin necesidad de transferirlos al laboratorio.

Otro objeto de la presente invención es desarrollar un kit que permita obtener la transferencia de exosomas/nanopartículas/proteínas, sin contacto con el aire, a la persona, especialmente para su uso en la obtención de nanopartículas de ciertos tamaños, eliminando el riesgo de infección y contaminación.

5

Otro objetivo de la presente invención es desarrollar un kit que permita obtener las nanopartículas con la ayuda del sistema cerrado a transferir a la persona sin perder su estabilidad y eficacia.

10

Otro objetivo de la presente invención es desarrollar un kit en el que se puedan obtener exosomas en una forma activada en un sistema cerrado, especialmente sin pérdida de capacidad regenerativa.

15

Otro objetivo de la presente invención es desarrollar un kit en el que se puedan obtener nanopartículas de ciertos tamaños basándose en métodos mecánicos sin exponerse a ninguna etapa o polímero químico o biológico.

20

Otro objetivo de la presente invención es desarrollar un kit que proporcione un entorno cerrado con un sistema de filtro, elimina partículas no deseadas con un cartucho de filtro de flujo tangencial, y aumenta la activación de perlas de vidrio y nanopartículas en el fluido

biológico, permite la administración del producto final con una alta capacidad regenerativa a la persona.

Otro objetivo de la presente invención es desarrollar un kit con
5 alta eficiencia, bajo coste y uso práctico para la extracción y concentración de exosoma/nanopartícula/proteína.

Las características estructurales y características de la presente invención se entenderán claramente por la siguiente descripción
10 detallada. Por lo tanto, la evaluación se realizará tomando en consideración esta descripción detallada.

Figuras Clarificantes de la Invención

15 La Figura 1 es una vista en perspectiva despiezada del kit de aislamiento de la invención,

La Figura 2 es la vista en sección transversal del kit de aislamiento de la invención, tomada paralela al plano x-y,

La Figura 3 es la vista en sección transversal del kit de
20 aislamiento de la invención, tomada paralela al plano y-z desde el eje del puerto de entrada número 3,

La Figura 4 es la vista en sección transversal del kit de aislamiento de la invención, tomada paralela al plano y-z desde el eje del puerto de entrada número 7,

5 La Figura 5 es la vista en sección transversal del kit de aislamiento de la invención, tomada paralela al plano x-y desde el eje del puerto de entrada número 7,

La Figura 6 es una vista en perspectiva del estado cerrado del kit de aislamiento de la invención,

10 La Figura 7 es una vista en perspectiva de la capa intermedia del kit de aislamiento de la invención,

La Figura 8 es una vista en perspectiva inferior de la cubierta superior del kit de aislamiento de la invención,

La Figura 9 es una vista en perspectiva superior de la cubierta superior del kit de aislamiento de la invención,

la Figura 10 es una vista en perspectiva de la cámara de activación,

La Figura 11 es una vista en perspectiva de la cámara de filtración,

La Figura 12 es una vista en perspectiva superior de la cubierta inferior del kit de aislamiento de la invención,

20 La Figura 13 es una vista en perspectiva del elemento de filtro,

La Figura 14 es una vista en sección transversal del elemento de filtro,

La Figura 15 es una vista en perspectiva inferior de la capa intermedia del kit de aislamiento de la invención.

5

Referencias de partes

1. Número de puerto de entrada 1
2. Número de puerto de entrada 2
3. Orificio de entrada número 3
- 10 4. Número de puerto de entrada 4
5. Número de puerto de entrada 5
6. Número de puerto de entrada 6
7. Número de puerto de entrada 7
8. Cámara de activación
- 15 9. Elemento de conexión número 1
10. Elemento de conexión número 2
11. Perlas de vidrio
12. Elemento filtrante
13. Elemento de conexión número 3

- 14. Cámara de filtración
- 15. Elemento filtrante tangencial
- 16. Elemento de conexión número 4
- 17. Elemento de conexión número 5
- 5 18. Kit de aislamiento
- 19. Lengüeta
- 20. Sistema de estabilización 1
- 21. Comedero Estabilizador 2
- 22. Cubierta inferior
- 10 23. Cubierta superior
- 24. Ranura de lengüeta
- 25. Capa intermedia
- 26. Hueco de lengüeta
- 15 a. Se retira del puerto de entrada número 2 y se fija al puerto de entrada número 3.
- b. Se retira del puerto de entrada número 4 y se fija al puerto de entrada número 5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En esta descripción detallada, el kit de aislamiento de la invención (18) se describe solo para clarificar el objeto de una manera tal que no se crea ningún efecto limitante.

5

En particular, el kit de aislamiento (18) de la invención se ha desarrollado para obtener exosomas, nanopartículas o proteínas puras. Hay 3 etapas diferentes en el diseño del producto:

1. Activación

10 2. Filtración de extremo muerto

3. Filtración tangencial al flujo

Se refiere a un producto adecuado para uso único o repetido, que se basa en perlas de vidrio para activación, filtración de extremo muerto y unidades de filtración de flujo tangencial para eliminar residuos celulares no deseados, que pueden realizar el proceso de filtración con un solo dispositivo con alta eficiencia sin perturbar las condiciones de sistema cerrado.

20 La obtención de una exosoma, nanopartícula o proteína concentrada y lista para aplicar exosomas, nanopartículas o proteínas que se ha activado, purificado a partir de moléculas no deseadas, utilizando el

kit de la invención, brevemente, el principio de funcionamiento del kit de aislamiento de la invención es el siguiente:

El material de origen se obtiene a partir de una variedad de fuentes, incluyendo cultivo celular, material biológico, planta, plasma sanguíneo. El material de origen obtenido se llena en una jeringa con una punta Luer Lock. La jeringa llena con material fuente se conecta al puerto de entrada número 1 (1) ubicado en la superficie superior del kit de aislamiento (18). Otra jeringa hueca estéril con entrada Luer Lock se conecta al puerto de entrada número 2 (2) en la superficie superior del kit de aislamiento (18). El material de origen se transfiere aproximadamente 15-20 veces, primero desde 1 a 2, y luego desde 2 a 1, mediante émbolos de jeringa, entre la jeringa en el puerto de entrada número 1 (1) y la jeringa en el puerto de entrada número 2 (2). Esta transferencia del material de origen entre las jeringas se proporciona a través de la cámara de activación (8) llena de perlas de vidrio (11). La conexión del número de puerto de entrada 1 (1) a la cámara de activación (8) es proporcionada por el elemento de conexión número 1 (9), la conexión del número de puerto de entrada 2 (2) a la cámara de activación (8) es proporcionada por el elemento de conexión número 2 (10).

El material de origen se expone a una alta tensión de flujo con la ayuda de las perlas de vidrio de calidad médica (11) ubicadas en la cámara de activación (8), por lo tanto, se pretende aumentar las liberaciones de exosomas o proteínas aumentando la activación del material de origen por medios mecánicos por medio de las perlas de vidrio de calidad médica (11). Los materiales no deseados, los desechos celulares o las proteínas de alta dimensión también están presentes en el líquido durante esta activación

El material del proceso de activación se recoge en la jeringa conectada al puerto de entrada número 2 (2) En esta etapa, puede haber moléculas no deseadas o residuales en el material activado obtenido Aquí, la jeringa, que se une al puerto de entrada número 2 (2) y se llena con el material activado, se "retira del puerto de entrada número 2 (2) y se une al puerto de entrada número 3 (3)" (a) para filtrar estas moléculas no deseadas, otra jeringa estéril y vacía se une al puerto de entrada número 4 (4) Se asegura que todo el material en la jeringa pase a la jeringa estéril y vacía, que se conecta al puerto de entrada número 4 (4) presionando el émbolo de la jeringa, que se activa y se llena con moléculas no deseadas/residuales, que se retiran del puerto de entrada número 2 (2) y se unen al puerto de entrada número 3 (3). La conexión entre el puerto de entrada número 3 (3) y el puerto de entrada número 4 (4) es proporcionada por el elemento de filtro (12) y el elemento de conexión número 3 (13). El material activado y filtrado, es decir, material purificado a partir de residuos celulares o proteínas de alta

dimensión, se obtiene en la jeringa que se conecta al puerto de entrada número 4 (4) como resultado de este proceso.

Como etapa final, el elemento de filtrado de flujo tangencial (15) en la cámara de filtración (14) se ubica dentro del dispositivo se usa para obtener exosomas concentrados, nanopartículas o proteínas del material activado y filtrado, es decir, para eliminar el líquido dentro del material. En dicha cámara de filtración (14) se utiliza el principio de filtración conocido como filtración de flujo tangencial (filtración de flujo cruzado o filtración de flujo tangencial/TFF).

Desde la jeringa, que está conectada al puerto de entrada número 3 (3) en la etapa anterior y contiene el material activado, a la jeringa, que se filtra y se transfiere a la jeringa vacía conectada al puerto de entrada número 4 (4), por medio del elemento de filtro (12), y por lo tanto se llena con el material activado y filtrado, se retira del puerto de entrada número 4 (4) y se une al puerto de entrada número 5 (5)_(b) Las jeringas estériles vacías están conectadas al puerto de entrada número 6 (6) y al puerto de entrada número 7 (7) La conexión del número de puerto de entrada 5 (5) a la cámara de filtración (14) es proporcionada por el elemento de conexión número 4 (16), y la conexión del número de puerto de entrada 6 (6) a la cámara de filtración (14) es proporcionada por el elemento de conexión número 5 (17) La transferencia se realiza entre la jeringa con el material de fuente activado y filtrado retirado

del número de puerto de entrada 4 (4), insertado en el puerto de entrada número 5 (5) y la jeringa vacía unida al puerto de entrada número 6 (6) hasta que se obtiene el volumen deseado de exosoma, nanopartícula o molécula de proteína. El líquido (agua) y las moléculas pequeñas en el material salen del puerto de entrada número 7 (7) durante esta transferencia. El objetivo de este proceso es concentrar las moléculas activadas y filtradas. El líquido que contiene las moléculas se filtra por medio del cartucho de filtro de flujo tangencial durante la concentración, las moléculas muy pequeñas seleccionadas y el líquido se filtran con esta filtración y el material se concentra. Por esta razón, aunque se realiza la transferencia entre la jeringa unida al puerto de entrada 5 (5) y la jeringa unida al puerto de entrada 6 (6), estas moléculas, que podemos llamar no deseadas o residuos y cuyas dimensiones moleculares son más pequeñas que las moléculas de exosomas, nanopartículas o proteínas que queremos obtener, se filtran por el elemento de filtro de flujo tangencial (15) y se llenan en la jeringa conectada al puerto de entrada número 7 (7). El material que llena la jeringa conectada al puerto de entrada número 7 (7) es el material residual no deseado. Se recogen exosomas, nanopartículas o proteínas listas para la administración y la jeringa se retira del kit de aislamiento para su administración en la jeringa conectada al número de puerto 6 (6).

La vista en perspectiva despiezada del kit de aislamiento de la invención (18) se ilustra en la **Figura 1**. Aunque en esta figura se puede

ver esquemáticamente un total de 7 jeringas, la jeringa unida al puerto de entrada número 2 (2) como se describió anteriormente y se muestra como a y b en la figura, se toma aquí y se une al puerto de entrada número 3 (3). Además, el material transferido al puerto de entrada número 4 (4) al ser filtrado a una vez desde la jeringa unida al puerto de entrada número 3 (3) se llena en la jeringa aquí. La jeringa unida al puerto de entrada número 4 se retira de aquí y se une al puerto de entrada número 5 para la siguiente operación de filtración tangencial. En resumen, durante estos procesos se usan un total de 5 jeringas diferentes. **La Figura 2** muestra la vista en sección transversal del kit de aislamiento de la invención, tomada paralela al plano x-y justo debajo de la cubierta superior. En este dibujo, se observan el alimentador estabilizador 1 (20) y el alimentador estabilizador 2 (21) ubicados en la cubierta superior (23) y que proporciona la ropa de cama a la cámara de activación (8) y la cámara de filtración desde la parte superior cuando la cubierta superior (23) está cerrada.

La vista en sección transversal del kit de aislamiento de la invención, tomada paralela al plano y-z desde el eje del número de orificio de entrada 3 (3) se ilustra en la **Figura 3**. Las perlas de vidrio (11) en la cámara de activación (8), el elemento de filtro (12) y el elemento de filtro de flujo tangencial (15) en la cámara de filtración (14) se pueden ver en este dibujo.

La vista en perspectiva del estado cerrado del kit de aislamiento de la invención se ilustra en la **Figura 6**. Se puede ver en este dibujo un total de 7 entradas de jeringa en el kit de aislamiento.

5 Una vista en perspectiva de la capa intermedia (25) del kit de aislamiento (18) de la invención se ilustra en la **Figura 7**. La capa intermedia (25) colocada entre la cubierta inferior (22) y la cubierta superior (23) proporciona ropa de cama a la cámara de activación (8) y la cámara de filtración (14). El elemento de conexión número 3 (13)

10 también se coloca en dicha capa intermedia (25). Además, se forman huecos de lengüeta en dicha capa intermedia (25) de acuerdo con las posiciones de las lengüetas (19) de modo que las lengüetas (19) posicionadas circunferencialmente en la cubierta superior puedan alcanzar las ranuras de lengüeta (24) en la cubierta inferior.

15

Las lengüetas (19) en la cubierta superior (23) del kit de aislamiento de la invención (18) se pueden ver en la Figura 8. El montaje de la cubierta inferior (22) y la cubierta superior (23) entre sí se logra enganchando las lengüetas (19) en la cubierta superior (23) en las

20 ranuras de lengüeta (24) en la cubierta inferior (22).