(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 065 030**

(21) Número de solicitud: 202530844

(51) Int. CI.:

B01L 3/00 (2006.01)
G01N 23/00 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN B2

(22) Fecha de presentación:

17.09.2025

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

30.04.2026

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

30.07.2026

Fecha de concesión:

23.10.2026

(45) Fecha de publicación de la concesión:

30.10.2026

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (60,00%)
Av. Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES;
INSTITUT DE BIOENGINYERIA DE CATALUNYA (IBEC) (35,00%) y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (5,00%)

(72) Inventor/es:

SÁNCHEZ PARCERISA, Daniel;
GUTIÉRREZ UZQUIZA, Álvaro;
BRAGADO DOMINGO, Paloma;
PORRAS GALLO, María Almudena;
VELASCO DÍEZ, Guillermo;
ORTEGA MACHUCA, María Alejandra;
CORTÉS LLANOS, Belén y
MARCO RIUS, Irene

(54) Título: **Dispositivo microfluídico para estudios de radioterapia o radiobiología**

(57) Resumen:

Dispositivo microfluídico para estudios de radioterapia o radiobiología.

Los dispositivos de tejido en un chip (tissue-on-a-chip) son herramientas potentes para estudiar y modelar las respuestas de los tejidos a la radiación ionizante en un entorno controlado y fisiológicamente relevante. Hasta la fecha, todos ellos se refieren a irradiaciones utilizando fotones (rayos X y rayos gamma), lo que se considera radioterapia convencional. Existe la necesidad de salvar algunos impedimentos técnicos que permitan realizar experimentos de radiobiología en numerosas condiciones, de forma estandarizada y siendo válidos los protocolos para cualquier tipo de irradiador, abierto o cerrado, de haz continuo o pulsado, de haz plano o gaussiano, con protones, electrones o fotones.

La presente invención describe un dispositivo que consiste en un chip microfluídico formado por capas y diseñado para realizar experimentos de radiobiología en dianas biológicas 2D y 3D utilizando diferentes fuentes de radiación (fotones, electrones, protones y otros iones).

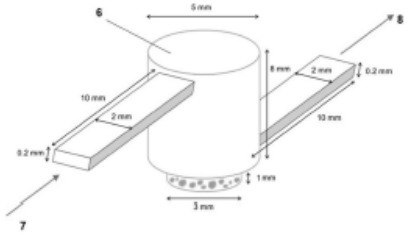


Figura 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 3 065 030 B2

DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfluídico para estudios de radioterapia o radiobiología

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere a un dispositivo microfluídico que imita la arquitectura y la función de los tejidos humanos. De forma más concreta, describe un chip para realizar experimentos de radiobiología en dianas biológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los dispositivos de tejido en un chip (*tissue-on-a-chip*), también conocidos como modelos de órganos en un chip (*organ-on-a-chip*), son sistemas microfluídicos de vanguardia que imitan la arquitectura y la función de los tejidos humanos. En la investigación de radioterapia estos dispositivos han surgido como herramientas potentes para estudiar y modelar las respuestas de los tejidos a la radiación ionizante en un entorno controlado y fisiológicamente relevante. Permiten la integración de múltiples tipos de tejidos, como células tumorales y tejidos sanos circundantes, para simular mejora la dinámica compleja del daño y la reparación de la radiación. Al incorporar características avanzadas como tejidos en 3D, redes microvasculares y flujo de fluidos dinámico, estos modelos brindan una representación más precisa de cómo la radiación interactúa con los tejidos humanos en comparación con los cultivos de células 2D tradicionales.

Los avances recientes han permitido el desarrollo de sistemas multitejidos que pueden simular interacciones de órganos completos y hacer un seguimiento de los efectos a largo plazo de la radiación, como la fibrosis, la inflamación y las respuestas inmunitarias. Estos dispositivos también permiten un cribado de alto rendimiento de combinaciones de radioterapia, incluidos nuevos radiosensibilizadores y agentes protectores, que pueden probarse en diferentes condiciones de dosimetría. Además, la integración de sensores y capacidades de obtención de imágenes en tiempo real en estos chips proporciona información valiosa sobre los cambios celulares y moleculares durante y después de la exposición a la radiación.

En general, la tecnología de tejido en chip está preparada para revolucionar la investigación en radioterapia, al ofrecer modelos más predictivos y personalizados de la respuesta del tejido, acelerando potencialmente el desarrollo de tratamientos más efectivos y menos tóxicos.

Hasta la fecha, se han realizado diferentes estudios de radioterapia, tanto *in vitro* como *ex vivo* (Chermat. R. et al. *Radiotherapy on-chip: microfluidics for translational radiation oncology*. Lab Chip, **2022**, 22**,** 2065-2079). Todos ellos se refieren a irradiaciones de chip utilizando fotones (rayos X y rayos gamma) en campos grandes y planos, lo que se considera radioterapia convencional.

Sin embargo, no se ha planteado el uso de la tecnología *tissue-on-a-chip* para nuevas modalidades de irradiación que, generalmente, provienen de aceleradores de investigación o preclínicos con tamaños de campo más pequeño o no planos. Por ejemplo, el irradiador de rayos X de tasa de dosis ultra alta (Espinosa – Rodríguez. A. et al. *Design of an X-ray irradiator based on a standard imaging X-ray tube with FLASH dose-rate capabilities for preclinical research*. Radiation Physics and Chemistry, **2023**, 206, 110760) podría ser útil para investigar sobre el conocimiento de la radioterapia FLASH pero produce un campo intenso con una forma asimétrica casi gaussiana. Otra posible aplicación sería la radioterapia de protones con los aceleradores de partículas, como el acelerador de tipo tándem de 10 MV en CMAM (Viñals, S. et al. *Characterization of the proton pulsed beam at CMAM*. In EPJ Web of Conferences, **2021**, Vol. 253, p. 04027), que producen haces de tipo gaussiano de forma finita.

Para garantizar una dosis homogénea en un campo de interés con un haz no homogéneo es necesario adaptar el tamaño de los objetivos biológicos al área máxima del perfil del haz para el que la dosis es homogénea. En particular, si la dosis tiene que administrarse simultáneamente al objetivo completo. Sin embargo, los objetivos biológicos pequeños (como los pocillos de cultivo que se utilizan en la tecnología *tissue-on-a-chip*) son difíciles de manejar, sembrar y procesar.

Además, los haces de radioterapia producidos por los aceleradores de investigación de protones (y otros tipos de radiación) a menudo tienen una orientación horizontal, por lo que requieren que las muestras biológicas (como chips) se coloquen en posición vertical durante un largo periodo de tiempo. Por lo tanto, los chips tienen que garantizar

que las muestras permanezcan en buenas condiciones (hidratación, nutrientes, nivel de oxígeno) durante todo el experimento, también en orientación vertical.

Finalmente, algunas modalidades de radiación (como protones o electrones de baja energía) tienen un rango de penetración muy bajo y, por lo tanto, los sustratos microfluídicos estándar no son adecuados para la irradiación en estas modalidades de radiación, que esta radiación que pasa a través del sustrato no alcanzaría los objetivos biológicos.

Por todo ello, siendo deseable avanzar en el desarrollo de la tecnología *tissue-on-a-chip* para ampliar su aplicación, existe la necesidad de salvar algunos impedimentos técnicos que permitan realizar experimentos de radiobiología en numerosas condiciones, de forma estandarizada y siendo válidos los protocolos para cualquier tipo de irradiador, abierto o cerrado, de haz continuo o pulsado, de haz plano o gaussiano, con protones, electrones o fotones.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe la aplicación de dispositivos microfluídicos diseñados para realizar experimentos de radiobiología en dianas biológicas 2D y 3D utilizando diferentes fuentes de radiación (fotones, electrones, protones y otros iones). Así mismo, la invención se refiere al procedimiento de realización de experimentos de irradiación de dianas biológicas, incluyendo la preparación de la muestra, la irradiación y el post-procesamiento.

La principal ventaja del dispositivo fluídico para radioterapia (en adelante, RTchip) es su universalidad ya que puede utilizarse con diferentes tipos de irradiadores (electrones y protones clínicos, aceleradores de investigación de protones o iones pesados, fuentes radiactivas de rayos gamma, etc.) lo cual es debido a sus características técnicas únicas que se detallan a continuación.

Los pocillos constan de regiones diferenciadas con anchos constantes variables. Este diseño permite reducir el tamaño de la muestra, haciéndolo compatible con haces gaussianos de escala milimétrica, al tiempo que permite una fácil manipulación de la muestra en el pocillo utilizando instrumentos estándar. Además, aumenta la tensión

superficial, lo que permite utilizar el RTchip para en posición vertical con haces horizontales.

Las ventanas de irradiación que a su vez se utilizan para el cultivo de muestras biológicas es extremadamente fina, lo que permite su uso incluso con fuentes de radiación de alcance ultracorto. Además, está fabricado con materiales no activables (lo que garantiza que el RTchip no se vuelva radiactivo, incluso después de una irradiación intensa) y está recubierto con una superficie hidrófila para obtener mejores resultados.

Las cámaras donde las muestras biológicas están posicionadas presentan una estructura de doble cilindro, cuyas dimensiones garantiza su correcta aplicación en irradiaciones en diversos sistemas, así como también la correcta colocación de las muestras dentro de la misma

El RTchip está diseñado para maximizar la superficie útil, y a su vez, encajar dentro de un volumen de radio reducido, como la cámara de irradiación cilíndrica de los irradiadores de rayos gamma.

El RTchip está diseñado para ser flexible, fácil de modelar y adherir. Los materiales elegidos son transparentes, lo que permite el control óptico de las células. Para garantizar una adhesión uniforme de las células en los pocillos y resistente a la adsorción de pequeñas partículas (que de otro modo podrían interferir con el experimento) la superficie del chip se vuelve hidrófila. Esta superficie hidrófila evita la formación de burbujas que podrían alterar el cultivo celular y afectar a los resultados experimentales.

El RTchip está formado por capas:

- La capa inferior está dotada de un portaobjetos fino de espesor por debajo de 250 micrometros, sobre el que se depositan las células o tejidos.

- Una capa con pocillos define el área de cultivo celular y protege a las células del esfuerzo cortante causado por las entradas de medios. Esta capa consta de, al menos, una capa con pocillos con diferentes formas (cilíndrica, cónica,

de doble cilindro), alineada con la capa inferior.
Los pocillos pueden tener diferentes formas (cilíndrica, troncocónica, etc.) y, a su vez, consistir en una doble capa (Figura 3b) o una única capa solo o apilada sobre sobre otra capa de pocillos.

- Una capa microfluídica que está alineada centralmente con la capa inferior de cultivo celular cuyos los canales tienen un tamaño uniforme y están diseñados para mantener una resistencia igual, lo que garantiza una distribución uniforme del medio.

- Finalmente, una capa superior que actúa de tapa que sella el chip para formar un sistema cerrado.

El RTchip podría utilizarse para realizar experimentos de radiobiología en numerosas condiciones, de forma estandarizada y siendo válidos los protocolos para cualquier tipo de irradiador, abierto o cerrado, de haz continuo o pulsado, de haz plano o gaussiano, con protones, electrones o fotones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Esquema del sistema de perfusión en un pocillo de cilindro doble (6) con entrada en el cilindro superior (7) y salida a través del cilindro inferior (8) del pocillo.

Figura 2.- Capas de los elementos que forman parte del chip microfluídico para uso en configuración 2D y 3D para todos los irradiadores: (1) portaobjetos; (2) capa de pocillos; (3) tapa superior; (4) bomba peristáltica y (5) recolector.

Figura 3.- Diferentes formas de pocillos para la siembra de células 2D: a) cilindro; b) cilindro de doble capa; c) pocillo troncocónico.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCIÓN

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1.

Este ejemplo muestra un chip diseñado para ser irradiado por un haz de protones de 10 MeV. El haz es horizontal por lo que el chip debe colocarse en vertical, ubicado desde el lado de la membrana más cerca del irradiador, de modo que solamente la membrana es el obstáculo entre las células y el campo de protones.

El chip dispone de un cubreobjetos de vidrio con un espesor por debajo de 130 micrones al que se incorpora una membrana muy delgada para permitir el paso de la energía de los protones irradiados. El espesor de la membrana es fundamental para garantizar que la radiación penetre de manera efectiva sin atenuación significativa y así conseguir que llegue la dosis requerida a las células.

Para mitigar los riesgos de evaporación debido al pequeño volumen de medio en cada pocillo y al calor que provoca la irradiación, el chip está equipado con una tapa que garantiza un entorno controlado dentro del chip, manteniendo la integridad del cultivo celular y evitando la contaminación.

En una capa separada del chip se encuentra un sistema de perfusión integrado, conectado a una bomba peristáltica que permite el intercambio continuo de medios. Este sistema suministra los nutrientes esenciales a las células y elimina los productos de desecho, lo cual es crucial para mantener la viabilidad celular durante experimentos a largo plazo. El sistema de perfusión también facilita los estudios longitudinales (Figura 1).

De forma más detallada, el chip consta de las siguientes capas: (Figura 2)

- Capa inferior: membrana sobre la que crecen las células, formada por un

cubreobjetos de vidrio redondo de 70 mm de diámetro y un espesor entre un rango de 0,05 y 0,25 mm. (Figura 2a).

- Primera capa de pocillos: capa de PDMS (polidimetilsiloxano) de 5 mm (pero no limitado a) de espesor con 16 pocillos, cada uno de 3 mm de diámetro para el pocillo interno y 5 mm para el externo, que define el área de cultivo celular y protege a las células del esfuerzo cortante causado por las entradas de medios (Figura 2b).

- Capa que contiene canales de microfluídica de un tamaño uniforme y están diseñados para mantener una resistencia igual, lo que garantiza una distribución uniforme del medio (Figura 1).

- Capa superior diseñada para distribuir los medios desde entradas a los pocillos. Presenta agujeros de salida para recolectar el medio post-experimento (Figura 2c). De un grosor de 2 mm (pero no limitado a) que sella el chip para formar un sistema cerrado que evita la evaporación.

Ejemplo 2.

Este ejemplo se refiere a la forma de los pocillos.

Los pocillos pueden presentar diversas formas como forma un solo cilindro (Figura 3a), de doble capa (Figura 3b) o troncocónica (Figura 3c).

El RTchip descrito en el ejemplo 1 presenta pocillos perfectamente uniformes dispuestos en una estructura de doble capa. Este diseño no sólo facilita la siembra de células gracias al cilindro más ancho en la parte superior, sino que también asegura que el área de cultivo de células se mantenga en el rango del área efectiva homogénea instantánea (3 mm de diámetro). La última interacción con el chip incorpora un diseño hidrófilo mejorado, lo que reduce aún más la probabilidad de formación de burbujas y garantiza una adhesión celular más consistente.

Ejemplo 3.

En este ejemplo se muestra describe el método de fabricación del chip descrito en el

ejemplo 1.

El chip está fabricado en PDMS y vidrio. Cada una de las capas requiere un molde diferente (Figura 3).

El portaobjetos de vidrio microscópico se limpia con acetona, se enjuaga con agua MiliQ, se seca con una pistola de nitrógeno suave y, por último, se calienta en una placa calefactora antes de adherirlo.

Las capas de PDMS se moldean a partir de un molde diseñado con AutoCAD y se mecanizan mediante CNC (Control Numérico Computarizado), utilizando PDMS mezclado con Sylgard 184 y un agente de curado en una proporción de 10:1; después de desgasificar se hornea durante 2 horas a 85°C.

Después de preparar todas las capas, las superficies de contacto de cada una de ellas se activan utilizando un limpiador de plasma de oxígeno y, posteriormente, se unen de forma permanente.

Finalmente, todo el chip se trata con plasma de O_2 para crear una superficie hidrófila inmediatamente antes de la siembra de células.

Ejemplo 4.

En este ejemplo el chip, fabricado como se describe en el Ejemplo 1, se irradia en horma horizontal en un irradiador cerrado de Cs-137. Para ello se desconecta cualquier sistema de perfusión que estuviera conectado a la microfluídica, volviendo a conectarse posteriormente en caso necesario (por ejemplo para recoger los efluentes post-irradiación).

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo microfluídico para radioterapia o radiobiología experimental que comprende varias capas:

- una capa inferior está dotada de un portaobjetos fino de espesor por debajo de 250 µm sobre el que se depositan las muestras biológicas (células, tejidos, etc.);

- al menos, una capa con pocillos con posibles formas, de diferentes tamaños o del mismo tamaño, alineada con la capa inferior;

- una capa microfluídica que está alineada centralmente con la capa inferior de muestras biológicas cuyos canales tienen un tamaño uniforme y están diseñados para mantener una resistencia igual;

- una capa superior que actúa de tapa y de entrada y salida de fluidos que sella el chip para formar un sistema cerrado;

donde los pocillos tienen forma de cilindro de doble capa o troncocónica.

2. Dispositivo, según reivindicación 1, donde los pocillos tienen forma de cilindro de doble capa.

3. Dispositivo microfluídico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde las capas están realizadas en material transparente.

4. Dispositivo, según reivindicaciones 1 y 2, donde las capas con pocillos y la tapa están fabricadas en PDMS (polidimetilsiloxano).

5. Dispositivo, según reivindicaciones anteriores, que comprende:

- capa inferior con formada por una oblea de vidrio redondo de 70 mm de diámetro y un espesor inferior a 250 µm;

- primera capa de pocillos de PDMS (polidimetilsiloxano) de 1 mm de

espesor con 16 pocillos, cada uno de 3 mm de diámetro cilindro interno;

- segunda capa de pocillos de PDMS microfluídica de 3 mm de espesor con pocillos de 5 mm de diámetro que está alineada centralmente con la capa de cultivo celular;

- capa a modo de tapa de PDMS, de 2 mm de grosor que sella el chip que distribuye los medios desde una única entrada y salida principal a los pocillos.

6. Dispositivo, según reivindicación 5, donde las células se irradian con un haz de protones.

7. Método de fabricación del dispositivo, según reivindicación 5, que comprende:

- moldear las capas de PDMS a partir de un molde diseñado con AutoCAD;

- mecanizar las capas moldeadas mediante CNC (Control Numérico Computarizado), utilizando PDMS mezclado con Sylgard 184 y un agente de curado en una proporción de 10:1;

- desgasificar el material mecanizado y hornear durante 2 horas a 85°C;

- activar las superficies de contacto de cada una de ellas utilizando un limpiador de plasma y, posteriormente, unir se unen de forma permanente para formar el chip;

- tratar el chip obtenido con plasma de O_2 para crear una superficie hidrófila inmediatamente antes de la siembra de células.

8. Uso del dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en radioterapia o radiobiología experimental donde las muestras se irradian con un irradiador abierto o cerrado, de haz continuo o pulsado, de haz plano o gaussiano, con protones, electrones o fotones.

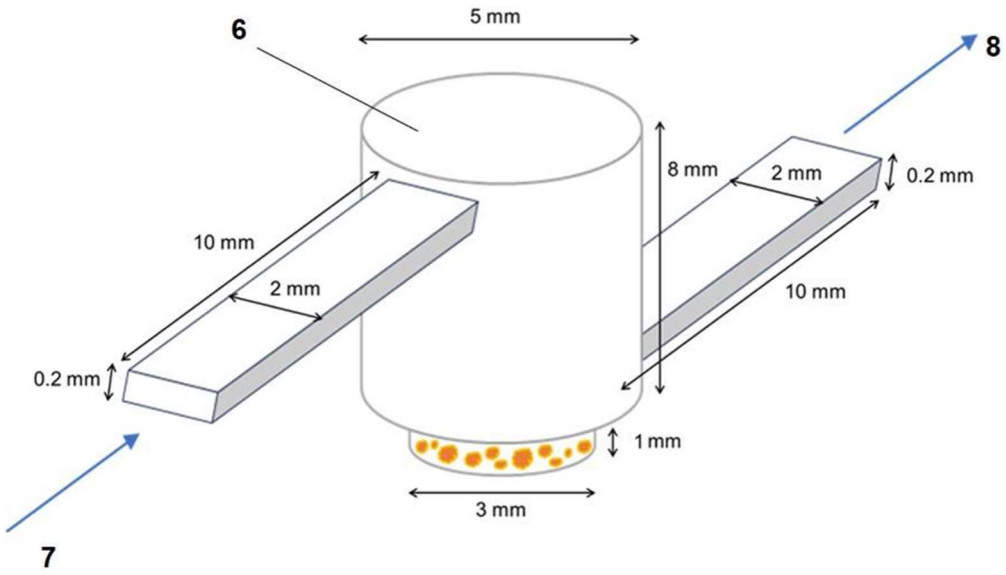


Figura 1

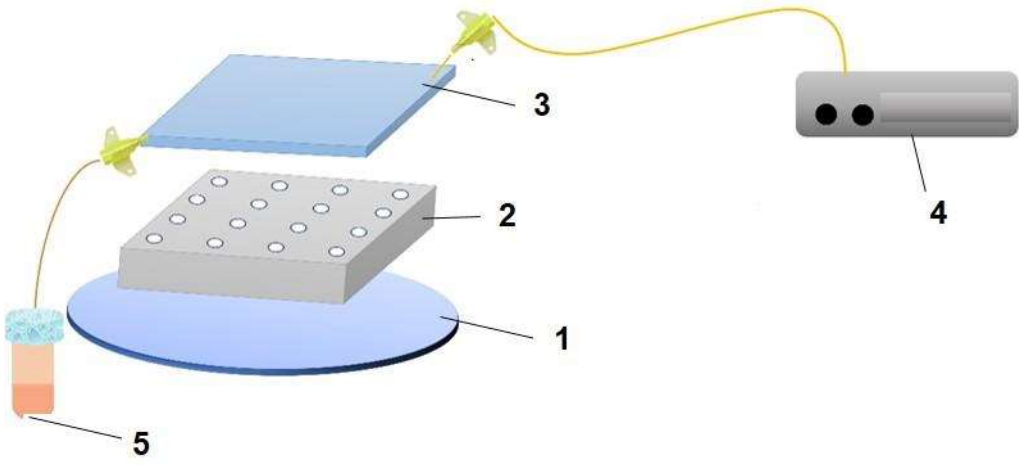


Figura 2

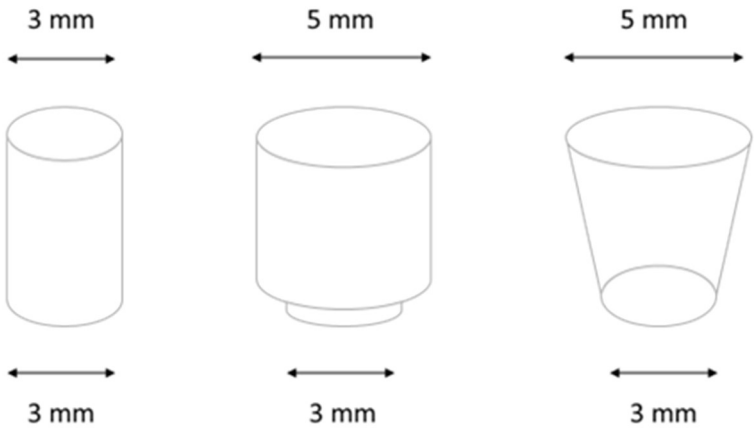


Figura 3