

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 579**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2007 E 07003739 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 1961807**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para estabilizar el flujo a través de una cámara**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2015

73 Titular/es:

**LONZA COLOGNE GMBH (100.0%)
Nattermannallee 1
50829 Köln , DE**

72 Inventor/es:

**KAZINSKI, MICHAEL y
WIRTH, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 534 579 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y procedimiento para estabilizar el flujo a través de una cámara

5 La invención se refiere a un dispositivo, al menos compuesto por al menos un canal de entrada para introducir un fluido en una cámara y al menos un canal de salida para evacuar el fluido de la cámara, teniendo la cámara al menos dos electrodos para generar un campo eléctrico en la cámara que están en contacto con el espacio interior de la cámara. La invención se refiere además a un procedimiento para estabilizar el flujo de un fluido a través de una cámara que tiene al menos dos electrodos, que están en contacto con el espacio interior de la cámara, así como al
10 menos un canal de entrada para introducir el fluido en la cámara y al menos un canal de salida para evacuar el fluido de la cámara, generándose en la cámara un campo eléctrico mediante los dos electrodos.

La introducción de moléculas biológicamente activas como, por ejemplo, ADN, ARN o proteínas, en células vivas puede servir, por ejemplo, para el análisis de las funciones biológicas de estas moléculas y, además, es un requisito imprescindible del éxito de un uso terapéutico de estas moléculas, por ejemplo, en la terapia genética. A este respecto, un método preferido para la introducción de moléculas extrañas en las células es la denominada electroporación que, a diferencia de métodos químicos, provoca menores cambios no deseados de la estructura biológica y funciones de la célula objetivo. En la electroporación, las moléculas extrañas se introducen desde una solución acuosa, preferiblemente una solución tampón adaptada a las células o un medio de cultivo de células,
15 mediante una corriente de flujo temporal, es decir, por ejemplo, el pulso de un condensador que se está descargando, en las células, volviéndose la membrana de célula permeable para las moléculas extrañas mediante el efecto de los pulsos eléctricos cortos. A través de los "poros" que se producen temporalmente en la membrana de célula, las moléculas biológicamente activas llegan en primer lugar al interior del citoplasma en el que, dado el caso, ya pueden ejercer su función o efecto terapéutico a analizar, y, a continuación, en determinadas condiciones también al interior del núcleo celular, lo que es necesario en el caso de aplicaciones de terapia genética. Mediante la aplicación temporal de un campo eléctrico intenso, es decir, un pulso corto con una densidad de corriente elevada, se pueden fusionar además también células, derivados de célula, partículas subcelulares y/o vesículas. En esta denominada electrofusión, por ejemplo, las células en primer lugar se ponen en contacto íntimo de membrana
20 mediante un campo alterno eléctrico no homogéneo. Mediante la aplicación subsiguiente de un pulso de campo eléctrico se produce entonces la interacción de partes de membrana que finalmente conduce a la fusión. Para la electrofusión se pueden utilizar a este respecto dispositivos de aparatos comparables tal como para la electroporación.

Volúmenes más pequeños se tratan en la mayoría de los casos en el procedimiento de lotes en recipientes relativamente sencillos. La solución o suspensión de células se encuentra a este respecto a menudo en una cubeta, es decir, en un recipiente estrecho abierto hacia arriba que en la proximidad de la base tiene dos electrodos opuestos paralelos en las paredes laterales que sirven para aplicar la tensión eléctrica. Sin embargo, para el tratamiento de volúmenes más grandes, recipientes de este tipo no son adecuados, ya que el espacio de reacción disponible para el tratamiento eléctrico no se puede ampliar de cualquier manera, ya que la distancia de los electrodos es un factor limitativo. Para la electroporación o la electrofusión de volúmenes más grandes se aplican, por tanto, preferiblemente procedimientos de circulación en los que la suspensión de células o vesículas se conduce de forma continua o discontinua a través del espacio de reacción entre los electrodos.
35

Por el documento US-A-6 150 148, por ejemplo, es conocida una cubeta modificada para procedimientos de circulación cuya abertura está cerrada mediante un tapón a través del que está conducido un conducto de alimentación. En la zona de la base entre los electrodos, la cubeta tiene una abertura adicional a la que está conectado un conducto de evacuación. Mediante esta disposición se puede conducir la suspensión a tratar a través del conducto de alimentación al interior del espacio de reacción entre los electrodos y se puede volver a evacuar a través del conducto de evacuación. Mediante un intercambio repetido, continuo o discontinuo de la suspensión en el espacio de reacción y un pulsado correspondientemente repetido se pueden tratar con la cubeta conocida también volúmenes más grandes.
40
45
50

El documento US-A-6 150 148 da a conocer además cámaras de circulación que están configuradas en forma de tubo o ranura y tienen en sus extremos en cada caso una conexión para un canal de entrada y un canal de salida. Las propias cámaras constituyen un espacio de reacción alargado que está encerrado por dos electrodos cilíndricos, dispuestos de manera concéntrica o planos, dispuestos con planos paralelos. Mediante estos dispositivos se pueden tratar también en este caso volúmenes más grandes mediante un pulsado repetido en el paso a través de la cámara.
55

El documento US-A-5 965 410 da a conocer un procedimiento y un dispositivo para el calentamiento controlado de un fluido en un sistema de microfluidos. El sistema comprende al menos dos canales conectados entre sí mediante una zona de transición, solicitándose y calentándose a este respecto el fluido en los canales mediante electrodos con energía o corriente eléctrica. Debido a los diferentes diámetros de los dos canales, el fluido tiene en los canales diferentes temperaturas.
60

65 En la electroporación o electrofusión en el procedimiento de circulación, la producción de burbujas de gas mediante electrólisis, además del calentamiento de la suspensión, implica un problema importante. Debido a las corrientes

muy elevadas a menudo necesarias para estos procedimientos se producen en la solución electrolítica, en la que están suspendidas las células o vesículas a tratar, mediante procesos electroquímicos muchas burbujas de gas pequeñas que perturban el flujo de la suspensión a través de la cámara y pueden conducir a un flujo de retorno de la suspensión ya tratada al interior de la cámara. Por un lado, esto conduce a unos resultados que ya no se pueden reproducir y, además, a una tasa de mortalidad aumentada en el caso del tratamiento de células vivas.

Por tanto, el objetivo de la invención es proporcionar un dispositivo y un procedimiento para la electroporación o electrofusión de circulación con los que se garantice un flujo dirigido del fluido a tratar a través de la cámara o el espacio de reacción y se evite un flujo de retorno del fluido ya tratado al interior de la cámara o el espacio de reacción.

El objetivo se consigue de acuerdo con la invención por que el diámetro interior medio del canal de entrada del dispositivo mencionado al inicio es menor que el diámetro interior medio del canal de salida. El objetivo se consigue de acuerdo con la invención con respecto al procedimiento mencionado al inicio además por que el canal de entrada se estrecha por la reducción de su diámetro interior. Al prever un diámetro interior situado aguas arriba, menor en el lado de acceso aumenta la presión por delante de la cámara (aguas arriba) en comparación con la presión por detrás de la cámara (aguas abajo) de modo que el flujo del fluido se estabiliza en total con respecto a su dirección. Además, mediante este gradiente de presión se evita de manera ventajosa que burbujas de gas o fluido fluya o fluyan desde el canal de salida de vuelta al interior de la cámara. De acuerdo con la invención, el diámetro interior medio del canal de entrada se elige en comparación con el diámetro interior medio del canal de salida de modo que la presión aguas arriba de la cámara es siempre mayor que aguas abajo de la cámara. En el caso más sencillo, el diámetro interior del canal de entrada por toda su longitud es menor que el diámetro interior del canal de salida por toda su longitud o en su punto más estrecho. Sin embargo, el diámetro interior del canal de entrada puede estar estrechado o se puede estrechar con respecto al diámetro interior del canal de salida también en un punto o dentro de un tramo limitado, por ejemplo, cuando ambos canales tienen por lo demás un diámetro interior aproximadamente idéntico. El estrechamiento del diámetro interior del canal de entrada constituye a este respecto una medida sencilla y económica que hace que no sea necesario el uso de sistemas de válvula complicados, controlados electrónicamente.

Las reivindicaciones independientes 1 y 12 son las siguientes:

1. Dispositivo (1, 50, 60), al menos compuesto por al menos un canal de entrada (6, 51, 65) para introducir un fluido en una cámara (7, 54, 62) y al menos un canal de salida (11, 52, 66) para evacuar el fluido de la cámara (7, 54, 62), teniendo la cámara (7, 54, 62) al menos dos electrodos (8) para generar un campo eléctrico en la cámara (7, 54, 62) que están en contacto con el espacio interior (10, 53, 67) de la cámara (7, 54, 62), caracterizado por que el diámetro interior medio del canal de entrada (6, 51, 65) es menor que el diámetro interior medio del canal de salida (11,52, 66).

12. Procedimiento para estabilizar el flujo de un fluido a través de una cámara (7, 54, 62) que tiene al menos dos electrodos (8), que están en contacto con el espacio interior (10, 53, 67) de la cámara (7, 54, 62), así como al menos un canal de entrada (6, 51, 65) para introducir el fluido en la cámara (7, 54, 62) y al menos un canal de salida (11, 52, 66) para evacuar el fluido de la cámara (7, 54, 62), generándose en la cámara (7, 54, 62) un campo eléctrico mediante los dos electrodos (8), caracterizado por que el canal de entrada (6, 51, 65) se estrecha mediante la reducción de su diámetro interior y, de este modo, el diámetro interior medio del canal de entrada (6, 51, 65) es menor que el diámetro interior medio del canal de salida (11,52, 66).

Realizaciones preferidas de la invención reivindicada se encuentran en las reivindicaciones dependientes 2 a 11 y 13 a 16.

En una configuración ventajosa del dispositivo de acuerdo con la invención, el diámetro interior del canal de entrada en al menos un punto es menor que el menor diámetro interior del canal de salida. Por tanto, el diámetro interior del canal de entrada puede ser menor por toda la longitud del mismo o sólo dentro de al menos un tramo o en al menos un punto que el punto más estrecho del canal de salida. En esta forma de realización se puede asegurar de manera relativamente sencilla que la presión en la dirección de flujo por delante de la cámara es en cualquier caso mayor que por detrás de la cámara.

Por ejemplo, el canal de entrada puede tener al menos un estrechamiento para la reducción de su diámetro interior. A este respecto, el estrechamiento puede estar formado mediante una reducción del diámetro exterior del canal de entrada con un grosor de pared al menos aproximadamente constante y/o por elevaciones, rebordes o similares dispuestos dentro del canal de entrada. También es posible la introducción de tubos flexibles o tubitos de un diámetro menor en el canal de entrada. Además, en una configuración especialmente ventajosa de la invención también puede estar colocado un dispositivo de cierre variable tal como, por ejemplo, una corredera, un tapón, una válvula o una compuerta, dentro de o en el canal de entrada, con cuya ayuda se puede ajustar de manera manual o automática el diámetro interior del canal de entrada.

- En una configuración ventajosa adicional del dispositivo de acuerdo con la invención está previsto que el canal de salida esté configurado en forma de arco o curva para evitar la producción de cantos y/o espacios muertos en o dentro de los que se podrían incrustar componentes o fragmentos de célula. Dado que el tratamiento en particular de células vivas con corriente eléctrica o el paso de las mismas a través de un campo eléctrico siempre conduce a una
- 5 eliminación o destrucción de células individuales, en el canal de salida situado aguas abajo de la cámara se encuentran en el fluido, además de células intactas, también fragmentos de célula y, por consiguiente, también componentes intracelulares que se depositan en puntos adecuados y, por tanto, podrían conducir a una obstrucción del canal de salida. Para evitar esto, el canal de salida no debería tener cambios de dirección en ángulo recto aunque fuera necesario un cambio de dirección por motivos constructivos.
- 10 Para que las burbujas de gas que se producen en el fluido mediante el tratamiento eléctrico se puedan escapar sin problemas, la desembocadura del canal de salida debería estar dispuesta preferiblemente por encima de la cámara. Por consiguiente, también el canal de salida debería estar dispuesto preferiblemente por encima del canal de entrada y no a la misma altura con éste.
- 15 El dispositivo de acuerdo con la invención puede tener además una carcasa, desembocando el canal de salida y el canal de entrada en la superficie o fuera de la carcasa por motivos de seguridad. Mediante esta construcción se asegura que una persona que manipula el dispositivo no puede o debe intervenir en el espacio interior de la carcasa en el que se encuentran los electrodos y otros componentes constructivos posiblemente cargados de manera
- 20 eléctrica. Por tanto, la conexión de un depósito y de un recipiente de recogida es posible sin riesgo en el caso de un dispositivo de este tipo. A este respecto, por motivos prácticos, las desembocaduras de ambos canales deberían estar situadas en el mismo lado de la carcasa, preferiblemente en el lado anterior o frontal, para facilitar la manipulación del dispositivo de acuerdo con la invención.
- 25 Adicionalmente a las medidas descritas, el canal de salida y/o el canal de entrada puede(n) estar provisto(s) de al menos una válvula controlada de manera activa o pasiva, preferiblemente al menos una válvula antirretorno. De este modo se puede evitar un flujo de retorno del fluido al interior de la cámara en caso de que se produzca temporalmente una inversión de las relaciones de presión por motivos cualesquiera.
- 30 Por motivos de seguridad está previsto de acuerdo con la invención además que el canal de entrada y/o el canal de salida esté(n) provisto(s) de al menos un electrodo de puesta a tierra. De este modo se puede evitar que las corrientes elevadas, que fluyen en muchas aplicaciones en el dispositivo de acuerdo con la invención, impliquen un peligro para el personal operativo. A este respecto, uno o varios electrodos de puesta a tierra pueden estar dispuestos en cualquier punto aguas abajo, aguas arriba y/o directamente en la cámara.
- 35 En una configuración especialmente ventajosa del dispositivo de acuerdo con la invención está previsto que los al menos dos electrodos estén provistos en su lado alejado del fluido de al menos un dispositivo de refrigeración. Dado que en el paso de mayores cantidades de fluido a través de la cámara se tienen que generar una pluralidad de pulsos de tensión, se produce obligatoriamente un calentamiento de los electrodos y, con ello, también del fluido.
- 40 Para limitar este calentamiento y evitar un aumento de la temperatura de fluido hasta una temperatura perjudicial para el material biológico a tratar es necesaria una refrigeración al menos de los electrodos. Por ejemplo, en el tratamiento de células vivas con corriente eléctrica, la temperatura no debería subir por encima de 40 °C. La refrigeración de los electrodos se puede realizar, por ejemplo, mediante un refrigerador de CPU convencional, un refrigerador Peltier o similares. A este respecto, por motivos de seguridad puede estar dispuesta en una
- 45 configuración ventajosa de la invención una lámina termoconductora, no conductora de corriente para el aislamiento entre el respectivo electrodo y el dispositivo de refrigeración.
- La invención se refiere también al uso ventajoso del dispositivo de acuerdo con la invención para la electroporación o electrofusión de células, partículas de célula y/o vesículas de membrana en el procedimiento de circulación. A este
- 50 respecto, el dispositivo de acuerdo con la invención permite de manera ventajosa el tratamiento de grandes volúmenes del material biológico mediante un paso continuo o discontinuo de la respectiva suspensión a través de la cámara.
- En una configuración ventajosa del procedimiento de acuerdo con la invención está previsto que el estrechamiento se establezca mediante una reducción del diámetro exterior del canal de entrada con un grosor de pared al menos
- 55 aproximadamente constante y/o mediante una introducción de elevaciones, rebordes o similares en el canal de entrada.
- Especialmente preferible es una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención en la que se varía la reducción del diámetro interior del canal de entrada. Mediante un accionamiento manual o automático de una corredera, un tapón, una válvula, una compuerta o un dispositivo de cierre similar se puede ajustar a este
- 60 respecto el diámetro interior del canal de entrada de modo que las relaciones de presión en el dispositivo de acuerdo con la invención están adaptadas óptimamente a las respectivas condiciones. De este modo se puede controlar el flujo del fluido mediante una variación del diámetro interior del canal de entrada para posibilitar el ajuste de una
- 65 relación óptima entre la sobrepresión aguas arriba, por un lado, y la velocidad de flujo, por otro lado, en diferentes condiciones.

Para limitar un calentamiento del fluido en el paso a través del campo eléctrico en la cámara y evitar un aumento de la temperatura de fluido hasta una temperatura perjudicial para el material a tratar está previsto que se refrigere al menos un electrodo que está previsto para generar el campo eléctrico en la cámara.

5 En el procedimiento de acuerdo con la invención, el fluido se puede conducir de manera continua o discontinua a través de la cámara. A este respecto se genera una serie de campos eléctricos en la cámara para que cada volumen parcial del fluido esté expuesto al campo eléctrico. La velocidad de flujo se debe adaptar a las separaciones entre los pulsos de tensión individuales o, a la inversa, las separaciones entre los pulsos de tensión individuales se deben adaptar a la velocidad de flujo, de modo que un volumen parcial del fluido a tratar está expuesto lo más exactamente posible al número deseado de pulsos eléctricos. En cualquier caso se debería evitar que una parte demasiado grande del fluido a tratar esté expuesta más veces de lo deseado o no esté expuesta a los pulsos de tensión. Preferiblemente, el fluido contiene células, partículas de célula y/o vesículas de membrana que se exponen al menos a un campo eléctrico en el paso a través de la cámara.

15 La invención se explica además en más detalle a modo de ejemplo mediante las siguientes figuras. Muestran

- La figura 1 un corte longitudinal esquemático a través de una forma de realización del dispositivo de acuerdo con la invención,
- 20 La figura 2 el dispositivo de acuerdo con la figura 1 con un estrechamiento adicional del canal de entrada,
- La figura 3 el dispositivo de acuerdo con la figura 1 con electrodos de puesta a tierra,
- La figura 4 el dispositivo de acuerdo con la figura 2 con electrodos de puesta a tierra,
- 25 La figura 5 un corte longitudinal esquemático a través de formas de realización adicionales del dispositivo de acuerdo con la invención con estrechamientos diferentes del canal de entrada y
- La figura 6 una forma de realización adicional del dispositivo de acuerdo con la invención con electrodos de puesta a tierra.
- 30

La figura 1 muestra un corte longitudinal a través de una forma de realización a modo de ejemplo del dispositivo de acuerdo con la invención. El dispositivo 1 comprende una carcasa 2 que tiene en su lado anterior 3 dos aberturas 4, 5. A las aberturas 4, 5 se pueden conectar, preferiblemente a través de tubos flexibles u otros conductos, recipientes que en cada caso sirven para alojar un fluido. Así, por ejemplo, se puede conectar a la abertura 4 un recipiente de reservas o depósito desde el que se introduce el fluido, preferiblemente mediante una bomba o aire comprimido, en el canal de entrada 6 del dispositivo 1 (las flechas en las aberturas 4, 5 indican la dirección de flujo del fluido). A través del canal de entrada 6, el fluido llega entonces al interior de una cámara 7 que tiene dos electrodos que están en contacto con el espacio interior 10 de la cámara 7. De los electrodos se puede ver en esta representación sólo el electrodo 8 dispuesto por detrás del espacio interior 10 de la cámara 7, mientras que el segundo electrodo, que está dispuesto en un plano paralelo al electrodo 8, se sitúa por delante del plano de corte. Los dos electrodos están separados uno de otro mediante dos aisladores 9, formando los dos aisladores en la prolongación del canal de entrada 6 un hueco que representa el espacio interior 10 de la cámara 7. El espacio interior 10 de la cámara 7 se delimita, observado desde el lado anterior 3 del dispositivo 1, lateralmente por los electrodos así como por delante y por detrás por los aisladores 9 situados entre los electrodos. Al aplicar una tensión eléctrica en los electrodos se produce en el espacio interior 10 un campo eléctrico que actúa sobre el material que se encuentra en el fluido. La tensión aplicada es, preferiblemente, un pulso de alta tensión que se genera mediante la descarga de uno o varios condensadores. Debido a la descarga del condensador se produce entre los electrodos un campo eléctrico intenso temporal en el espacio interior 10 de la cámara 7.

50 Por ejemplo, cuando el fluido es una suspensión en la que células, partículas de célula y/o vesículas de membrana están suspendidas en una solución electrolítica y están disueltas moléculas biológicamente activas, entonces estas moléculas biológicamente activas se pueden introducir con ayuda del campo eléctrico en las células, partículas de célula y/o vesículas de membrana (electroporación). De manera alternativa, las células, partículas de célula y/o vesículas de membrana también se pueden fusionar mediante el campo eléctrico (electrofusión). Si se conducen volúmenes más grandes del fluido o de la suspensión de manera continua o discontinua a través de la cámara 7, entonces se deben generar campos eléctricos en intervalos breves de modo que cada volumen parcial del fluido o de la suspensión está expuesto al menos a un campo eléctrico y se puede tratar tal como se desea.

60 El material tratado llega entonces desde la cámara 7 al interior del canal de salida 11 del dispositivo 1. El canal de salida 11 está configurado en forma de arco y, por tanto, desemboca en la abertura 5 en el lado anterior 3 del dispositivo 1. Dado que el fluido, por ejemplo, en el caso de una suspensión de célula tras el tratamiento eléctrico en la cámara 7, también contiene fragmentos de célula, una configuración rectangular del canal de salida en las esquinas y cantos que existen entonces podría conducir a depósitos y, en el peor caso, a una obstrucción del canal de salida. Mediante la configuración redondeada del canal de salida 11 del dispositivo 1 se pueden evitar de manera eficaz problemas de este tipo, ya que en las zonas de curva del canal de salida 11 no se pueden depositar

fragmentos de célula. Por ejemplo, a la abertura 5 se puede conectar un recipiente de recogida o acumulación en el que se puede recoger el fluido o la suspensión tras el tratamiento en el dispositivo 1. Con recipientes de reservas y de recogida conectados a las aberturas 4, 5, el dispositivo 1 de acuerdo con la invención, por tanto, constituye un sistema cerrado que también se puede operar de manera estéril.

5 Mediante el campo eléctrico en el espacio interior 10 de la cámara 7 entre los electrodos se pueden producir en el fluido mediante electrólisis burbujas de gas que pueden perturbar el flujo del fluido. En particular, en caso de una pluralidad de pulsos de alta tensión se puede producir una sobrepresión en la cámara 7 que presiona las burbujas de gas y material ya tratado de vuelta al interior del canal de entrada 6. Para evitar este efecto no deseado, en el dispositivo 1 de acuerdo con la invención, el diámetro interior medio del canal de entrada 6 es menor que el diámetro interior medio del canal de salida 11. En la forma de realización representada en este caso, tanto el canal de entrada 6 como el canal de salida 11 tienen un diámetro interior aproximadamente constante en cada caso por toda su longitud. Debido a que el diámetro interior del canal de entrada 6 es claramente menor que el diámetro interior del canal de salida 11 se produce en el paso del fluido aguas arriba de la cámara 7 en el canal de entrada 6 una presión mayor que aguas abajo de la cámara 7 en el canal de salida 11. De manera ventajosa, este gradiente de presión conduce a que el flujo del fluido permanezca constante dirigido en la dirección de las flechas y que ningún fluido ya tratado pueda fluir de vuelta al interior de la cámara 7 o del canal de entrada 6.

20 Como medida ventajosa adicional, en el dispositivo 1 de acuerdo con la invención, la desembocadura o la abertura 5 del canal de salida 11 se sitúa por encima del canal de entrada 6 y también por encima de la cámara 7. De este modo se facilita el escape de las burbujas de gas del canal de salida 11. Además, en el canal de salida 11, preferiblemente en proximidad de la cámara 7, puede estar dispuesta una válvula antirretorno (no representada en este caso) que evita un flujo de retorno del fluido en caso de una inversión de presión temporal, por ejemplo, al apagar la bomba o entre los pulsos de tensión. Dado que ambas aberturas 4, 5 de los canales 6, 11 están dispuestas en el lado anterior 3 del dispositivo 1, los recipientes necesarios se pueden conectar de manera sencilla al dispositivo 1. Por tanto, el dispositivo 1 es muy fácil de manejar y, además, también muy seguro, ya que los recipientes o tubos flexibles necesarios no se pueden conectar directamente a la cámara 7 sino a la carcasa 2. Por tanto se puede excluir un peligro para el personal operativo por la fuente de tensión o los electrodos.

30 La figura 2 muestra el dispositivo 1 de acuerdo con la figura 1 con un estrechamiento 15 introducido adicionalmente en el canal de entrada 6. Por tanto, en esta forma de realización, el diámetro interior del canal de entrada 6 está reducido otra vez en la zona del estrechamiento 15 con respecto al diámetro interior del canal de salida 11 de modo que el gradiente de presión está aumentado adicionalmente. Debido al aumento adicional de la presión de fluido en el canal de entrada 6 se puede evitar, incluso en caso de una formación de gas muy intensa en la cámara 7, un flujo de retorno del fluido al interior del espacio interior 10 de la cámara 7 o del canal de entrada 6. En el caso del estrechamiento 15 se trata de un engrosamiento cilíndrico dirigido hacia dentro de la pared del canal de entrada 6 con un diámetro exterior constante. Por tanto, el estrechamiento 15 es una especie de borde reforzado o elevación de la pared interior del canal de entrada 6. De manera alternativa, el mismo efecto, por ejemplo, se puede conseguir también mediante la introducción de un trozo corto de tubo flexible en el canal de entrada 6, debiendo ser el diámetro exterior del trozo de tubo flexible igual de grande o algo más grande que el diámetro interior del canal de entrada (encaje a presión).

45 Las figuras 3 y 4 muestran los dispositivos 1 de acuerdo con las figuras 1 y 2 en cada caso con electrodos de puesta a tierra 20. Los electrodos de puesta a tierra sirven para la seguridad del dispositivo 1 de acuerdo con la invención. Las corrientes elevadas, que fluyen en muchas aplicaciones en el dispositivo 1 de acuerdo con la invención, constituyen un peligro permanente para el personal operativo. Uno o varios electrodos de puesta a tierra pueden estar dispuestos en cualquier punto aguas abajo, aguas arriba y/o directamente en la cámara para reducir el riesgo de una descarga eléctrica. Los electrodos de puesta a tierra 20 están colocados a ambos lados de la cámara 7 en cada caso en los canales de entrada y de salida 6, 11 de modo que se pueden desviar directamente corrientes que fluyen saliendo de la cámara 7.

50 La figura 5 muestra un corte longitudinal a través de una forma de realización adicional del dispositivo de acuerdo con la invención con diferentes estrechamientos del canal de entrada. A diferencia del dispositivo 1 de acuerdo con las figuras 1 a 4, el dispositivo 50 tiene un canal de entrada 51 y un canal de salida 52 con un diámetro interior (y exterior) aproximadamente idéntico. La presión que se produce debido a los pulsos de tensión y las burbujas de gas que se producen de este modo en el espacio interior 53 de la cámara 54 y en el canal de salida 52 se sobrecompensa mediante un estrechamiento 55 en el canal de entrada 51 que fundamentalmente se corresponde con el estrechamiento 15 de acuerdo con las figuras 2 y 4. Debido a la reducción del diámetro interior medio del canal de entrada 51 en comparación con el diámetro interior medio del canal de salida 52, provocada por el estrechamiento 55, se puede mantener un flujo dirigido del fluido a través de la cámara 54 también en caso de una formación de gas intensa. La reducción del diámetro interior medio del canal de entrada 51 se puede conseguir a este respecto de diferente manera tal como muestran las diferentes formas de realización de acuerdo con a) a e). Mientras que, en principio, las formas de realización de acuerdo con b) y e) son similares a la forma de realización de acuerdo con c), en la forma de realización de acuerdo con d) se consigue el estrechamiento mediante una reducción del diámetro exterior del canal de entrada con un grosor de pared constante. Un efecto de este tipo se puede conseguir, por ejemplo, también mediante la colocación de una pinza o similares en un tramo flexible del

canal de entrada. En este caso, la reducción del diámetro interior y, con ello, también la presión en el canal de entrada se puede variar de manera flexible. La forma de realización de acuerdo con a) muestra una válvula, pudiendo tratarse en este caso de una válvula controlada de manera activa o pasiva. En el caso de una válvula controlada es también posible variar de manera flexible la reducción del diámetro interior y, con ello, también la presión en el canal de entrada. De manera ventajosa, la válvula se podría sincronizar también con los pulsos de tensión para optimizar adicionalmente el procedimiento de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, las transiciones de la pared interior del canal de entrada están configuradas de manera redondeada o aplanada hacia la zona del estrechamiento tal como, por ejemplo, en las formas de realización de acuerdo con las figuras 5 a) a d), para evitar transiciones de arista viva. Esto es especialmente ventajoso, ya que, en caso contrario, se podría dañar el material a tratar por fuerzas de cizallamiento demasiado grandes.

Evidentemente, los estrechamientos 55 pueden estar dispuestos en diferentes puntos del canal de entrada. Además, también es posible disponer varios estrechamientos en fila para aumentar el efecto de los mismos.

La figura 6 muestra un dispositivo 60 adicional de acuerdo con la invención que, en principio, se corresponde con el dispositivo 1 de acuerdo con la figura 1 con electrodos de puesta a tierra 60, 61 colocados adicionalmente. En esta forma de realización ventajosa se vuelve claro que los electrodos de puesta a tierra pueden estar dispuestos en diferentes puntos a lo largo del canal de entrada y del canal de salida. Así, en el presente ejemplo, el electrodo de puesta a tierra 61 está dispuesto aguas arriba directamente en la cámara 62, mientras que el electrodo de puesta a tierra 68 está dispuesto aguas arriba en proximidad del estrechamiento 63. Además, en esta forma de realización, el hueco entre los aisladores 64 es más ancho que los diámetros interiores del canal de entrada 65 y del canal de salida 66 de modo que se reduce la velocidad de flujo del fluido en la cámara 62, lo que conduce a una prolongación del tiempo de permanencia del fluido en el espacio interior 67 de la cámara 62.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1, 50, 60), al menos compuesto por al menos un canal de entrada (6, 51, 65) para introducir un fluido en una cámara (7, 54, 62) y al menos un canal de salida (11, 52, 66) para evacuar el fluido de la cámara (7, 54, 62),
 5 presentando la cámara (7, 54, 62) al menos dos electrodos (8) para generar un campo eléctrico en la cámara (7, 54, 62) que están en contacto con el espacio interior (10, 53, 67) de la cámara (7, 54, 62), **caracterizado por que** el diámetro interior medio del canal de entrada (6, 51, 65) es menor que el diámetro interior medio del canal de salida (11, 52, 66).
- 10 2. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el diámetro interior del canal de entrada (6, 51, 65) en al menos un punto es menor que el menor diámetro interior del canal de salida (11, 52, 66).
3. Dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el canal de entrada (6, 51, 65) tiene al menos un estrechamiento (15, 55, 63) para la reducción de su diámetro interior.
- 15 4. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** el estrechamiento (15, 55, 63) está formado por una reducción del diámetro exterior del canal de entrada (6, 51, 65) con un grosor de pared al menos aproximadamente constante y/o por elevaciones, rebordes o similares dispuestos dentro del canal de entrada (6, 51, 65).
- 20 5. Dispositivo de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el canal de salida (11, 52, 66) está configurado en forma de arco o curva.
6. Dispositivo de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** la desembocadura del canal de salida (11, 52, 66) está dispuesta por encima de la cámara (7, 54, 62).
- 25 7. Dispositivo de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** el canal de salida (11, 52, 66) y/o el canal de entrada (6, 51, 65) está(n) provisto(s) de al menos una válvula, preferiblemente al menos una válvula antirretorno.
- 30 8. Dispositivo de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** el canal de entrada (6, 51, 65) y/o el canal de salida (11, 52, 66) está(n) provisto(s) de al menos un electrodo de puesta a tierra (20, 61, 68).
- 35 9. Dispositivo de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** los al menos dos electrodos (8) están provistos en su lado alejado del fluido de al menos un dispositivo de refrigeración.
10. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** entre el electrodo (8) y el dispositivo de refrigeración está dispuesta una lámina termoconductora no conductora de corriente.
- 40 11. Uso del dispositivo de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 10 para la electroporación o electrofusión de células, partículas de célula y/o vesículas de membrana en el procedimiento de circulación.
- 45 12. Procedimiento para estabilizar el flujo de un fluido a través de una cámara (7, 54, 62) que tiene al menos dos electrodos (8), que están en contacto con el espacio interior (10, 53, 67) de la cámara (7, 54, 62), así como al menos un canal de entrada (6, 51, 65) para introducir el fluido en la cámara (7, 54, 62) y al menos un canal de salida (11, 52, 66) para evacuar el fluido de la cámara (7, 54, 62), generándose en la cámara (7, 54, 62) un campo eléctrico mediante los dos electrodos (8), **caracterizado por que** el canal de entrada (6, 51, 65) se estrecha para la reducción de su diámetro interior y, de este modo, el diámetro interior medio del canal de entrada (6, 51, 65) es menor que el diámetro interior medio del canal de salida (11, 52, 66).
- 50 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado por que** el estrechamiento se establece mediante la reducción del diámetro exterior del canal de entrada (6, 51, 65) con un grosor de pared al menos aproximadamente constante y/o mediante la introducción de elevaciones, rebordes o similares en el canal de entrada (6, 51, 65).
- 55 14. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 12 o 13, **caracterizado por que** se varía la reducción del diámetro interior del canal de entrada (6, 51, 85).
- 60 15. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado por que** el flujo del fluido se controla variando el diámetro interior del canal de entrada (6, 51, 65).
- 65 16. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 12 a 15, **caracterizado por que** se refrigera al menos un electrodo (8) que está previsto para la generación del campo eléctrico en la cámara (7, 54, 62).

Fig. 1

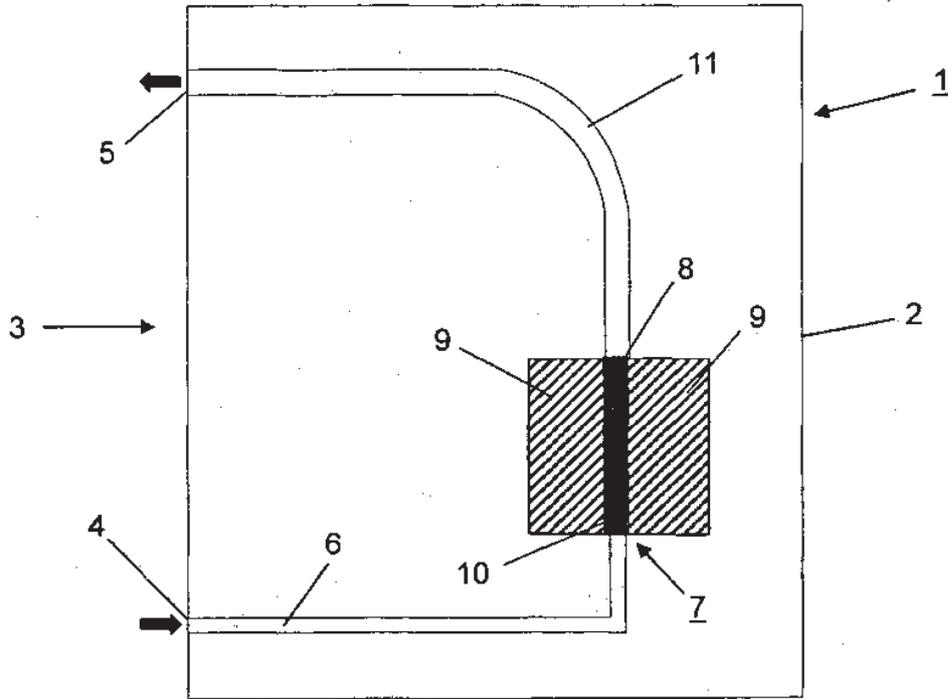


Fig. 2

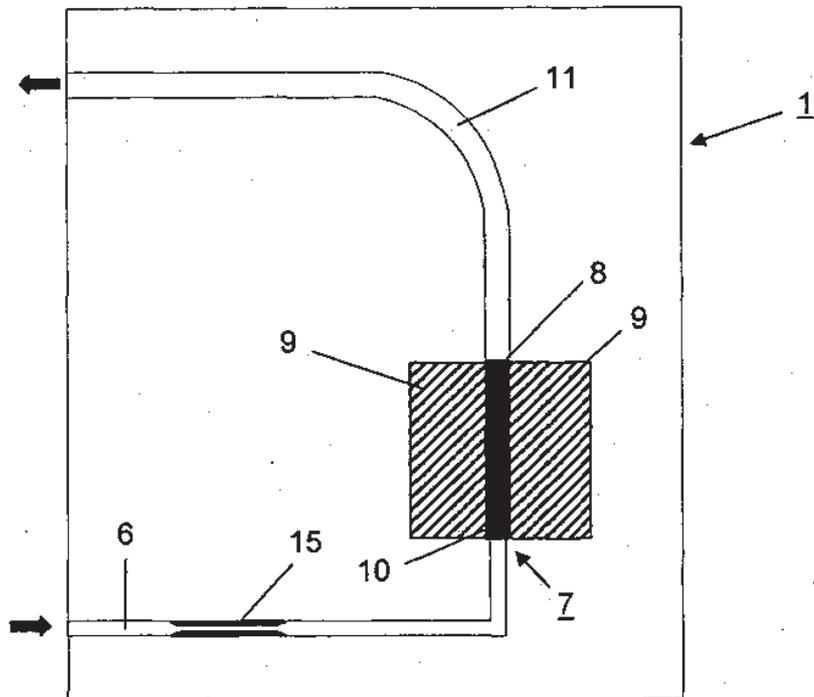


Fig. 3

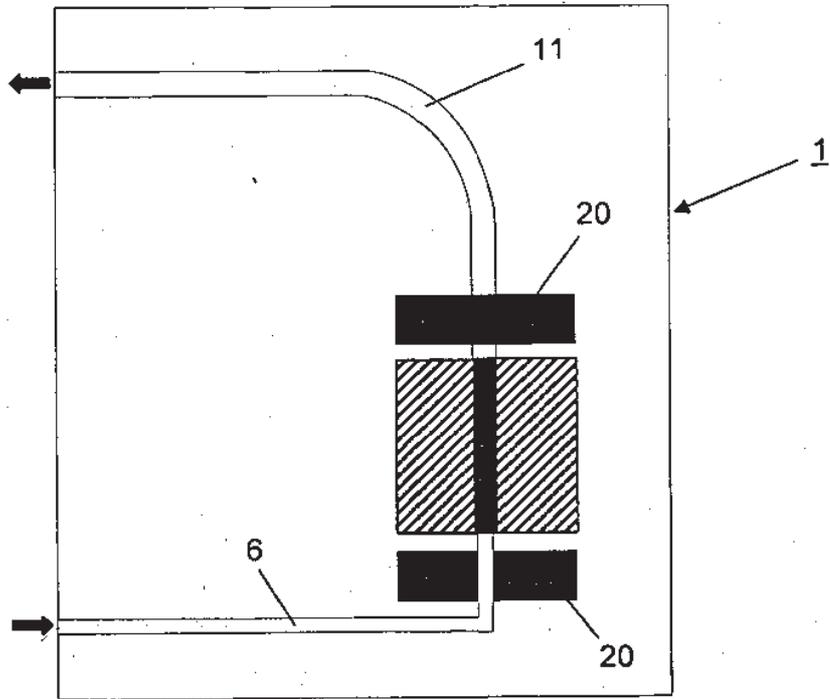


Fig. 4

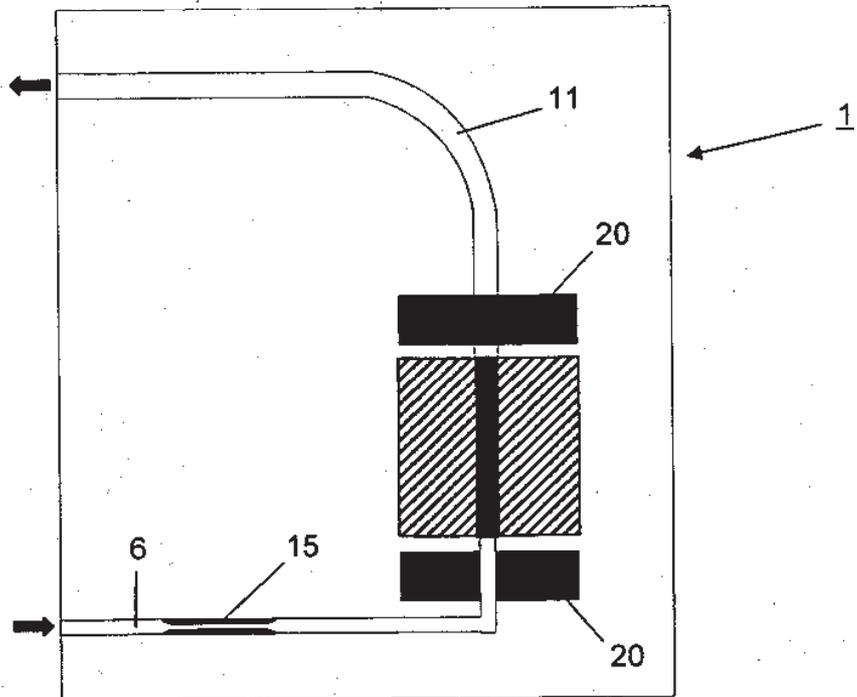


Fig. 5

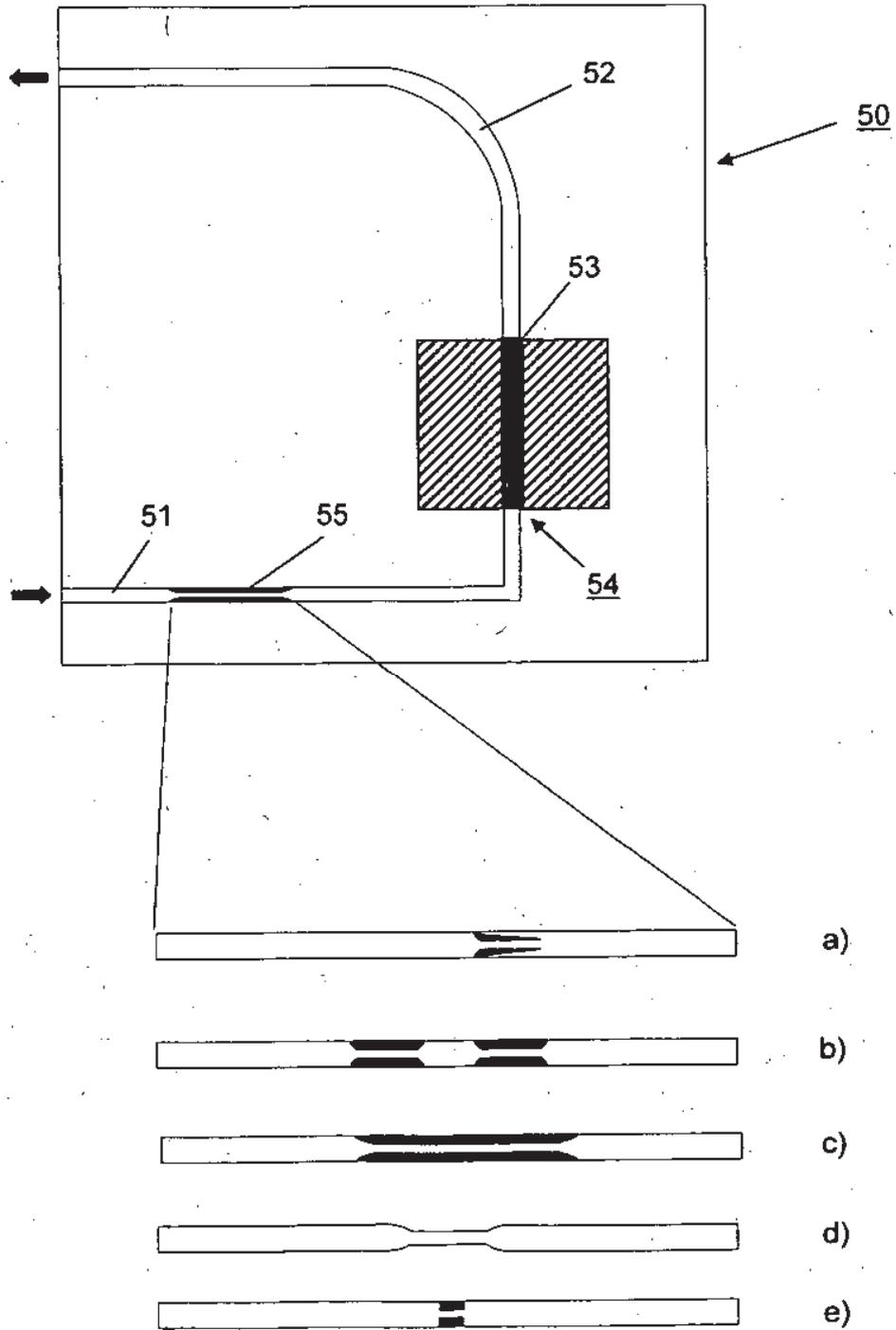


Fig. 6

