

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 784**

51 Int. Cl.:

C12M 1/42 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010 E 10015997 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 2399985**

54 Título: **Método y conjunto de electrodo para tratar células adherentes**

30 Prioridad:

22.06.2010 EP 10006458

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

24.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KOBLIZEK, THOMAS;
HEINZE, ANDREAS;
GLEISSNER, TIMO y
MÜLLER-HARTMANN, HERBERT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 807 784 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

Método y conjunto de electrodo para tratar células adherentes

Antecedentes de la invención

5 La invención se refiere a un procedimiento para someter células adherentes que se adhieren al fondo de un espacio de reacción a por lo menos un campo eléctrico, en el que el campo eléctrico es generado por la aplicación de una tensión a por lo menos dos electrodos activos, estando previstos al menos tres electrodos, de los cuales al menos dos electrodos son electrodos activos cuando se aplica la tensión para la generación de un primer campo eléctrico, y en el que es generado al menos un segundo campo eléctrico. La invención se refiere además a un dispositivo que comprende al menos tres electrodos que están conectados a por lo menos una fuente de tensión a través de al menos un dispositivo de conmutación.

Estado de la técnica

15 El someter células vivas a un campo eléctrico o impulso de tensión, la llamada electroporación o electrotransfección, se emplea desde hace años en células en los más diferentes estados. Estas células se presentan como células individuales en suspensión en una solución tampón, en estado adherente en un recipiente de cultivo, casi siempre en el fondo de un recipiente de plástico y en vivo, donde las células están incrustadas, generalmente en una estructura tisular dentro de una matriz extracelular. Esencialmente, en la electroporación las moléculas extrañas de una solución tampón adaptada a las células o un medio de cultivo celular se introducen en las células mediante un flujo de corriente de corta duración, la membrana celular se hace permeable a las moléculas extrañas por la acción de los impulsos de tensión eléctrica o del campo eléctrico y el flujo de corriente así producidos. La suspensión celular se encuentra aquí frecuentemente en una llamada cubeta, es decir, en un recipiente estrecho abierto, cuyo espacio para las muestras presenta en las paredes laterales dos electrodos opuestos aproximadamente paralelos, que sirven para la aplicación de la tensión eléctrica. A través de los "poros" de la membrana celular producidos en breve tiempo, las moléculas biológicamente activas llegan en primer lugar al citoplasma, en el que eventualmente ya pueden ejercer su función a examinar, y a continuación, en determinadas condiciones, alcanzan también el núcleo de las células. Mediante la aplicación de corta duración de un fuerte campo eléctrico, es decir, de un impulso de tensión corto con alta densidad de corriente, se pueden además fusionar células, derivados celulares, partículas subcelulares y/o vesículas. En esta llamada electrofusión las células se ponen en estrecho contacto con la membrana, por ejemplo en primer lugar por medio de un campo eléctrico alterno no homogéneo. Por la aplicación subsiguiente de un impulso de campo eléctrico se produce entonces la interacción de partes de la membrana que conduce finalmente a la fusión. Para la electrofusión se pueden emplear aquí dispositivos de aparatos comparables a los de la electroporación. Además, las células vivas pueden ser estimuladas también por campos eléctricos de una manera que modifica sus propiedades.

20 Por el documento WO 2005/056788 A1 es conocido por ejemplo un procedimiento de electroporación en el que crecen células sobre una membrana microporosa que se encuentra entre dos superficies de electrodo dispuestas paralelas.

35 El documento US-A-5 134 070 describe aplicaciones y dispositivos para la electroporación de células que crecen sobre una superficie eléctricamente conductora que sirve como electrodo. El recipiente de cultivo es recubierto por arriba con un contraelectrodo en forma de placa, formándose un resquicio a través del cual son posibles descargas eléctricas.

40 Por el documento WO 2008/104086 A1 es conocido además un dispositivo en el que las células crecen sobre superficies de electrodo coplanarias. El contacto eléctrico entre los electrodos se produce a través del medio de cultivo celular dispuesto sobre las células, estando las dos zonas de electrodo separadas por una barrera aislante que, no obstante, permite un puente de electrolito entre los electrodos. Éstos pueden estar hechos, por ejemplo, de óxido de indio-estaño que como semiconductor transparente permite un análisis microscópico de las células.

45 Por el documento WO 2009/131972 A1 es conocido un dispositivo de electroporación de células que crecen de manera adherente sobre una placa redonda con forma de disco. El dispositivo presenta dos electrodos dispuestos paralelos entre sí, encontrándose un electrodo sobre la superficie cóncava de un cilindro exterior y el otro electrodo se encuentra sobre la superficie convexa de un cilindro interior.

50 Por el documento US 2009/0305380 A1 es conocido además un dispositivo para electroporación de células que están inmovilizadas sobre una superficie fija. El campo eléctrico al que se somete a las células es generado por una disposición de pares de electrodos, que situados uno junto a otro muy cerca, se encuentran sobre una superficie dispuesta por encima de la superficie fija. Los electrodos están formados por trazas eléctricas que están aplicadas como un chapado sobre la superficie. Los dos electrodos de un par de electrodos están dispuestos aquí tan juntos uno a otro que no puede encontrarse más de una célula dentro de la distancia mas pequeña entre los dos electrodos.

55 Lin et al. (LAB CHIP, Bd. 4, 31-12-2004, 104-108) describen un procedimiento y un microchip para electroporación de células adherentes. El microchip presenta una pluralidad de microelectrodos entrelazados y se puede conectar a una fuente de tensión. Los microelectrodos que son cubiertos por las células pueden ser divididos en dos grupos (ánodos y cátodos), estando dispuesto adicionalmente otro electrodo (cátodo) por encima del microchip. En primer lugar se genera un campo eléctrico entre el otro electrodo y algunos microelectrodos para conseguir un enriquecimiento de plásmidos en la zona de las células. Después se realiza la electroporación propiamente dicha en la zona de las células

por generación de un campo eléctrico entre los microelectrodos.

El documento WO 2010/117806 A1 da a conocer un procedimiento para el tratamiento de lesiones dentro de un cuerpo humano, en el que son generados impulsos de tensión en la zona de una lesión para eliminar esta mediante electroporación irreversible. Para este fin los electrodos en forma de sondas son introducidos en el cuerpo del paciente bajo control visual y en particular en la proximidad inmediata de la lesión. Asimismo, los electrodos individuales que están conectados por separado a un generador son controlados de forma individual en cada caso.

Por el documento WO2009/140161 A1 es conocido además un dispositivo para electroporación de células adherentes que comprende una disposición de electrodos dispuestos uno junto a otro muy cerca. Los electrodos están así conectados, respectivamente, alternando al polo positivo y al polo negativo de una fuente de tensión.

La empresa BTX comercializa con el PetriPulser® una disposición de placas de electrodo planoparalelas de polaridades alternas que pueden ser aplicadas perpendicularmente sobre células que crecen de forma adherente en un recipiente de cultivo. Los electrodos se sumergen aquí en el sobrante del cultivo, llenándose con el medio de cultivo los espacios intermedios entre las distintas placas de electrodo. Un inconveniente esencial de esta disposición reside en que la mayor parte de la corriente escapa por el medio de cultivo exento de células que se encuentra sobre las células. Sin embargo, el campo es operativo solamente en el campo de borde del fondo del recipiente en donde se encuentra las células, de modo que se tienen que aportar corrientes innecesariamente altas. Asimismo, se tiene que partir de una alta mortalidad de las células debido a variaciones del valor del pH y a la alta corriente. Además, se tiene que diseñar muy grande el suministro de tensión para impulsos de tensión de larga duración a fin de aportar estas grandes corrientes y por tanto estas grandes cantidades de carga y potencias. Por otro lado se tiene que aplicar un volumen grande que sea adecuado para la electroporación y que contenga el sustrato a transfeccionar en concentración suficientemente alta, con lo que también la cantidad de sustrato es correspondientemente más alta. Otro inconveniente esencial de este dispositivo conocido consiste en que el campo eléctrico es mínimo en la zona ortogonal por debajo de las puntas de electrodo libres. Esto conduce a que las células que se encuentran en esta zona prácticamente no sean transfectadas o fusionadas, de manera que la eficiencia de los procedimientos realizados con este dispositivo conocido en conjunto es baja.

Descripción de la invención.

La invención tiene por objeto proporcionar un procedimiento y un dispositivo que permitan un tratamiento eficiente y uniforme de células adherentes con un campo eléctrico.

El objeto se consigue según la invención mediante un procedimiento del tipo mencionado al principio, en el que cuando se aplica la tensión para la generación del segundo campo eléctrico al menos uno de los dos electrodos anteriormente activos es un electrodo sin potencial, siendo generados tantos campos eléctricos como sea preciso para que todos los electrodos activos durante la generación del primer campo eléctrico sean, respectivamente, por lo menos una vez electrodos sin potencial durante la generación de los otros campos eléctricos. Si, por ejemplo, cuando las células son sometidas a un impulso de tensión un primer electrodo es activo, es decir un polo positivo o negativo, entonces el campo eléctrico por debajo de este electrodo es mínimo, de modo que las células que se encuentran ortogonalmente por debajo de este electrodo no reciben un tratamiento eléctrico suficiente. Según la invención es generado entonces un segundo campo eléctrico, de modo que el primer electrodo mencionado ahora está sin potencial (pasivo), es decir, el campo eléctrico es generado por la aplicación de una tensión a por lo menos otros dos electrodos. De este modo se consigue que ahora durante el segundo impulso de tensión, incluso la zona por debajo del primer electrodo mencionado sea sometida al campo eléctrico. En consecuencia, por el procedimiento según la invención se garantiza que incluso las células que no estuvieron expuestas a un campo eléctrico durante el primer impulso de tensión sean igualmente tratadas eléctricamente de un modo suficiente. Con la ayuda del procedimiento según la invención, el número de zonas dentro de las cuales el campo eléctrico es bajo se puede minimizar de manera efectiva, de modo que la eficiencia del procedimiento respectivo, por ejemplo de una electrotransfección o electrofusión, puede ser optimizada. Por tanto, el procedimiento según la invención es adecuado ventajosamente para garantizar un tratamiento eficiente y uniforme de células adherentes con un campo eléctrico. Puesto que todos los electrodos activos durante la generación del primer campo eléctrico son, respectivamente, al menos una vez electrodos sin potencial mientras se generan los otros campos eléctricos, se asegura que por debajo de los electrodos no existan ya zonas que no hayan sido sometidas a un campo eléctrico. En consecuencia, en este caso óptimo, todas las células son tratadas uniformemente con un campo eléctrico, de modo que se puede garantizar una eficiencia máxima para el procedimiento respectivo, por ejemplo una electrotransfección o electrofusión.

En una realización ventajosa de la invención está previsto que cada campo eléctrico sea generado por al menos un impulso de tensión, preferiblemente al menos dos impulsos de tensión. Según la invención, cada uno de los campos eléctricos puede generarse mediante un impulso de tensión individual o al menos dos o más impulsos de tensión (parciales) que se suceden al poco tiempo o enlazan entre sí. Los impulsos parciales se pueden generar mediante la descarga de uno o varios acumuladores de carga, preferiblemente de un condensador o al menos dos condensadores. Preferiblemente cada impulso de tensión que genera un campo eléctrico es un impulso doble, que se compone de un impulso corto de alta tensión y un impulso más largo con una tensión relativamente menor. Tal impulso doble puede generarse, por ejemplo, mediante la descarga de dos condensadores que se suceden en tiempo corto, pudiendo los dos impulsos parciales enlazar entre sí sin interrupción. Por ejemplo, un primer dispositivo de

acumulación de carga puede tener una capacidad de al menos 10 μF , preferiblemente de al menos 50 μF , en particular de al menos 100 μF , y/o descargarse con una tensión inicial de 10 a 1500 V, preferiblemente de 20 a 1200 V, en particular de 50 a 1000 V, con una duración de impulso de 2 μs a 40 ms, preferiblemente de 5 μs a 20 ms, en particular de 10 μs a 10 ms. Poco antes, simultáneamente o poco después del final de la descarga del primer dispositivo de

5 acumulación de carga, puede descargarse un segundo dispositivo de acumulación de carga, que puede presentar por ejemplo una capacidad de al menos 100 μF , preferiblemente de al menos 500 μF , en particular de al menos 1000 μF con una tensión inicial de por ejemplo 10 a 240 V, preferiblemente de 20 a 200 V, en particular de 50 a 150 V, con una duración de impulso de por ejemplo 1 ms a 500 ms, preferiblemente de 2 ms a 350 ms, en particular de 4 ms a 250 ms.

Simultánea o alternativamente, los al menos dos campos eléctricos pueden generarse, respectivamente, por al menos un impulso de tensión, siendo el intervalo de tiempo entre los impulsos de tensión de al menos 500 ms, preferiblemente de al menos 1 s, en particular de 1 a 10 s. El intervalo de tiempo entre los impulsos de tensión (no impulsos parciales), que generan, respectivamente, un campo eléctrico en el sentido de la invención, debe ser de forma sorprendente relativamente grande para que la tasa de supervivencia de las células permanezca estable y/o se pueda garantizar una alta eficiencia del procedimiento. Como se describió anteriormente, cada impulso de tensión individual también

10 puede estar compuesto de varios impulsos parciales, esto es, de al menos dos impulsos parciales.

En otra realización ventajosa de la invención está previsto que se proporcionen varios espacios de reacción, en cada uno de los cuales son aplicados campos eléctricos a células adherentes, aprovechándose el intervalo de tiempo entre dos impulsos de tensión para la generación de dos campos eléctricos en un espacio de reacción para generar al menos un campo eléctrico en al menos otro espacio de reacción. Esta realización de la invención es particularmente

20 ventajosa cuando tienen que tratarse muchas muestras en un tiempo muy corto, en particular en procedimientos de alto rendimiento. Como ya se describió anteriormente, los impulsos de tensión individuales para la generación de los campos eléctricos en los respectivos espacios de reacción pueden tener un intervalo de tiempo relativamente grande entre sí. En caso de tratamiento de muchas muestras, esto conduciría a una duración de proceso muy larga. Según la invención, por tanto, los impulsos de tensión individuales son generados preferiblemente de manera intercalada con respecto a los diferentes espacios de reacción a tratar, de modo que el tiempo de espera entre la generación de dos campos eléctricos en un espacio de reacción se puede aprovechar para generar al menos un campo eléctrico en al menos otro espacio de reacción. De esta manera, toda la duración del proceso, por ejemplo en el caso del tratamiento de todos los espacios de reacción de una placa de cultivo celular de "24 pocillos", se puede reducir significativamente. Además, por esta forma de proceder disminuye el peligro de que resulten desviaciones entre las muestras en los diferentes espacios de reacción debido a diferentes tiempos de incubación antes y/o después del tratamiento. Si por ejemplo las células en los espacios de reacción individuales de una placa de "24 pocillos" fueran tratados sucesivamente durante un período de tiempo largo, entonces las muestras en los primeros espacios de reacción pasarían un tiempo de incubación relativamente largo después del tratamiento, mientras que las muestras tratadas en último lugar deberían pasar un tiempo de incubación más largo antes del tratamiento. Esto puede afectar a la eficiencia del tratamiento en los espacios de reacción individuales y, en última instancia, conducir a resultados diferentes para las muestras individuales. Los tratamientos intercalados de los diferentes espacios de reacción conducen, por el contrario, a resultados o eficiencias más uniformes, y por tanto mejor reproducibles debido a la minimización de tiempos de incubación diferentes.

25

30

35

En una realización particularmente ventajosa de la invención está previsto además que los electrodos y las células adherentes estén distanciados entre sí y que la distancia entre las células y los electrodos se ajuste a un valor determinado empíricamente. En este caso la distancia se ajusta preferiblemente de modo que la intensidad del campo eléctrico entre los electrodos activos y por debajo de los electrodos sin potencial se optimice en cada caso. Se pudo mostrar que la densidad de las líneas de campo disminuye al aumentar la distancia, de modo que el campo eléctrico efectivo en la superficie inferior del recipiente se hace más pequeño al aumentar la distancia. En principio, este efecto podría compensarse aumentando la tensión aplicada, es decir, aumentando la densidad de corriente. Sin embargo, esto aumentaría el despliegue técnico y el riesgo de descargas de rayos. Distancias demasiado pequeñas tampoco tienen sentido puesto que entonces incluso leves irregularidades de la superficie inferior conducirían a una falta de homogeneidad del campo eléctrico y, por tanto, a resultados no reproducibles. En este contexto también debe tenerse en cuenta que la intensidad de campo entre los electrodos activos disminuye al aumentar la distancia, mientras que la intensidad de campo por debajo de los electrodos sin potencial alcanza un valor máximo a una distancia media, es decir, a partir de este valor máximo, disminuye al aumentar o disminuir las distancias. Por tanto, la distancia entre los electrodos y las células debe ajustarse en función de las condiciones de reacción, de manera que la intensidad de campo por debajo de los electrodos sin potencial se acerque lo más posible al valor máximo y al mismo tiempo alcance el valor más alto posible entre los electrodos activos. Esta distancia óptima debe determinarse empíricamente para las diferentes condiciones, como por ejemplo la geometría del espacio de reacción, el tipo de la solución tampón utilizada, la forma y el tamaño de los electrodos y los parámetros eléctricos.

40

45

50

55

El objeto se consigue según la invención además por un dispositivo del tipo mencionado al principio, en particular un dispositivo para la realización del procedimiento según la invención, en el que al menos cinco electrodos están conectados a la por lo menos una fuente de tensión a través de cuatro dispositivos de conmutación, estando al menos dos electrodos conectados a la fuente de tensión a través de un dispositivo de conmutación común y en el que están previstos dos grupos de electrodos con, respectivamente, al menos dos electrodos, que están unidos a la fuente de tensión, respectivamente, a través de dos dispositivos de conmutación comunes. Debido a esta configuración

60

particularmente ventajosa, todos los electrodos pueden ser conmutados a activos o pasivos (sin potencial). En el dispositivo según la invención, por la agrupación de electrodos y la limitación del número de dispositivos de conmutación se minimiza el despliegue de aparatos y de construcción, de modo que se proporciona un dispositivo barato y que es menos susceptible a fallas. En conexión con el procedimiento descrito anteriormente, el dispositivo según la invención posibilita un tratamiento eficiente y uniforme de células adherentes con un campo eléctrico, pudiendo realizarse la conmutación entre electrodos activos y sin potencial con un número reducido de dispositivos de conmutación de forma rápida y segura. Dado que están previstos dos grupos de electrodos que están unidos a la fuente de tensión, respectivamente, a través de dos dispositivos de conmutación comunes, se puede controlar un número relativamente grande de electrodos mediante únicamente cuatro dispositivos de conmutación, es decir ambos grupos de electrodos pueden ser conmutados en cada caso a activo o pasivo (sin potencial).

Cada grupo comprende preferiblemente al menos tres electrodos, de forma particularmente preferida al menos cuatro electrodos. En una realización ventajosa de la invención puede estar previsto un total de al menos siete, preferiblemente de 9-21, electrodos. Por ejemplo, se podría usar una configuración de acuerdo con la invención en la que un primer grupo comprenda 8 electrodos y el segundo grupo comprenda 9 electrodos.

En una realización ventajosa del dispositivo según la invención está previsto que los electrodos estén diseñados para su inserción en al menos un espacio de reacción, es decir, los electrodos pueden por ejemplo estar dispuestos y contruidos como una unidad, de tal manera que se introduzcan en un recipiente de cultivo celular por arriba y eventualmente puedan sumergirse en el medio de cultivo celular que se encuentra en su interior. Los electrodos se pueden disponer entonces ventajosamente por encima de las células que se adhieren al fondo del espacio de reacción. Preferiblemente, el espacio de reacción es aquí parte de una placa multipocillo, de modo que con el dispositivo según la invención se puede tratar una pluralidad de muestras en condiciones comparables.

En cuanto a los dispositivos de conmutación se puede tratar por ejemplo de semiconductores de potencia, preferiblemente IGBT o MOSFET, o dispositivos electromecánicos, preferiblemente relés.

La invención comprende también el uso del dispositivo según la invención para someter células adherentes a por lo menos un campo eléctrico, en particular para electroporación o electrofusión de células adherentes.

La invención se explica con más detalle a continuación a modo de ejemplo con referencia a las figuras.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una vista lateral esquemática de una disposición de electrodos de un ejemplo de dispositivo según la invención con tres electrodos.

La figura 2 muestra una vista lateral esquemática de una disposición de electrodos alternativa de un ejemplo de dispositivo según la invención con cuatro electrodos.

La figura 3 muestra una vista en perspectiva del lado inferior de un ejemplo de forma de realización de una disposición de electrodos a modo de ejemplo para un dispositivo según la invención.

La figura 4 muestra otra vista en perspectiva de la disposición de electrodos de acuerdo con la figura 3, siendo visibles en esta representación las partes interiores de los electrodos y los elementos de contacto.

La figura 5 muestra una vista en perspectiva del lado superior de la disposición de electrodos según la figura 3.

La figura 6 muestra un corte longitudinal a través de la disposición de electrodos según las figuras 3 a 5.

La figura 7 muestra en un diagrama de barras la dependencia de la eficiencia de transfección respecto de la distancia de los electrodos de una disposición de electrodos según la invención a las células que se adhieren a la superficie de cultivo en el caso de tres impulsos de tensión de diferente intensidad (eje x: distancia [mm], eje y: eficiencia de transfección [%], A-5 = impulso de tensión débil, K-19 = impulso de tensión de intensidad media, AX-19 = impulso de tensión fuerte).

La figura 8 muestra un diagrama de la intensidad relativa del campo eléctrico en función de la distancia de los electrodos respecto al fondo del recipiente, con referencia a la intensidad de campo a una distancia de 500 µm (eje x: distancia [µm], eje y: eficiencia de transfección relativa [%]). Aquí está representada la intensidad de campo relativa entre los electrodos activos (diamantes grises) y la intensidad de campo relativa por debajo de los electrodos sin potencial (pasivos) (cuadrados negros).

La figura 9 muestra simulaciones de los campos eléctricos en un recipiente de cultivo celular en el caso de exclusivamente electrodos activos (A), así como en el caso de electrodos activos y sin potencial (B).

La figura 10 muestra imágenes microscópicas por fluorescencia de células que han sido transfectadas con un plásmido (electroporación con Nucleofector®, Lonza), que codifica para la proteína fluorescente MAXGFP® (Lonza). Arriba: A) todos los electrodos son activos durante la electrotransfección. Centro: B) las mismas condiciones que arriba, pero solo la mitad de los electrodos estaban activos durante la transfección, la otra mitad estaba sin potencial. Debajo: C)

las mismas células fueron nuevamente sometidas a un segundo campo eléctrico (impulso de tensión), sin embargo, los electrodos activos y pasivos se intercambiaron durante el segundo impulso, es decir, todos los electrodos activos durante el primer impulso estaban sin potencial durante el segundo impulso, mientras que los electrodos anteriormente pasivos estaban activos durante el segundo impulso.

- 5 La figura 11 muestra imágenes microscópicas por fluorescencia de células que fueron transfectadas con un plásmido que codifica para la proteína fluorescente MAXGFP® (Lonza), de acuerdo con el procedimiento según la invención (electroporación con Nucleofector®, Lonza). Arriba: A) distancia entre dos impulsos de tensión < 0,5 s. Debajo: B) distancia entre dos impulsos de tensión 2,0 s.

- 10 La figura 12 muestra representaciones esquemáticas del circuito eléctrico de una disposición de electrodos con 17 electrodos, de modo que en la representación (B) mostrada a la derecha los electrodos activos en la representación (A) ilustrada a la izquierda están sin potencial (pasivos). Electrodos incoloros: sin potencial (pasivos). Electrodos discontinuos: activos (alta tensión). Electrodos negros: activos (masa).

- 15 La figura 13 muestra una representación esquemática de la conexión eléctrica de los electrodos de un ejemplo de dispositivo según la invención con cuatro dispositivos de conmutación. Electrodos incoloros: sin potencial (pasivos). Electrodos discontinuos: activos (alta tensión). Electrodos negros: activos (masa).

La figura 14 muestra en una vista en planta desde arriba representaciones esquemáticas de disposiciones de electrodos con puntos de contacto. Las disposiciones de electrodos presentan diferentes dimensiones para las placas de cultivo celular con 3 espacios de reacción grandes (formato "6-pocillos") y 12 espacios de reacción pequeños (formato "24-pocillos").

- 20 La figura 15 muestra en una vista en planta desde arriba representaciones esquemáticas de disposiciones de electrodos con puntos de contacto. Los números del 1 al 17 por debajo de las disposiciones de electrodos indican, respectivamente, las líneas de la retícula de electrodos dentro de la cual se encuentra cada uno de los electrodos. A) Una disposición a modo de ejemplo y preferida de los puntos de contacto para disposiciones de electrodos con diferentes dimensiones para placas de cultivo celular con al menos un espacio de reacción grande y al menos cuatro espacios de reacción pequeños. B) Otra disposición a modo de ejemplo y preferida de los puntos de contacto para disposiciones de electrodos con diferentes dimensiones para placas de cultivo celular con al menos un espacio de reacción grande y al menos cuatro espacios de reacción pequeños, en la que la disposición de los puntos de contacto o elementos de contacto está optimizada en cuanto al proceso de fabricación.

- 30 La figura 16 muestra en una vista en planta desde arriba una representación esquemática de otra disposición a modo de ejemplo y preferida de los puntos de contacto para disposiciones de electrodos con diferentes dimensiones para placas de cultivo celular con 3 espacios de reacción grandes (formato "6-pocillos") y 12 espacios de reacción pequeños (formato "24-pocillos"), en la que los elementos de contacto pueden girar alrededor de un eje.

Descripción de formas de realizaciones a modo de ejemplo y preferidas

- 35 La figura 1 muestra una disposición de electrodos 1 según la invención que comprende tres electrodos 2, 3, 4 dispuestos planoparalelos, que sobresalen en el interior 6 de un recipiente 7. El recipiente 7 comprende una superficie inferior 8, sobre la cual pueden adherirse y crecer células vivas (células adherentes). El espacio interior 6 está generalmente lleno de un líquido, por ejemplo un medio de cultivo celular u otra solución adaptada a las células. El espacio entre los electrodos 2, 3, 4 está completamente lleno de un material aislante eléctrico 5, de modo que cuando se aplica una tensión a los electrodos 2, 3, 4, no puede fluir corriente a través del espacio situado entre los electrodos 2, 3, 4. En la disposición de electrodos 1 según la invención, toda la corriente fluye a través del espacio entre los electrodos 2, 3, 4 y la superficie inferior 8, de modo que cuando se usa una fuente de tensión no permanente (por ejemplo, un condensador) la tensión disminuye más lentamente y, por tanto, la intensidad de campo para el tratamiento de las células es mas alta a lo largo del tiempo. Así, por un lado el dispositivo para la generación de impulsos se puede dimensionar con ahorro y, por otro lado, se pueden evitar cambios fuertes del valor de pH en el líquido, que si no se generarían por las grandes cantidades de carga que fluyen debido a la electrólisis.

- 45 En el ejemplo de realización representado aquí los electrodos planoparalelos 2, 3, 4 están separados por material aislante 5, de modo que las superficies conductoras de los electrodos 2, 3, 4 solo están expuestas (en la dirección de la superficie inferior 8 o de las células que se adhieren a ella) y en contacto eléctrico con el medio ambiente por debajo. Debido a la extensión completa del material aislante 5 en la zona entre las superficies 9 opuestas de los electrodos 2, 3, 4 planoparalelos respectivas, o al menos en la zona entre los electrodos que está abierta al líquido, en la que estos describen líneas paralelas, el campo eléctrico se puede focalizar o la corriente puede limitarse al rango del efecto deseado. Además es particularmente ventajoso que sea posible una focalización del campo eléctrico en la zona de las células a las que se dirige o una limitación de la corriente eléctrica al rango efectivo, incluso cuando se usan electrodos planoparalelos 2, 3, 4, lo que permite intensidades de campo y densidades de corriente constantes y estables a través del tiempo en la zona a la que se dirige entre los electrodos 2, 3, 4 y la superficie inferior 8. Materiales aislantes adecuados para ello son, por ejemplo, láminas o cuerpos moldeados por inyección hechos de plásticos comunes, preferiblemente termoplásticos, tales como por ejemplo: cloruro de polivinilo, poliestireno, polipropileno, polietileno o policarbonato. Por la construcción según la invención se puede evitar el flujo de salida de corriente sobre

las superficies opuestas 9 respectivas de las porciones planoparalelas de los electrodos 2, 3, 4 y por tanto se pueden generar impulsos de tensión con un menor nivel de corriente descendente. Por tanto, una disposición según la invención puede ser alimentada con una o varias descargas de impulsos sucesivas de menor energía/corriente por ejemplo por reacción, dependiendo de la superficie del fondo de cultivo con las células a tratar, para limitar las potencias necesarias por descarga.

Por ejemplo se puede usar un emparedado de electrodo-aislante en el que los electrodos tienen polaridades alternas. En caso de tal disposición, el campo es prácticamente inexistente en las zonas ortogonales por debajo de los electrodos activos y por tanto no es efectivo en las células que se encuentran allí, que se sitúan por debajo de los electrodos activos. Estas zonas se encuentran en las inmediaciones de un conductor eléctrico (el electrodo) y, por tanto, fuera de un campo significativo. Las zonas activas, es decir las zonas con un campo eléctrico suficiente, son solo las zonas entre electrodos con polaridad opuesta. Para minimizar las zonas por debajo de los electrodos que no son sometidas a un campo eléctrico, los electrodos pueden, por ejemplo, estar realizados tan delgados como sea posible (por ejemplo, 50 μm), de modo que zonas más grandes de la superficie inferior donde han crecido las células estén cubiertas por la disposición de electrodos con zonas activas hechas de combinaciones de electrodo-aislante. Sin embargo, en muchos casos reducir el grosor del electrodo no tiene sentido ni es técnicamente factible, de modo que el efecto de tal medida es limitado.

Según la invención, por tanto, después del primer impulso de tensión es generado al menos un campo eléctrico adicional en el espacio entre los electrodos 2, 3, 4 y la superficie inferior 8 por medio de al menos otro impulso de tensión. Según la invención, al menos uno de los electrodos activos anteriormente está sin potencial, de modo que el campo eléctrico adicional o secundario puede actuar también sobre las células en la zona por debajo del electrodo ahora pasivo. Si en el ejemplo de realización representado en la figura 1 por ejemplo el electrodo central 3 hubiese estado activo durante el primer impulso de tensión, es decir, conectado a tensión (+) o a masa (-), entonces este electrodo 3 podría permanecer sin potencial (pasivo) durante el segundo impulso de tensión, de modo que entonces también la zona por debajo del electrodo 3, que se sitúa simultáneamente entre los electrodos 2 y 4 activos durante el segundo impulso de tensión, puede ser sometida a un campo eléctrico suficiente. De esta manera la superficie inferior 8 puede cubrirse de manera más uniforme y, por tanto, un mayor número de células puede ser tratado eléctricamente con eficacia.

La figura 2 muestra una disposición de electrodos 10 alternativa de un ejemplo de dispositivo según la invención con cuatro electrodos 11, 12, 13, 14. La disposición de electrodos 10 corresponde esencialmente a la disposición de electrodos 1 según la figura 1, con la diferencia de que esta comprende estos cuatro electrodos 11, 12, 13, 14 dispuestos planoparalelos y que sobresalen en el espacio interior 16 de un recipiente 17. El recipiente 17 comprende igualmente una superficie inferior 18 sobre la cual las células vivas pueden adherirse y crecer (células adherentes). En cada caso el espacio entre los electrodos 11, 12, 13, 14 también está completamente lleno de un material eléctrico aislante 15, de modo que cuando se aplica una tensión a los electrodos 11, 12, 13, 14, no puede fluir corriente a través del espacio situado entre los electrodos 11, 12, 13, 14. De acuerdo con la invención, los electrodos 11, 12, 13, 14 pueden ser controlados por ejemplo de tal manera que durante un primer impulso de tensión los electrodos 11 y 13 sean activos, mientras que los electrodos 12 y 14 estén sin potencial. Durante el impulso de tensión subsiguiente los electrodos 11 y 13 anteriormente activos están sin potencial, mientras que los electrodos 12 y 14 son activos. De esta manera ventajosa se aplica un campo eléctrico suficiente a toda la zona entre los electrodos 11 y 14 situados por fuera, en particular en cada caso también a la zona por debajo de los electrodos 12 y 13 situados por dentro. Por tanto, toda la superficie inferior 18 o las células que se adhieren a ella son tratadas eléctricamente de manera uniforme (véanse también las figuras 10 y 11).

La figura 3 muestra una vista en perspectiva del lado inferior de un ejemplo de forma de realización de una disposición de electrodos 20 de un dispositivo según la invención. La disposición de electrodos 20 comprende siete electrodos 21, que se describen con más detalle a continuación con referencia a las figuras 5 y 7. Los electrodos 21 están dispuestos en un soporte 22 que está realizado esencialmente con forma cilíndrica. El soporte 22 comprende un cuerpo de base 23 y una zona de borde 24 dispuesta en el extremo superior del cuerpo de base 23, siendo el diámetro exterior de la zona de borde 24 mayor que el diámetro exterior del cuerpo de base 23, de modo que la zona de borde 24 sobresale hacia fuera más allá del cuerpo de base 23. Los electrodos 21 están dispuestos en su mayor parte dentro del cuerpo base 23 y están expuestos con su superficie frontal inferior 33 en el lado inferior 25 del soporte 22, de modo que están en contacto con el entorno. Los electrodos individuales 21 están separados eléctricamente entre sí por un material aislante 26, llenando el material aislante 26 completamente el espacio entre los distintos electrodos 21 en este ejemplo de realización. El material aislante 26 entre las respectivas superficies opuestas de los electrodos 21 garantiza que no pueda fluir corriente a través del espacio entre los electrodos 21 cuando se aplica una tensión a los electrodos si los electrodos 21 están sumergidos en un líquido conductor de electricidad. Más bien, el material aislante 26 hace que cuando se aplica una tensión a los electrodos 21, la corriente fluya a través de las superficies frontales 33 de los electrodos 21 y se forme un campo eléctrico por debajo del lado inferior 25 del soporte 22. Como no pueden fluir corrientes apreciables a través del espacio entre los electrodos 21, la tensión cae lentamente durante la descarga de un condensador o de otra fuente de tensión no permanente, de modo que a lo largo del tiempo fluyen corrientes más estables, que generan un campo eléctrico a lo largo del tiempo de la descarga suficientemente fuerte para la mayoría de los procedimientos biológicos, por ejemplo la electrotransfección. Para ello la disposición de electrodos 20 está prevista para ser insertada en particular en un recipiente que está al menos parcialmente lleno de líquido, por ejemplo un recipiente de reacción, una placa de cultivo celular o un "pocillo" de una placa multipocillo, presentando este

recipiente una superficie inferior a la que pueden adherirse las células vivas.

Las células adherentes en la superficie inferior del recipiente generalmente están cubiertas con un líquido adecuado, por ejemplo un medio de cultivo celular o una solución adaptada al tratamiento eléctrico deseado, de modo que la disposición de electrodos 20 desplaza al menos una parte de este líquido cuando se inserta en el recipiente. Para que los electrodos 21 con sus superficies frontales 33 no descansen directamente sobre la superficie inferior del recipiente y por tanto sobre las células, el lado inferior 25 del soporte 22 tiene cuatro distanciadores 27 que garantizan una distancia suficiente entre los electrodos 21 y la superficie inferior del recipiente. La eficiencia del procedimiento según la invención se puede optimizar ajustando la distancia a un valor determinado empíricamente (véanse las figuras 7 y 8).

La figura 4 muestra una vista en perspectiva de la disposición de electrodos 20 según la figura 3, estando representadas visibles en esta ilustración las partes interiores de los electrodos 21. Está claro en esta representación que los electrodos 21 están realizados esencialmente con forma de placa, de modo que el grosor de las placas de electrodo disminuye en la dirección del lado inferior 25 del soporte 22. Las superficies frontales expuestas 33 de los electrodos 21, que están en contacto con el líquido en el recipiente, son por lo tanto esencialmente más estrechas que las partes de los electrodos 21 dispuestas dentro del cuerpo de base 23. Esto tiene la ventaja de que la superficie por debajo del electrodo respectivo 21, dentro de la cual no es posible un tratamiento eléctrico efectivo de las células debido al campo eléctrico demasiado débil, se reduce. En el extremo opuesto, por el contrario, los electrodos 21 deben presentar un grosor mayor, ya que aquí deben ponerse en contacto efectivo para la producción de un contacto eléctrico suficiente. En el presente ejemplo de realización, el contacto eléctrico con la fuente de tensión utilizada en cada caso se produce a través de elementos de contacto 28 en forma de pasador que son insertados en zonas engrosadas 29 de los electrodos 21. Los elementos de contacto 28 son conectados eléctricamente a una fuente de tensión en cada caso en su extremo opuesto a la zona 29 por medio de un dispositivo de contacto adecuado. En cuanto a la fuente de tensión puede tratarse por ejemplo de uno o varios condensadores que permite(n) la emisión controlada de impulsos de tensión. Los impulsos de tensión generados son reenviados a los electrodos 21 a través de los elementos de contacto 28, de modo que se crea un campo eléctrico en el lado inferior de los electrodos 21, es decir por debajo del lado inferior 25 del soporte 22, que debido al material aislante 26 entre los electrodos 21 en el espacio entre las células y el lado de los electrodos 21 que da a las células, está limitado o focalizado.

La disposición de electrodos 20 según la invención se produce preferiblemente en el procedimiento de moldeo por inyección. Los elementos de contacto 28 son colocados en primer lugar en una herramienta de moldeo por inyección adecuada y luego son moldeados por inyección con un polímero eléctricamente aislante. En una segunda etapa se inyecta un polímero eléctricamente conductor que forma los electrodos 21. Alternativamente, los electrodos también pueden estar hechos de metal, preferiblemente aluminio. En esta forma de realización, los electrodos metálicos son insertados en primer lugar en la herramienta de moldeo por inyección y luego son moldeados por inyección de un polímero eléctricamente aislante. En esta forma de realización, los electrodos metálicos tienen preferiblemente proyecciones que sobresalen por arriba, a través de las cuales los electrodos pueden ponerse en contacto eléctricamente.

La figura 5 muestra una vista en perspectiva del lado superior 30 de la disposición de electrodos 20 según la invención de acuerdo con la figura 3. Aquí está claro que los elementos de contacto 28 sobresalen por arriba por el cuerpo de base 23. Por tanto, los elementos de contacto 28 están completamente rodeados por el material eléctricamente aislante del cuerpo base 23, excepto por los extremos expuestos 31 y los extremos opuestos que se sumergen en el polímero eléctricamente conductor. A través de los extremos expuestos 31, los elementos de contacto 28 pueden conectarse eléctricamente a una fuente de tensión por medio de un dispositivo adecuado.

La figura 6 muestra un corte longitudinal a través de la disposición de electrodos 20 de acuerdo con las figuras 3 a 5. En esta representación está claro que el diámetro de los electrodos 21 se estrecha en la dirección al lado inferior 25 del cuerpo de base 23, de modo que la superficie 33 por debajo de los electrodos 21, dentro de la cual se forma solo un campo eléctrico insuficiente, se reduce. En el extremo opuesto de los electrodos 21 se encuentra la zona 29 con grosor aumentado, en la que se insertan o inyectan, respectivamente, los elementos de contacto 28. Esta realización particularmente ventajosa garantiza un contacto eléctrico suficiente entre los elementos de contacto 28 y los electrodos 21, de modo que está asegurada una transmisión efectiva de los impulsos de tensión desde la fuente de tensión hacia los electrodos 21. Cuando la disposición de electrodos 20 es insertada en un recipiente lleno de líquido, en cuya superficie inferior se adhieren células vivas, los distanciadores 27 se ocupan de que se ajuste una distancia óptima entre el lado inferior de los electrodos 21 y las células a tratar. Dado que el espacio entre las superficies 32 de los electrodos 21 opuestas entre sí, en cada caso, está completamente lleno con el material aislante 26, no entra líquido entre las superficies 32 de los electrodos 21, de modo que no puede fluir corriente a través de la zona entre las superficies 32 de los electrodos 21. De esta manera, cuando se aplica una tensión a los electrodos 21, el campo eléctrico se concentra en el lado de los electrodos 21 que da a las células y se limita o focaliza al espacio entre las células y los electrodos 21. De esta manera, las células pueden ser tratadas de manera muy efectiva y con un gasto de energía relativamente pequeño. Otra ventaja de la invención consiste en que la disposición de electrodos 20 desplaza una parte del líquido cuando se inserta en el recipiente, ya que no hay espacios intermedios entre los electrodos 21. Por esta razón, el recipiente solo debe estar lleno con una pequeña cantidad de líquido, con lo que se ahorran soluciones y sustancias necesarias para el tratamiento, y por tanto los costes pueden reducirse.

La figura 7 muestra la dependencia de la eficiencia de transfección respecto de la distancia de los electrodos a las

células a tratar, en cada caso con impulsos de tensión de diferentes intensidades. En este contexto, transfección significa la introducción de moléculas de ácido nucleico (aquí ADN) en células vivas (aquí animales) por medio de impulsos de tensión eléctrica. Mientras que a tensiones relativamente altas (AX-19) solo existe una pequeña dependencia de la eficiencia de transfección de la distancia entre los electrodos y las células, con impulsos de tensión débiles (A-5) se hace evidente que cuanto menor sea la distancia entre los electrodos y las células, mayor es la eficiencia de transfección. Los impulsos de tensión medianos (K-19), por el contrario, muestran un óptimo a distancias medianas. Así pues queda claro que la distancia entre los electrodos y las células tiene una influencia mayor o menor en la eficiencia de transfección dependiendo de la intensidad de los impulsos de tensión. Para optimizar la eficiencia de la transfección, la distancia se ajusta, por tanto, según la invención a un valor determinado empíricamente, por ejemplo dimensionando adecuadamente los distanciadores 27 de la disposición de electrodos 20 de acuerdo con las figuras 3 a 6.

La figura 8 muestra las intensidades relativas del campo eléctrico en la zona entre los electrodos y el fondo de un recipiente en función de la distancia de los electrodos al fondo del recipiente. La intensidad de campo se refiere en cada caso a la intensidad de campo a una distancia de 500 μm , es decir, la intensidad de campo de ambas curvas se ajustó al 100 % para esta distancia. Las intensidades de campo entre los electrodos activos y por debajo de los electrodos pasivos se comportan en sentidos opuestos, es decir, mientras que la intensidad de campo entre los electrodos activos aumenta a medida que disminuyen las distancias, la intensidad de campo por debajo de los electrodos pasivos se aproxima a cero. Con el aumento de las distancias, la intensidad de campo entre los electrodos activos disminuye, mientras que la intensidad de campo por debajo de los electrodos pasivos continúa aumentando. En términos absolutos, la intensidad de campo entre los electrodos activos disminuye a medida que aumenta la distancia, mientras que la intensidad de campo por debajo de los electrodos sin potencial alcanza un valor máximo a una distancia media, es decir, a partir de este valor máximo disminuye al aumentar o disminuir las distancias. Por tanto, la distancia de los electrodos respecto de las células se ajusta según la invención dependiendo de las condiciones de reacción, de tal manera que la intensidad de campo por debajo de los electrodos sin potencial se acerque lo más posible al valor máximo y al mismo tiempo alcance el valor más alto posible entre los electrodos activos.

La figura 9 muestra simulaciones de los campos eléctricos en un recipiente de cultivo celular en el caso de exclusivamente electrodos activos (arriba), así como electrodos activos y sin potencial (debajo). Mientras que los procedimientos y dispositivos conocidos para la generación de campos eléctricos tienen el inconveniente de que el campo eléctrico ortogonal por debajo de los electrodos activos es mínimo y, por tanto, el tratamiento eléctrico de las células en esta zona es insuficiente, queda claro aquí que por la inclusión de electrodos sin potencial (pasivos) en el procedimiento según la invención se hace posible un tratamiento más uniforme y por tanto más eficaz de las células. La disposición de electrodos 40 representada aquí a modo de ejemplo comprende cuatro electrodos 41, 42, 43, 44 que generan un campo eléctrico cuando se aplica una tensión eléctrica en el espacio 45 entre los electrodos 41, 42, 43, 44 y la superficie inferior 46 de un recipiente de cultivo celular. La intensidad de este campo eléctrico es simulada en esta representación por la densidad de las líneas de campo. Las zonas más oscuras indican una mayor intensidad de campo y las zonas más claras indican una menor intensidad de campo. En la figura A) todos los electrodos 41, 42, 43, 44 son activos. En este caso, la intensidad de campo es alta únicamente entre los electrodos 41, 42, 43, 44 y en sus extremos libres (zonas oscuras). Por el contrario, la intensidad de campo en el espacio 45 en las zonas por debajo de los electrodos 41, 42, 43, 44 (zonas claras) es baja, de modo que a las células a tratar sobre la superficie inferior 46 se aplica un campo eléctrico suficiente solo de manera no uniforme. Según la invención, por tanto, como está representado en la figura B), en este ejemplo de realización la tensión se aplica en primer lugar solo a los dos electrodos 41 y 43, mientras que los otros dos electrodos 42 y 44 están sin potencial (pasivos). El resultado de esto es que en las zonas por debajo de los electrodos pasivos 42 y 44 actúa sobre las células que se adhieren a la superficie inferior 46 un campo eléctrico más fuerte, que está solo ligeramente debilitado por los electrodos pasivos 42 y 44. Si ahora en caso de otro impulso de tensión se aplica tensión a los electrodos anteriormente pasivos 42 y 44 y los electrodos anteriormente activos 41 y 43 están sin potencial, actúa también en la zona por debajo de los electrodos 41 y 43 un campo eléctrico fuerte. En consecuencia, las células que se adhieren a la superficie inferior 46 pueden ser tratadas uniformemente con un campo eléctrico suficiente mediante el procedimiento según la invención.

La figura 10 muestra imágenes microscópicas de células marcadas con fluorescencia que fueron transfectadas según el estado de la técnica (A) y mediante el procedimiento según la invención (B y C). Durante la electrotransfección de las células representadas en la figura A) todos los electrodos eran activos, es decir, todos los electrodos estaban conectados a alta tensión o a masa. Las células transfectadas con éxito con el plásmido presentaban fluorescencia y, por tanto, se pueden identificar claramente. Pero en la figura A) se muestran huecos ("sombras") en el césped de las células transfectadas que corresponden a las zonas por debajo de los electrodos activos. En estas zonas el campo eléctrico no era lo suficientemente fuerte como para transfectar con éxito las células. En el caso de electrotransfección de las células representadas en la figura B) solo la mitad de los electrodos estaban activos, mientras que la otra mitad estaba sin potencial. En comparación con la transfección según la figura A), en conjunto aquí se han transfectado con éxito menos células, pero hay también menos huecos o las distancias entre las zonas con una eficiencia de transfección muy baja son mayores. La eficiencia de transfección es aquí inicialmente más baja ya que el campo eléctrico a través de toda la superficie de cultivo es más débil en conjunto debido a las distancias más grandes entre los electrodos activos. De acuerdo con el procedimiento según la invención estas mismas células fueron sometidas nuevamente a un segundo campo eléctrico (impulso de tensión), intercambiándose los electrodos activos y pasivos

durante el segundo impulso, es decir, todos los electrodos activos en el caso del primer impulso estaban sin potencial durante el segundo impulso, mientras que los electrodos anteriormente pasivos fueron activos durante el segundo impulso. Ya no se reconocen huecos, es decir, todas las zonas, incluyendo las zonas por debajo de los electrodos, muestran una alta tasa de transfección (Figura C). El procedimiento según la invención permite así un tratamiento muy uniforme y homogéneo de las células a través de toda la superficie de cultivo. En particular, la comparación de las figuras A) (estado de la técnica) y C) (procedimiento según la invención) ilustra las claras ventajas del procedimiento según la invención con respecto a los procedimientos conocidos.

La figura 11 muestra imágenes microscópicas de células fluorescentes que fueron transfectadas de acuerdo con el procedimiento según la invención, habiendo sido modificada la distancia entre dos impulsos de tensión. A intervalos muy cortos (A: < 0,5 segundos) se produce una reducción indeseable en la eficiencia de transfección. Este efecto se elimina de nuevo al aumentar los intervalos entre los impulsos de tensión (B: 2,0 segundos). Para que la duración completa del proceso no se alargue innecesariamente, las distancias deberían ser optimizadas, es decir, adaptadas a las condiciones del proceso, como por ejemplo parámetros eléctricos, volumen de muestra, solución tampón o medio de cultivo, temperatura y/o tipo de célula. Preferiblemente, el intervalo de tiempo entre dos impulsos de tensión es aprovechado en primer lugar para someter varias muestras sucesivamente al primer impulso de tensión y luego estas muestras sucesivamente al segundo impulso de tensión. Por este intercalado temporal particularmente ventajoso de los impulsos de tensión se puede minimizar la duración total del proceso en caso de tratamiento de varias muestras.

Para llevar a cabo el procedimiento según la invención los electrodos deben ser direccionados individualmente, como se muestra en la figura 12, o en grupos, como se muestra en la figura 13. Esto se realiza preferiblemente a través de dispositivos de conmutación, por ejemplo IGBT, MOSFET o relés, que pueden adoptar un estado abierto o cerrado. En el estado abierto, los dispositivos de conmutación no conducen ninguna corriente eléctrica, por lo que los electrodos conectados están aislados eléctricamente y, por tanto, sin potencial (pasivos). En el estado cerrado, los dispositivos de conmutación conducen corriente eléctrica, de modo que la corriente puede fluir a través de los electrodos conectados. Estos electrodos tienen un potencial eléctrico (positivo o negativo) y actúan como ánodo o cátodo. Se denominan electrodos activos.

La figura 12 muestra una disposición de circuito 47 para llevar a cabo el procedimiento según la invención con diecisiete electrodos 48, 49, 56, 57. Los electrodos 48, 49, 56, 57 dispuestos planoparalelos están conectados, respectivamente, a una fuente de tensión 52 o masa 53 a través de un dispositivo de conmutación 50, 51, 54, 55. La figura A) muestra el estado de la disposición de circuito 47 cuando se genera el primer campo eléctrico. La parte de los electrodos 48, 49 que están conectados a los dispositivos de conmutación abiertos 50 son aquí, en primer lugar, electrodos sin potencial 49. La parte de los electrodos 48, 49 que está conectada a los dispositivos de conmutación cerrados 51 son los electrodos activos 48, que en última instancia generan el primer campo eléctrico para el tratamiento de las células. Ortogonalmente por debajo de los electrodos activos 48, el campo eléctrico es mínimo, de modo que las células en estas zonas no son tratadas de forma suficiente. La figura B) muestra el estado de la disposición del circuito 47 cuando se genera el segundo campo eléctrico. Los dispositivos de conmutación 54, que estaban abiertos durante la generación del primer campo eléctrico, están cerrados aquí, mientras que los dispositivos de conmutación 55 que estaban cerrados durante la generación del primer campo eléctrico, están abiertos aquí. Esto tiene como consecuencia que los electrodos 56, que estaban sin potencial cuando se generó el primer campo eléctrico, durante la generación del segundo campo eléctrico son los electrodos activos que generan el segundo campo eléctrico. Los electrodos 57 que estaban activos cuando se generó el primer campo eléctrico, están sin potencial cuando se genera el segundo campo eléctrico. Dado que todos los electrodos activos 56 están dispuestos entre dos electrodos 57 sin potencial cuando se genera el primer campo eléctrico, las zonas por debajo de los electrodos activos 56 se someten al segundo campo eléctrico que fue generado por los electrodos activos 56. Como resultado, también las células que no fueron tratadas suficientemente mientras duró el primer campo eléctrico son tratadas eléctricamente por el segundo campo eléctrico, de modo que en conjunto todas las células son tratadas de manera uniforme.

La figura 13 muestra un ejemplo de dispositivo 58 según la invención para llevar a cabo el procedimiento según la invención con cuatro dispositivos de conmutación 59, 60, 61, 62. Los dispositivos de conmutación 59 y 60 están conectados a una fuente de tensión, mientras que los dispositivos de conmutación 61 y 62 están conectados a masa. Los electrodos (electrodos activos 63: discontinuos o negros, electrodos sin potencial 64: incoloros) del dispositivo 58 se dividen en dos grupos, estando un grupo acoplado eléctricamente a los dispositivos de conmutación 59 y 61 y el otro grupo a los dispositivos de conmutación 60 y 62. Por tanto, en la forma de realización representada aquí, diecisiete electrodos 63, 64 están conectados a una fuente de tensión a través de únicamente cuatro dispositivos de conmutación 59, 60, 61, 62. En el estado representado aquí, los electrodos activos 63 (primer grupo) están conectados a una fuente de tensión o masa a través de los dispositivos de conmutación cerrados 59 y 61, de modo que cuando se aplica una tensión a los electrodos activos 63, se genera un primer campo eléctrico entre los electrodos activos 63. Como los dispositivos de conmutación 60 y 62 están abiertos, los electrodos 64 (segundo grupo) acoplados a ellos permanecen sin potencial o pasivos en este estado. Para poder someter a un tratamiento suficiente también a las células en la zona por debajo de los electrodos activos 63, que solo estuvieron expuestas a un campo eléctrico mínimo en el estado aquí representado, según la invención para la generación de un segundo campo eléctrico los dispositivos de conmutación 59 y 61 se abren y los dispositivos de conmutación 60 y 62 se cierran. Con este sencillo proceso de conmutación los electrodos del primer grupo, que son electrodos activos 63 en el estado aquí representado, se convierten en electrodos sin potencial, mientras que los electrodos del segundo grupo, que son electrodos sin potencial 64 en el estado aquí representado, se vuelven activos y generan un segundo campo eléctrico. Este segundo

campo eléctrico se ocupa entonces de que también las zonas por debajo de los electrodos del primer grupo 63 se sometan a un tratamiento eléctrico suficiente, de modo que se garantice en conjunto un tratamiento uniforme y eficiente de las células. El dispositivo 58 según la invención tiene así la ventaja de que funciona con cuatro dispositivos de conmutación y puede cambiar rápidamente entre los electrodos de ambos grupos por cambio de estos dispositivos de conmutación. Cada grupo de electrodos puede ser conmutado a activo o pasivo, por lo que todos los electrodos de un grupo están conmutados al mismo tiempo siempre de la misma manera (activo o sin potencial). Por el agrupamiento de los electrodos 63, 64, el dispositivo 58 según la invención tiene, por ejemplo, un número significativamente reducido de dispositivos de conmutación en comparación con la disposición de circuito 47 según la figura 12, lo que reduce significativamente el despliegue de aparatos y la susceptibilidad a fallos del dispositivo 58.

La figura 14 muestra representaciones esquemáticas de disposiciones de electrodos 65, 66 con diferentes dimensiones para placas de cultivo celular con 3 espacios de cultivo grandes (formato "6 pocillos", disposiciones de electrodos 65) y 12 espacios de cultivo pequeños (formato "24 pocillos", disposiciones de electrodos 66). Para ahorrar material y reducir el despliegue de construcción según la invención son seleccionados puntos de contacto comunes para disposiciones de electrodos con diferentes dimensiones. Como resultado, el número de elementos de contacto que se requieren en el lado del dispositivo para el contacto eléctrico de los electrodos puede reducirse significativamente de manera ventajosa. La zona de alojamiento 67 para placas de cultivo celular representada aquí presenta una sección para tres espacios de cultivo grandes y una sección para doce espacios de cultivo pequeños. Los espacios de cultivo grandes son equipados con disposiciones de electrodos 65 correspondientemente dimensionadas para el tratamiento eléctrico de las células que se encuentran en ellos, por ejemplo en forma de electrodos de inmersión que comprenden, respectivamente, diecisiete electrodos 68. Los espacios de cultivo pequeños están equipados con disposiciones de electrodos 66 dimensionadas correspondientemente para el tratamiento eléctrico de las células que se encuentran en ellos, por ejemplo igualmente en forma de electrodos de inmersión, que comprenden cada uno siete electrodos 69. Las disposiciones de electrodos pueden, por ejemplo, estar integradas en una tapa para placas de cultivo celular o estar colocadas en una unidad de soporte del dispositivo de contacto correspondiente. Tal dispositivo de contacto también comprende los elementos de contacto que están dispuestos en la sección respectiva de la zona de alojamiento 67 como se explica a continuación en correspondencia con los puntos de contacto de los electrodos. A cada electrodo 68, 69 está asignado un punto de contacto 70 en el que el electrodo respectivo 68, 69 puede ponerse en contacto por medio de un elemento de contacto respectivo para que se pueda establecer un contacto eléctrico con una fuente de tensión, por ejemplo un condensador. Por tanto, un dispositivo para el contacto con tal placa de cultivo celular 67 "mixta" requiere $3 \times 17 + 12 \times 7 = 135$ elementos de contacto. Un dispositivo para el contacto de dos formatos diferentes de placas de cultivo celular, por ejemplo formato "6 pocillos" (6 espacios de cultivo para disposiciones de electrodos con 17 electrodos cada uno) y formato "24 pocillos" (24 espacios de cultivo con 7 electrodos cada uno), necesitaría incluso $6 \times 17 + 24 \times 7 = 270$ elementos de contacto.

Dado que para la fabricación de un contacto eléctrico suficiente mediante por ejemplo elementos de contacto sometidos a tensión de resorte se requiere una cierta presión de contacto, que también compensa tolerancias de fabricación, el número de puntos de contacto o elementos de contacto correspondientes debería ser lo más pequeño posible. La presión de contacto de un resorte estándar es de aproximadamente 0,4 N, lo que en el caso de un número de 270 elementos de contacto conduciría a una fuerza mecánica de aproximadamente 108 N (aproximadamente 10 kg). Por tanto, es deseable minimizar el número de elementos de contacto para reducir el despliegue técnico y de aparatos.

La figura 15 muestra disposiciones a modo de ejemplo y preferidas de los puntos de contacto 71, 72, 73 para disposiciones de electrodos 74, 75 con diferentes dimensiones para placas de cultivo celular con al menos un espacio de reacción grande (disposición de electrodos 74) y al menos cuatro espacios de reacción pequeños (disposiciones de electrodos 75). Según la invención, la mayoría de los puntos de contacto 71, 72, 73 pueden disponerse según la invención de tal manera que sean idénticos para los diferentes formatos, es decir, pueden servir como puntos de contacto tanto para los electrodos de la disposición de electrodos mayores 74 como para los electrodos de las disposiciones de electrodos menores 75. En los formatos representados aquí a modo de ejemplo, únicamente los electrodos centrales (números de retícula 8-10) y los electrodos exteriores (números de retícula 1 y 17) de la disposición de electrodos grandes 74 tienen, respectivamente, una posición que no puede coincidir con posiciones correspondientes de electrodos de las disposiciones de electrodos pequeñas 75. Los puntos de contacto restantes (números de retícula 2-7 y 11-16) se pueden usar, respectivamente, como puntos de contacto para los electrodos correspondientes de las disposiciones de electrodos de ambos formatos (Figura A). A los electrodos aún no registrados de las dimensiones de electrodos pequeñas 75 se deben asignar entonces puntos de contacto propios en cada caso. En la Figura B) está representada una disposición de los puntos de contacto 72, 73 según la invención, que también está optimizada con respecto al proceso de producción. Los diecisiete puntos de contacto negros 72 representan lugares en los que todos los electrodos de la disposición de electrodos grandes 74 (por ejemplo, "formato de 6 pocillos") y algunos electrodos de las disposiciones de electrodos pequeñas 75 (por ejemplo "formato 24 pocillos") pueden ser puestos en contacto. Los diecisiete puntos de contacto 73 rayados representan lugares en los que exclusivamente los restantes electrodos de las disposiciones de electrodos pequeñas 75 pueden ser contactadas. En suma, un dispositivo para el contacto de estos dos formatos sería una disposición correspondiente de los elementos de contacto con $6 \times (17 + 16) = 198$ elementos de contacto dentro de una zona de alojamiento para placas de cultivo celular. Este es un número significativamente reducido de elementos de contacto en comparación con el ejemplo mostrado en la figura 14 (270 elementos de contacto), lo que reduce considerablemente el despliegue de aparatos.

La figura 16 muestra otra disposición a modo de ejemplo y preferida de los puntos de contacto para disposiciones de electrodos con diferentes dimensiones para placas de cultivo celular con 3 espacios de reacción grandes (formato "6 pocillos") y 12 espacios de reacción pequeños (formato "24 pocillos"). En esta forma de realización particularmente ventajosa, los electrodos y/o los elementos de contacto correspondientes para el contacto de los puntos de contacto pueden girar alrededor de un eje, preferiblemente un eje dispuesto perpendicular al plano de la placa de cultivo celular. Como resultado, el número de elementos de contacto necesarios en el lado del dispositivo puede reducirse ventajosamente a $3 \times (17 + 16) = 99$ elementos de contacto. Además, esta forma de realización permite el tratamiento adicional de placas de cultivo celular de otros formatos, por ejemplo del formato de "12 y 48 pocillos". En el ejemplo de realización representado aquí está prevista una zona de alojamiento 76 para placas de cultivo celular, que por ejemplo puede ser parte de un dispositivo para el contacto de disposiciones de electrodo 77, 78. Este dispositivo presenta aquí elementos de contacto no representados que pueden producir un contacto eléctrico con los electrodos de las disposiciones de electrodos 77, 78. La zona de alojamiento 76 comprende dos secciones 79, 80, dentro de cada una de las cuales están previstos elementos de contacto respectivos en una disposición correspondiente a los puntos de contacto 81, 82 de las disposiciones de electrodos 77, 78. Los puntos de contacto negros 81 representan lugares en los que pueden contactar todos los electrodos de las disposiciones de electrodos grandes 77 ("formato de 6 pocillos") y algunos electrodos de las disposiciones de electrodos pequeñas 78 ("formato de 24 pocillos"). Los puntos de contacto rayados 82 representan lugares en los que exclusivamente pueden contactar los electrodos restantes de las disposiciones de electrodos pequeñas 78. La primera sección 79 de la zona de alojamiento 76 está prevista para las disposiciones de electrodos 77, 78 o espacios de cultivo celular ("pocillos") dimensionados correspondientemente, de modo que en este ejemplo de realización disposiciones de electrodos grandes 77 (formato "6 pocillos") y disposiciones de electrodos pequeñas 78 (formato "24 pocillos") pueden contactar eléctricamente. Por tanto, si en la zona de alojamiento 76 se utiliza una placa de cultivo celular con 6 o 24 espacios de cultivo o una placa mixta con 3 espacios de cultivo grandes y 12 pequeños, entonces en la primera sección 79 contacta eléctricamente en primer lugar la mitad de las disposiciones de electrodos correspondientes. Después de que las células en los espacios de cultivo hayan sido tratadas, la placa es girada horizontalmente 180°, de modo que la otra mitad de los espacios de cultivo esté dispuesta en la primera sección 79 y pueda ser contactada eléctricamente. Alternativamente, por supuesto, en lugar de la placa, también el dispositivo con los elementos de contacto puede ser girado para tratar la otra mitad de la placa. La segunda sección 80 de la zona de alojamiento 76 está libre y permanece sin usar, o está prevista para las disposiciones de electrodos o espacios de cultivo celular ("pocillos") dimensionados correspondientemente con otras medidas, por ejemplo disposiciones de electrodos grandes en el formato "12 pocillos" y disposiciones de electrodos pequeñas en el formato "48 pocillos". Con un dispositivo según la invención para el contacto de al menos dos disposiciones de electrodos pueden ser contactadas eléctricamente de forma ventajosa al menos dos, preferiblemente cuatro, formatos de placa diferentes.

Lista de símbolos de referencia

35	1	disposición de electrodos
	2	electrodo
	3	electrodo
	4	electrodo
	5	material aislante
40	6	espacio interior
	7	recipiente
	8	superficie inferior
	9	superficies
	10	disposición de electrodos
45	11	electrodo
	12	electrodo
	13	electrodo
	14	electrodo
	15	material aislante
50	16	espacio interior
	17	recipiente

	18	superficie inferior
	20	disposición de electrodos
	21	electrodos
	22	soporte
5	23	cuerpo de base
	24	zona de borde
	25	lado inferior
	26	material aislante
	27	distanciador
10	28	elementos de contacto
	29	zona
	30	lado superior
	31	extremo
	32	superficie
15	33	superficie frontal
	40	disposición de electrodos
	41	electrodo
	42	electrodo
	43	electrodo
20	44	electrodo
	45	espacio
	46	superficie inferior
	47	disposición de electrodos
	48	electrodos activos
25	49	electrodos sin potencial
	50	dispositivos de conmutación abiertos
	51	dispositivos de conmutación cerrados
	62	alta tensión
	53	masa
30	54	dispositivos de conmutación cerrados
	55	dispositivos de conmutación abiertos
	56	electrodos activos
	57	electrodos sin potencial
	58	dispositivo
35	59	dispositivo de conmutación
	60	dispositivo de conmutación
	61	dispositivo de conmutación

	62	dispositivo de conmutación
	63	electrodos activos
	64	electrodos sin potencial
	65	disposición de electrodos
5	66	disposición de electrodos
	67	zona de alojamiento
	68	electrodos
	69	electrodos
	70	puntos de contacto
10	71	puntos de contacto
	72	puntos de contacto
	73	puntos de contacto
	74	disposición de electrodos
	75	disposición de electrodos
15	76	zona de alojamiento
	77	disposición de electrodos
	78	disposición de electrodos
	79	sección
	80	sección
20	81	puntos de contacto
	82	puntos de contacto

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para someter células adherentes que se adhieren al fondo de un espacio de reacción, a por lo menos un campo eléctrico, en el que el campo eléctrico es generado por la aplicación de una tensión a por lo menos dos electrodos activos (48, 56, 63), estando previstos al menos tres electrodos (48, 49, 56, 57, 63, 64), de los que al menos dos electrodos son electrodos activos (48, 63) cuando se aplica la tensión para la generación de un primer campo eléctrico, y en el que es generado al menos un segundo campo eléctrico, caracterizado por que cuando la tensión se aplica para la generación del segundo campo eléctrico al menos uno de los dos electrodos anteriormente activos (48, 63) es un electrodo sin potencial (57, 64), siendo generados tantos campos eléctricos como sean necesarios para que todos los electrodos (48, 63) activos durante la generación del primer campo eléctrico sean, respectivamente, al menos una vez electrodos sin potencial (57, 64) durante la generación de los otros campos eléctricos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que cada campo eléctrico es generado, respectivamente, por al menos un impulso de tensión, preferiblemente al menos dos impulsos de tensión, y/o por que los al menos dos campos eléctricos son generados, respectivamente, por al menos un impulso de tensión, siendo el intervalo de tiempo entre los impulsos de tensión de al menos 500 ms, preferiblemente de al menos 1 s, en particular de 1 a 10 s.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que están previstos varios espacios de reacción, en cada uno de los cuales células adherentes son sometidas a campos eléctricos, en el que el intervalo de tiempo entre dos impulsos de tensión para la generación de dos campos eléctricos en un espacio de reacción es aprovechado para generar al menos un campo eléctrico en al menos otro espacio de reacción.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que los electrodos (48, 49, 56, 57, 63, 64) y las células adherentes están distanciados entre sí y por que la distancia entre las células y los electrodos (48, 49, 56, 57, 63, 64) es ajustada a un valor determinado empíricamente.
5. Dispositivo (58), en particular para la realización del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende al menos tres electrodos (63, 64) que están conectados a por lo menos una fuente de tensión a través de al menos un dispositivo de conmutación (59, 60, 61, 62), caracterizado por que al menos cinco electrodos (63, 64) están conectados a la por lo menos una fuente de tensión a través de cuatro dispositivos de conmutación (59, 60, 61, 62), en el que al menos dos electrodos (63, 64) están conectados a la fuente de tensión a través de un dispositivo de conmutación común (59, 60, 61, 62), y en el que están previstos dos grupos de electrodos (63, 64) con, respectivamente, al menos dos electrodos (63, 64) que están conectados a la fuente de tensión, respectivamente, a través de dos dispositivos de conmutación comunes (59, 60, 61, 62).
6. Dispositivo según la reivindicación 5, caracterizado por que está previsto un total de al menos siete, preferiblemente de 9-21, electrodos (63, 64).
7. Dispositivo según la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que los electrodos (63, 64) están previstos para su inserción en al menos un espacio de reacción.
8. Dispositivo según la reivindicación 7, caracterizado por que el espacio de reacción es parte de una placa multipocillo.
9. Uso del dispositivo según una de las reivindicaciones 5 a 8 para someter células adherentes a por lo menos un campo eléctrico, en particular para electroporación o electrofusión de células adherentes.

Figura 1

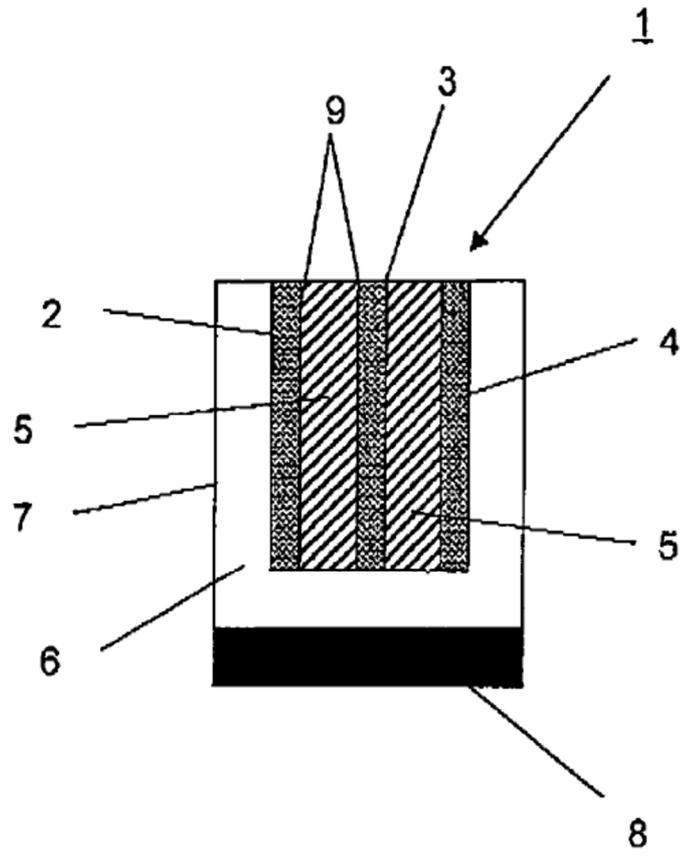


Figura 2

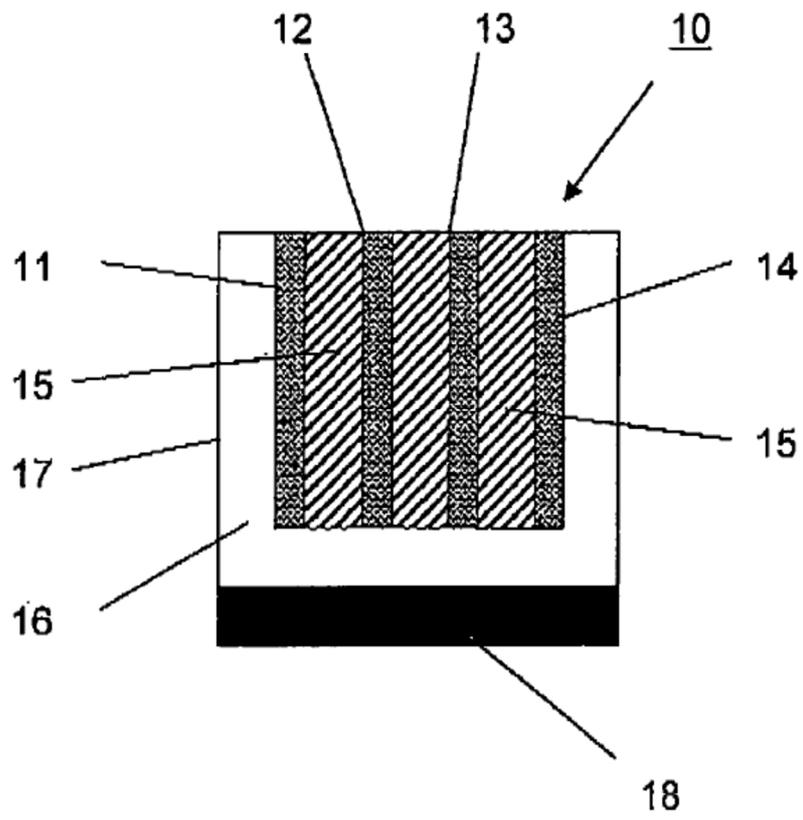


Figura 3

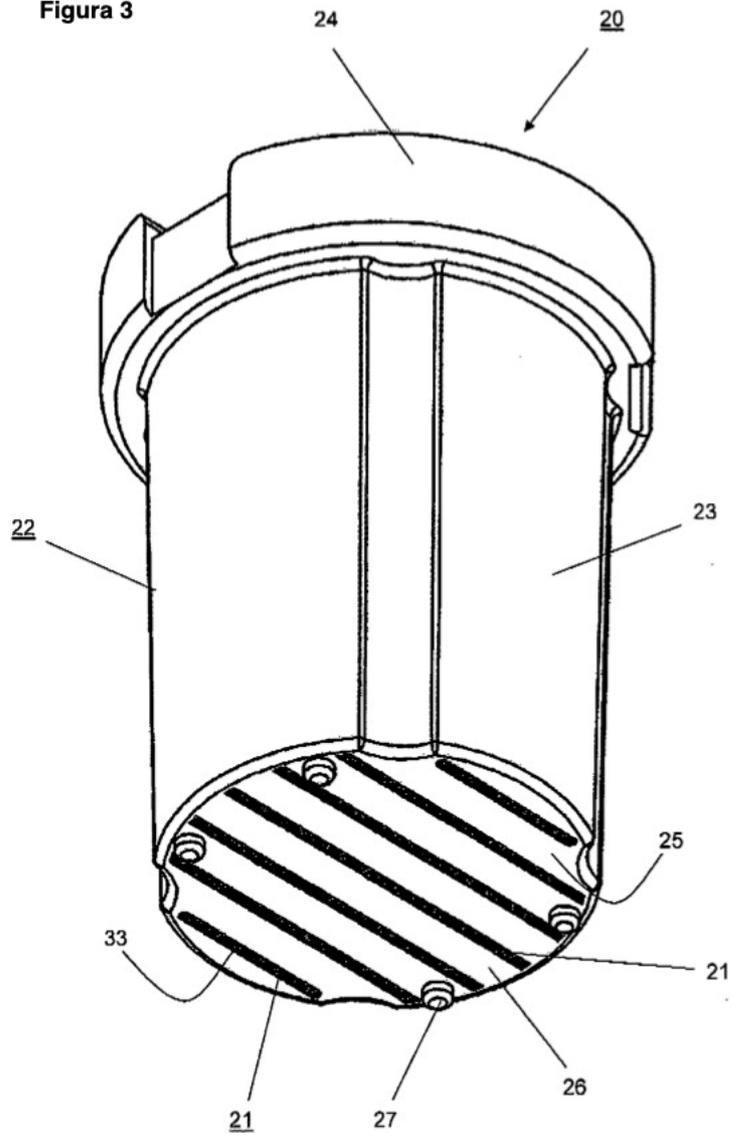


Figura 4

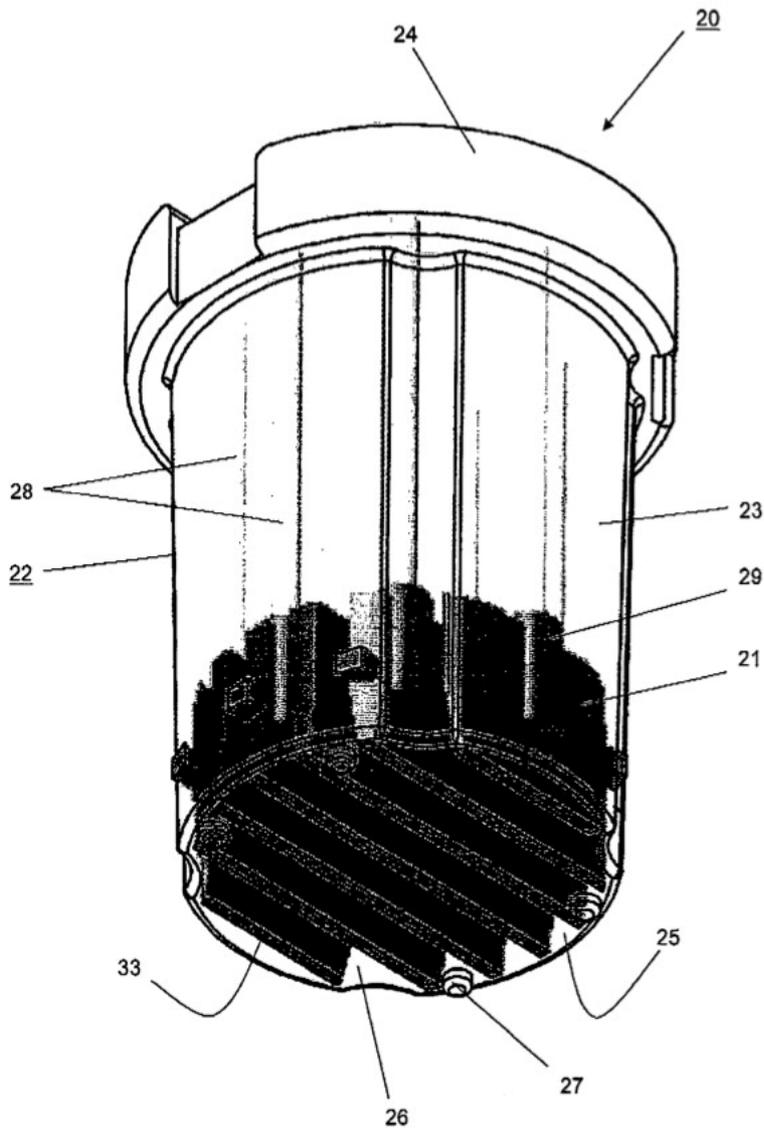


Figura 5

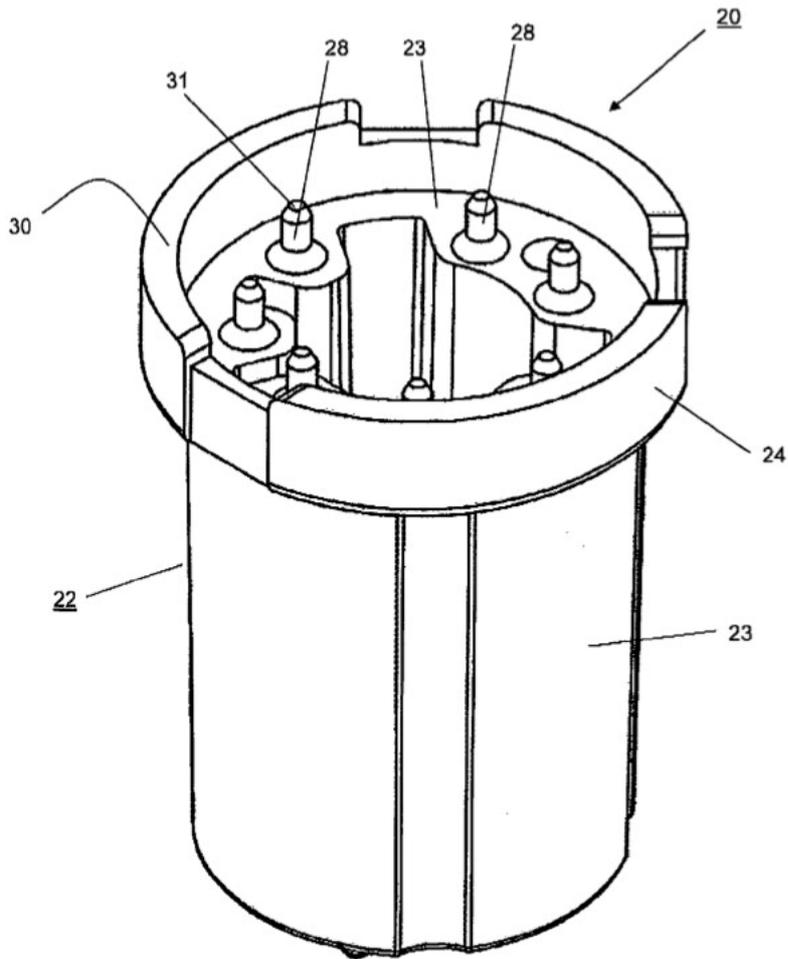


Figura 6

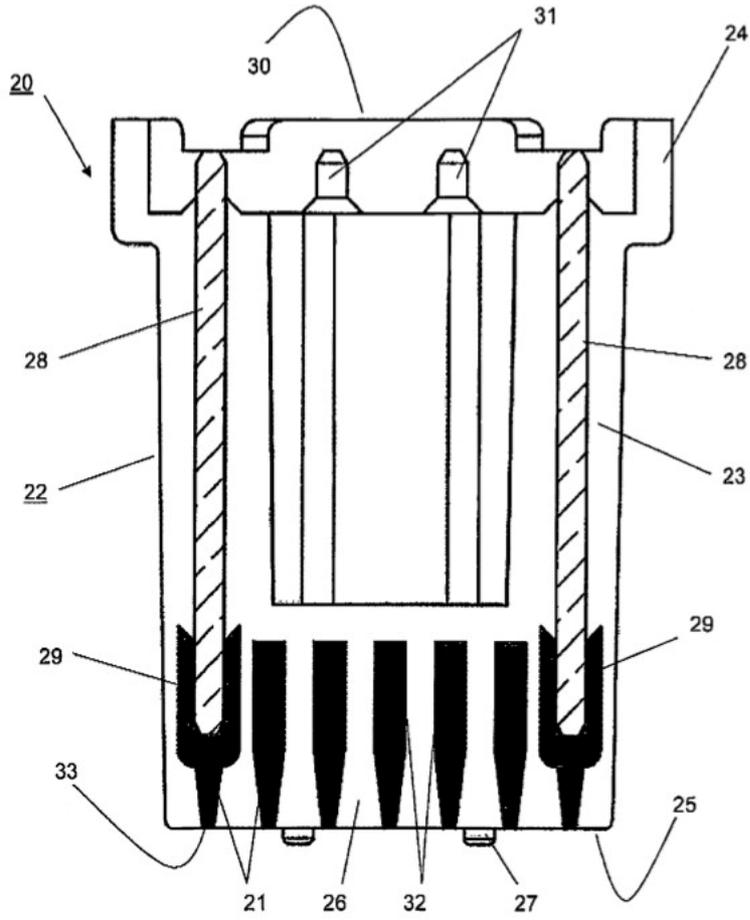


Figura 7

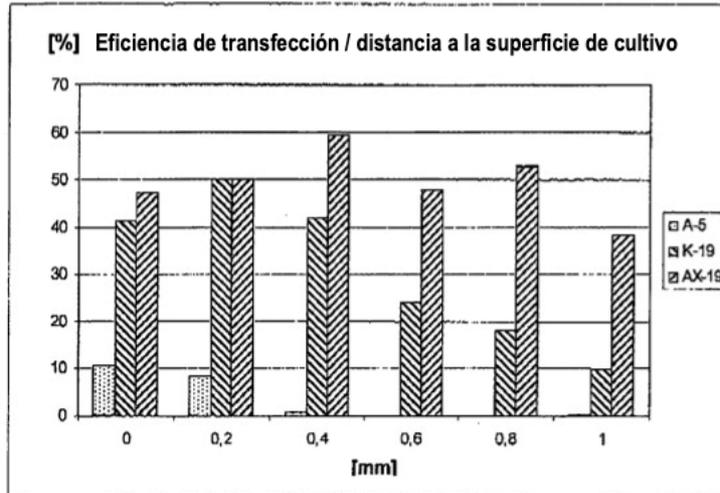


Figura 8

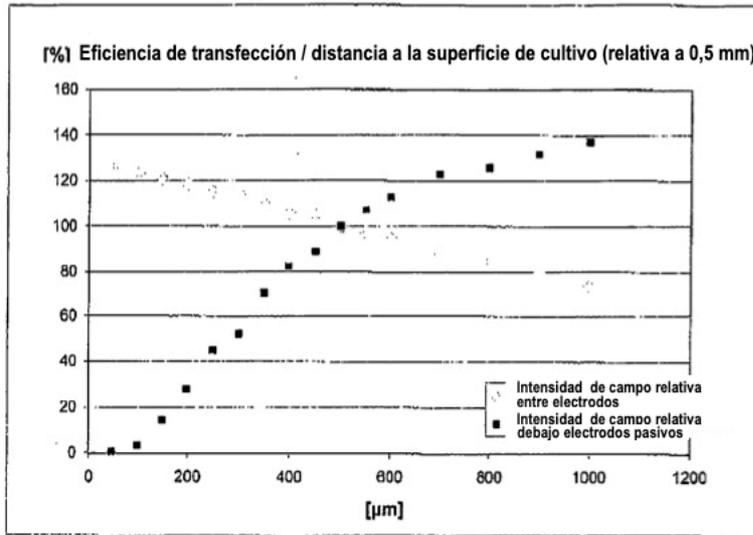


Figura 9

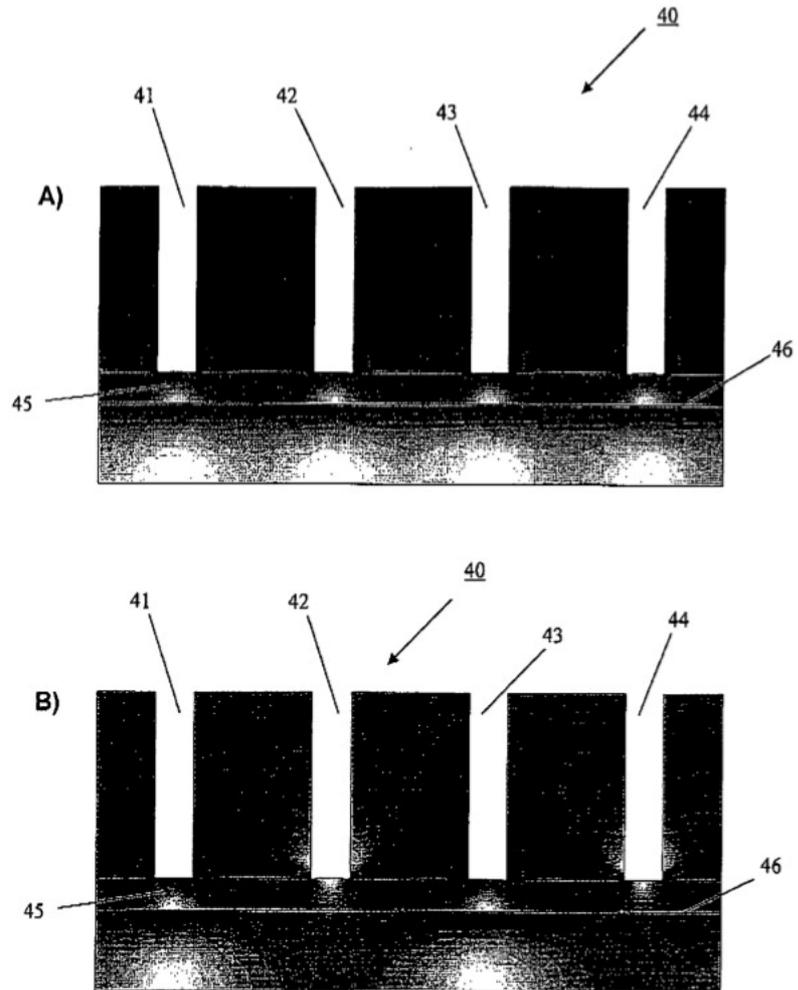
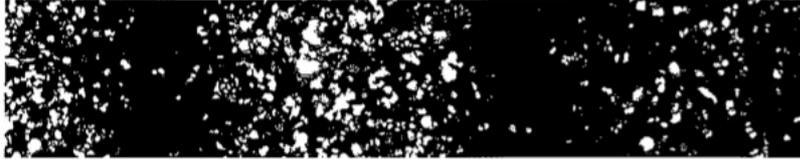
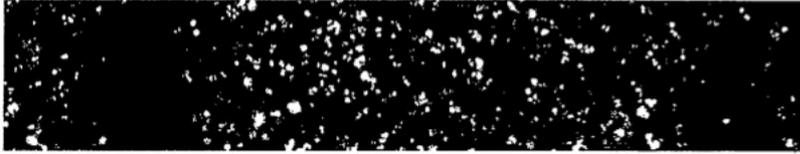


Figura 10

A)



B)



C)

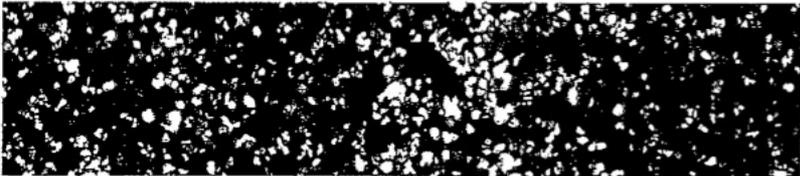


Figura 11

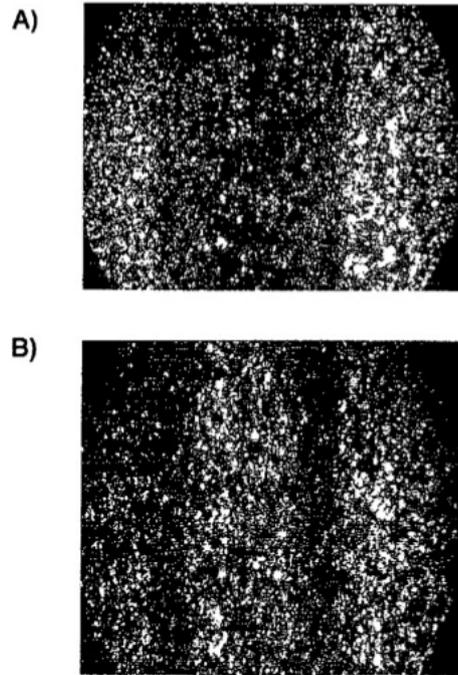


Figura 12

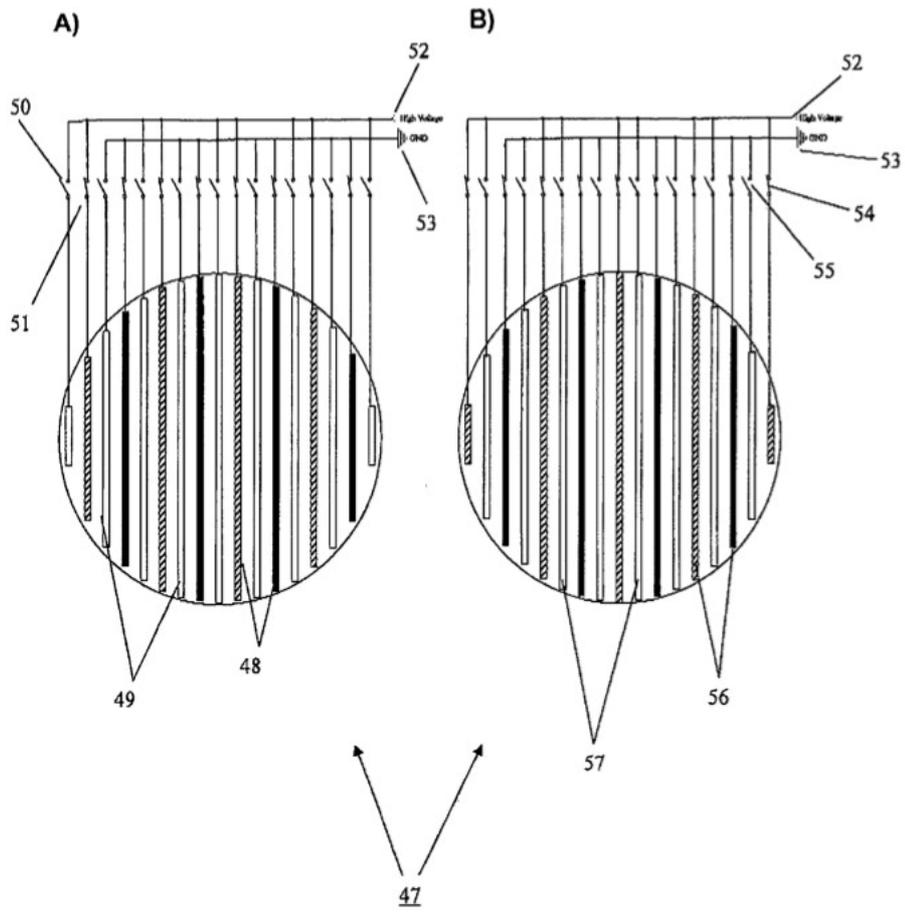


Figura 13

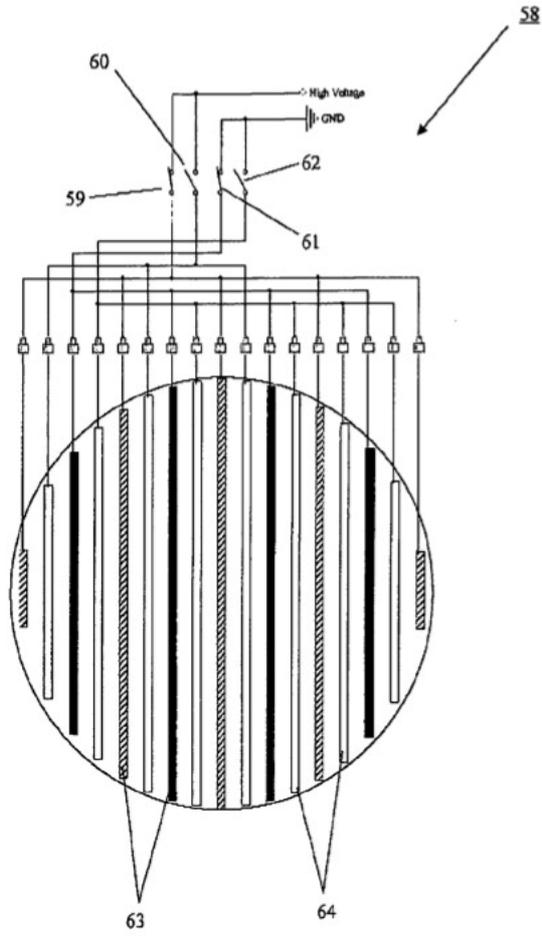


Figura 14

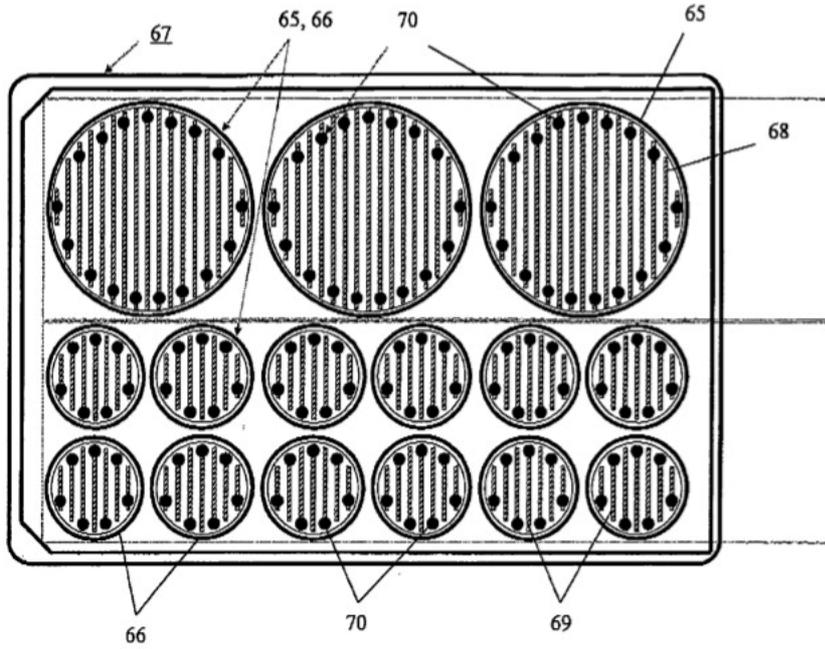


Figura 15

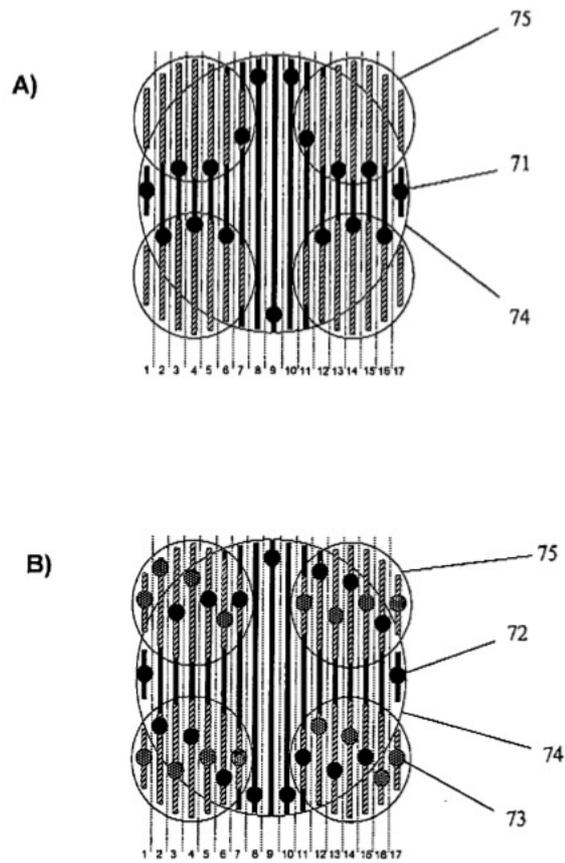


Figura 16

