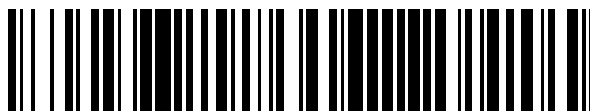


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 467**

51 Int. Cl.:

A61N 1/32 (2006.01)

A61N 1/08 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

H03K 3/57 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2004 E 04013843 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1607484**

54 Título: **Procedimiento y disposición de circuito para el tratamiento de material biológico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2014

73 Titular/es:

**LONZA COLOGNE AG (100.0%)
NATTERMANNALLEE 1
50829 KÖLN, DE**

72 Inventor/es:

MÜLLER-HARTMANN, HERBERT

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 465 467 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).

DESCRIPCION

Procedimiento y disposición de circuito para el tratamiento de material biológico

5 El invento se refiere a un procedimiento para el tratamiento de material biológico mediante como mínimo un campo eléctrico generado mediante un primer impulso de tensión, en donde este primer impulso de tensión se interrumpe cuando se sobrepasa por arriba o por abajo un valor límite predeterminado para un parámetro eléctrico, así como a una disposición de circuito, especialmente para llevar a cabo el procedimiento, con como mínimo un dispositivo acumulador para cantidades de carga eléctrica para la generación de como mínimo un impulso de tensión mediante la descarga dirigida del dispositivo acumulador y como mínimo un dispositivo de control para controlar la descarga, mediante el cual el impulso de tensión puede ser interrumpido al sobrepasarse por arriba o por debajo un valor límite predeterminado para un parámetro eléctrico. El invento se refiere entonces especialmente a los campos de electroporación, electrofusión y electrosimulación de células vivas, así como a todas las aplicaciones en las que el material biológico debe ser sometido a un campo eléctrico.

Fundamentos

15 La introducción de moléculas biológicamente activas, como por ejemplo DNA, RNA o proteínas, en células vivas representa un importante instrumento para la investigación de funciones biológicas de estas moléculas. Un método preferido para la introducción de moléculas extrañas en las células es entonces la electroporación, la cual en oposición a los métodos químicos no está predispuesta para el transporte simultáneo de otras moléculas biológicamente activas. En la electroporación las moléculas extrañas son un introducidas en las células a partir de una solución de almacenamiento adaptada a las células o un medio de cultivo de células mediante una inyección de corta duración, con lo que mediante la acción del corto impulso eléctrico de tensión o del campo eléctrico producido por él la membrana de célula se hace permeable para las moléculas extrañas. La suspensión de células se encuentra entonces a menudo en una llamada cubeta, es decir, un recipiente pequeño abierto hacia arriba que en las proximidades de su fondo presenta dos electrodos paralelos opuestos en las paredes laterales, los cuales sirven para la aplicación de la tensión eléctrica. Mediante los "poros" que se producen durante corto tiempo en la membrana de célula las moléculas biológicamente activas alcanzan primeramente el citoplasma en el cual en su caso ya pueden desarrollar su función investigadora, y después de ello y bajo determinadas condiciones también en el núcleo de la célula.

20 Mediante la aplicación de corta duración de un fuerte campo eléctrico, es decir, de un corto impulso de tensión con alta densidad de corriente, también pueden fusionarse además células, derivados de células, partículas subcelulares y / o vesículas. En esta llamada electrofusión las células son puestas en estrecho contacto con membranas primeramente por ejemplo mediante un campo eléctrico alterno no homogéneo. Mediante la inmediata aplicación de un pulso de campo eléctrico se llega entonces a la interacción de partes de membrana que finalmente lleva a la fusión. Para la electrofusión se pueden utilizar entonces dispositivos operativos comparables, como para la electroporación. Y aún más las células vivas puede ser estimuladas mediante un campo eléctrico también de una manera que modifique sus propiedades.

25 Cuando se crea un campo eléctrico con una intensidad de campo de varios cientos de voltio por centímetro en una solución acuosa, la resistencia eléctrica se rompe en un período de tiempo muy corto, por ejemplo menor de 1 μ s, y con ello la intensidad sube muy rápido y fuerte, pudiendo producirse entonces una llamada descarga de rayo. Cuando se produce una descarga de rayo y debido a la fuerte subida de potencia y calor en el corto periodo de tiempo se llega por un lado a apariciones físicas acompañantes como destellos, crepitaciones y salpicaduras de la solución y por otro lado a un daño irreversible o a la muerte de las células. Una descarga de rayo perjudica generalmente no sólo a la seguridad de las personas presentes y de los aparatos sino que lleva también a una pérdida del material biológico utilizado.

Estado de la técnica

30 Por el documento WO 02/086129 A1 se conoce una disposición de circuito para la introducción de moléculas biológicamente activas en el núcleo de célula de células eucarióticas mediante la corriente eléctrica, o para el tratamiento de células, derivados de células, partículas subcelulares y / o vesículas con corriente eléctrica, así como un procedimiento correspondiente. La disposición de circuito se compone de dos dispositivos de almacenamiento para cantidades de carga eléctrica, los cuales son alimentados cada uno de una parte de red de alta tensión. Los dispositivos de almacenamiento están unidos con un semiconductor de potencia para la transmisión de las cantidades de carga existentes en los dispositivos de almacenamiento a la suspensión de célula. Los semiconductores de potencia son controlados mediante un dispositivo de control o conectados. En esta disposición de circuito conocida está previsto además que como mínimo un primer impulso de tensión pueda ser transmitido sobre la suspensión de células con la tensión de condensador del dispositivo de almacenamiento por medio del control de un semiconductor de potencia durante un periodo de tiempo (T1) ajustado previamente. Para mayor seguridad del usuario y de las pruebas utilizadas está previsto que mediante una etapa de sobretensión esté

prevista una desconexión por sobreintensidad como mínimo durante el primer impulso de tensión, mediante la que se interrumpe el correspondiente impulso. La desconexión por sobreintensidad hace por ello posible la interrupción del impulso de tensión para el caso de que se sobrepasen los valores límite preajustados. También por ejemplo, cuando al construir un campo eléctrico la corriente sube muy rápidamente entonces se puede evitar una descarga de rayo y con ello un daño de las células mediante la interrupción del impulso de tensión. Pero esto tiene la desventaja de que dependiendo del momento de la interrupción el éxito del tratamiento no llega, así por ejemplo la eficiencia de la transacción es muy pequeña. Si se interrumpe el impulso de tensión en un momento muy temprano la correspondiente mezcla de reacción, a pesar de mantenerse la capacidad de vida de las células, debe ser desechada o en cualquier caso será utilizable en una cantidad muy pequeña.

El invento tiene por tanto la misión de crear un procedimiento y una disposición de circuito del tipo mencionado anteriormente que haga posible un tratamiento con éxito del material biológico incluso cuando el primer impulso de tensión ha sido interrumpido.

Descripción del invento

De acuerdo con el invento, para la solución de la misión está previsto para el procedimiento que después de la interrupción el primer impulso de tensión sea seguido por como mínimo otro impulso de tensión. De manera sorprendente se ha mostrado que el éxito del tratamiento de las células puede quedar sin embargo asegurado si se continúa el impulso de tensión interrumpido. Mediante el otro impulso de tensión las células son sometidas a otro campo eléctrico el cual preferentemente corresponde al generado por el primer impulso de tensión de manera que el tratamiento interrumpido puede ser continuado y con ello puede llegar el éxito deseado. Así, mediante el procedimiento acorde con el invento, por ejemplo en una electroporación, se puede mejorar claramente la eficiencia de transfección en la transfección de células eucarióticas con ácidos nucleicos mediante la continuación o repetición del impulso de tensión después de una descarga de rayo. La ventaja del procedimiento acorde con el invento consiste por tanto en que debido a la interrupción ocasional de un impulso de tensión se pueden evitar o disminuir resultados no previsibles o no reproducibles que pueden presentarse. Como parámetros eléctricos que pueden ocasionar la interrupción del impulso de tensión, son adecuados por ejemplo, una pendiente de un descenso de tensión (flanco), una interrupción brusca de la resistencia, la intensidad de corriente o el aumento del gradiente de intensidad (flanco). De acuerdo con el invento, la prosecución del impulso de tensión se produce por que para el primer impulso de tensión se prescribe una duración determinada $T1$ y la duración $T2$ del otro impulso de tensión es como mínimo igual a la duración $T1$ menos el tiempo Tx existente entre el comienzo del primer impulso de tensión y la interrupción del mismo. De esta manera se asegura que en la suma las células están sometidas al campo eléctrico como mínimo por el mismo tiempo que el previsto para el primer impulso de tensión. Si por ejemplo, para el primer impulso de tensión se preajusta una duración $T1 = 500 \mu s$ pero esta se interrumpe después de $Tx = 100 \mu s$ debido a una amenazante descarga de rayo, entonces la duración $T2$ del otro impulso de tensión será calculada como $T2 = T1 - Tx$, es decir, para $T2$ se obtiene una duración de $400 \mu s$. El siguiente impulso de tensión continua entonces al primer impulso de tensión de tal manera que las células están sometidas al campo eléctrico en la suma de la duración de $500 \mu s$ originalmente ajustada o predeterminada. De esta manera se evita que, por un lado, las células queden dañadas por un tratamiento muy largo, y por otro lado se asegura que los resultados son reproducibles. Como alternativa, la duración $T2$ puede ser también más larga que la duración $T1$ menos el tiempo Tx existente entre el comienzo del primer impulso de tensión y la interrupción del mismo. Para una duración $T1 = 500 \mu s$ y un tiempo hasta la interrupción de $Tx = 100 \mu s$ se puede elegir para duración del otro impulso de tensión también $T2 = 600 \mu s$. Con esto se pueden compensar posibles pérdidas o desventajas debidas al tiempo de pausa entre la interrupción del primer impulso de tensión y el inicio del otro impulso de tensión, lo cual actúa igualmente positivamente para los resultados obtenidos.

Como $T1$ se puede elegir por ejemplo una duración de un intervalo desde $10 \mu s$ hasta $1 ms$.

En otro diseño ventajoso del invento está previsto que como intensidad de campo del otro impulso de tensión se redefina la misma intensidad de campo que para el primer impulso de tensión. Con esto se asegura que las células son tratadas bajo condiciones constantes y el (los) otro (s) impulso (s) de tensión representan una continuación del primer impulso de tensión. Esto también actúa positivamente sobre la posibilidad de reproducir los resultados.

Preferentemente y dependiendo de la aplicación se prescribe una intensidad de campo de 2 a $10 kV$ por centímetro. Pero también se pueden ajustar intensidades de campo mayores o menores para aplicaciones especiales o tipos de células.

En una forma constructiva especial del invento está previsto que entre la interrupción del primer impulso de tensión y la generación del otro impulso de tensión se prescriba un determinado tiempo de pausa, preferentemente un tiempo de como mínimo $40 \mu s$, especialmente preferido 50 a $600 \mu s$, especialmente ahora $100 \mu s$. Mediante el ajuste definido del tiempo de pausa el procedimiento acorde con el invento puede ser ajustado al tipo de aplicación, la finalidad deseada y/o el tipo de célula, de manera que sea posible una optimización de los resultados. Entonces es en general especialmente ventajoso si el tiempo de pausa no es más corto que $40 \mu s$ para que por un lado las

condiciones en el interior de la mezcla de reacción después de la corta interrupción y del resultado de la interrupción puedan normalizarse y por otro lado que las células tengan una corta "fase de reposo".

5 En un diseño ventajoso del invento está previsto además que en total se generen como mínimos otros dos impulsos de tensión, cuando los otros impulsos de tensión precedentes se han interrumpido. En esta forma constructiva se tiene en cuenta la posibilidad de que también el otro impulso de tensión o varios de los otros impulsos de tensión puedan ser interrumpidos debido a que se sobrepase por arriba o por abajo un valor límite de un valor eléctrico. Mediante la previsión de la posibilidad de varios intentos de repetición el procedimiento será mejorado todavía más, porque queda claramente reducida la posibilidad de un intento defectuoso o un tratamiento insuficiente. Preferentemente se prefijara o regulara la posibilidad de generar otros 2 o 3 impulsos de tensión. Después de la interrupción de otro impulso de tensión se puede iniciar otro impulso de tensión adicional (otros 2 impulsos de tensión, $n = 2$). Si también se interrumpe el último entonces se genera un tercer impulso de tensión (otros 3 impulsos de tensión, $n = 3$). Con esto se trata ciertamente de la posibilidad prefijada de otros impulsos de tensión adicionales. Si por el contrario, el tiempo T1 preestablecido se alcanza en total, entonces no se inicia ningún impulso adicional de tensión.

15 Para el caso de que sean posibles otros varios impulsos de tensión y para el primer impulso de tensión se predetermine una duración T1 es ventajoso si entonces la duración total Ts de los otros impulsos de tensión sea como mínimo igual a la duración T1 menos el intervalo de tiempo Tx existente entre el comienzo del primer impulso de tensión y la interrupción del mismo. De esta manera también en esta forma constructiva queda asegurado que las células, en suma, quedan sometidas al campo eléctrico como mínimo por el mismo tiempo que el que fue previsto para el primer impulso de tensión. Por ejemplo, si para el primer impulso de tensión se ajusta previamente una duración T1 = 800 μ s, pero debido a una amenaza de descarga de rayo se interrumpe después de un tiempo de Tx = 250 μ s, entonces la duración T2 del otro impulso de tensión se calcula $T2 = T1 - Tx$, es decir para T2 se obtiene una duración de 550 μ s. Pero si ahora el segundo impulso de tensión se interrumpe después de un tiempo Ty = 350 μ s, entonces para la duración T3 del otro impulso de tensión se obtiene una duración de $T3 = T1 - (Tx + Ty)$ o $T3 = T2 - Ty$, es decir, entonces T3 = 200 μ s. La suma Ts = Ty + T3 (= T1 - Tx) da entonces 550 μ s, de manera que las células en total han sido sometidas a un campo eléctrico por un total de 800 μ s (=T1). Los otros impulso de tensión siguen al primer impulso de tensión de tal manera que en suma, las células están sometidas al campo eléctrico durante la misma duración originalmente prefijada o ajustada ($T1 = Tx + Ty + \dots + Tn$). De esta manera también en esta forma constructiva por un lado se evita que las células resulten dañadas por un tratamiento demasiado largo, y por otro lado se asegura que los resultados son reproducibles. Alternativamente, la duración Ts también puede ser más larga que la duración T1 menos el tiempo Tx transcurrido entre el comienzo del primer impulso de tensión y la interrupción del mismo, es decir, $Ts > T1 - Tx$. Con una duración T1 = 800 μ s y un tiempo hasta la interrupción del primer impulso de tensión de Tx = 250 μ s y un tiempo hasta la interrupción del otro impulso de tensión Ty = 350 μ s entonces como duración para el otro impulso de tensión adicional se puede elegir también por ejemplo una duración T3 = 300 μ s. Con ello se pueden compensar posibles pérdidas o desventajas por los tiempos de pausa entre la interrupción del impulso de tensión y el inicio del siguiente impulso de tensión, lo que igualmente influye positivamente en los resultados obtenidos.

La misión será resuelta además respecto de la disposición de circuito por que como mínimo está previsto un dispositivo de mando para detectar el recorrido temporal del impulso de tensión, mediante el cual se puede controlar una continuación de la descarga después de la interrupción. Por la introducción de un dispositivo de mando adicional en la disposición de circuito, que capte el recorrido en el tiempo del primer (y en su caso de los otros) impulso de tensión es posible calcular la duración de permanencia del otro impulso de tensión o de los otros impulso de tensión ($T2 = T1 - Tx$ o $T3 = T1 - (Tx + Ty)$ etc.) en la que después de la interrupción ya no hay más tensión. Después de un tiempo de pausa prefijado o que hay que programar el dispositivo de mando puede controlar la descarga del dispositivo de acumulación de tal manera que aquella continua y con ello se completa el tiempo de descarga. La unidad de control está construida entonces de tal manera que detecta el tiempo desde el comienzo del primer impulso de tensión y en su caso de los otros impulsos de tensión hasta la interrupción de los mismos y calcula la duración todavía permanente del otro impulso de tensión ($T2 = T1 - Tx$ o $T3 = T1 - (Tx - Ty)$ etc.). De esta manera la descarga del dispositivo acumulador puede ser controlada por el dispositivo de mando de tal manera que el primer impulso de tensión puede continuar o ser completado, de manera que el tratamiento del material biológico, a pesar de la continuada interrupción de uno o varios impulsos de tensión, tiene éxito y puede ser reproducido.

55 En una forma constructiva especial del invento está previsto que el dispositivo de control es un componente que procesa una señal analógica, por ejemplo un condensador. Para ello, por ejemplo, un condensador toma la misión de integrar el tiempo en el que existe la tensión. El condensador es ahora cargado en tanto en cuanto exista tensión. Un circuito de tiempo determinado por el hardware permite entonces cerrar de nuevo el circuito en tanto en cuanto el condensador no esté totalmente lleno o no haya alcanzado un valor umbral.

En una forma constructiva preferida está previsto que el dispositivo de mando es un componente que procesa una señal digital, por ejemplo un DSP. Mediante un componente DSP (Procesamiento Digital de Señal) que por ejemplo controla un dispositivo de conexión, es posible seguir el transcurso del tiempo del primer impulso de tensión o de los

5 restantes impulsos de tensión. Cuando se llega a la interrupción del impulso de tensión mediante un dispositivo de control esto reconocido por el componente DSP. El componente DSP calcula el tiempo restante en el que ya no exista tensión. Después de una pausa de tiempo que hay que programar el dispositivo DSP puede controlar al dispositivo de conexión de tal manera que se continúe con la descarga del dispositivo acumulador, por ejemplo mediante un correspondiente control del dispositivo de control.

10 En una forma constructiva preferida de la disposición de circuito acorde con el invento el dispositivo de mando y / o el dispositivo de control puede estar unido con un dispositivo de conexión. Este dispositivo de conexión está unido con un interruptor de tensión, preferiblemente mediante una etapa separadora de potencial. El dispositivo acumulador está unido con un semiconductor de potencia a través del cual se produce la descarga del dispositivo acumulador. Si el interruptor de tensión está unido igualmente con el semiconductor de potencia, la descarga del dispositivo acumulador puede ser controlada en consecuencia mediante el dispositivo de mando y / o el dispositivo de control. Por ello, porque el dispositivo de mando está unido con el dispositivo de conexión, puede este detectar el transcurso en el tiempo de la descarga a través de un control y detección del estado de conexión del circuito de conexión y con ello determinar la duración del correspondiente impulso de tensión.

15 En una configuración ventajosa del invento el dispositivo de conexión puede ser conectado a través del dispositivo de control, es decir, el dispositivo de control puede abrir y cerrar el dispositivo de conexión de manera que finalmente el semiconductor de potencia unido con el dispositivo acumulador puede ser abierto o cerrado y con ello controlar la descarga del dispositivo acumulador. Para ello el dispositivo de control puede contener un dispositivo de desconexión, el cual interrumpa la descarga si se ha sobrepasado por arriba o por abajo un valor límite predeterminado para un parámetro eléctrico. Como parámetros eléctricos se pueden utilizar el gradiente de una caída de tensión (flanco), la interrupción brusca de la resistencia, intensidad de corriente o el crecimiento de la subida de corriente (flanco). Si también se sobrepasa por arriba o por abajo un valor límite predeterminado para uno de estos parámetros entonces el dispositivo de desconexión conecta el dispositivo de conexión de tal manera que la descarga del dispositivo acumulador queda interrumpida. Por ejemplo, en el caso de una descarga de rayo amenazante se puede medir en un intervalo de tiempo muy corto la pendiente de la subida de la intensidad de corriente y en el caso de sobrepasarse un valor límite predeterminado se puede interrumpir el impulso de tensión mediante el dispositivo de control o el dispositivo de desconexión (desconexión de flanco).

20 El dispositivo de conexión también puede ser conectado directamente a través del dispositivo de mando de manera que éste puede controlar la descarga del dispositivo acumulador mediante la conexión del dispositivo de conexión. El dispositivo de mando también puede detectar mediante el dispositivo de conexión no sólo el transcurso en el tiempo del correspondiente impulso de tensión sino también extinguir los otros impulsos de tensión. Preferentemente el control de la descarga se lleva a cabo mediante el dispositivo de mando pero a través del dispositivo de control.

25 El invento comprende además un elemento programa que mediante un dispositivo electrónico de tratamiento de datos puede ser leído y ejecutado y que, cuando es ejecutado, es adecuado para llevar a cabo el procedimiento acorde con el invento, así como un elemento programa que mediante un dispositivo electrónico de tratamiento de datos puede ser leído y ejecutado y que cuando es ejecutado es adecuado para controlar la disposición de circuito acorde con el invento. En conjunto el invento comprende también programas de ordenador los cuales controlan el procedimiento acorde con el invento y/o la disposición de circuito acorde con el invento. Los elementos de programa están para ello depositados preferentemente en una unidad acumuladora de un dispositivo (electroprocesador) en el que también está situada la disposición de circuito acorde con el invento. Un procesador adecuado puede acceder a los elementos de programa y procesarlos o ejecutarlos.

30 El invento comprende también cada medio acumulador que puede ser leído con un dispositivo de procesamiento de datos electrónico y en el que está o están almacenados uno o ambos de los elementos programa mencionados.

35 El procedimiento acorde con el invento y la disposición de circuito acorde con el invento pueden ser utilizados o adecuados de manera ventajosa para la transfección de células eucarióticas en reposo o en partición activa. Igualmente estos son adecuados para la transfección de células primarias como células de la sangre humana, células progenitoras pluripotentes de la sangre humana, fibroblastos primarios humanos, células de endotelio, células de músculos o melanocitos y pueden ser utilizados para fines analíticos o diagnósticos o para la elaboración de un medicamento para la terapia genética ex vivos.

40 El procedimiento acorde con el invento y la disposición de circuito acorde con el invento son también adecuados por ejemplo para la electrofusión, es decir, procedimientos para la fusión de células, derivados de células, partículas subcelulares y/o vesículas mediante la corriente eléctrica, en el que por ejemplo las células, derivados de células, partículas subcelulares y / o vesículas primeramente están suspendidas en densidad adecuada en una solución acuosa, a continuación se lleva la suspensión a una cubeta y finalmente se aplica una tensión eléctrica a los electrodos de la cubeta y se genera un flujo de corriente a través de la suspensión. Alternativamente, por ejemplo, se pueden fusionar células adherentes, derivados de células, partículas subcelulares y/o vesículas pero también por ejemplo células adherentes con células suspendidas, derivados de célula, partículas subcelulares o vesículas.

El concepto "material biológico" comprende células, derivados de células, partículas celulares y vesículas así como también ácidos nucleicos, pepsina, proteínas, polisacáridos, lípidos o combinaciones o derivados de estas moléculas.

5 El concepto "moléculas biológicamente activas" comprende ácidos nucleico, pepsinas, proteínas, polisacáridos, lípidos o combinaciones o derivados de estas moléculas, en tanto en cuanto desplieguen una actividad biológica en células, derivados de células, partículas subcelulares o vesículas.

Recipientes adecuados para acoger el material biológico o los aditivos de reacción son, por ejemplo, cubetas con una separación de electrodos de 2 mm o 1 mm, por ejemplo, cubetas comercialmente habituales para la electroporación.

10 El invento será descrito por lo demás con más detalles por las siguientes figuras a modo de ejemplo.

Fig. 1 un diagrama de bloques de una disposición de circuito de acuerdo con el invento;

Fig. 2 un diagrama de bloques de una forma constructiva especial de una disposición de circuito de acuerdo con el invento;

Fig. 3 un diagrama de flujo para aclaración del procedimiento acorde con el invento.

15 Fig. 4 un diagrama de flujo para aclaración de una forma constructiva especial del procedimiento de acuerdo con el invento;

Fig. 5 diagramas de datos experimentales para impulsos de tensión interrumpidos artificialmente

20 La figura 1 muestra un diagrama de bloques de una disposición de circuito 1 acorde con el invento con una unidad de ajuste 2 para la introducción de parámetros que van a ser aportados, una unidad de mando 3 central para controlar la disposición de circuito 1 así como una parte de red de alta tensión 5. La parte de red de alta tensión 5 alimenta un dispositivo acumulador 7 conectado a continuación, que por ejemplo puede ser un condensador o un grupo de condensadores, el cual puede ser cargado con una tensión U1. El dispositivo acumulador 7 está unido con un semiconductor de potencia 9 previsto para la emisión de un impulso de tensión (U1) o para la descarga del dispositivo acumulador 7. El semiconductor de potencia 9 puede ser controlado, aquí a través de una etapa separadora de potencial 11, mediante un interruptor de tensión 13 a través de la unidad de control 3, un dispositivo de control 20 y un dispositivo de mando 4. El dispositivo acumulador 7 está directamente unido con la entrada del semiconductor de potencia 9, en donde el semiconductor de potencia 9 puede estar compuesto por ejemplo por un IGBT. El concepto "semiconductor de potencia" debe comprender sin embargo también todos los otros componentes o sistemas de componentes electrónicos mediante los cuales pueden ser conectadas las tensiones e intensidades que hay que conectar con los tiempos de conexión necesarios. La salida del semiconductor de potencia 9 está unida directamente con una conexión 15 de cubeta. En el caso de la cubeta 24 se trata de un recipiente de reacción que sirve para alojar una solución acuosa y el material biológico que hay que tratar y en la que se genera el campo eléctrico. Una segunda conexión 18 de cubeta está unida a masa mediante una resistencia 19. En el caso de la resistencia 19 se trata de un shunt de medida para por ejemplo medir la caída de tensión y llevarla al dispositivo de control 20. A través de un dispositivo de conexión 21 el dispositivo de control 20 puede ocasionar una interrupción del impulso de tensión mediante la etapa de separación de potencial 11 y el interruptor de tensión 13. Si por ejemplo se sobrepasa por arriba o por abajo un valor límite predeterminado para un parámetro eléctrico, entonces un dispositivo de desconexión, aquí no representado, situado en el dispositivo de control 20, conecta el dispositivo de conexión 21 de tal manera que se interrumpe la descarga del dispositivo acumulador 7. Por ejemplo, en el caso de una descarga de rayo peligrosa se puede medir la inclinación de la subida de la intensidad de corriente en un intervalo de tiempo muy corto y al sobrepasarse un valor límite prefijado interrumpir el impulso de tensión mediante el dispositivo de control 20 o el dispositivo de desconexión (desconexión por flanco). De acuerdo con el invento el dispositivo de conexión 21 puede ser conectado mediante el dispositivo de mando 4 de manera que este puede controlar la descarga del dispositivo acumulador 7 mediante la conexión del dispositivo de conexión 21. El dispositivo de mando 4 puede detectar también a través del dispositivo de conexión 21, por un lado el ocurrir en el tiempo del correspondiente impulso de tensión, es decir, el instante de una interrupción del impulso y calcular la duración de los restantes impulsos de tensión, y por otro lado iniciar los restantes impulsos de tensión mediante el control del dispositivo de conexión 21. Con ello el control de la descarga por el dispositivo de mando 4 se produce preferentemente indirectamente a través del dispositivo de control 20. Pero el dispositivo de mando 4 puede controlar el dispositivo de conexión 21 también directamente. En el caso del dispositivo de control 20 la resistencia de medida 19 de baja resistencia está después de las conexiones 15,18 de cubeta y está conectada a masa de manera que se puede excluir la transmisión de los impulsos de alta tensión. El dispositivo acumulador 7 puede comprender varios condensadores de la necesaria capacidad y tensión de carga de manera que puede almacenar una correspondiente alta carga y ser transmitida a la conexión 15 de cubeta.

La figura 2 muestra un diagrama de bloques de una forma constructiva especial de una disposición de circuito 25 acorde con el invento que esencialmente se corresponde con la disposición de circuito 1 acorde con la figura 1, sin embargo en diferencia con ella presenta otro dispositivo acumulador 8 que puede ser cargado con una tensión U2, para emitir un segundo impulso de tensión. Este dispositivo de conexión 25 es adecuado por tanto para aplicaciones en las que se deban emitir dos impulsos de tensión consecutivos uno tras otro muy seguidos. Así por ejemplo para la transfección de determinados tipos de células puede ser ventajoso generar primeramente un impulso de tensión corto con alta intensidad de campo y directamente a continuación, preferentemente sin interrupción con el primer impulso de tensión, un segundo impulso de tensión de mayor duración pero con menor intensidad de campo. Dos partes de red 5,6 de alta tensión alimentan con este fin cada una a un dispositivo acumulador 7,8 conectado a continuación, cada uno de los cuales puede ser por ejemplo un condensador o un grupo de condensadores los cuales están unidos con un semiconductor de potencia 9,10 previstos para la emisión de un impulso de tensión o para la descarga de los dispositivos acumuladores 7,8. El semiconductor de potencia 10 puede ser controlado, aquí a través de la etapa separadora de potencial 12, mediante un interruptor de tensión 14 a través de la unidad de mando 3, un dispositivo de control 22 y el dispositivo de mando 4. Los dispositivos acumuladores 7 están directamente unidos con las entradas del semiconductor de potencia 9,10, en donde dependiendo de la intensidad de campo y duración de impulso utilizadas los dispositivos acumuladores 7,8 pueden estar compuestos por uno o varios condensadores. El semiconductor de potencia 9 puede estar compuesto por ejemplo por un IGBT y el semiconductor de potencia 10 por un MOSFET. Preferentemente sin embargo ambos semiconductores de potencia 9,10 se componen de un IGBT. La salida del semiconductor de potencia 10 está unida con la conexión de cubeta 15 a través de una resistencia 16 y un diodo 17, de manera que ningún impulso puede retroceder a través del segundo semiconductor de potencia 10 en el caso de que ambos semiconductores de potencia 9,10 estén controlados simultáneamente. El diodo 17 está para ello unido con la conexión 15 de cubeta por el lado del cátodo. Un segundo dispositivo de control 22 puede interrumpir a través de un interruptor 23 un control del interruptor de tensión 14 para el semiconductor de potencia 10. La tensión existente es conducida al dispositivo de control 22 a través de la resistencia 16 y en el caso de sobrepasarse una intensidad máxima provocar una desconexión por intensidad. Por ello por que la resistencia 16 está situada colocada directamente en el circuito de alta tensión el interruptor 23 se encuentra detrás de la etapa de separación de potencial 12, de manera que ningún impulso de alta tensión puede alcanzar la unidad de mando 3 y con ello el personal de servicio no pelagra. De acuerdo con el fin de aplicación de la disposición de circuito 25 se pueden utilizar una o varias partes de red de alta tensión 5,6 con los correspondientes dispositivos acumuladores 7,8 así como las necesarias etapas de separación de potencial 11,12 e interruptores de tensión 13,14 para el control de los semiconductores de potencia 9,10. Los dispositivos acumuladores 7,8 están equipados cada uno con uno o varios condensadores de la necesaria capacidad y tensión de descarga, de manera que se puede acumular una cantidad de carga correspondientemente alta y ser transmitida a la conexión 15 de cubeta. Respecto al control de la descarga del dispositivo acumulador 7 a través del dispositivo de mando 4 la disposición de circuito 25 se corresponde casi exactamente con la disposición de circuito 1 acorde con la figura 1.

La figura 3 muestra esquemáticamente un diagrama de flujo del procedimiento acorde con una forma constructiva preferida del invento. En primer lugar se introducen manualmente los parámetros de impulso necesarios (por ejemplo duración de impulso T1 e intensidad de campo) mediante la unidad de introducción o son introducidos mediante la lectura de una tarjeta de almacenamiento (no representada aquí). Después del inicio de la rutina (por ejemplo por accionamiento en la correspondiente tecla de inicio) en el paso 30 se elaboran primeramente los parámetros de impulso para el programa seleccionado. En el paso 31 se determina la resistencia óhmica de la cubeta mediante la aplicación durante un corto tiempo de una tensión baja (por ejemplo 12 V) a las conexiones de la cubeta y a continuación una medición de la intensidad (por ejemplo durante 2 μ s). En el marco del paso 32 se comprueba si esta resistencia está dentro de una ventana prefijada. Si no es así, la rutina se interrumpe por rutina errónea. Si la resistencia se encuentra correctamente en el interior de la ventana prefijada, entonces el dispositivo acumulador según la figura 1 y 2 es cargado en el paso 34 con la tensión U1 predeterminada. Cuando se alcanza la tensión de carga deseada entonces se desconecta la carga mediante la parte de red de alta tensión. La entrega del primer impulso de tensión se inició entonces en el paso 35 mediante el cierre del semiconductor de potencia 9 según las figuras 1 y 2. Con ello se produce un campo eléctrico en la cubeta en la que se encuentra el material biológico que hay que tratar. Simultáneamente en el paso 35 se detectan y siguen los parámetros eléctricos, por ejemplo la subida de corriente, mediante el dispositivo de control 20 acorde con las figuras 1 y 2, así como el discurso en el tiempo del impulso de tensión mediante la unidad de mando 4 acorde con las figuras 1 y 2. Una subida de la corriente muy empinada será reconocida por el dispositivo de control 20 acorde con las figuras 1 y 2 y conduce por motivos de seguridad a una apertura inmediata del semiconductor de potencia 9 acorde con las figuras 1 y 2 y a una interrupción de la rutina (desconexión flanco). De esta manera se puede evitar la presencia de una descarga por rayo. En la presente forma constructiva, en un caso normal, y después de una duración T1 predeterminada, que es tratada en el paso 36, se termina el primer impulso de tensión. Con ello en el paso 37 se abre el semiconductor de potencia. Pero si en el paso 36 se comprueba que no se ha alcanzado la duración T1 debido a una interrupción del primer impulso de tensión, que se ha manifestado en una caída de tensión, entonces la rutina salta al paso 38 en este punto y después de un tiempo de pausa predeterminado se ejecuta de nuevo el paso 35 y se inicia otro impulso de tensión, en donde el dispositivo de mando 4 acorde con las figuras 1 y 2 calcula la duración del siguiente impulso de tensión ($T2 = T1 - T_x$) y lo entrega. En el paso 36 se comprueba de nuevo

entonces si se ha alcanzado la duración $T1 = (Tx + T2)$. Si este es el caso, la rutina pasa al paso 37 y termina el impulso de tensión. Si el otro impulso de tensión, por el contrario, es interrumpido igualmente, entonces la rutina va de nuevo al paso 38 de manera que se puede iniciar otro impulso de tensión adicional. Con ello el número de repeticiones, es decir el número máximo de otros impulsos de tensión está predeterminado. En el ejemplo constructivo presente se pueden iniciar como máximo otros tres impulsos de tensión ($n = 3$) de manera que en el paso 36 la rutina después de una nueva interrupción del tercer otro impulso de tensión pasa al paso 37 y con ello termina definitivamente.

La figura 4 muestra un diagrama de flujo para aclarar una forma constructiva especial del procedimiento acorde con el invento, en la que se entregan dos impulsos de tensión que viajan uno sobre otro. En la forma constructiva aquí descrita, después de un predeterminado periodo de tiempo se termina un impulso de alta tensión, después de lo cual directamente y sin interrupción se conecta un segundo impulso. El procedimiento mostrado corresponde hasta el paso 38 esencialmente al procedimiento descrito en la figura 3. En diferencia con éste en el paso 34 se carga adicionalmente el segundo dispositivo acumulador 8 acorde con la figura 2 a la tensión $U2$ predeterminada. Si se alcanzan las tensiones de carga deseadas entonces se desconecta la carga mediante la correspondiente parte de red de alta tensión. En esta forma constructiva especial, en el paso 37, se cierra el segundo semiconductor de potencia 10 acorde con la figura 2 justo corto tiempo antes de la apertura del primer semiconductor de potencia 9 acorde con la figura 2, de manera que se obtiene una transición libre de interrupción entre ambos impulsos. En el corto intervalo de tiempo en el que ambos interruptores de potencia 9,10 están cerrados simultáneamente, el diodo 17 acorde con la figura 2 impide que una eventual alta tensión pueda fluir desde el dispositivo acumulador 7 al dispositivo acumulador 8. El semiconductor de potencia 10 permanece a continuación tanto tiempo conectado (en tanto en cuanto no se haya abierto a través del dispositivo de control 22 debido a una intensidad muy alta), hasta que una carga Q predeterminada haya fluído a través de la cubeta 24 de acuerdo con la figura 2. Para ello, en el paso 39 en intervalos de tiempo predeterminados (por ejemplo 1 ms) se mide la corriente que fluye por la cubeta y se integra. Tan pronto como se ha alcanzado la carga debida predeterminada (paso 41) o se ha sobrepasado un tiempo predeterminado (paso 40) el semiconductor de potencia 10 es abierto en el paso 42 y la rutina termina. La capacidad del dispositivo acumulador 8 acorde con la figura 2 está elegida de tal manera que la tensión durante la duración del segundo impulso cae de grado en grado o lentamente. En el caso en que debido a una perturbación no se alcance la carga debida incluso aunque el dispositivo acumulador esté prácticamente descargado del todo, entonces después de sobrepasarse un correspondiente límite de tiempo seleccionado el proceso es interrumpido por la rutina de fallo 43.

La figura 5 muestra diagramas de datos experimentales para impulsos de tensión interrumpidos artificialmente

Para el cálculo de los datos para las figuras 5a y 5b se colocaron 1×10^6 células K563 en 100 μ l de solución de la Cell Line Nucleofector Kit R (Amaxa GmbH), se mezclaron con 0,5 μ g de pEGFP-C1 (invitrogen) y durante diferente tiempo se sometieron a un campo de 5 KV/cm. A continuación las células fueron colocadas en un medio de Dulbecco's modificado con Iscove's (invitrogen) con 2 mM GlutaMAX (invitrogen), 100 μ g/ml de Estreptomina, 100 U/ml de Penicilina y 10% FCS (Sigma) y cultivados durante 48 horas en un armario de cultivo húmedo a 37°C y 5% CO₂. A continuación se investigó la vitalidad de las pruebas mediante citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson) sobre GFP expresión según la coloración con yoduro de propidio. Representadas están la parte porcentual de células que expresan GFP (a) y la parte porcentual de células muertas (b). La literatura de las barras se refiere a la conexión en tiempo de la exposición al campo; todos los datos están dados en μ s, las cifras representan la longitud del impulso, los números entre paréntesis son las pausas existentes entre ellos.

La figura 5a muestra que la eficiencia de la transfección de un primer impulso de tensión completo ($T1 = 100 \mu$ s, barra 1; más del 80%) puede ser alcanzada aproximadamente por la secuencia de un primer impulso de tensión interrumpido después de un tiempo $Tx = 40 \mu$ s mediante otro impulso de tensión ($T2 = 30 \mu$ s y $T3 = 30 \mu$ s, barra 2; más del 80%). Se añade entonces la duración total $Ts = T2 + T3$ de los otros impulsos de tensión a la duración $T1$ menos el intervalo de tiempo Tx ($Ts = T1 - Tx = 60 \mu$ s) existente entre el comienzo del primer impulso de tensión y la interrupción del mismo y con ello se alcanza en total la duración $T1 = 100 \mu$ s predeterminada, de manera que se puede reproducir prácticamente la eficiencia de la transacción. Si por el contrario no se alcanza $T1 = 100 \mu$ s ($Tx + T2 = 70 \mu$ s, barra 3; aproximadamente 70%) entonces no se puede alcanzar completamente la eficiencia de la transacción. En estos ejemplos el tiempo de pausa entre los intervalos de tensión alcanzó precisamente 100 μ s. En tiempos de pausa más largos (barras 4 - 6: 1000 μ s) es públicamente lógico elegir la duración total Ts de los otros impulsos mayor que la duración $T1$ menos el intervalo de tiempo Tx ($Ts > T1 - Tx$) existente entre el comienzo del primer impulso de tensión y la interrupción del mismo para alcanzar la eficiencia de transfección del primer impulso de tensión no interrumpido. Ciertamente, la más larga exposición a campo de las células que conlleva va unida con un ratio de mortalidad superior (Fig. 5b).

Para el cálculo de los datos para las figuras 5c y 5d se recogieron 1×10^6 PMBC como placas leucocitarias y 0,4 μ g pEGFP-C1 (invitrogen) en 100 μ l de solución de Human T Cell Nucleofector (Amaxa GmbH). El análisis se llevó a cabo como antes, después de 20 horas de incubación y coloración adicional con un anticuerpo anti CD3 con acoplamiento a Phycoeritrina. De nuevo se representa la parte porcentual de células T- CD3+ transferidas (c) así

como la parte porcentual en células totales (d). La literatura de las barras se refiere a la conexión en tiempo de la exposición a campo; todos los datos están dados en μs , las cifras representan la longitud del impulso, los números entre paréntesis son las pausas existentes entre ellos.

- 5 Las figuras 5c y 5d confirman los resultados de los intentos representados en las figuras 5a y 5d, en donde aquí las eficiencias de la transfección son en general menores y con ello se producen mayores oscilaciones. Aquí también se muestra que un primer impulso de tensión interrumpido puede ser continuado con éxito. Con ello en el caso de largos tiempos de pausa el resultado del intento puede ser mejorado claramente cuando la duración total T_s del otro impulso de tensión es elegida mayor que $T_1 - T_x$.

LISTA DE SÍMBOLOS DE IDENTIFICACIÓN

	1	disposición de circuito
	2	unidad de ajuste
	3	unidad de mando
5	4	unidad de mando
	5	parte de red de alta tensión
	6	parte de red de alta tensión
	7	dispositivo acumulador
	8	dispositivo acumulador
10	9	semiconductor
	10	semiconductor
	11	etapa de separación de potencial
	12	etapa de separación de potencial
	13	interruptor de tensión
15	14	interruptor de tensión
	15	conexión de cubeta
	16	resistencia
	17	diodo
	18	conexión de cubeta
20	19	resistencia
	20	dispositivo de control
	21	dispositivo de conexión
	22	dispositivo de control
	23	interruptor
25	24	cubeta
	25	disposición de circuito
	30-	
	43	pasos

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el tratamiento de material biológico mediante como mínimo un campo eléctrico generado por un primer impulso de tensión, en donde el primer impulso de tensión se interrumpe cuando se sobrepasa por arriba o por abajo un valor límite predeterminado para un parámetro eléctrico, caracterizado por que después de la interrupción el primer impulso de tensión es seguido por como mínimo un otro impulso de tensión, en donde para el primer impulso de tensión se fija previamente una duración T1 determinada y la duración T2 del otro impulso de tensión es como mínimo igual a la duración T1 menos el intervalo de tiempo Tx existente entre el comienzo del primer impulso de tensión y la interrupción del mismo.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que como T1 se elige una duración del intervalo desde 10 μ s hasta 1 ms.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que como intensidad de campo del siguiente impulso de tensión se predetermina la misma intensidad de campo que para el primer impulso de tensión.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que se predetermina una intensidad de campo de 2 hasta 10 kV / cm.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que entre la interrupción del primer impulso de tensión y la generación del otro impulso de tensión hay prefijado un determinado tiempo de pausa.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que como tiempo de pausa se predetermina un intervalo de tiempo de como mínimo 40 μ s, preferentemente 50 hasta 600 μ s, especialmente 100 μ s.
- 20 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que en total se generan como mínimo 2, preferentemente 2 o 3 otros impulsos de tensión cuando los otros impulsos de tensión precedentes se han interrumpido
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que para el primer impulso de tensión se predetermina una duración T1 determinada y la duración total Ts del otro impulso de tensión es como mínimo igual a la duración T1 menos el intervalo de tiempo Tx existente entre el comienzo del primer impulso de tensión y la interrupción del mismo.
- 25 9. Disposición de circuito (1) especialmente para el tratamiento de material biológico mediante como mínimo un campo eléctrico generado por un primer impulso de tensión, con como mínimo un dispositivo acumulador (7) para cantidades de carga eléctrica para la generación de como mínimo un impulso de tensión mediante la descarga controlada del dispositivo acumulador (7) y como mínimo un dispositivo de control (20) para controlar la descarga, mediante el cual el impulso de tensión puede ser interrumpido al sobrepasarse por arriba o por abajo un valor límite predeterminado para un parámetro eléctrico, caracterizada por que está previsto como mínimo un dispositivo de mando (4) para detectar el discurso en el tiempo del impulso de tensión, mediante el cual se puede controlar una continuación de la descarga después de la interrupción.
- 30 10. Disposición de circuito según la reivindicación 9, caracterizada por que el dispositivo de mando (4) es un componente analógico de procesamiento de señal, por ejemplo un condensador.
11. Disposición de circuito según la reivindicación 9, caracterizada por que el dispositivo de mando (4) es un componente digital de procesamiento de señal, por ejemplo un DSP.
- 40 12. Disposición de circuito según la reivindicación 9, 10 u 11, caracterizada por que el dispositivo de mando (4) y/ o el dispositivo de control (20) está / están unidos con un dispositivo de conexión (21).
13. Disposición de circuito según la reivindicación 12, caracterizada por que el dispositivo de conexión (21) está unido con un interruptor de tensión (13) preferentemente a través de una etapa de separación de potencial (11).
- 45 14. Disposición de circuito según una de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizada por que el dispositivo acumulador (7) está unido con un semiconductor de potencia (9) a través del que se realiza la descarga del dispositivo acumulador (7).
15. Disposición de circuito según una de las reivindicaciones 13 o 14, caracterizada por que el interruptor de tensión (13) está unido con el semiconductor de potencia (9).
16. Disposición de circuito según una de las reivindicaciones 12 a 15, caracterizada por que el dispositivo de conexión (21) puede ser conectado mediante el dispositivo de control (20).

17. Disposición de circuito según una de las reivindicaciones 9 a 16, caracterizada por que el dispositivo de control (20) contiene un dispositivo de desconexión el cual interrumpe la descarga si se ha sobrepasado por arriba o por abajo un valor límite predeterminado para un parámetro eléctrico.

5 18. Disposición de circuito según una de las reivindicaciones 12 a 17, caracterizada por que el dispositivo de conexión (21) puede ser conectado a través del dispositivo de mando (4), preferentemente por el dispositivo de control (20).

Fig. 1

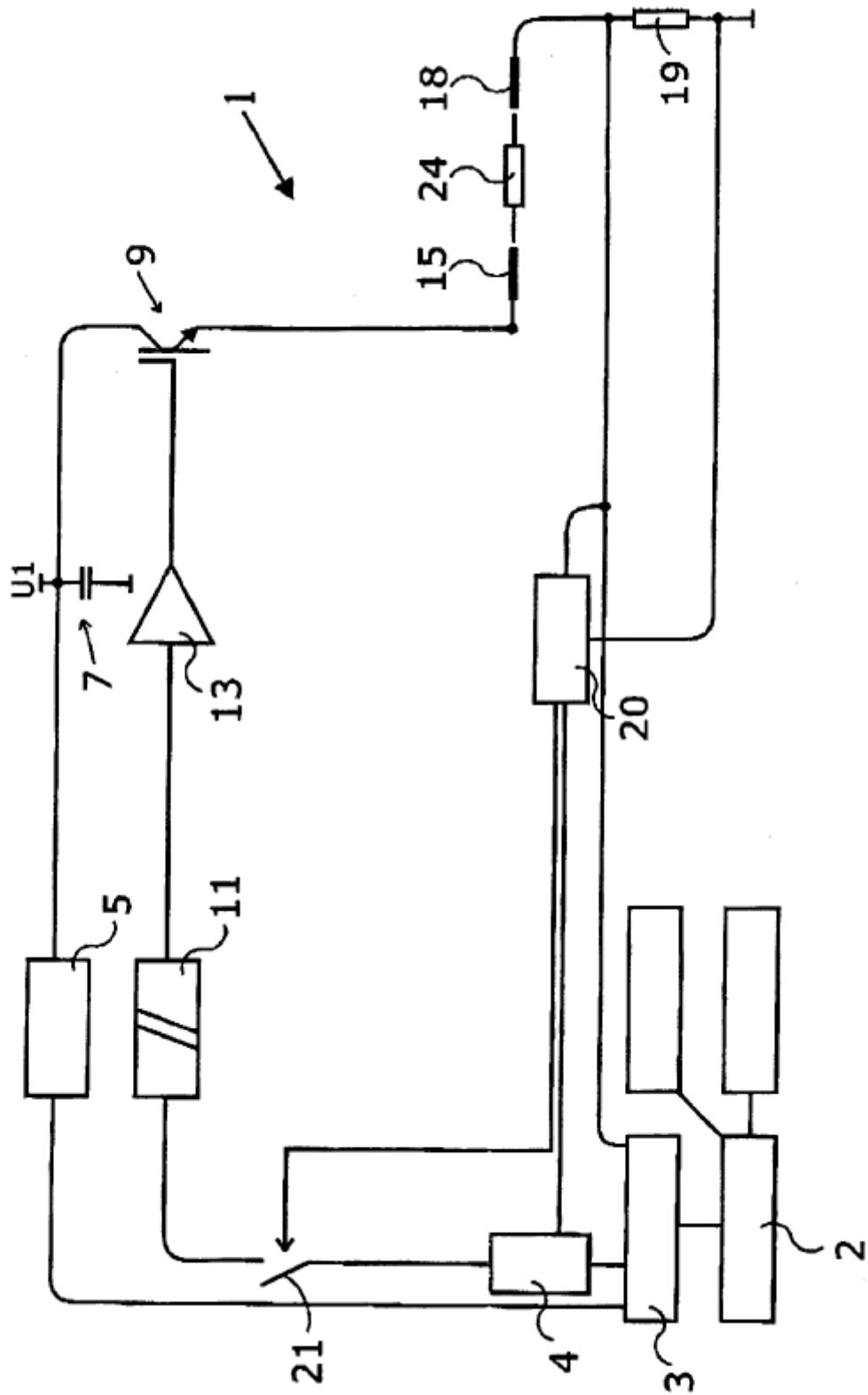


Fig. 2

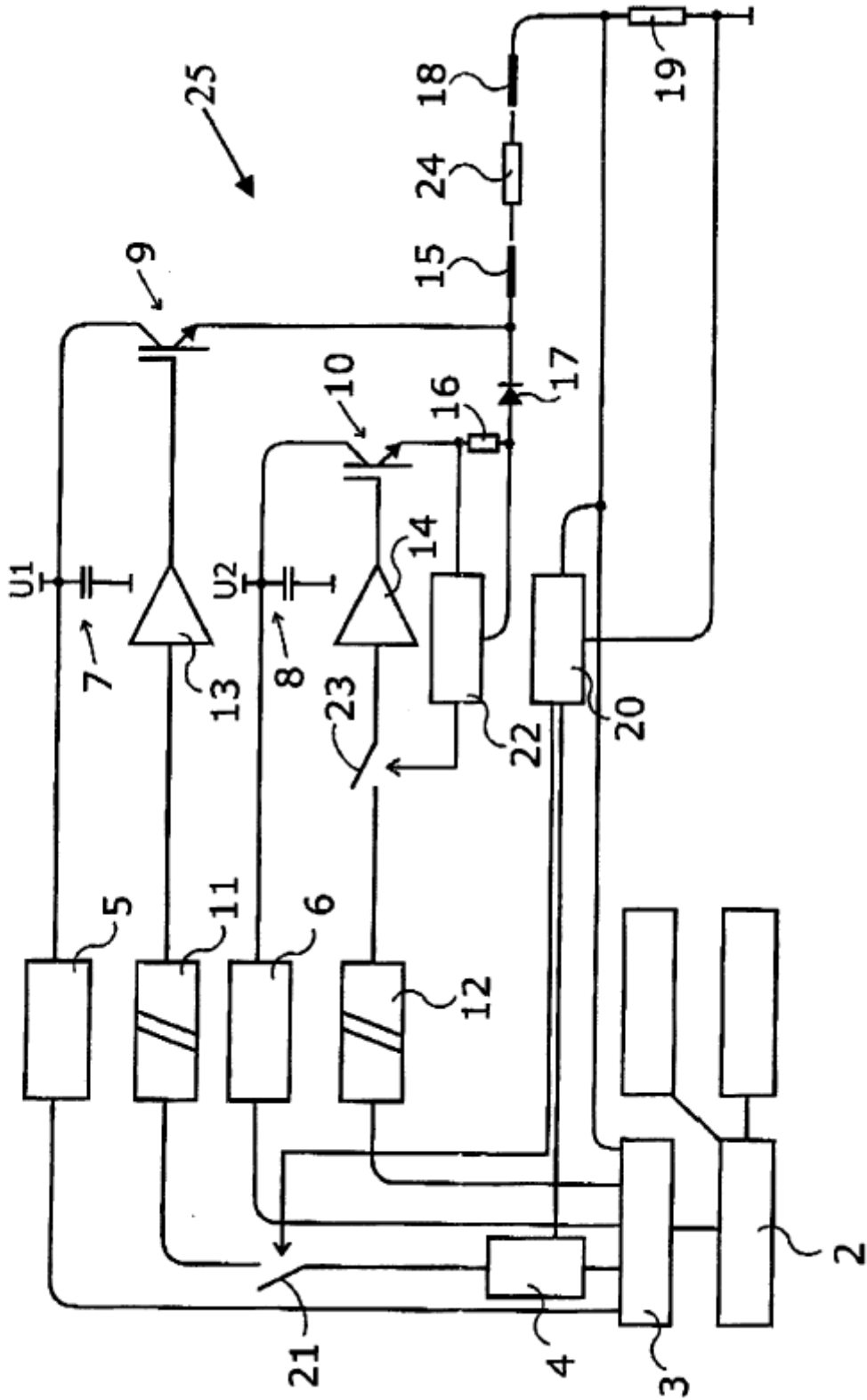


Fig. 3

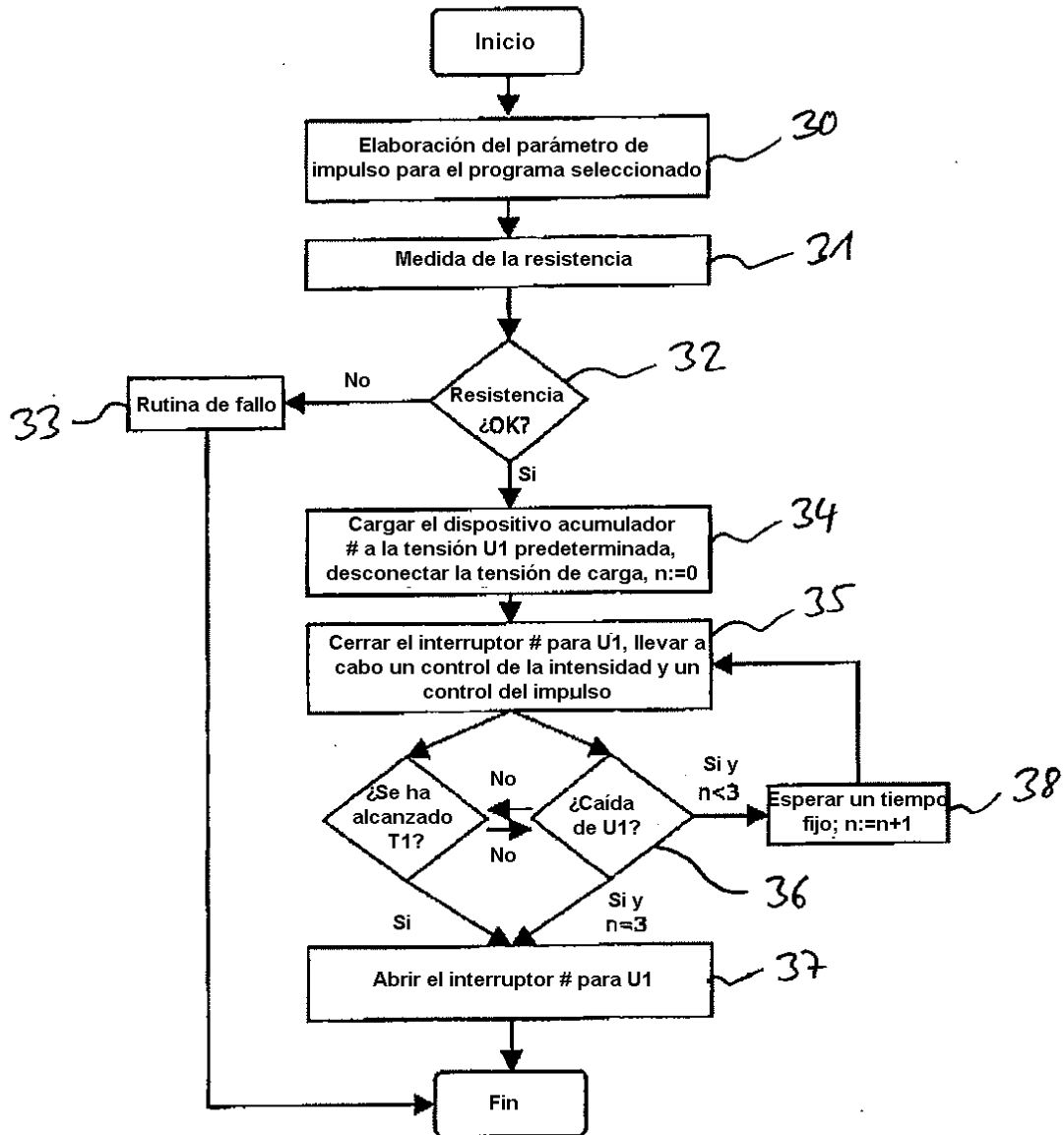
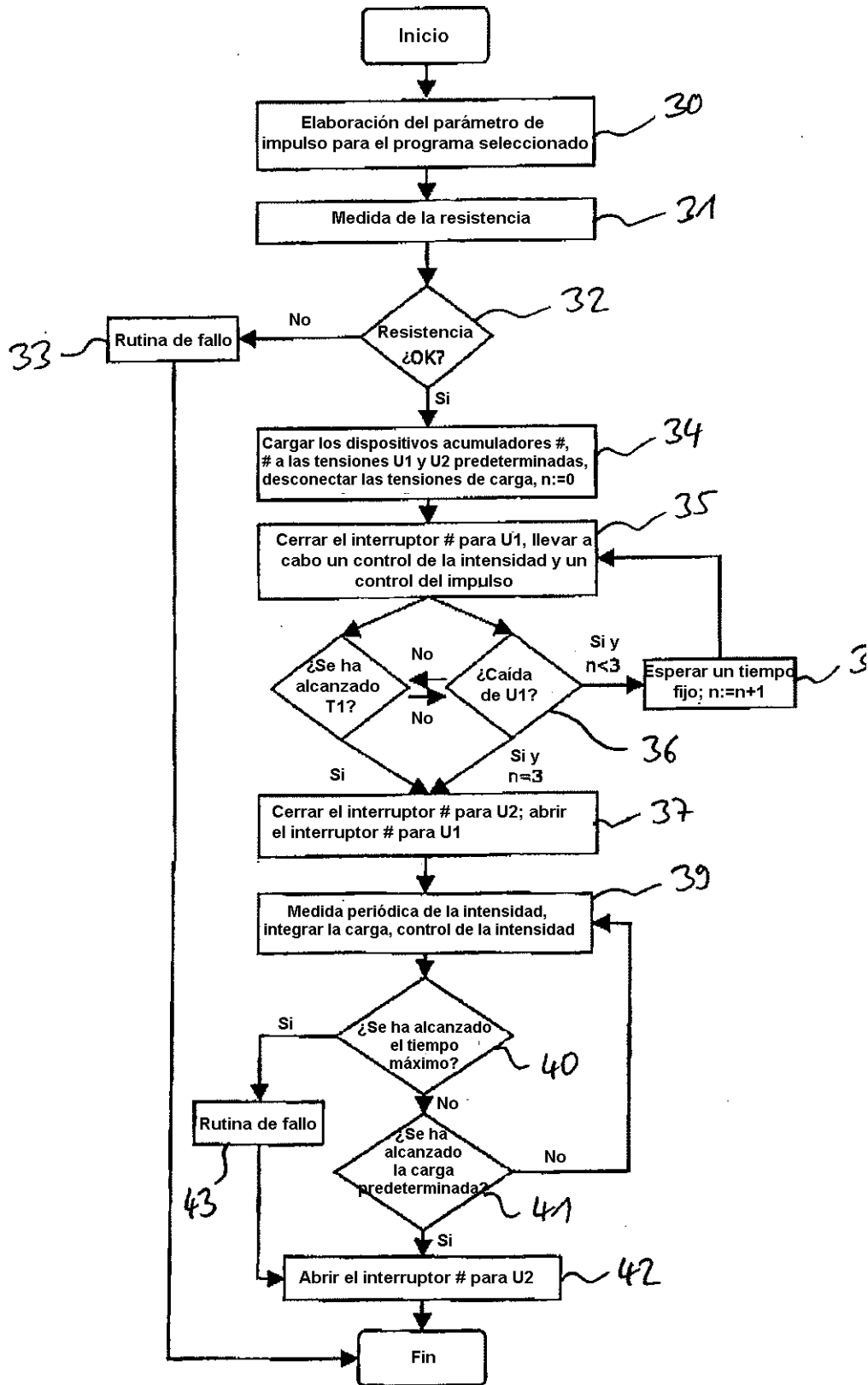


Fig. 4



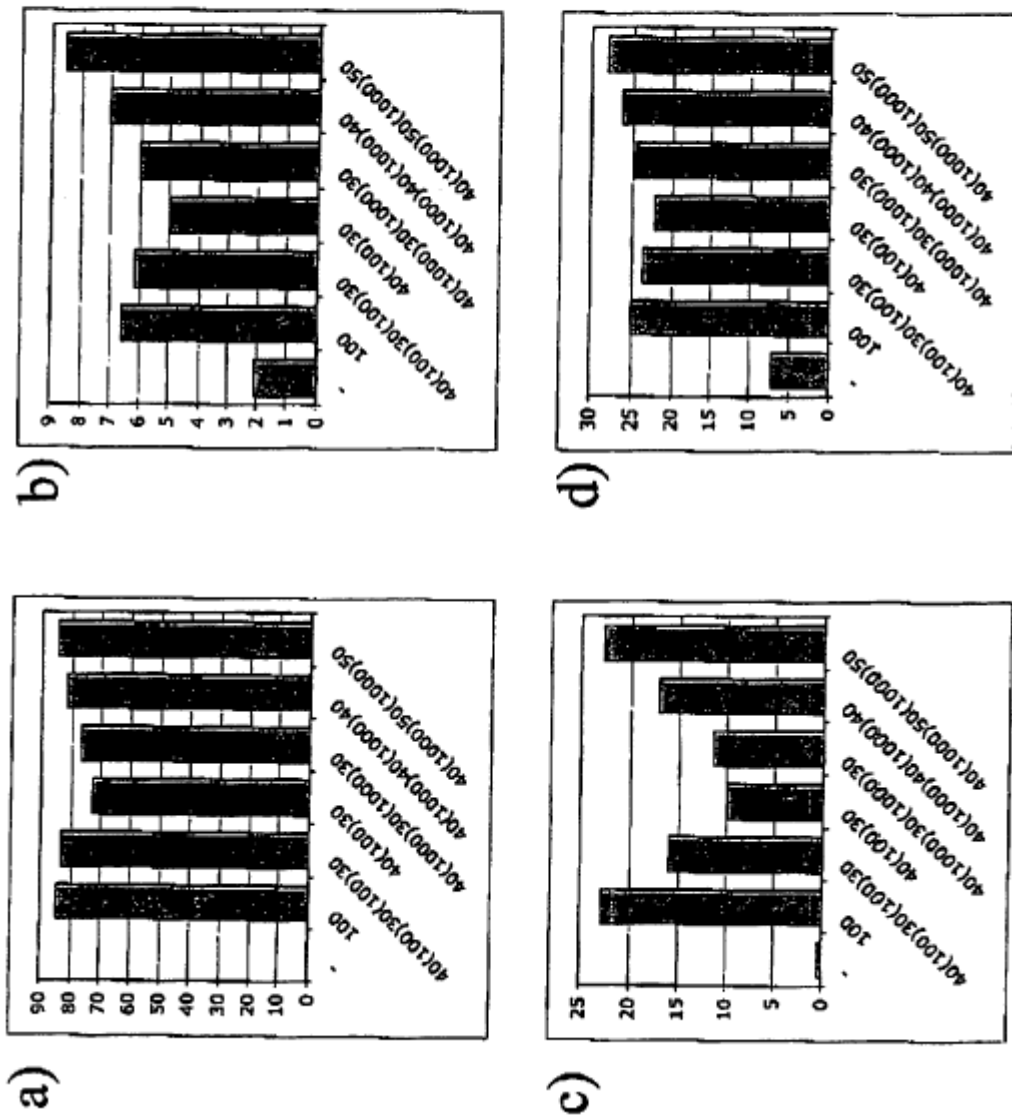


Fig. 5