

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, el dispositivo comprende:
 - 5 (a) un primer electrodo que comprende una primera entrada, una primera salida y un primer lumen que comprende una dimensión de sección transversal mínima;
 - (b) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen que comprende una dimensión de sección transversal mínima; y
 - (c) una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, en la que la
- 10 zona de electroporación comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a aproximadamente 100 μm , donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme;
- donde la primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos.
- 15 2. El dispositivo de la reivindicación 1, donde una sección transversal de la zona de electroporación es una forma seleccionada de un grupo que consiste en circular, disco, elíptica, polígono regular, polígono irregular, forma curvilínea, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.
3. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, donde la zona de electroporación tiene una sección transversal sustancialmente circular.
- 20 4. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal mínima de entre 0,1 mm y 50 mm.
5. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-4, donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal de entre alrededor de 7850 μm^2 y alrededor de 2000 mm².
6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la zona de electroporación tiene
- 25 una longitud de entre 0,1 mm y 50 mm.
7. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde un lumen de cualquiera de los primeros electrodos y/o el segundo electrodo tiene una dimensión de sección transversal mínima de entre 0,01 mm y 500 mm.
8. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde una relación entre la dimensión de
- 30 la sección transversal mínima de un lumen del primer o segundo electrodo y la dimensión de la sección transversal mínima de la zona de electroporación se encuentra entre 1:10 y 10:1.
9. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde una relación entre la dimensión mínima de la sección transversal de la zona de electroporación y la longitud de la zona de electroporación está entre 1:100 y 100:1.
- 35 10. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde una relación de un área de sección transversal de un lumen de cualquiera de los primeros electrodos y/o el segundo electrodo al área

de la sección transversal de la zona de electroporación se encuentra entre 1:10 y 10:1.

11. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además un primer depósito en comunicación de fluidos con la primera entrada y/o un segundo depósito en comunicación fluida con la segunda salida.

5 12. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además un tercer depósito en comunicación de fluidos con el primer lumen o el segundo lumen.

13. El dispositivo de la reivindicación 12, donde el primer electrodo o el segundo electrodo tiene una entrada o salida adicional para la comunicación fluídica con el tercer depósito.

10 14. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el dispositivo comprende además una o más zonas de electroporación adicionales.

15. Un sistema para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, comprende:

(a) un dispositivo, que comprende:

15 (i) un primer electrodo que comprende una primera entrada, una primera salida y un primer lumen que comprende una dimensión de sección transversal mínima;

(ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen que comprende una dimensión de sección transversal mínima; y

20 (iii) una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a aproximadamente 100 μm , donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme;

donde la primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos; y

25 (b) una fuente de potencial eléctrico, en la que el primer electrodo y el segundo electrodo del dispositivo están en contacto operativo de forma removible con la fuente de potencial eléctrico.

16. El sistema de la reivindicación 15, que comprende además un primer depósito en comunicación de fluidos con la primera entrada.

17. El sistema de la reivindicación 15 o 16, que comprende además un segundo depósito en comunicación de fluidos con la segunda salida.

30 18. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 15-17, que comprende además un tercer depósito en comunicación de fluidos con un lumen de cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo, donde cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo tiene una entrada adicional para la comunicación de fluidos con el tercer depósito.

35 19. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 15-18, que comprende una fuente de administración de fluido en comunicación de fluidos con la primera entrada, donde la fuente de administración de fluido está configurada para suministrar el líquido y/o la pluralidad de células en

suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.

20. El sistema de cualquiera de reivindicaciones 15-19, que comprende además un controlador acoplado operativamente a la fuente de potencial eléctrico para entregar pulsos de voltaje al primer electrodo y al segundo electrodo, donde los pulsos de voltaje generan una diferencia de potencial eléctrico entre el primer electrodo y el segundo electrodo, lo que produce, de esta manera, un campo eléctrico en la zona de electroporación.

21. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 15-20, donde el dispositivo comprende además una o más zonas de electroporación adicionales.

22. El sistema de la reivindicación 21, que comprende además un alojamiento configurado para activar las zonas de electroporación en paralelo, en serie o desplazados en el tiempo, donde el alojamiento comprende adicionalmente una bandeja que alberga una pluralidad de dispositivos de electroporación, donde la bandeja se modifica con dos electrodos en rejilla, donde el primer electrodo en rejilla se aísla de forma eléctrica de un segundo electrodo en rejilla, donde un exterior del primer electrodo de cada uno de la pluralidad de dispositivos es removible en contacto operativo con cualquiera de un primer electrodo accionado por resorte, un primer electrodo mecánicamente conectado o un primer electrodo inductivamente conectado, donde un exterior del segundo electrodo de cada uno de la pluralidad de dispositivos es removible en contacto operativo con cualquiera de un segundo electrodo accionado por resorte, un segundo electrodo mecánicamente conectado o un segundo electrodo inductivamente acoplado, donde cada uno de la pluralidad de dispositivos ingresa, de forma removible, al alojamiento a través de una abertura en los electrodos en rejilla, donde cualquiera del primer electrodo activado por resorte, el primer electrodo mecánicamente conectado o el primer electrodo inductivamente conectado de cada dispositivo se encuentra en contacto operativo con el primer electrodo en rejilla y cualquiera del segundo electrodo accionado por resorte, el segundo electrodo mecánicamente conectado o el segundo electrodo inductivamente conectado de cada dispositivo se encuentra en contacto operativo con el segundo electrodo en rejilla, donde los electrodos en rejilla se conectan con la fuente de potencial eléctrico.

23. El sistema de la reivindicación 22, donde la fuente de potencial eléctrico administra pulsos de voltaje a los electrodos de rejilla, donde el primer electrodo de rejilla se energiza a un voltaje aplicado particular mientras que el segundo electrodo de rejilla se energiza a un voltaje aplicado particular, donde cada uno de la pluralidad de dispositivos es energizado por los electrodos de rejilla con un pulso de voltaje aplicado idéntico de manera que la magnitud de un campo eléctrico generado dentro de cada una de las al menos una zona de electroporación de cada dispositivo es sustancialmente idéntica.

24. El sistema de la reivindicación 23, donde la fuente de potencial eléctrico incluye circuitos o programación adicionales configurados para modular la entrega de pulsos de voltaje a los electrodos de la rejilla, donde cada uno de la pluralidad de dispositivos recibe un voltaje diferente de los

electrodos de la rejilla, donde una magnitud de un campo eléctrico generado dentro de cada una de las al menos una zona de electroporación de cada dispositivo es diferente.

25. Un sistema para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, que comprende:

- 5 (a) un dispositivo, que comprende:
 - (i) un primer electrodo que comprende una primera entrada, una primera salida y un primer lumen;
 - (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen;
 - (iii) una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida están en
10 comunicación de fluidos con el primer lumen, donde la tercera entrada y la tercera salida cortan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida;
 - (iv) una cuarta entrada y una cuarta salida, donde la cuarta entrada y la cuarta salida están en comunicación de fluidos con el segundo lumen, donde la cuarta entrada y la cuarta salida cortan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida; y
 - 15 (v) una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación tiene una longitud de entre 0,1 mm y 50 mm y comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a aproximadamente 100 μm , donde un área de sección transversal de la zona de electroporación es sustancialmente uniforme;
- donde una relación de una dimensión de sección transversal mínima del primer lumen a la dimensión
20 de sección transversal mínima de la zona de electroporación está entre 1:10 y 10:1, donde una relación de una dimensión de sección transversal mínima del segundo lumen a la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación está entre 1:10 y 10:1, y donde la primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos; y
- (b) una fuente de potencial eléctrico, donde el primer electrodo y el segundo electrodo del dispositivo
25 están en contacto operativo de forma removible con la fuente de potencial eléctrico.

26. Un método de administración electromecánica de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido que fluye, el método comprende:

- (a) proporcionar un dispositivo que comprende:
 - (i) un primer electrodo que comprende una primera salida, una primera entrada y un primer lumen
30 que comprende una dimensión de sección transversal mínima;
 - (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda salida, una segunda entrada y un segundo lumen que comprende una dimensión de sección transversal mínima; y
 - (iii) una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a
35 alrededor de 100 μm , donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme;

y donde la primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos;

(b) aplicar una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodos, produciendo así un campo eléctrico en la zona de electroporación; y

- 5 (c) pasar la pluralidad de células y la composición a través de la zona de electroporación, lo que mejora así la permeabilidad de la pluralidad de células e introduciendo la composición en la pluralidad de células.

27. El método de la reivindicación 26, donde la pluralidad de células se encuentra en un líquido diferente al de la composición antes de la etapa (b).

- 10 28. El método de la reivindicación 26 o 27, donde el paso (b) comprende aplicar una presión positiva impulsada por fluido.

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-28, donde ninguno del primer lumen, segundo lumen o zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal mínima que haga que una dimensión de sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el
15 líquido se comprima temporalmente.

30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-29, donde una velocidad de flujo de un líquido y/o la pluralidad de células en suspensión suministradas desde una fuente de suministro de fluido desde el primer lumen hasta la zona de electroporación está entre 0,001 mL/min y 1000 mL/min, donde la fuente de suministro de fluido está configurada para suministrar el líquido y/o la pluralidad
20 de células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.

31. El método de cualquiera de los párrafos 26-30, donde un número de Reynolds de un líquido y/o la pluralidad de células en suspensión administrada desde una fuente de administración de fluido desde el primer lumen a la zona de la electroporación es de entre 0,04 y $2,43 \times 10^4$, donde la fuente de administración de fluido está configurada para administrar el líquido y/o la pluralidad de células
25 en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.

32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-31, donde una velocidad máxima de un líquido y/o la pluralidad de células en suspensión administradas desde una fuente de administración de fluido desde el primer lumen a la zona de electroporación es entre 5×10^{-5} m/s y 32.7 m/s, donde la fuente de administración de fluido está configurada para suministrar el líquido y/o la pluralidad de
30 células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.

33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-32, donde las velocidades de cizallamiento de un líquido y/o la pluralidad de células en suspensión administradas desde una fuente de administración de fluido desde el primer lumen a la zona de electroporación se encuentran entre $0,1 \text{ s}^{-1}$ y $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar el líquido
35 y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen hacia la segunda salida.

34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-33, donde una presión pico de un líquido y/o

la pluralidad de células en suspensión administrada desde una fuente de administración de fluido desde el primer lumen a la zona de la electroporación es de entre 1×10^{-3} Pa y $9,5 \times 10^4$ Pa, donde la fuente de administración de fluido está configurada para administrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.

- 5 35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-34, donde una velocidad promedio de un líquido y/o la pluralidad de células en suspensión administradas desde una fuente de administración de fluido desde el primer lumen a la zona de electroporación es entre $1,5 \times 10^{-5}$ m/s y 15,9 m/s, donde la fuente de administración de fluido está configurada para suministrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.
- 10 36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-35, donde una viscosidad cinemática de un líquido y/o la pluralidad de células en suspensión administradas desde una fuente de administración de fluido desde el primer lumen a la zona de electroporación es entre 1×10^{-6} m²/s y 15×10^{-4} m²/s, donde la fuente de administración de fluido está configurada para suministrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.
- 15 37. El método de cualquiera de los párrafos 26-36, donde un tiempo de residencia en la zona de electroporación de la pluralidad de células suspendidas en el líquido está entre 0,5 ms y 50 ms.
38. El método de la reivindicación 26, donde pasar la pluralidad de células y la composición a través de la zona de electroporación induce una tensión mecánica en el líquido que fluye, lo que mejora así aún más la permeabilidad de la pluralidad de células e introduciendo la composición en la pluralidad
- 20 de células.
39. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-37, donde el campo eléctrico se produce mediante pulsos de voltaje.
40. El método de la reivindicación 39, donde los pulsos de voltaje energizan el primer electrodo a un primer voltaje aplicado y el segundo electrodo se energiza a un segundo voltaje aplicado, aplicando
- 25 así una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodos.
41. El método de reivindicación 39 o 40, donde los pulsos de voltaje tienen cada uno una amplitud entre -3 kV y 3 kV.
42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 39-41, donde los pulsos de voltaje tienen una duración de entre 0,01 ms y 1000 ms.
- 30 43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 39-42, donde los pulsos de voltaje se aplican al primer y segundo electrodos a una frecuencia entre 1 Hz y 50 000 Hz.
44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 39-43, donde el pulso de voltaje comprende una forma de onda seleccionada del grupo que consiste en CC, cuadrado, pulso, bipolar, sinusoidal, rampa, bipolar asimétrico, arbitrario y cualquier superposición o combinaciones de estos.
- 35 45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 39-44, donde el campo eléctrico generado a partir de los pulsos de voltaje tiene una magnitud de entre 1 V/cm y 50 000 V/cm.

46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 39-45, donde un ciclo de trabajo de los pulsos de voltaje se encuentra entre 0,001 % y 100 %.
47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-46, donde el líquido tiene una conductividad de entre 0,001 mS/cm y 500 mS/cm.
- 5 48. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-47, donde la temperatura del líquido se encuentra entre 0 °C y 50 °C.
49. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-48, que comprende además almacenar la pluralidad de células en un amortiguador de recuperación después de la administración electromecánica de la composición.
- 10 50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-49, donde la composición comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en agentes terapéuticos, vitaminas, nanopartículas, moléculas cargadas, moléculas no cargadas, ADN, ARN, complejo CRISPR-Cas, proteínas, enzimas, péptidos, virus, polímeros, una ribonucleoproteína, polisacáridos, nucleasas modificadas genéticamente, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN),
- 15 nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas autoguiadas, meganucleasas (MN), megaTAL y transposones.
51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-50, donde la composición tiene una concentración en el líquido de entre 0,0001 µg/mL y 1000 µg/mL.
52. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-51, donde la pluralidad de células comprende
- 20 células eucariotas, células vegetales, células procariotas o células sintéticas.
53. El método de la reivindicación 52, donde la pluralidad de células comprende células humanas o células animales.
54. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-53, donde la pluralidad de células comprende células primarias, células de una línea celular, células adherentes, células no estimuladas, células
- 25 estimuladas, células activadas, células madre, células sanguíneas, células de ovario de hámster chino (CHO), células inmunitarias, glóbulos rojos o células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
55. El método de la reivindicación 54, donde la pluralidad de células comprende células inmunitarias adaptativas y/o células inmunitarias innatas.
- 30 56. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-54, donde la pluralidad de células comprende células presentadoras de antígeno (APC), monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células citolíticas (NK), células Jurkat, células THP-1, células de riñón embrionario humano (HEK-293) o células madre embrionarias (ESC), células madre mesenquimales (MSC) o células madre hematopoyéticas (HSC).
- 35 57. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-54, donde la pluralidad de células comprende células citolíticas humanas primarias, células madre pluripotentes inducidas por humanos primarios

(iPSC), macrófagos humanos primarios o monocitos humanos primarios.

58. Un kit para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, que comprende:

(a) una pluralidad de dispositivos, cada uno de la pluralidad de dispositivos comprende:

- 5 (i) un primer electrodo que comprende una primera salida, una primera entrada y un primer lumen que comprende una dimensión de sección transversal mínima;
- (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda salida, una segunda entrada y un segundo lumen que comprende una dimensión de sección transversal mínima; y
- 10 (iii) una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a alrededor de 100 μm , donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme; y

donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico al primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación; y

- 15 (b) una pluralidad de estructuras externas configuradas para contener la pluralidad de dispositivos, donde cada una de la pluralidad de estructuras externas comprende:

- (i) un alojamiento configurado para acoplar el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del al menos un dispositivo;
- (ii) una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo; y
- 20 (iii) una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.

59. Un kit para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, que comprende:

(a) una pluralidad de dispositivos, cada uno de la pluralidad de dispositivos de cualquiera de las reivindicaciones 1-14; y

- 25 (b) una pluralidad de estructuras externas configuradas para contener la pluralidad de dispositivos, donde cada una de la pluralidad de estructuras externas comprende:

- (i) un alojamiento configurado para acoplar el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del al menos un dispositivo;
- (ii) una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo; y
- 30 (iii) una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.