

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 480**

51 Int. Cl.:

**B01F 11/00** (2006.01)

**B01F 13/08** (2006.01)

**B01F 15/00** (2006.01)

**B01F 15/02** (2006.01)

**G01N 1/38** (2006.01)

**C12M 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2015** E 15166679 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018** EP 2944373

54 Título: **Dispositivo para suspender células**

30 Prioridad:

**17.05.2014 EP 14168756**

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

**25.10.2018**

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)  
Friedrich-Ebert-Strasse 68  
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**BÜSCHER, MARTIN;  
PETERS, RALF-PETER;  
IGNATIUS, SVEN y  
HAMMERSCHMIDT, DOMINIK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 687 480 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 para suspender células

Esta invención se refiere a un método y a un dispositivo para suspender partículas en el seno de un fluido, especialmente para suspender células vivas en pequeños volúmenes de fluidos.

### 5 Antecedentes

Las muestras biológicas tales como células necesitan ser suspendidas en el seno de un líquido para propósitos de cultivo o de análisis. Tales suspensiones resultan adecuadas durante un corto tiempo, hasta que la muestra comienza a sedimentarse, lo que hace necesaria la remezcla. La mezcla de suspensiones de muestras biológicas es una técnica conocida desde hace mucho tiempo, para la que se dispone comercialmente de diversos dispositivos. El diseño y el funcionamiento de los dispositivos de mezcla dependen de la naturaleza y del volumen de la muestra que se ha de mezclar, del tamaño y de la forma del recipiente de mezcla, y de las subsiguientes etapas de tratamiento de la muestra.

Además de mezclar una suspensión por medio de un agitador acoplado a un motor eléctrico, son de uso común los agitadores de células magnéticos. A fin de proporcionar volúmenes mayores de suspensiones, los documentos EP 53869, US 3.854.704 y US 3.572.651 divulgan un agitador de células magnético en el que la suspensión es mezclada por medio de un imán rotativo colocado dentro del recipiente de mezcla, a través de un árbol flexible. El imán situado dentro del recipiente es forzado a un movimiento de rotación por un imán situado en el exterior del recipiente, que, a su vez, es hecho rotar por un aparato de agitación magnética convencional. El árbol flexible está fijado al recipiente de mezcla y no puede ser retirado o insertado dentro del recipiente.

El documento US 3.780.992 divulga una pipeta vibratoria en la cual un oscilador mecánico está fijado a la pipeta a modo de barra de agitación.

El documento US 4.204.774 describe un agitador de células magnético en el cual la suspensión es mezclada por una barra de agitación rotativa. La barra es hecha rotar en una trayectoria circular dentro del recipiente mezclador por unos medios excéntricos y un motor sincrónico. El agitador de células magnético está firmemente fijado al recipiente de mezcla y no puede ser retirado del recipiente o insertado en él.

Las muestras biológicas para propósitos de ensayo o análisis se proporcionan habitualmente en pequeños volúmenes que oscilan entre menos de 10  $\mu$ l y 5 ml. Por ejemplo, las microplacas que se utilizan comúnmente proporcionan hasta 1.024 pocillos que tienen un volumen menor que un mililitro. La mezcla de cantidades tan pequeñas por mera agitación resulta difícil como consecuencia de las fuerzas capilares y de la pequeña relación entre superficie y volumen del recipiente, resultado de la adhesión del líquido a las paredes del recipiente. La mezcla por agitación genera una única corriente de líquido que se mueve en un círculo adyacente a la pared del recipiente, la cual tiene una baja turbulencia y, de acuerdo con ello, una baja eficiencia de mezcla.

A este respecto, el documento US 2008/0078257 divulga un procedimiento de mezcla y un dispositivo de mezcla de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1, en el cual una barra de mezcla magnética es movida por un segundo imán que rota en torno a la barra de mezcla.

Las suspensiones del interior de los pocillos de la microplaca son, por tanto, habitualmente mezcladas mediante sacudimiento o vibración de toda la microplaca, esto es, de todos los pocillos simultáneamente. El sacudimiento de suspensiones de células en el interior de una microplaca puede dar como resultado una pérdida de células, ya que pueden adherirse células a las paredes de un pocillo, por encima de la superficie del líquido. Resultaría beneficioso proporcionar suspensiones de pequeño volumen de muestras biológicas sin agitación del fluido en círculo y/o sin necesidad de sacudir / hacer vibrar otros recipientes. Sería, por lo demás, deseable proporcionar un dispositivo para generar tales suspensiones que pueda ser implementado en dispositivos analíticos como máquinas de FACS [Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia –“Florescence-Activated Cell Sorting”–] para la preparación de muestras, aguas arriba con respecto al dispositivo de análisis de células.

De forma sorprendente, se encontró que las suspensiones de partículas, especialmente en recipientes de pequeño volumen, pueden ser eficazmente homogeneizadas por medio de un dispositivo en el cual una barra de mezcla magnética es movida de una manera oscilante por su interacción con un segundo imán rotativo.

### Objeto de la invención

De acuerdo con ello, el objeto de la invención consiste en un dispositivo de mezcla de acuerdo con la reivindicación 1. También se divulga un procedimiento para mezclar una muestra biológica, tal como una suspensión de células, consistente en proporcionar a un recipiente de mezcla una muestra biológica en el seno de un líquido, sumergir una barra de mezcla en el líquido y agitar el líquido por medio de un primer imán (1) que rota alrededor de un eje longitudinal (2); una barra de mezcla (4), fijada a una montura (6), de tal manera que la montura incluye un segundo imán (3), de tal modo que la montura (6) se mueve en un movimiento sustancialmente ortogonal al eje longitudinal de la barra de mezcla (4) por la interacción del primer imán rotativo con el segundo imán (3).

Con el dispositivo de la invención, es posible suspender partículas incluso en pequeños volúmenes de fluido, sin pérdida de partículas o de fluido debidas a los derrames o a la reaglomeración.

Dentro del alcance de la invención, los términos «mezcla» o «suspensión» son sinónimos y están encaminados a proporcionar una suspensión de partículas, tales como células, en el seno de un fluido.

- 5 El dispositivo de acuerdo con la invención es especialmente útil para la suspensión de partículas como las de una muestra biológica en el seno de un líquido o fluido por medio del movimiento de la barra de mezcla (4) en el seno de la muestra biológica. «Muestra biológica» puede ser cualquier tipo de tejido o células que se vayan a suspender en un fluido apropiado, tal como una solución amortiguadora de nutrición de las células.

#### Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 muestra el dispositivo provisto de un primer imán (1), un primer eje longitudinal (2), un segundo imán (3), una barra de mezcla (4), una montura (6, 6') y un segundo eje (5).

La Figura 2 muestra el primer imán (1), montado en un motor eléctrico (8), con un contrapeso (9) que rota alrededor del primer eje longitudinal (2').

- 15 La Figura 3 muestra el imán (3), fijado a la montura de la barra de mezcla (4), articulada a las juntas (6, 6'). Las juntas están aseguradas mediante orificios pasantes (7), por lo que el movimiento de la montura es limitado, como se ha representado por la línea discontinua 6''. La barra de mezcla (4) es guiada por un manguito (10).

La Figura 4 es una vista lateral del sistema de mezcla, provisto de un motor eléctrico (8) y de la barra de mezcla (4).

La Figura 5 es una vista frontal del sistema de mezcla, del que se han retirado las juntas articuladas (6, 6') para la barra de mezcla (4). La barra de mezcla (4) es guiada por el soporte o manguito (10).

- 20 La Figura 6 muestra ejemplos del movimiento de la barra de mezcla (4) (línea delgada) así como de las corrientes de convección resultantes de los fluidos (línea gruesa).

#### Descripción detallada de la invención

- 25 El movimiento preferido de la barra de mezcla (4) a través del fluido es sustancialmente ortogonal o lateral con respecto al eje longitudinal de la barra de mezcla. Tal movimiento, así como las corrientes resultantes en el líquido, se representan en la Figura 6, con flechas que indican el sentido del movimiento. Al mover la barra de mezcla (4) (líneas delgadas) a través del fluido, se producen como resultado corrientes de convección de fluido (líneas gruesas) con una zona común de turbulencia. Las corrientes fluyen con direcciones opuestas y comparten al menos una zona común de turbulencia.

- 30 Es esencial para el dispositivo de mezcla de acuerdo con la invención el movimiento de la barra de mezcla (4) alrededor del segundo eje (5). El término «sustancialmente» significa que el movimiento puede desviarse ligeramente del movimiento lateral. Por ejemplo, en la Figura 6a, el dibujo muestra en línea delgada unas trayectorias sustancialmente laterales de movimiento de la barra de mezcla. Se prefiere que el movimiento de la barra de mezcla (4) sea lateral, es decir, ortogonal al eje longitudinal de la barra de mezcla (4), tal como se muestra en la Figura 6b.

- 35 En el dispositivo de mezcla de acuerdo con la invención, en un estado inactivo del primer imán, el eje longitudinal (2) del primer imán puede ser sustancialmente coaxial con un eje de rotación del segundo imán (3).

- 40 El movimiento de la barra de mezcla se origina a partir de la rotación del primer imán (1) en torno al primer eje (2). El movimiento de rotación es transferido por la interacción magnética entre el primer imán (1) y el segundo imán (3), a la montura (6) y, por último, a la barra de mezcla (4). La interacción magnética entre el primer imán (1) y el segundo imán (3) requiere que la distancia entre ambos imanes sea suficientemente pequeña. Dependiendo de la orientación de los polos de los primer y segundo imanes, la interacción puede generar fuerzas atractivas o repulsivas. En la presente invención, los primer y segundo imanes se orientan, preferiblemente, con los polos semejantes enfrentados entre sí (N-N o S-S). El movimiento de rotación del primer imán (1) y las fuerzas opuestas entre los imanes «empujan» el segundo imán (3) a movimiento.

- 45 El primer imán (1) y el segundo imán (3) son imanes permanentes sin ningún requisito especial.

- 50 En las Figuras 1 y 3, la barra de mezcla (4) es guiada por un manguito o guía (10) que se fija a la montura o articulación (6, 6'). La trayectoria de movimiento de la barra de mezcla (4) se define o restringe por la montura (6, 6'), que permite el movimiento del segundo imán (3) en torno a un segundo eje (5). De acuerdo con la invención, la montura se proporciona a modo de soporte provisto de una o dos articulaciones a modo de lámina (6, 6'), que únicamente pueden oscilar o vibrar en torno al segundo eje (5).

En una realización preferida del dispositivo de mezcla, la barra de mezcla (4) se acopla a una montura (6) por medio de un manguito (10), de tal manera que el manguito permite el movimiento de la barra de mezcla a lo largo de su eje

longitudinal. Puede darse acomodo al movimiento ortogonal de la barra de mezcla mediante una pluralidad de juntas dispuestas en al menos dos lados de la montura (6). Esta realización se muestra en la Figura 3 y da como resultado un movimiento lateral sustancial de la barra de mezcla (4) a lo largo de la línea discontinua 6".

5 Como se ha mostrado en la Figura 2, la rotación del primer imán (1) se lleva a efecto por medio de un motor eléctrico (8) que rota en torno a un primer eje (2). El primer imán (1) puede estar asegurado en línea con el primer eje (2) o, en una realización preferida, de forma asimétrica con el primer eje (2), esto es, colocado con una distancia de entre 1 mm y 5 mm con el primer eje (2). En esta realización, preferiblemente, se ha colocado un contrapeso (9) con respecto al primer imán (1), a la misma distancia del primer eje (2), a fin de evitar el desequilibrio.

10 La barra de mezcla (4) se ha fabricado de un material como el acero inoxidable u otro similar, en contraste con materiales flexibles como polímeros, caucho, etc. La barra de mezcla (4) puede ser maciza o haberse proporcionado en forma de tubo o cánula.

15 En caso de que se proporcione en forma de tubo o cánula, la barra de mezcla (4) puede ser utilizada para llenar el recipiente de mezcla con las partículas y fluidos destinados a ser mezclados / suspendidos. En otra variante de la invención, las partículas (muestra biológica / celda) y/o el fluido son, al menos en parte, insertados o extraídos del recipiente de mezcla a través de una barra de mezcla (4) proporcionada a modo de tubo. Las partículas y los fluidos pueden haber sido ya premezclados antes de ser proporcionados en el interior del recipiente de mezcla. Para este propósito, la barra de mezcla (4) está provista, opcionalmente, de conectores apropiados como el sistema Luer para su conexión con un conjunto de tubos.

20 En aún otra realización de la invención, el dispositivo de mezcla está provisto de al menos un recipiente de mezcla, y la barra de mezcla puede ser insertada dentro del recipiente de mezcla y extraída de este. La inserción / extracción de la barra de mezcla del receptáculo requiere, bien mover el recipiente de mezcla con respecto a una barra de mezcla estacionaria, o bien mover la barra de mezcla con respecto a un recipiente de mezcla estacionario. Esta variante se muestra en las Figuras 4 y 5, en las que la posición de la barra de mezcla (4) es ajustable con respecto a un recipiente de mezcla, no mostrado, en la dirección de la línea discontinua (13).

25 En una primera variante de esta realización de la invención, el dispositivo de mezcla está provisto de al menos un recipiente de mezcla que contiene un líquido, por debajo de la montura (6), de tal manera que la barra de mezcla es sumergida en el líquido para agitar el líquido por medio del movimiento ortogonal. En esta variante, el dispositivo de mezcla comprende, de manera adicional, un dispositivo de accionamiento 14 acoplado al motor 8, que detiene e invierte el movimiento de la barra de mezcla (4), como se muestra en la Figura 2.

30 En una segunda variante de esta realización de la invención, el dispositivo de mezcla está provisto de al menos un recipiente de mezcla, y la barra de mezcla (4) es insertada en el recipiente de mezcla y retirada de este moviendo el recipiente de mezcla en la dirección que va a lo largo del eje longitudinal de la barra de mezcla.

35 Como recipientes de mezcla, se prefieren los pocillos de las microplacas que se encuentran comercialmente disponibles. Por supuesto, el movimiento del segundo imán (3) y de la barra de mezcla (4) alrededor del segundo eje (5) necesita ser ajustado al espacio de que se dispone dentro del recipiente. La barra de mezcla mezclará el líquido sin tocar las paredes del recipiente a todo lo largo de su movimiento.

40 El método se lleva a cabo preferiblemente en un recipiente de mezcla en el cual la relación entre el diámetro exterior de la barra de mezcla (4) y la anchura interior máxima del recipiente de mezcla está comprendida entre 0,1 y 0,3. Por ejemplo, la barra de mezcla puede tener un diámetro exterior de entre 1,5 mm y 0,3 mm y puede ser utilizada en recipientes de mezcla con una anchura interior máxima de entre 1 mm y 10 mm.

El dispositivo de la invención puede ser utilizado para mezclar o suspender de forma subsiguiente una pluralidad de muestras diferentes. Es otro propósito de la invención evitar la contaminación de una muestra que se ha de poner en suspensión por trazas o gotas de una muestra diferente que está adherida a la barra de mezcla.

45 En realizaciones adicionales de la invención, la superficie de la barra de mezcla es limpiada o desnudada de mezcla en adhesión por medio de una rasqueta de limpieza o de un líquido de limpieza. Para este propósito, la montura (6) puede haberse provisto de al menos una rasqueta de limpieza que retira material de la barra de mezcla. La rasqueta de limpieza puede estar hecha de cualquier material adecuado para absorber por empapamiento líquidos, como el algodón o el papel tisú.

50 Puede conseguirse una mejor limpieza de la barra de mezcla utilizando un líquido de limpieza y lavando la barra de mezcla. En esta realización de la invención, la montura (6) está provista de al menos un orificio (11, 12) que permite la introducción de un líquido dentro del manguito (10). La barra de mezcla es entonces guiada a través de un depósito del líquido de limpieza o a través de una corriente de líquido de limpieza, con lo que se asegura que la barra de mezcla está únicamente en contacto con líquido de limpieza fresco, sin contaminar.

55 La Figura 3 muestra esta realización de la invención, en la cual la junta o articulación (6, 6') está provista de un manguito o guía (10) para la barra de mezcla (4), que puede ser lavado por circulación con líquido de limpieza aportado y eliminado a través de unos orificios (11) y (12).

El dispositivo de acuerdo con la invención es de especial utilidad para la preparación de muestras en tratamiento automatizado o para el análisis de muestras biológicas. Por lo común, tal tratamiento requiere una suspensión homogénea de la muestra en el seno de un fluido. Lo mejor es que la muestra homogénea sea suspendida en el fluido poco antes de su tratamiento.

- 5 De acuerdo con ello, se divulga también un procedimiento para proporcionar una suspensión, que comprende: colocar partículas, tales como una muestra biológica, y un fluido dentro de un recipiente de mezcla; colocar la barra de mezcla del dispositivo de mezcla como se ha descrito, dentro del recipiente de mezcla y suspender las partículas en el seno del líquido / fluido. La barra de mezcla puede, con ello, mezclar la muestra biológica.

- 10 El procedimiento puede ser utilizado en autómatas o robots de alta capacidad de tratamiento para analizar una pluralidad de muestras biológicas. Por lo tanto, se utilizan, preferiblemente, microplacas de múltiples pocillos como recipiente de mezcla en el procedimiento, y la barra de mezcla es insertada en cada pocillo / recipiente de mezcla para mezcla y es extraída una vez completada la suspensión / mezcla.

- 15 El dispositivo de la invención puede ser utilizado para el tratamiento en paralelo de una pluralidad de muestras. Por ejemplo, la suspensión de una pluralidad de muestras biológicas en microplacas de múltiples pocillos puede ser llevada a cabo en paralelo por entre 2 y 6 dispositivos de la invención. Para este propósito, el dispositivo de mezcla puede comprender de 1 a 6 barras de mezcla (4) y monturas (10) adicionales que son accionadas en paralelo.

Por otra parte, el dispositivo de mezcla puede ser utilizado para volúmenes más grandes mediante el uso de una única montura (6) que incluye una pluralidad de barras de mezcla (4).

- 20 El dispositivo de mezcla de la invención puede ser utilizado para cualquier tratamiento automatizado o análisis automatizado para muestras biológicas en suspensión o en solución, especialmente para los sistemas ELIZA o FACS.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un dispositivo de mezcla que comprende:  
un primer imán (1), que rota alrededor de un eje longitudinal (2);  
una barra de mezcla (4), fijada a una montura, de tal manera que la montura incluye un segundo imán (3) que tiene un eje de rotación, de tal modo que el eje longitudinal (2) del primer imán es sustancialmente coaxial con el eje de rotación del segundo imán (3), **caracterizado por que** la montura se ha proporcionado a modo de soporte con una o dos articulaciones a modo de lámina (6, 6') que oscilan o vibran alrededor de un segundo eje (5) de manera tal, que la montura se mueve en un movimiento sustancialmente ortogonal (6'') con respecto al eje longitudinal de la barra de mezcla (4) por la interacción magnética del primer imán rotativo con el segundo imán (3).
- 2.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la barra de mezcla es un tubo.
- 3.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que la barra de mezcla (4) está acoplada a una montura por medio de un manguito (10), de tal modo que el manguito permite el movimiento de la barra de mezcla a lo largo de su eje longitudinal.
- 4.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la montura está provista de al menos un orificio (11, 12) que permite la introducción de un líquido dentro del manguito (10).
- 5.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la montura está provista de al menos una rasqueta de limpieza que retira material de la barra de mezcla.
- 6.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que se ha proporcionado al menos un recipiente de mezcla que contiene un líquido, por debajo de la montura, de tal modo que la barra de mezcla (4) es sumergida en el líquido con el fin de agitar el líquido por el movimiento ortogonal.
- 7.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que se ha proporcionado al menos un recipiente de mezcla, y la barra de mezcla (4) es insertada en el recipiente de mezcla y extraída de él moviendo el recipiente de mezcla en la dirección que va a lo largo del eje longitudinal de la barra de mezcla (4).
- 8.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual la barra de mezcla (4) no toca las paredes del recipiente a todo lo largo de su movimiento.
- 9.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el cual el diámetro exterior de la barra de mezcla (4) se encuentra entre aproximadamente 0,1 y 0,3 de un diámetro del recipiente.
- 10.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende, adicionalmente, de 1 a 6 barras de mezcla (4) y monturas adicionales que son accionadas en paralelo.
- 11.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el cual la montura incluye una pluralidad de barras de mezcla (4).
- 12.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente un dispositivo de accionamiento que detiene e invierte el movimiento de la barra de mezcla.
- 13.- El dispositivo de mezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el cual la barra de mezcla (4) mezcla una muestra biológica.

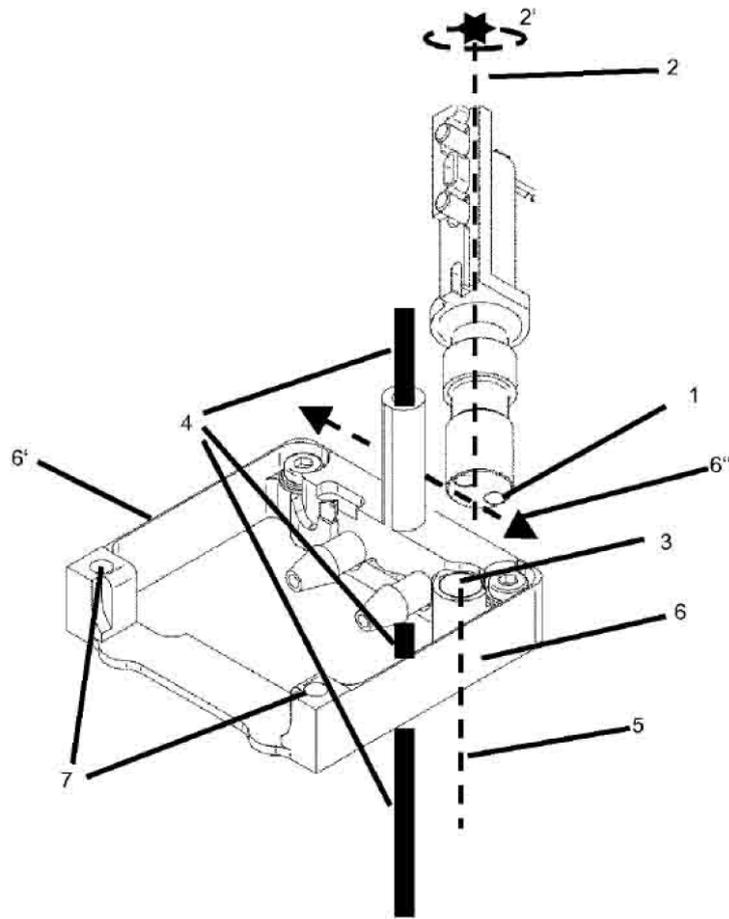


Fig. 1

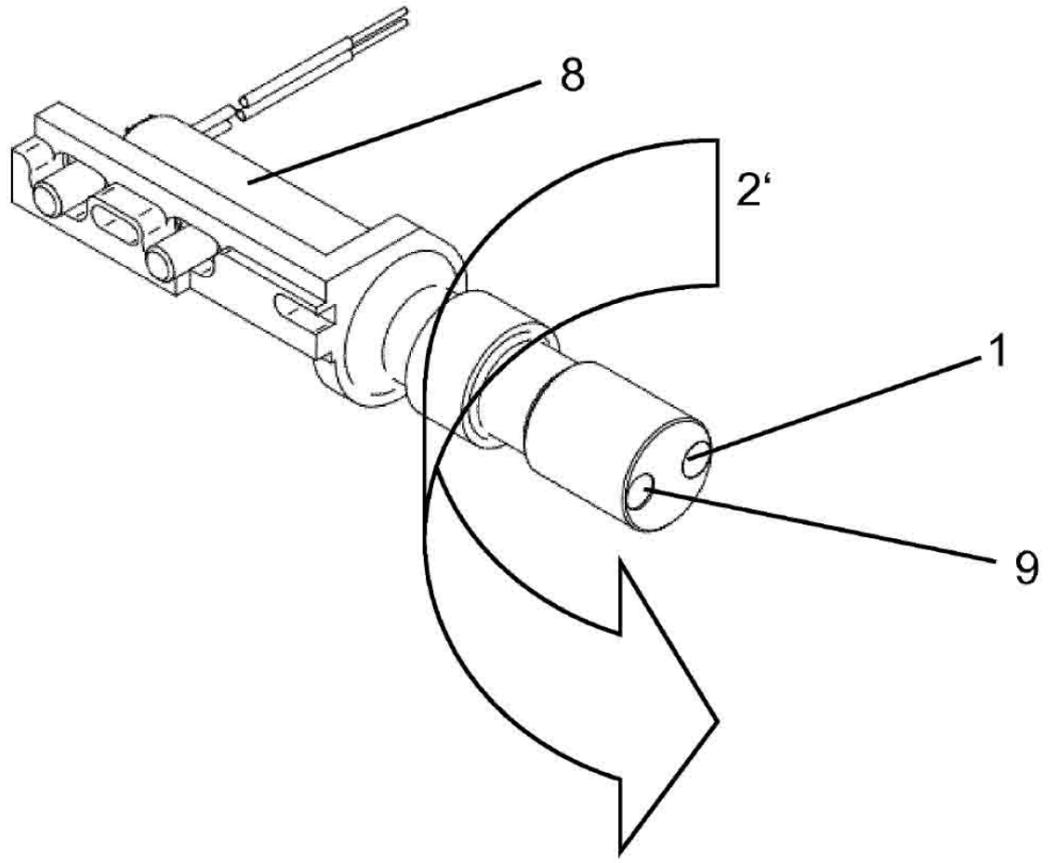


Fig. 2

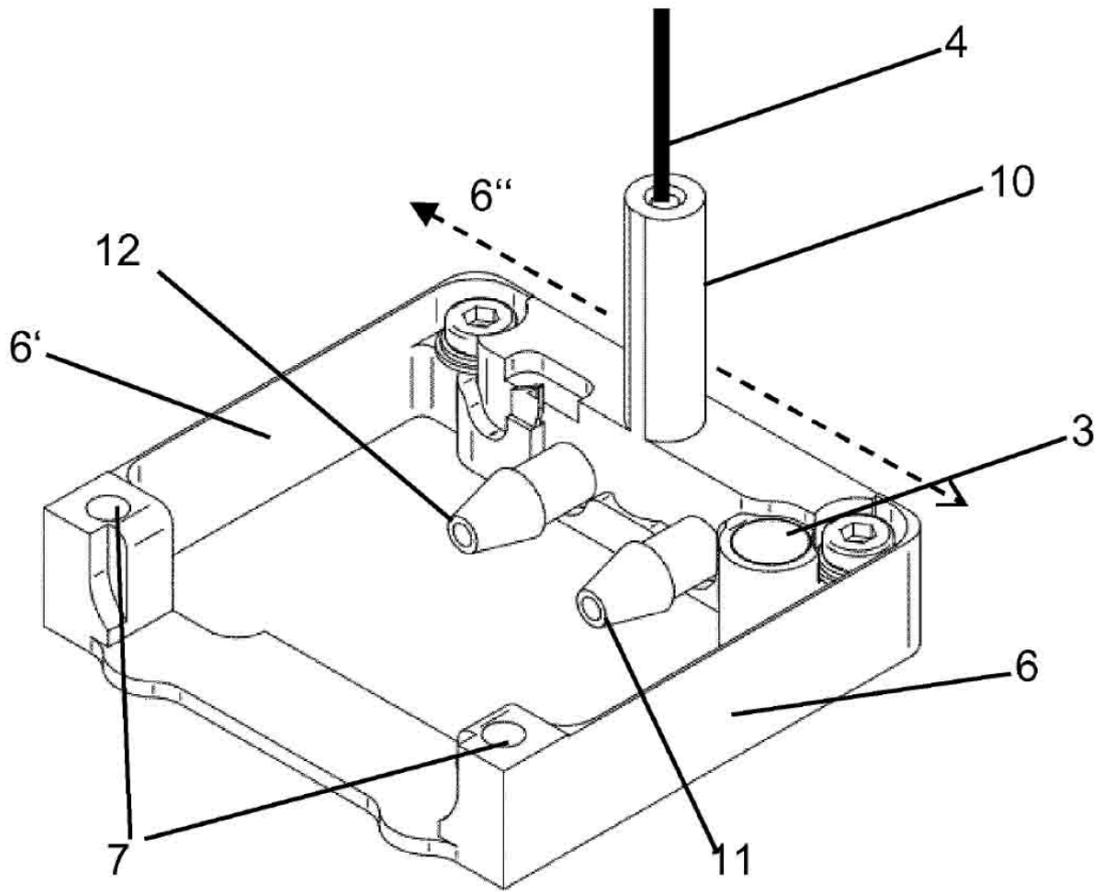


Fig. 3

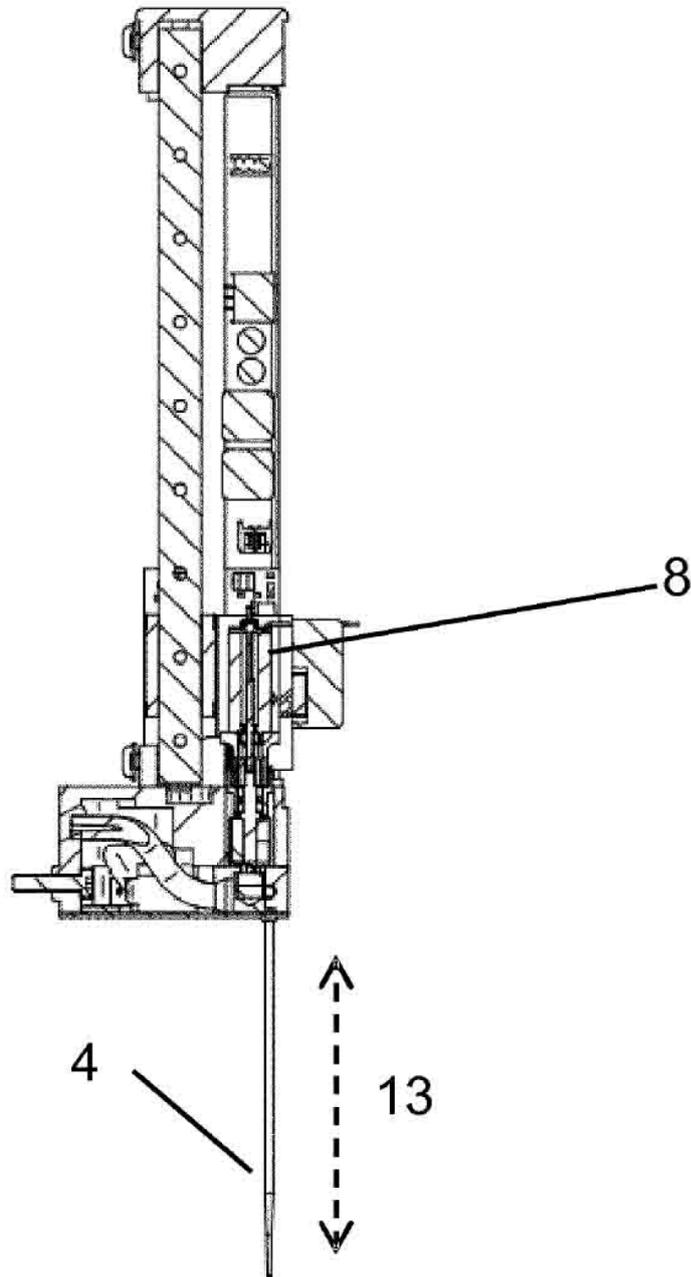


Fig. 4

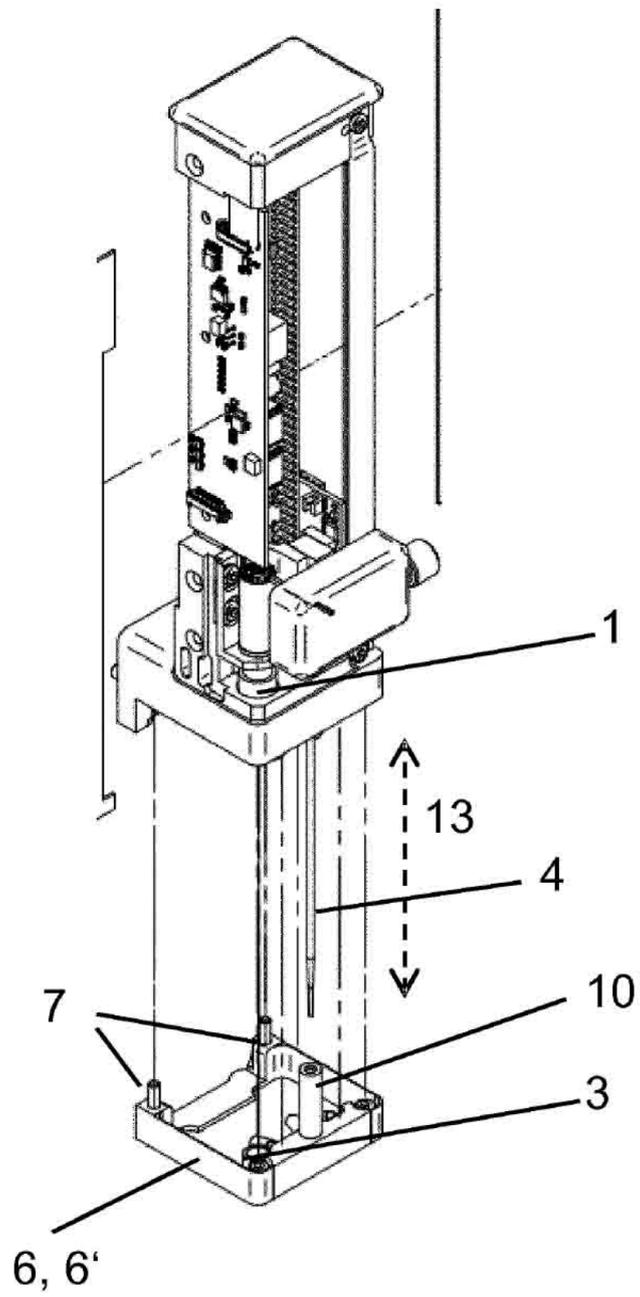
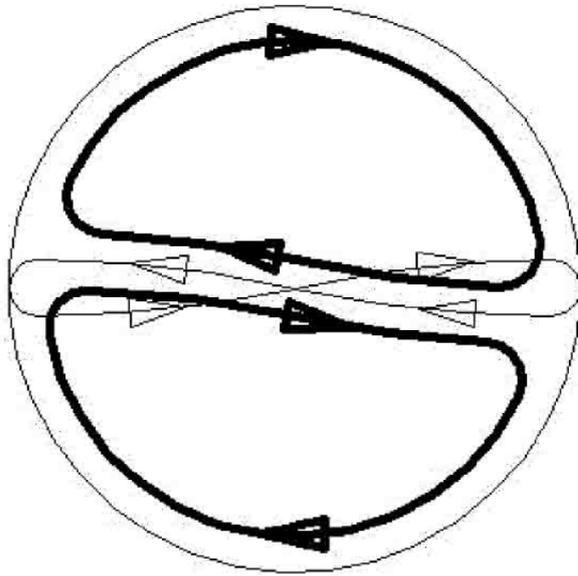
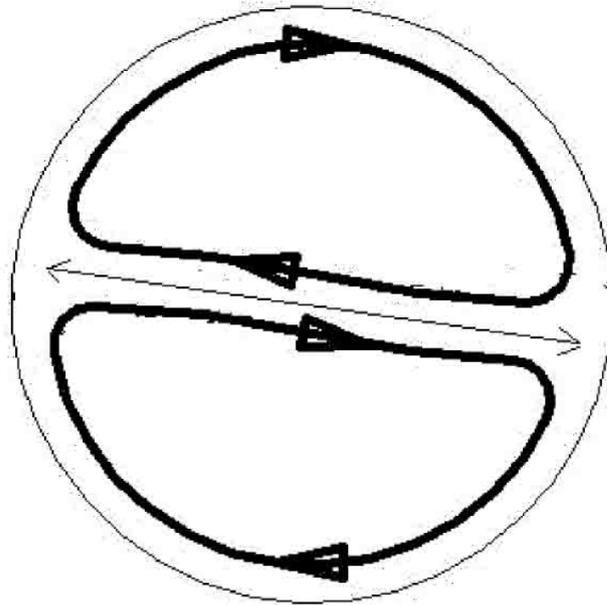


Fig. 5



a



b

Fig. 6