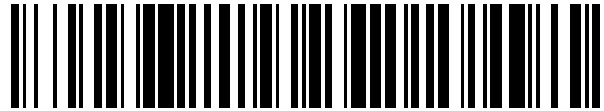


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 459**

51 Int. Cl.:

**A61N 1/04** (2006.01)  
**A61N 1/32** (2006.01)  
**A61N 1/36** (2006.01)  
**C12N 13/00** (2006.01)  
**C12M 1/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2020 E 20212860 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2023 EP 4011436**

54 Título: **Tratamiento de células biológicas con campos eléctricos pulsados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.12.2023**

73 Titular/es:

**BÜHLER AG (100.0%)**  
**Gupfenstrasse 5**  
**9240 Uzwil, CH**

72 Inventor/es:

**BUCHMANN, LEANDRO**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**ES 2 955 459 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

Tratamiento de células biológicas con campos eléctricos pulsados

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones 1, 3 y 7, se refiere a métodos para aumentar la actividad metabólica y estimular la proliferación celular de células biológicas a través del uso de tratamiento con campo eléctrico pulsado (PEF), especialmente mediante el uso de un tratamiento con campo eléctrico pulsado de nanosegundos (nsPEF).

### 10 **Antecedentes de la invención**

El procesamiento con campo eléctrico pulsado (PEF) es un campo en crecimiento en el área de las tecnologías electromagnéticas para aplicaciones médicas, ambientales y alimenticias (véase el artículo de Perspective por Buchmann & Matys, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, artículo 265, 16 de octubre de 2019). El tratamiento con PEF se basa en la formación de una diferencia de potencial a través de un material biológico conductor entre dos electrodos, creando un campo eléctrico que depende de la tensión eléctrica aplicada, la forma de los electrodos y el espacio entre los electrodos.

El procesamiento con PEF puede dividirse en el procesamiento con PEF convencional en el intervalo de procesamiento de microsegundos a milisegundos y nanosegundo (nsPEF), en el que se aplican campos eléctricos altos ( $10\text{-}100\text{ kV cm}^{-1}$ ) durante 1-300 ns. nsPEF induce efectos intracelulares, distintos de los efectos pronunciados del PEF convencional en la membrana celular. De este modo, son posibles aplicaciones innovadoras y ventanas de procedimiento novedosas, mientras que se requieren componentes similares para tratamientos tanto en modo discontinuo como continuo. En ambos casos, la electropermeabilización resultante aumenta la transferencia de masa de moléculas e iones. Dependiendo de los parámetros del procedimiento, puede inducirse un efecto reversible o irreversible. La mayoría de las aplicaciones actuales se centran en la electropermeabilización irreversible, que incluye pasteurización no térmica (mínima), tasas de secado mejoradas, rendimientos de extracción aumentados, ablandamiento de tejidos, así como electroquimioterapia y ablación tumoral. La electropermeabilización reversible se usa normalmente en biología molecular para la introducción de moléculas específicas, tales como plásmidos y anticuerpos, *in vivo*. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a los efectos inducidos por PEF/nsPEF todavía son objeto de una intensa investigación.

### 35 **Problemas técnicos subyacentes a la presente invención**

Los presentes inventores han ideado procedimientos mejorados de tratamiento con campo eléctrico pulsado (PEF) y tratamiento con campo eléctrico pulsado de nanosegundos (nsPEF) de células procariotas y eucariotas.

Los procedimientos de la presente invención proporcionan una mayor productividad de las células tratadas debido a una respuesta celular más homogénea; permiten una manipulación tanto intracelular como extracelular de las células; dan como resultado un mayor rendimiento de biomasa y un aumento de la producción de compuestos específicos debido a una aplicación más dirigida y más ubicua del campo eléctrico; permiten la manipulación específica de las células en un amplio intervalo de tamaños; y pueden adaptarse fácilmente a una escala industrial.

Este resumen no describe necesariamente todas las ventajas logradas y todos los problemas resueltos por la presente invención. Los documentos EP 2.147.697; WO 2020/146702; EP 3.290.082 Y RAM ANAND VADLAMANI Y COL: "Nanosecond pulsed electric field induced proliferation and differentiation of osteoblasts and myoblasts", *JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY. INTERFAZ*, vol. 16, n.º 155, 1 de junio de 2019 (01-06-2019) describen sistemas de PEF conocidos para tratar células.

### 50 **Resumen de la invención**

La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones, ejemplos o aspectos según la presente descripción que no se encuentran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un método para aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- 60 (a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,
- (b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y
- 65 (c) aplicar desde 1 hasta 100 pulsos, preferiblemente desde 2 hasta 30 pulsos, de electricidad entre los electrodos, aumentando así la actividad metabólica de las células biológicas;

5 en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns, preferiblemente dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns; en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, preferiblemente de entre 50 ns y 300 ns; y

en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm, preferiblemente de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm.

10 En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a un método para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

15 (a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

(b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y

20 (c) aplicar desde 2 hasta 30 pulsos, preferiblemente desde 2 hasta 12 pulsos, de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;

25 en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns, preferiblemente dentro de un período de tiempo de 3 ns a 15 ns; en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 50 ns y 300 ns, preferiblemente de aproximadamente 100 ns; y en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm, preferiblemente de 5,0 kV/cm a 20 kV/cm.

30 En un tercer aspecto, la presente descripción se refiere a un método para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

35 (a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

(b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y

(c) aplicar desde 1 hasta 100 pulsos, preferiblemente desde 2 hasta 30 pulsos, de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;

40 en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns, preferiblemente dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns; en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, preferiblemente de entre 50 ns y 300 ns; y

45 en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm, preferiblemente de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm;

en donde las células biológicas se seleccionan del grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células de microalgas, células vegetales, células animales y células humanas.

50 En un cuarto aspecto, la presente descripción se refiere a un método para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

55 (a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

(b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y

60 (c) aplicar desde 1 hasta 100 pulsos, preferiblemente desde 2 hasta 30 pulsos, de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;

65 en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns, preferiblemente dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns; en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, preferiblemente de entre 50 ns y 300 ns; y

en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm, preferiblemente de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm;

en donde la etapa (c) se lleva a cabo en un procedimiento de recirculación.

5 En un quinto aspecto, la presente descripción se refiere a un método para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

10 (a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

(b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y

15 (c) aplicar desde 1 hasta 100 pulsos, preferiblemente desde 2 hasta 30 pulsos, de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;

20 en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns, preferiblemente dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns; en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, preferiblemente de entre 50 ns y 300 ns; y

en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm, preferiblemente de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm;

25 en donde la etapa (c) se lleva a cabo en un procedimiento por lotes.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

30 La presente invención se expone en las reivindicaciones 1, 3 y 7.

35 Como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a valores numéricos que oscilan entre el 5 % por debajo del valor numérico indicado y el 5 % por encima del valor numérico indicado. Por ejemplo, una duración de pulso de “aproximadamente 100 ns” abarca una duración de pulso que oscila entre 95 ns y aproximadamente 105 ns.

#### Aspectos de la invención

40 En los siguientes pasajes se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

45 En un primer aspecto, la presente descripción proporciona un método para aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

50 (a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

(b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y

55 (c) aplicar desde 1 hasta 100 pulsos de electricidad entre los electrodos, aumentando así la actividad metabólica de las células biológicas;

en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns,

60 en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, y

en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm.

65 La presente descripción demuestra que los procedimientos descritos de tratamiento con PEF no solo son adecuados para estimular la proliferación de células biológicas, sino que también son adecuados para aumentar la actividad

metabólica de las células biológicas y lograr rendimientos más altos de compuestos endógenos o exógenos específicos.

5 En un segundo aspecto, la presente descripción proporciona un método para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

(a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

10 (b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y

(c) aplicar desde 2 hasta 30 pulsos de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;

15 en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns,

en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 50 ns y 300 ns, y

20 en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm.

25 Sin querer restringirse a una teoría particular, es la opinión de los inventores que los parámetros físicos utilizados en el segundo aspecto conducirán a una mayor productividad debido a una respuesta celular más homogénea; y/o permitirán una manipulación tanto intracelular como extracelular de las células; y/o darán como resultado un mayor rendimiento de biomasa y/o un aumento de la producción de compuestos específicos debido a una aplicación más dirigida y más ubicua del campo eléctrico; y/o permitirán la manipulación específica de las células en el intervalo de tamaño de desde 1  $\mu\text{m}$  hasta 70  $\mu\text{m}$  (preferiblemente desde 1  $\mu\text{m}$  hasta 10  $\mu\text{m}$ ); y/o permitirán la adaptación del procedimiento a una escala industrial.

30 En un tercer aspecto, la presente descripción proporciona un método para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

35 (a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

(b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y

(c) aplicar desde 1 hasta 100 pulsos de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;

40 en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns,

en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, y

45 en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm;

50 en donde las células biológicas se seleccionan del grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células de microalgas, células vegetales, células animales y células humanas.

55 En un cuarto aspecto, la presente descripción proporciona un método para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

(a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

(b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y

60 (c) aplicar desde 1 hasta 100 pulsos de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;

en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns,

en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, y

65

en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm;

5 en donde la etapa (c) se lleva a cabo en un procedimiento de recirculación.

Sin querer restringirse a una teoría particular, es la opinión de los inventores que un procedimiento de recirculación facilita la implementación industrial del procedimiento de tratamiento con campo eléctrico pulsado.

10 En un quinto aspecto, la presente descripción proporciona un método para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

(a) proporcionar células biológicas y suspender las células en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

15 (b) colocar la suspensión entre dos electrodos, y

(c) aplicar desde 1 hasta 100 pulsos de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;

20 en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns,

en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, y

25 en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm;

en donde la etapa (c) se lleva a cabo en un procedimiento por lotes.

30 Sin querer restringirse a una teoría particular, es la opinión de los inventores que un procedimiento por lotes reducirá la tensión mecánica y/o física general que se produce durante el tratamiento de campo eléctrico de las células.

En un ejemplo preferido del primer, tercer, cuarto o quinto aspecto de la descripción, en la etapa (c) se aplican desde 2 hasta 30 pulsos de electricidad.

35 En un ejemplo preferido de cualquier aspecto de la invención, en la etapa (c) se aplican desde 2 hasta 25 pulsos, preferiblemente desde 2 hasta 20 pulsos, más preferiblemente desde 2 hasta 15 pulsos, e incluso más preferiblemente desde 2 hasta 12 pulsos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 pulsos.

40 En un ejemplo preferido del primer, tercer, cuarto o quinto aspecto de la descripción, el aumento de tensión entre los dos electrodos desde 10 % hasta 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad tiene lugar dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns,

45 En un ejemplo preferido de cualquier aspecto de la descripción, el aumento de tensión entre los dos electrodos desde 10 % hasta 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad tiene lugar dentro de un período de tiempo de 2 ns a 10 ns, más preferiblemente dentro de un período de tiempo de 3 ns a 15 ns.

En un ejemplo preferido del primer, tercer, cuarto o quinto aspecto de la descripción, los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 50 ns y 300 ns.

50 En un ejemplo preferido de cualquier aspecto de la descripción, los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 60 ns y 250 ns, preferiblemente de entre 70 ns y 200 ns, más preferiblemente de entre 80 ns y 150 ns, más preferiblemente de entre 90 ns y 125 ns, y lo más preferiblemente de aproximadamente 100 ns.

55 En un ejemplo preferido del primer, tercer, cuarto o quinto aspecto de la invención, los pulsos de electricidad, cuando alcanzan la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm.

En un ejemplo preferido de cualquier aspecto de la descripción, los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 2 kV/cm a 28 kV/cm, preferiblemente de 3 kV/cm a 25 kV/cm, más preferiblemente de 4 kV a 23 kV/cm, y lo más preferiblemente de 5 kV/cm a 20 kV/cm.

60 En un ejemplo preferido del primer, tercer, cuarto o quinto aspecto de la descripción, la diferencia de potencial entre los electrodos es de entre 2 y 300 kV, preferiblemente entre 2 y 250 kV, más preferiblemente entre 2 y 200 kV, más preferiblemente entre 2 y 150 kV, más preferiblemente entre 2 y 100 kV, más preferiblemente entre 2 y 50 kV, incluso más preferiblemente entre 2 y 40 kV, incluso más preferiblemente entre 3 y 30 kV, incluso más preferiblemente entre 4 y 20 kV, y lo más preferiblemente entre 5 y 10 kV.

65

En un ejemplo preferido del primer, segundo, cuarto o quinto aspecto de la descripción, las células biológicas se seleccionan del grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células de microalgas, células vegetales, células animales y células humanas.

5 En un ejemplo preferido de cualquier aspecto de la descripción,

- las células bacterianas se seleccionan del grupo que consiste en *Escherichia coli* y *Corynebacterium glutamicum*;

10 - las células de levadura se seleccionan del grupo que consiste en *Pichiapastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*;

- las células de microalgas se seleccionan del grupo que consiste en *Galdieria sulphuraria* y *Aurantiochytrium limacinum*;

15 - las células vegetales se seleccionan del grupo que consiste en *Hordeum vulgare* y *Oryza sativa*; y

- las células animales se seleccionan del grupo que consiste en *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

20 En un ejemplo preferido del primer, segundo o tercer aspecto de la descripción, la etapa (c) se lleva a cabo en un procedimiento de recirculación.

En un ejemplo preferido del primer, segundo o tercer aspecto de la descripción, la etapa (c) se lleva a cabo en un procedimiento discontinuo.

25 Las siguientes figuras y ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse que limitan el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas en modo alguno.

#### Breve descripción de las figuras

30 **Figura 1: Actividad metabólica de diferentes muestras de *E. coli* determinadas por escisión con FDA (diacetato de fluoresceína).** Las muestras de células *E. coli* recibieron diferentes números de pulsos eléctricos de un tratamiento con campo eléctrico pulsado de nanosegundos (nsPEF) en un procedimiento de recirculación. Todas las muestras de células *E.coli* mostraron un aumento en la actividad metabólica debido al tratamiento con nsPEF.

#### 35 Ejemplos

Ejemplo 1:

40 Se usó un sistema de biorreactor doble para cultivos paralelos. Los cultivos paralelos se inocularon con la misma cantidad de precultivo del mismo tren de alimentación de la célula bacteriana seleccionada *Escherichia coli*. Los cultivos del reactor, así como el precultivo/inóculo, se realizaron en el medio MD-FB modificado y definido:

14,3 g·L<sup>-1</sup> (precultivo) y 28,7 g·L<sup>-1</sup> de glicerol al 85 %,

45 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,70 g·L<sup>-1</sup>,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,2 g·L<sup>-1</sup>,

50 NaCl 2,04 g·L<sup>-1</sup>,

(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 4,1 g·L<sup>-1</sup>,

Antiespumante 205 0,05 g·L<sup>-1</sup>,

55 ddH<sub>2</sub>O 920,8 g·L<sup>-1</sup>,

0,8 mL de disolución madre de MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (300 g·L<sup>-1</sup>),

10,0 mL de solución madre de citrato de Fe(III) (10,0 g·L<sup>-1</sup>),

60 10 mL de disolución madre de Na-EDTA \* 2 H<sub>2</sub>O (0,84 g·L<sup>-1</sup>),

2,8 mL de disolución madre de HCl de tiamina (45,0 g·L<sup>-1</sup>),

65 2,9 mL de disolución madre de TE (CoCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O, 0,16 g·L<sup>-1</sup>,

MnCl<sub>2</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O, 1,42 g·L<sup>-1</sup>,

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,01 g·L<sup>-1</sup>,

5 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 0,02 g·L<sup>-1</sup>,

CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 1,44 g·L<sup>-1</sup>,

10 AlCl<sub>3</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O 0,04 g·L<sup>-1</sup>,

ZnSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 0,87 g·L<sup>-1</sup>,

CSO<sub>4</sub> \* 5 H<sub>2</sub>O, 1,55 g·L<sup>-1</sup>,

15 NiCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O, 0,01 g·L<sup>-1</sup>

Las condiciones de cultivo se resumen en la tabla 1:

Tabla 1:

20

Parámetro	Valor	Unidad
Volumen de trabajo del reactor	10	[L]
pH	7	[-]
Aireación (aire estéril)	3	[vvm]
Temperatura	30,0	[°C]
Presión	0,5	[bar]
Agitador	1200	[rpm]

25

30

Tras el tratamiento, la actividad metabólica se expresó como la tasa y la cantidad total de escisión celular individual por FDA (diacetato de fluoresceína). Se usaron protocolos de tinción convencionales en los experimentos y se analizaron en un citómetro de flujo (Ehgartner D, Herwig C, Neutsch L. At-line determination of spore inoculum quality in *Penicillium chrysogenum* bioprocesses. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100(12):5363-73; Söderström BE. Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biol Biochem.* 1977; 9:59-63; y Pekarsky, A., Veiter, L., Rajamanickam, V. y col. Production of a recombinant peroxidase in different glyco-engineered *Pichia pastoris* strains: a morphological and physiological comparison. *Microb Cell Fact* 17, 183 (2018)).

35

40

La tabla 2 resume las condiciones de nsPEF para el control y cinco muestras diferentes.

Tabla 2:

45

N.º de muestra	010	012	016	018	019	0112
Diferencia de potencial [kV]		10	10	10	10	10
Longitud de pulso [ns]	Control	100	100	100	100	100
Pulsos de electricidad por pase de tratamiento [-]		4	6	8	10	12
Distancia de electrodos [cm]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

50

Se detectó un aumento en la actividad metabólica para todas las muestras tratadas (véase la **Figura 1**). Sorprendentemente, se observó el mayor aumento de la actividad metabólica para la muestra n.º 12, que recibió el menor número de pulsos (es decir, 4 pulsos). La muestra n.º 012 mostró un aumento de la actividad metabólica en comparación con la muestra de control 010 de 90 UIF a 120 UIF, que corresponde a un aumento de aproximadamente el 30 %

55

60

Ejemplo 2:

Se usó un sistema de biorreactor doble para cultivos paralelos. Los cultivos paralelos se inocularon con la misma cantidad de precultivo del mismo tren de alimentación de la célula de levadura seleccionada *Pichia pastoris*. Los cultivos del reactor se realizaron en el medio modificado y definido (Hellwig y col., 2001):

65

## ES 2 955 459 T3

35,29 g·L<sup>-1</sup> de Glicerol al 85 %,

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,86 g·L<sup>-1</sup>,

5 KOH 0,64 g·L<sup>-1</sup>,

MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 2,32 g·L<sup>-1</sup>,

10 CaSO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0,17 g·L<sup>-1</sup>,

Na-EDTA · 2 H<sub>2</sub>O, 0,6 g·L<sup>-1</sup>,

NaCl 0,22 g·L<sup>-1</sup>,

15 Antiespumante 205 0,1 g·L<sup>-1</sup>,

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %) 7,19 g·L<sup>-1</sup>,

20 Agua 860 g·L<sup>-1</sup>,

Disolución madre de PTM1 4,35 mL·L<sup>-1</sup> (CuSO<sub>4</sub> 6,0 g·L<sup>-1</sup>, NaI 0,08 g·L<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 3,0 g·L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0,2 g·L<sup>-1</sup>, CoCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 0,5 g·L<sup>-1</sup>, ZnCl<sub>2</sub> 20,0 g·L<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 65,0 g·L<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %) 50 mL·L<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,02 g·L<sup>-1</sup>),

25 Disolución madre de biotina 500 x 4,35 mL·L<sup>-1</sup> (0,2 g·L<sup>-1</sup>)

Las condiciones de cultivo se resumen en la tabla 3:

Tabla 3:

30

Parámetro	Valor	Unidad
Volumen de trabajo del reactor	10	[L]
pH	7	[-]
Aireación (aire estéril)	3	[vvm]
Temperatura	30,0	[°C]
Presión	0,5	[bar]
Agitador	800	[rpm]

35

40

Tras el tratamiento, la actividad metabólica aumentó en cada célula individual, basándose en los parámetros analizados.

45

La tabla 4 resume las condiciones de nsPEF para el control y cuatro muestras diferentes.

Tabla 4:

50

N.º de muestra	0	1	2	3	4
Diferencia de potencial [kV]		5	5	5	5
Longitud de pulso [ns]	Control	100	100	100	100
Pulsos de electricidad por pase de tratamiento [-]		2	3	4	6
Distancia de electrodos [cm]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
- 5 (a)suspender células biológicas en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,  
 (b)colocar la suspensión entre dos electrodos, y  
 10 (c)aplicar desde 1 hasta 100 pulsos, preferiblemente desde 2 hasta 30 pulsos, de electricidad entre los electrodos, aumentando así la actividad metabólica de las células biológicas;
- en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde 10 % hasta 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns, preferiblemente dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns; en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, preferiblemente de entre 50 ns y 300 ns; y en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm, preferiblemente de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde las células biológicas se seleccionan del grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células de microalgas, células vegetales, células animales y células humanas.
- 20 3. Un método *in vitro* para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
- 25 (a)suspender células biológicas en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,  
 (b)colocar la suspensión entre dos electrodos, y  
 30 (c)aplicar desde 1 hasta 100 pulsos, preferiblemente desde 2 hasta 30 pulsos, de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;
- en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde el 10 % hasta el 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns, preferiblemente dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns; en donde los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, preferiblemente de entre 50 ns y 300 ns; y en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm, preferiblemente de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm;
- 35 en donde las células biológicas se seleccionan del grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células de microalgas, células vegetales y células animales, en donde las células animales se seleccionan del grupo que consiste en *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.
- 40 4. El método según la reivindicación 2 o 3, en donde
- 45 -las células bacterianas se seleccionan del grupo que consiste en *Escherichia coli* y *Corynebacterium glutamicum*;  
 -las células de levadura se seleccionan del grupo que consiste en *Pichiapastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*;  
 50 -las células de microalgas se seleccionan del grupo que consiste en *Galdieria sulphuraria* y *Aurantiochytrium limacinum*;  
 -las células vegetales se seleccionan del grupo que consiste en *Hordeum vulgare* y *Oryza sativa*; y  
 -las células animales se seleccionan del grupo que consiste en *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.
- 55 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa (c) se lleva a cabo en un procedimiento de recirculación adaptado a una escala industrial.
- 60 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa (c) se lleva a cabo en un procedimiento discontinuo.
7. Un método *in vitro* para estimular la proliferación celular y/o aumentar la actividad metabólica de las células biológicas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
- 65 (a)suspender las células biológicas en un líquido eléctricamente conductor, formando así una suspensión,

(b)colocar la suspensión entre dos electrodos, y  
(c)aplicar desde 1 hasta 100 pulsos, preferiblemente desde 2 hasta 30 pulsos, de electricidad entre los electrodos, estimulando así la proliferación celular;

- 5 en donde tiene lugar un aumento de tensión entre los dos electrodos desde 10 % hasta 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de electricidad dentro de un período de tiempo de 0,1 a 100 ns, preferiblemente dentro de un período de tiempo de 1 ns a 25 ns; en donde
- 10 los pulsos de electricidad tienen una duración de pulso de entre 5 y 5000 ns, preferiblemente de entre 50 ns y 300 ns; y en donde los pulsos de electricidad, cuando se alcanza la tensión objetivo, tienen una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm, preferiblemente de 1,0 kV/cm a 30 kV/cm;
- en donde la etapa (c) se lleva a cabo en un procedimiento de recirculación adaptado a una escala industrial.
- 15 8. El método según la reivindicación 7, en donde las células biológicas se seleccionan del grupo que consiste en células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células de microalgas, células vegetales, células animales y células humanas.
- 20 9. El método según la reivindicación 8, en donde
- las células bacterianas se seleccionan del grupo que consiste en *Escherichia coli* y *Corynebacterium glutamicum*;
- las células de levadura se seleccionan del grupo que consiste en *Pichiapastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*;
- 25 -las células de microalgas se seleccionan del grupo que consiste en *Galdieria sulphuraria* y *Aurantiochytrium limacinum*;
- las células vegetales se seleccionan del grupo que consiste en *Hordeum vulgare* y *Oryza sativa*; y
- las células animales se seleccionan del grupo que consiste en *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.
- 30

Figura 1

