

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 732**

51 Int. Cl.:

A61N 1/04 (2006.01)
A61N 1/30 (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
G01N 35/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2014** E 17184306 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019** EP 3260163

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2020

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 2 751 732 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

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 dos segmentos, comprendiendo cada segmento al menos un primer electrodo y al menos un segundo electrodo.

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.

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.

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.

La patente de los EE.UU. US-A-6 150 148 describe, por ejemplo, una cubeta modificada para procesos de flujo continuo. El puerto de la cubeta está sellado por una tapa a través de la que es guiada una línea de alimentación. En la parte inferior de una región entre los electrodos, la cubeta tiene un puerto adicional al que se conecta una descarga. Debido a esta disposición, la suspensión a ser tratada puede ser alimentada por medio de la línea de alimentación al espacio de reacción y salir a través de la descarga. Debido al intercambio repetido, continuo o discontinuo de la suspensión en la sala de reacción y los pulsos eléctricos repetidos respectivos, se pueden tratar volúmenes más grandes con esta cubeta. La patente de los EE.UU. US-A-6 150 148 describe además cámaras de flujo continuo que son de diseño tubular o ranurado y en sus extremos cada una tiene una conexión para una entrada y un canal de salida. Las cámaras representan un espacio de reacción alargado que está rodeado por dos cilindros, dispuestos concéntricamente o electrodos planos con configuración plana-paralela. Estos dispositivos permiten también tratar volúmenes mayores mediante pulsos repetitivos conforme son alimentados a través de la cámara.

Sin embargo, los procesos de electroporación de flujo continuo o incluso de electrofusión son difíciles de controlar, ya que la velocidad de flujo continuo debe corresponderse con la frecuencia de pulsación. El calentamiento de la suspensión y la formación de burbujas de gas por electrólisis plantean otros problemas importantes. La generación repetitiva de las corrientes muy altas frecuentemente requeridas para estos procesos conduce a un aumento de la producción de calor y a un gran número de pequeñas burbujas de gas que se forman por procesos electroquímicos en la solución de electrolito en la que están suspendidas las células o vesículas a ser tratadas. Estas burbujas perturban el flujo de la suspensión a través de la cámara y pueden dar lugar a un reflujo de la suspensión ya tratada en la cámara. Además, el riesgo de formación de arco aumenta conforme la suspensión se distribuye de manera desigual dentro de la cámara. Estos problemas, por una parte, conducen a resultados que ya no son reproducibles y, por otra parte, si se tratan células vivas, a una mayor tasa de mortalidad.

El documento WO 2004/083379 A2 describe un método de electroporación para la inserción de material exógeno en vesículas mediante el cual el volumen de tratamiento de la suspensión es escalable y el tiempo de tratamiento de las vesículas en la cámara es sustancialmente uniforme. En este método, el volumen de la suspensión es mayor que el volumen de la cámara del dispositivo de electroporación. Una porción inicial del volumen de la suspensión es movida

a la cámara, retenida y tratada en la cámara, y sacada de la cámara. Una porción adicional del volumen de la suspensión es movida a continuación a la cámara, retenida y tratada en la cámara, y sacada de la cámara. Otras porciones del volumen de la suspensión son movidas secuencialmente hacia la cámara, retenidas y tratadas en la cámara, y sacadas de la cámara hasta agotar el volumen de la suspensión.

5 El documento WO 2005/113820 A2 describe un dispositivo de electroporación que comprende una cámara de electroporación de flujo regulado que permite condiciones en las que una muestra es tratada uniformemente en fracciones o volúmenes individuales en un sistema estéril completamente cerrado. La cámara incluye un puerto de entrada y un puerto de salida, a través de los que la suspensión celular a ser tratada puede ser cargada y desplazada desde la cámara, respectivamente, para que las muestras de la suspensión puedan ser tratadas en unidades que se producen al proporcionar un contorno entre los volúmenes tratados y no tratados de la muestra. El contorno es proporcionado mediante el ciclado de un gas o fluido no de muestra en la cámara entre dos fracciones de la muestra. El gas o fluido que no es de muestra puede fluir dentro o fuera de la cámara a través de un tercer puerto de la cámara.

10 La patente de los EE.UU. US 2007/0128708 A1 y el documento WO 2007/120234 A2 describen un dispositivo escalable para electroporar volúmenes relativamente grandes de un medio fluido que transporta células biológicas o vesículas a una cámara segmentada, en donde cada segmento comprende dos electrodos. El volumen efectivo de la cámara puede ser variado moviendo 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 y purgada de la cámara por medio de un puerto dispuesto en la pared final de la cámara. La muestra dentro de la cámara es tratada aplicando secuencialmente pulsos de voltaje a los pares de electrodos de los segmentos individuales de la cámara.

15 Sin embargo, un inconveniente de los dispositivos y métodos de la técnica anterior es que el tratamiento de volúmenes mayores lleva mucho tiempo, ya que una muestra ya tratada debe ser completamente descargada de la cámara antes de que la siguiente muestra pueda ser cargada en la cámara. Otro inconveniente de los dispositivos y métodos de la técnica anterior es que las burbujas y los residuos celulares no se eliminan completamente de la cámara de reacción de una manera fiable.

20 Un objeto de la invención es proporcionar un dispositivo para tratar células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas, con lo que se acelera el tratamiento de volúmenes mayores, lo que permite el tratamiento en condiciones reproducibles y que puede ensamblarse fácilmente.

25 El objeto se alcanza mediante un dispositivo que aplica un campo eléctrico a una suspensión de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas según se ha especificado inicialmente, en donde el segundo electrodo es un electrodo común de al menos dos segmentos y la cámara comprende rebajos correspondientes de dos componentes que están unidos entre sí, formando los rebajos alineados la cámara, en la que cada rebajo está provisto de al menos un electrodo. Una ventaja del dispositivo según la invención es que cada segmento puede ser direccionado eléctricamente de manera individual, de forma que se puede conseguir con precisión la generación controlada de campos eléctricos dentro de la cámara. Por ejemplo, para evitar la formación de arcos y/o el calentamiento no deseado de la suspensión, se pueden aplicar pulsos de voltaje a diferentes segmentos de un compartimento de forma secuencial. Para este fin, cada segmento está 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. La cámara del dispositivo según la invención comprende rebajos correspondientes de dos componentes que están unidos entre sí. Es decir, el dispositivo según la invención puede ser ensamblado, por ejemplo, uniendo 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 unidos entre sí, sus rebajos alineados forman la cámara del dispositivo. Para producir un campo eléctrico dentro de la cámara, cada rebajo está provisto de al menos un electrodo.

30 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 un 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, en este caso es todavía posible un ensamblaje fácil acoplando los componentes entre sí.

35 En una realización particular, la cámara comprende además al menos un miembro de base que está hecho al menos sustancialmente de un material aislante e incluye al menos una superficie a la que están acoplados los electrodos, en donde dicha superficie comprende al menos una superficie conductora diseñada para proporcionar una conexión eléctrica entre uno de los electrodos y al menos un punto de contacto eléctrico. La superficie conductora puede ser, por ejemplo, al menos un orificio, una característica tridimensional de la superficie o una superficie plana. El orificio puede ser un orificio dispuesto en el miembro de base que está provisto de un material eléctricamente conductor, al menos en su superficie interior. El orificio puede estar al menos parcialmente lleno de un material eléctricamente conductor que proporciona un camino eléctricamente conductor desde el electrodo a la misma o a otra superficie del miembro de base. La característica tridimensional puede ser seleccionada del grupo que consiste en hoyos, baches, líneas, rebajos, depresiones, salientes y pozos. La superficie conductora puede estar eléctricamente acoplada al menos con un punto de contacto eléctrico por medio de al menos un camino conductor, por ejemplo, una pista de

5 placa de circuito impreso (PCB). El punto de contacto eléctrico está hecho de un material conductor de electricidad y está diseñado para ser contactado al menos por un contacto eléctrico, por ejemplo, un contacto de resorte, que proporciona una conexión eléctrica directa o indirecta con un suministro de energía. El uso de dichos miembros de base permite una producción rentable del dispositivo según la invención, ya que los miembros que incluyen electrodos y puntos de contacto correspondientes pueden ser producidos en un proceso de fabricación de un único paso que ahorra tiempo. Además, en esta realización, el diseño del electrodo es independiente de la situación de los contactos eléctricos, de manera que el diseño optimizado del electrodo puede ser combinado con una conexión eléctrica óptima. Los medios para hacer contacto con los electrodos pueden ser diseñados independientemente del diseño y la posición del electrodo.

10 En una realización ventajosa de la invención, el miembro de base puede ser una placa de circuito impreso (PCB) o similar. La PCB puede incluir un termistor interno (resistencia térmica) para un mejor control de la temperatura, a fin de permitir un tratamiento más lento de la suspensión para permitir la disipación del calor.

15 Por ejemplo, los electrodos pueden estar hechos de un polímero eléctricamente conductor, en particular un polímero dopado con material eléctricamente conductor. El polímero puede consistir en o estar al menos basado en policarbonato, polieteretercetona, polipropileno, poliamida, polifenilensulfuro o una mezcla de estos polímeros. El polímero puede estar dopado, por ejemplo, con fibras de carbono, grafito, hollín, nanotubos de carbono y/o un material sintético intrínsecamente conductor. Alternativamente, puede ser usado como material electrodo un polímero intrínsecamente conductor, tal como polianilina, poliacetileno, poli-parafenileno, poli-para-fenilensulfuro, polipirrol, politiofeno, polipropileno o similares.

20 Con el propósito de proporcionar un miembro de base adecuado, el polímero puede ser moldeado sobre un lado del miembro de base provisto de al menos dos superficies conductoras en uno o más lados del miembro de base, en donde el polímero forma un contacto físico estrecho al menos parcialmente al menos con una superficie conductora, en donde las superficies conductoras pueden ser planas o la superficie de un hoyo o un orificio a través del miembro de base y el polímero se extiende hacia los orificios o a través de los orificios y se forman eléctricamente caminos conductores desde los electrodos hasta puntos de contacto que no están sobremoldeados con el polímero conductor.

25 Un aspecto de la invención es proporcionar un dispositivo según la invención, en donde la cámara comprende además al menos un miembro de base que está hecho al menos sustancialmente de un material aislante e incluye una superficie a la que están acoplados los electrodos, en donde dicha superficie incluye al menos una superficie conductora diseñada para proporcionar una conexión eléctrica entre uno de los electrodos y al menos un punto de contacto eléctrico. La superficie conductora en la superficie del miembro de base puede ser un hoyo u orificio al menos parcialmente moldeado o relleno con un material eléctricamente conductor y que proporciona un camino eléctricamente conductor desde el electrodo hasta el punto de contacto. Con este dispositivo puede ser beneficioso que el electrodo y el material eléctricamente conductor estén hechos del mismo material. Por ejemplo, los electrodos pueden estar hechos de 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 ser moldeado sobre un lado del miembro de base y puede formar un contacto físico estrecho a una superficie conductora plana, o extenderse a hoyos chapados conductivamente o a través de orificios chapados conductivamente, para formar caminos eléctricamente conductores desde el electrodo hasta el punto de contacto. En una realización ventajosa de la invención, el miembro de base puede ser una placa de circuito impreso (PCB) o similar.

30 El contacto de los electrodos mediante el sobremoldeo de la PCB permite diseñar los electrodos independientemente de la situación de los contactos eléctricos, de manera que el diseño optimizado del electrodo puede ser combinado con una conexión eléctrica óptima. Es decir, los medios para hacer contacto con los electrodos pueden ser diseñados independientemente del diseño y la posición del electrodo. La PCB puede incluir un termistor interno o cualquier otro componente eléctrico sensible a la temperatura, para un mejor control de la temperatura, con objeto de permitir una ralentización del tratamiento de la suspensión que permita la disipación del calor.

35 Alternativamente, los electrodos de la cámara pueden estar hechos de metal, por ejemplo, aluminio, o de cualquier otro material conductor.

Para sellar la cámara contra otros componentes del dispositivo según la invención, al menos una junta puede estar dispuesta entre el elemento de ajuste y la cámara.

40 La cámara puede comprender además al menos una capa de sellado que se extiende al menos parcialmente a lo largo de un lado de la cámara para sellar este lado contra el medio ambiente. Esta capa de sellado puede estar dispuesta en un lado de la cámara en oposición a la junta mencionada anteriormente, es decir, en el lado de la cámara en oposición al elemento de ajuste. Si la capa de sellado comprende un material elástico y compresible, habilita además la compensación de presión dentro de la cámara. La capa de sellado puede estar hecha de espuma de sílica o de un material inerte similar.

45 Según otra realización ejemplar, el dispositivo según la invención puede comprender además medios de apilamiento para acoplar este dispositivo a otro dispositivo según la invención. Es decir, el rendimiento de un sistema de electroporación o electrofusión puede ser fácilmente mejorado apilando una pluralidad de dispositivos según la

invención, para aumentar el volumen tratable por unidad de tiempo. Por ejemplo, los dispositivos apilados pueden ser acoplados de manera que una pluralidad de cámaras estén conectadas en paralelo. De esta manera, es ventajosamente posible aumentar el volumen total del sistema, por ejemplo, 10 veces.

5 Otro enfoque para aumentar la capacidad del dispositivo según la invención es la disposición de dos o más cámaras dentro de un dispositivo. En este caso, las cámaras pueden estar dispuestas en paralelo o ser concéntricas.

10 Con la versión apilable y/o multicámara, el volumen total del sistema puede ser fácilmente aumentado hasta 10 ml o incluso 100 ml o más. Básicamente, el número de células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas a procesar no está de ninguna manera limitado. Por ejemplo, una ampliación adecuada permite el tratamiento de 10^7 a 10^8 , 10^7 a 10^9 o 10^7 a 10^{10} células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas.

En una realización ventajosa de la invención, el dispositivo está diseñado de manera que tenga una orientación vertical en el estado funcional. Esta orientación vertical en combinación con el puerto o puertos de salida de la cámara que están dispuestos en la parte superior de la cámara asegura la eliminación completa de burbujas.

15 El dispositivo según la invención puede comprender además al menos un elemento de separación que es movable dentro de la cámara entre dos puntos terminales.

El dispositivo según la invención puede comprender además medios para fijar el elemento de separación fuera de la cámara, por ejemplo, en un lugar de estacionamiento, de manera que la cámara escalable pueda ser transformada fácilmente en una cámara estática con un volumen fijo. Por ejemplo, la variante estática del dispositivo puede tener un volumen de tratamiento fijo de aproximadamente 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml o 2,0 ml.

20 Por ejemplo, el elemento de separación puede ser movido dentro de la cámara al menos parcialmente por medio de un elemento de ajuste que está acoplado operativamente al elemento de separación. Si el elemento de ajuste es un cuerpo giratorio, por ejemplo, un elemento similar a un rotor, el elemento de separación puede ser movido girando el elemento de ajuste. Dicha realización asegura un control preciso y un movimiento constante del elemento de separación, en particular si la cámara tiene una forma curva.

25 La suspensión puede ser cargada y descargada de la cámara mediante un elemento de bombeo, por ejemplo, una bomba de vacío o una bomba peristáltica o similar. Con este propósito, el dispositivo según la invención puede estar provisto de conectores Luer-slip, o cualquier otro conector que sea conectable y desconectable, que haga que el dispositivo sea compatible con los sistemas de bombeo comunes. La presión de bombeo es soportada por el movimiento del elemento de separación que limpia las superficies internas de la cámara para asegurar el desplazamiento completo de la muestra tratada en la cámara. Además, la combinación de bombeo y limpieza da como resultado la eliminación efectiva de burbujas de aire, residuos celulares y cualquier otra partícula.

30 En aplicaciones particulares puede ser necesario o ventajoso proporcionar las células, derivados celulares, orgánulos, partículas subcelulares y/o vesículas a ser tratadas y los sustratos o reactivos en recipientes separados y mezclarlos justo antes del llenado de la cámara y del tratamiento posterior.

35 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.

a) Elemento de separación en una posición en un punto terminal inferior.

b) Elemento de separación en una posición intermedia.

40 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

b) Posición en un punto terminal superior

c) Posición intermedia

45 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.

a) Lado interior del miembro de base con electrodos

b) Lado exterior del miembro de base con superficies conductoras

La Figura 5 muestra detalles de tres realizaciones ejemplares del dispositivo según las Figuras 3 y 4.

- a) Electrodo que se extiende a través de orificios
- b) Electrodo acoplado a una superficie plana
- c) Electrodo acoplado a un rebajo

5 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 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.

25 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.

40 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.

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.

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 sostener 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 1000µl por ciclo. Por tanto, en este caso, 2000µl 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 1200µl. 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).

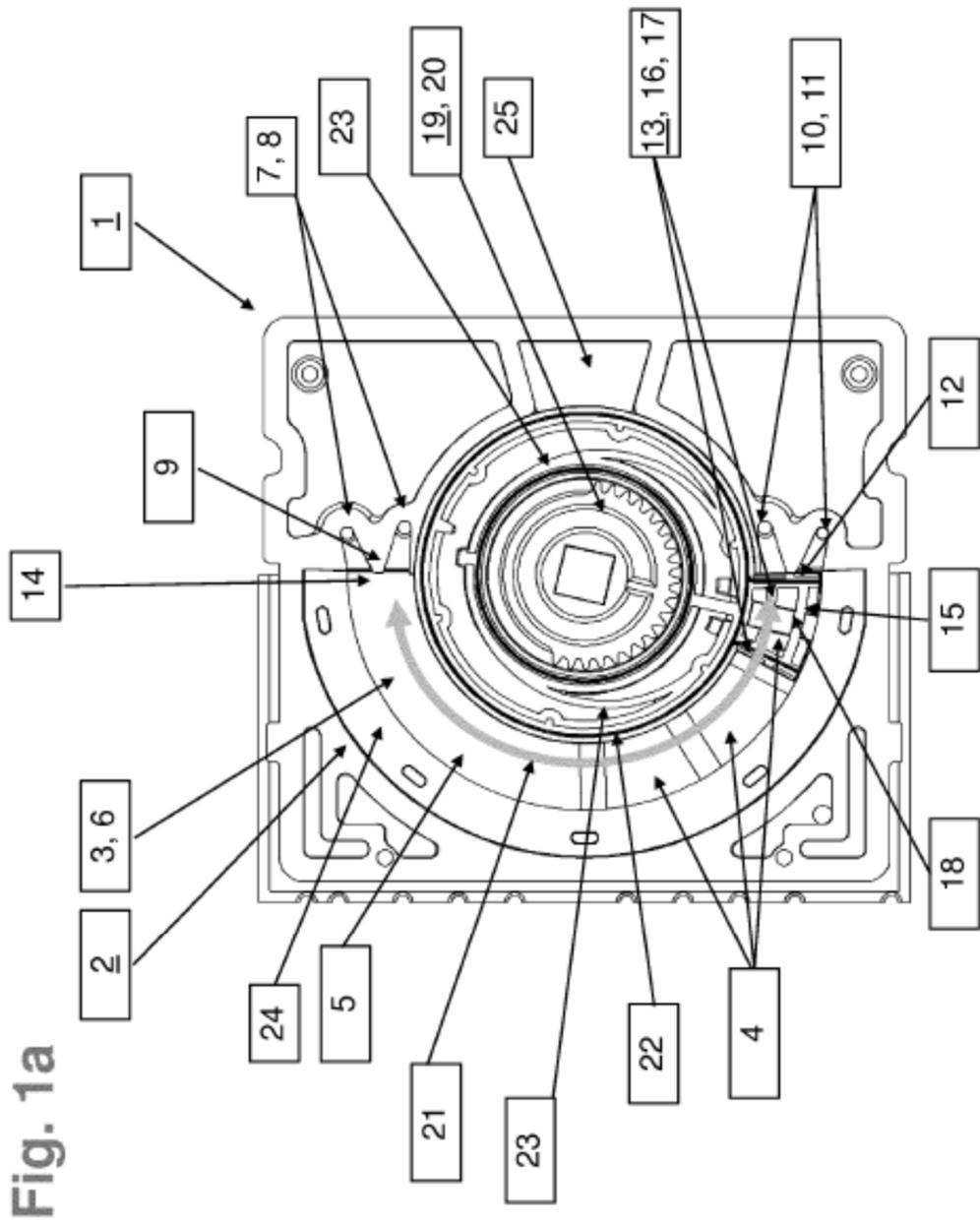
El miembro de base 30 comprende además una multitud de superficies conductoras 32 para proporcionar una conexión eléctrica a los electrodos dispuestos en la cámara. Las superficies conductoras 32 pueden comprender un polímero eléctricamente conductor, en particular un polímero dopado con material eléctricamente 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 (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 acoplados 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 acoplados 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).

Las Figuras 5a-c muestran detalles de tres realizaciones alternativas del dispositivo según las Figuras 3 y 4. Como se describe con referencia a las Figuras 3 y 4, el miembro de base 30 incluye las superficies conductoras 32 a las que están unidos los electrodos 4. En la realización mostrada en la Figura 5a, que ha sido realizada también en el dispositivo mostrado en las Figuras 3 y 4, la superficie conductora 32 comprende los orificios 36 que están al menos parcialmente llenos de un material eléctricamente conductor. Si el material conductor sobresale de un orificio 36 y forma una especie de abultamiento 37 en la superficie exterior 35 del miembro de base 30, la estabilidad de la conexión del electrodo 4 al miembro de base 30 aumenta de manera ventajosa. En las realizaciones mostradas en las Figuras 5b y 5c, las superficies conductoras 32 no comprenden orificios que están llenos de un material conductor, sino una superficie plana (Figura 5b) o un rebajo (Figura 5c) que comprende un material eléctricamente conductor. De esta manera, los electrodos 4 pueden estar unidos alternativamente a una superficie plana o a un rebajo del miembro de base 30.

REIVINDICACIONES

- 5 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 dos segmentos, comprendiendo cada segmento al menos un primer electrodo (4) y al menos un segundo electrodo (5), caracterizado por que el segundo electrodo (5) es un electrodo común de al menos dos segmentos y la cámara (6) comprende además rebajos (3) correspondientes de dos componentes que están unidos entre sí, formando los rebajos (3) alineados la cámara (6), en donde cada rebajo (3) está provisto de al menos un electrodo (4, 5).
- 10 2. Dispositivo según la reivindicación 1, en donde la cámara (6) comprende además al menos un miembro de base (2, 30) que está hecho sustancialmente al menos de un material aislante e incluye al menos una superficie a la que los electrodos (4, 5) están unidos, en donde dicha superficie comprende al menos una superficie conductora (32) diseñada para proporcionar una conexión eléctrica entre uno de los electrodos (4, 5) y al menos un punto de contacto eléctrico (33).
- 15 3. Dispositivo según la reivindicación 2, en donde la superficie conductora (32) es un hoyo u orificio que está al menos parcialmente sobremoldeado o relleno con un material eléctricamente conductor y que proporciona un camino eléctricamente conductor desde el electrodo (4, 5) hasta el punto de contacto (33).
4. Dispositivo según la reivindicación 3, en donde el electrodo (4, 5) y el material eléctricamente conductor están hechos del mismo material.
5. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el miembro de base (2, 30) es una Placa de Circuito Impreso (PCB).
- 20 6. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cámara (6) comprende al menos una capa de sellado (24) que se extiende al menos parcialmente a lo largo de un lado de la cámara (6), en donde la capa de sellado (24) comprende un material compresible.
7. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde cada segmento es direccionable eléctricamente de manera individual.
- 25 8. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde al menos algunos de los electrodos (4, 5) están segmentados.
9. Dispositivo según la reivindicación 8, en donde una mitad de los electrodos (4, 5) está segmentada, mientras que la otra mitad de los electrodos (4, 5) es un electrodo simple no segmentado.
- 30 10. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde los dos componentes son idénticos y los componentes idénticos son simétricos giratoriamente.
11. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además un elemento (13) de separación, que es movable dentro de la cámara (6) entre dos puntos terminales (14, 15).
12. Dispositivo según la reivindicación 11, en donde el elemento (13) de separación está fijado fuera de la cámara (6).
- 35 13. Dispositivo según la reivindicación 12, en donde el elemento (13) de separación está fijado en un lugar de estacionamiento (25).



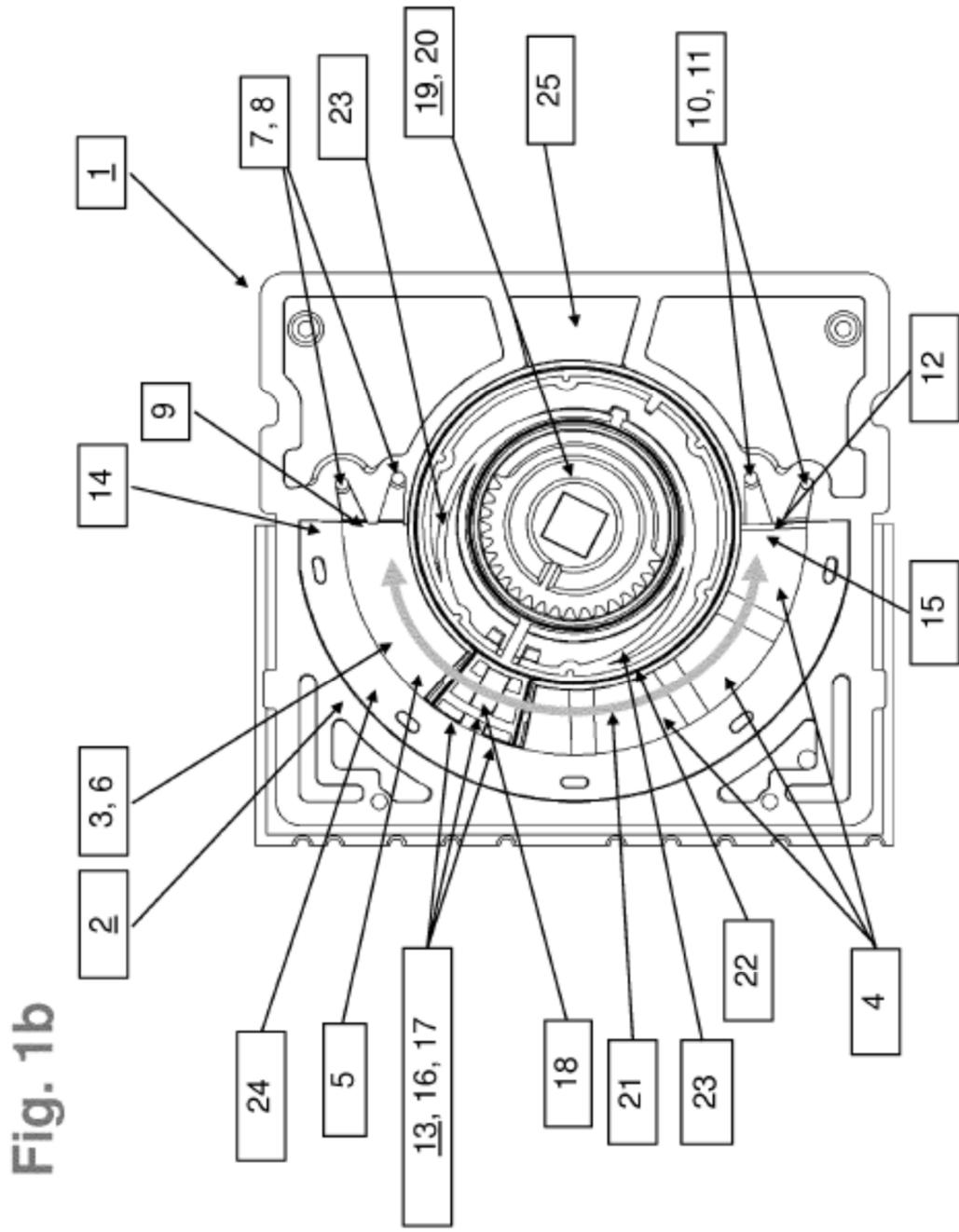


Fig. 1b

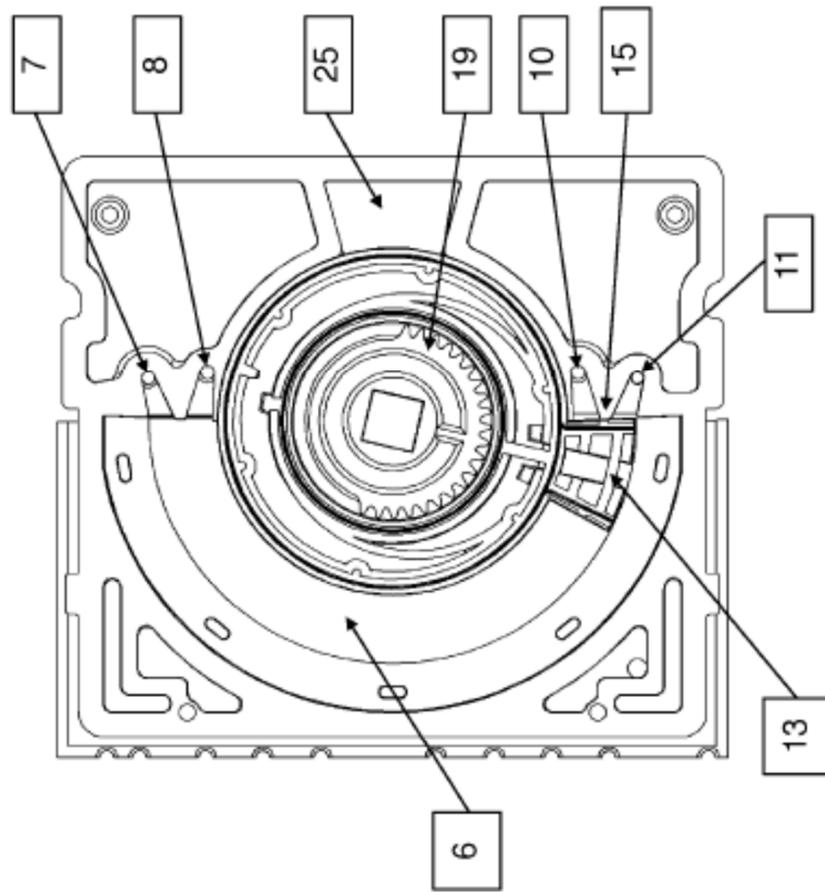


Fig. 2a

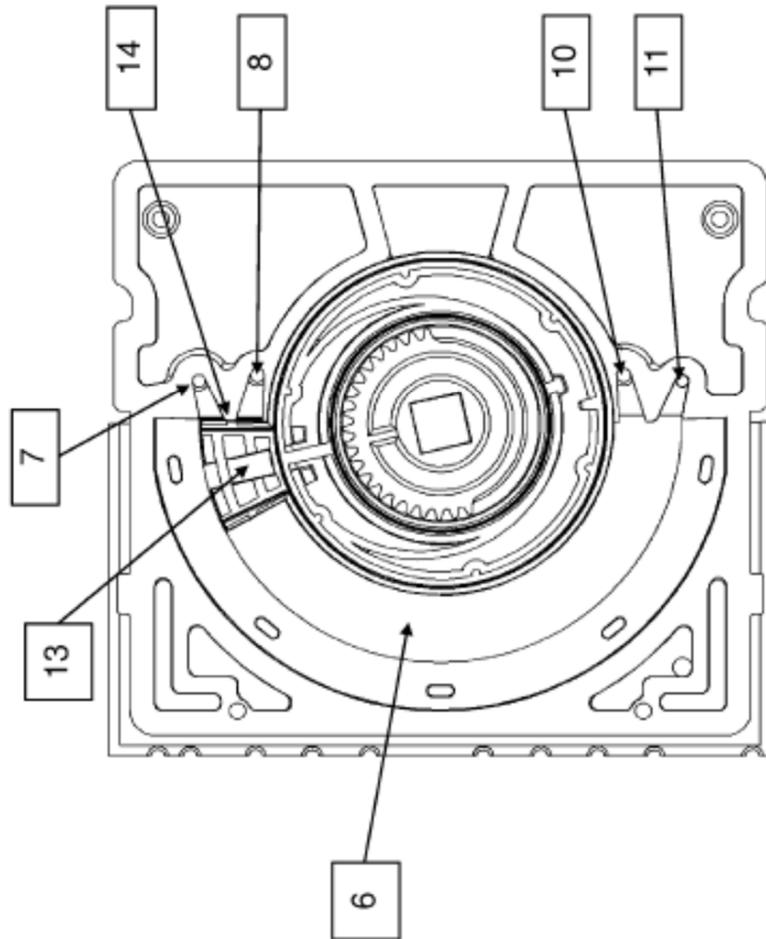


Fig. 2b

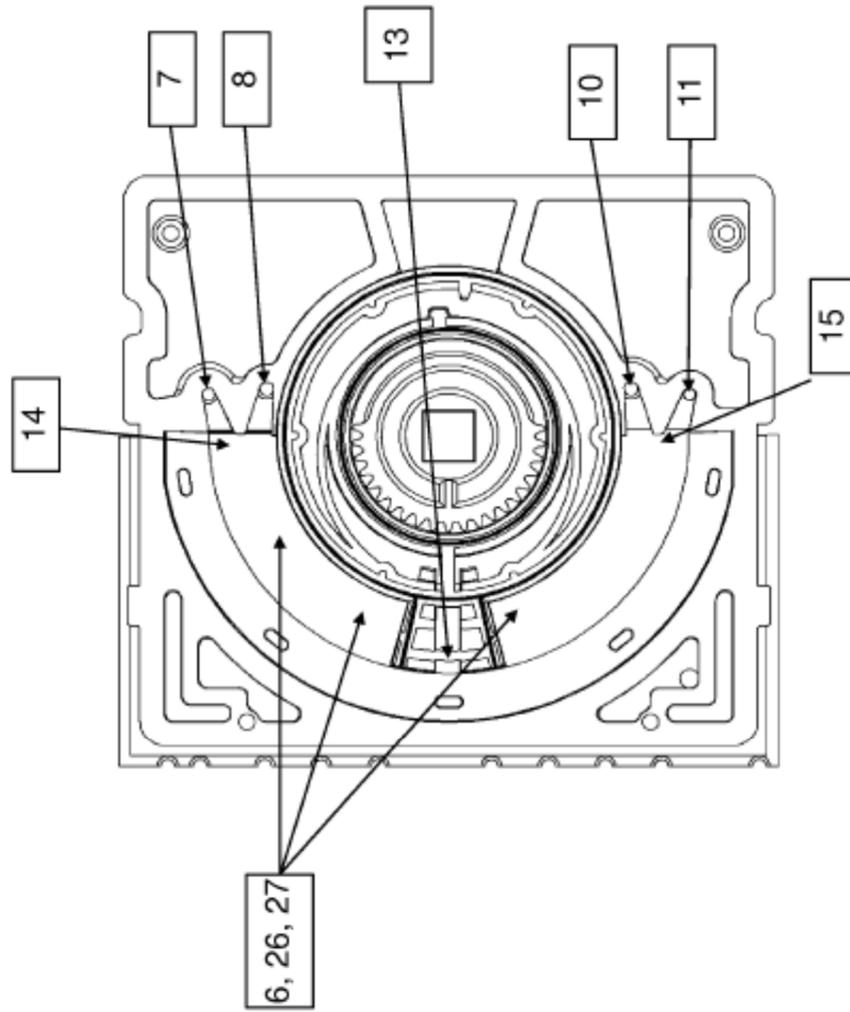


Fig. 2c

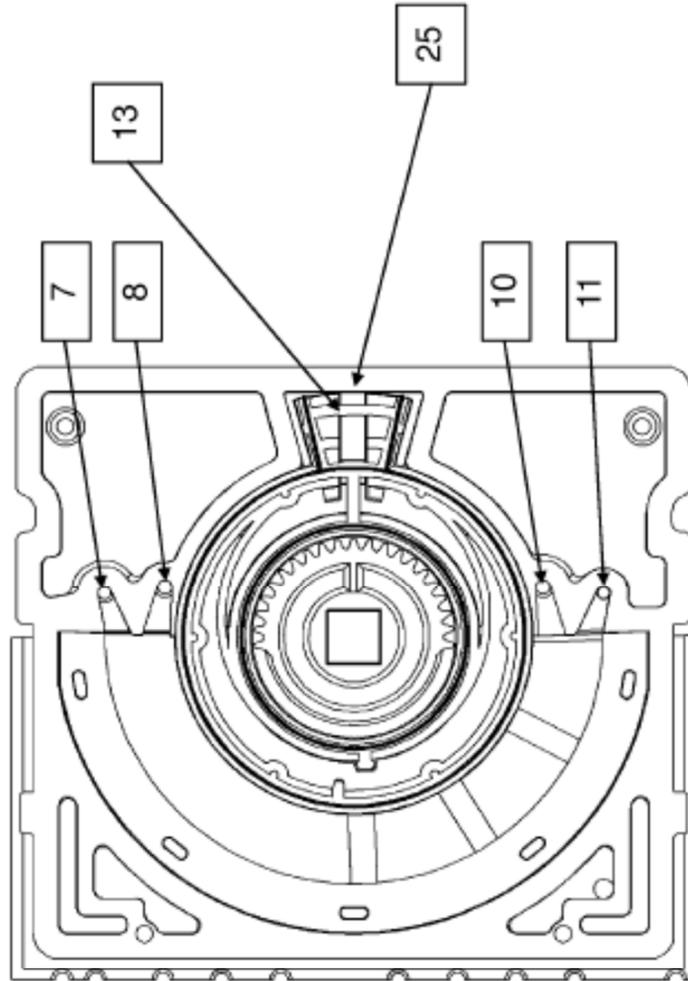
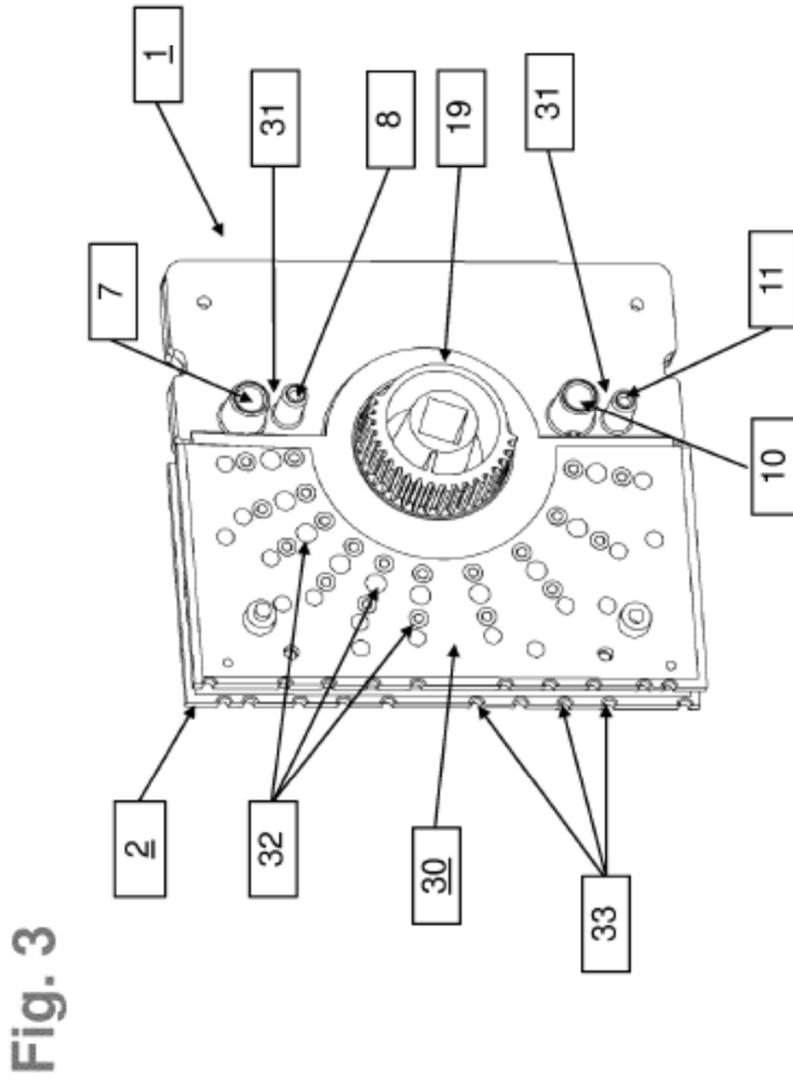


Fig. 2d



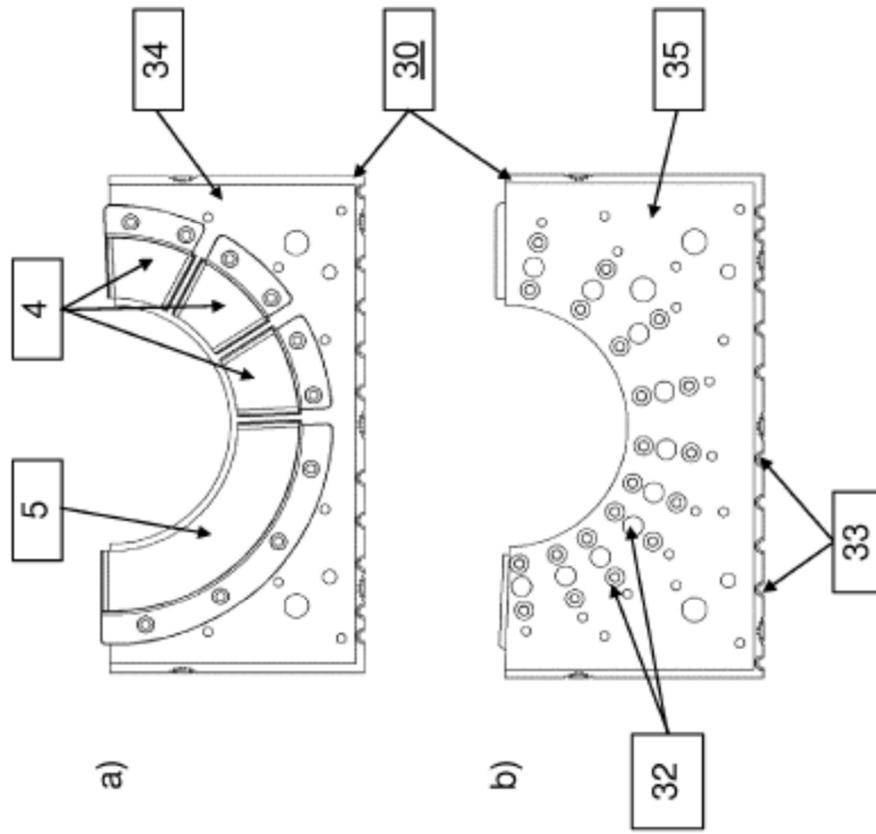


Fig. 4

Fig. 5

