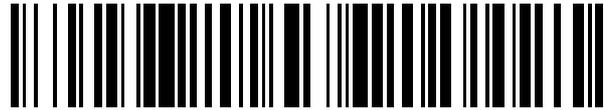


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 752**

51 Int. Cl.:

A61N 1/04 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2014 E 14191272 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2940121**

54 Título: **Dispositivo y método para la transfección de grandes volúmenes**

30 Prioridad:

02.05.2014 EP 14166918

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

13.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ALTROGGE, LUDGER;
GLEISSNER, TIMO;
HEINZE, ANDREAS y
HERMSMEIER, SVEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 693 752 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 método para la transfección de grandes volúmenes

5 La invención se refiere a un dispositivo para aplicar un campo eléctrico a una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas, que comprende al menos una cámara que comprende al menos un espacio interno para mantener la suspensión, el espacio interno comprende al menos dos segmentos, en donde cada segmento comprende al menos un electrodo y en donde los electrodos adyacentes están separados entre sí por al menos una separación que está al menos parcialmente llena de un material aislante. La invención se refiere además a un método para aplicar un campo eléctrico a una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas, en donde un voltaje es aplicado a los electrodos de una cámara que comprende al menos un espacio interno para mantener la suspensión, el espacio interno que comprende al menos dos segmentos, en donde cada segmento comprende al menos un electrodo y en donde los electrodos adyacentes están separados entre sí por al menos una separación que está al menos parcialmente llena de un material aislante.

15 La introducción de moléculas biológicamente activas, por ejemplo, ADN, ARN o proteínas, en células vivas, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas puede, por ejemplo, servir para examinar las funciones biológicas de estas moléculas y es, además, una condición previa esencial para el éxito del uso terapéutico de estas moléculas, por ejemplo, en terapia génica. Un método preferido para introducir moléculas externas en las células se llama electroporación, que a diferencia de los métodos químicos limita los cambios indeseables en la estructura y en la función de la célula objeto. En la electroporación, las moléculas externas son introducidas en las células a partir de una solución acuosa, preferiblemente una solución tampón específicamente adaptada a las células, o un medio de cultivo celular, por medio de un corto flujo de corriente, es decir, por ejemplo, el pulso de un condensador que es descargado y que hace que la membrana celular sea transitoriamente permeable a las moléculas externas. Los "poros" temporales que se forman en la membrana celular permiten que las moléculas biológicamente activas alcancen primero el citoplasma en el que ya pueden realizar su función o ejercer cualquier acción terapéutica para ser examinadas, y a continuación, bajo ciertas condiciones, alcanzan también el núcleo celular como se requiere, por ejemplo, en aplicaciones de terapia génica.

20 Debido a una breve aplicación de un campo eléctrico fuerte, es decir, un pulso corto con una alta densidad de corriente, las células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas pueden fusionarse también. En esta llamada electrofusión, las células, por ejemplo, son puestas inicialmente en contacto estrecho con la membrana por un campo eléctrico alterno no homogéneo. La aplicación posterior de un impulso de campo eléctrico conduce a la interacción entre las partes de la membrana, lo que finalmente da lugar a la fusión. Los dispositivos comparables a los usados en la electroporación pueden ser usados también en la electrofusión.

35 Los volúmenes más pequeños de suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas son tratados en general mediante un proceso por lotes en recipientes relativamente simples. La solución o suspensión celular, respectivamente, se encuentra con frecuencia en una cubeta, es decir, en un recipiente estrecho abierto por la parte superior, que cerca de la parte inferior tiene dos electrodos paralelos opuestos en las paredes laterales que sirven para aplicar el voltaje eléctrico. Sin embargo, dichos recipientes no son adecuados para tratar volúmenes mayores, ya que el espacio de reacción disponible para el tratamiento eléctrico está limitado por la distancia máxima limitada entre los electrodos. Por tanto, los procesos de flujo por medio de los que la suspensión de células o vesículas es alimentada de forma continua o discontinua a través del espacio de reacción entre los electrodos son utilizados frecuentemente en la electroporación o electrofusión de volúmenes mayores.

40 El documento WO 2011/161092 A1 describe un conjunto de electrodos para aplicar un campo eléctrico a células adherentes que crecen en el fondo de un recipiente. El conjunto de electrodos está diseñado para ser insertado en el recipiente y comprende una pluralidad de electrodos, cada uno con una superficie que está dispuesta en oposición a la superficie correspondiente al siguiente electrodo. La separación entre estas superficies está completamente llena de un material eléctricamente aislante, de manera que el campo eléctrico se concentra en la región de las células a tratar de tal manera que un impulso de voltaje, o la corriente así producida, fluye a través de las células.

45 El documento WO 2007/120234 A2 describe un dispositivo escalable para electroporar volúmenes relativamente grandes de un medio fluido que transporta células biológicas o vesículas dentro de una cámara segmentada, en donde cada segmento comprende dos electrodos. El volumen efectivo de la cámara puede ser variado desplazando un émbolo a lo largo del eje longitudinal de la cámara. Por tanto, el volumen elegido está directamente relacionado con el volumen de la muestra a ser electroporada. La muestra es aspirada dentro y purgada fuera de la cámara por medio de un puerto dispuesto en la pared de extremo de la cámara. La muestra dentro de la cámara es tratada aplicando secuencialmente impulsos de voltaje a los pares de electrodos de los segmentos individuales de la cámara.

55 El documento WO 2005/113820 A2 describe un dispositivo y un método de electroporación de flujo en donde la muestra fluye a través de una cámara del dispositivo que tiene al menos dos electrodos y es tratada en unidades separadas que son producidas proporcionando un contorno entre volúmenes de la muestra sin tratar y tratados. El contorno puede estar formado por un gas o un líquido, en donde el contorno es proporcionado ciclando el gas o el líquido dentro de la cámara entre dos o más fracciones de la muestra. El dispositivo comprende un primer puerto para

el flujo de muestra no tratada hacia la cámara, un segundo puerto para el flujo de muestra tratada hacia fuera de la cámara y un tercer puerto para el flujo de gas o fluido dentro o fuera de la cámara.

Kennedy y otros, (S.M. Kennedy, Z. Ji, C. Hedstrom, J.H. Booske y S.C. Hagness, Biophysical Journal Vol. 94, junio de 2008, 5018-5027) describen una microcubeta para electroporación que consiste en un portaobjetos con dos electrodos de níquel electrochapados en él. Una arandela está dispuesta sobre la separación del electrodo para proporcionar un hoyo para la suspensión de células. Los bordes de los electrodos están ligeramente redondeados para evitar la formación de un arco eléctrico.

Sin embargo, es un inconveniente de los dispositivos y métodos de la técnica anterior es que el riesgo de formación de arco aumenta, especialmente si se aplican altos voltajes a los electrodos segmentados, y que las líneas de campo eléctrico pueden extenderse por regiones fuera del segmento o segmentos de electrodo activos.

Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar un dispositivo y un método para tratar células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas, con electrodos segmentados para mantener bajas las corrientes eléctricas, y con los que el riesgo de aparición del arco eléctrico se reduce y el campo eléctrico está confinado a la región adyacente al segmento o segmentos adyacente al electrodo activo.

El objeto se consigue con un dispositivo para aplicar un campo eléctrico a una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas según se ha especificado inicialmente, en el que los bordes de los electrodos encarados entre sí dentro del espacio interno están redondeados y la superficie del material aislante que está orientada hacia el espacio interno corta la superficie de al menos un electrodo en ángulo recto. Si se aplica voltaje a los electrodos, el riesgo de formación de arco aumenta significativamente en las regiones de cambios bruscos de contorno (bordes) o si se produce una falta de homogeneidad del campo eléctrico muy cerca de la superficie del electrodo de un segmento activo. Sorprendentemente, al redondear los bordes de los electrodos encarados a un electrodo adyacente se obtiene una reducción significativa de dichos gradientes de campo y, por tanto, incluso del riesgo de formación de arco. Según la invención, la homogeneización del campo eléctrico dentro del espacio interno de la cámara y especialmente cerca de la superficie del electrodo en la región de las separaciones entre los segmentos del electrodo se logra mediante una transición de forma uniforme desde una superficie del primer electrodo orientada hacia el lumen del espacio interno a una segunda superficie del electrodo perpendicular a la primera superficie del electrodo, por lo que la superficie del segundo electrodo está orientada hacia la separación del electrodo. En particular, la transición uniforme es proporcionada por una superficie de electrodo curvada, es decir, desde un radio del empalme mayor a uno menor (por ejemplo, varios segmentos circulares unidos tangencialmente o una estría). Además, la reducción de los gradientes de campo y la homogeneización del campo eléctrico dan como resultado una disminución de la dispersión del campo eléctrico dentro del espacio interno. Por consiguiente, los bordes redondeados de los electrodos encarados entre sí dentro del espacio interno de la cámara tienen el efecto sorprendente de que se evitan altas densidades de campo. Además, al diseñar la superficie del material aislante de manera que esté dispuesta perpendicularmente a la superficie del electrodo, las líneas equipotenciales del campo eléctrico se encuentran ortogonalmente con la superficie del electrodo y no están desviadas. Como resultado, se puede evitar la falta de homogeneidad del campo eléctrico dentro de la cámara o al menos que ésta sea desplazada a una región dentro del material aislante o fuera de la superficie del electrodo del segmento activo, de manera que la probabilidad de formación de arco se reduzca todavía más. Además, se reduce la densidad de campo máxima adyacente al electrodo activo.

Según una realización ejemplar de la invención, el radio del empalme de los bordes redondeados de los electrodos está maximizado. Sorprendentemente, se ha descubierto que reducir la falta de homogeneidad del campo eléctrico maximizando el radio del empalme de los bordes redondeados da lugar a una disminución significativa de la probabilidad de formación de arco. Es decir, cuanto mayor sea el radio de los bordes redondeados, menor es el riesgo de formación de arco.

En otra realización ejemplar de la invención, se minimiza el ancho de la separación y/o la distancia entre dos electrodos adyacentes. Como las células, los derivados celulares, los orgánulos, las partículas subcelulares y/o las vesículas no son procesadas suficientemente en el espacio interno alrededor de la separación, la separación (es decir, la distancia entre dos electrodos adyacentes) debe ser lo más pequeña posible. Por consiguiente, cuanto menor sea la separación, mayor es la eficiencia del tratamiento.

Por ejemplo, el diseño del dispositivo según la invención puede ser optimizado determinando la relación óptima del radio del empalme y el ancho de la separación. Es decir, el radio del empalme de los bordes redondeados de los electrodos debe ser maximizado, mientras que el ancho de la separación debe ser minimizado. El diseño ideal asegura un riesgo de formación de arco muy bajo y una eficiencia de tratamiento muy alta.

En una realización ejemplar, que es adecuada para muchas aplicaciones, el radio del empalme de los bordes redondeados de al menos uno de los electrodos está dentro del intervalo de aproximadamente 0,3 - 2,0 mm. Por ejemplo, el radio puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 0,3 - 1,8, 0,3 - 1,6, 0,3 - 1,4, 0,3 - 1,2, 0,3 - 1,0, 0,5 - 2,0, 0,7 - 2,0, 0,9 - 2,0, 1,0 - 2,0, 0,4 - 1,9, 0,5 - 1,8, 0,6 - 1,7, 0,7 - 1,6, 0,8 - 1,5, 0,9 - 1,4, o 1,0 - 1,2.

En la misma o en otra realización ejemplar, que también es adecuada para muchas aplicaciones, el ancho de la separación y/o la distancia entre dos electrodos adyacentes está dentro del intervalo de aproximadamente 0,5 a 2,0

mm. Por ejemplo, el ancho puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 0,5 - 1,8, 0,5 - 1,6, 0,5 - 1,4, 0,5 - 1,2, 0,5 - 1,0, 0,6 - 2,0, 0,7 - 2,0, 0,9 - 2,0, 1,0 - 2,0, 0,6 - 1,9, 0,7 - 1,8, 0,8 - 1,7, 0,9 - 1,6, 1,0 - 1,5, 1,1 - 1,4, o 1,1 - 1,3.

5 En la misma o en otra realización ejemplar, el diseño del dispositivo según la invención puede ser optimizado variando los radios de curvatura de los electrodos con el objeto de maximizar el radio de la superficie del electrodo que está orientada hacia el lumen del espacio interno de la cámara y al mismo tiempo minimizar el ancho de la separación. Es decir, en una realización ejemplar, el radio de la superficie del electrodo orientado hacia el lumen del espacio interno puede ser mayor que el radio de la superficie del electrodo orientado hacia el material aislante de la separación.

10 En particular, en una realización ejemplar, el radio de la superficie del electrodo orientado hacia el lumen del espacio interno está dentro del intervalo de aproximadamente 1,0 - 2,0 mm, y el radio de la superficie del electrodo orientado hacia el material aislante de la separación está dentro del intervalo de 0,3 - 2,0 mm. Como un aspecto adicional de esta realización, la superficie del material aislante orientado hacia el espacio interno corta la superficie de al menos un electrodo en ángulo recto exactamente en o adyacente a la posición del cambio de radio de curvatura de la superficie del electrodo.

15 El material aislante dentro del espacio entre dos electrodos adyacentes puede, por ejemplo, comprender o consistir en policarbonato.

20 En otra realización ejemplar de la invención, al menos uno de los electrodos es más grande que el otro u otros. Por ejemplo, el electrodo más grande puede ser un contraelectrodo o electrodo de tierra que está dispuesto en oposición a los electrodos más pequeños. En esta realización, los electrodos más pequeños pueden ser electrodos activos ajustados a un alto voltaje o electrodos ajustados al potencial de tierra.

En una realización ejemplar, que es adecuada para muchas aplicaciones, al menos un electrodo tiene un ancho dentro del intervalo de 5 - 20 mm y al menos un electrodo tiene un ancho dentro del intervalo de 20 - 80 mm.

25 En otra realización ejemplar de la invención, la separación está dispuesta de tal manera que una parte de al menos un electrodo está dispuesta en oposición a dicho espacio. Como en esta disposición ventajosa, cada separación no está dispuesta frente a otra separación, sino en oposición a un electrodo, las regiones dentro del espacio interno de la cámara que no están expuestas a un campo eléctrico suficiente para un tratamiento eficiente, son minimizadas o incluso son eliminadas. Como resultado, la eficiencia del tratamiento global aumenta efectivamente gracias a esta medida.

30 En otra realización ejemplar más de la invención, cada segmento tiene dispuesto al menos un primer electrodo y al menos un segundo electrodo, en donde el segundo electrodo es un electrodo común de al menos dos segmentos. Dicha configuración facilita la construcción y el montaje del dispositivo según la invención y evita además un cableado complicado.

35 Por ejemplo, la cámara del dispositivo según la invención puede comprender componentes que se corresponden que pueden estar aplicados entre sí. Es decir, el dispositivo según la invención puede ser ensamblado, por ejemplo, aplicando dos componentes entre sí, en donde cada componente comprende un rebajo que se corresponde con el rebajo del otro componente. Si estos dos componentes están aplicados entre sí, sus rebajos alineados forman el espacio interno de la cámara. Para producir un campo eléctrico dentro del espacio interno, cada rebajo puede estar provisto de al menos un electrodo. Al menos algunos de los electrodos pueden estar segmentados. Por ejemplo, una mitad de los electrodos (en un lado del eje de simetría) puede estar segmentada, mientras que la otra mitad de los electrodos (en el otro lado del eje de simetría) puede ser un electrodo simple y no segmentado que puede ser usado como contraelectrodo. En una realización ventajosa, los dos componentes son idénticos, de manera que se asegura una producción rentable. Como los componentes idénticos son simétricos giratoriamente, se asegura un fácil montaje acoplando los componentes entre sí.

45 En una realización ejemplar de la invención, al menos un segmento tiene un volumen dentro del intervalo de aproximadamente 10 µl a 500 µl o 20 µl a 400 µl o 30 µl a 300 µl o 50 µl a 200 µl.

En la misma o en otra realización ejemplar, el lumen del espacio interno de la cámara tiene un volumen de al menos 500 µl o al menos 800 µl o al menos 1 ml.

50 La invención se refiere además a un método para producir un dispositivo para aplicar un campo eléctrico a una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas, por ejemplo, el dispositivo según la invención según ha sido descrito anteriormente, en donde hay dispuesta una cámara al menos, que comprende al menos un espacio interno para mantener la suspensión, el espacio interno comprende al menos dos segmentos y cada segmento comprende al menos un electrodo, en donde un material aislante está lleno al menos parcialmente en al menos un espacio que separa los electrodos adyacentes entre sí, y en donde los bordes de los electrodos encarados entre sí dentro del espacio interno han sido mecanizados de tal manera que están redondeados.

55 Debido a este diseño ventajoso, el riesgo de arco eléctrico si se aplica voltaje a los electrodos es reducido significativamente.

Según una realización ejemplar de este método, el radio del empalme de los bordes redondeados de los electrodos está maximizado. En otra realización ejemplar del método, el ancho de la separación y/o la distancia entre dos electrodos adyacentes está minimizado. Por ejemplo, el diseño del dispositivo según la invención puede ser optimizado determinando la relación óptima del radio del empalme y el ancho de la separación. Es decir, el radio del empalme de los bordes redondeados de los electrodos debe estar maximizado, mientras que el ancho de la separación debe estar minimizado. El diseño ideal asegura un riesgo de formación de arco muy bajo y una eficiencia del tratamiento muy alta.

En otra realización ejemplar del método, la superficie del material aislante orientado hacia el espacio interno está formada de tal manera que corta la superficie de al menos un electrodo en un ángulo recto. Al formar la superficie del material aislante de manera que está dispuesta perpendicularmente a la superficie del electrodo, las líneas equipotenciales del campo eléctrico se encuentran ortogonalmente con la superficie del electrodo y no están desviadas. En consecuencia, se puede evitar la falta de homogeneidad del campo eléctrico dentro de la cámara o al menos que sea desplazada a una región dentro del material aislante y/o fuera de la superficie del electrodo activo, de manera que la probabilidad de formación de arco se reduce aún más. Además, se reduce la densidad de campo máxima cerca del electrodo activo.

En otra realización ejemplar más de la invención, al menos uno de los electrodos integrados en el dispositivo es más grande que el otro u otros. Por ejemplo, el electrodo más grande puede ser usado como contraelectrodo o electrodo de tierra que está dispuesto en oposición a los electrodos más pequeños. En dicha realización, los electrodos más pequeños pueden ser usados como electrodos activos ajustados a un alto voltaje o como electrodos ajustados al potencial de tierra. En esta realización, cada segmento puede estar provisto de al menos un primer electrodo y de al menos un segundo electrodo, en donde el segundo electrodo es un electrodo común de al menos dos segmentos. Dicha configuración facilita la construcción y el montaje del dispositivo según la invención y evita además el cableado complicado durante la producción del dispositivo.

En otra realización ejemplar más de la invención, la separación está dispuesta de tal manera que una parte de al menos un electrodo está dispuesta en oposición a dicha separación. Como en esta disposición ventajosa, cada separación no está dispuesta frente a otra separación, sino en oposición a un electrodo, las regiones dentro de la separación interna de la cámara que no están expuestas a un campo eléctrico suficiente para un tratamiento eficiente son minimizadas o incluso son eliminadas. Como resultado, la eficiencia de tratamiento global aumenta efectivamente gracias a esta medida.

El objetivo se cumple además mediante un método para aplicar un campo eléctrico a una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas como se ha especificado inicialmente, en donde el voltaje está aplicado al menos a un electrodo activo mientras que los electrodos o segmentos de electrodos próximos y/o en oposición al electrodo activo están ajustados al potencial de tierra. Ajustar los electrodos adyacentes que rodean los electrodos activos da lugar a una disminución de la dispersión del campo eléctrico dentro del espacio interno, de manera que el área eléctricamente activa está limitada localmente y las líneas de campo están enfocadas cerca del electrodo activo y, por tanto, el control del proceso es mejorado, especialmente si se tratan grandes volúmenes en una cámara segmentada.

En una realización ejemplar y ventajosa de la invención, el voltaje está aplicado a un único electrodo activo, mientras que todos los demás electrodos o segmentos de electrodo del espacio interno están ajustados al potencial de tierra. Ajustar todos los electrodos del espacio interno de la cámara, excepto el electrodo activo, al potencial de tierra asegura que las líneas de campo estén enfocadas en el espacio interno adyacente al electrodo activo y, por tanto, sólo en el segmento activo de la cámara y desgastadas localmente hacia los electrodos adyacentes.

En otra realización ejemplar de la invención, el voltaje es aplicado al menos a dos electrodos o segmentos de electrodos del espacio interno de forma secuencial. Una ventaja de la invención es que cada segmento del espacio interno de la cámara puede ser eléctricamente seleccionado de manera individual, para que se pueda lograr con precisión la generación controlada de campos eléctricos dentro de la cámara. Por ejemplo, para evitar la formación de arcos y/o un calentamiento no deseado de la suspensión, se pueden aplicar impulsos de voltaje a diferentes segmentos de forma secuencial. Con este objeto, cada segmento tiene dispuesto al menos un electrodo que puede ser seleccionado individualmente para que los impulsos de voltaje puedan ser aplicados secuencialmente a los segmentos de una cámara.

Por ejemplo, el segmento más cercano a un puerto de salida de la cámara es tratado como primer segmento seguido por el segmento adyacente hasta que el último segmento de esta secuencia, el segmento más lejos del puerto de salida, está siendo tratado. Es decir, el voltaje es aplicado primero al segmento más cercano a un puerto de salida de la cámara, seguido del segmento adyacente hasta que el voltaje es aplicado al último segmento de esta secuencia, el segmento más distante al puerto de salida. En esta realización ejemplar de la invención, el segmento más cercano al puerto de salida es tratado como primer segmento seguido por el segmento adyacente hasta que el último segmento de esta secuencia, el segmento más lejos de la salida, está siendo tratado. Esta secuencia de tratamiento asegura que las burbujas de gas que se producen durante la aplicación de un alto voltaje a la suspensión celular no impulsan las muestras no tratadas hacia y/o hacia fuera de la salida, sino sólo las muestras tratadas.

En otra realización ejemplar más de la invención, cada segmento tiene dispuesto al menos un primer electrodo y al menos un segundo electrodo, en donde el voltaje está aplicado al primer electrodo y el segundo electrodo es un electrodo común de al menos dos segmentos. Por consiguiente, el número de electrodos dispuestos en el espacio interno del dispositivo puede ser reducido significativamente para facilitar el control del proceso.

- 5 La expresión "redondeado", según se usa en la memoria presente, se refiere a una superficie curva y uniforme en la que la transición de la forma de una región plana a otra región plana es tangencial.

La expresión "electrodo activo", según se usa en la memoria presente, se refiere a un electrodo al que es aplicado un voltaje pero que no está ajustado al potencial de tierra. Por ejemplo, un "electrodo activo" puede ser un electrodo que está ajustado a un potencial de alto voltaje.

- 10 La expresión "segmento de electrodo", según se usa en la memoria presente, se refiere a una parte separada de un electrodo segmentado, es decir, un electrodo que está dividido en partes diferentes, en donde las partes separadas del electrodo segmentado no están acopladas eléctricamente entre sí.

La expresión "segmento", según se usa en la memoria presente, se refiere a una zona del espacio interno de una cámara, que comprende al menos un electrodo o segmento de electrodo.

- 15 La expresión "segmento activo", según se usa en la memoria presente, se refiere a un segmento de una cámara, que comprende al menos un electrodo activo.

La invención se describe adicionalmente de manera ejemplar en detalle haciendo referencia a las Figuras.

La Figura 1 muestra una realización ejemplar de un componente individual de un dispositivo según la invención que comprende unos medios de ajuste giratorios y un diseño de cámara curva.

- 20 a) Elemento de separación en una posición en un punto terminal inferior.
b) Elemento de separación en una posición intermedia.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de diferentes posiciones del elemento de separación del dispositivo según la Figura 1.

- a) Posición en un punto terminal inferior
25 b) Posición en un punto terminal superior
c) Posición intermedia
d) Posición de estacionamiento

La Figura 3 muestra una vista en perspectiva del lado exterior del dispositivo según la Figura 1.

La Figura 4 muestra diferentes vistas del miembro de base según la Figura 3.

- 30 a) Lado interior del miembro de base con electrodos
b) Lado exterior del miembro de base con superficies conductoras

La Figura 5 muestra una vista esquemática en sección transversal de una realización ejemplar de un dispositivo según la invención.

- a) Espacio interno que comprende 8 segmentos;
35 b) Una parte del espacio interno según a) que comprende 2 segmentos.

La Figura 6 muestra una representación de una simulación de un campo eléctrico si se ha aplicado alto voltaje a la realización del dispositivo según la Figura 5.

- La Figura 7 muestra una representación de una simulación de un campo eléctrico si se ha aplicado alto voltaje a un dispositivo que tiene una separación y/o una distancia mayores entre dos electrodos adyacentes o segmentos de electrodo.
40

La Figura 8 muestra una representación de una simulación de un campo eléctrico si se ha aplicado alto voltaje a un dispositivo con un diseño de electrodo convencional.

- Las Figuras 1a y 1b muestran una realización ejemplar de un componente individual de un dispositivo 1 según la invención. El dispositivo 1 comprende un miembro de base 2 que tiene un rebajo curvo 3 que está provisto de cuatro electrodos 4, 5. Tres de estos electrodos son electrodos segmentados 4 mientras que un electrodo es un
45

5
10
15

contraelectrodo 5. El miembro de base 2 representa un componente del dispositivo 1, que es un ensamblaje de dos componentes que están unidos entre sí, en donde al menos los lados internos de estos componentes son idénticos. Es decir, el miembro de base 2 y un segundo miembro de base (miembro de base 30 mostrado en la Figura 3) que tienen un lado interno idéntico están unidos entre sí de manera que el rebajo 3 y un rebajo correspondiente del segundo miembro de base forman una cámara 6 para mantener una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas. En esta cámara 6 se puede aplicar un campo eléctrico a las células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas, por ejemplo, para transferir moléculas biológicamente activas tales como ácidos nucleicos o proteínas a las células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas. Con este propósito, los electrodos 4, 5 del miembro de base 2 y los electrodos correspondientes del segundo miembro de base establecen pares de electrodos, en donde los electrodos segmentados 4 del miembro de base 2 y un contraelectrodo dispuesto en oposición al segundo miembro de base establecen tres pares de electrodos mientras que el contraelectrodo 5 del miembro de base 2 y tres electrodos segmentados dispuestos en oposición al segundo miembro de base establecen también tres pares de electrodos. En esta configuración, el contraelectrodo 5 del miembro de base 2 y el contraelectrodo del segundo miembro de base son cada uno de ellos electrodos comunes de tres segmentos, de manera que la cámara 6 comprende seis segmentos, en donde cada segmento está provisto de un electrodo segmentado y una superficie de un contraelectrodo común.

20
25
30

Dos puertos 7, 8 están dispuestos en un extremo 9 de la cámara 6 y dos puertos 10, 11 están dispuestos en el extremo en oposición 12 de la cámara 6. Un puerto de los puertos superiores 7, 8 puede ser usado como puerto de entrada para cargar la cámara 6 y el otro puerto de los puertos 7, 8 puede ser usado como puerto de salida para descargar la cámara 6. De manera similar, un puerto de los puertos inferiores 10, 11 puede ser usado como puerto de entrada para cargar la cámara 6 y el otro puerto de los puertos 10, 11 puede ser usado como puerto de salida para descargar la cámara 6. Por consiguiente, cada extremo 9, 12 tiene dispuestos dos puertos 7, 8, 10, 11 a través de los que se puede llenar el compartimento respectivo de la cámara 6 con la suspensión y/o a través de los que se puede purgar la suspensión de este compartimento. Esta configuración permite la carga y descarga simultáneas de la cámara 6, de manera que se minimiza el tiempo necesario para cambiar la suspensión y, por tanto, el lapso de tiempo entre dos tratamientos eléctricos posteriores de la suspensión. La disposición de los puertos 7, 8, 10, 11 en los extremos opuestos 9, 12 de la cámara 6 permite establecer fácilmente un mecanismo de vaivén donde la suspensión puede ser movida entre los dos extremos 9, 12 de la cámara 6 para cargar simultáneamente un compartimento por un extremo 9 de la cámara 6 y descargar otro compartimento por el extremo en oposición 12 de la cámara 6. Por consiguiente, el dispositivo 1 no es un dispositivo de flujo continuo sino un dispositivo que permite cargar y descargar la cámara 6 al mismo tiempo, mediante un mecanismo de vaivén con el que el líquido sale siempre de la cámara por el mismo lado por el que entró.

35
40
45

Para separar la suspensión que ya ha sido tratada por el campo eléctrico de la suspensión a ser tratada, hay dispuesto un elemento de separación 13. El elemento de separación 13 puede ser movido dentro de la cámara 6 entre dos puntos terminales 14, 15 y divide la cámara 6 en dos compartimentos si éste está en una posición entre los dos puntos terminales 14, 15 según se muestra en las Figuras 1b y 2c. En la realización ejemplar representada en las Figuras 1 y 2, el elemento de separación 13 comprende dos partes 16, 17 que están separadas entre sí y rodean un espacio interior 18 que comprende un material compresible. Las dos partes separadas 16, 17 son dedos en forma de limpiaparabrisas, por lo que el elemento de separación 13 es un elemento de sellado que asegura la separación a prueba de líquidos y/o gases de los diferentes compartimentos de la cámara 6 si éste está en una posición entre los puntos terminales 14, 15 (Figuras 1b y 2c). Con este propósito, el elemento de separación 13 puede estar hecho de un material flexible y/o elástico de manera que pueda compensar también los picos de presión dentro de la cámara 6. El elemento de separación 13 puede comprender además unos labios de sellado para una limpieza óptima de la cámara 6. El material compresible que llena el espacio interior 18 puede ser aire o cualquier otro gas, o una espuma compresible o material celular, para proporcionar una compensación de presión efectiva en la cámara 6. Por consiguiente, el elemento de separación 13 actúa también como un tipo de amortiguador que equilibra las variaciones de presión en la cámara 6.

50
55

El elemento de separación 13 está acoplado a un elemento de ajuste 19 que opera y/o controla al elemento de separación 13. Es decir, el elemento de separación 13 puede ser movido dentro de la cámara 6 por medio del elemento de ajuste 19. El elemento de ajuste 19 está dispuesto fuera de la cámara 6, de manera que cada compartimento de la cámara 6 está desprovisto de cualquier elemento de interferencia que pueda afectar la función del dispositivo 1. El elemento de ajuste 19 comprende un cuerpo giratorio 20 que está acoplado operativamente a las partes separadas 16, 17 del elemento de separación 13. En esta realización ejemplar, el cuerpo giratorio 20 es un elemento similar a un rotor que mueve al elemento de separación 13 de manera que puede realizar un movimiento giratorio a lo largo de la doble flecha 21. Esta realización asegura un control preciso y un movimiento constante del elemento de separación 13 dentro de la cámara curvada 6. El cuerpo giratorio 20 está rodeado por una junta 22 que sella el elemento de ajuste 19 contra la cámara 6, en donde el cuerpo giratorio 20 está conectado a la junta 22 por medio de los radios 23 hechos de un material elástico.

60

El dispositivo 1 comprende además una capa de sellado 24 que se extiende a lo largo del lado exterior de la cámara 6 en oposición a la junta 22 descrita anteriormente y sella los compartimentos 26 y 27 de la cámara 6 uno contra otro. La capa de sellado 24 está hecha de un material elástico y compresible, por ejemplo, espuma de silicona o un material inerte similar, de manera que permite la compensación de presión dentro de la cámara.

Ventajosamente, el dispositivo 1 incluye medios para fijar el elemento de separación 13 fuera de la cámara 6, de manera que la cámara escalable 6 puede ser fácilmente transformada en una cámara estática 6 que tiene un volumen fijo según se muestra en la Figura 2d. Con este propósito, el elemento de separación 13 es movido por medio del elemento de ajuste 19 a un lugar de estacionamiento 25 donde es fijado, para proporcionar todo el volumen de la cámara 6 para el tratamiento de la suspensión en un proceso por lotes.

Las Figuras 2a-d muestran diferentes posiciones del elemento de separación 13 del dispositivo 1 según la Figura 1. El método según la invención es un proceso escalable para tratar eléctricamente una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares, y/o vesículas. En la Figura 2a el elemento de separación 13 está dispuesto en una posición en el punto terminal inferior 15. Si el elemento de separación 13 es girado a una posición en el punto terminal superior 14 (Figura 2b), una primera parte alícuota de la suspensión es inyectada en uno de los puertos inferiores 10, 11 y, por tanto, es cargada en la cámara 6. La primera parte alícuota es tratada a continuación en la cámara 6 aplicando un campo eléctrico a las células suspendidas, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas. Posteriormente, la primera parte alícuota tratada es descargada a través de uno de los puertos inferiores 10, 11 girando el elemento de separación 13 de vuelta a la posición del punto terminal inferior 15 y, al mismo tiempo, una segunda parte alícuota de la suspensión es inyectada en uno de los puertos superiores 7, 8 y, por tanto, es cargada en la cámara 6. La segunda parte alícuota es tratada a continuación en la cámara 6 aplicando un campo eléctrico a las células suspendidas, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas. Posteriormente, la segunda parte alícuota tratada es descargada a través de uno de los puertos superiores 7, 8 girando el elemento de separación 13 de vuelta a la posición del punto terminal superior 14 y, al mismo tiempo, una tercera parte alícuota de la suspensión es inyectada en uno de los puertos inferiores 10, 11 y, por tanto, es cargada en la cámara 6. La tercera parte alícuota es tratada a continuación en la cámara 6 aplicando un campo eléctrico a las células suspendidas, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas. Este mecanismo de vaivén con carga y descarga simultáneas de la suspensión puede ser repetido hasta que toda la suspensión haya sido tratada.

El elemento de separación 13 separa la cámara 6 en dos compartimentos 26, 27 si éste está en una posición entre los puntos terminales 14, 15 (Figura 2c), en donde cada compartimento 26, 27 de la cámara 6 está diseñado para mantener una suspensión y comprende dos puertos 7, 8 y 10, 11 para cargar o descargar la cámara 6. Cada compartimento 26, 27 puede recibir y mantener una parte alícuota de la suspensión que es movable dentro y fuera de la cámara 6 a través de los puertos 7, 8 y 10, 11. Los compartimentos 26, 27 tienen dispuestos cada uno un puerto 7, 10 a través de los que los respectivos compartimentos 26, 27 pueden ser llenados con la suspensión y con un puerto 8, 11 a través del que la suspensión de este compartimento 26, 27 puede ser purgada. Cuando se hace girar el elemento de separación 13, un compartimento 26, 27 de la cámara 6 es llenado con una parte alícuota de la muestra, mientras que otra parte alícuota de la muestra es descargada e impulsada hacia afuera desde el otro compartimento 26, 27. Se puede conectar un recipiente para la muestra entrante a un puerto de entrada superior y a uno inferior 7, 10 y un puerto de salida superior y uno inferior 8, 11 pueden ser conectados a un depósito para la muestra tratada. Como resultará evidente según la Figura 2, el dispositivo 1 no funciona en forma de flujo continuo sino en vaivén con el que la muestra inyectada es descargada después del tratamiento por el mismo lado donde fue cargada. La cámara 6 posee seis segmentos de electrodo, uno de los cuales está siempre cubierto por el elemento de separación 13 y, por tanto, no es utilizable. Por ejemplo, la cámara 6 puede aceptar 834 µl por ciclo. Por tanto, en este caso, 1668 µl pueden ser procesados en un ciclo completo.

En una realización ventajosa de la invención, el elemento de separación está ajustado de manera que cubre exactamente uno o más electrodos segmentados para que se puedan establecer los mismos parámetros eléctricos dentro de cada otro segmento de electrodo.

La variante estática del dispositivo 1 no permite que gire el elemento de separación 13. En lugar de eso, el elemento de separación 13 está fijado fuera de la cámara 6 en el lugar del estacionamiento 25, sin cubrir ningún segmento de electrodo según se muestra en la Figura 2d. Con esta variante se pueden usar los seis segmentos de electrodos y, por tanto, se puede procesar una muestra de 1000 µl. Por ejemplo, la muestra puede ser inyectada en un puerto de entrada inferior o superior 7, 10 del dispositivo 1 y puede ser recogida en el puerto de salida inferior 11. El llenado repetitivo no es posible en este estado del dispositivo 1.

La Figura 3 muestra una vista en perspectiva del lado exterior del dispositivo 1 según la Figura 1. El dispositivo 1 comprende un miembro de base 30, cuyo lado interno (no visible) es idéntico al lado interno del miembro de base 2 de la Figura 1. El miembro de base 30 representa un componente adicional del dispositivo 1 que es un ensamblaje de dos componentes (los miembros de base 2 y 30) que están unidos entre sí. En su lado exterior, el miembro de base 30 tiene dispuestos los conectores 31 para conectar conductos a los puertos 7, 8, 10, 11 de la cámara 6 según las Figuras 1 y 2. Uno o más recipientes para la suspensión a ser tratada y uno o más depósitos para la suspensión tratada pueden estar conectados a los conectores 31 por medio de conductos adecuados. La suspensión puede ser cargada a y descargada de la cámara por medio de un elemento de bombeo, por ejemplo, una bomba de vacío o una bomba peristáltica o similar, que puede estar conectada al circuito de suspensión entre el recipiente o los recipientes/depósito o depósitos y los conectores 31. Para hacer que el dispositivo 1 sea compatible con conductos y sistemas de bombeo comunes, los conectores 31 pueden ser conectores Luer-slip o Luer-lock.

El elemento de ajuste 19 del dispositivo 1 puede estar conectado a una unidad de energía (no mostrada), por ejemplo, un motor eléctrico, por medio de un tornillo sin fin, un engranaje de dientes rectos, un engranaje cónico, una barra de

engranajes, una transmisión por correa y una barra de acero cuadrada, o mecanismos de engranajes similares o elementos de transmisión de potencia (no mostrados).

El miembro de base 30 comprende además una multitud de superficies conductoras 32 para proporcionar una conexión eléctrica a los electrodos dispuestos en la cámara. Las superficies conductoras 32 pueden comprender un polímero eléctricamente conductor, en particular un polímero dopado con material eléctricamente conductor o un polímero intrínsecamente conductor. Las superficies conductoras 32 han sido diseñadas para proporcionar una conexión eléctrica entre los electrodos y al menos un punto de contacto eléctrico 33. En esta realización, las superficies conductoras 32 son orificios dispuestos en el miembro de base 30 que están al menos parcialmente llenos del material conductor de electricidad. Las superficies conductoras 32 están acopladas eléctricamente al menos a un punto de contacto eléctrico 33 por medio de al menos un camino conductor, por ejemplo, pistas de cobre sobre una capa del miembro de base (no mostrado). El punto de contacto eléctrico puede ser contactado al menos por un contacto eléctrico, para proporcionar una conexión eléctrica directa o indirecta a una fuente de energía.

Las Figuras 4a y 4b muestran diferentes vistas del miembro de base 30 según la Figura 3. La superficie interior 34 del miembro de base 30 está representada en la Figura 4a. Los electrodos 4, 5 están aplicados a la superficie interior 34. Tres de estos electrodos 4, 5 son electrodos segmentados 4, mientras que uno de estos electrodos 4, 5 es un contraelectrodo mayor 5. Los electrodos 4, 5 están aplicados y conectados a superficies conductoras 32 que se extienden desde la superficie interior 34 hasta la superficie exterior 35 del miembro de base 30. Por ejemplo, los electrodos 4, 5 y el material eléctricamente conductor dentro de la superficie conductora 32 están hechos del mismo material, por ejemplo, un polímero eléctricamente conductor, en particular un polímero dopado con material eléctricamente conductor o un polímero intrínsecamente conductor como ha sido descrito anteriormente. El polímero puede estar moldeado sobre la superficie interior 34 y la superficie conductora 32 del miembro de base 30 y extenderse a través de los orificios de la zona conductora 32 según se muestra en detalle en la Figura 5a. Las superficies conductoras 32 están acopladas eléctricamente al menos a un punto de contacto eléctrico 33 por medio de al menos un camino conductor (no mostrado). El punto de contacto eléctrico 33 puede ser contactado al menos por un contacto eléctrico, para proporcionar una conexión eléctrica directa o indirecta a una fuente de energía. En una realización ventajosa de la invención, el miembro de base 30 es una placa de circuito impreso (PCB).

La Figura 5a muestra una realización ejemplar de una parte de un espacio interno 40 de un dispositivo ejemplar según la invención. Por ejemplo, el espacio interno 40 puede ser parte de la cámara 6 del dispositivo 1 según las Figuras 1 y 2. El espacio interno 40 comprende ocho segmentos 41.1, 41.2, 41.3, 41.4, 42.1, 42.2, 42.3, 42.4, cada uno de ellos comprende un electrodo 43.1, 43.2, 43.3, 43.4, 44.1, 44.2, 44.3, 44.4. Dos electrodos adicionales 45.1 y 45.2 están dispuestos en oposición a los electrodos 43.1, 43.2, 43.3, 43.4 y 44.1, 44.2, 44.3, 44.4, respectivamente. Los electrodos adyacentes están separados entre sí por un material aislante 46 que rodea los electrodos 43.1, 43.2, 43.3, 43.4, 44.1, 44.2, 44.3, 44.4 y llena cada separación 47.1 - 47.8 entre los electrodos adyacentes. El material aislante 46 puede, por ejemplo, consistir en o al menos comprender policarbonato, placa de circuito FR4 u otros materiales aislantes. Las características de los bordes de los electrodos 43.2 y 43.3, así como las características de la separación 47.2, se describen con más detalle haciendo referencia a la Figura 5b. Estas características descritas a continuación pueden ser aplicadas también a otros electrodos 43.1, 43.4, 44.1, 44.2, 44.3, 44.4 y a las separaciones 47.1, 47.3 - 47.8.

La Figura 5b muestra una parte del espacio interno 40 según la Figura 5a que comprende dos segmentos 41.2, 41.3, cada uno de ellos comprende un electrodo 43.2, 43.3. Un electrodo adicional 45.1 está dispuesto en oposición a los electrodos 43.2, 43.3. Los electrodos adyacentes 43.2, 43.3 están separados entre sí por un material aislante 46 que rodea los electrodos 43.2, 43.3 y llena la separación 47.2 entre los electrodos adyacentes 43.2, 43.3. Con el objeto de evitar la formación de arcos no deseados, los bordes 48, 49 de los electrodos 43.2, 43.3 encarados entre sí dentro del espacio interno 40 están redondeados. Los bordes redondeados 48, 49 aseguran una reducción significativa de gradientes perturbadores del campo eléctrico. Los gradientes del campo eléctrico crean altas densidades de campo locales innecesarias y, por tanto, aumentan el riesgo no deseado de formación de arco. Además, la homogeneización del campo eléctrico dentro del espacio interno 40 y especialmente el del adyacente a la superficie de los electrodos 43.2, 43.3 puede ser conseguida proporcionando una transición uniforme a partir de una superficie de electrodo plana a una superficie de electrodo curvada, es decir, de una superficie más grande a otra de radio de empalme más pequeña. Dicho diseño de electrodo da lugar además a una disminución de la dispersión del campo eléctrico dentro del espacio interno 40, de manera que las líneas del campo eléctrico están enfocadas cerca de los electrodos 43.2, 43.3.

El diseño del dispositivo según la invención puede ser optimizado determinando la relación óptima del radio de cada borde redondeado 48, 49 y el ancho de la separación 47.2. Esta optimización se consigue maximizando el radio del empalme de los bordes redondeados 48, 49 de los electrodos 43.2, 43.3 y al mismo tiempo manteniendo el ancho de la separación 47.2 lo más pequeño posible. El diseño ideal asegura un riesgo de formación de arco muy bajo y una eficiencia de tratamiento muy alta. Por ejemplo, el radio del empalme de los bordes redondeados 48, 49 de al menos uno de los electrodos 43.2, 43.3 puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 0,3 - 2,0 mm, mientras que el ancho de la separación 47.2, es decir, la distancia entre los electrodos adyacentes 43.2, 43.3, puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 0,5 - 2,0 mm.

La superficie 50 del material aislante 46 orientado hacia el espacio interno 40 puede estar formada y alineada de manera que corta la superficie de cada uno de los electrodos 43.2, 43.3 en un ángulo recto. Como resultado, la

superficie 50 del material aislante 46 está dispuesta perpendicularmente a la superficie de los electrodos 43.2 y 43.3, respectivamente. Debido a este diseño favorable, las líneas equipotenciales de un campo eléctrico dentro del espacio interno 40 se encuentran en la superficie de los electrodos 43.2, 43.3 de forma ortogonal y, por tanto, no están desviadas. Por consiguiente, se puede evitar la posible falta de homogeneidad del campo eléctrico o, al menos, desplazarla a una región dentro del material aislante 46, de manera que la probabilidad de formación de arco se reduzca aún más.

El electrodo 45.1 orientado hacia los electrodos 43.2, 43.3 es más grande que los electrodos adyacentes 43.2, 43.3 y está dispuesto en oposición a la separación 47.2. Es decir, no se dispone de ninguna otra separación en oposición a la separación 47.2, de manera que la región adyacente a la separación 47.2 sigue expuesta a un campo eléctrico suficiente para un tratamiento eficiente. Por tanto, la eficiencia de tratamiento global aumenta efectivamente. El electrodo 45.1 se extiende por toda la longitud de ambos segmentos 41.2, 41.3 y, por tanto, es un electrodo común de ambos segmentos 41.2, 41.3. Por ejemplo, el electrodo más grande 45.1 puede ser un contraelectrodo o electrodo de tierra, mientras que los electrodos más pequeños 43.2, 43.3 pueden ser electrodos activos que están ajustados a alto voltaje o electrodos que también están ajustados al potencial de tierra. Se puede aplicar voltaje, por ejemplo, al electrodo 43.2 (electrodo activo), mientras que el electrodo adyacente 43.3 y el contraelectrodo 45.1 son ajustados al potencial de tierra. Ajustar la configuración de los electrodos 43.3 y 45.1 que rodean el electrodo activo 43.2 al potencial de tierra da lugar a una disminución de la dispersión del campo eléctrico dentro del espacio interno 40, de manera que las líneas de campo están enfocadas adyacentes al electrodo activo 43.2 y, por tanto, el control del proceso mejora.

Por ejemplo, al menos uno de los electrodos 43.2, 43.3 puede tener un ancho dentro del intervalo de 5 - 20 mm, mientras que el electrodo más grande 45 puede tener un ancho dentro del intervalo de 20 - 80 mm.

Durante la operación del dispositivo según la invención, cuando la suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas es tratada mediante la generación de un campo eléctrico dentro del espacio interno 40, las superficies planas 51, 52 (o, alternativamente, ligeramente curvadas y/o convexas) de los electrodos adyacentes 43.2, 43.3 que están en contacto con la suspensión son las superficies activas principales del proceso. Las superficies planas 51, 52 están en oposición con el electrodo más grande 45.1 que puede ser usado como contraelectrodo ajustado al potencial de tierra. Por ejemplo, si se aplica un alto voltaje al electrodo 43.3 y el electrodo adyacente 43.2 es ajustado al potencial de tierra, se genera un campo eléctrico con una alta intensidad de campo en el segmento 41.3 entre las superficies del electrodo paralelo, es decir, la superficie plana 52 del electrodo 43.3 y la superficie 53 plana dispuesta en oposición (o, alternativamente, ligeramente curvada y/o convexa) del electrodo 45.1 (Figura 6). Debido al diseño ventajoso del dispositivo según la invención, las líneas equipotenciales de esta zona están distribuidas homogéneamente, de manera que el riesgo de formación de arco es muy bajo. Básicamente, el siguiente principio es válido: cuanto más homogénea es la distribución de las líneas equipotenciales, menor es el riesgo de formación de arco. Por consiguiente, deben evitarse la falta de homogeneidad y los gradientes de campo en la zona de transición de la superficie plana 52 a la superficie redondeada 49 del electrodo 43.3. Con este objeto, según la invención, se asegura una transición uniforme y constante mediante la provisión de un primer redondeo que tiene un primer radio de empalme más grande y un segundo redondeo que tiene un segundo radio de empalme más pequeño. El segundo radio del empalme aleja la superficie del electrodo 43.3 del electrodo opuesto 45.1 para reducir localmente la intensidad de campo. El borde redondeado 49 del electrodo 43.3 y el diseño de la superficie 50 del material aislante 46 según se ha descrito anteriormente dan lugar a una reducción significativa del riesgo de formación de arco. Además, el campo eléctrico está enfocado en el segmento 41.3 entre la superficie plana 52 del electrodo 43.3 y la superficie plana dispuesta en sentido opuesto 53 del electrodo 45.1. Lo mismo le ocurre al electrodo adyacente 43.2 si se aplica alto voltaje al electrodo 43.2 y el electrodo 43.3 es ajustado al potencial de tierra durante un impulso de voltaje posterior.

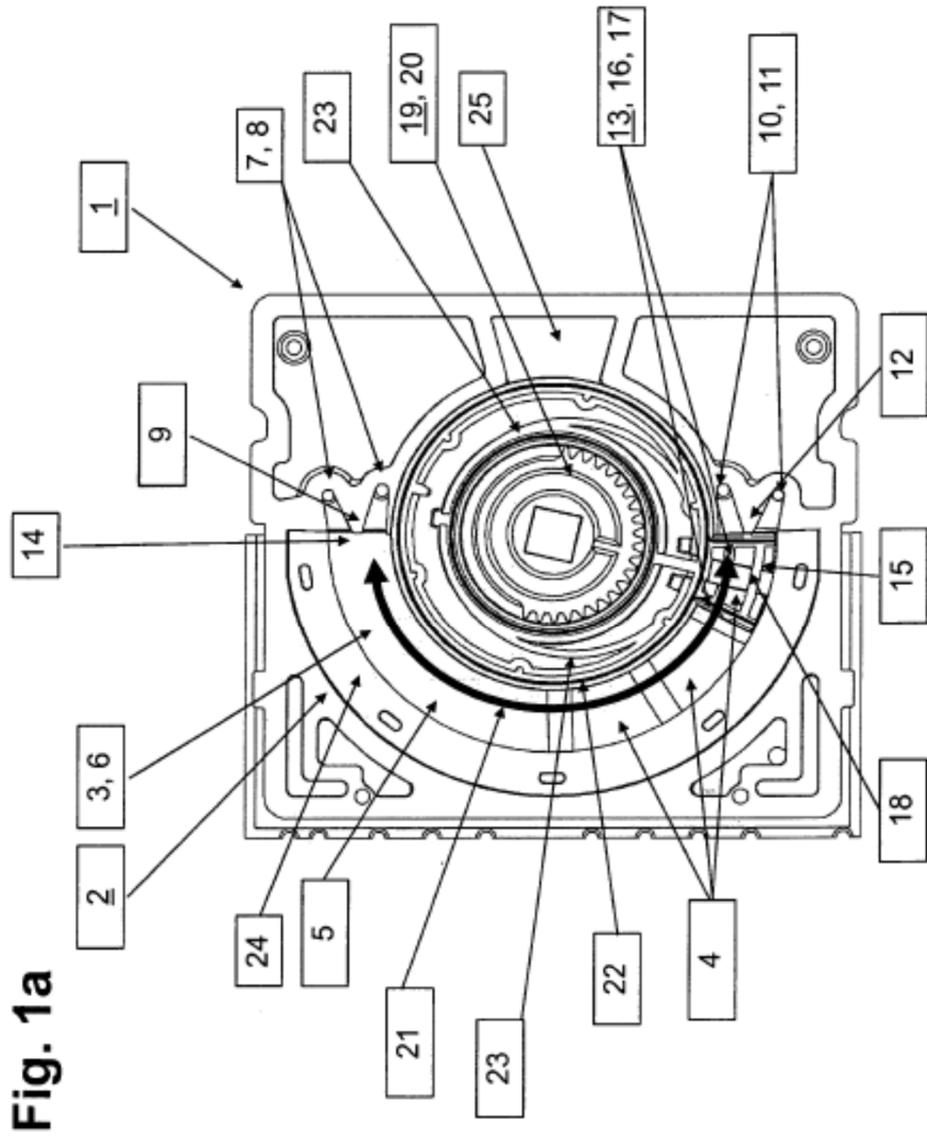
Como resultará evidente en la Figura 6, la región adyacente a la separación 47.2 sigue expuesta a un campo eléctrico suficiente para un tratamiento eficiente. Como el volumen de la suspensión es tratado dos veces cuando se aplica un impulso de voltaje a continuación al electrodo 43.2, es deseable una intensidad de campo media dentro de la zona entre la separación 47.2 y el electrodo en oposición 45.1. El ancho de la separación 47.2, es decir, la distancia entre los electrodos adyacentes 43.2, 43.3, es, por tanto, optimizado.

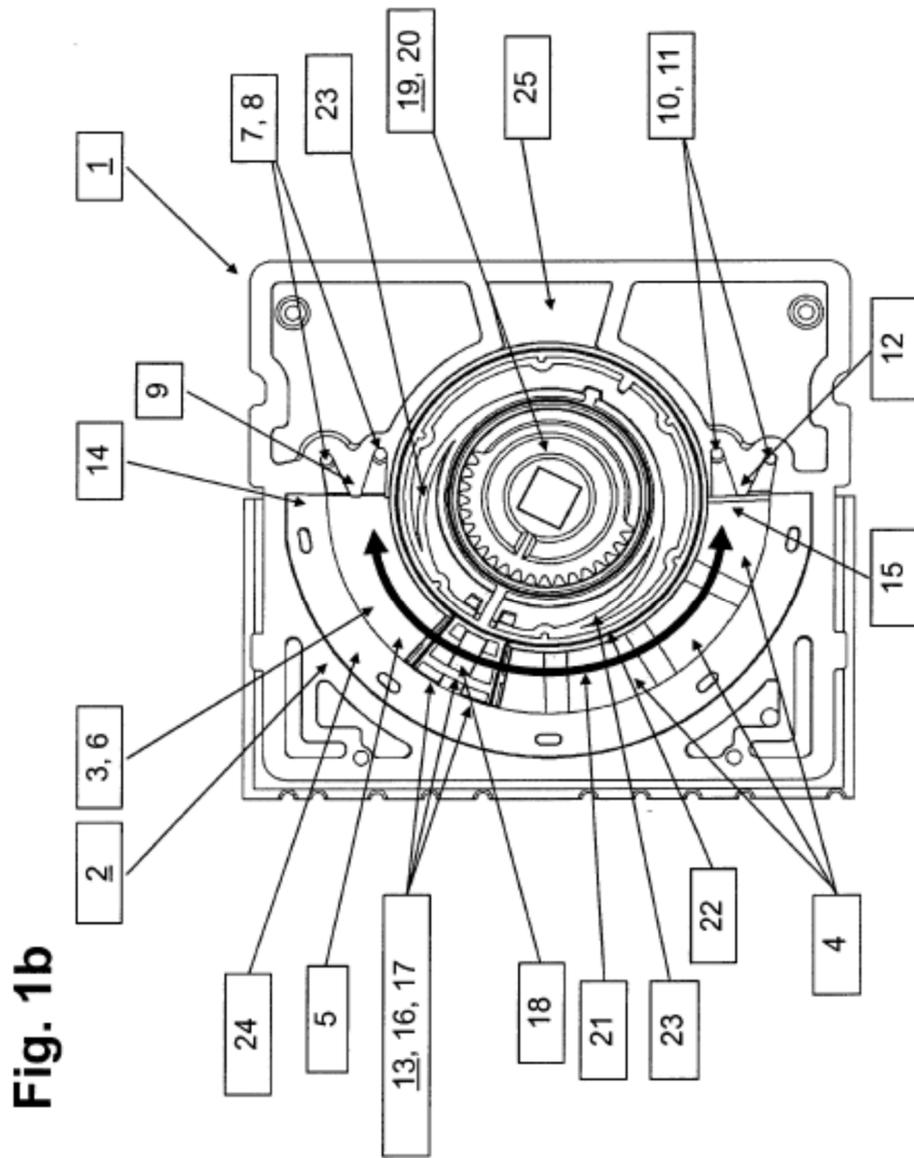
Si el ancho de la separación es demasiado grande, las células, los derivados celulares, los orgánulos, las partículas subcelulares y/o las vesículas en medio de la zona de la separación aislante están expuestas a una intensidad de campo inferior a la mitad de la intensidad de campo máxima (por ejemplo, la separación 54 entre los electrodos 55, 56 representada en la Figura 7). Por tanto, el material tratado dos veces en esta zona no ha sido tratado idealmente.

El diseño ideal del dispositivo según la invención aleja posibles "puntos calientes" con gradientes de campo muy elevados lejos de la superficie/esquinas del electrodo. Con los electrodos convencionales y el diseño de la separación (es decir, los electrodos rectos y rectangulares 57, 58 como se muestra en la Figura 8), los altos gradientes de campo adyacentes a los electrodos se correlacionan con un bajo umbral de formación de arco y, por tanto, una probabilidad mucho mayor de casos de formación de arco.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1) para aplicar un campo eléctrico a una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas, comprendiendo al menos una cámara (6) que comprende al menos un espacio interno (40) para mantener la suspensión, comprendiendo el espacio interno (40) al menos dos segmentos (41, 42), en donde cada segmento (41, 42) comprende al menos un electrodo (43, 44, 45) y en donde los electrodos adyacentes (43, 44) están separados entre sí por al menos una separación (47) que está al menos parcialmente llena de un material aislante (46), **caracterizado por que** los bordes (48, 49) de los electrodos (43, 44) encarados entre sí dentro del espacio interno (40) están redondeados y la superficie (50) del material aislante (46) orientada hacia el espacio interno (40) corta la superficie (51, 52) de al menos un electrodo (43, 44) en ángulo recto.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, en donde el radio del empalme de los bordes redondeados (48, 49) de los electrodos (43, 44) está maximizado.
3. Dispositivo según la reivindicación 1 o 2, en donde el ancho de la separación (47) y/o la distancia entre los electrodos adyacentes (43, 44) está minimizado.
4. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde el radio del empalme de los bordes redondeados (48, 49) de al menos uno de los electrodos (43, 44) está dentro del intervalo de aproximadamente 0,3 - 2,0 mm.
5. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el ancho de la separación (47) y/o la distancia entre los electrodos adyacentes (43, 44) está dentro del intervalo de aproximadamente 0,5 - 2,0 mm.
6. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde al menos uno de los electrodos es más grande que el otro u otros.
7. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde al menos un electrodo (43, 44) tiene un ancho dentro del intervalo de 5 - 20 mm y al menos un electrodo (45) tiene un ancho dentro del intervalo de 20 - 80 mm.
8. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la separación (47) está situada de tal manera que una parte de al menos un electrodo (45) está dispuesta en oposición a dicha separación (47).
9. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde cada segmento (41, 42) tiene dispuesto al menos un primer electrodo (43, 44) y al menos un segundo electrodo (45), en donde el segundo electrodo (45) es un electrodo común de al menos dos segmentos (41, 42).
10. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el lumen del espacio interno (40) de la cámara (6) tiene un volumen de al menos 500 µl.
11. Método para aplicar un campo eléctrico a una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas, en donde un voltaje es aplicado a los electrodos (43, 44) de una cámara (6) comprendiendo al menos un espacio interno (40) para mantener la suspensión, comprendiendo el espacio interno (40) al menos dos segmentos (41, 42), en donde cada segmento (41, 42) comprende al menos un electrodo (43, 44, 45) y en donde los electrodos adyacentes (43, 44) están separados entre sí por al menos una separación (47) que está al menos parcialmente llena de un material aislante (46), **caracterizado por que** el voltaje es aplicado al menos a un electrodo activo (43, 44) mientras que los electrodos (43, 44, 45) o segmentos de electrodos adyacentes y/o en oposición al electrodo activo (43, 44) están ajustados al potencial de tierra.
12. Método según la reivindicación 11, en donde el voltaje es aplicado a un único electrodo activo (43, 44) mientras que todos los demás electrodos (43, 44, 45) o segmentos de electrodos del espacio interno (40) están ajustados al potencial de tierra.
13. Método según la reivindicación 11 o 12, en donde el voltaje es aplicado al menos a dos electrodos (43, 44) o a segmentos de electrodos del espacio interno (40) de manera secuencial.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el segmento más cercano a un puerto de salida de la cámara es tratado como primer segmento seguido por el segmento adyacente hasta que el último segmento de esta secuencia, el segmento más distante al puerto de salida, está siendo tratado.
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde cada segmento (41, 42) tiene dispuesto al menos un primer electrodo (43, 44) y al menos un segundo electrodo (45), en donde el voltaje está aplicado al primer electrodo (43, 44) y el segundo electrodo (45) es un electrodo común de al menos dos segmentos (41, 42).





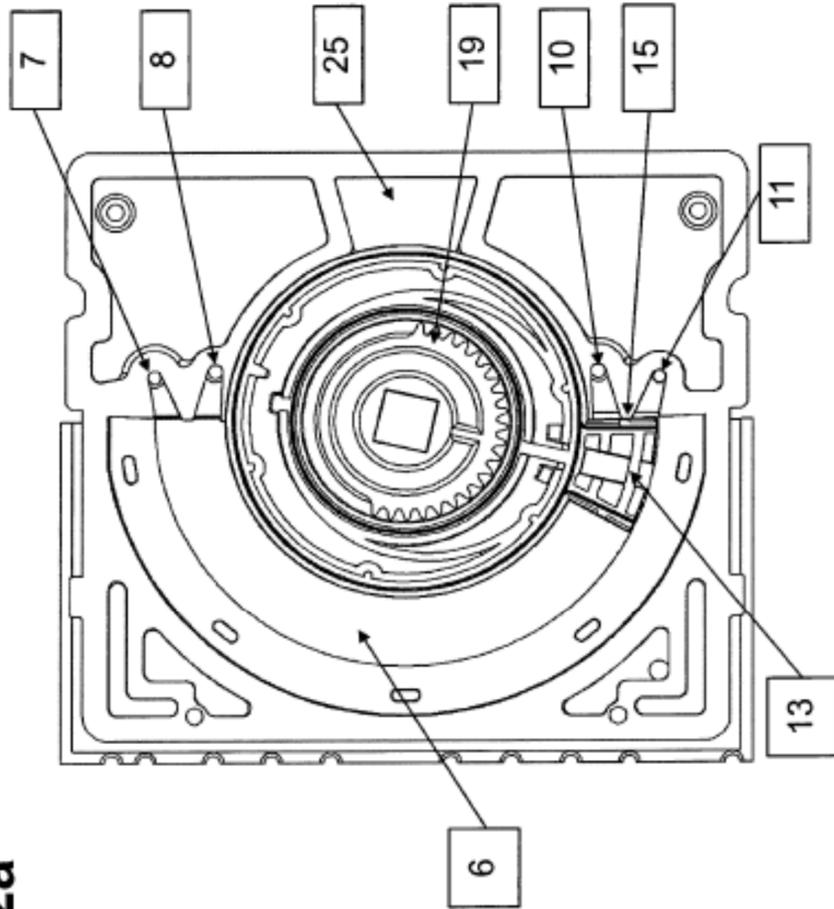


Fig. 2a

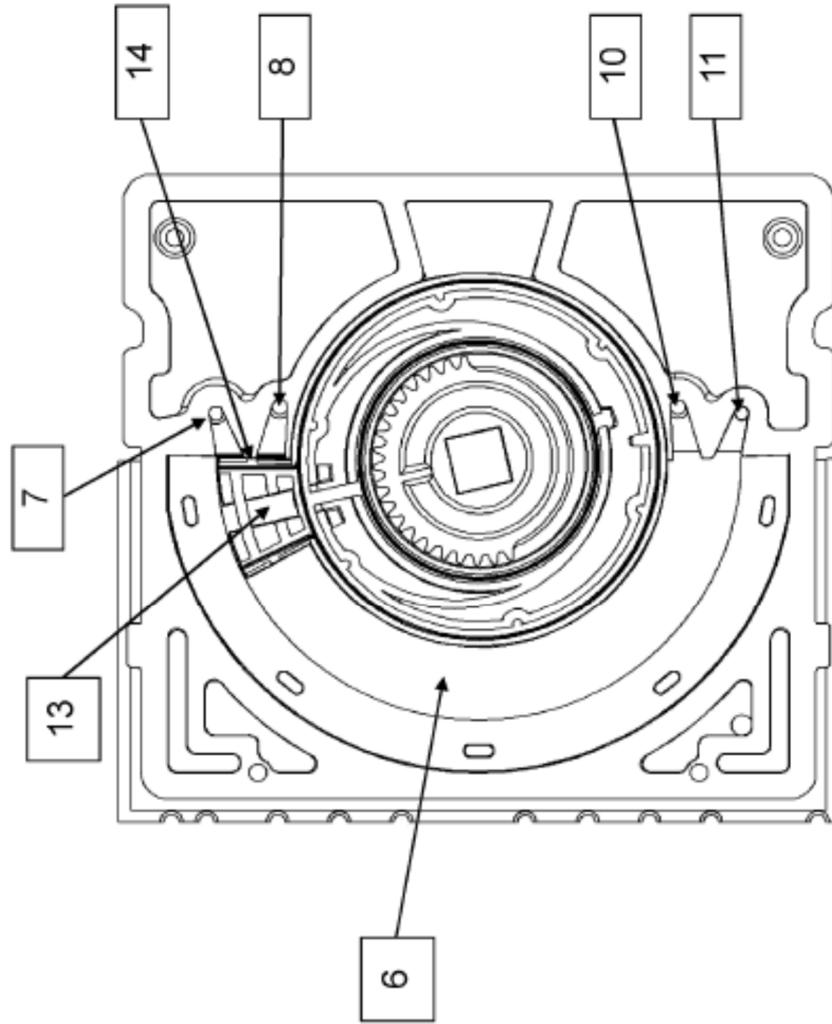


Fig. 2b

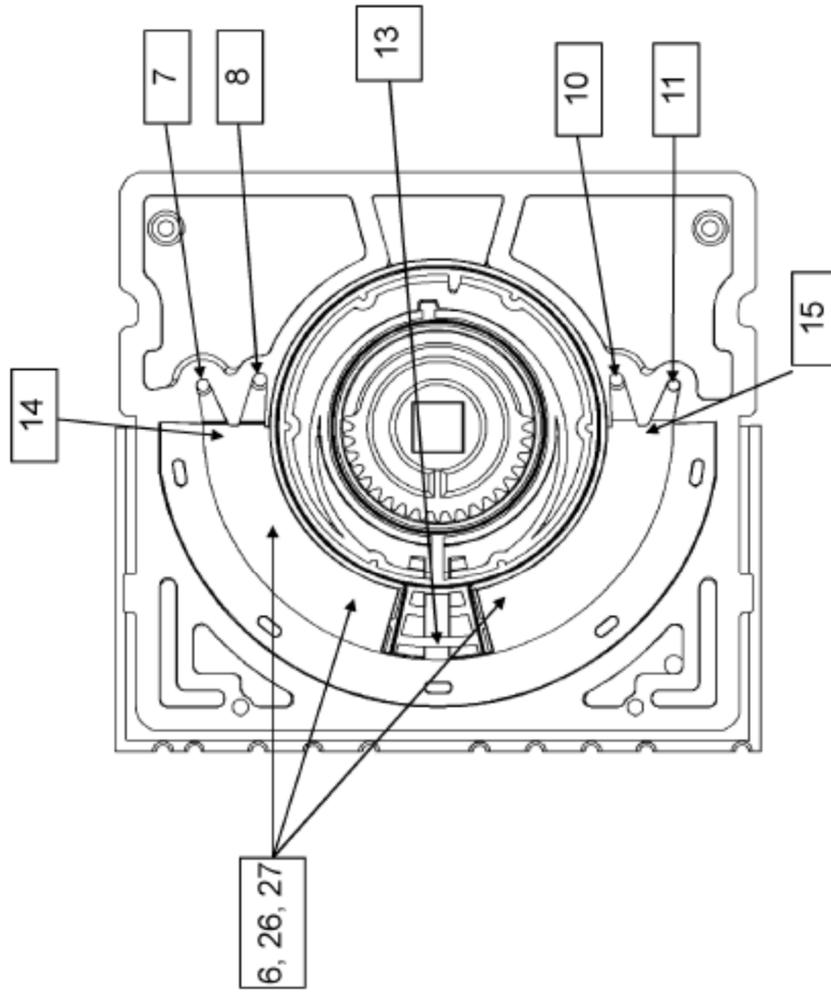


Fig. 2c

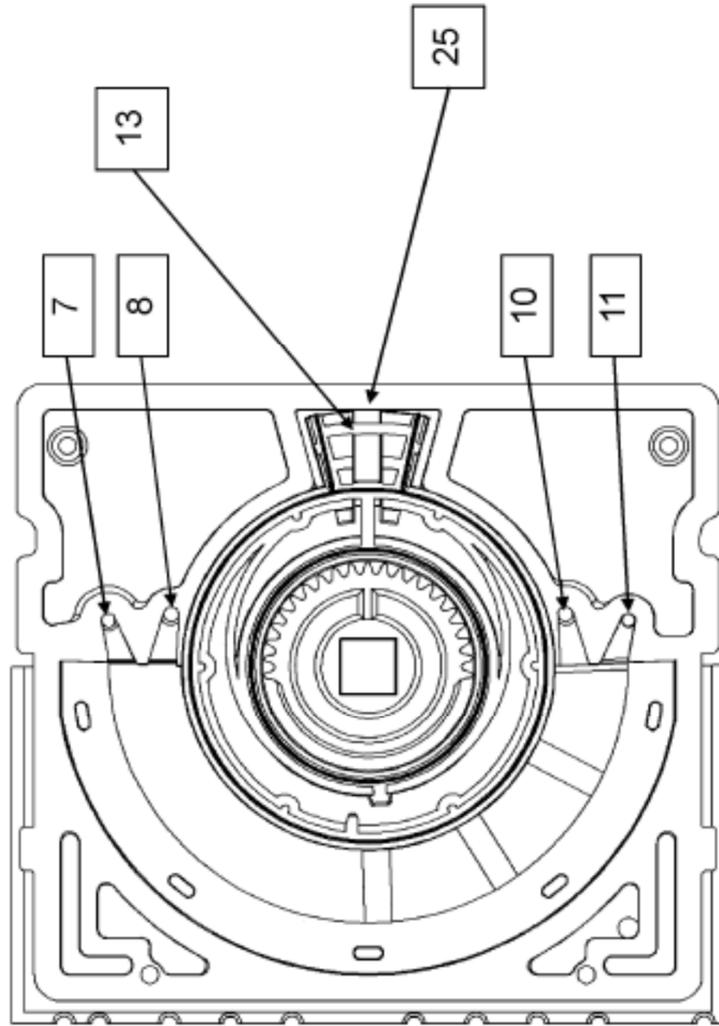


Fig. 2d

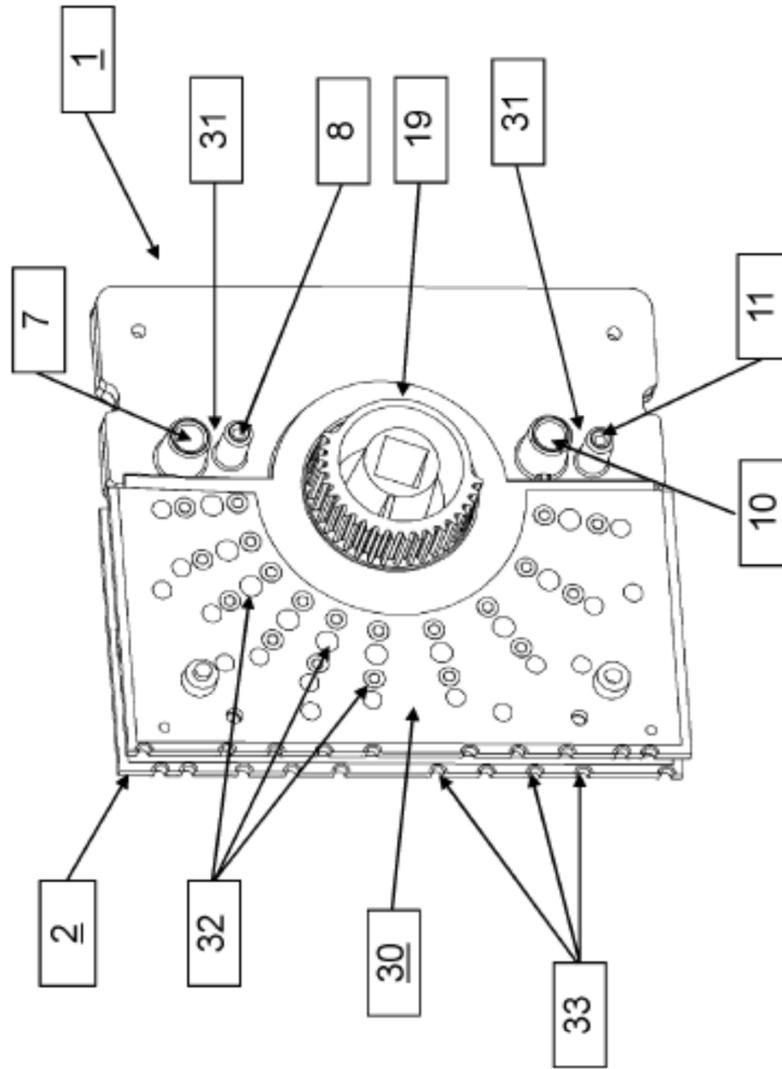


Fig. 3

Fig. 5a

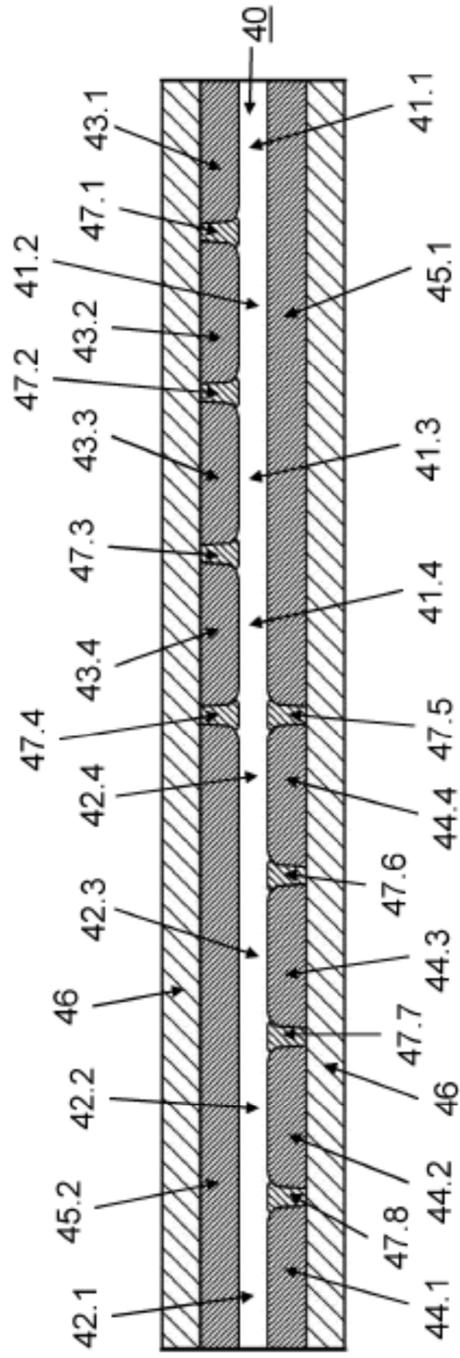


Fig. 5b

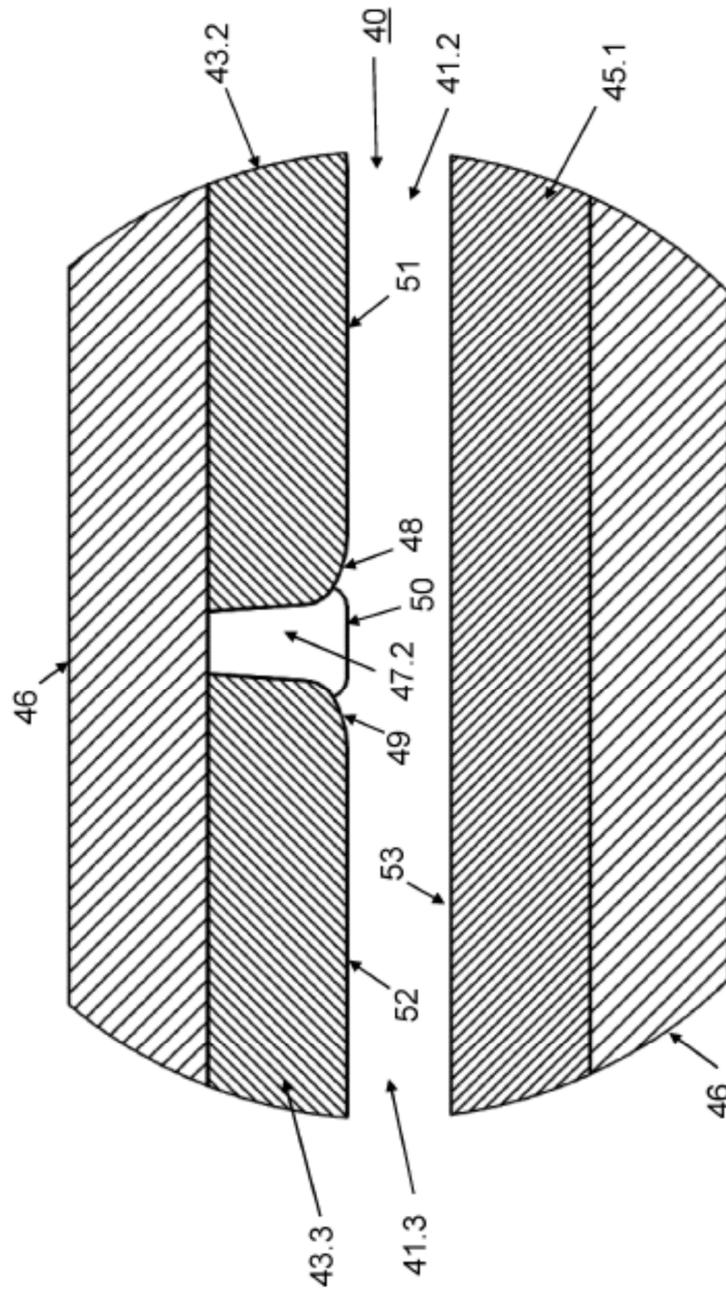
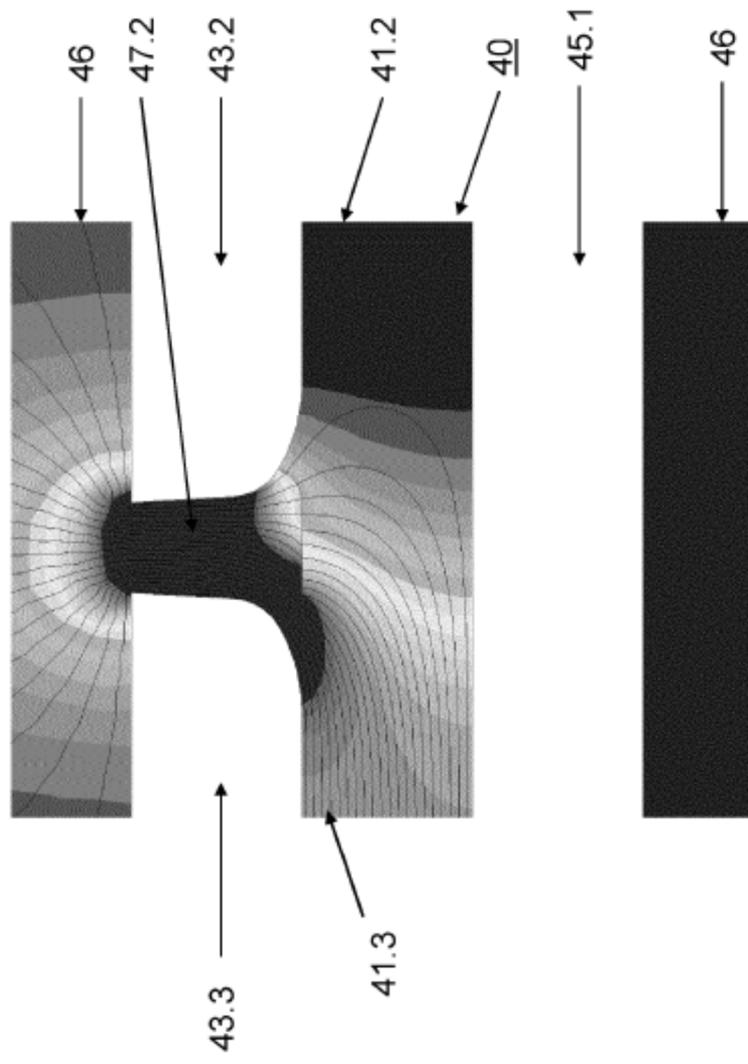


Fig. 6



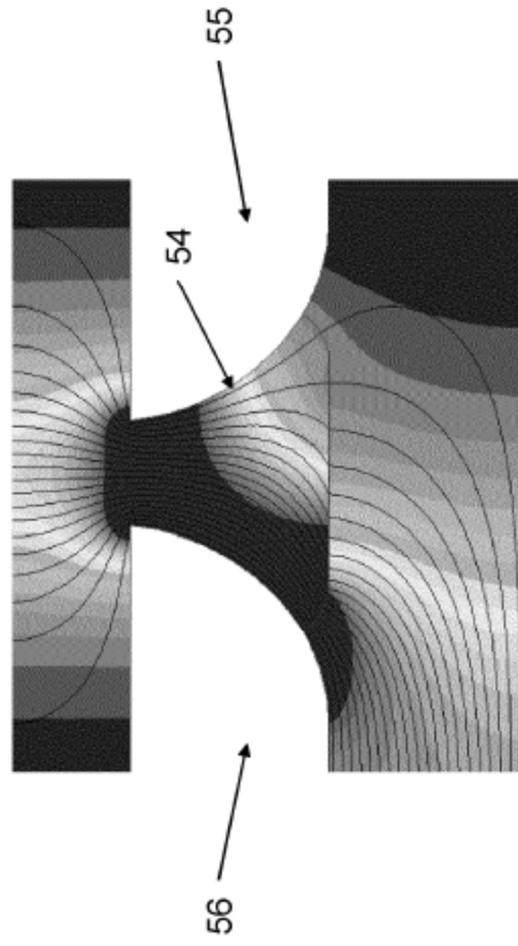


Fig. 7

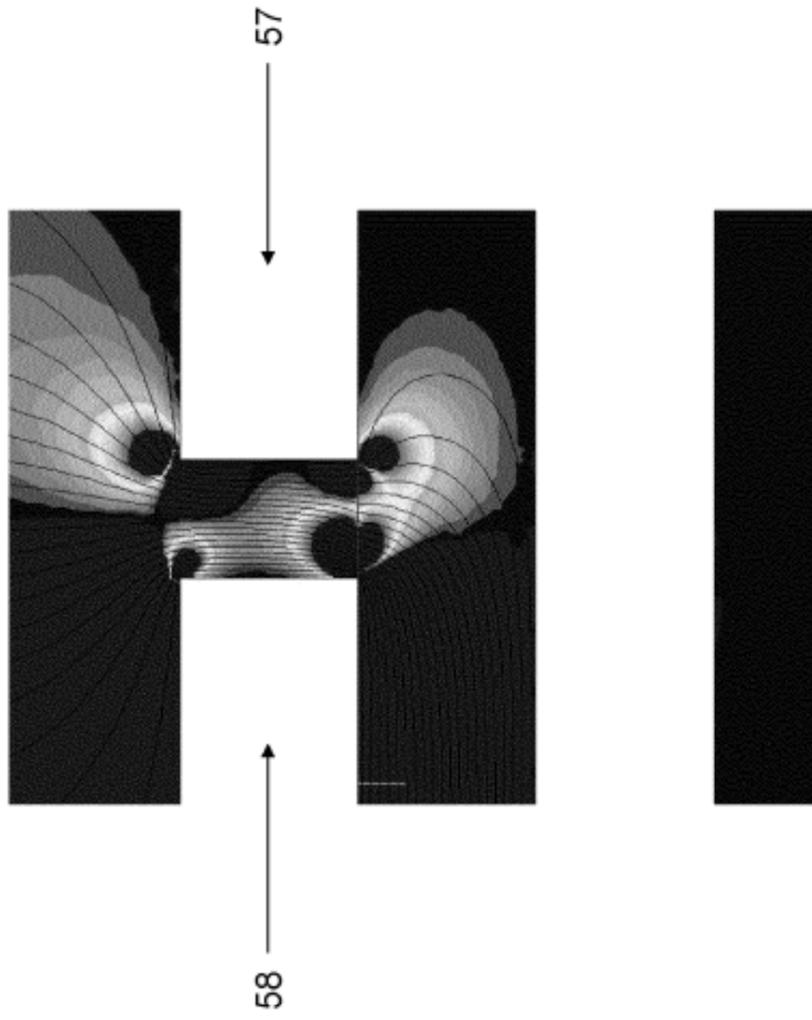


Fig. 8