

## **DISPOSITIVOS, SISTEMAS Y KITS PARA LA ADMINISTRACIÓN ELECTROMECAÁNICA Y MÉTODOS PARA USARLOS**

### **DECLARACIÓN DE INVESTIGACIÓN PATROCINADA FEDERALMENTE**

- 5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo la Subvención SBIR Fase I n.º 1747096 y la Subvención SBIR Fase II n.º 1853194 de la Fundación Nacional para la Ciencia (NSF, por sus siglas en inglés). El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- 10 La inmunoterapia se encuentra actualmente a la vanguardia tanto de la investigación científica básica como de la aplicación clínica impulsada por productos farmacéuticos. Esta tendencia se debe en parte a los recientes avances en la modificación genética dirigida y al uso ampliado de la edición del complejo CRISPR/Cas para el desarrollo terapéutico. Para identificar modificaciones genéticas de interés terapéutico, las organizaciones de investigación a menudo tienen que examinar miles de variantes genéticas, que pueden incluir la modificación de un gen endógeno o la
- 15 inserción de un gen modificado genéticamente. Este proceso de descubrimiento de fármacos es laborioso, lo que requiere un trabajo manual significativo dentro del laboratorio, lo que crea un estancamiento en toda la industria debido a la falta de tecnologías adecuadas de alto rendimiento. Las actividades de investigación y desarrollo biotecnológicas y farmacéuticas se han desplazado hacia la automatización de casi todos los pasos del proceso. Los flujos de trabajo incluyen robots
- 20 de manipulación de líquidos, activados por un sofisticado software de control de laboratorio, para permitir un descubrimiento de alto rendimiento. Sin embargo, las etapas de transfección se limitan a un bajo rendimiento, tecnologías de baja eficacia y sistemas de uso intensivo de usuarios que no se pueden automatizar. Las plataformas automatizadas para la transfección no solo tienen el potencial de reducir sustancialmente los costos del proceso, sino que también aumentan la
- 25 viabilidad celular y la cantidad de células diseñadas con éxito, al tiempo que reducen el tiempo de descubrimiento, que es fundamental en el espacio competitivo de la inmunoterapia. Una fuerza única de transfección mediante electroporación es el suministro de ARN. Las técnicas virales existentes para administrar ADN parecen estar a la par con la transfección por medio de electroporación, pero existe una falta de virus de ARN no retrovirales de calidad GMP. Por lo tanto,
- 30 las empresas con plataformas de electroporación han sido objeto de colaboraciones y adquisiciones con el fin de suministrar ARNm a las células. Los métodos actuales de transferencia de genes de alto rendimiento requieren típicamente el uso de suministro viral (por ejemplo, vectores lentivirales), en el que las partículas virales infectan una célula y transducen la modificación genética de interés. Si bien se puede aplicar una metodología
- 35 viral a sistemas automatizados de alto rendimiento, existen limitaciones en la producción que extienden los plazos para los esfuerzos de investigación: los vectores virales deben clonarse,

transfectarse en una línea de producción viral y luego deben purificarse las partículas virales. Este proceso puede llevar meses a las organizaciones de investigación, lo que afecta significativamente sus cronogramas para el desarrollo de la plataforma y, al mismo tiempo, aumenta el costo del descubrimiento de fármacos. Además, el uso de la transducción viral para la transferencia de genes no es susceptible de modificación genética para todos los tipos de células, ya que algunas células (tales como los subconjuntos de células inmunitarias específicas) son resistentes a la infección viral. Por lo tanto, dentro de la industria de la biotecnología existe una necesidad insatisfecha de tener un sistema automatizado de alto rendimiento para la transferencia de genes que no dependa de mecanismos de administración viral.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención presenta un dispositivo para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido (por ejemplo, un líquido que fluye a través del dispositivo), el dispositivo incluye un primer y un segundo electrodo y una zona de electroporación. El primer electrodo incluye una primera entrada, una primera salida y un primer lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima, y el segundo electrodo incluye una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima. La zona de electroporación está dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada y tiene una dimensión de sección transversal mínima que es mayor de alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm, o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm), donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme. La primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos.

En otro aspecto, la invención presenta un dispositivo para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido (por ejemplo, un líquido que fluye a través del dispositivo), el dispositivo incluye un primer y un segundo electrodo y una zona de electroporación. El primer electrodo incluye una primera entrada, una primera salida y un primer lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima, y el segundo electrodo incluye una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima. La zona de electroporación está dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada y tiene una dimensión de sección transversal mínima que es mayor de alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm, o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm,

alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm), donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme. La primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos. La transfección de células puede ocurrir dentro de la zona de electroporación a través de un mecanismo de suministro electromecánico que es distinto del mecanismo de suministro en los sistemas de electroporación estática.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, una sección transversal de la zona de electroporación es una forma seleccionada de un grupo que consiste en una forma circular, de disco, elíptica, polígono regular, polígono irregular, forma curvilínea, estrella, paralelogramo, trapezoidal y forma irregular (por ejemplo, una forma que tiene protuberancias, tales como ranuras o surcos que sobresalen, polígonos irregulares y/o formas curvilíneas). En algunas modalidades, la sección transversal de la zona de electroporación varía a lo largo de la longitud (es decir, el eje longitudinal o la dirección del flujo) de la zona de electroporación. En algunas modalidades, la forma es consistente a lo largo de la longitud pero varía en posición con respecto al eje longitudinal central a lo largo de la longitud de la zona de electroporación (por ejemplo, la forma de la sección transversal gira alrededor del eje central desde un extremo de la zona de electroporación al otro, tal como una hélice). En modalidades particulares, la zona de electroporación tiene una sección transversal sustancialmente circular. En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene un área de sección transversal de entre alrededor de  $7850 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $2000 \text{ mm}^2$  (por ejemplo, entre alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $1 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $10 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $9000 \mu\text{m}^2$  y  $5 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $1 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $10 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $1 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $3 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $20 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $10 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $50 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $25 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $75 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $50 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $75 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $200 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $100 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $350 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $150 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $500 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $300 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $750 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $500 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $1000 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $750 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $1500 \text{ mm}^2$ , o entre alrededor de  $950 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $2000 \text{ mm}^2$ , por ejemplo, alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$ , alrededor de  $9000 \mu\text{m}^2$ , alrededor de  $1 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $5 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $10 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $15 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $20 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $25 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $50 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $60 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $75 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $80 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $150 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $200 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $250 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $300 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $350 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $400 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $450 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $500 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $600 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $700 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $800 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $900 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1000 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1100 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1200 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1300 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1400 \text{ mm}^2$ ,

alrededor de 1500 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1600 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1700 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1800 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1900 mm<sup>2</sup> o alrededor de 2000 mm<sup>2</sup>).

En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene una longitud de entre 0,005 mm y 50 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,005 mm y 25 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,1 mm y 50 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 25 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 50 mm, entre 15 mm y 25 mm, entre 20 mm y 30 mm, entre 25 mm y 40, o entre 30 mm y 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 9 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 45 mm o alrededor de 50 mm). En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene una longitud de entre 0,005 mm y 25 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 10 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 10 mm, entre 7 mm y 15 mm, entre 10 mm y 20 mm o entre 15 mm y 25 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 12 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 18 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 23 mm o alrededor de 25 mm).

En algunas modalidades, un lumen de cualquiera del primer electrodo y/o el segundo electrodo tiene una dimensión de sección transversal mínima de entre 0,01 mm y 500 mm (por ejemplo, entre 0,01 mm y 0,1 mm, entre 0,01 mm y 0,5 mm, entre 0,01 mm y 10 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 50 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 100 mm, entre 15 mm y 30 mm, entre 20 mm y 40 mm, entre 20 mm y 200 mm, entre 30 mm y 50, entre 30 mm y 300 mm, entre 45 mm y 60 mm, entre 50 mm y 100 mm, entre 50 mm y 500 mm, entre 75 mm y 150 mm, entre 75 mm y 300 mm, entre 100 mm y 200 mm, entre 100 mm y 500 mm, entre 150 mm y 300 mm, entre 200 mm y 400 mm, entre 300 mm y 450 mm o entre 350 mm y 500 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15

mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 45 mm, alrededor de 50 mm, alrededor de 60 mm, alrededor de 70 mm, alrededor de 80 mm, alrededor de 90 mm, alrededor de 100 mm, alrededor de 150 mm, alrededor de 200 mm, alrededor de 250 mm, alrededor de 300 mm, alrededor de 350 mm, alrededor de 400 mm, alrededor de 450 mm o alrededor de 500 mm).

En algunas modalidades, una relación de la dimensión de sección transversal mínima de un lumen del primer o segundo electrodo con respecto a la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación es entre 1:10 y 10:1 (por ejemplo, entre 1:10 y 1:5, entre 1:10 y 1:2, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 2:3, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 6:1, entre 2:3 y 2:1, entre 2:3 y 4:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 3:1, entre 1:1 y 10:1, entre 3:2 y 3:1, entre 3:2 y 6:1, entre 2:1 y 3:1, entre 2:1 y 5:1, entre 5:2 y 5:1, entre 3:1 y 4:1, entre 7:2 y 5:1, entre 7:2 y 10:1, entre 4:1 y 8:1, entre 5:1 y 10:1 o entre 7:1 y 10:1, por ejemplo, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 2:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 9:2, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1).

En algunas modalidades, una relación de la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación con respecto a la longitud de la zona electroporación es entre 1:100 y 100:1 (por ejemplo, entre 1:100 y 1:50, entre 1:100 y 1:25, entre 1:100 y 1:10, entre 1:100 y 1:1, entre 1:50 y 1:5, entre 1:50 y 1:2, entre 1:50 y 2:1, entre 1:25 y 1:10, entre 1:25 y 1:5, entre 1:25 y 1:1, entre 1:25 y 10:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 5:1, entre 1:1 y 10:1, entre 1:1 y 50:1, entre 1:1 y 100:1, entre 2:1 y 5:1, entre 2:1 y 20:1, entre 3:1 y 10:1, entre 4:1 y 25:1, entre 5:1 y 50:1, entre 10:1 y 50:1, entre 40:1 y 80:1, entre 50:1 y 100:1, o entre 75:1 y 90:1, por ejemplo, alrededor de 1:100, alrededor de 1:75, alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 20:1, alrededor de 30:1, alrededor de 40:1, alrededor de 50:1, alrededor de 60:1, alrededor de 70:1, alrededor de 80:1, alrededor de 90:1 o alrededor de 100:1).

En algunas modalidades, una relación de un área de sección transversal de un lumen de cualquiera del primer electrodo y/o el segundo electrodo con respecto al área de sección transversal de la zona de electroporación es entre 1:100 y 100:1 (por ejemplo, entre 1:100 y 1:50, entre 1:100 y 1:25, entre 1:100 y 1:10, entre 1:100 y 1:1, entre 1:50 y 1:5, entre 1:50 y 1:2, entre 1:50 y 2:1, entre 1:25 y 1:10, entre 1:25 y 1:5, entre 1:25 y 1:1, entre 1:25 y 10:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 5:1, entre 1:1 y 10:1, entre 1:1 y 50:1, entre 1:1 y 100:1,

entre 2:1 y 5:1, entre 2:1 y 20:1, entre 3:1 y 10:1, entre 4:1 y 25:1, entre 5:1 y 50:1, entre 10:1 y 50:1, entre 40:1 y 80:1, entre 50:1 y 100:1, o entre 75:1 y 90:1, por ejemplo, alrededor 1:100, alrededor 1:75, alrededor 1:50, alrededor de 1:25, alrededor 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 20:1, alrededor de 30:1, alrededor de 40:1, alrededor de 50:1, alrededor de 60:1, alrededor de 70:1, alrededor de 80:1, alrededor de 90:1 o alrededor de 100:1).

En algunas modalidades, el dispositivo incluye además un primer depósito (por ejemplo, una bolsa de muestra) en comunicación de fluidos con la primera entrada y/o un segundo depósito (por ejemplo, una bolsa de recolección, por ejemplo, una bolsa de recuperación) en comunicación de fluidos con la segunda salida. Además, el dispositivo puede incluir un tercer depósito en comunicación de fluidos con el primer lumen o el segundo lumen. El tercer depósito puede contener uno o más reactivos para transfección (por ejemplo, reactivos que tienen una composición seleccionada para la transfección), por ejemplo, una suspensión de carga útil, tal como una composición genética, para ser administrada a las células. En algunas modalidades, el tercer depósito está configurado para contener un amortiguador, aditivo amortiguador y/o suspensión de carga útil que comprende la composición en una fase no líquida (por ejemplo, sal sólida) que puede diluirse antes o durante el proceso de electroporación o electromecánico. En algunas modalidades, el primer electrodo o el segundo electrodo tiene una entrada o salida adicional para la comunicación de fluidos con el tercer depósito.

En algunas modalidades, el primer electrodo o el segundo electrodo pueden ser porosos o un fluido conductor (por ejemplo, líquido conductor).

Un dispositivo de cualquiera de las modalidades anteriores puede incluir una fuente de administración en comunicación de fluidos con la primera entrada. La fuente de administración puede configurarse para suministrar el líquido y/o la pluralidad de las células en suspensión a través del primer lumen hacia la segunda salida. Una fuente de administración también se puede configurar para administrar otros componentes, tal como una composición (por ejemplo, composición genética) para introducirse en las células (por ejemplo, como un depósito de reactivos de transfección) o un amortiguador o aditivo amortiguador adicional, mediante el uso de un mecanismo de desplazamiento de fluido (por ejemplo, una sola bomba de jeringa o múltiples bombas de jeringa) en conexión de fluidos con la fuente de administración y el primer lumen.

En algunas modalidades, la fuente de administración está configurada para administrar componentes antes (por ejemplo, aguas arriba) o dentro de la zona de electroporación. En algunas modalidades, la fuente de administración está configurada de tal manera que el mecanismo de desplazamiento de fluido (por ejemplo, una sola bomba de jeringa o múltiples bombas de jeringa) está dedicado a un amortiguador, aditivo amortiguador y/o carga útil en suspensión y se encuentra

en comunicación de fluidos con la pluralidad de células en suspensión.

En algunas modalidades, el dispositivo incluye además una o más zonas de electroporación adicionales (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, seis, ocho, diez, 11, 12, 24, 27, 36, 48, 64, 96, 384, 1536, o más) zonas de electroporación adicionales, que pueden configurarse en paralelo, en serie o una combinación de estos. La una o más zonas de electroporación adicionales puede tener, cada una, un área de sección transversal sustancialmente uniforme.

En algunas modalidades de cualquiera de las modalidades mencionadas anteriormente, el dispositivo puede incluir además un alojamiento configurada para contener el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación. El alojamiento puede incluir una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para aumentar la temperatura del dispositivo y/o del líquido en el que está suspendida la pluralidad de células, donde el controlador térmico es un elemento calefactor seleccionado de un grupo que consta de un bloque térmico, un flujo de líquido, un calefactor alimentado por batería y un calefactor de película fina. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para disminuir la temperatura del dispositivo y/o del líquido en el que está suspendida la pluralidad de células, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado de un grupo que consiste en un flujo de líquido, un enfriador evaporativo y un dispositivo Peltier. El alojamiento puede ser parte integral o estar conectado de forma removible al dispositivo.

En otro aspecto, la invención incluye un dispositivo para la administración electromecánica de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, donde el dispositivo incluye un primer electrodo que incluye una primera entrada, una primera salida y un primer lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima; un segundo electrodo que incluye una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima; una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida están en comunicación de fluidos con el primer lumen, donde la tercera entrada y la tercera salida interceptan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida; 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 una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación incluye una dimensión de sección transversal mínima mayor de alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm, o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de

5 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm), donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme. La primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos. La sección transversal de la zona de electroporación es una forma seleccionada de un grupo que consiste en una forma circular, de disco, elíptica, polígono regular, polígono irregular, forma curvilínea, estrella, paralelogramo, trapezoidal y una forma irregular (por ejemplo, una forma que tiene protuberancias, tales como ranuras o surcos que sobresalen, polígonos irregulares y/o formas curvilíneas). En algunas modalidades, la sección transversal de la zona de electroporación varía a lo largo de la longitud (es decir, el eje longitudinal o la dirección del flujo) de la zona de electroporación). En algunas modalidades, la forma es consistente a lo largo de la longitud, pero varía en posición con respecto al eje longitudinal central a lo largo de la longitud de la zona de electroporación (por ejemplo, la forma de la sección transversal gira alrededor del eje central desde un extremo de la zona de electroporación al otro, tal como una hélice). En modalidades particulares, la zona de electroporación tiene una sección transversal sustancialmente circular. En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene un área de sección transversal de entre alrededor de  $7850 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $2000 \text{ mm}^2$  (por ejemplo, entre alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $1 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $10 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $9000 \mu\text{m}^2$  y  $5 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $1 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $10 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $1 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $3 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $20 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $10 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $50 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $25 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $75 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $50 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $75 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $200 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $100 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $350 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $150 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $500 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $300 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $750 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $500 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $1000 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $750 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $1500 \text{ mm}^2$ , o entre alrededor de  $950 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $2000 \text{ mm}^2$ , por ejemplo, alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$ , alrededor de  $9000 \mu\text{m}^2$ , alrededor de  $1 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $5 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $10 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $15 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $20 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $25 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $50 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $60 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $75 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $80 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $150 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $200 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $250 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $300 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $350 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $400 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $450 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $500 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $600 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $700 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $800 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $900 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1000 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1100 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1200 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1300 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1400 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1500 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1600 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1700 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1800 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1900 \text{ mm}^2$  o alrededor de  $2000 \text{ mm}^2$ ).

En otro aspecto, la invención incluye un dispositivo para transfectar una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, donde el dispositivo incluye un primer electrodo

que incluye una primera entrada, una primera salida y un primer lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima; un segundo electrodo que incluye una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima; una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida están en comunicación de fluidos con el primer lumen, donde la tercera entrada y la tercera salida interceptan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida; 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 intersecan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida; y una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación incluye una dimensión de sección transversal mínima mayor de alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm, o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm), donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme. La primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos. La sección transversal de la zona de electroporación es una forma seleccionada de un grupo que consiste en una forma circular, de disco, elíptica, polígono regular, polígono irregular, forma curvilínea, estrella, paralelogramo, trapezoidal y una forma irregular (por ejemplo, una forma que tiene protuberancias, tales como ranuras o surcos que sobresalen, polígonos irregulares y/o formas curvilíneas). En algunas modalidades, la sección transversal de la zona de electroporación varía a lo largo de la longitud (es decir, el eje longitudinal o la dirección del flujo) de la zona de electroporación). En algunas modalidades, la forma es consistente a lo largo de la longitud, pero varía en posición con respecto al eje longitudinal central a lo largo de la longitud de la zona de electroporación (por ejemplo, la forma de la sección transversal gira alrededor del eje central desde un extremo de la zona de electroporación al otro, tal como una hélice). En modalidades particulares, la zona de electroporación tiene una sección transversal sustancialmente circular. En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene un área de sección transversal de entre alrededor de 7850  $\mu\text{m}^2$  y alrededor de 2000  $\text{mm}^2$  (por ejemplo, entre alrededor de 8000  $\mu\text{m}^2$  y alrededor de 1  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 8000  $\mu\text{m}^2$  y alrededor de 10  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 8000  $\mu\text{m}^2$  y alrededor de 100  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 9000  $\mu\text{m}^2$  y 5  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 1  $\text{mm}^2$  y alrededor de 10  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 1  $\text{mm}^2$  y alrededor de 100  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 3  $\text{mm}^2$  y alrededor de 20  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 10  $\text{mm}^2$  y alrededor de 50  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 25  $\text{mm}^2$  y alrededor de 75  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 50  $\text{mm}^2$  y alrededor de 100  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 75  $\text{mm}^2$  y alrededor de 200  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 100  $\text{mm}^2$  y alrededor de 350  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de

150 mm<sup>2</sup> y alrededor de 500 mm<sup>2</sup>, entre alrededor de 300 mm<sup>2</sup> y alrededor de 750 mm<sup>2</sup>, entre  
 alrededor de 500 mm<sup>2</sup> y alrededor de 1000 mm<sup>2</sup>, entre alrededor de 750 mm<sup>2</sup> y alrededor de 1500  
 mm<sup>2</sup>, o entre alrededor de 950 mm<sup>2</sup> y alrededor de 2000 mm<sup>2</sup>, por ejemplo, alrededor de 8000  
 μm<sup>2</sup>, alrededor de 9000 μm<sup>2</sup>, alrededor de 1 mm<sup>2</sup>, alrededor de 5 mm<sup>2</sup>, alrededor de 10 mm<sup>2</sup>,  
 5 alrededor de 15 mm<sup>2</sup>, alrededor de 20 mm<sup>2</sup>, alrededor de 25 mm<sup>2</sup>, alrededor de 50 mm<sup>2</sup>, alrededor  
 de 60 mm<sup>2</sup>, alrededor de 75 mm<sup>2</sup>, alrededor de 80 mm<sup>2</sup>, alrededor de 100 mm<sup>2</sup>, alrededor de 150  
 mm<sup>2</sup>, alrededor de 200 mm<sup>2</sup>, alrededor de 250 mm<sup>2</sup>, alrededor de 300 mm<sup>2</sup>, alrededor de 350 mm<sup>2</sup>,  
 alrededor de 400 mm<sup>2</sup>, alrededor de 450 mm<sup>2</sup>, alrededor de 500 mm<sup>2</sup>, alrededor de 600 mm<sup>2</sup>,  
 alrededor de 700 mm<sup>2</sup>, alrededor de 800 mm<sup>2</sup>, alrededor de 900 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1000 mm<sup>2</sup>,  
 10 alrededor de 1100 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1200 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1300 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1400 mm<sup>2</sup>,  
 alrededor de 1500 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1600 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1700 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1800 mm<sup>2</sup>,  
 alrededor de 1900 mm<sup>2</sup> o alrededor de 2000 mm<sup>2</sup>).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, la zona de electroporación tiene  
 una dimensión de sección transversal mínima de entre 0,1 mm y 50 mm (por ejemplo, entre  
 15 0,1 mm y 0,5 mm, entre 0,1 mm y 1 mm, entre 0,1 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre  
 0,5 mm y 5 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y  
 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 100 mm, entre 15 mm y  
 30 mm, entre 20 mm y 40 mm, entre 20 mm y 200 mm, entre 30 mm y 50, entre 45 mm y 60 mm,  
 entre 50 mm y 100 mm, entre 75 mm y 150 mm, entre 100 mm y 200 mm, entre 150 mm y  
 20 300 mm, entre 200 mm y 400 mm, entre 300 mm y 450 mm o entre 350 mm y 500 mm, por  
 ejemplo, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm,  
 alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de  
 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm,  
 alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de  
 25 45 mm o alrededor de 50 mm).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, la zona de electroporación tiene  
 una longitud de entre 0,005 mm y 50 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre  
 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,005 mm y 25 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm,  
 entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,1 mm y 50 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 25 mm, entre  
 30 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50  
 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 50 mm, entre 15 mm y 25 mm, entre 20 mm y 30 mm,  
 entre 25 mm y 40, o entre 30 mm y 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01  
 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm,  
 alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5  
 35 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 9 mm, alrededor de  
 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm,

alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, unos 45 mm o unos 50 mm). En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene una longitud de entre 0,005 mm y 25 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 10 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 10 mm, entre 7 mm y 15 mm, entre 10 mm and 20 mm o entre 15 mm y 25 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 12 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 18 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 23 mm o alrededor de 25 mm).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, un lumen de cualquiera del primer electrodo y/o el segundo electrodo tiene una dimensión de sección transversal mínima de entre 0,01 mm y 500 mm (por ejemplo, entre 0,01 mm y 0,1 mm, entre 0,01 mm y 0,5 mm, entre 0,01 mm y 10 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 50 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 100 mm, entre 15 mm y 30 mm, entre 20 mm y 40 mm, entre 20 mm y 200 mm, entre 30 mm y 50, entre 30 mm y 300 mm, entre 45 mm y 60 mm, entre 50 mm y 100 mm, entre 50 mm y 500 mm, entre 75 mm y 150 mm, entre 75 mm y 300 mm, entre 100 mm y 200 mm, entre 100 mm y 500 mm, entre 150 mm y 300 mm, entre 200 mm y 400 mm, entre 300 mm y 450 mm o entre 350 mm y 500 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 45 mm, alrededor de 50 mm, alrededor de 60 mm, alrededor de 70 mm, alrededor de 80 mm, alrededor de 90 mm, alrededor de 100 mm, alrededor de 150 mm, alrededor de 200 mm, alrededor de 250 mm, alrededor de 300 mm, alrededor de 350 mm, alrededor de 400 mm, alrededor de 450 mm o alrededor de 500 mm). En algunas modalidades, una relación de la dimensión de sección transversal mínima de un lumen de cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo con respecto a la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación es entre 1:10 y 10:1 (por ejemplo, entre 1:10 y 1:5, entre 1:10 y 1:2, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 2:3, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 6:1, entre 2:3 y 2:1, entre 2:3 y 4:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 3:1, entre 1:1 y 10:1, entre 3:2 y 3:1, entre 3:2 y 6:1, entre 2:1 y 3:1, entre 2:1 y 5:1, entre 5:2 y 5:1, entre 3:1 y 4:1, entre 7:2 y 5:1, entre

7:2 y 10:1, entre 4:1 y 8:1, entre 5:1 y 10:1 o entre 7:1 y 10:1, por ejemplo, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 2:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 9:2, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, una relación de la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación con respecto a la longitud de la zona electroporación es entre 1:100 y 100:1 (por ejemplo, entre 1:100 y 1:50, entre 1:100 y 1:25, entre 1:100 y 1:10, entre 1:100 y 1:1, entre 1:50 y 1:5, entre 1:50 y 1:2, entre 1:50 y 2:1, entre 1:25 y 1:10, entre 1:25 y 1:5, entre 1:25 y 1:1, entre 1:25 y 10:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 5:1, entre 1:1 y 10:1, entre 1:1 y 50:1, entre 1:1 y 100:1, entre 2:1 y 5:1, entre 2:1 y 20:1, entre 3:1 y 10:1, entre 4:1 y 25:1, entre 5:1 y 50:1, entre 10:1 y 50:1, entre 40:1 y 80:1, entre 50:1 y 100:1, o entre 75:1 y 90:1, por ejemplo, alrededor de 1:100, alrededor de 1:75, alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 20:1, alrededor de 30:1, alrededor de 40:1, alrededor de 50:1, alrededor de 60:1, alrededor de 70:1, alrededor de 80:1, alrededor de 90:1 o alrededor de 100:1). En algunas modalidades, una relación de un área de sección transversal de un lumen de cualquiera del primer electrodo y/o el segundo electrodo con respecto al área de sección trnasversal de la zona de electroporación es entre 1:100 y 100:1 (por ejemplo, entre 1:100 y 1:50, entre 1:100 y 1:25, entre 1:100 y 1:10, entre 1:100 y 1:1, entre 1:50 y 1:5, entre 1:50 y 1:2, entre 1:50 y 2:1, entre 1:25 y 1:10, entre 1:25 y 1:5, entre 1:25 y 1:1, entre 1:25 y 10:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 5:1, entre 1:1 y 10:1, entre 1:1 y 50:1, entre 1:1 y 100:1, entre 2:1 y 5:1, entre 2:1 y 20:1, entre 3:1 y 10:1, entre 4:1 y 25:1, entre 5:1 y 50:1, entre 10:1 y 50:1, entre 40:1 y 80:1, entre 50:1 y 100:1 o entre 75:1 y 90:1, por ejemplo, alrededor de 1:100, alrededor de 1:75, alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 20:1, alrededor de 30:1, alrededor de 40:1, alrededor de 50:1, alrededor de 60:1, alrededor de 70:1, alrededor de 80:1, alrededor de 90:1 o alrededor de 100:1). El primer o el segundo electrodo, o ambos, pueden ser porosos o un fluido conductor (por ejemplo, líquido).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el dispositivo incluye además un primer depósito en comunicación de fluidos con la primera entrada. En algunas modalidades,

incluye además un segundo depósito en comunicación de fluidos con la segunda salida. En algunas modalidades, el dispositivo incluye adicionalmente un tercer depósito en comunicación fluida con la tercera entrada y la tercera salida. En algunas modalidades, el dispositivo incluye adicionalmente un cuarto dispositivo en comunicación de fluidos con la cuarta entrada y la cuarta salida. En algunas modalidades, el dispositivo incluye adicionalmente un quinto 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 al menos una entrada adicional para la comunicación de fluidos con el quinto depósito. En algunas modalidades, el dispositivo incluye además 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. En algunas modalidades, el dispositivo incluye además una pluralidad de zonas de electroporación (por ejemplo, dispuestas en serie, en paralelo o una combinación de esto). Cada una de la pluralidad de zonas de electroporación puede tener un área de sección transversal sustancialmente uniforme.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos, el dispositivo incluye adicionalmente un alojamiento que incluye un alojamiento (por ejemplo, un cartucho) configurado para contener el primer electrodo, el segundo electrodo y la al menos una zona de electroporación del dispositivo. El alojamiento puede incluir una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo. En algunas modalidades, la carcasa incluye además un controlador térmico configurado para aumentar la temperatura del dispositivo y/o del líquido en el que está suspendida la pluralidad de células, donde el controlador térmico es un elemento calefactor seleccionado de un grupo que consta de un bloque térmico, un flujo de líquido, un calefactor alimentado por batería y un calefactor de película fina. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para disminuir la temperatura del dispositivo y/o del líquido en el que está suspendida la pluralidad de celdas, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado de un grupo que consiste en un flujo de líquido, un enfriador evaporativo y un dispositivo Peltier. En algunas modalidades, el alojamiento es integral al dispositivo o está conectado de manera removible al dispositivo. En algunas modalidades, el alojamiento (por ejemplo, un cartucho) está configurado para su uso con y/o la inserción en un sistema cerrado automatizado que se utiliza para administrar terapias celulares a pacientes en un entorno clínico u hospitalario.

En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un área/espacio de enfriamiento/calentamiento para el almacenamiento de la suspensión celular y/o amortiguador durante, antes y luego de la electroporación del espécimen. En algunas modalidades, el sistema

(por ejemplo, dispositivo y alojamiento) se alimenta externamente.

En algunas modalidades, los dispositivos de la invención incluyen una interfaz de usuario u otra interfaz de usuario alternativa que permite al usuario seleccionar parámetros tales como velocidad de flujo, formas de onda, potencial aplicado, volumen a transfectar, retardo de tiempo, características de enfriamiento, características de calentamiento, estado de transfección, progreso y otros parámetros utilizados para optimizar el protocolo de transfección. En algunas modalidades, la interfaz de usuario también contiene selecciones de parámetros formuladas previamente que permiten al usuario operar el sistema en condiciones estándar que han sido previamente validadas por el usuario o recomendadas por los fabricantes. En algunas modalidades, la interfaz de usuario puede estar conectada a la programación que permite el funcionamiento automatizado del sistema y/o ejecutar un algoritmo para optimizar la transfección para una muestra determinada de un tipo de célula conocido. En algunas modalidades, los algoritmos de optimización tienen la capacidad de ajustar los parámetros de transfección de forma independiente o autónoma si el usuario selecciona esta funcionalidad. En algunas modalidades, los algoritmos de optimización permiten el ajuste continuo de los parámetros utilizados en el proceso de transfección que pueden depender del tipo de célula, la conductividad de las suspensiones de células, el volumen de las suspensiones de células, la viscosidad, la vida útil del o los cartuchos de transfección, el estado físico, el estado de la suspensión o el estado del o los dispositivos de transfección.

En algunas modalidades, los algoritmos de optimización tienen la capacidad de realizar análisis predictivos en función de los parámetros del tipo de célula de entrada conocidos y de ajustar los parámetros de transfección en consecuencia. En algunas modalidades, los algoritmos de optimización ajustan los parámetros de transfección en función de las señales eléctricas dentro de cualquiera de los dispositivos de la invención. En algunas modalidades, los algoritmos de optimización ajustan los parámetros de transfección en función de los parámetros de entrada adimensionales únicos. En algunas modalidades, los algoritmos de optimización tienen la capacidad de ajustar los parámetros de transfección en función de las combinaciones únicas multivariadas de parámetros que predicen resultados de alta viabilidad, resultados de alta eficiencia o resultados de viabilidad y eficiencia equiparados. Estas combinaciones multivariadas únicas de parámetros pueden ser relaciones conocidas, como el número de Reynolds, o pueden ser relaciones nuevas, tal como la relación entre la velocidad de corte y la velocidad del fluido, el diámetro del canal y la velocidad del fluido, el campo eléctrico y la velocidad del fluido, etc. En términos generales, existe un equilibrio entre la cantidad de energía eléctrica entregada a través del pulso eléctrico aplicado y la cantidad de energía mecánica entregada a través del flujo de fluido. Dependiendo del resultado deseado, por ejemplo, alto rendimiento celular o alta eficiencia, existe una combinación óptima de los efectos eléctricos y mecánicos. Para una condición de pulso eléctrico dada, el flujo de fluido más rápido disminuye la cantidad de energía eléctrica expuesta a

la célula y tiende a aumentar la viabilidad y el rendimiento de la célula. Pero esto solo ocurre hasta un punto, más allá del cual el rendimiento de la célula comienza a disminuir a medida que las células no experimentan suficiente energía eléctrica para una entrega eficaz de la carga útil.

En otro aspecto, la invención incluye un sistema para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de celdas suspendidas en un líquido, donde el sistema incluye cualquiera de las modalidades del dispositivo mencionadas anteriormente.

En otro aspecto, la invención incluye un sistema para electroporar una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, donde el sistema incluye cualquiera de las modalidades del dispositivo mencionadas anteriormente (por ejemplo, donde la electroporación se produce mediante un mecanismo de suministro electromecánico).

En otro aspecto, la invención incluye un sistema para el suministro electromecánico de una composición a una pluralidad de células suspendidas en un líquido, que incluye un dispositivo y una fuente de potencial eléctrico. El dispositivo incluye un primer electrodo, un segundo electrodo y una zona de electroporación. El primer electrodo incluye una primera entrada, una primera salida y un primer lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima, y el segundo electrodo incluye una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima. La zona de electroporación está dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada y tiene una dimensión de sección transversal mínima mayor de alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm, o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm). La zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme. La primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos. El sistema incluye además una fuente de potencial eléctrico, donde el primer electrodo y el segundo electrodo del dispositivo están en contacto operativo de forma liberable con la fuente de potencial eléctrico. En algunas modalidades, el dispositivo incluye además un primer depósito en comunicación de fluidos con la primera entrada y/o un segundo depósito en comunicación de fluidos con la segunda salida.

En otro aspecto, la invención incluye un sistema para la electroporación de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, que incluye un dispositivo y una fuente de potencial eléctrico. El dispositivo incluye un primer electrodo, un segundo electrodo y una zona de electroporación. El primer electrodo incluye una primera entrada, una primera salida y un primer lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima, y el segundo electrodo incluye una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima. La zona de electroporación está dispuesta entre la primera salida y la

segunda entrada y tiene una dimensión de sección transversal mínima mayor de alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm, o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm). La zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme. La primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos. El sistema incluye además una fuente de potencial eléctrico, donde el primer electrodo y el segundo electrodo del dispositivo están en contacto operativo de forma removible con la fuente de potencial eléctrico. En algunas modalidades, el dispositivo incluye además un primer depósito en comunicación de fluidos con la primera entrada y/o un segundo depósito en comunicación de fluidos con la segunda salida.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, la sección transversal de la zona de electroporación es una forma seleccionada de un grupo que consta de circular, disco, elíptica, polígono regular, polígono irregular, forma curvilínea, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular. En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene una sección transversal sustancialmente circular. En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal mínima de entre 0,1 mm y 50 mm (por ejemplo, entre 0,1 mm y 0,5 mm, entre 0,1 mm y 1 mm, entre 0,1 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 100 mm, entre 15 mm y 30 mm, entre 20 mm y 40 mm, entre 20 mm y 200 mm, entre 30 mm y 50, entre 45 mm y 60 mm, entre 50 mm y 100 mm, entre 75 mm y 150 mm, entre 100 mm y 200 mm, entre 150 mm y 300 mm, entre 200 mm y 400 mm, entre 300 mm y 450 mm o entre 350 mm y 500 mm, por ejemplo, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 45 mm o alrededor de 50 mm).

En algunas modalidades de cualquiera de los sistemas anteriores de la invención, la zona de electroporación tiene un área de sección transversal de entre alrededor de 7850  $\mu\text{m}^2$  y alrededor de 2000  $\text{mm}^2$  (por ejemplo, entre alrededor de 8000  $\mu\text{m}^2$  y alrededor de 1  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 8000  $\mu\text{m}^2$  y alrededor de 10  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 8000  $\mu\text{m}^2$  y alrededor de 100  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 9000  $\mu\text{m}^2$  y 5  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 1  $\text{mm}^2$  y alrededor de 10  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 1  $\text{mm}^2$  y alrededor de 100  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 3  $\text{mm}^2$  y alrededor de 20  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 10  $\text{mm}^2$  y alrededor de 50  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 25  $\text{mm}^2$  y alrededor de 75  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 50  $\text{mm}^2$  y alrededor de 100  $\text{mm}^2$ , entre alrededor de 75  $\text{mm}^2$  y alrededor de 200

mm<sup>2</sup>, entre alrededor de 100 mm<sup>2</sup> y alrededor de 350 mm<sup>2</sup>, entre alrededor de 150 mm<sup>2</sup> y alrededor de 500 mm<sup>2</sup>, entre alrededor de 300 mm<sup>2</sup> y alrededor de 750 mm<sup>2</sup>, entre alrededor de 500 mm<sup>2</sup> y alrededor de 1000 mm<sup>2</sup>, entre alrededor de 750 mm<sup>2</sup> y alrededor de 1500 mm<sup>2</sup>, o entre alrededor de 950 mm<sup>2</sup> y alrededor de 2000 mm<sup>2</sup>, por ejemplo, alrededor de 8000 μm<sup>2</sup>, alrededor de 9000 μm<sup>2</sup>, alrededor de 1 mm<sup>2</sup>, alrededor de 5 mm<sup>2</sup>, alrededor de 10 mm<sup>2</sup>, alrededor de 15 mm<sup>2</sup>, alrededor de 20 mm<sup>2</sup>, alrededor de 25 mm<sup>2</sup>, alrededor de 50 mm<sup>2</sup>, alrededor de 60 mm<sup>2</sup>, alrededor de 75 mm<sup>2</sup>, alrededor de 80 mm<sup>2</sup>, alrededor de 100 mm<sup>2</sup>, alrededor de 150 mm<sup>2</sup>, alrededor de 200 mm<sup>2</sup>, alrededor de 250 mm<sup>2</sup>, alrededor de 300 mm<sup>2</sup>, alrededor de 350 mm<sup>2</sup>, alrededor de 400 mm<sup>2</sup>, alrededor de 450 mm<sup>2</sup>, alrededor de 500 mm<sup>2</sup>, alrededor de 600 mm<sup>2</sup>, alrededor de 700 mm<sup>2</sup>, alrededor de 800 mm<sup>2</sup>, alrededor de 900 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1000 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1100 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1200 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1300 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1400 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1500 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1600 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1700 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1800 mm<sup>2</sup>, alrededor de 1900 mm<sup>2</sup> o alrededor de 2000 mm<sup>2</sup>).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, la zona de electroporación tiene una longitud de entre 0,005 mm y 50 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,005 mm y 25 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,1 mm y 50 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 25 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 50 mm, entre 15 mm y 25 mm, entre 20 mm y 30 mm, entre 25 mm y 40, o entre 30 mm y 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 9 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, unos 45 mm o unos 50 mm). En algunas modalidades de los sistemas, la longitud de la zona de electroporación se encuentra entre 0,005 mm y 25 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 10 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 10 mm, entre 7 mm y 15 mm, entre 10 mm and 20 mm o entre 15 mm y 25 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 12 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 18 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 23 mm o alrededor de 25 mm).

En algunas modalidades de cualquiera de los sistemas anteriores, un lumen de cualquiera del

primer electrodo y/o el segundo electrodo tiene una dimensión de sección transversal mínima de entre 0,01 mm y 500 mm (por ejemplo, entre 0,01 mm y 0,1 mm, entre 0,01 mm y 0,5 mm, entre 0,01 mm y 10 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 50 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 100 mm, entre 15 mm y 30 mm, entre 20 mm y 40 mm, entre 20 mm y 200 mm, entre 30 mm y 50, entre 30 mm y 300 mm, entre 45 mm y 60 mm, entre 50 mm y 100 mm, entre 50 mm y 500 mm, entre 75 mm y 150 mm, entre 75 mm y 300 mm, entre 100 mm y 200 mm, entre 100 mm y 500 mm, entre 150 mm y 300 mm, entre 200 mm y 400 mm, entre 300 mm y 450 mm o entre 350 mm y 500 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 45 mm, alrededor de 50 mm, alrededor de 60 mm, alrededor de 70 mm, alrededor de 80 mm, alrededor de 90 mm, alrededor de 100 mm, alrededor de 150 mm, alrededor de 200 mm, alrededor de 250 mm, alrededor de 300 mm, alrededor de 350 mm, alrededor de 400 mm, alrededor de 450 mm o alrededor de 500 mm).

En algunas modalidades de los sistemas de la invención, una relación de la dimensión de sección transversal mínima de un lumen de cualquiera del primer o segundo electrodo con respecto a la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación es entre 1:10 y 10:1 (por ejemplo, entre 1:10 y 1:5, entre 1:10 y 1:2, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 2:3, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 6:1, entre 2:3 y 2:1, entre 2:3 y 4:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 3:1, entre 1:1 y 10:1, entre 3:2 y 3:1, entre 3:2 y 6:1, entre 2:1 y 3:1, entre 2:1 y 5:1, entre 5:2 y 5:1, entre 3:1 y 4:1, entre 7:2 y 5:1, entre 7:2 y 10:1, entre 4:1 y 8:1, entre 5:1 y 10:1 o entre 7:1 y 10:1, por ejemplo, alrededor de 1:10, alrededor de 1:9, alrededor de 1:8, alrededor de 1:7, alrededor de 1:6, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 2:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 9:2, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1).

En algunas modalidades, una relación de la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación con respecto a la longitud de la zona electroporación es entre 1:100 y 100:1 (por ejemplo, entre 1:100 y 1:50, entre 1:100 y 1:25, entre 1:100 y 1:10, entre 1:100 y 1:1, entre 1:50 y 1:5, entre 1:50 y 1:2, entre 1:50 y 2:1, entre 1:25 y 1:10, entre 1:25 y 1:5, entre 1:25 y 1:1, entre 1:25 y 10:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 5:1, entre 1:1 y 10:1, entre 1:1 y 50:1, entre 1:1 y 100:1, entre 2:1 y 5:1, entre 2:1 y 20:1, entre 3:1 y 10:1, entre 4:1 y

25:1, entre 5:1 y 50:1, entre 10:1 y 50:1, entre 40:1 y 80:1, entre 50:1 y 100:1, o entre 75:1 y 90:1, por ejemplo, alrededor de 1:100, alrededor de 1:75, alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 20:1, alrededor de 30:1, alrededor de 40:1, alrededor de 50:1, alrededor de 60:1, alrededor de 70:1, alrededor de 80:1, alrededor de 90:1 o alrededor de 100:1).

En algunas modalidades, una relación de un área de sección transversal de un lumen de cualquiera del primer electrodo y/o el segundo electrodo con respecto al área de sección transversal de la zona de electroporación es entre 1:100 y 100:1 (por ejemplo, entre 1:100 y 1:50, entre 1:100 y 1:25, entre 1:100 y 1:10, entre 1:100 y 1:1, entre 1:50 y 1:5, entre 1:50 y 1:2, entre 1:50 y 2:1, entre 1:25 y 1:10, entre 1:25 y 1:5, entre 1:25 y 1:1, entre 1:25 y 10:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:10 y 10:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 50:1, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 10:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 5:1, entre 1:1 y 10:1, entre 1:1 y 50:1, entre 1:1 y 100:1, entre 2:1 y 5:1, entre 2:1 y 20:1, entre 2:1 y 50:1, entre 3:1 y 10:1, entre 3:1 y 30:1, entre 4:1 y 25:1, entre 5:1 y 10:1, entre 5:1 y 50:1, entre 10:1 y 50:1, entre 10:1 y 100:1, entre 40:1 y 80:1, entre 50:1 y 100:1 o entre 75:1 y 90:1, por ejemplo, alrededor de 1:100, alrededor de 1:75, alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1, alrededor de 10:1, alrededor de 15:1, alrededor de 20:1, alrededor de 25:1, alrededor de 30:1, alrededor de 40:1, alrededor de 50:1, alrededor de 60:1, alrededor de 70:1, alrededor de 80:1, alrededor de 90:1 o alrededor de 100:1). Cualquiera del primera electrodo o el segundo electrodo, o ambos, puede ser poroso o un fluido conductor (por ejemplo, líquido).

En algunas modalidades de cualquiera de los sistemas anteriores, el sistema incluye 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. En algunas modalidades, el dispositivo incluye además 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.

En algunas modalidades, el sistema de la invención incluye 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. En algunas modalidades, el sistema incluye una pluralidad de zonas de electroporación (por ejemplo, como parte de una pluralidad de cualquier modalidad de los dispositivos proporcionados en la presente). Cada una de la pluralidad de zonas de electroporación puede tener un área de sección transversal sustancialmente uniforme o no uniforme.

En algunas modalidades, el sistema incluye además una estructura exterior que incluye un alojamiento configurado para encerrar el primer electrodo, el segundo electrodo y la al menos una zona de electroporación del dispositivo (por ejemplo, en la que la estructura exterior incluye además una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo). El alojamiento puede incluir un controlador térmico configurado para aumentar la temperatura del dispositivo y/o del líquido en el que está suspendida la pluralidad de células. El controlador térmico puede ser un elemento calefactor seleccionado de un grupo que consta de un bloque calefactor, un flujo de líquido, un calefactor alimentado por batería y un calefactor de película delgada. Adicional o alternativamente, el controlador térmico configurado para disminuir la temperatura del dispositivo y/o del líquido en el que está suspendida la pluralidad de celdas, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado de un grupo que consiste en un flujo de líquido, un enfriador evaporativo y un dispositivo Peltier.

En algunas modalidades de cualquiera de los sistemas anteriores de la invención, la fuente de potencial eléctrico está conectada de forma removible a la primera y segunda entradas eléctricas de la estructura exterior. La conexión removible entre la primera o la segunda entrada eléctrica y la fuente de potencial eléctrico se puede seleccionar de un grupo que consta de una abrazadera, un clip, un resorte, una funda, un cepillo de alambre, conexión mecánica, conexión inductiva o una combinación de estos. La estructura exterior puede ser parte integral del o estar conectada de forma removible al dispositivo. En algunas modalidades, un alojamiento (por ejemplo, cartucho) se configura para energizar una pluralidad de dispositivos en paralelo, en serie o desplazados en el tiempo, donde el alojamiento incluye 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 (por ejemplo,

cartucho) 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.

En algunas modalidades, el alojamiento (por ejemplo, un cartucho) encapsula una o más de las invenciones anteriormente indicadas o uno o más dispositivos de electroporación utilizados para la electroporación de flujo continuo. En algunas modalidades, el alojamiento (por ejemplo, un cartucho) está configurado para permitir su uso con y/o la inserción en un sistema cerrado automatizado que administra terapias celulares a los pacientes. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un área/espacio de enfriamiento/calentamiento para el almacenamiento de la suspensión celular y/o amortiguador durante, antes y luego de la electroporación del espécimen. En algunas modalidades, el sistema (por ejemplo, uno o más dispositivos y alojamiento) se alimenta externamente.

En algunas modalidades, el sistema también incluye algoritmos de optimización tienen la capacidad de ajustar los parámetros de electroporación de forma independiente o autónoma si el usuario selecciona esta funcionalidad. Estos algoritmos de optimización permiten un ajuste continuo de los parámetros utilizados en el proceso de electroporación que puede depender del tipo de célula, conductividad, volumen de suspensiones, viscosidad, vida útil del catucho de electroporación, el estado físico de la suspensión o el estado del dispositivo de electroporación.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores del sistema, la fuente de potencial eléctrico entrega pulsos de voltaje a los electrodos en rejilla, donde el primer electrodo en rejilla se energiza a un voltaje aplicado particular mientras que el segundo electrodo en rejilla se energiza a un voltaje aplicado particular, donde cada uno de la pluralidad de dispositivos es energizado por los electrodos en 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. En algunas modalidades, la fuente de potencial eléctrico incluye circuitos o programación adicionales configurados para modular la entrega de pulsos de voltaje a los electrodos en la rejilla, donde cada uno de la pluralidad de dispositivos puede recibir 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.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, que incluye: un dispositivo,

que incluye un primer electrodo que incluye una primera entrada, una primera salida y un primer lumen; un segundo electrodo que incluye una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen; una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida están en 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; 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 una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, en la que la zona de electroporación tiene una longitud de entre 0,005 y 50 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,005 mm y 25 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,1 mm y 50 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 25 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 50 mm, entre 15 mm y 25 mm, entre 20 mm y 30 mm, entre 25 mm y 40 o entre 30 mm y 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 9 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 45 mm o alrededor de 50 mm) e incluye una dimensión de sección transversal mínima mayor que alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 50 mm), donde el área de sección transversal de la zona de electroporación es sustancialmente uniforme; y donde una relación de una dimensión de sección transversal mínima del primer lumen con respecto a la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación se encuentra entre 1:10 y 10:1 (por ejemplo, entre 1:10 y 1:5, entre 1:10 y 1:2, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 2:3, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 6:1, entre 2:3 y 2:1, entre 2:3 y 4:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 3:1, entre 1:1 y 10:1, entre 3:2 y 3:1, entre 3:2 y 6:1, entre 2:1 y 3:1, entre 2:1 y 5:1, entre 5:2 y 5:1, entre 3:1 y 4:1, entre 7:2 y 5:1, entre 7:2 y 10:1, entre 4:1 y 8:1, entre 5:1 y 10:1, o entre 7:1 y 10:1, por ejemplo, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 2:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 9:2, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor

de 10:1), donde una relación de una dimensión de sección transversal mínima del segundo lumen con respecto a la dimensión de corte transversal mínima de la zona de electroporación es entre 1:10 y 10:1 (por ejemplo, entre 1:10 y 1:5, entre 1:10 y 1:2, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 2:3, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 6:1, entre 2:3 y 2:1, entre 2:3 y 4:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 3:1, entre 1:1 y 10:1, entre 3:2 y 3:1, entre 3:2 y 6:1, entre 2:1 y 3:1, entre 2:1 y 5:1, entre 5:2 y 5:1, entre 3:1 y 4:1, entre 7:2 y 5:1, entre 7:2 y 10:1, entre 4:1 y 8:1, entre 5:1 y 10:1 o entre 7:1 y 10:1, por ejemplo, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 2:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 9:2, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1) y donde la primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos; y una fuente de potencial eléctrico, donde el primer y segundo electrodos del dispositivo están en contacto operativo de forma removible con la fuente de potencial eléctrico. La sección transversal de la zona de electroporación es una forma cerrada seleccionada de un grupo que consta de circular, disco, elíptica, polígono regular, polígono irregular, forma curvilínea, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular. La zona de electroporación puede tener una sección transversal sustancialmente circular.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema para electroporar una composición en una pluralidad de célula suspendidas en un líquido, que incluye: un dispositivo, que incluye un primer electrodo que incluye una primera entrada, una primera salida y un primer lumen; un segundo electrodo que incluye una segunda entrada, una segunda salida y un segundo lumen; y una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida se encuentran en comunicación de fluidos con el primer lumen, donde la tercera entrada y la tercera salida intersecan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida; una cuarta entrada y una cuarta salida, donde la cuarta entrada y la cuarta salida se encuentran en comunicación de fluidos con el segundo lumen, donde la cuarta entrada y la cuarta salida intersecan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida; y una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación tiene una longitud de entre 0,005 mm y 50 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,005 mm y 25 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,1 mm y 50 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 25 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 50 mm, entre 15 mm y 25 mm, entre 20 mm y 30 mm, entre 25 mm y 40 o entre 30 mm y 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de

6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 9 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 45 mm o alrededor de 50 mm) en incluye una dimensión de sección transversal mínima mayor que alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm), donde un área de sección transversal de la zona de electroporación es sustancialmente uniforme; y donde una relación de una dimensión de sección transversal mínima del primer lumen con respecto a la dimensión de corte transversal mínima de la zona de electroporación es entre 1:10 y 10:1 (por ejemplo, entre 1:10 y 1:5, entre 1:10 y 1:2, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 2:3, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 6:1, entre 2:3 y 2:1, entre 2:3 y 4:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 3:1, entre 1:1 y 10:1, entre 3:2 y 3:1, entre 3:2 y 6:1, entre 2:1 y 3:1, entre 2:1 y 5:1, entre 5:2 y 5:1, entre 3:1 y 4:1, entre 7:2 y 5:1, entre 7:2 y 10:1, entre 4:1 y 8:1, entre 5:1 y 10:1 o entre 7:1 y 10:1, por ejemplo, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 2:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 9:2, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1), donde una relación de una dimensión de sección transversal mínima del segundo lumen con respecto a la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación es entre 1:10 y 10:1 (por ejemplo, entre 1:10 y 1:5, entre 1:10 y 1:2, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 2:3, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 6:1, entre 2:3 y 2:1, entre 2:3 y 4:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 3:1, entre 1:1 y 10:1, entre 3:2 y 3:1, entre 3:2 y 6:1, entre 2:1 y 3:1, entre 2:1 y 5:1, entre 5:2 y 5:1, entre 3:1 y 4:1, entre 7:2 y 5:1, entre 7:2 y 10:1, entre 4:1 y 8:1, entre 5:1 y 10:1 o entre 7:1 y 10:1, por ejemplo, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 2:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 9:2, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1), y donde la primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada se encuentra en comunicación de fluidos; y una fuente de potencial eléctrico, donde el primer y segundo electrodo del dispositivo son removibles en contacto operativo. La sección transversal de la zona de electroporación tiene una forma cerrada seleccionada de un grupo que consiste en circular, de disco, elíptica, polígono regular, polígono irregular, forma curvilínea, de estrella, paralelograma, trapezoide e irregular. La zona de electroporación puede tener una sección transversal sustancialmente circular.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal mínima de entre 0,1 mm y 50 mm (por ejemplo, entre 0,1 mm y 0,5 mm, entre 0,1 mm y 1 mm, entre 0,1 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 100 mm, entre 15 mm y 30 mm, entre 20 mm y 40 mm, entre 20 mm y 200 mm, entre 30 mm y 50, entre 45 mm y 60 mm, entre 50 mm y 100 mm, entre 75 mm y 150 mm, entre 100 mm y 200 mm, entre 150 mm y 300 mm, entre 200 mm y 400 mm, entre 300 mm y 450 mm o entre 350 mm y 500 mm, por ejemplo, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 45 mm o alrededor de 50 mm).

En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene un área de sección transversal de entre alrededor de  $7850 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $2000 \text{ mm}^2$  (por ejemplo, entre alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $1 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $10 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $9000 \mu\text{m}^2$  y  $5 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $1 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $10 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $1 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $3 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $20 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $10 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $50 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $25 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $75 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $50 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $75 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $200 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $100 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $350 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $150 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $500 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $300 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $750 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $500 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $1000 \text{ mm}^2$ , entre alrededor de  $750 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $1500 \text{ mm}^2$ , o entre alrededor de  $950 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $2000 \text{ mm}^2$ , por ejemplo, alrededor de  $8000 \mu\text{m}^2$ , alrededor de  $9000 \mu\text{m}^2$ , alrededor de  $1 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $5 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $10 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $15 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $20 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $25 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $50 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $60 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $75 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $80 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $150 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $200 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $250 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $300 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $350 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $400 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $450 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $500 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $600 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $700 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $800 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $900 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1000 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1100 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1200 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1300 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1400 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1500 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1600 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1700 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1800 \text{ mm}^2$ , alrededor de  $1900 \text{ mm}^2$  o alrededor de  $2000 \text{ mm}^2$ ).

En algunas modalidades, la zona de electroporación tiene una longitud de entre 0,005 mm y 50 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,005 mm y 25 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,1 mm y 50

mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 25 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10 mm y 20 mm, entre 10 mm y 50 mm, entre 15 mm y 25 mm, entre 20 mm y 30 mm, entre 25 mm y 40, o entre 30 mm y 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 9 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, unos 45 mm o unos 50 mm). En algunas modalidades del sistema de la invención, la longitud de la zona de electroporación se encuentra entre 0,005 mm y 25 mm (por ejemplo, entre 0,005 mm y 0,05 mm, entre 0,005 mm y 0,5 mm, entre 0,01 mm y 1 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 10 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 10 mm, entre 7 mm y 15 mm, entre 10 mm and 20 mm o entre 15 mm y 25 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 12 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 18 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 23 mm o alrededor de 25 mm). En algunas modalidades, el dispositivo o sistema incluye además una pluralidad de cavidades de restricción de fluido para la transfección celular que están en comunicación de fluidos con la al menos una zona de electroporación y en la que la pluralidad de células experimentan campos eléctricos similares o diferentes y velocidades de flujo similares o diferentes (por ejemplo, velocidades de desplazamiento). En algunas modalidades, los electrodos pueden estar en cualquier configuración (por ejemplo, colector) con múltiples entradas y salidas que conducen a una constricción y sostienen la electroporación de la células en múltiples cavidades de restricción de fluido no conductor. En algunas modalidades, cada una de la pluralidad de cavidades que limitan el fluido para la electroporación celular incluye un alojamiento individual (por ejemplo, un cartucho) y puede funcionar de forma independiente. En algunas modalidades, cada alojamiento individual (por ejemplo, cartucho) está configurado para estar expuesto a los mismos o diferentes parámetros operativos que controlan las velocidades de flujo (por ejemplo, velocidades de desplazamiento), campo eléctrico o una combinación de otros parámetros. En algunas modalidades, cada alojamiento está configurado para integrarse en uno o más sistemas de controlador. En otras modalidades, el uno o más sistemas de controlador están configurados para aceptar uno o más alojamientos individuales.

En algunas modalidades, el dispositivo o sistema incluye además una pluralidad de cavidades de restricción de fluido para la electroporación celular que están en comunicación de fluidos con la al

- menos una zona de electroporación y en la que la pluralidad de células experimentan campos eléctricos similares o diferentes y velocidades de flujo similares o diferentes (por ejemplo, velocidades de desplazamiento). En algunas modalidades, los electrodos pueden encontrarse en cualquier configuración (por ejemplo, colector) con múltiples entradas y salidas que conducen a
- 5 una restricción y sostienen la electroporación de células en múltiples cavidades de restricción de fluido no conductor. En algunas modalidades, cada una de la pluralidad de cavidades que limitan el fluido para la electroporación celular incluye un alojamiento individual (por ejemplo, un cartucho) y puede funcionar de forma independiente. En algunas modalidades, cada alojamiento individual (por ejemplo, cartucho) está configurado para estar expuesto a los mismos o diferentes parámetros
- 10 operativos que controlan las velocidades de flujo (por ejemplo, velocidades de desplazamiento), campo eléctrico o una combinación de otros parámetros. En algunas modalidades, cada alojamiento está configurada para integrarse en uno o más sistemas de controlador. En otras modalidades, el uno o más sistemas de controlador están configurados para aceptar uno o más alojamientos individuales.
- 15 En algunas modalidades, un lumen de cualquiera del primer electrodo y/o el segundo electrodo tiene una dimensión de sección transversal mínima de entre 0,01 mm y 500 mm (por ejemplo, entre 0,01 mm y 0,1 mm, entre 0,01 mm y 0,5 mm, entre 0,01 mm y 10 mm, entre 0,05 mm y 5 mm, entre 0,1 mm y 10 mm, entre 0,5 mm y 5 mm, entre 0,5 mm y 50 mm, entre 1 mm y 5 mm, entre 1 mm y 10 mm, entre 1 mm y 25 mm, entre 3 mm y 15 mm, entre 3 mm y 50 mm, entre 10
- 20 mm y 20 mm, entre 10 mm y 100 mm, entre 15 mm y 30 mm, entre 20 mm y 40 mm, entre 20 mm y 200 mm, entre 30 mm y 50, entre 30 mm y 300 mm, entre 45 mm y 60 mm, entre 50 mm y 100 mm, entre 50 mm y 500 mm, entre 75 mm y 150 mm, entre 75 mm y 300 mm, entre 100 mm y 200 mm, entre 100 mm y 500 mm, entre 150 mm y 300 mm, entre 200 mm y 400 mm, entre 300 mm y 450 mm o entre 350 mm y 500 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 45 mm, alrededor de 50 mm, alrededor de 60 mm, alrededor de 70 mm, alrededor de
- 25 80 mm, alrededor de 90 mm, alrededor de 100 mm, alrededor de 150 mm, alrededor de 200 mm, alrededor de 250 mm, alrededor de 300 mm, alrededor de 350 mm, alrededor de 400 mm, alrededor de 450 mm o alrededor de 500 mm).
- En algunas modalidades, una relación de la dimensión de sección transversal mínima de un lumen de cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo con respecto a la dimensión de sección
- 35 transversal mínima de la zona de electroporación es entre 1:10 y 10:1 (por ejemplo, entre 1:10 y 1:5, entre 1:10 y 1:2, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y

1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 2:3, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 6:1, entre 2:3 y 2:1, entre 2:3 y 4:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 3:1, entre 1:1 y 10:1, entre 3:2 y 3:1, entre 3:2 y 6:1, entre 2:1 y 3:1, entre 2:1 y 5:1, entre 5:2 y 5:1, entre 3:1 y 4:1, entre 7:2 y 5:1, entre 7:2 y 10:1, entre 4:1 y 8:1, entre 5:1 y 10:1 o entre 7:1 y 10:1, por ejemplo, alrededor de 1:10, alrededor de 1:9, alrededor de 1:8, alrededor de 1:7, alrededor de 1:6, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 2:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 9:2, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1 o alrededor de 10:1). En algunas modalidades, una relación de la dimensión de sección transversal mínima de la zona de electroporación con respecto a la longitud de la zona de electroporación es entre 1:100 y 100:1 (por ejemplo, entre 1:100 y 1:50, entre 1:100 y 1:25, entre 1:100 y 1:10, entre 1:100 y 1:1, entre 1:50 y 1:5, entre 1:50 y 1:2, entre 1:50 y 2:1, entre 1:25 y 1:10, entre 1:25 y 1:5, entre 1:25 y 1:1, entre 1:25 y 10:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:10 y 10:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 50:1, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 10:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 5:1, entre 1:1 y 10:1, entre 1:1 y 50:1, entre 1:1 y 100:1, entre 2:1 y 5:1, entre 2:1 y 20:1, entre 2:1 y 50:1, entre 3:1 y 10:1, entre 3:1 y 30:1, entre 4:1 y 25:1, entre 5:1 y 10:1, entre 5:1 y 50:1, entre 10:1 y 50:1, entre 10:1 y 100:1, entre 40:1 y 80:1, entre 50:1 y 100:1 o entre 75:1 y 90:1, por ejemplo, alrededor de 1:100, alrededor de 1:75, alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1, alrededor de 10:1, alrededor de 15:1, alrededor de 20:1, alrededor de 25:1, alrededor de 30:1, alrededor de 40:1, alrededor de 50:1, alrededor de 60:1, alrededor de 70:1, alrededor de 80:1, alrededor de 90:1 o alrededor de 100:1). En algunas modalidades, una relación de un área de sección transversal de un lumen de cualquiera del primer electrodo y/o el segundo electrodo con respecto al área de sección transversal de la zona de electroporación es entre 1:100 y 100:1 (por ejemplo, entre 1:100 y 1:50, entre 1:100 y 1:25, entre 1:100 y 1:10, entre 1:100 y 1:1, entre 1:50 y 1:5, entre 1:50 y 1:2, entre 1:50 y 2:1, entre 1:25 y 1:10, entre 1:25 y 1:5, entre 1:25 y 1:1, entre 1:25 y 10:1, entre 1:10 y 1:1, entre 1:10 y 2:1, entre 1:10 y 5:1, entre 1:10 y 10:1, entre 1:5 y 1:2, entre 1:5 y 1:1, entre 1:5 y 2:1, entre 1:5 y 50:1, entre 1:2 y 1:1, entre 1:2 y 2:1, entre 1:2 y 10:1, entre 1:1 y 2:1, entre 1:1 y 5:1, entre 1:1 y 10:1, entre 1:1 y 50:1, entre 1:1 y 100:1, entre 2:1 y 5:1, entre 2:1 y 20:1, entre 2:1 y 50:1, entre 3:1 y 10:1, entre 3:1 y 30:1, entre 4:1 y 25:1, entre 5:1 y 10:1, entre 5:1 y 50:1, entre 10:1 y 50:1, entre 10:1 y 100:1, entre 40:1 y 80:1, entre 50:1 y 100:1 o entre 75:1 y 90:1, por ejemplo, alrededor de 1:100, alrededor de 1:75, alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 3:2, alrededor de 2:1, alrededor de 5:2, alrededor de 3:1, alrededor de 7:2, alrededor de 4:1, alrededor

de 5:1, alrededor de 6:1, alrededor de 7:1, alrededor de 8:1, alrededor de 9:1, alrededor de 10:1, alrededor de 15:1, alrededor de 20:1, alrededor de 25:1, alrededor de 30:1, alrededor de 40:1, alrededor de 50:1, alrededor de 60:1, alrededor de 70:1, alrededor de 80:1, alrededor de 90:1 o alrededor de 100:1).

- 5 En algunas modalidades, el sistema incluye además un primer depósito en comunicación de fluidos con la primera entrada, un segundo depósito en comunicación de fluidos con la segunda salida, un tercer depósito en comunicación de fluidos con la tercera entrada y la tercera salida, un cuarto depósito en comunicación de fluidos comunicación con la cuarta entrada y la cuarta salida, y/o un quinto depósito en comunicación de fluidos con un lumen de cualquiera del primer electrodo
- 10 o el segundo electrodo, por ejemplo, donde cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo tiene al menos una entrada adicional para comunicación de fluidos con el quinto depósito. En algunas modalidades, el dispositivo incluye además 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
- 15 primer lumen hasta la segunda salida. En algunas modalidades, el dispositivo incluye además una pluralidad de zonas de electroporación, por ejemplo, donde cada una de la pluralidad de zonas de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme o no uniforme.
- El sistema de cualquiera de los aspectos anteriores puede incluir adicionalmente un controlador acoplado operativamente a la fuente de potencial eléctrico para entregar pulsos de voltaje al primer
- 20 y segundo electrodos para generar una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodo, lo que produce, de esta manera, un campo eléctrico en la zona de electroporación.
- En algunas modalidad, el sistema incluye además una estructura exterior que incluye un alojamiento configurado para albergar el primer electrodo, el segundo electrodo y la al menos una zona de electroporación del dispositivo. El sistema puede incluir adicionalmente una primera
- 25 entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo. El alojamiento puede incluir además un controlador térmico configurado para aumentar la temperatura del dispositivo y/o del líquido en el que está suspendida la pluralidad de células, donde el controlador térmico es un elemento térmico seleccionado de un grupo que consta de un bloque térmico, un flujo de líquido, un calefactor
- 30 alimentado por batería y un calefactor de película fina. Adicional o alternativamente, el alojamiento puede incluir además un controlador térmico configurado para disminuir la temperatura del dispositivo y/o del líquido en el que está suspendida la pluralidad de celdas, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado de un grupo que consiste en un flujo de líquido, un enfriador evaporativo y un dispositivo Peltier. En algunas modalidades, la fuente de
- 35 potencial eléctrico se encuentra conectada de forma removible a la primera y segunda entrada eléctrica, por ejemplo, donde la conexión removible entre la primera o segunda entrada eléctrica y

la fuente de potencial eléctrico se seleccionan de un grupo que consta de una abrazadera, un clip, un resorte, una funda, un cepillo de alambre, una conexión mecánica, una conexión inductiva o una combinación de estos. La estructura exterior y/o el alojamiento puede ser parte integral del o estar conectada de forma removible al dispositivo.

- 5 En algunas modalidades, el sistema incluye además una pluralidad de dispositivos, por ejemplo, que tienen una pluralidad de estructuras externas. En algunas modalidades, un alojamiento está configurado para accionar una pluralidad de dispositivos en paralelo, en serie o desplazados en el tiempo, donde el alojamiento incluye además una bandeja que acomoda una pluralidad de dispositivos de electroporación, donde la bandeja se modifica con dos electrodos en rejilla, donde
- 10 un primer electrodo en rejilla está aislado eléctricamente de un segundo electrodo en rejilla, donde un exterior del primer electrodo de cada uno de la pluralidad de dispositivos está en contacto operativo de forma removible con cualquiera de un primer electrodo activado por resorte, un primer electrodo conectado mecánicamente, o un primer electrodo conectado inductivamente, donde un exterior del segundo electrodo de cada uno de la pluralidad de dispositivos está en contacto
- 15 operativo de forma removible con cualquiera de un segundo electrodo activado por resorte, un segundo electrodo conectado mecánicamente o un segundo electrodo acoplado inductivamente, donde cada uno de la pluralidad de dispositivos ingresa de manera removible al alojamiento a través de una abertura en los electrodos en rejilla, donde cualquiera del primer electrodo activado por resorte, el primer electrodo conectado mecánicamente o el primer electrodo conectado
- 20 inductivamente de cada dispositivo está en contacto operativo con el primer electrodo en rejilla y cualquiera del segundo electrodo activado por resorte, segundo electrodo conectado mecánicamente o segundo electrodo conectado inductivamente de cada dispositivo está en contacto operativo con el segundo electrodo en rejilla, donde los electrodos en rejilla están conectados a la fuente de potencial eléctrico. En algunas modalidades, la fuente de potencial
- 25 eléctrico entrega pulsos de voltaje a los electrodos en rejilla, donde el primer electrodo en rejilla se energiza a un voltaje aplicado particular mientras que el segundo electrodo en rejilla se energiza a un voltaje aplicado particular, donde cada uno de la pluralidad de los dispositivos son energizados por los electrodos en 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
- 30 cada dispositivo es sustancialmente idéntica. En algunas modalidades, la fuente de potencial eléctrico incluye circuitos o programación adicionales configurados para modular la entrega de pulsos de voltaje a los electrodos en la rejilla, donde cada uno de la pluralidad de dispositivos puede recibir 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
- 35 dispositivo puede ser diferente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para introducir una composición en una

pluralidad de células suspendidas en un líquido que fluye usando cualquiera de los dispositivos o sistemas de la invención (por ejemplo, mediante suministro electromecánico). En particular, los métodos de la invención incluyen proporcionar un dispositivo que incluye un primer electrodo que incluye una primera salida, una primera entrada y un primer lumen que incluye una dimensión de

5 sección transversal mínima; un segundo electrodo que incluye un segundo lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima; y una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación incluye una dimensión de sección transversal mínima mayor que alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a

10 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm), 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 se encuentran en comunicación

15 fluida; aplicar una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y el segundo electrodo, mediante lo cual se produce un campo eléctrico en la zona de electroporación; y pasar la pluralidad de células y la composición a través de la zona de electroporación, mediante lo cual potencia, de esta manera, la permeabilidad de la pluralidad de células y se introduce la composición en la pluralidad de las células. En algunas modalidades, el pasaje de la pluralidad de células incluye aplicar una

20 presión positiva impulsada por fluido. En algunas modalidades, 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 líquido se comprima temporalmente. La electroporación puede ser electroporación reversible sustancialmente no térmica, electroporación irreversible sustancialmente no térmica o

25 electroporación irreversible sustancialmente térmica. En algunas modalidades, la velocidad de flujo de un líquido y/o la pluralidad de células en suspensión administradas desde una fuente de administración de fluido desde el primer lumen hasta la zona de electroporación se encuentra entre 0,001 mL/min y 1000 mL/min (por ejemplo, entre 0,001 mL/min y 0,05 mL/min, entre 0,001 mL/min y 0,1 mL/min, entre 0,001 mL/min y 1 mL/min, entre 0,05 mL/min y 0,5 mL/min, entre 0,05 mL/min

30 y 5 mL/min, entre 0,1 mL/min y 1 mL/min, entre 0,5 mL/min y 2 mL/min, entre 1 mL/min y 5 mL/min, entre 1 mL/min y 10 mL/min, entre 1 mL/min y 100 mL/min, entre 5 mL/min y 25 mL/min, entre 5 mL/min y 150 mL/min, entre 10 mL/min y 100 mL/min, entre 15 mL/min y 150 mL/min, entre 25 mL/min y 100 mL/min, entre 25 mL/min y 200 mL/min, entre 50 mL/min y 150 mL/min, entre 50 mL/min y 250 mL/min, entre 75 mL/min y 200 mL/min, entre 75 mL/min y 350 mL/min, entre 100

35 mL/min y 250 mL/min, entre 100 mL/min y 400 mL/min, entre 150 mL/min y 450 mL/min, entre 200 mL/min y 500 mL/min, entre 250 mL/min y 700 mL/min, entre 300 mL/min y 1000 mL/min, entre

400 mL/min y 750 mL/min, entre 500 mL/min y 1000 mL/min, o entre 750 mL/min y 1000 mL/min, por ejemplo, alrededor de 0,001 mL/min, alrededor de 0,01 mL/min, alrededor de 0,05 mL/min, alrededor de 0,1 mL/min, alrededor de 0,5 mL/min, alrededor de 1 mL/min, alrededor de 5 mL/min, alrededor de 10 mL/min, alrededor de 15 mL/min, alrededor de 20 mL/min, alrededor de 30 mL/min, alrededor de 40 mL/min, alrededor de 50 mL/min, alrededor de 60 mL/min, alrededor de 70 mL/min, alrededor de 80 mL/min, alrededor de 90 mL/min, sobre 100 mL/min, alrededor de 150 mL/min, alrededor de 200 mL/min, alrededor de 250 mL/min, alrededor de 300 mL/min, alrededor de 350 mL/min, alrededor de 400 mL/min, alrededor de 450 mL/min, alrededor de 500 mL/min, alrededor de 600 mL/min, alrededor de 700 mL/min, alrededor de 800 mL/min, alrededor de 900 mL/min, o alrededor de 1000 mL/min), donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen hacia la segunda salida.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, un número de Reynolds de un líquido y/o la pluralidad de células en suspensión entregadas desde una fuente de suministro de fluido desde el primer lumen a la zona de electroporación está entre  $0,04$  y  $2,43 \times 10^4$  (por ejemplo, entre 10 y 2000, entre 100 y 1600, entre 100 y 1800, o entre 183 y 1530), donde la fuente de suministro 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. En algunas modalidades, 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  $5 \times 10^{-5}$  m/s y 32,7 m/s (por ejemplo, entre 0,01 y 10 m/s, entre 0,1 y 5 m/s, o entre 0,26 y 2,08 m/s), donde la fuente de suministro 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. En algunas modalidades, las velocidades de corte 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 están entre 0,1 1/s y  $2 \times 10^6$  1/s (por ejemplo, entre 1 /s y 100 000 /s, entre 10 /s y 100 000 /s, entre 100 /s y 100 000 /s, entre 1000 /s y 80 000 /s, o entre 2600 y 54 000), donde la fuente de suministro 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. En algunas modalidades, la presión máxima de un líquido y/o la pluralidad de células en suspensión administrada desde una fuente de suministro de fluido desde el primer lumen a la zona de electroporación está entre  $1 \times 10^{-3}$  Pa y  $9,5 \times 10^4$  Pa (por ejemplo, entre 0,1 Pa y 10 000 Pa, entre 1 Pa y 5000 Pa, entre 100 Pa y 3000 Pa, o entre 136 Pa y 1600 Pa), donde la fuente de suministro 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. En algunas modalidades, una velocidad promedio 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 electroporación se encuentra entre  $1,5 \times 10^{-5}$  m/s y 15,9 m/s (por ejemplo, entre  $7,79 \times 10^{-2}$  m/s y  $7,81 \times 10^{-1}$  m/s), donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar el líquido y/o la pluralidad de las células en suspensión a través del primer lumen a la segunda salida. En algunas modalidades, 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 se encuentra entre  $1 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s y  $15 \times 10^{-4}$  m<sup>2</sup>/s (por ejemplo, entre  $1,3 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s y  $5,6 \times 10^{-4}$  m<sup>2</sup>/s), donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen a la segunda salida.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, un tiempo de residencia en la zona de electroporación de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el líquido se encuentra entre 0,5 ms y 50 ms (por ejemplo, entre 0,5 ms y 5 ms, entre 1 ms y 10 ms, entre 1 ms y 15 ms, entre 5 ms y 15 ms, entre 10 ms y 20 ms, entre 15 ms y 25 ms, entre 20 ms y 30 ms, entre 25 ms y 35 ms, entre 30 ms y 40 ms, entre 35 ms y 45 ms, o entre 40 ms y 50 ms, por ejemplo, alrededor de 0,5 ms, alrededor de 0,6 ms, alrededor de 0,7 ms, alrededor de 0,8 ms, alrededor de 0,9 ms, alrededor de 1 ms, alrededor de 1,5 ms, alrededor de 2 ms, alrededor de 2,5 ms, alrededor de 3 ms, alrededor de 3,5 ms, alrededor de 4 ms, alrededor de 4,5 ms, alrededor de 5 ms, alrededor de 5,5 ms, alrededor de 6 ms, alrededor de 6,5 ms, alrededor de 7 ms, alrededor de 7,5 ms, alrededor de 8 ms, alrededor de 8,5 ms, alrededor de 9 ms, alrededor de 9,5 ms, alrededor de 10 ms, alrededor de 10,5 ms, alrededor de 11 ms, alrededor de 11,5 ms, alrededor de 12 ms, alrededor de 12,5 ms, alrededor de 13 ms, alrededor de 13,5 ms, alrededor de 14 ms, alrededor de 14,5 ms, alrededor de 15 ms, alrededor de 20 ms, alrededor de 25 ms, alrededor de 30 ms, alrededor de 35 ms, alrededor de 40 ms, alrededor de 45 ms o alrededor de 50 ms). En algunas modalidades, el tiempo de residencia es de 5-20 ms (por ejemplo, de 6-18 ms, 8-15 ms o 10-14 ms).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, la pluralidad de células tiene desde 0 % hasta alrededor de 25 % de cambio fenotípico (por ejemplo, de alrededor de 0 % a alrededor 2,5 %, de alrededor de 1 % a alrededor 5%, de alrededor de 1 % a alrededor 10 %, desde alrededor de 5 % a alrededor 15 %, desde alrededor de el 10 % hasta alrededor de 20 %, desde alrededor de el 15 % hasta alrededor de 25 % o de alrededor de el 20 % a alrededor de 25 %, por ejemplo, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 13 %, alrededor de 14 %, alrededor de 15 %, alrededor de 16 %, alrededor de 17 %, alrededor de 18 %, alrededor de 19 %, alrededor de 20 %, alrededor de 21 %, alrededor de 22 %, alrededor de 23 %, alrededor de 24 % o alrededor de 25 %) con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular al salir de la

segunda salida del dispositivo (por ejemplo, dentro de las 48 horas posteriores a la salida de la segunda salida, por ejemplo, dentro de las 24 horas posteriores a la salida de la segunda salida, por ejemplo, entre 1 minuto y 24 horas, 5 minutos y 24 horas, 10 minutos y 24 horas, 30 minutos y 24 horas, 1 hora y 24 horas, o 2 horas y 24 horas después de salir de la segunda salida).

- 5 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico en relación con una medición de referencia del fenotipo celular al salir de la segunda salida del dispositivo (por ejemplo, dentro de las 48 horas posteriores a la salida de la segunda salida, por ejemplo, dentro de las 24 horas después de salir de la segunda salida, por ejemplo, entre 1 minuto y 24 horas, 5 minutos y 24 horas, 10 minutos y 24 horas, 30 minutos y 24 horas, 1 hora y 24 horas, o 2 horas y 24 horas después de salir de la segunda salida).

10 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el campo eléctrico es producido por pulsos de voltaje, donde los pulsos de voltaje activan el primer electrodo a un voltaje aplicado particular mientras que el segundo electrodo se activa a un voltaje aplicado particular, aplicando así una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodos, donde los pulsos de

15 voltaje tienen cada uno una amplitud entre -3 kV y 3 kV (por ejemplo, entre -3 kV y 1 kV, entre -3 kV y -1,5 kV, entre -2 kV y 2 kV, entre -1,5 kV y 1,5 kV, entre -1,5 kV y 2,5 kV, entre -1 kV y 1 kV, entre -1 kV y 2 kV, entre -0,5 kV y 0,5 kV, entre -0,5 kV y 1,5 kV, entre -0,5 kV y 3 kV, entre -0,01 kV y 2 kV, entre 0 kV y 1 kV, entre 0 kV y 2 kV, entre 0 kV y 3 kV, entre 0,01 kV y 0,1 kV, entre 0,01 kV y 1 kV, entre 0,02 kV y 0,2 kV, entre 0,03 kV y 0,3 kV, entre 0,04 kV y 0,4 kV, entre 0,05

20 kV y 0,5 kV, entre 0,05 kV y 1,5 kV, entre 0,06 kV y 0,6 kV, entre 0,07 kV y 0,7 kV, entre 0,08 kV y 0,8 kV, entre 0,09 kV y 0,9 kV, entre 0,1 kV y 0,7 kV, entre 0,1 kV y 1 kV, entre 0,1 kV y 2 kV, entre 0,1 kV y 3 kV, entre 0,15 kV y 1,5 kV, entre 0,2 y 0,6 kV, entre 0,2 kV y 2 kV, entre 0,25 kV y 2,5 kV, entre 0,3 kV y 3 kV, entre 0,5 kV y 1 kV, entre 0,5 kV y 3 kV, entre 0,6 kV y 1,5 kV, entre 0,7 kV y 1,8 kV, entre 0,8 kV y 2 kV, entre 0,9 kV y 3 kV, entre 1 kV y 2 kV, entre 1,5 kV y 2,5 kV, o entre

25 2 kV y 3 kV, por ejemplo, alrededor de -3 kV, alrededor de -2,5 kV, alrededor de -2 kV, alrededor de -1,5 kV, alrededor de -1 kV, alrededor de -0,5 kV, alrededor de -0,01 kV, alrededor de 0 kV, alrededor de 0,01 kV, alrededor de 0,02 kV, alrededor de 0,03 kV, alrededor de 0,04 kV, alrededor de 0,05 kV, alrededor de 0,06 kV, alrededor de 0,07 kV, alrededor de 0,08 kV, alrededor de 0,09 kV, alrededor de 0,1 kV, alrededor de 0,2 kV, alrededor de 0,3 kV, alrededor de 0,4 kV, alrededor de 0,5 kV, alrededor de 0,6 kV, alrededor de 0,7 kV, alrededor de 0,8 kV, alrededor de 0,9 kV, alrededor de 1 kV, alrededor de 1,1 kV, alrededor de 1,2 kV, alrededor de 1,3 kV, alrededor de 1,4 kV, alrededor de 1,5 kV, alrededor de 1,6 kV, alrededor de 1,7 kV, alrededor de 1,8 kV, alrededor de 1,9 kV, alrededor de 2 kV, alrededor de 2,1 kV, alrededor de 2,2 kV, alrededor de 2,3 kV, alrededor de 2,4 kV, alrededor de 2,5 kV, alrededor de 2,6 kV, alrededor de 2,7 kV, alrededor de

30 2,8 kV, alrededor de 2,9 kV o alrededor de 3 kV). En algunas modalidades, el primer electrodo se energiza a un voltaje aplicado particular mientras que el segundo electrodo se mantiene a tierra

35

(por ejemplo, 0 kV), aplicando, de esta manera, una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y el segundo electrodo. En algunas modalidades, los pulsos de voltaje tienen una duración de entre 0,01 ms y 1000 ms (por ejemplo, entre 0,01 ms y 0,1 ms, entre 0,01 ms y 1 ms, entre 0,01 ms y 10 ms, entre 0,05 ms y 0,5 ms, entre 0,05 ms y 1 ms, entre 0,1 ms y 1 ms, entre 0,1 ms y 5 ms, entre 0,1 ms y 500 ms, entre 0,5 ms y 2 ms, entre 1 ms y 5 ms, entre 1 ms y 10 ms, entre 1 ms y 25 ms, entre 1 ms y 100 ms, entre 1 ms y 1000 ms, entre 5 ms y 25 ms, entre 5 ms y 150 ms, entre 10 ms y 100 ms, entre 15 ms y 150 ms, entre 25 ms y 100 ms, entre 25 ms y 200 ms, entre 50 ms y 150 ms, entre 50 ms y 250 ms, entre 75 ms y 200 ms, entre 75 ms y 350 ms, entre 100 ms y 250 ms, entre 100 ms y 400 ms, entre 150 ms y 450 ms, entre 200 ms y 500 ms, entre 250 ms y 700 ms, entre 300 ms y 1000 ms, entre 400 ms y 750 ms, entre 500 ms y 1000 ms, o entre 750 ms y 1000 ms, por ejemplo, alrededor de 0,01 ms, alrededor de 0,05 ms, alrededor de 0,1 ms, alrededor de 0,5 ms, alrededor de 1 ms, alrededor de 5 ms, alrededor de 10 ms, alrededor de 15 ms, alrededor de 20 ms, alrededor de 30 ms, alrededor de 40 ms, alrededor de 50 ms, alrededor de 60 ms, alrededor de 70 ms, alrededor de 80 ms, alrededor de 90 ms, alrededor de 100 ms, alrededor de 150 ms, alrededor de 200 ms, alrededor de 250 ms, alrededor de 300 ms, alrededor de 350 ms, alrededor de 400 ms, alrededor de 450 ms, alrededor de 500 ms, alrededor de 600 ms, alrededor de 700 ms, alrededor de 800 ms, alrededor de 900 ms o alrededor de 1000 ms). En algunas modalidades, los pulsos de voltaje se aplican al primer y segundo electrodos a una frecuencia de entre 1 Hz y 50 000 Hz (por ejemplo, entre 1 Hz y 10 Hz, entre 1 Hz y 100 Hz, entre 1 Hz y 1000 Hz, entre 5 Hz y 20 Hz, entre 5 Hz y 2000 Hz, entre 10 Hz y 50 Hz, entre 10 Hz y 100 Hz, entre 10 Hz y 1000 Hz, entre 10 Hz y 10,000 Hz, entre 20 Hz y 50 Hz, entre 20 Hz y 100 Hz, entre 20 Hz y 2000 Hz, entre 20 Hz y 20 000 Hz, entre 50 Hz y 500 Hz, entre 50 Hz y 1000 Hz, entre 50 Hz y 50 000 Hz, entre 100 Hz y 200 Hz, entre 100 Hz y 500 Hz, entre 100 Hz y 1000 Hz, entre 100 Hz y 10 000 Hz, entre 100 Hz y 50 000 Hz, entre 200 Hz y 400 Hz, entre 200 Hz y 750 Hz, entre 200 Hz y 2000 Hz, entre 500 Hz y 1000 Hz, entre 750 Hz y 1500 Hz, entre 750 Hz y 10,000 Hz, entre 1000 Hz y 2000 Hz, entre 1000 Hz y 5000 Hz, entre 1000 Hz y 10 000 Hz, entre 1000 Hz y 50 000 Hz, entre 5 000 Hz y 10 000 Hz, entre 5000 Hz y 20 000 Hz, entre 5000 Hz y 50 000 Hz, entre 10 000 Hz y 15 000 Hz, entre 10 000 Hz y 25 000 Hz, entre 10 000 Hz y 50 000 Hz, entre 20 000 Hz y 30 000 Hz, o entre 20 000 y 50 000 Hz, por ejemplo, alrededor de 1 Hz, alrededor de 5 Hz, alrededor de 10 Hz, alrededor de 20 Hz, alrededor de 50 Hz, alrededor de 75 Hz, alrededor de 100 Hz, alrededor de 150 Hz, alrededor de 200 Hz, alrededor de 300 Hz, alrededor de 400 Hz, alrededor de 500 Hz, alrededor de 600 Hz, alrededor de 700 Hz, alrededor de 800 Hz, alrededor de 900 Hz, alrededor de 1000 Hz, alrededor de 2000 Hz, alrededor de 5000 Hz, alrededor de 10 000 Hz, alrededor de 15 000 Hz, alrededor de 20 000 Hz, alrededor de 30 000 Hz, alrededor de 40 000 Hz o alrededor de 50 000 Hz).

En algunas modalidades, una forma de onda del pulso de voltaje se selecciona de un grupo que

consta de CC, cuadrado, pulso, bipolar, seno, rampa, bipolar asimétrico, arbitrario y cualquier superposición o combinaciones de estos. En algunas modalidades, el campo eléctrico generado a partir de los pulsos de voltaje tiene una magnitud de entre 1 V/cm y 50 000 V/cm (por ejemplo, entre 1 V/cm y 50 V/cm, entre 1 V/cm y 500 V/cm, entre 1 V/cm y 1000 V/cm, entre 1 V/cm y 20 000 V/cm, entre 5 V/cm y 10 000 V/cm, entre 25 V/cm y 200 V/cm, entre 50 V/cm y 250 V/cm, entre 50 V/cm y 500 V/cm, entre 50 V/cm y 15 000 V/cm, entre 100 V/cm y 1000 V/cm, entre 300 V/cm y 500 V/cm, entre 500 V/cm y 10 000 V/cm, entre 1000 V/cm y 25 000 V/cm, entre 5000 V/cm y 25 000 V/cm, entre 10 000 V/cm y 20 000 V/cm, entre 10 000 V/cm y 50 000 V/cm, por ejemplo, alrededor de 1 V/cm, sobre 2 V/cm, alrededor de 3 V/cm, alrededor de 4 V/cm, como 5 V/cm, alrededor de 6 V/cm, alrededor de 7 V/cm, alrededor de 8 V/cm, alrededor de 9 V/cm, como 10 V/cm, aproximadamente 20 V/cm, al rededor de 30 V/cm, alrededor de 40 V/cm, alrededor de 50 V/cm, alrededor de 60 V/cm, alrededor de 70 V/cm, alrededor de 80 V/cm, alrededor de 90 V/cm, sobre 100 V/cm, alrededor de 150 V/cm, alrededor de 200 V/cm, alrededor de 250 V/cm, alrededor de 300 V/cm, alrededor de 350 V/cm, alrededor de 400 V/cm, alrededor de 450 V/cm, alrededor de 500 V/cm, alrededor de 550 V/cm, alrededor de 600 V/cm, alrededor de 650 V/cm, alrededor de 700 V/cm, alrededor de 750 V/cm, alrededor de 800 V/cm, alrededor de 900 V/cm, alrededor de 1000 V/cm, alrededor de 2000 V/cm, alrededor de 3000 V/cm, alrededor de 4000 V/cm, alrededor de 5000 V/cm, alrededor de 6000 V/cm, alrededor de 7000 V/cm, alrededor de 8000 V/cm, alrededor de 9000 V/cm, alrededor de 10 000 V/cm, alrededor de 15 000 V/cm, alrededor de 20 000 V/cm, alrededor de 25 000 V/cm, alrededor de 30 000 V/cm, alrededor de 35 000 V/cm, alrededor de 40 000 V/cm, alrededor de 45 000 V/cm, o alrededor de 50 000 V/cm).

En algunas modalidades, un ciclo de trabajo de los pulsos de voltaje está entre 0,001 % y 100 % (por ejemplo, entre 0,001 % y 0,1 %, entre 0,001 % y 10 %, entre 0,01 % y 1 %, entre 0,01 % a 100 %, entre 0,1 % y 5 %, entre 0,1 % y 99 %, entre 1 % y 10 %, entre 1 % y 97 %, entre 2,5 % y 20 %, entre 5 % y 25 %, entre 5 % y 40 %, entre 10 % y 25 %, entre 10 % y 50 %, entre 10 % y 95 %, entre 15 % y 60 %, entre 15 % y 85 %, entre 20 % y 40 %, entre 30 % y 50 %, entre 40 % y 60 %, entre 40 % y 75 %, entre 50 % y 85 %, entre 50 % y 100 %, entre 75 % y 100 %, o entre 90 % y 100 %, por ejemplo, alrededor de 0,001 %, alrededor de 0,002 %, alrededor de 0,003 %, alrededor de 0,004 %, alrededor de 0,005 %, alrededor de 0,006 %, alrededor de 0,007 %, alrededor de 0,008 %, alrededor de 0,009 %, alrededor de 0,01 %, alrededor de 0,02 %, alrededor de 0,03 %, alrededor de 0,04 %, alrededor de 0,05 %, alrededor de 0,06 %, alrededor de 0,07 %, alrededor de 0,08 %, alrededor de 0,09 %, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %,

alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 100 %).

En algunas modalidades, el líquido tiene una conductividad de entre 0,001 mS/cm y 500 mS/cm (por ejemplo, entre 0,001 mS/cm y 0,05 mS/cm, entre 0,001 mS/cm y 0,1 mS/cm, entre 0,001 mS/cm y 1 mS/cm, entre 0,05 mS/cm y 0,5 mS/cm, entre 0,05 mS/cm y 5 mS/cm, entre 0,1 mS/cm y 1 mS/cm, entre 0,1 mS/cm y 100 mS/cm, entre 0,5 mS/cm y 2 mS/cm, entre 1 mS/cm y 5 mS/cm, entre 1 mS/cm y 10 mS/cm, entre 1 mS/cm y 100 mS/cm, entre 1 mS/cm y 500 mS/cm, entre 5 mS/cm y 25 mS/cm, entre 5 mS/cm y 150 mS/cm, entre 10 mS/cm y 100 mS/cm, entre 10 mS/cm y 250 mS/cm, entre 15 mS/cm y 150 mS/cm, entre 25 mS/cm y 100 mS/cm, entre 25 mS/cm y 200 mS/cm, entre 50 mS/cm y 150 mS/cm, entre 50 mS/cm y 250 mS/cm, entre 50 mS/cm y 500 mS/cm, entre 75 mS/cm y 200 mS/cm, entre 75 mS/cm y 350 mS/cm, entre 100 mS/cm y 250 mS/cm, entre 100 mS/cm y 400 mS/cm, entre 100 mS/cm y 500 mS/cm, entre 150 mS/cm y 450 mS/cm, entre 200 mS/cm y 500 mS/cm, entre 300 mS/cm y 500 mS/cm, por ejemplo, alrededor de 0,001 mS/cm, alrededor de 0,01 mS/cm, alrededor de 0,05 mS/cm, alrededor de 0,1 mS/cm, alrededor de 0,5 mS/cm, alrededor de 1 mS/cm, alrededor de 5 mS/cm, alrededor de 10 mS/cm, alrededor de 15 mS/cm, alrededor de 20 mS/cm, alrededor de 30 mS/cm, alrededor de 40 mS/cm, alrededor de 50 mS/cm, alrededor de 60 mS/cm, alrededor de 70 mS/cm, alrededor de 80 mS/cm, alrededor de 90 mS/cm, sobre 100 mS/cm, alrededor de 150 mS/cm, alrededor de 200 mS/cm, alrededor de 250 mS/cm, alrededor de 300 mS/cm, alrededor de 350 mS/cm, alrededor de 400 mS/cm, alrededor de 450 mS/cm, o alrededor de 500 mS/cm).

En algunas modalidades, la temperatura de la pluralidad de células suspendidas en el líquido está entre 0 °C y 50 °C (entre 0 °C y 5 °C, entre 2 °C y 15 °C, entre 3 °C y 30 °C, entre 4 °C y 10 °C, entre 4 °C y 25 °C, entre 5 °C y 30 °C, entre 7 °C y 35 °C, entre 10 °C y 25 °C, entre 10 °C y 40 °C, entre 15 °C y 50 °C, entre 20 °C y 40 °C, entre 25 °C y 50 °C, o entre 35 °C y 45 °C, por ejemplo, alrededor de 0 °C, alrededor de 1 °C, alrededor de 2 °C, alrededor de 3 °C, alrededor de 4 °C, alrededor de 5 °C, alrededor de 6 °C, alrededor de 7 °C, alrededor de 8 °C, alrededor de 9 °C, alrededor de 10 °C, alrededor de 11 °C, alrededor de 12 °C, alrededor de 13 °C, alrededor de 14 °C, alrededor de 15 °C, alrededor de 16 °C, alrededor de 17 °C, alrededor de 18 °C, alrededor de 19 °C, alrededor de 20 °C, alrededor de 21 °C, alrededor de 22 °C, alrededor de 23 °C, alrededor de 24 °C, alrededor de 25 °C, alrededor de 26 °C, alrededor de 27 °C, alrededor de 28 °C, alrededor de 29 °C, alrededor de 30 °C, alrededor de 31 °C, alrededor de 32 °C, alrededor de 33 °C, alrededor de 34 °C, alrededor de 35 °C, alrededor de 36 °C, alrededor de 37 °C, alrededor de 38 °C, alrededor de 39 °C, alrededor de 40 °C, alrededor de 41 °C, alrededor de 42 °C, alrededor de 43 °C, alrededor de 44 °C, alrededor de 45 °C, alrededor de 46 °C, alrededor de 47 °C, alrededor de 48 °C, alrededor de 49 °C, o alrededor de 50 °C).

En algunas modalidades, el método incluye además almacenar la pluralidad de células suspendidas en el líquido en un amortiguador de recuperación después de la poración. En algunas modalidades, las células tienen una viabilidad luego de la introducción de la composición de entre 0,1 % y 99,9 % (por ejemplo, entre 0,1 % y 5 %, entre 1 % y 10 %, entre 2,5 % y 20 %, entre 5 % y 40 %, entre 10 % y 30 %, entre 10 % y 60 %, entre 10 % y 90 %, entre 25 % y 40 %, entre 25 % y 85 %, entre 30 % y 50 %, entre 30 % y 80 %, entre 40 % y 65 %, entre 50 % y 75 %, entre 50 % y 100 %, entre 60 % y 80 %, entre 75 % y 100 % o entre 85 % y 100 %, por ejemplo, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,15 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,25 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,35 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,45 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,55 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,65 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,75 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,85 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 0,95 %, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 99 % o alrededor de 99,9 %).

En algunas modalidades, la composición se introduce en una pluralidad de las células a una eficacia de entre 0,1 % y 99,9 % (por ejemplo, entre 0,1 % y 5 %, entre 1 % y 10 %, entre 2,5 % y 20 %, entre 5 % y 40 %, entre 10 % y 30 %, entre 10 % y 60 %, entre 10 % y 90 %, entre 25 % y 40 %, entre 25 % y 85 %, entre 30 % y 50 %, entre 30 % y 80 %, entre 40 % y 65 %, entre 50 % y 75 %, entre 50 % y 99,9 %, entre 60 % y 80 %, entre 75 % y 99,9 %, o entre 85 % y 99,9 %, por ejemplo, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,15 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,25 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,35 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,45 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,55 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,65 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,75 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,85 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 0,95 %, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 99 % o alrededor de 99,9 %).

En algunas modalidades, cualquiera de los métodos de la invención produce un número recuperación de células de entre  $10^4$  células y  $10^{12}$  células (por ejemplo, entre  $10^4$  células y  $10^5$  células, entre  $10^4$  células y  $10^6$  células, entre  $10^4$  células y  $10^7$  células, entre  $5 \times 10^4$  células y  $5 \times 10^5$  células, entre  $10^5$  células y  $10^6$  células, entre  $10^5$  células y  $10^7$  células, entre  $10^5$  células y  $10^{10}$

células, entre  $2,5 \times 10^5$  células y  $10^6$  células, entre  $5 \times 10^5$  células y  $5 \times 10^6$  células, entre  $10^6$  células y  $10^7$  células, entre  $10^6$  células y  $10^8$  células, entre  $10^6$  células y  $10^{12}$  células, entre  $5 \times 10^6$  células y  $5 \times 10^7$  células, entre  $10^7$  células y  $10^8$  células, entre  $10^7$  células y  $10^9$  células, entre  $10^7$  células y  $10^{12}$  células, entre  $5 \times 10^7$  células y  $5 \times 10^8$  células, entre  $10^8$  células y  $10^9$  células, entre  $10^8$  células y  $10^{10}$  células, entre  $10^8$  células y  $10^{12}$  células, entre  $5 \times 10^8$  células y  $5 \times 10^9$  células, entre  $10^9$  células y  $10^{10}$  células, entre  $10^9$  células y  $10^{11}$  células, entre  $10^{10}$  células y  $10^{11}$  células, entre  $10^{10}$  células y  $10^{12}$  células, o entre  $10^{11}$  células y  $10^{12}$  células, por ejemplo, alrededor de  $10^4$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^4$  células, alrededor de  $5 \times 10^4$  células, alrededor de  $10^5$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^5$  células, alrededor de  $5 \times 10^5$  células, alrededor de  $10^6$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^6$  células, alrededor de  $5 \times 10^6$  células, alrededor de  $10^7$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^7$  células, alrededor de  $5 \times 10^7$  células, alrededor de  $10^8$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^8$  células, alrededor de  $5 \times 10^8$  células, alrededor de  $10^9$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^9$  células, alrededor de  $5 \times 10^9$  células, alrededor de  $10^{10}$  células, alrededor de  $5 \times 10^{10}$  células, alrededor de  $10^{11}$  células o alrededor de  $10^{12}$  células).

En algunas modalidades, el método produce una tasa de recuperación celular de entre 0,1 % y 100 % (por ejemplo, entre 0,1 % y 5 %, entre 1 % y 10 %, entre 2,5 % y 20 %, entre 5 % y 40 %, entre 10 % y 30 %, entre 10 % y 60 %, entre 10 % y 90 %, entre 25 % y 40 %, entre 25 % y 85 %, entre 30 % y 50 %, entre 30 % y 80 %, entre 40 % y 65 %, entre 50 % y 75 %, entre 50 % y 99,9 %, entre 60 % y 80 %, entre 75 % y 99,9 % o entre 85 % y 99,9 %, por ejemplo, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,15 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,25 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,35 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,45 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,55 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,65 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,75 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,85 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 0,95 %, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 100 %).

En algunas modalidades, el método produce un rendimiento de las células vivas modificadas genéticamente (por ejemplo, rendimiento de recuperación) de entre 0,1 % y 500 % (por ejemplo, entre 0,1 % y 5 %, entre 1 % y 10 %, entre 2,5 % y 20 %, entre 5 % y 40 %, entre 10 % y 30 %, entre 10 % y 60 %, entre 10 % y 90 %, entre 25 % y 40 %, entre 25 % y 85 %, entre 30 % y 50 %, entre 30 % y 80 %, entre 40 % y 65 %, entre 50 % y 75 %, entre 50 % y 100 %, entre 60 % y 80 %, entre 60 % y 150 %, entre 75 % y 100 %, entre 75 % y 200 %, entre 85 % y 150 %, entre 90 % y 250 %, entre 100 % y 200 %, entre 100 % y 400 %, entre 150 % y 300 %, entre 200 % y 500 %, o entre 300 % y 500 %, por ejemplo, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,15 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,25 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,35 %, alrededor de

0,4 %, alrededor de 0,45 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,55 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,65 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,75 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,85 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 0,95 %, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %  
 5 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 99 %, alrededor de 100 %, alrededor de 150 %, alrededor de 200 %, alrededor de 210 %, alrededor de 220 %, alrededor de 230 %, alrededor de 240 %, alrededor de 250 %, alrededor de 260 %, alrededor de 270%, alrededor de 280 %, alrededor de 290 %, alrededor de 300 %, alrededor de 310 %, alrededor de 320 %, alrededor de 330 %, alrededor de 340 %, alrededor de 350 %, alrededor de 360 %, alrededor de 370 %, alrededor de 380 %, alrededor de 390 %, alrededor de 400 %, alrededor de 410 %, alrededor de 420 %, alrededor de 430 %, alrededor de 440 %, alrededor de 450 %, alrededor de 460 %, alrededor de 470 %, alrededor de 480 %, alrededor de 490 % o alrededor de 500 %).

En algunas modalidades, la composición administrada a la pluralidad de células (por ejemplo, administrada electromecánicamente a la pluralidad de células) incluye al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en agentes terapéuticos, vitaminas, nanopartículas, moléculas cargadas, moléculas no cargadas, manipuladas nucleasas, ADN, ARN, complejo  
 20 CRISPR-Cas, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas autoguiadas, meganucleasas (mns), megaTAL, enzimas, transposones, péptidos, proteínas, virus, polímeros, una ribonucleoproteína (RNP) y polisacáridos. En algunas modalidades, la composición tiene una concentración en el líquido de entre  
 25 0,0001 µg/mL y 1000 µg/mL (por ejemplo, de alrededor de 0,0001 µg/mL a alrededor de 0,001 µg/mL, alrededor de 0,001 µg/mL a alrededor de 0,01 µg/mL, alrededor de 0,001 µg/mL a alrededor de 5 µg/mL, alrededor de 0,005 µg/mL a alrededor de 0,1 µg/mL, alrededor de 0,01 µg/mL a alrededor de 0,1 µg/mL, alrededor de 0,01 µg/mL a alrededor de 1 µg/mL, alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 1 µg/mL, alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 5 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 10 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL a unos 50 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL, alrededor de 2,5 µg/mL a alrededor de 15 µg/mL, alrededor de 5 µg/mL a alrededor de 25 µg/mL, alrededor de 5 µg/mL a alrededor de 50 µg/mL, alrededor de 5 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 7,5 µg/mL a alrededor de 75 µg/mL, alrededor de 10 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL, alrededor de 10 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL a alrededor de 50 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL a alrededor de 250 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL,

alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 250 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 750 µg/mL, sobre 100 µg/mL a alrededor de 300 µg/mL, sobre 100 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, alrededor de 200 µg/mL a alrededor de 400 µg/mL, alrededor de 250 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 350 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 400 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, alrededor de 500 µg/mL a alrededor de 750 µg/mL, alrededor de 650 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, o alrededor de 800 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, por ejemplo, alrededor de 0,0001 µg/mL, alrededor de 0,0005 µg/mL, alrededor de 0,001 µg/mL, alrededor de 0,005 µg/mL, alrededor de 0,01 µg/mL, alrededor de 0,02 µg/mL, alrededor de 0,03 µg/mL, alrededor de 0,04 µg/mL, alrededor de 0,05 µg/mL, alrededor de 0,06 µg/mL, alrededor de 0,07 µg/mL, alrededor de 0,08 µg/mL, alrededor de 0,09 µg/mL, alrededor de 0,1 µg/mL, alrededor de 0,2 µg/mL, alrededor de 0,3 µg/mL, alrededor de 0,4 µg/mL, alrededor de 0,5 µg/mL, alrededor de 0,6 µg/mL, alrededor de 0,7 µg/mL, alrededor de 0,8 µg/mL, alrededor de 0,9 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL, alrededor de 1,5 µg/mL, sobre 2 µg/mL, alrededor de 2,5 µg/mL, alrededor de 3 µg/mL, alrededor de 3,5 µg/mL, alrededor de 4 µg/mL, alrededor de 4,5 µg/mL, como 5 µg/mL, alrededor de 5,5 µg/mL, alrededor de 6 µg/mL, alrededor de 6,5 µg/mL, alrededor de 7 µg/mL, alrededor de 7,5 µg/mL, alrededor de 8 µg/mL, alrededor de 8,5 µg/mL, alrededor de 9 µg/mL, alrededor de 9,5 µg/mL, alrededor de 10 µg/mL, alrededor de 15 µg/mL, alrededor de 20 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL, al rededor de 30 µg/mL, alrededor de 35 µg/mL, alrededor de 40 µg/mL, alrededor de 45 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL, alrededor de 55 µg/mL, alrededor de 60 µg/mL, alrededor de 65 µg/mL, alrededor de 70 µg/mL, alrededor de 75 µg/mL, alrededor de 80 µg/mL, alrededor de 85 µg/mL, alrededor de 90 µg/mL, alrededor de 95 µg/mL, sobre 100 µg/mL, alrededor de 200 µg/mL, alrededor de 250 µg/mL, alrededor de 300 µg/mL, alrededor de 350 µg/mL, alrededor de 400 µg/mL, alrededor de 450 µg/mL, alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 550 µg/mL, alrededor de 600 µg/mL, alrededor de 650 µg/mL, alrededor de 700 µg/mL, alrededor de 750 µg/mL, alrededor de 800 µg/mL, alrededor de 850 µg/mL, alrededor de 900 µg/mL, alrededor de 950 µg/mL, o alrededor de 1000 µg/mL).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, la pluralidad de células suspendidas en el líquido incluye células eucariotas (por ejemplo, células animales, por ejemplo, células humanas), células procariotas (por ejemplo, células bacterianas), células vegetales y/o células sintéticas. Las células pueden ser células primarias (por ejemplo, células humanas primarias), células de una línea celular (por ejemplo, una línea celular humana), células en suspensión, células adherentes, células madre, células sanguíneas (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), y/o células inmunitario (por ejemplo, glóbulos blancos (por ejemplo, células inmunitarias innatas o células inmunitarias adaptativas)). En algunas modalidades, las células (por ejemplo, células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos o células presentadoras de antígenos) son

células no estimuladas, células estimuladas o células activadas. En algunas modalidades, las células son células inmunitarias adaptativas y/o células inmunitarias innatas. En algunas modalidades, la pluralidad de células incluye células presentadoras de antígeno (APC), monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células citolíticas, células Jurkat, células THP-1, riñón embrionario humano (HEK- 293), células de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1), células madre embrionarias (ESC), células madre mesenquimales (MSC) o células madre hematopoyéticas (HSC). En algunas modalidades, las células pueden ser linfocitos T humanos primarios, macrófagos humanos primarios, monocitos humanos primarios, células citolíticas humanas primarias o células madre pluripotentes inducidas por humanos primarios (iPSC). En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el método incluye además almacenar la pluralidad de células suspendidas en el líquido en un amortiguador de recuperación después de la poración.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit que incluye cualquiera de los dispositivos o sistemas descritos en este documento. Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona un kit para administrar electromecánicamente una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, donde el kit incluye una pluralidad de dispositivos, cada uno de la pluralidad de dispositivos que incluye: un primer electrodo que incluye una primera salida, una primera entrada y un primer lumen que incluyen una dimensión de sección transversal mínima; un segundo electrodo que incluye una segunda salida, una segunda entrada y un segundo lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima; y una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación incluye una dimensión de sección transversal mínima superior a alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm, o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm), donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme, donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico al primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación; y una pluralidad de estructuras externas configuradas para revestir la pluralidad de dispositivos, donde cada una de la pluralidad de estructuras externas incluye: un alojamiento configurado para revestir el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del al menos un dispositivo; una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo; y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo. En algunas modalidades, la pluralidad de estructuras externas es integral a la pluralidad de dispositivos. En algunas modalidades, la pluralidad de estructuras externas está conectada de manera removible a la pluralidad de dispositivos. En

algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para aumentar una temperatura del al menos un dispositivo, donde el controlador térmico es un elemento calefactor seleccionado de un grupo que consta de un bloque térmico, un flujo de líquido, un calefactor alimentado por batería y un calefactor de película fina. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para disminuir una temperatura del al menos un dispositivo, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado de un grupo que consiste en un flujo de líquido, un enfriador evaporativo y un dispositivo Peltier.

En un aspecto, la invención proporciona un kit para someter a electroporación a una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, donde el kit incluye una pluralidad de dispositivos, cada uno de la pluralidad de dispositivos que incluye: un primer electrodo que incluye una primera salida, una primera entrada y un primer lumen que incluyen una dimensión de sección transversal mínima; un segundo electrodo que incluye una segunda salida, una segunda entrada y un segundo lumen que incluye una dimensión de sección transversal mínima; y una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la zona de electroporación incluye una dimensión de sección transversal mínima superior a alrededor de 100  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de 100  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 150  $\mu\text{m}$  a 15 mm, de 200  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 250  $\mu\text{m}$  a 5 mm, de 500  $\mu\text{m}$  a 10 mm, de 1 mm a 10 mm, de 1 mm a 50 mm, de 5 mm a 25 mm, o de 20 mm a 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 1,0 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 25 mm o alrededor de 50 mm), donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme, donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico al primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación; y una pluralidad de estructuras externas configuradas para revestir la pluralidad de dispositivos, donde cada una de la pluralidad de estructuras externas incluye: un alojamiento configurado para revestir el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del al menos un dispositivo; una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo; y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo. En algunas modalidades, la pluralidad de estructuras externas es integral a la pluralidad de dispositivos. En algunas modalidades, la pluralidad de estructuras externas está conectada de manera removible a la pluralidad de dispositivos. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para aumentar una temperatura del al menos un dispositivo, donde el controlador térmico es un elemento calefactor seleccionado de un grupo que consta de un bloque térmico, un flujo de líquido, un calefactor alimentado por batería y un calefactor de película fina. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para disminuir una temperatura del al menos un dispositivo, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado de un grupo que consiste en un flujo de

líquido, un enfriador evaporativo y un dispositivo Peltier.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para administrar electromecánicamente una composición en una pluralidad de celdas suspendidas en un líquido, que incluye: una pluralidad de dispositivos, cada uno de la pluralidad de dispositivos incluye un dispositivo de las modalidades mencionadas anteriormente; y una pluralidad de estructuras externas configuradas para contener la pluralidad de dispositivos, donde cada una de la pluralidad de estructuras externas incluye: un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del al menos un dispositivo; una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo; y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo. En algunas modalidades, la pluralidad de estructuras externas es integral a la pluralidad de dispositivos. En algunas modalidades, la pluralidad de estructuras externas está conectada de manera removible a la pluralidad de dispositivos. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para aumentar la temperatura del al menos un dispositivo, donde el controlador térmico es un elemento calefactor seleccionado de un grupo que consta de un bloque térmico, un flujo de líquido, un calefactor alimentado por batería y un calefactor de película fina. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para disminuir una temperatura del al menos un dispositivo, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado de un grupo que consiste en un flujo de líquido, un enfriador evaporativo y un dispositivo Peltier.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para someter a electroporación una composición en una pluralidad de celdas suspendidas en un líquido, que incluye: una pluralidad de dispositivos, cada uno de la pluralidad de dispositivos incluye un dispositivo de las modalidades mencionadas anteriormente; y una pluralidad de estructuras externas configuradas para contener la pluralidad de dispositivos, donde cada una de la pluralidad de estructuras externas incluye: un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del al menos un dispositivo; una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo; y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo. En algunas modalidades, la pluralidad de estructuras externas es integral a la pluralidad de dispositivos. En algunas modalidades, la pluralidad de estructuras externas está conectada de manera removible a la pluralidad de dispositivos. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para aumentar la temperatura del al menos un dispositivo, donde el controlador térmico es un elemento calefactor seleccionado de un grupo que consta de un bloque térmico, un flujo de líquido, un calefactor alimentado por batería y un calefactor de película fina. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un controlador térmico configurado para disminuir una temperatura del al menos un dispositivo, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado de un grupo que consiste en un

flujo de líquido, un enfriador evaporativo y un dispositivo Peltier.

En otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo para administrar electromecánicamente una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, donde el dispositivo incluye: un primer electrodo que tiene una primera entrada y una primera salida, donde un lumen  
 5 del primer electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo que tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de recuperación; y una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente  
 10 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. En el dispositivo, la pluralidad de células suspendidas en el fluido se electroporan al entrar en la zona de electroporación.

En otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo para someter a electroporación una  
 15 composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, donde el dispositivo incluye: un primer electrodo que tiene una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo que tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de recuperación; y una  
 20 zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión 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. En el dispositivo, la pluralidad de células suspendidas en el fluido se electroporan al entrar en la zona de electroporación.

25 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos anteriores, el kit incluye además uno o más depósitos, por ejemplo, un primer depósito y un segundo depósito, conectados de forma fluida a una zona, por ejemplo, la zona de entrada o zona de recuperación, del dispositivo. Por ejemplo, un primer depósito se puede conectar de forma fluida a la zona de entrada y un segundo depósito se puede conectar de forma fluida a la zona de recuperación.

30 En ciertas modalidades, la sección transversal de la zona de electroporación se selecciona del grupo que consiste en cilíndrica, elipsoidal, poligonal, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.

En algunos casos, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación se encuentra entre el 0,01 % y el 100 000 % de  
 35 la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación. Por ejemplo, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de

recuperación puede ser de alrededor de un 0,01 % a alrededor de un 1000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, alrededor de 0,01 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, alrededor de 5 % a alrededor de 25 %, alrededor de 10 % a alrededor de 50 %, alrededor de 10 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 25 %  
 5 alrededor de 75 %, alrededor de 25 % alrededor de 750 % o alrededor de 50 % a alrededor de 1000 %. Alternativamente, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación puede ser de alrededor de 100 % a alrededor de 100 000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, de alrededor de 100 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 500 % a alrededor de  
 10 5000 %, alrededor de 1000 % a alrededor de 10 000 %, alrededor de 5000 % a alrededor de 25 000 %, alrededor de 10 000 % a alrededor de 50 000 %, alrededor del 25 000 % a alrededor de 75 000 %, o alrededor de 50 000 % a alrededor de 100 000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación.

En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación está  
 15 entre 0,005 mm y 50 mm. En algunas modalidades, la longitud de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm. En modalidades particulares, la longitud de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 25 mm. En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de cualquiera del primer electrodo o del segundo electrodo se encuentra entre 0,1 mm y 500 mm. En  
 20 modalidades particulares, ninguna de la zona de entrada, zona de recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de la sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido, por ejemplo, las células pueden pasar a través del dispositivo sin deformarse.

En algunas modalidades, la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular al salir de la zona de  
 25 electroporación. En algunas modalidades, la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación.

En modalidades adicionales, el dispositivo incluye una estructura externa que tiene un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, segundo electrodo y la zona de electroporación de la dispositivo. En algunas modalidades, la estructura exterior forma parte integral del dispositivo.  
 30 En determinadas modalidades, la estructura exterior está conectada de forma removible al dispositivo.

En otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo para la administración electromecánica de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, donde el dispositivo incluye: un primer electrodo que tiene una primera entrada y una primera salida, donde un lumen  
 35 de la primera el electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo que tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de

recuperación; una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida cortan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida; una cuarta entrada y una cuarta salida, donde la cuarta entrada y la cuarta salida intersecan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida; y una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación. En el dispositivo, la pluralidad de células suspendidas en el fluido se transfectan al entrar en la zona de electroporación.

En otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo para la electroporación de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, donde el dispositivo incluye: un primer electrodo que tiene una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de recuperación; una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida intersecan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida; una cuarta entrada y una cuarta salida, donde la cuarta entrada y cuarta salida intersecan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida; y una zona de electroporación, donde la zona de electroporación se conecta de forma fluida con la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico al primer y el segundo electrodo produce un campo eléctrico en la zona de electroporación. En el dispositivo, la pluralidad de células suspendidas en el fluido se transfectan al entrar en la zona de electroporación.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos anteriores, el dispositivo incluye adicionalmente uno o más depósitos, por ejemplo, un primer depósito y un segundo depósito, conectado de forma fluida a una zona, por ejemplo, la zona de entrada o la zona de recuperación, del dispositivo. Por ejemplo, un primer depósito se puede conectar de forma fluida a la zona de entrada y un segundo depósito se puede conectar de forma fluida a la zona de recuperación. En modalidades particulares, el dispositivo incluye un tercer depósito conectado de forma fluida a la tercera entrada y la tercera salida y un cuarto depósito conectado de forma fluida a la cuarta entrada y la cuarta salida.

En ciertas modalidades, la sección transversal de la zona de electroporación se selecciona del grupo que consiste en cilíndrica, elipsoidal, poligonal, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.

En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación se encuentra entre el 0,01 % y el 100 000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación. Por ejemplo, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación puede ser de alrededor de un 0,01 % a alrededor de un 1000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, alrededor de 0,01 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, alrededor de 5 % a alrededor de 25 %, alrededor de 10 % a alrededor de 50 %, alrededor de 10 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 25 % alrededor de 75 %, alrededor de 25 % alrededor de 750 % o alrededor de 50 % a alrededor de 100 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación. Por ejemplo, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación puede ser de alrededor de un 100 % a alrededor de un 100 000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, alrededor de 100 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 500 % a alrededor de 5000 %, alrededor de 1000 % a alrededor de 10 000 %, alrededor de 5000 % a alrededor de 25 000 %, alrededor de 10 000 % a alrededor de 50 000 %, alrededor de 25 000 % a alrededor de 75 000 % o alrededor de 50 000 % a alrededor de 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.

En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm. En algunas modalidades, la longitud de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 25 mm. En modalidades particulares, la longitud de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm. En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de cualquiera del primer electrodo o del segundo electrodo se encuentra entre 0,1 mm y 500 mm. En modalidades particulares, ninguna de la zona de entrada, zona de recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de la sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido, por ejemplo, las células pueden pasar a través del dispositivo sin deformarse.

En modalidades particulares, la primera y/o los segundos electrodos son porosos o un fluido conductor (por ejemplo, líquido).

En algunas modalidades, la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular al salir de la zona de electroporación. En algunas modalidades, la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación.

En modalidades adicionales, el dispositivo incluye una estructura externa que tiene un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, segundo electrodo y la zona de electroporación de la dispositivo. En algunas modalidades, la estructura exterior forma parte integral del dispositivo.

En determinadas modalidades, la estructura exterior está conectada de forma removible al dispositivo.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema para la administración electromecánica de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, el sistema incluye un dispositivo que incluye: un primer electrodo que tiene una primera entrada, donde un lumen del primer electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de electrodo; y una zona de electroporación, donde la zona de electroporación se conecta de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico al primer y segundo electrodo produce un campo eléctrico en la zona de electroporación. El sistema incluye además una fuente de potencial eléctrico, donde el primer y segundo electrodo del dispositivo están conectados de manera liberable a la fuente de potencial eléctrico. En el sistema, la pluralidad de células suspendidas en el fluido se electroporan al entrar en la zona de electroporación.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema para la electroporación de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, donde el dispositivo incluye: un primer electrodo que tiene una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo que tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de recuperación; y una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión 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. El sistema incluye además una fuente de potencial eléctrico, donde el primer y segundo electrodo del dispositivo están conectados de manera removible a la fuente de potencial eléctrico. En el sistema, la pluralidad de células suspendidas en el fluido se electroporan al entrar en la zona de electroporación.

En algunas modalidades, la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular al salir de la zona de electroporación. En algunas modalidades, la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación.

En modalidades adicionales, el dispositivo incluye una estructura externa que tiene un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, segundo electrodo y la zona de electroporación del dispositivo. En algunas modalidades, la estructura exterior incluye una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada

operativamente al segundo electrodo. En algunas modalidades, la conexión removible entre la primera o la segunda entrada eléctrica y la fuente de potencial eléctrico se selecciona del grupo que consta de una abrazadera, un clip, un resorte, una funda, un cepillo de alambre, conexión mecánica, conexión inductiva o una combinación de estos.

- 5 En algunas modalidades, la estructura exterior forma parte integral del dispositivo. En determinadas modalidades, la estructura exterior está conectada de forma removible al dispositivo. En algunas modalidades, cualquiera de los dispositivos, sistemas o métodos de cualquiera de los aspectos anteriores induce una electroporación reversible o irreversible. En modalidades particulares, la electroporación es electroporación reversible sustancialmente no térmica, electroporación irreversible sustancialmente no térmica o electroporación irreversible sustancialmente térmica.

- 10 En algunas modalidades, la conexión removible entre el dispositivo y la fuente de potencial eléctrico se selecciona del grupo que consta de una abrazadera, un clip, un resorte, una funda, un cepillo de alambre, conexión mecánica, conexión inductiva o una combinación de estos. En modalidades particulares, la conexión liberable entre el dispositivo y la fuente de potencial eléctrico es un resorte.

- 15 En algunas modalidades, el dispositivo incluye adicionalmente uno o más depósitos, por ejemplo, un primer depósito y un segundo depósito, conectado de forma fluida a una zona, por ejemplo, la zona de entrada o la zona de recuperación, de un dispositivo. Por ejemplo, un primer depósito se puede conectar de forma fluida a la zona de entrada y un segundo depósito se puede conectar de forma fluida a la zona de recuperación.

- 20 En determinadas modalidades, la sección transversal de la zona de electroporación se selecciona del grupo que consiste en cilíndrica, elipsoidal, poligonal, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.

- 25 En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación se encuentra entre el 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación. Por ejemplo, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación puede ser de alrededor de un 0,01 % a alrededor de un 1000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, alrededor de 0,01 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, alrededor de 5 % a alrededor de 25 %, alrededor de 10 % a alrededor de 50 %, alrededor de 10 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 25 % alrededor de 75 %, alrededor de 25 % alrededor de 750 % o alrededor de 50 % a alrededor de 100 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación. Por ejemplo, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación puede ser de alrededor de un 100 % a alrededor de un 100

000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, alrededor de 100 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 500 % a alrededor de 5000 %, alrededor de 1000 % a alrededor de 10 000 %, alrededor de 5000 % a alrededor de 25 000 %, alrededor de 10 000 % a alrededor de 50 000 %, alrededor de 25 000 % a alrededor de 75 000 % o alrededor de 50 000 % a alrededor de 100 000 %

En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm. En algunas modalidades, la longitud de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 25 mm. En modalidades particulares, la longitud de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 25 mm. En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de cualquiera del primer electrodo o del segundo electrodo se encuentra entre 0,1 mm y 500 mm. En modalidades particulares, ninguna de la zona de entrada, zona de recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de la sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido, por ejemplo, las células pueden pasar a través del dispositivo sin deformarse.

En modalidades adicionales, el sistema incluye una fuente de administración de fluido conectada de forma fluida a la zona de entrada, donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar la pluralidad de células suspendidas en el fluido a través de la zona de entrada a la zona de comparación. En algunas modalidades, la velocidad de administración desde la fuente de suministro de fluido se encuentra entre 0,001 mL/min hasta 1000 mL/min, por ejemplo, 25 mL/min.

En determinadas modalidades, el tiempo de residencia de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido está entre 0,5 ms a 50 ms. En algunas modalidades, la conductividad del fluido se encuentra entre 0,001 mS/cm hasta 500 mS/cm, por ejemplo, 1-20 mS/cm.

En modalidades adicionales, el sistema incluye un controlador acoplado operativamente a la fuente de potencial eléctrico para administrar pulsos de voltaje al primer electrodo y el segundo electrodo para generar una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y el segundo electrodo. En algunas modalidades, los pulsos de voltaje tienen una amplitud de -3 kV a 3 kV, por ejemplo, de 0,01 kV a 3 kV, por ejemplo, de 0,2 a 0,6 kV. En algunos casos, el ciclo de trabajo de la electroporación está entre 0,001 % y 100 %, por ejemplo, 10-95 %. En algunas modalidades, los pulsos de voltaje tienen una duración de entre 0,01 ms y 1000 ms, por ejemplo, de 1-10 ms. En determinadas modalidades, los pulsos de voltaje se aplican al primer y segundo electrodos a una frecuencia entre 1 Hz y 50 000 Hz, por ejemplo, 100-500 Hz. La forma de onda del pulso de voltaje puede ser CC, cuadrada, pulso, bipolar, sinusoidal, rampa, bipolar asimétrica, arbitraria o cualquier superposición o combinación de estas. En modalidades particulares, el campo eléctrico generado a partir de los pulsos de voltaje tiene una magnitud de entre 1 V/cm hasta 50 000 V/cm, por ejemplo, 100-1000 V/cm.

En modalidades adicionales, el sistema incluye un alojamiento (por ejemplo, una estructura de

alojamiento) configurada para contener el dispositivo de electroporación descrito en este documento. En otros casos, el alojamiento (por ejemplo, la estructura del alojamiento) incluye un controlador térmico configurado para aumentar o disminuir la temperatura del alojamiento o cualquier componente del sistema de este. En algunas modalidades, el controlador térmico es un elemento calefactor, por ejemplo, un bloque calefactor, flujo de líquido, calefactor alimentado por batería o calefactor de película fina. En otras modalidades, el controlador térmico es un elemento de enfriamiento, por ejemplo, un flujo de líquido, un enfriador evaporativo o un dispositivo termoeléctrico, por ejemplo, un Peltier.

En modalidades adicionales, el sistema incluye una pluralidad de dispositivos de poración celular, por ejemplo, en serie o en paralelo. En modalidades particulares, el sistema incluye una pluralidad de estructuras externas para la pluralidad de dispositivos de poración celular.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema para la administración electromecánica de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, el sistema incluye un dispositivo que incluye: un primer electrodo que tiene una primera entrada y una primera salida, donde un lumen de la primera el electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo que tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de recuperación; una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida cortan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida; una cuarta entrada y una cuarta salida, donde la cuarta entrada y la cuarta salida cortan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida; y una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación. En el dispositivo, la pluralidad de células suspendidas en el fluido se transfectan al entrar en la zona de electroporación. En algunas modalidades, la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular al salir de la zona de electroporación. En algunas modalidades, la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema para la electroporación de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, el sistema incluye un dispositivo que incluye: un primer electrodo que tiene una primera entrada y una primera salida, donde un lumen de la primera el electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo que tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de recuperación; una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida cortan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida; una cuarta entrada y una

cuarta salida, donde la cuarta entrada y la cuarta salida intersecan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida; y una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación. En el dispositivo, la pluralidad de células suspendidas en el fluido se electroporan al entrar en la zona de electroporación.

En algunas modalidades, la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular al salir de la zona de electroporación. En algunas modalidades, la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación.

En modalidades adicionales de cualquiera de los aspectos anteriores, el dispositivo incluye una estructura externa que tiene un alojamiento (por ejemplo, una estructura de alojamiento) configurada para contener el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del dispositivo. En algunas modalidades, la estructura exterior incluye una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo. En algunas modalidades, la conexión removible entre la primera o la segunda entrada eléctrica y la fuente de potencial eléctrico se selecciona del grupo que consta de una abrazadera, un clip, un resorte, una funda, un cepillo de alambre, conexión mecánica, conexión inductiva o una combinación de estos.

En algunas modalidades, la estructura exterior forma parte integral del dispositivo. En determinadas modalidades, la estructura exterior está conectada de forma removible al dispositivo. En algunos casos, el sistema induce una electroporación reversible o irreversible. En modalidades particulares, la electroporación es electroporación reversible sustancialmente no térmica, electroporación irreversible sustancialmente no térmica o electroporación irreversible sustancialmente térmica.

En algunas modalidades, la conexión removible entre el dispositivo y la fuente de potencial eléctrico se selecciona del grupo que consta de una abrazadera, un clip, un resorte, una funda, un cepillo de alambre, conexión mecánica, conexión inductiva o una combinación de estos. En modalidades particulares, la conexión liberable entre el dispositivo y la fuente de potencial eléctrico es un resorte.

En algunas modalidades, el dispositivo incluye adicionalmente uno o más depósitos, por ejemplo, un primer depósito y un segundo depósito, conectado de forma fluida a una zona, por ejemplo, la zona de entrada o la zona de recuperación, de un dispositivo. Por ejemplo, un primer depósito se puede conectar de forma fluida a la zona de entrada y un segundo depósito se puede conectar de

forma fluida a la zona de recuperación.

En ciertas modalidades, la sección transversal de la zona de electroporación se selecciona del grupo que consiste en cilíndrica, elipsoidal, poligonal, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.

- 5 En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación se encuentra entre el 0,01 % y el 100 000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación. Por ejemplo, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación puede ser de alrededor de un 0,01 % a alrededor de un 1000 % de la
- 10 dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, alrededor de 0,01 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, alrededor de 5 % a alrededor de 25 %, alrededor de 10 % a alrededor de 50 %, alrededor de 10 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 25 % alrededor de 75 %, alrededor de 25 % alrededor de 750 % o alrededor de 50 % a alrededor de 100 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación. Por
- 15 ejemplo, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación puede ser de alrededor de un 100 % a alrededor de un 100 000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, alrededor de 100 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 500 % a alrededor de 5000 %, alrededor de 1000 % a alrededor de 10 000 %, alrededor de 5000 % a alrededor de 25 000 %, alrededor de
- 20 10 000 % a alrededor de 50 000 %, alrededor de 25 000 % a alrededor de 75 000 % o alrededor de 50 000 % a alrededor de 100 000 %

En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm. En algunas modalidades, la longitud de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm. En modalidades particulares, la longitud de la zona de electroporación

25 está entre 0,005 mm y 25 mm. En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de cualquiera del primer electrodo o del segundo electrodo se encuentra entre 0,01 mm y 500 mm. En modalidades particulares, ninguna de la zona de entrada, zona de recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de la sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido, por ejemplo, las células pueden pasar a través del dispositivo sin

30 deformarse.

En modalidades adicionales, el sistema incluye una fuente de administración de fluido conectada de forma fluida a la zona de entrada, donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar la pluralidad de células suspendidas en el fluido a través de la zona de entrada a la zona de comparación. En algunas modalidades, la velocidad de administración desde la fuente de

35 suministro de fluido se encuentra entre 0,001 mL/min y 1000 mL/min, por ejemplo, 25 mL/min. En determinadas modalidades, el tiempo de residencia de cualquiera de la pluralidad de células

suspendidas en el fluido está entre 0,5 ms a 50 ms. En algunas modalidades, la conductividad del fluido se encuentra entre 0,001 mS/cm y 500 mS/cm, por ejemplo, entre 1 mS/cm y 20 mS/cm.

En modalidades adicionales, el sistema incluye un controlador acoplado operativamente a la fuente de potencial eléctrico para administrar pulsos de voltaje al primer electrodo y el segundo electrodo

5 para generar una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y el segundo electrodo. En algunas modalidades, los pulsos de voltaje tienen una amplitud de -3 kV a 3 kV, por ejemplo, de 0,01 kV a 3 kV, por ejemplo, de 0,2 a 0,6 kV. En algunos casos, el ciclo de trabajo de la electroporación está entre 0,001 % y 100 %, por ejemplo, 10-95 %. En algunas modalidades, los pulsos de voltaje tienen una duración de entre 0,01 ms y 1000 ms, por ejemplo, de 1-10 ms. En  
10 determinadas modalidades, los pulsos de voltaje se aplican al primer y segundo electrodos a una frecuencia entre 1 Hz y 50 000 Hz, por ejemplo, 100-500 Hz. La forma de onda del pulso de voltaje puede ser DC, cuadrada, pulso, bipolar, sinusoidal, rampa, bipolar asimétrica, arbitraria o cualquier superposición o combinación de estas. En modalidades particulares, el campo eléctrico generado a partir de los pulsos de voltaje tiene una magnitud de entre 1 V/cm y 50 000 V/cm, por ejemplo,  
15 entre 100 V/cm y 1000 V/cm.

En modalidades adicionales, el sistema incluye un alojamiento (por ejemplo, una estructura de alojamiento) configurada para contener el dispositivo de electroporación descrito en este documento. En otros casos, la estructura del alojamiento incluye un controlador térmico configurado para aumentar o disminuir la temperatura del alojamiento o cualquier componente del  
20 sistema de este. En algunas modalidades, el controlador térmico es un elemento calefactor, por ejemplo, un bloque calefactor, flujo de líquido, calefactor alimentado por batería o calefactor de película fina. En otras modalidades, el controlador térmico es un elemento de enfriamiento, por ejemplo, un flujo de líquido, un enfriador evaporativo o un dispositivo termoelectrónico, por ejemplo, un Peltier.

25 En modalidades adicionales, el sistema incluye una pluralidad de dispositivos de poración celular, por ejemplo, en serie o en paralelo. En modalidades particulares, el sistema incluye una pluralidad de estructuras externas para la pluralidad de dispositivos de poración de células.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para introducir una composición en al menos una parte de una pluralidad de células suspendidas en un fluido, el método que incluye las etapas

30 de: a. proporcionar un dispositivo que incluye: un primer electrodo que tiene una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo que tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de recuperación; y una zona de electroporación, donde la zona de electroporación se conecta de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda  
35 entrada del segundo electrodo, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico al primer y segundo electrodo produce un campo eléctrico en la zona de electroporación; b. activar el

primer y el segundo electrodos para producir una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodo, mediante lo cual se produce un campo eléctrico en la zona de electroporación; y c. pasar la pluralidad de células suspendidas en el fluido con la composición a través del campo eléctrico en la zona de electroporación del dispositivo. En el método, el flujo de la pluralidad de células suspendidas en fluido con la composición a través del campo eléctrico en la zona de electroporación mejora la permeabilidad temporal de la pluralidad de células, introduciendo así la composición en al menos una parte de la pluralidad de células.

En modalidades adicionales, el método incluye evaluar la salud de una parte de la pluralidad de células suspendidas en el fluido. En determinadas modalidades, la evaluación incluye medir la viabilidad de la parte de la pluralidad de células suspendidas en el fluido. En algunas modalidades, la evaluación incluye medir la eficacia de transfección de la parte de la pluralidad de células suspendidas en el fluido. En algunas modalidades, la evaluación incluye medir la tasa de recuperación de células de la parte de la pluralidad de células suspendidas en el fluido. En determinadas modalidades, la evaluación incluye análisis de citometría de flujo de la expresión del marcador de superficie celular.

En algunas modalidades, la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular al salir de la zona de electroporación del dispositivo. En algunas modalidades, la pluralidad de células no presenta ningún cambio fenotípico al salir de la zona de electroporación del dispositivo del dispositivo.

En algunas modalidades, el método induce una electroporación reversible o irreversible. En modalidades particulares, la electroporación es electroporación reversible sustancialmente no térmica, electroporación irreversible sustancialmente no térmica o electroporación irreversible sustancialmente térmica.

En algunas modalidades, las células suspendidas en el fluido con la composición pasan a través del campo eléctrico en la zona de electroporación del dispositivo mediante la aplicación de una presión positiva, por ejemplo, una bomba, por ejemplo, una bomba de jeringa o una bomba peristáltica.

En determinadas modalidades, las células de la pluralidad de células de la muestra pueden ser células de mamífero, eucariotas, células humanas, células animales, células vegetales, células sintéticas, células primarias, líneas celulares, células en suspensión, células adherentes, células no estimuladas, células estimuladas, células activadas, células inmunitarias, células madre, células sanguíneas, glóbulos rojos, linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, células dendríticas, células presentadoras de antígeno (APC), células citóliticas (NK), monocitos, macrófagos o células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células renales embrionarias humanas, por ejemplo, células HEK-293 o células de ovario de hámster chino (CHO). En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye células Jurkat. En modalidades particulares, la pluralidad de células

incluye linfocitos T humanos primarios. En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye células THP-1. En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye macrófagos humanos primarios. En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye monocitos humanos primarios. En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye células citolíticas (NK). En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye células de ovario de hámster chino. En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye células renales embrionarias humanas. En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye linfocitos B. En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye linfocitos T humanos primarios. En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye monocitos humano primarios. En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye macrófagos humanos primarios. En realizaciones particulares, la pluralidad de células incluye células madre embrionarias (ESC), células madre mesenquimales (MSC) o células madre hematopoyéticas (HSC). En modalidades particulares, la pluralidad de células incluye células madre pluripotentes inducidas por humanos primarios (iPSC).

En algunas modalidades, la composición incluye al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en agentes terapéuticos, vitaminas, nanopartículas, agentes terapéuticos cargados, nanopartículas, moléculas cargadas, por ejemplo, iones en solución, moléculas no cargadas, ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN, complejos CRISPR-Cas, proteínas, polímeros, ribonucleoproteínas (RNP), nucleasas modificadas genéticamente, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas autoguiadas, meganucleasas (MN), megaTAL, enzimas, péptidos, transposones o polisacáridos, por ejemplo, dextrano, por ejemplo, sulfato de dextrano. Las composiciones que se pueden administrar a las células en una suspensión incluyen ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos, ARNm o ADN), anticuerpos (o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento biespecífico, un fragmento inespecífico, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, o un fragmento variable monocatenario (scFv)), aminoácidos, polipéptidos (por ejemplo, péptidos o proteínas), células, bacterias, terapias génicas, terapias de ingeniería del genoma, terapias de ingeniería de epigenomas, carbohidratos, fármacos químicos, agentes de contraste, partículas magnéticas, perlas de polímero, nanopartículas de metal, micropartículas de metal, puntos cuánticos, antioxidantes, agentes antibióticos, hormonas, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas, lipoproteínas, esteroides, analgésicos, anestésicos locales, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos, agentes quimioterapéuticos, exosomas, vesículas de la membrana externa, vacunas, virus, bacteriófagos, adyuvantes, vitaminas, minerales, orgánulos y combinaciones de estos. En determinadas modalidades, la composición es un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido, ARNm o ADN). En determinadas modalidades, la composición es un anticuerpo. En determinadas modalidades, la composición es un polipéptido (por ejemplo, un péptido o una proteína).

En determinadas modalidades, la composición tiene una concentración en el líquido de entre 0,0001 µg/mL y 1000 µg/mL (por ejemplo, de alrededor de 0,0001 µg/mL a alrededor de 0,001 µg/mL, alrededor de 0,001 µg/mL a alrededor de 0,01 µg/mL, alrededor de 0,001 µg/mL a alrededor de 5 µg/mL, alrededor de 0,005 µg/mL a alrededor de 0,1 µg/mL, alrededor de 0,01 µg/mL a alrededor de 0,1 µg/mL, alrededor de 0,01 µg/mL a alrededor de 1 µg/mL, alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 1 µg/mL, alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 5 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 10 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL a unos 50 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL, alrededor de 2,5 µg/mL a alrededor de 15 µg/mL, alrededor de 5 µg/mL a alrededor de 25 µg/mL, alrededor de 5 µg/mL a alrededor de 50 µg/mL, alrededor de 5 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 7,5 µg/mL a alrededor de 75 µg/mL, alrededor de 10 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL, alrededor de 10 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL a alrededor de 50 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL a alrededor de 250 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 250 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 750 µg/mL, sobre 100 µg/mL a alrededor de 300 µg/mL, sobre 100 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, alrededor de 200 µg/mL a alrededor de 400 µg/mL, alrededor de 250 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 350 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 400 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, alrededor de 500 µg/mL a alrededor de 750 µg/mL, alrededor de 650 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, o alrededor de 800 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, por ejemplo, alrededor de 0,0001 µg/mL, alrededor de 0,0005 µg/mL, alrededor de 0,001 µg/mL, alrededor de 0,005 µg/mL, alrededor de 0,01 µg/mL, alrededor de 0,02 µg/mL, alrededor de 0,03 µg/mL, alrededor de 0,04 µg/mL, alrededor de 0,05 µg/mL, alrededor de 0,06 µg/mL, alrededor de 0,07 µg/mL, alrededor de 0,08 µg/mL, alrededor de 0,09 µg/mL, alrededor de 0,1 µg/mL, alrededor de 0,2 µg/mL, alrededor de 0,3 µg/mL, alrededor de 0,4 µg/mL, alrededor de 0,5 µg/mL, alrededor de 0,6 µg/mL, alrededor de 0,7 µg/mL, alrededor de 0,8 µg/mL, alrededor de 0,9 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL, alrededor de 1,5 µg/mL, sobre 2 µg/mL, alrededor de 2,5 µg/mL, alrededor de 3 µg/mL, alrededor de 3,5 µg/mL, alrededor de 4 µg/mL, alrededor de 4,5 µg/mL, como 5 µg/mL, alrededor de 5,5 µg/mL, alrededor de 6 µg/mL, alrededor de 6,5 µg/mL, alrededor de 7 µg/mL, alrededor de 7,5 µg/mL, alrededor de 8 µg/mL, alrededor de 8,5 µg/mL, alrededor de 9 µg/mL, alrededor de 9,5 µg/mL, alrededor de 10 µg/mL, alrededor de 15 µg/mL, alrededor de 20 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL, al rededor de 30 µg/mL, alrededor de 35 µg/mL, alrededor de 40 µg/mL, alrededor de 45 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL, alrededor de 55 µg/mL, alrededor de 60 µg/mL, alrededor de 65 µg/mL, alrededor de 70 µg/mL, alrededor de 75 µg/mL, alrededor de 80 µg/mL, alrededor de 85 µg/mL, alrededor de 90 µg/mL, alrededor de 95 µg/mL, sobre 100 µg/mL, alrededor de 200 µg/mL, alrededor de 250 µg/mL, alrededor de 300 µg/mL, alrededor de 350 µg/mL, alrededor de 400 µg/mL, alrededor de 450 µg/mL, alrededor de

500 µg/mL, alrededor de 550 µg/mL, alrededor de 600 µg/mL, alrededor de 650 µg/mL, alrededor de 700 µg/mL, alrededor de 750 µg/mL, alrededor de 800 µg/mL, alrededor de 850 µg/mL, alrededor de 900 µg/mL, alrededor de 950 µg/mL o alrededor de 1000 µg/mL).

En algunas modalidades, el dispositivo incluye adicionalmente uno o más depósitos, por ejemplo, un primer depósito y un segundo depósito, conectado de forma fluida a una zona, por ejemplo, la zona de entrada o la zona de recuperación, de un dispositivo. Por ejemplo, un primer depósito se puede conectar de forma fluida a la zona de entrada y un segundo depósito se puede conectar de forma fluida a la zona de recuperación.

En algunas modalidades, la zona de electroporación del dispositivo tiene una dimensión de sección transversal uniforme. En otras modalidades, la zona de electroporación del dispositivo tiene una dimensión de sección transversal no uniforme. En modalidades adicionales, el dispositivo comprende adicionalmente una pluralidad de zonas de electroporación, donde cada una de la pluralidad de zonas de electroporación, por ejemplo, zona de electroporación, puede tener una sección transversal uniforme o una sección transversal no uniforme. En determinadas modalidades, la sección transversal de la zona de electroporación se selecciona del grupo que consiste en cilíndrica, elipsoidal, poligonal, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.

En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación se encuentra entre el 0,01 % y el 100 000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación. Por ejemplo, la dimensión de sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de sección transversal de la zona de recuperación puede ser alrededor de 0,01 % a alrededor de 100 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, alrededor de 0,01 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, alrededor de 5 % a alrededor de 25 %, alrededor de 10 % a alrededor de 50 %, alrededor de 25 % a alrededor de 75 % o alrededor de 50 % a alrededor de 100 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación. Por ejemplo, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación puede ser de alrededor de un 100 % a alrededor de un 100 000 % de la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, alrededor de 100 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 500 % a alrededor de 5000 %, alrededor de 1000 % a alrededor de 10 000 %, alrededor de 5000 % a alrededor de 25 000 %, alrededor de 10 000 % a alrededor de 50 000 %, alrededor de 25 000 % a alrededor de 75 000 % o alrededor de 50 000 % a alrededor de 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.

En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm. En algunas modalidades, la longitud de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm. En algunas modalidades, la longitud de la zona de electroporación está

entre 0,005 mm y 25 mm. En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de cualquiera del primer electrodo o del segundo electrodo se encuentra entre 0,1 mm y 500 mm. En modalidades particulares, ninguna de la zona de entrada, zona de recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de la sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido, por ejemplo, las células pueden pasar a través del dispositivo sin deformarse.

En modalidades adicionales, el dispositivo incluye una estructura externa que tiene un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, segundo electrodo y la zona de electroporación de la dispositivo. En algunas modalidades, la estructura exterior incluye una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo. En algunas modalidades, la estructura exterior forma parte integral del dispositivo. En determinadas modalidades, la estructura exterior está conectada de forma removible al dispositivo.

En algunas modalidades, la velocidad de administración desde la fuente de suministro de fluido se encuentra entre 0,001 mL/min a 1000 mL/min, por ejemplo, 20-30 mL/min, por ejemplo, 25 mL/min. En determinadas modalidades, el tiempo de residencia de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido está entre 0,5 ms a 50 ms. En algunas modalidades, la conductividad del fluido se encuentra entre 0,001 mS/cm hasta 500 mS/cm, por ejemplo, 1-20 mS/cm.

En modalidades adicionales, el método incluye un controlador acoplado operativamente a la fuente de potencial eléctrico para administrar pulsos de voltaje al primer electrodo y el segundo electrodo para generar una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y el segundo electrodo. En algunas modalidades, los pulsos de voltaje tienen una amplitud de -3 kV a 3 kV, por ejemplo, 0,2-0,6 kV. En algunos casos, el ciclo de trabajo de la electroporación está entre 0,001 % y 100 %, por ejemplo, entre 10 % y 95 %. En algunas modalidades, los pulsos de voltaje tienen una duración de entre 0,01 ms y 1000 ms, por ejemplo, entre 1 ms y 10 ms. En determinadas modalidades, los pulsos de voltaje se aplican al primer y segundo electrodos a una frecuencia entre 1 Hz y 50 000 Hz, por ejemplo, 100-500 Hz. La forma de onda del pulso de voltaje puede ser CC, cuadrada, pulso, bipolar, sinusoidal, rampa, bipolar asimétrica, arbitraria o cualquier superposición o combinación de estas. En modalidades particulares, el campo eléctrico generado a partir de los pulsos de voltaje tiene una magnitud de entre 1 V/cm y 50 000 V/cm, por ejemplo, entre 100 V/cm y 1000 V/cm.

En modalidades adicionales, el método incluye una estructura de alojamiento configurada para alojar el dispositivo de electroporación descrito en la presente. En otros casos, la estructura de alojamiento incluye un controlador térmico configurado para aumentar o disminuir la temperatura del alojamiento o cualquier componente del sistema de este. En algunas modalidades, el controlador térmico es un elemento calefactor, por ejemplo, un bloque calefactor, flujo de líquido,

calefactor alimentado por batería o calefactor de película fina. En otras modalidades, el controlador térmico es un elemento de enfriamiento, por ejemplo, un flujo de líquido, un enfriador evaporativo o termoelectrónico, por ejemplo, un dispositivo Peltier. En determinadas modalidades, la temperatura de la pluralidad de células suspendidas en el fluido se encuentra entre 0 °C y 50 °C.

5 En modalidades adicionales, el dispositivo incluye una pluralidad de dispositivos de poración celular, por ejemplo, en serie o en paralelo. En modalidades particulares, el dispositivo incluye una pluralidad de estructuras externas para la pluralidad de dispositivos.

En algunas modalidades, el método incluye además almacenar la pluralidad de células suspendidas en el fluido en un amortiguador de recuperación después de la poración. En  
10 determinadas modalidades, las células electroporadas tienen una viabilidad tras la introducción de la composición entre 0,1 % y 99,9 %, por ejemplo, 25 % y 85 %. En otras modalidades, la eficacia de la introducción de la composición en las células se encuentra entre 0,1 y 99,9 %, por ejemplo, entre 25 % y 85 %. En determinadas modalidades, la tasa de recuperación celular se encuentra entre 0,1 % y 100 %. En modalidades particulares, el rendimiento de recuperación celular se  
15 encuentra entre 0,1 % y 500 %. En algunas modalidades, el número de células recuperadas (por ejemplo, células vivas) se encuentra entre  $10^4$  y  $10^{12}$ .

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, el kit incluye una pluralidad de dispositivos como se describe en este documento, una pluralidad de estructuras externas como se  
20 describe en este documento, y un amortiguador de transfección.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para la electroporación de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, el kit incluye una pluralidad de dispositivos como se describe en este documento, una pluralidad de estructuras externas como se describe en este documento, y un amortiguador de transfección.

25 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, las estructuras externas son parte integral de la pluralidad de dispositivos celulares. En determinadas modalidades, las estructuras exteriores están conectadas de forma removible a la pluralidad de dispositivos.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

El archivo de la solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina proporcionará  
30 copias de esta solicitud de patente con dibujos en color luego de solicitar el pago de la tasa necesaria.

Las Figuras 1A-1C son esquemas de una modalidad de un único dispositivo de electroporación de la invención. La Figura 1A muestra un esquema del funcionamiento del dispositivo de la invención. La Figura 1B muestra un esquema de los componentes de la invención. La Figura 1C muestra una  
35 fotografía de la modalidad del dispositivo de la invención mostrado en la Figura 1B.

La Figura 2A-2B son esquemas de ejemplo de un alojamiento para la administración en paralelo

de energía eléctrica a modalidades de dispositivos de electroporación de la invención. La Figura 2A muestra una vista isométrica del alojamiento con el concepto de redes eléctricas que se utilizará para activar 96 dispositivos de electroporación de la invención en paralelo. La Figura 2B muestra una vista ampliada de la interfaz de un solo dispositivo de electroporación de la invención y el alojamiento con rejillas eléctricas utilizando electrodos activados por resorte para sujetar de forma segura el primer y segundo electrodos de cada dispositivo de electroporación contra las rejillas eléctricas del alojamiento.

Las Figuras 3A-3B son gráficos de barras de la optimización de la velocidad de flujo de fluido (mL/min) para la electroporación de células Jurkat ( $1 \times 10^7$  células/mL) mediante el uso de dispositivos de la invención. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 3A muestra la viabilidad de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 3B muestra la eficacia de transfección de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 4A-4D son ilustraciones de la simulación de la velocidad de flujo a lo largo de una zona activa de un dispositivo. La Figura 4A es un modelo 3D que representa una velocidad de flujo volumétrico de líquido de 10 mL por minuto. La Figura 4C es un modelo 3D que representa una velocidad de flujo volumétrico de líquido de 100 mL por minuto. Las Figuras 4B y 4D son modelos 2D correspondientes a las Figuras 4A y 4C, respectivamente.

Las Figuras 5A-5B son gráficos de barras para la optimización del campo eléctrico en la zona de electroporación de dispositivos de la invención para la electroporación de células Jurkat. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 5A muestra la viabilidad de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 5B muestra la eficacia de transfección de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 6A-6B son gráficos de barras que muestran los efectos de la temperatura sobre la transfección de células Jurkat mediante el uso de dispositivos de la invención. "TA" en las figuras significa temperatura ambiente. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 6A muestra la viabilidad de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 6B muestra la eficacia de transfección de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 7A-7D son ilustraciones de simulación que muestran distribuciones de campo eléctrico a lo largo de una zona activa de un dispositivo de la invención. La Figura 7A muestra un mapa de distribución de campo eléctrico de un dispositivo con un voltaje aplicado de 225 V. La Figura 7B es

una sección transversal longitudinal del modelo 2D de la Fig. 7A. La Figura 7C muestra un mapa de distribución de campo eléctrico de un dispositivo con un voltaje aplicado de 275 V. La Figura 7D es una sección transversal longitudinal del modelo 2D de la Figura 7C.

Las Figuras 8A-8D son ilustraciones de simulación que muestran los efectos de las distribuciones de temperatura a lo largo de una zona activa de un dispositivo de la invención. La Figura 8A muestra un mapa de distribución de temperatura del líquido en una zona activa del dispositivo en el momento = 0 ms; la Figura 8B muestra un mapa de distribución de temperatura del líquido en una zona activa del dispositivo en el momento = 100 ms; la Figura 8C muestra un mapa de distribución de temperatura del líquido en una zona activa del dispositivo en el momento = 200 ms; y la Figura 8D muestra un mapa de distribución de temperatura del líquido en una zona activa del dispositivo en el momento = 300 ms.

Las Figuras 9A-9B son gráficos de barras que muestran la optimización de la duración del pulso de voltaje y el número de pulsos para la electroporación de células Jurkat usando dispositivos de la invención. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 9A muestra la viabilidad de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 9B muestra la eficacia de transfección de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 10A-10B son gráficos de barras que muestran la optimización del volumen de muestra para la electroporación de células Jurkat mediante el uso de dispositivos de la invención. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 10A muestra la viabilidad de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de tinte de exclusión 7-AAD. La Figura 10B muestra la eficacia de transfección de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 11A-11B son gráficos de barras que muestran la optimización del diámetro de la zona de electroporación para la electroporación de células Jurkat mediante el uso de dispositivos de la invención. Las electroporaciones se realizaron a un voltaje fijo con velocidades de flujo variables para igualar sustancialmente el tiempo total de residencia de la célula en las diferentes dimensiones del canal. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 11A muestra la viabilidad de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 11B muestra la eficacia de transfección de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 12A-12L muestran gráficos de barras que muestran el efecto de formas de onda de pulso de voltaje seleccionadas para la electroporación de células Jurkat usando dispositivos de la

invención y formas de onda ejemplares. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 12A muestra la viabilidad de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 12B muestra la eficacia de transfección de las células Jurkat evaluadas mediante el uso de la expresión de GFP. La Figura 12C muestra una corriente continua (CC) siempre en forma de onda. La Figura 12D muestra una forma de onda cuadrada con un ciclo de trabajo de 50 % que incluye un desplazamiento. La Figura 12E muestra una forma de onda de rampa asimétrica al 75 %. La Figura 12F muestra una forma de onda de pulso con un ciclo de trabajo del 95 %. La Figura 12G muestra una forma de onda cuadrada con un ciclo de trabajo de 75 % que incluye un desplazamiento. La Figura 12H muestra una forma de onda sinusoidal. La Figura 12I muestra una forma de onda de rampa asimétrica al 25 %. La Figura 12J muestra una forma de onda cuadrada con un ciclo de trabajo de 25 % que incluye un desplazamiento. La Figura 12K muestra una forma de onda de onda cuadrada bipolar sin desplazamiento. La Figura 12L muestra una forma de onda de rampa simétrica.

Las Figuras 13A-13B son gráficos de barras que comparan la eficacia de la transfección y la viabilidad celular resultante para las células Jurkat mediante el uso de un dispositivo de la invención y un instrumento de transfección celular disponible comercialmente. La viabilidad de las células Jurkat evaluada usando el tinte de exclusión 7-AAD y la eficiencia de transfección de las células Jurkat evaluada mediante el uso de la expresión de GFP. La Figura 13A muestra los resultados de los experimentos de transfección realizados mediante el uso de los parámetros publicados para la transfección de células Jurkat (muestra en una punta de 100 µl; 3 pulsos/10 ms/450 V/cm). La Figura 13B es un experimento duplicado de la Figura 13A que muestra la reproducibilidad en experimentos realizados mediante el uso de parámetros optimizados para los dispositivos de la invención en comparación con los parámetros publicados para la transfección de células Jurkat. La Figura 13C muestra un esquema de flujo de trabajo de un cribado de biblioteca en matriz de ribonucleoproteínas Cas9 mediante el uso de una biblioteca en matriz de sgRNA de cadena simple disponible comercialmente para hibridar la proteína Cas9 purificada para formar una biblioteca de ribonucleoproteína Cas9 en matriz. Con el uso de un dispositivo de la invención, el cribado de la biblioteca en matriz de ribonucleoproteínas Cas9 tendrá como resultado la identificación de objetivos genéticos para futuras investigaciones inmunoterapéuticas con el uso de análisis en placa. Además, el cribado de bibliotecas agrupadas de ribonucleoproteínas Cas9 podría usarse para realizar los ensayos necesarios para identificar objetivos genéticos para terapias futuras.

Las Figuras 14A-14B son gráficos de barras que muestran la viabilidad y eficacia del suministro de dextrano FITC en linfocitos T humanos primarios mediante el uso de dispositivos de la invención, a través de polímeros de dextrano de peso molecular variable para evaluar cualquier restricción de

tamaño para el suministro de dextrano. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 14A muestra la viabilidad de linfocitos T humanos primarios evaluados con el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 14B muestra la eficacia de transfección de los linfocitos T humanos primarios evaluados con el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 15A-15B son gráficos de barras que comparan la eficacia y la viabilidad de la transfección en monocitos THP-1 usando dispositivos de la invención y un instrumento de transfección celular disponible comercialmente (NEON®) a través de protocolos de transfección publicados para monocitos THP-1. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 15A muestra la viabilidad de los monocitos THP-1 evaluados con el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 15B muestra la eficacia de transfección de los monocitos THP-1 evaluados con el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 16A-16B son gráficos de barras que comparan la eficacia y la viabilidad de la transfección en monocitos humanos primarios con el uso de dispositivos de la invención y un instrumento de transfección celular disponible comercialmente (NEON®) a través de protocolos de transfección publicados para monocitos humanos primarios. Los monocitos humanos primarios se aislaron de sangre periférica con el uso de selección negativa. Las células de recuperación se cultivaron durante 24 horas en RPMI con FBS al 10 % a 37 °C antes del análisis con citómetro de flujo mediante el uso de LSR II HTS (BD Bioscience). La Figura 16A muestra la viabilidad de monocitos humanos primarios evaluados con el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 16B muestra la eficacia de transfección de los monocitos humanos primarios evaluados con el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 17A-17B son gráficos de barras que comparan la eficacia y la viabilidad de la transfección en la línea celular NK-92 con el uso de dispositivos de la invención y un instrumento de transfección celular disponible comercialmente que usa protocolos de transfección publicados para la línea celular NK-92. Después de la electroporación con el uso de dispositivos de la invención o mediante un instrumento disponible comercialmente, las células se cultivaron durante 24 horas en aMEM completo (aMEM con suero al 25 %, inositol 0,2 mM, ácido fólico 0,02 mM mercaptoetanol 0,1 mM) a 37 °C antes del citómetro de flujo. análisis con el uso de iQue (Intellicyt). La Figura 17A muestra la viabilidad evaluada con el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 17B muestra la eficacia de transfección evaluada por la expresión de GFP.

Las Figuras 18A-18B son gráficos de barras que comparan la eficacia y la viabilidad de la transfección en la línea celular NK-92MI con el uso de dispositivos de la invención y un instrumento de transfección celular disponible comercialmente que usa protocolos de transfección publicados para la línea celular NK-92MI. Después de la electroporación las células se cultivaron durante 24

horas en aMEM completo (aMEM con suero al 25 %, inositol 0,2 mM, ácido fólico 0,02 mM mercaptoetanol 0,1 mM) a 37 °C antes del citómetro de flujo. análisis con el uso de iQue (Intellicyt). La Figura 18A muestra la viabilidad evaluada con el uso de colorante de exclusión 7-AAD. La Figura 18B muestra la eficacia de transfección evaluada por la expresión de GFP.

- 5 Las Figuras 19A-19F son gráficos de barras que comparan linfocitos T (Figuras 19A-19C) con monocitos humanos primarios (Figuras 19D-19F) electroporados y transfectados con ARNm personalizado de SIRPalpa con el uso de dispositivos de la invención en comparación con células no electroporadas. Se transfectaron linfocitos T expandidas del día 11 con 20 µg de ARNm de SIRPalpa y se evaluó la sobreexpresión a las 24 horas. Gráficos representativos para A)
- 10 viabilidad medida como células negativas a 7-AAD, B) eficiencia de transfección medida como células positivas para SIRPalpa, y C) expresión de SIRPalpa medida como intensidad fluorescente media (MFI). Los monocitos aislados de PBMC se transfectaron con 20 µg de ARNm de SIRPalpa y se evaluó la sobreexpresión a las 24 horas. Gráficos representativos para D)
- 15 células positivas para SIRPalpa, y F) expresión de SIRPalpa medida como intensidad fluorescente media (MFI). Los gráficos son media ± SEM.

Las Figuras 20A-20D son gráficos de barras que muestran el suministro de ARNm de GFP a linfocitos T naturales primarios humanos. La Figura 20A muestra células recuperadas, la Figura 20B muestra la eficacia de los linfocitos T vírgenes, la Figura 20C muestra la viabilidad de los

20 linfocitos T no activados y la Figura 20D muestra el rendimiento total. Se transfectaron linfocitos T vírgenes con 10 µg de ARNm de GFP comercial y se evaluó la expresión a las 24 horas. Se muestran gráficos representativos de recuentos, viabilidad, eficiencia y rendimiento. Los gráficos son media ± SEM.

Las Figuras 21A-21B son gráficos FACS que muestran que la electroporación no cambia el

25 fenotipo de los linfocitos T primarios no activados humanos. La Figura 21A muestra células no tratadas y la Fig. 21B muestra células electroporadas. Se transfectaron linfocitos T no activados con 10 µg de ARNm de GFP comercial y luego se tiñeron para CD45RA y CD45RO a las 24 h, como se muestra en los gráficos de puntos. Los fenotipos CD45RA/CD45RO son equivalentes entre los linfocitos T no tratados y no activados electroporados Flowfect™.

30 La Figura 22 es un gráfico cinético que muestra la expansión de linfocitos T no activados con el uso de un dispositivo de la invención en comparación con células no tratadas. La electroporación no cambia la expansión de los linfocitos T primarios humanos no activados. Se transfectaron linfocitos T no activados con 10 µg de ARNm de GFP comercial y luego se expandieron con activadores CD3/CD28 solubles. Los recuentos de células se tomaron 1, 4 y 6 días después de la

35 activación. Las tasas de expansión son equivalentes entre linfocitos T no tratados y no activados electroporados.

Las Figuras 23A-23F muestran ejemplos de modalidades de dispositivos de electroporación de la invención integrados en un dispositivo de descarga electrónico configurado para activar y electroporar una pluralidad de muestras de células simultáneamente. La Figura 23A muestra una vista isométrica superior de un dispositivo de descarga electrónico. La Figura 23B muestra una vista lateral de un dispositivo de la invención instalado en un dispositivo de descarga electrónica que muestra cómo se realiza el contacto eléctrico en el sistema utilizando contactos eléctricos de tipo pin de pogo. La Figura 23C muestra una vista lateral de un dispositivo de descarga electrónico completo. La Figura 23D muestra una vista isométrica superior de una modalidad alternativa de un dispositivo de descarga electrónico. La Figura 23E muestra una vista lateral de un dispositivo de la invención instalado en un dispositivo de descarga electrónica que muestra cómo se realiza el contacto eléctrico en el sistema mediante el uso de contactos eléctricos de tipo resorte. La Figura 23F muestra una vista aérea de un dispositivo de descarga electrónico configurado para activar y electroporar una pluralidad de muestras de células simultáneamente.

Las Figuras 24A-24B muestran modalidades de un dispositivo de electroporación de temperatura controlada de la invención que usa un líquido térmico para controlar la temperatura. La Figura 24A muestra un esquema de los componentes del dispositivo de electroporación de temperatura controlada. La Figura 24B muestra una vista lateral del dispositivo de electroporación con control de temperatura que muestra el dispositivo en un marco externo.

Las Figuras 25A-25B muestran modalidades de un dispositivo de electroporación a base de chips fluidos de la invención configurado para aceptar puntas de pipeta estándar de la industria para la introducción de muestras. La Figura 25A muestra una modalidad de un chip fluídico que incorpora electrodos integrados y canales fluídicos. La Figura 25B muestra un esquema de los componentes del dispositivo de electroporación a base de chips fluídicos.

Las Figuras 26A-26B muestran modalidades de un dispositivo de electroporación de flujo continuo de la invención. La Figura 26A muestra un esquema en corte de los componentes de un dispositivo de electroporación de flujo continuo. La Figura 26B muestra una vista exterior con transparencia para mostrar los componentes del dispositivo de electroporación de flujo continuo.

Las Figuras 27A-27F muestran el campo eléctrico simulado generado mediante el uso de un modelado informático de una modalidad de un electrodo helicoidal. La Figura 27A muestra el campo eléctrico simulado de un electrodo helicoidal mostrado a lo largo de los tres ejes cartesianos. La Figura 27B muestra el campo eléctrico simulado de un electrodo helicoidal mostrado en una sección transversal a lo largo del eje Z. Las Figuras 27C-27F muestran el campo eléctrico simulado de un electrodo helicoidal a lo largo del eje XY mostrado desde cuatro posiciones diferentes a lo largo del eje Z.

Las Figuras 28A-28C muestran modalidades de un dispositivo de electroporación de dos partes de la invención configurado para escalabilidad de fabricación. La Figura 28A muestra una

representación 3D isométrica superior de una modalidad de un dispositivo de electroporación de dos partes de la invención. La Figura 28B muestra una sección transversal vertical de la modalidad representada en la Figura 28A que muestra cómo se acoplan los dos componentes. La Figura 28C muestra una vista idéntica de la realización representada en la Figura 28B con las dimensiones (en mm) del dispositivo superpuesto.

Las Figuras 29A-29B muestran una modalidad de un dispositivo de electroporación de dos partes de la invención que incluye electrodos integrados con una interfaz para una cánula de manipulación de líquidos. La Figura 29A muestra una representación 3D isométrica superior de una modalidad de un dispositivo de electroporación de dos partes de la invención con electrodos integrados. La Figura 29B muestra una sección transversal vertical de la modalidad representada en la Figura 29A que muestra la ubicación de los electrodos integrados en relación con la zona de electroporación del dispositivo de la invención.

La Figura 29C es un dibujo de un enfoque multidispositivo que mejora el rendimiento y la paralelización de la tecnología actual.

Las Figuras 30A-30B muestran modalidades de un alojamiento exterior de la invención configurada para albergar una pluralidad de dispositivos de la invención, componentes de manipulación de líquidos, controladores y cualquier componente eléctrico. La Figura 30A muestra una modalidad de un alojamiento exterior de la invención con una interfaz de usuario. La Figura 30B muestra una modalidad de dispositivos de la invención conectados a un colector de distribución de líquido y una placa de muestra.

La Figura 31 muestra una comparación entre la estrategia de activación por citometría de flujo tradicional (mediante el uso de un sistema de electroporación Lonza NUCLEOFECTOR 4D™ disponible comercialmente, inferior) y adoptada (mediante el uso de dispositivos y sistemas de la invención, superior) para el análisis posterior a la transfección para el recuento celular, la viabilidad, eficiencia de transfección y detección de marcadores de superficie/intercelulares.

Las Figuras 32A-32B son gráficos de barras que muestran la viabilidad y eficacia de la administración de ADN plasmídico que codifica GFP en células CHO-K1 mediante el uso de dispositivos de la invención 24 horas después de la electroporación. La Figura 32A muestra la viabilidad de las células CHO-K1. La Figura 32B muestra la eficacia de transfección de las células CHO-K1 evaluadas mediante el uso de la expresión de GFP.

Las Figuras 33A-33D son gráficos de barras que muestran la viabilidad y eficiencia de la administración de ADN plasmídico que codifica GFP en células HEK-293T mediante el uso de dispositivos de la invención 24 y 48 horas después de la electroporación. La Figura 33A muestra la viabilidad de las células HEK-293T 24 horas después de la electroporación. La Figura 33B muestra la eficacia de transfección de las células HEK-293T evaluadas usando la expresión de GFP 24 horas después de la electroporación. La Figura 33C muestra la viabilidad de las células HEK-293T

48 horas después de la electroporación. La Figura 33D muestra la eficacia de transfección de las células HEK-293T evaluadas mediante el uso de la expresión de GFP 48 horas luego de la electroporación.

5 Las Figuras 34A-34B muestran las señales de fluorescencia de GFP recolectadas de células de ovario de hámster chino (CHO-K1) antes (Figura 34A) y después (Figura 34B) de la electroporación mediante el uso de dispositivos y sistemas de la invención. Las imágenes de fluorescencia de GFP se capturaron utilizando un microscopio ECHO Revolve equipado con un objetivo de 10x.

10 Las Figuras 35A-35B muestran las señales de fluorescencia de GFP recogidas de células HEK-293T antes (Figura 35A) y después (Figura 35B) de la electroporación con el uso de dispositivos y sistemas de la invención. Las imágenes de fluorescencia de GFP se capturaron mediante el uso de un microscopio ECHO Revolve equipado con un objetivo de 10x.

15 Las Figuras 36A-36D son gráficos de barras que muestran el recuento total de células después de la electroporación, la viabilidad, la eficacia y las células transfectadas positivamente vivas relativas para la administración de dextrano FITC de 40 kD a linfocitos T humanos primarios mediante el uso de un sistema de transfección NEON® disponible comercialmente y dispositivos de la invención. La Figura 36A muestra el recuento total de células después de la electroporación. La Figura 36B muestra la viabilidad de los linfocitos T humanos primarios. La Figura 36C muestra la eficacia de la administración en linfocitos T humanos primarios. La Figura 36D muestra la población de células  
20 vivas transfectadas positivamente relativas.

La Figura 37 es un gráfico de barras que muestra una comparación entre el sistema de transfección NEON® y los dispositivos de la invención para la población de células transfectadas positivamente vivas relativas después de la administración del plásmido GFP a linfocitos T humanos primarios.

25 Las Figuras 38A-38D son gráficos de barras que muestran la recuperación, viabilidad, eficacia y rendimiento del suministro de ARNm en linfocitos T humanos primarios a los 9 días de edad. La electroporación se realizó mediante el uso de dos sistemas de transfección disponibles comercialmente (Lonza NUCLEOFECTOR 4D™ y Thermo Fisher NEON®) y dispositivos de la invención. Ya sea 1 millón ( $10^6$  células/mL) o 5 millones ( $5 \times 10^6$  células/mL) se electroporaron en  
30 100  $\mu$ L con 10  $\mu$ g de ARNm que codifica EGFP. El análisis por citometría de flujo se realizó 24 horas después de la electroporación. Los recuentos de células se normalizan a 1 millón de entradas de células y el rendimiento se normaliza a los resultados recolectados mediante el uso de dispositivos de la invención. La Figura 38A muestra la recuperación en ambas densidades celulares. La Figura 38B muestra la viabilidad en ambas densidades celulares. La Figura 38C  
35 muestra la eficiencia en ambas densidades celulares. La Figura 38D muestra el rendimiento en ambas densidades celulares.

Las Figuras 39A-39D son gráficos de líneas que muestran la recuperación, viabilidad, eficiencia y MFI de la liberación de complejos de ribonucleoproteína (RNP) Cas9 dirigidos a CXCR3 en linfocitos T humanos primarios mediante el uso de dispositivos y sistemas de la invención. Los RNP Cas9 se formularon con proteína Cas9 disponible comercialmente y dos fuentes comerciales de sgRNA. El análisis por citometría de flujo se realizó 24-72 horas después de la electroporación. La Figura 39A muestra la recuperación celular. La Figura 39B muestra la viabilidad. La Figura 39C muestra la eficiencia. La Figura 39D muestra el rendimiento total de las células inactivadas objetivo expandidas hasta 72 horas después de la electroporación.

Las Figuras 40A-40B son gráficos de barras que muestran los recuentos de células vivas para la expresión de GFP a partir de células THP-1 y la administración de dextrano marcado con FITC a células NK-92MI para electroporación con el uso de un sistema de transfección NEON® comercial y dispositivos de la invención. La Figura 40A muestra los recuentos de células vivas para la expresión de GFP en células THP-1. La Figura 40B muestra los recuentos de células vivas para la administración de dextrano marcado con FITC a células NK-92MI.

Las Figuras 41A-41B son gráficos de barras que muestran una comparación de la viabilidad y eficiencia resultantes de la entrega de ARNm de GFP en monocitos THP-1 mediante el uso de un sistema de transfección NEON® comercial y dispositivos de la invención. La Figura 41A muestra la viabilidad de los monocitos THP-1 evaluados 24 horas después de la transfección. La Figura 41B muestra la eficacia de transfección de los monocitos THP-1 evaluados mediante el uso de la expresión de GFP 24 horas después de la electroporación.

Las Figuras 42A-42C son gráficos de barras que muestran la viabilidad, la eficiencia y el rendimiento del suministro de ARNm de GFP en monocitos THP-1 mediante el uso de dispositivos de la invención con una muestra de control de células no electroporadas. La Figura 42A muestra la viabilidad de las células transfectadas evaluadas 24-72 horas después de la electroporación. La Figura 42B muestra la eficiencia de la captación de ARNm de GFP evaluada 24-72 horas después de la electroporación. La Figura 42C muestra la viabilidad de las células transfectadas evaluadas 24-72 horas después de la electroporación.

Las Figuras 43A-43B son gráficas de barras que muestran la viabilidad y eficiencia de la administración de ARNm de GFP en células THP-1 activadas con LPS con el uso de dispositivos de la invención. La Figura 43A muestra la viabilidad de las células THP-1 activadas con LPS evaluadas 24 horas después de la transfección. La Figura 43B muestra la eficacia de la transfección de células THP-1 activada por LPS evaluada mediante el uso de la expresión GFP 24 horas luego de la electroporación.

Las Figuras 44A-44D son gráficos de barras que muestran la viabilidad y eficiencia de la administración de dextrano FITC de 40 kD y ARNm de GFP en monocitos de sangre periférica primaria mediante el uso de dispositivos de la invención. La Figura 44A muestra la viabilidad de los

monocitos de sangre periférica primaria transfectados con dextrano FITC. La Figura 44B muestra la eficacia de transfección de los monocitos de sangre periférica primarios transfectados con dextrano FITC. La Figura 44C muestra la viabilidad de los monocitos de sangre periférica primaria transfectados con ARNm de GFP. La Figura 44B muestra la eficacia de transfección de los monocitos de sangre periférica primarios transfectados con ARNm de GFP.

Las Figuras 45A-45B son gráficas de barras que muestran la expresión de CD80 y CD86 en monocitos de sangre periférica primarios que se transfectaron con GFP con estimulación con LPS mediante el uso de dispositivos de la invención. La expresión de CD80 y CD86 se midió 24 horas y 96 horas después de la electroporación. La Figura 45A muestra la expresión del marcador de activación CD80. La Figura 45B muestra la expresión del marcador de linaje CD86.

Las Figuras 46A-46C son gráficas de barras que muestran el fenotipo de macrófagos, la viabilidad y la expresión de GFP de monocitos de sangre periférica primarios transfectados con ARNm de GFP mediante el uso de dispositivos de la invención que se diferenciaron en macrófagos durante 4-8 días. La Figura 46A muestra el fenotipo de macrófagos evaluado mediante análisis de citometría de flujo de FSC y SSC. La Figura 46B muestra la viabilidad de los macrófagos transfectados. La Figura 46C muestra el porcentaje de expresión de GFP de los macrófagos transfectados.

Las Figuras 47A-47D son gráficas de barras que muestran la viabilidad y eficiencia de la administración de dextrano FITC de 40 kD y ARNm de GFP en monocitos de sangre periférica primarios mediante el uso de dispositivos de la invención. La Figura 47A muestra la viabilidad de macrófagos diferenciados de sangre periférica transfectados con dextrano FITC. La Figura 47B muestra la eficacia de transfección de macrófagos diferenciados de sangre periférica transfectados con dextrano FITC. La Figura 47C muestra la viabilidad de los monocitos de sangre periférica primaria transfectados con ARNm de GFP. La Figura 47D muestra la viabilidad de los monocitos de sangre periférica primaria transfectados con ARNm de GFP.

Las Figuras 48A-48B son gráficas de barras que muestran la capacidad de los macrófagos diferenciados en sangre periférica para polarizar en macrófagos M1 y M2 después de la transfección con ARNm de GFP mediante el uso de dispositivos de la invención. La Figura 48A muestra macrófagos polarizados M1 donde polarización M1 con estimulación con IFN $\gamma$  + LPS fue indicada por una expresión elevada de CD86. La Figura 48B muestra macrófagos polarizados M2 donde la polarización M2, estimulación con IL-4, fue indicada por la expresión de CD206.

Las Figuras 49A-49C son gráficas de barras que muestran la viabilidad, la eficacia y el recuento de células vivas de monocitos humanos primarios transfectados con dextrano FITC usando un sistema de transfección NEON® comercial y dispositivos de la invención. La Figura 49A muestra la viabilidad de los monocitos humanos primarios. La Figura 49B muestra la eficacia de la administración de dextrano FITC en monocitos humanos primarios. La Figura 49C muestra el

recuento de células vivas de los monocitos humanos primarios transfectados.

Las Figuras 50A-50D son gráficas de barras que comparan la recuperación, viabilidad, eficiencia y rendimiento de la transfección de ADN en células Jurkat de densidades celulares variables mediante el uso de dispositivos de flujo continuo y de canal único de la invención. La Figura 50A muestra la recuperación de las células Jurkat transfectadas. La Figura 50B muestra la viabilidad de las células Jurkat transfectadas. La Figura 50C muestra la eficacia de la transfección de ADN en células Jurkat. La Figura 50D muestra el rendimiento de las células Jurkat transfectadas.

Las Figuras 51A-51B son gráficos de barras que comparan el rendimiento de GFP y FITC de células Jurkat transfectadas mediante el uso de dispositivos de flujo continuo y de canal único de la invención. La Figura 51A muestra el rendimiento de GFP para células Jurkat transfectadas. La Figura 51B muestra el rendimiento de FITC para células Jurkat transfectadas.

Las Figuras 52A-52D son gráficas de barras que muestran la administración de dextrano FITC en suspensiones de alta densidad celular mediante el uso de dispositivos de flujo continuo de la invención. El análisis por citometría de flujo se realizó 24 horas después de la electroporación. La Figura 52A muestra los recuentos de células recuperadas totales en relación con 1 millón de entradas de células. La Figura 52B muestra la viabilidad de las células Jurkat transfectadas. La Figura 52C muestra la eficacia de la transfección de dextrano FITC en células Jurkat. La Figura 52D muestra el rendimiento de FITC de las células Jurkat transfectadas.

Las Figuras 53A-53D son gráficos de barras que muestran la recuperación, viabilidad, eficacia y rendimiento de la transfección de ARNm en células Jurkat con un número de células de 100 millones de células mediante el uso de cantidades variables de ARNm y concentraciones celulares variables en dispositivos de flujo continuo de la invención. El análisis por citometría de flujo se realizó 24 horas después de la electroporación. La Figura 53A muestra el número de células Jurkat recuperadas a diferentes concentraciones de ARNm y concentraciones celulares. La Figura 53B muestra la viabilidad de las células Jurkat transfectadas a diferentes concentraciones de ARNm y concentraciones celulares. La Figura 53C muestra la eficacia de la transfección de ARNm en células Jurkat a diferentes concentraciones de ARNm y concentraciones celulares. La Figura 53D muestra la viabilidad de las células Jurkat transfectadas a diferentes concentraciones de ARNm y concentraciones celulares.

La Figura 54 muestra un análisis de citometría de flujo de linfocitos T no tratados y linfocitos T electroporados comparando el sistema de transfección comercial Lonza NUCLEOFECTOR 4D™ y los dispositivos de la invención. El panel superior muestra las gráficas de células totales FSC/SSC y el panel inferior muestra la tinción de viabilidad. Las poblaciones de células muertas se indican con flechas rojas y recuadros rojos. También existe un cambio de morfología de las células transfectadas con Lonza NUCLEOFECTOR 4D™ a las 24 h en comparación con las células no tratadas, lo que indica que se producen cambios fenotípicos durante la electroporación con la

plataforma Lonza.

La Figura 55 muestra un gráfico de barras del rendimiento celular total de la electroporación de 50 millones de linfocitos T primarios con ARNm de FITC-dextrano o EGFP mediante el sistema comercial de transfección Lonza LV y un dispositivo de flujo continuo de la invención.

- 5 Las Figuras 56A-56B son gráficas de barras que muestran la viabilidad y eficacia de la administración de dextrano FITC en una suspensión de mil millones de células THP-1 mediante el uso de un dispositivo de flujo continuo de la invención durante un período de hasta 72 horas después de la electroporación. La Figura 56A muestra la viabilidad de las células THP-1. La Figura 56B muestra la eficacia de la administración de dextrano FITC en las células THP-1.
- 10 La Figura 57 es una gráfica de barras que muestra el rendimiento de células transfectadas con dextrano FITC recuperables vivas a partir de una suspensión de mil millones de células THP-1 con el uso de un dispositivo de flujo continuo de la invención. Se siguió el rendimiento durante un período de hasta 72 horas después del cultivo de electroporación y representa aproximadamente el 50 % del número de células de entrada. El análisis por citometría de flujo se realizó a las 4
- 15 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas después de la electroporación.

Las Figuras 58A-58D son gráficas de barras que comparan la forma de la forma de onda y el voltaje de la forma de onda en el recuento total de células, la viabilidad, la eficacia y el rendimiento de la transfección de dextrano FITC en células Jurkat con el uso de dispositivos de la invención. La Figura 58A muestra el número de células Jurkat recuperadas con diferentes formas de onda y voltajes. La Figura 58B muestra la viabilidad de las células Jurkat transfectadas con diferentes formas de onda y voltajes. La Figura 58C muestra la eficiencia de la transfección de dextrano FITC en células Jurkat con diferentes formas de onda y voltajes. La Figura 58D muestra el número de células Jurkat recuperadas con diferentes formas de onda y voltajes.

Las Figuras 59A-59D son gráficos de barras que comparan los voltajes máximos de la forma de onda y los ciclos de trabajo en los recuentos celulares totales, la viabilidad, la eficiencia y el rendimiento de la transfección de dextrano FITC en linfocitos T primarios mediante el uso de dispositivos de la invención. La Figura 59A muestra el número de linfocitos T primarios recuperadas a diferentes voltajes máximos de forma de onda y ciclos de trabajo. La Figura 59B muestra la viabilidad de las linfocitos T primarios transfectados a diferentes voltajes máximos de forma de onda y ciclos de trabajo. La Figura 59C muestra la eficiencia de la transfección de dextrano FITC en linfocitos T primarios a diferentes voltajes máximos de forma de onda y ciclos de trabajo. La Figura 59D muestra el rendimiento de linfocitos T primarios transfectados a diferentes voltajes máximos de forma de onda y ciclos de trabajo.

Las Figuras 60A-60D son gráficos de barras que comparan los voltajes máximos de la forma de onda y los ciclos de trabajo en los recuentos celulares totales, la viabilidad, la eficacia y el rendimiento de la transfección de dextrano FITC en linfocitos T primarios mediante el uso de

dispositivos de la invención. La Figura 60A muestra el número de linfocitos T primarios recuperadas a diferentes voltajes máximos de forma de onda y ciclos de trabajo. La Figura 60B muestra la viabilidad de las linfocitos T primarios transfectados a diferentes voltajes máximos de forma de onda y ciclos de trabajo. La Figura 60C muestra la eficacia de la transfección ARNm en linfocitos T primarios en diferentes voltajes máximos de forma de onda y ciclos de trabajo. La Figura 60D muestra el rendimiento de linfocitos T primarios transfectados a diferentes voltajes máximos de forma de onda y ciclos de trabajo.

La Figura 61 es una gráfica de barras que muestra la eficacia de la entrega de Dynabeads CD3/CD28 en una suspensión de 1 millón de linfocitos T humanos primarios mediante el uso de dispositivos de la invención. La electroporación se realizó con y sin Dynabeads, la incorporación de Dynabead ocurrió durante 5 minutos o durante la noche. El análisis por citometría de flujo se realizó 24 horas después de la electroporación.

Las Figuras 62A-62B muestran una modalidad de una estructura exterior que está configurada para revestir los electrodos de los dispositivos de la invención. La Figura 62A muestra la estructura exterior configurada con un pestillo y una bisagra tipo concha para revestir un dispositivo de la invención. La Figura 62B muestra la estructura exterior de la Figura 62A con un dispositivo de la invención que se aloja dentro de los correspondientes huecos interiores de la estructura exterior.

Las Figuras 63A-63B son gráficas de barras que muestran la viabilidad y eficiencia de la administración de dextrano FITC en monocitos THP-1 mediante el uso de dispositivos de la invención, con y sin una estructura exterior que cubra los electrodos del dispositivo. El análisis por citometría de flujo se realizó 24 horas después de la electroporación.

La Figura 63A muestra la viabilidad de los monocitos THP-1. La Figura 63B muestra la eficacia de la transfección de los monocitos THP-1.

Las Figuras 64A-64B son gráficas de barras que muestran la viabilidad y eficiencia de la administración de dextrano FITC en monocitos THP-1 mediante el uso de dispositivos de la invención fabricados a partir de diferentes resinas poliméricas. La Figura 64A muestra la viabilidad de los monocitos THP-1 transfectados. La Figura 64B muestra la eficacia de la transfección del dextrano FITC en los monocitos THP-1.

Las Figuras 65A-65B son gráficas de barras que comparan la viabilidad y eficiencia de la administración tanto de ADN como de ARNm que codifica GFP en células Jurkat mediante el uso de dispositivos de la invención operados manualmente o con una plataforma automatizada de manipulación de fluidos. La Figura 65A muestra la viabilidad de las células Jurkat transfectadas. La Figura 65A muestra la eficacia de la transfección de ADN y ARNm que codifica GFP en las células Jurkat.

Las Figuras 66A-66E son gráficas de barras y diagramas de puntos que comparan la viabilidad y eficiencia de la entrega de múltiples ARNm que codifican tanto GFP como mCherry en linfocitos T

en paralelo (el mismo día) o en serie (con 2 días de diferencia) mediante el uso de dispositivos de la invención operados manualmente o con una plataforma automatizada de manipulación de fluidos. La Figura 66A muestra la viabilidad de los linfocitos T 24 horas después de la electroporación de la administración de múltiples ARNm que codifican mCherry. La Figura 66B muestra la eficiencia de GFP 24 horas después de la electroporación. La Figura 66C muestra la eficiencia de mCherry 24 horas después de la electroporación. La Figura 66D muestra la eficacia dual de GFP y mCherry 24 horas luego de la electroporación. La Figura 66E muestra los gráficos de puntos de la expresión de GFP (eje x) y mCherry (eje y) a las 24 horas.

Las Figuras 67A-67B son gráficos de barras que demuestran la eficacia de la administración de ARNm en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante el uso de dispositivos de la invención. Estos experimentos se realizaron con un ARNm de origen comercial que codifica GFP, seguido de tinción fenotípica de receptores de superficie para identificar poblaciones celulares específicas. La Figura 67A muestra la eficacia en subpoblaciones de linfocitos T y la Figura 67B muestra la eficacia en poblaciones de células que no son T de las PBMC. El análisis por citometría de flujo se realizó 24 horas después de la electroporación.

La Figura 68 es una fotografía de una modalidad de un sistema de la invención que tiene un depósito (una bolsa) en comunicación fluida con la primera entrada y un depósito (bolsa) en comunicación fluida con la segunda salida.

La Figura 69A es un conjunto de fotomicrografías que muestran la expresión de ARNm de eGFP mediante el uso de dispositivos de la invención frente a controles no tratados. Las Figuras 69B y 69C son gráficas de barras que muestran porcentajes de células vivas (Figura 69B) y porcentajes de células GFP+ (Figura 69C).

Las Figuras 70A-70D son gráficas de barras que muestran la recuperación total de células citolíticas (Figura 70A), la viabilidad (Figura 70B), la eficacia de transfección (Figura 70C) y el rendimiento de células GFP+ (Figura 70D).

Las Figuras 71A y 71B son gráficas de barras que muestran una comparación multiplataforma entre un control de "no electroporación" (primera barra a la izquierda), el dispositivo de la invención (Kytopen; segunda barra a la izquierda) y dos plataformas convencionales: Thermo (Neon Transfection System) y Lonza 4D-Nucleofector (tercera y cuarta barras, respectivamente). La Figura 71A muestra el % de viabilidad. La Figura 71B muestra el % de eficacia de transfección.

La Figura 71C es un mapa térmico que muestra las diferencias de expresión génica entre las tres plataformas comparadas en las Figuras 71A y 71B. Los tonos oscuros corresponden a mayores grados de diferencia de expresión génica en relación con las células no tratadas.

Las Figuras 72A-72D son mapas de calor para el recuento relativo de células, la viabilidad (porcentaje de células 7-AAD-), la eficacia (porcentaje de células GFP + vivas) y el recuento de células de rendimiento (recuentos de células GFP+ vivas) por reacción a las 24 horas después de

la transfección, que se muestran como una función de  $V_{rms}$  (eje y) y la velocidad de flujo (eje x) variables.

Las Figuras 73A-73D son mapas de calor para el recuento relativo de células, la viabilidad (porcentaje de células 7-AAD-), la eficacia (porcentaje de células GFP + vivas) y el recuento de células de rendimiento (recuentos de células GFP+ vivas) por reacción a las 24 horas después de la transfección, que se muestran como una función de  $V_{rms}$  (eje y) y la velocidad de flujo (eje x) variables.

La Figura 74 es un gráfico de densidad que muestra el rendimiento de células vivas a través de diferentes energías aplicadas ( $V_{rms}^2/R$ )s y velocidades de flujo.

Cuando los valores se describen como intervalos, se entenderá que dicha descripción incluye la descripción de todos los subintervalos posibles dentro de dichos intervalos, así como también se establecen expresamente los valores numéricos específicos que se incluyen dentro de dichos intervalos, independientemente de si se trata de un valor numérico específico o un subintervalo específico.

El término "alrededor de", como se usa en este documento, se refiere a  $\pm 10\%$  de un valor establecido.

El término "pluralidad", como se usa en este documento, se refiere a más de uno.

El término "sustancialmente uniforme", como se usa en este documento, se refiere a  $\pm 5\%$  de diferencia.

La expresión "dimensión de sección transversal mínima", como se usa en este documento, se refiere a una longitud mínima de una línea recta que pasa a través del centro geométrico de una sección transversal de un lumen e intersecta una pared interior del lumen dos veces en el mismo plano de la sección transversal.

La expresión "área de la sección transversal", a menos que se especifique lo contrario, se refiere al área de la sección transversal (por ejemplo, a lo largo del plano perpendicular al eje longitudinal o la dirección del flujo).

La expresión "conectado de manera fluida", como se usa en este documento, se refiere a una conexión directa entre al menos dos elementos del dispositivo, por ejemplo, un dispositivo de electroporación, un depósito, etc., que permite que el fluido se mueva entre dichos elementos del dispositivo sin pasar a través de un elemento intermedio.

La expresión "comunicación de fluidos", como se usa en este documento, se refiere a una conexión indirecta entre al menos dos elementos del dispositivo, por ejemplo, una zona de electroporación, un depósito, etc., que permite que el fluido se mueva entre dichos elementos del dispositivo, por ejemplo, a través de un elemento intermedio (por ejemplo, a través de una tubería intermedia, un canal intermedio, etc.). Por ejemplo, en las modalidades en las que un fluido fluye desde un lumen del primer electrodo, a través de una zona de electroporación, hacia un lumen de

un segundo electrodo, el primer electrodo está en comunicación de fluidos con el segundo electrodo.

El término "lumen", como se usa en este documento, se refiere a una cavidad interior de un electrodo de los dispositivos de la invención que permite que el fluido pase a través de este. Parte o todo el lumen de un electrodo puede ser conductor o no conductor. Por ejemplo, un lumen de un electrodo puede encerrar un elemento conductor en forma de C que no rodea completamente el perímetro del lumen. En otras modalidades, el electrodo está compuesto sustancialmente en su totalidad por el material conductor que transmite la corriente. Cuando se aplica una diferencia de potencial eléctrico a un primer y segundo electrodo de los dispositivos de la invención, un campo eléctrico que puede generarse en un lumen de cualquiera de los primeros o segundos electrodos no es lo suficientemente alto como para provocar la electroporación celular dentro del lumen.

La expresión "zona de entrada", como se usa en este documento, comprende un lumen de un primer electrodo de los dispositivos de la invención a través del cual un fluido y una pluralidad de células suspendidas en el fluido pueden pasar antes de la electroporación. Una zona de entrada puede comprender además un depósito adicional en comunicación de fluidos con un lumen de un primer electrodo de los dispositivos de la invención. Cuando se aplica una diferencia de potencial eléctrico a un primer y segundo electrodo de los dispositivos de la invención, el campo eléctrico que puede generarse dentro de una zona de entrada de los dispositivos de la invención no es lo suficientemente alto como para provocar la electroporación celular.

La expresión "zona de recuperación", como se utiliza en la presente, comprende un lumen de un segundo electrodo de los dispositivos de la invención a través del cual un fluido y una pluralidad de células suspendidas en el fluido puede pasar luego de la electroporación. Una zona de recuperación puede comprender además un depósito adicional en comunicación fluida con un lumen de un segundo electrodo de los dispositivos de la invención. Cuando se aplica una diferencia de potencial eléctrico a un primer y segundo electrodo de los dispositivos de la invención, el campo eléctrico que puede generarse dentro de una zona de recuperación de los dispositivos de la invención no es lo suficientemente alto como para provocar la electroporación celular.

La término "zona de electroporación", como se usa en este documento, se refiere a una parte de un dispositivo que está dispuesto entre, y en comunicación de fluidos con, una salida de un electrodo corriente arriba (por ejemplo, una primera salida) y una entrada de un electrodo corriente abajo (por ejemplo, una segunda entrada). Se administra el campo eléctrico al fluido en la zona de electroporación.

El término "transfección", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso mediante el cual se pueden introducir cargas útiles en las células mediante el uso de medios distintos a los métodos de liberación viral, tales como métodos biológicos, químicos, eléctricos,

mecánicos o físicos.

El término "electroporación", como se usa en este documento, se refiere a un proceso que utiliza campos eléctricos aplicados para crear pequeños poros en las membranas celulares a través de los cuales se pueden introducir cargas útiles en las células (por ejemplo, como un método de transfección).

La expresión "suministro electromecánico", como se usa en este documento, es un proceso de transfección mediante el cual se pueden introducir cargas útiles en las células con el uso de cualquier combinación de campos eléctricos aplicados y/o los mecanismos de poración mecánica. Este método de entrega tiene el potencial de disminuir y/o estabilizar la exposición general al campo eléctrico de las células en la zona de electroporación, lo que mejora así la viabilidad de la célula y/o eficacia de transfección, o ambas. Los dispositivos de la invención están configurados para transfectar células mediante suministro electromecánico en lugar de mediante electroporación sola.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona dispositivos, sistemas y métodos para la transfección de células, por ejemplo, linfocitos T primarios, mediante electroporación en volúmenes más grandes, eficacia de transfección más altas, rendimientos más altos, tasas de recuperación más altas, rendimientos más altos y viabilidades celulares más altas en comparación con enfoques de electroporación a base de cubetas tradicional o instrumentos de electroporación comercialmente disponible. En particular, se proporcionan sistemas y métodos que pueden realizar la electroporación de una manera de flujo continuo, de manera continua o mediante el uso de una pluralidad de dispositivos de electroporación de la invención para mejorar el rendimiento y el número de células.

#### *Dispositivos*

En general, los dispositivos de la presente invención están configurados para fluir a través de dispositivos que pueden interactuar con el manejo de líquidos, bombas o aparatos de transporte de fluidos existentes, tales como robots de punta de pipeta convencionales o sistemas de manejo de líquidos a gran escala, para proporcionar electroporación continua de las células suspendidas en un fluido. Un dispositivo de la invención se configura para provocar la transfección de células dentro de la zona de electroporación a través de un mecanismo de suministro electromecánico que es distinto del mecanismo de suministro en los sistemas de electroporación estática. Los dispositivos de la invención presentan típicamente tres regiones distintas: un primer electrodo que tiene una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo define una zona de entrada; un segundo electrodo que tiene una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo define una zona de recuperación; y una zona de electroporación que está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la

segunda entrada del segundo electrodo. En la Figura 1A se muestra un ejemplo de una modalidad del dispositivo de la invención, con el primer electrodo y el segundo electrodo conectados de forma fluida por una zona de electroporación entre ellos. Cuando se aplica una diferencia de potencial eléctrico al primer y segundo electrodos, se desarrolla un campo eléctrico localizado en el espacio entre los dos electrodos, por ejemplo, la zona de electroporación, y las células que están expuestas al campo eléctrico se electroporan. Un dispositivo individual de la invención puede incluir dos electrodos, como se muestra en las Figuras 1A-1C; alternativamente, los dispositivos individuales de la invención pueden incluir tres o más electrodos que definen una pluralidad de zonas de electroporación, permitiendo así una pluralidad de electroporaciones en las células suspendidas en un fluido. Los dispositivos de la invención pueden incluir una pluralidad de zonas de electroporación entre el primer y segundo electrodos, lo que permite que las células experimenten diferentes campos eléctricos, por ejemplo, desarrollados por diferentes geometrías de cada una de la pluralidad de zonas de electroporación, mientras fluyen en un solo dispositivo o un pluralidad de dispositivos.

En algunos casos, el primer electrodo y el segundo electrodo pueden ser alambres eléctricamente conductores, cilindros huecos, películas delgadas eléctricamente conductoras, espumas metálicas, electrodos de malla, membranas líquidas difusibles, líquidos conductores o cualquier combinación de estos puede incluirse en el dispositivo. Los electrodos pueden estar alineados en paralelo con el eje de flujo de fluido del dispositivo o pueden estar alineados ortogonalmente al eje de flujo de fluido del dispositivo. Por ejemplo, el primer y segundo electrodos pueden ser electrodos cilíndricos huecos dispuestos en paralelo con el eje de flujo de fluido dentro del dispositivo, como en el dispositivo de las Figuras 1A-1C, de modo que el fluido fluya a través de los electrodos. En un ejemplo alternativo, el primer y/o el segundo electrodo pueden estar hechos de un conductor poroso, por ejemplo, una malla metálica, con poros que están alineados con el eje del flujo de fluido del dispositivo. En un ejemplo alternativo, el primer y/o el segundo electrodo puede ser un fluido conductor, por ejemplo, un líquido. En algunos casos, el primer y segundo electrodo pueden estar configurados como helicoidales, por ejemplo, una doble hélice, hechos de un conductor sólido, por ejemplo, un alambre, alrededor de la zona de electroporación. En esta configuración, la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación permanece sustancialmente uniforme pero el primer y segundo electrodos cambian de posición a lo largo de la longitud de la zona de electroporación. El primer y segundo electrodo están en comunicación fluida con la zona de electroporación pero el campo eléctrico generado cuando se aplica una diferencia de potencial eléctrico a los electrodos gira cuando las células suspendidas en el fluido viajan a través del dispositivo de la invención. En determinadas modalidades, el primer y segundo electrodos están integrados en el dispositivo de la invención y tienen un área activa dispuesta en o cerca de las conexiones de fluido a la zona de electroporación de tal manera que el fluido que lleva las células

en suspensión contacta una parte del electrodo, con el campo eléctrico generado en la zona de electroporación.

Cuando se configura para ser electrodos cilíndricos huecos, el diámetro del electrodo puede ser de alrededor de 0,1 mm a alrededor de 5 mm, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mm a alrededor de 1 mm, de alrededor de 0,5 mm a alrededor de 1,5 mm, de alrededor de 1 mm a alrededor de 2 mm, de alrededor de 1,5 mm a alrededor de 2,5 mm, de alrededor de 2 mm a alrededor de 3 mm, de alrededor de 2,5 mm a alrededor de 3,5 mm, de alrededor de 3 mm a alrededor de 4 mm, de alrededor de 3,5 mm a alrededor de 4,5 mm, o alrededor de 4 mm a alrededor de 5 mm, por ejemplo, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,2 mm, alrededor de 0,3 mm, alrededor de 0,4 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 0,6 mm, alrededor de 0,7 mm, alrededor de 0,8 mm, alrededor de 0,9 mm, alrededor de 1 mm, alrededor de 1,1 mm, alrededor de 1,2 mm, alrededor de 1,3 mm, alrededor de 1,4 mm, alrededor de 1,5 mm, alrededor de 1,6 mm, alrededor de 1,7 mm, alrededor de 1,8 mm, alrededor de 1,9 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 2,1 mm, alrededor de 2,2 mm, alrededor de 2,3 mm, alrededor de 2,4 mm, alrededor de 2,5 mm, alrededor de 2,6 mm, alrededor de 2,7 mm, alrededor de 2,8 mm, alrededor de 2,9 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 3,1 mm, alrededor de 3,2 mm, alrededor de 3,3 mm, alrededor de 3,4 mm, alrededor de 3,5 mm, alrededor de 3,6 mm, alrededor de 3,7 mm, alrededor de 3,8 mm, alrededor de 3,9 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 4,1 mm, alrededor de 4,2 mm, alrededor de 4,3 mm, alrededor de 4,4 mm, alrededor de 4,5 mm, alrededor de 4,6 mm, alrededor de 4,7 mm, alrededor de 4,8 mm, alrededor de 4,9 mm o alrededor de 5 mm. Un diámetro exterior de electrodo de ejemplo es 1,3 mm, correspondiente a un electrodo de calibre 16.

En algunas modalidades, cuando un dispositivo de la invención está configurado para incluir electrodos cilíndricos huecos, un lumen de un electrodo, por ejemplo, el primer o segundo electrodo, puede incluir una zona, por ejemplo, una zona de entrada o una zona de recuperación, que no se encuentra sujeta al campo eléctrico de la zona de electroporación. Como se muestra en la Figura 1A, la zona de entrada puede ser el lumen del primer electrodo directamente antes de una entrada a la zona de electroporación donde se ubican las células de la suspensión que se van a electroporar junto con una composición que se administrará a las células. La zona de recuperación puede ser el lumen del segundo electrodo directamente después de una salida a la zona de electroporación donde las células a las que se les ha administrado una composición se mueven de manera que los poros en las membranas celulares puedan cerrarse, lo que asegura así que la composición administrada permanezca dentro de la célula. En esta configuración, a medida que las células pasan a través del lumen del primer electrodo y hacia el lumen del segundo electrodo, el primer electrodo se energiza y el segundo electrodo se mantiene a tierra, lo que crea el campo eléctrico localizado en la zona de electroporación, electroporando así el células que pasan a través del dispositivo.

La zona de electroporación conecta de forma fluida el primer y segundo electrodo de los dispositivos de la invención, y cuando los electrodos se activan, experimenta un campo eléctrico localizado entre ellos. La forma de la sección transversal de la zona de electroporación puede tener cualquier forma adecuada que permita que las células pasen a través de la zona de electroporación y el campo eléctrico dentro de la zona de electroporación. La forma de la sección transversal puede ser, por ejemplo, circular, elipsoidal o poligonal, por ejemplo, cuadrada, rectangular, triangular,  $n$ -gon (por ejemplo, un polígono regular o irregular que tiene 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más lados), estrella, paralelogramo, trapezoidal o irregular, por ejemplo, forma ovalada o curvilínea. En algunos casos, la zona de electroporación es un canal que tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme a lo largo de su longitud, por ejemplo, la zona de electroporación puede tener una sección transversal circular, donde el diámetro es constante desde la conexión de fluidos hasta la zona de entrada a la conexión de fluidos de la zona de recuperación. En esta configuración, el campo eléctrico resultante es más uniforme, lo que permite una exposición al campo eléctrico más predecible de las células suspendidas en un fluido.

Alternativamente, la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación se puede variar a lo largo de su longitud. Por ejemplo, la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación puede aumentar o disminuir a lo largo de su longitud, o puede tener más de un cambio de dimensión a lo largo de su longitud, por ejemplo, la dimensión de la sección transversal, por ejemplo, el diámetro, puede aumentar o disminuir en al menos 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, o como máximo 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. En esta configuración, la zona de electroporación puede tener una sección transversal cónica truncada, lo que aumenta el diámetro desde la abertura superior hasta la abertura inferior o disminuye desde la abertura superior hasta la abertura inferior. En algunos casos, los dispositivos de la invención pueden incluir una pluralidad de zonas de electroporación conectadas de forma fluida en serie, cada zona de electroporación tiene una sección transversal uniforme o no uniforme y cada una puede tener una forma de sección transversal diferente. Como ejemplo no taxativo, un dispositivo de la invención puede incluir una pluralidad de zonas de electroporación conectadas en serie, cada una de la pluralidad de zonas de electroporación tiene una sección transversal cilíndrica de una dimensión de sección transversal diferente, por ejemplo, cada una tiene una diferente diámetro.

En algunas modalidades, la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación puede ser de alrededor de 0,005 mm a alrededor de 50 mm, por ejemplo, de alrededor de 0,005 mm a alrededor de 0,05 mm, de alrededor de 0,01 mm a alrededor de 0,1 mm, de alrededor de 0,05 mm a alrededor de 0,5 mm, de alrededor de 0,1 mm a alrededor de 1 mm, de alrededor de 0,5 mm a alrededor de 1 mm, de alrededor de 0,5 mm a alrededor de 2 mm, de alrededor de 0,7 mm a alrededor de 1,5 mm, de alrededor de 1 mm a alrededor de 5 mm, de alrededor de 3 mm a

alrededor de 7 mm, alrededor de 5 mm a alrededor de 10 mm, alrededor de 7 mm a alrededor de 12 mm, alrededor de 10 mm a alrededor de 15 mm, alrededor de 13 mm a alrededor de 18 mm, alrededor de 15 mm a alrededor de 20 mm, alrededor de 22 mm a alrededor de 30 mm alrededor de 25 mm a alrededor de 35 mm, alrededor de 30 mm a alrededor de 40 mm, alrededor de 35 mm a alrededor de 45 mm, o alrededor de 40 mm a alrededor de 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm, alrededor de 0,006 mm, alrededor de 0,007 mm, alrededor de 0,008 mm, alrededor de 0,009 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,02 mm, alrededor de 0,03 mm, alrededor de 0,04 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,06 mm, alrededor de 0,07 mm, alrededor de 0,08 mm, alrededor de 0,09 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,2 mm, alrededor de 0,3 mm, alrededor de 0,4 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 0,6 mm, alrededor de 0,7 mm, alrededor de 0,8 mm, alrededor de 0,9 mm, alrededor de 1 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 9 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 11 mm, alrededor de 12 mm, alrededor de 13 mm, alrededor de 14 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 16 mm, alrededor de 17 mm, alrededor de 18 mm, alrededor de 19 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 21 mm, alrededor de 22 mm, alrededor de 23 mm, alrededor de 24 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 26 mm, alrededor de 27 mm, alrededor de 28 mm, alrededor de 29 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 31 mm, alrededor de 32 mm, alrededor de 33 mm, alrededor de 34 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 36 mm, alrededor de 37 mm, alrededor de 38 mm, alrededor de 39 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 41 mm, alrededor de 42 mm, alrededor de 43 mm, alrededor de 44 mm, alrededor de 45 mm, alrededor de 46 mm, alrededor de 47 mm, alrededor de 48 mm, alrededor de 49 mm o alrededor de 50 mm. En general, el diámetro de la zona de electroporación se dimensiona de manera que no tenga una restricción que entre en contacto con las células para deformar las membranas celulares con las paredes del canal, por ejemplo, la poración de las células no es inducida por deformación mecánica debido a la compresión de las células, por ejemplo, las células pueden pasar libremente a través de la zona de electroporación.

En algunos casos, la longitud de la zona de electroporación puede ser de alrededor de 0,005 mm a alrededor de 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005 mm a alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,01 mm a alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,05 mm a alrededor de 0,5 mm, alrededor de 0,1 mm a alrededor de 1 mm, de alrededor de 0,5 mm a alrededor de 2 mm, alrededor de 1 mm a alrededor de 5 mm, alrededor de 3 mm a alrededor de 7 mm, alrededor de 4 mm a alrededor de 8 mm, alrededor de 5 mm a alrededor de 10 mm, alrededor de 7 mm a alrededor de 12 mm, alrededor de 10 mm a alrededor de 15 mm, alrededor de 13 mm a alrededor de 18 mm, alrededor de 15 mm a alrededor de 20 mm, alrededor de 22 mm a alrededor de 30 mm alrededor de 25 mm a alrededor de 35 mm, alrededor de 30 mm a alrededor de 40 mm, alrededor de 35 mm a alrededor de 45 mm o alrededor de 40 mm a alrededor de 50 mm, por ejemplo, alrededor de 0,005

mm, alrededor de 0,006 mm, alrededor de 0,007 mm, alrededor de 0,008 mm, alrededor de 0,009 mm, alrededor de 0,01 mm, alrededor de 0,02 mm, alrededor de 0,03 mm, alrededor de 0,04 mm, alrededor de 0,05 mm, alrededor de 0,06 mm, alrededor de 0,07 mm, alrededor de 0,08 mm, alrededor de 0,09 mm, alrededor de 0,1 mm, alrededor de 0,2 mm, alrededor de 0,3 mm, alrededor de 0,4 mm, alrededor de 0,5 mm, alrededor de 0,6 mm, alrededor de 0,7 mm, alrededor de 0,8 mm, alrededor de 0,9 mm, alrededor de 1 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 3 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 8 mm, alrededor de 9 mm, alrededor de 10 mm, alrededor de 11 mm, alrededor de 12 mm, alrededor de 13 mm, alrededor de 14 mm, alrededor de 15 mm, alrededor de 16 mm, alrededor de 17 mm, alrededor de 18 mm, alrededor de 19 mm, alrededor de 20 mm, alrededor de 21 mm, alrededor de 22 mm, alrededor de 23 mm, alrededor de 24 mm, alrededor de 25 mm, alrededor de 26 mm, alrededor de 27 mm, alrededor de 28 mm, alrededor de 29 mm, alrededor de 30 mm, alrededor de 31 mm, alrededor de 32 mm, alrededor de 33 mm, alrededor de 34 mm, alrededor de 35 mm, alrededor de 36 mm, alrededor de 37 mm, alrededor de 38 mm, alrededor de 39 mm, alrededor de 40 mm, alrededor de 41 mm, alrededor de 42 mm, alrededor de 43 mm, alrededor de 44 mm, alrededor de 45 mm, alrededor de 46 mm, alrededor de 47 mm, alrededor de 48 mm, alrededor de 49 mm o alrededor de 50 mm.

La dimensión de la sección transversal de la zona de entrada y/o la zona de recuperación puede ser independientemente, de forma sustancial, la misma que la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación. Alternativamente, la zona de entrada y/o la zona de recuperación puede ser independientemente más pequeña o más grande que la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación. Por ejemplo, cuando la dimensión de sección transversal de la zona de entrada y/o la zona de recuperación se encuentra configurada independientemente para ser más pequeña que la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada y/o la zona de recuperación puede ser de alrededor de 0,01 % a alrededor de 100 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación, de alrededor de 0,01% a alrededor de 1 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, alrededor de 1 % a alrededor 5 %, alrededor de 1 % a alrededor 10 %, alrededor de 5 % a alrededor 25 %, alrededor de 5 % a alrededor 10 %, alrededor de 10 % a alrededor 25%, alrededor de 10 % a alrededor 50 %, alrededor de 25 % a alrededor 75 %, o alrededor de 50 % a alrededor 100 %, por ejemplo, alrededor de 0,01 %, alrededor de 0,02 %, alrededor de 0,03 %, alrededor de 0,04 %, alrededor de 0,05 %, alrededor de 0,06 %, alrededor de 0,07 %, alrededor de 0,08 %, alrededor de 0,09 %, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,15 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,25 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,35 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,45 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,55 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,65 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,75 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de

0,85 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 0,95 %, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 100 %.

Alternativamente, cuando la dimensión de sección transversal de la zona de entrada y/o la zona de recuperación se encuentra configurada independientemente para ser más grande que la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación, la dimensión de la sección transversal de la zona de entrada y/o la zona de recuperación puede ser de alrededor de 100 % a alrededor de 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación, por ejemplo, de alrededor de 100 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 100 % a alrededor de 250 %, alrededor de 100 % a alrededor de 500 %, alrededor de 250 % a alrededor de 750 %, alrededor de 500 % a alrededor de 1000 %, alrededor de 500 % a alrededor de 5000 %, alrededor de 1000 % a alrededor de 10 000 %, alrededor de 5000 % a alrededor de 25 000 %, alrededor de 10 000 % a alrededor de 50 000 %, alrededor de 25 000 % a alrededor de 75 000 %, o alrededor de 50 000 % a alrededor de 100 000 %, por ejemplo, alrededor de 100 %, alrededor de 150 %, alrededor de 175 %, alrededor de 200 %, alrededor de 225 %, alrededor de 250 %, alrededor de 300 %, alrededor de 250 %, alrededor de 400 %, alrededor de 450 %, alrededor de 500 %, alrededor de 600 %, alrededor de 700 %, alrededor de 800 %, alrededor de 900 %, alrededor de 1000 %, alrededor de 2000 %, alrededor de 3000 %, alrededor de 4000 %, alrededor de 5000 %, alrededor de 6000 %, alrededor de 7000 %, alrededor de 8000 %, alrededor de 9000 %, alrededor de 10 000 %, alrededor de 15 000 %, alrededor de 20 000 %, alrededor de 25 000 %, alrededor de 30 000 %, alrededor de 35 000 %, alrededor de 40 000 %, alrededor de 45 000 %, alrededor de 50 000 %, alrededor de 55 000 %, alrededor de 60 000 %, alrededor de 65 000 %, alrededor de 70 000 %, alrededor de 75 000 %, alrededor de 80 000 %, alrededor de 85 000 %, alrededor de 90 000 %, alrededor de 95 000 % o alrededor de 100 000 %.

Los dispositivos de la invención también pueden incluir uno o más depósitos para reactivos fluidos, por ejemplo, una solución amortiguadora, o muestras, por ejemplo, una suspensión de células y una composición a introducir en las células. Por ejemplo, los dispositivos de la invención pueden incluir un depósito para que las células suspendidas en el fluido fluyan en el primer electrodo hacia la zona de electroporación y/o un depósito para contener las células que han sido electroporadas. De manera similar, puede estar presente un depósito para que fluyan líquidos en componentes adicionales de un dispositivo, tales como entradas adicionales que se cruzan con el primer o segundo electrodos. También se puede conectar un único depósito a múltiples dispositivos de la

invención, por ejemplo, cuando se introducirá el mismo líquido en dos o más dispositivos individuales de la invención configurados para electroporar celdas en paralelo o en serie. Alternativamente, los dispositivos de la invención pueden configurarse para acoplarse con fuentes de los líquidos, que pueden ser depósitos externos tales como viales, tubos o bolsas. De manera similar, el dispositivo puede configurarse para acoplarse con un componente separado que alberga los depósitos. Los depósitos pueden tener cualquier tamaño adecuado, por ejemplo, para mantener 10 mL a 5000 mL, por ejemplo, 10 mL a 3000 mL, 25 mL a 100 mL, 100 mL a 1000 mL, 40 mL a 300 mL, 1 mL a 100 mL, 10 mL a 500 mL, 250 mL a 750 mL, 250 mL a 1000 mL o 1000 mL a 5000 mL. Cuando hay varios depósitos, cada depósito puede tener el mismo tamaño o uno diferente.

Además de los componentes discutidos anteriormente, los dispositivos de la invención pueden incluir componentes adicionales. Por ejemplo, el primer y segundo electrodos de los dispositivos de la invención pueden incluir una o más entradas de fluido adicionales para permitir la introducción de fluidos que no son muestra, por ejemplo, soluciones amortiguadoras, en la región apropiada del dispositivo. Por ejemplo, una zona de recuperación de un dispositivo de la invención puede incluir una entrada y una salida adicionales para hacer circular un amortiguador de recuperación para ayudar en el cierre de los poros abiertos en las membranas celulares del proceso de electroporación.

#### *Sistemas y kits*

Uno o más dispositivos de electroporación de la invención pueden combinarse con varios componentes externos, por ejemplo, fuentes de alimentación, bombas, depósitos (por ejemplo, bolsas), controladores, reactivos, líquidos y/o muestras en forma de sistema. En algunas modalidades, un sistema de la invención incluye una pluralidad de dispositivos de la invención y una fuente de potencial eléctrico que se conecta de forma liberable al primer y segundo electrodos del dispositivo o dispositivos de la invención. En esta configuración, el o los dispositivos de la invención están conectados a la fuente de potencial eléctrico, y el primer electrodo se energiza y el segundo electrodo se mantiene a tierra. Esto crea un campo eléctrico localizado en la zona de electroporación, electroporando así las células que pasan a través de los dispositivos. Los sistemas de electroporación que incorporan dispositivos de la invención pueden inducir una electroporación reversible o irreversible en las células que pasan a través del dispositivo y sistema de la invención. Por ejemplo, los dispositivos y sistemas de la invención pueden inducir electroporación reversible sustancialmente no térmica, electroporación irreversible sustancialmente no térmica o electroporación irreversible sustancialmente térmica en las células suspendidas en el fluido.

En algunos casos, la conexión removible al primer y segundo electrodos puede incluir cualquier conexión electromecánica práctica que pueda mantener un contacto eléctrico constante entre la fuente de potencial eléctrico y el primer y segundo electrodos. Las conexiones eléctricas de

ejemplo incluyen, de forma no taxativa, a abrazaderas, clips, por ejemplo, pinzas de cocodrilo, resortes, por ejemplo, una ballesta, una funda o manguito externo, cepillos de alambre, conductores flexibles, clavijas de pogo, conexiones mecánicas, conexiones inductivas o un combinación de estos. En la técnica se conocen otros tipos de conexiones eléctricas. Por ejemplo, un electrodo de tipo resorte se puede integrar en una plataforma conductora como la que se muestra en las Figuras 2A-2B. En la modalidad mostrada en las Figuras 2A-2B, se inserta un dispositivo de la invención en una carcasa que incorpora dos rejillas conductoras aisladas eléctricamente entre sí sobre una base que contiene aberturas individuales para aceptar dispositivos de la invención. Se puede instalar un dispositivo de la invención en una abertura en la rejilla conductora de modo que el primer y segundo electrodos del dispositivo puedan entrar en contacto con la rejilla conductora. En particular, la rejilla conductora incluye electrodos cargados por resorte, por ejemplo, electrodos conectados a un resorte, de modo que cuando un dispositivo de la invención se instala en una abertura de la rejilla conductora, los electrodos cargados por resorte desplazan y comprimen el resorte (que además proporciona una fuerza restauradora contra el primer y segundo electrodos del dispositivo de la invención), asegurando así el contacto eléctrico entre el dispositivo de la invención y la fuente de potencial eléctrico.

La fuente de potencial eléctrico está configurada para entregar un voltaje aplicado a uno o más electrodos con el fin de proporcionar una diferencia de potencial eléctrico entre los electrodos y así establecer un campo eléctrico uniforme en la zona de electroporación. En algunos casos, como en un circuito de electroporación de dos electrodos, el voltaje aplicado se envía a un primer electrodo y el segundo electrodo se mantiene a tierra. Sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, un voltaje aplicado entregado al electrodo se entrega a una amplitud particular, una frecuencia particular, una forma de pulso particular, una duración particular, un número particular de pulsos aplicados y un ciclo de trabajo particular. Estos parámetros, acoplados a la geometría de la zona de electroporación, entregarán un campo eléctrico particular dentro de la zona de electroporación que experimentarán las células suspendidas en un fluido. Los parámetros eléctricos descritos en este documento pueden optimizarse para una línea celular en particular y/o la composición se administra a una línea celular particular. Se puede iniciar la aplicación del potencial eléctrico a los electrodos de los dispositivos de la invención y/o controlado por un controlador, por ejemplo, un ordenador con programación, acoplado operativamente a la fuente de potencial eléctrico.

Junto con los parámetros de potencial eléctrico descritos en la presente, la geometría de los dispositivos de la invención, por ejemplo, la forma y dimensiones de la sección transversal de la zona de electroporación, controlan la forma y la intensidad del campo eléctrico resultante dentro de la zona de electroporación. Normalmente, un dispositivo con una zona de electroporación que tiene una sección transversal uniforme exhibirá un campo eléctrico uniforme a lo largo de su longitud. Para modular el campo eléctrico resultante en la zona de electroporación, la zona de

electroporación puede incluir una pluralidad de diferentes dimensiones de sección transversal y/o diferentes formas de sección transversal a lo largo de su longitud. Como ejemplo no taxativo, un dispositivo de la invención puede incluir una pluralidad de zonas de electroporación conectadas en serie, cada una de la pluralidad de zonas de electroporación tiene una sección transversal circular de una dimensión de sección transversal diferente, por ejemplo, cada una tiene una diferente diámetro. En esta configuración, las secciones transversales circulares de diferente diámetro de la zona de electroporación actúan cada una como una zona de electroporación independiente, y cada una inducirá un campo eléctrico diferente en cada cambio de dimensión con un voltaje aplicado idéntico, por ejemplo, un voltaje de CC constante.

En algunos casos, los dispositivos de la invención pueden incluir una pluralidad de zonas de electroporación conectadas de forma fluida en serie, cada zona de electroporación tiene una sección transversal uniforme o no uniforme y cada una puede tener una forma de sección transversal diferente. Alternativamente, un sistema de la invención puede incluir una pluralidad de dispositivos de la invención en una configuración paralela, con cada dispositivo operando independientemente entre sí para aumentar el rendimiento total de la electroporación.

En algunos casos, la amplitud del voltaje aplicado es de alrededor de -3 kV a 3 kV, por ejemplo, alrededor de -3 kV a alrededor de -0,1 kV, alrededor de -2 kV a alrededor de -0,1 kV, alrededor de -1 kV a alrededor de -0,1 kV, alrededor de -0,1 kV a alrededor de -0,01 kV, 0,01 kV a alrededor de 3 kV, por ejemplo, alrededor de 0,01 kV a alrededor de 0,1 kV, alrededor de 0,02 kV a alrededor de 0,2 kV, alrededor de 0,03 kV a alrededor de 0,3 kV, alrededor de 0,04 kV a alrededor de 0,4 kV, alrededor de 0,05 kV a alrededor de 0,5 kV, alrededor de 0,06 kV a alrededor de 0,6 kV, alrededor de 0,07 kV a alrededor de 0,7 kV, alrededor de 0,08 kV a alrededor de 0,8 kV, alrededor de 0,09 kV a alrededor de 0,9 kV, alrededor de 0,1 kV a alrededor de 1 kV, alrededor de 0,1 kV a alrededor de 2,0 kV, alrededor de 0,1 kV a alrededor de 3 kV, alrededor de 0,15 kV a alrededor de 1,5 kV, alrededor de 0,2 kV a alrededor de 2 kV, alrededor de 0,25 kV a alrededor de 2,5 kV, o alrededor de 0,3 kV a alrededor de 3 kV, por ejemplo, alrededor de 0,01 a alrededor de 1 kV, alrededor de 0,1 kV a alrededor de 0,7 kV, o alrededor de 0,2 a alrededor de 0,6 kV, por ejemplo, alrededor de 0,01 kV, alrededor de 0,02 kV, alrededor de 0,03 kV, alrededor de 0,04 kV, alrededor de 0,05 kV, alrededor de 0,06 kV, alrededor de 0,07 kV, alrededor de 0,08 kV, alrededor de 0,09 kV, alrededor de 0,1 kV, alrededor de 0,2 kV, alrededor de 0,3 kV, alrededor de 0,4 kV, alrededor de 0,5 kV, alrededor de 0,6 kV, alrededor de 0,7 kV, alrededor de 0,8 kV, alrededor de 0,9 kV, alrededor de 1 kV, alrededor de 1,1 kV, alrededor de 1,2 kV, alrededor de 1,3 kV, alrededor de 1,4 kV, alrededor de 1,5 kV, alrededor de 1,6 kV, alrededor de 1,7 kV, alrededor de 1,8 kV, alrededor de 1,9 kV, alrededor de 2 kV, alrededor de 2,1 kV, alrededor de 2,2 kV, alrededor de 2,3 kV, alrededor de 2,4 kV, alrededor de 2,5 kV, alrededor de 2,6 kV, alrededor de 2,7 kV, alrededor de 2,8 kV, alrededor de 2,9 kV o alrededor de 3 kV.

En algunos casos, la frecuencia del voltaje aplicado es de alrededor de 1 Hz a alrededor de 50 000 Hz, por ejemplo, de alrededor de 1 Hz a alrededor de 1000 Hz, alrededor de 1 Hz a alrededor de 500 Hz, alrededor de 100 Hz a alrededor de 500 Hz, alrededor de 100 Hz a alrededor de 5000 Hz, alrededor de 500 Hz a alrededor de 10 000 Hz, alrededor de 1000 Hz a alrededor de 25 000 Hz, o de alrededor de 5000 Hz a alrededor de 50 000 Hz, por ejemplo, de 10 Hz a alrededor de 1000 Hz, alrededor de 10 Hz a alrededor de 500 Hz, alrededor de 500 Hz a alrededor de 750 Hz, o alrededor de 100 Hz a alrededor de 500 Hz, por ejemplo, alrededor de 1 Hz, alrededor de 2 Hz, alrededor de 3 Hz, alrededor de 4 Hz, alrededor de 5 Hz, alrededor de 6 Hz, alrededor de 7 Hz, alrededor de 8 Hz, alrededor de 9 Hz, alrededor de 10 Hz, alrededor de 20 Hz, alrededor de 30 Hz, alrededor de 40 Hz, alrededor de 50 Hz, alrededor de 60 Hz, alrededor de 70 Hz, alrededor de 80 Hz, alrededor de 90 Hz, alrededor de 100 Hz, alrededor de 110 Hz, alrededor de 120 Hz, alrededor de 130 Hz, alrededor de 140 Hz, alrededor de 150 Hz, alrededor de 160 Hz, alrededor de 170 Hz, alrededor de 180 Hz, alrededor de 190 Hz, alrededor de 200 Hz, alrededor de 210 Hz, alrededor de 220 Hz, alrededor de 230 Hz, alrededor de 240 Hz, alrededor de 250 Hz, alrededor de 260 Hz, alrededor de 270 Hz, alrededor de 270 Hz, alrededor de 280 Hz, alrededor de 290 Hz alrededor de 300 Hz, alrededor de 310 Hz, alrededor de 320 Hz, alrededor de 330 Hz, alrededor de 340 Hz, alrededor de 350 Hz, alrededor de 360 Hz, alrededor de 370 Hz, alrededor de 380 Hz, alrededor de 390 Hz, alrededor de 400 Hz, alrededor de 410 Hz, alrededor de 420 Hz, alrededor de 430 Hz, alrededor de 440 Hz, alrededor de 450 Hz, alrededor de 460 Hz, alrededor de 470 Hz, alrededor de 480 Hz, alrededor de 490 Hz, alrededor de 500 Hz, alrededor de 510 Hz, alrededor de 520 Hz, alrededor de 530 Hz, alrededor de 540 Hz, alrededor de 550 Hz, alrededor de 600 Hz, alrededor de 700 Hz, alrededor de 800 Hz, alrededor de 900 Hz, alrededor de 1000 Hz, alrededor de 2000 Hz, alrededor de 3000 Hz, alrededor de 4000 Hz, alrededor de 5000 Hz, alrededor de 6000 Hz, alrededor de 7000 Hz, alrededor de 8000 Hz, alrededor de 9000 Hz, alrededor de 10 000 Hz, alrededor de 15 000 Hz, alrededor de 20 000 Hz, alrededor de 25 000 Hz, alrededor de 30 000 Hz, alrededor de 35 000 Hz, alrededor de 40 000 Hz, alrededor de 45 000 Hz o alrededor de 50 000 Hz.

En algunas modalidades, la forma del pulso aplicado, por ejemplo, la forma de onda, puede ser una onda cuadrada, un pulso, una onda bipolar, una onda sinusoidal, una rampa, una onda bipolar asimétrica o arbitraria. En la técnica se conocen otras formas de onda de voltaje. La forma de onda elegida se puede aplicar a cualquier patrón de voltaje práctico, incluidos, de forma no taxativa, alto voltaje-bajo voltaje, bajo voltaje-alto voltaje, corriente continua (CC), corriente alterna (CA), unipolar, positivo (+) polaridad solamente, polaridad negativa (-) solamente, (+)/(-) polaridad, (-)/(+) polaridad, o cualquier superposición o combinación de estos. Un experto en la técnica puede apreciar que estos parámetros de pulso dependerán de la línea celular y cualesquiera características eléctricas de la composición que se entreguen a la celda.

Los pulsos de voltaje aplicados se pueden administrar a la zona de electroporación con duraciones de alrededor de 0,01 ms a alrededor de 1000 ms, por ejemplo, de alrededor de 0,01 ms a alrededor de 1 ms, de alrededor de 0,1 ms a alrededor de 10 ms, de alrededor de 0,1 ms a alrededor de 15 ms, alrededor de 1 ms a alrededor de 10 ms, alrededor de 1 ms a alrededor de 50 ms, alrededor de 10 ms a alrededor de 100 ms, alrededor de 25 ms a alrededor de 200 ms, alrededor de 50 ms a alrededor de 400 ms, alrededor de 100 ms a alrededor de 600 ms, alrededor de 300 ms a alrededor de 800 ms, o alrededor de 500 ms a alrededor de 1000 ms, por ejemplo, alrededor de 0,01 ms a 100 ms, alrededor de 0,1 ms a alrededor de 50 ms, o alrededor de 1 ms a alrededor de 10 ms, por ejemplo, alrededor de 0,01 ms, alrededor de 0,02 ms, alrededor de 0,03 ms, alrededor de 0,04 ms, alrededor de 0,05 ms, alrededor de 0,06 ms, alrededor de 0,07 ms, alrededor de 0,08 ms, alrededor de 0,09 ms, alrededor de 0,1 ms, alrededor de 0,2 ms, alrededor de 0,3 ms, alrededor de 0,4 ms, alrededor de 0,5 ms, alrededor de 0,6 ms, alrededor de 0,7 ms, alrededor de 0,8 ms, alrededor de 0,9 ms, alrededor de 1 ms, alrededor de 2 ms, alrededor de 3 ms, alrededor de 4 ms, alrededor de 5 ms, alrededor de 6 ms, alrededor de 7 ms, alrededor de 8 ms, alrededor de 9 ms, alrededor de 10 ms, alrededor de 11 ms, alrededor de 12 ms, alrededor de 13 ms, alrededor de 14 ms, alrededor de 15 ms, alrededor de 20 ms, alrededor de 30 ms, alrededor de 40 ms, alrededor de 50 ms, alrededor de 60 ms, alrededor de 70 ms, alrededor de 80 ms, alrededor de 90 ms, alrededor de 100 ms, alrededor de 150 ms, alrededor de 200 ms, alrededor de 250 ms, alrededor de 300 ms, alrededor de 350 ms, alrededor de 400 ms, alrededor de 450 ms, alrededor de 500 ms, alrededor de 550 ms, alrededor de 600 ms, alrededor de 650 ms, alrededor de 700 ms, alrededor de 750 ms, alrededor de 800 ms, alrededor de 850 ms, alrededor de 900 ms, alrededor de 950 ms, o alrededor de 1000 ms.

En algunos casos, el número de pulsos de voltaje aplicados entregados puede ser de 0 a alrededor de 1000, o más, por ejemplo, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, o 100 o más, por ejemplo, 1-4, 2-5, 3-6, 4-7, 5-8, 6-9, 7-10, 8-11, 7-12 o 9-13, por ejemplo, de alrededor de 0,01 a alrededor de 1000, por ejemplo, de alrededor de 1 a alrededor de 10, alrededor de 1 a alrededor de 50, alrededor de 5 a alrededor de 10, alrededor de 5 a alrededor de 15, alrededor de 10 a alrededor de 100, alrededor de 25 a alrededor de 200, alrededor de 50 a alrededor de 400, alrededor de 100 a alrededor de 600, alrededor de 300 a alrededor de 800, o alrededor de 500 a alrededor de 1000, por ejemplo, alrededor de 1 a 100, alrededor de 1 a alrededor de 50, o alrededor de 1 a alrededor de 10, por ejemplo, alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 20, alrededor de 30, alrededor de 40, alrededor de 50, alrededor de 60, alrededor de 70, alrededor de 80, alrededor de 90, alrededor de 100, alrededor de 150, alrededor de 200, alrededor de 250, alrededor de 300, alrededor de 350, alrededor de 400, alrededor de 450, alrededor de 500, alrededor de 550, alrededor de 600,

alrededor de 650, alrededor de 700, alrededor de 750, alrededor de 800, alrededor de 850, alrededor de 900, alrededor de 950, o alrededor de 1000,

En algunos casos, el número de impulsos de voltaje aplicados entregados puede ser de 1 a alrededor de 1 000 000, Por ejemplo, en algunos casos, el número de pulsos de voltaje aplicados entregados es de 1000 a 1 000 000, por ejemplo, de 1000 a 10 000 (por ejemplo, de 1000 a 2000, de 2000 a 3000, de 3000 a 4000, de 4000 a 5000, de 5000 a 6000, de 6000 a 7000, de 7000 a 8000, de 8000 a 9000 o de 9000 a 10000, por ejemplo, alrededor de 1000, alrededor de 2000, alrededor de 3000, alrededor de 4000, alrededor de 5000, alrededor de 6000, alrededor de 7000, alrededor de 8000, alrededor de 9000, o alrededor de 10 000), de 10 000 a 100 000 (por ejemplo, de 10 000 a 20 000, de 20 000 a 30 000, de 30 000 a 40 000, de 40 000 a 50 000, de 50 000 a 60 000, de 60 000 a 70 000, de 70 000 a 80 000, de 80 000 a 90 000, o de 90 000 a 100 000, por ejemplo, alrededor de 10 000, alrededor de 25 000, alrededor de 30 000, alrededor de 40 000, alrededor de 50 000, alrededor de 60 000, alrededor de 70 000, alrededor de 75 000, alrededor de 80 000, alrededor de 90 000 o alrededor de 100 000), o de 100 000 a 1 000 000 (por ejemplo, de 100 000 a 200 000, de 200 000 a 300 000, de 300 000 a 400 000, de 400 000 a 500 000, de 500 000 a 600 000, de 600 000 a 700 000, de 700 000 a 800 000, de 800 000 a 900 000, o de 900 000 a 1 000 000, por ejemplo, alrededor de 100 000, alrededor de 200 000, alrededor de 250 000, alrededor de 300 000, alrededor de 400 000, alrededor de 500 000, alrededor de 600 000, alrededor de 700 000, alrededor de 750 000, alrededor de 800 000, alrededor de 900 000 o alrededor de 1 000 000).

Los pulsos de voltaje aplicado pueden, en algunos ejemplos, administrarse en un ciclo de trabajo de alrededor de 0,001 % a alrededor de 100 %, por ejemplo, de alrededor de 0,001 % a alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,01 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 5 %, alrededor de 1 % a alrededor de 10 %, alrededor de 2,5 % a alrededor de 20 %, alrededor de 5 % a alrededor de 40 %, alrededor de 10 % a alrededor de 60 %, alrededor de 30 % a alrededor de 80 % o alrededor de 50 % a alrededor de 100 %, por ejemplo, alrededor de 0,01 % a 100 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 99 %, alrededor de 1 % a alrededor de 97 %, o alrededor de 10 % a alrededor de 95 %, por ejemplo, alrededor de 0,001 %, alrededor de 0,002 %, alrededor de 0,003 %, alrededor de 0,004 %, alrededor de 0,005 %, alrededor de 0,006 %, alrededor de 0,007 %, alrededor de 0,008 %, alrededor de 0,009 %, alrededor de 0,01 %, alrededor de 0,02 %, alrededor de 0,03 %, alrededor de 0,04 %, alrededor de 0,05 %, alrededor de 0,06 %, alrededor de 0,07 %, alrededor de 0,08 %, alrededor de 0,09 %, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 100 %.

alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 100 %.

- 5 El dispositivo o dispositivos de la invención, cuando los electrodos están conectados a la fuente de potencial eléctrico y activados, generan un campo eléctrico localizado en la zona de electroporación que electropora las células que atraviesan. En algunos casos, el campo eléctrico generado en la zona de electroporación tiene una magnitud de alrededor de 2 V/cm a alrededor de 50 000 V/cm, por ejemplo, alrededor de 2 V/cm a alrededor de 1000 V/cm, alrededor de 100 V/cm a alrededor de 1000 V/cm, alrededor de 100 V/cm a alrededor de 5000 V/cm, alrededor de 500 V/cm a alrededor de 10 000 V/cm, alrededor de 1000 V/cm a alrededor de 25 000 V/cm, o de alrededor de 5000 V/cm a alrededor de 50 000 V/cm, por ejemplo, de alrededor de 2 V/cm a alrededor de 20 000 V/cm, alrededor de 5 V/cm a alrededor de 10 000 V/cm, o alrededor de 100 V/cm a alrededor de 1000 V/cm, por ejemplo, de alrededor de 2 V/cm, alrededor de 3 V/cm, alrededor de 4 V/cm, alrededor de 5 V/cm, alrededor de 6 V/cm, alrededor de 7 V/cm, alrededor de 8 V/cm, alrededor de 9 V/cm, alrededor de 10 V/cm, alrededor de 20 V/cm, alrededor de 30 V/cm, alrededor de 40 V/cm, alrededor de 50 V/cm, alrededor de 60 V/cm, alrededor de 70 V/cm, alrededor de 80 V/cm, alrededor de 90 V/cm, alrededor de 100 V/cm, alrededor de 200 V/cm, alrededor de 300 V/cm, alrededor de 400 V/cm, alrededor de 500 V/cm, alrededor de 600 V/cm, alrededor de 700 V/cm, alrededor de 800 V/cm, alrededor de 900 V/cm, alrededor de 1000 V/cm, alrededor de 2000 V/cm, alrededor de 3000 V/cm, alrededor de 4000 V/cm, alrededor de 5000 V/cm, alrededor de 6000 V/cm, alrededor de 7000 V/cm, alrededor de 8000 V/cm, alrededor de 9000 V/cm, alrededor de 10 000 V/cm, alrededor de 15 000 V/cm, alrededor de 20 000 V/cm, alrededor de 25 000 V/cm, alrededor de 30 000 V/cm, alrededor de 35 000 V/cm, alrededor de 40 000 V/cm, alrededor de 45 000 V/cm o alrededor de 50 000 V/cm.

Los sistemas de la invención incluyen típicamente una fuente de suministro de fluido que está configurada para suministrar la pluralidad de células suspendidas en el fluido a través del primer electrodo, por ejemplo, la zona de entrada, al segundo electrodo, por ejemplo, la zona de recuperación. Las fuentes de suministro de fluido típicamente incluyen bombas, incluidas, de forma no taxativa, bombas de jeringa, microbombas o bombas peristálticas. Alternativamente, los fluidos se pueden administrar mediante el desplazamiento de un fluido de trabajo contra un depósito del fluido a administrar o mediante el desplazamiento de aire. Se conocen en la técnica otras fuentes de administración de fluidos. En algunos casos, la fuente de administración de fluido está configurada para hacer fluir células suspendidas en un fluido mediante la aplicación de una presión positiva. Sin desear ligarse a ninguna teoría en particular, la velocidad de flujo al que las células en suspensión fluyen a través de los dispositivos de la invención y la geometría específica de la zona

de electroporación de los dispositivos de la invención determinarán el tiempo de residencia de las células en el campo eléctrico en la zona de electroporación.

En algunos casos, la velocidad de flujo volumétrico del fluido administrado desde una fuente de

5 administración de fluido tiene una velocidad de flujo volumétrico de alrededor de 0,001 mL/min a alrededor de 1000 mL/min, por ejemplo, desde alrededor de 0,001 mL/min a alrededor de 0,1 mL/min, alrededor de 0,01 mL/min a alrededor de 1 mL/min, alrededor de 0,1 mL/min a alrededor de 10 mL/min, alrededor de 1 mL/min a unos 50 mL/min, como 10 mL/min a alrededor de 100 mL/min, alrededor de 25 mL/min a alrededor de 200 mL/min, alrededor de 50 mL/min a alrededor de 400 mL/min, sobre 100 mL/min a alrededor de 600 mL/min, alrededor de 300 mL/min a  
10 alrededor de 800 mL/min, o alrededor de 500 mL/min a alrededor de 1000 mL/min, por ejemplo, alrededor de 0,001 mL/min, alrededor de 0,002 mL/min, alrededor de 0,003 mL/min, alrededor de 0,004 mL/min, alrededor de 0,005 mL/min, alrededor de 0,006 mL/min, alrededor de 0,007 mL/min, alrededor de 0,008 mL/min, alrededor de 0,009 mL/min, alrededor de 0,01 mL/min, alrededor de 0,02 mL/min, alrededor de 0,03 mL/min, alrededor de 0,04 mL/min, alrededor de 0,05 mL/min,  
15 alrededor de 0,06 mL/min, alrededor de 0,07 mL/min, alrededor de 0,08 mL/min, alrededor de 0,09 mL/min, alrededor de 0,1 mL/min, alrededor de 0,2 mL/min, alrededor de 0,3 mL/min, alrededor de 0,4 mL/min, alrededor de 0,5 mL/min, alrededor de 0,6 mL/min, alrededor de 0,7 mL/min, alrededor de 0,8 mL/min, alrededor de 0,9 mL/min, alrededor de 1 mL/min, sobre 2 mL/min, alrededor de 3 mL/min, alrededor de 4 mL/min, como 5 mL/min, alrededor de 6 mL/min, alrededor de 7 mL/min,  
20 alrededor de 8 mL/min, alrededor de 9 mL/min, alrededor de 10 mL/min, alrededor de 15 mL/min, alrededor de 20 mL/min, alrededor de 25 mL/min, alrededor de 30 mL/min, alrededor de 35 mL/min, alrededor de 40 mL/min, alrededor de 45 mL/min, alrededor de 50 mL/min, alrededor de 55 mL/min, alrededor de 60 mL/min, alrededor de 65 mL/min, alrededor de 70 mL/min, alrededor de 75 mL/min, alrededor de 80 mL/min, alrededor de 85 mL/min, alrededor de 90 mL/min,  
25 alrededor de 95 mL/min, alrededor de 100 mL/min, alrededor de 150 mL/min, alrededor de 200 mL/min, alrededor de 250 mL/min, alrededor de 300 mL/min, alrededor de 350 mL/min, alrededor de 400 mL/min, alrededor de 450 mL/min, alrededor de 500 mL/min, alrededor de 550 mL/min, alrededor de 600 mL/min, alrededor de 650 mL/min, alrededor de 700 mL/min, alrededor de 750 mL/min, alrededor de 800 mL/min, alrededor de 850 mL/min, alrededor de 900 mL/min, alrededor de 950 mL/min, o alrededor de 1000 mL/min. En modalidades particulares, la velocidad de flujo es de 10 mL/min a alrededor de 100 mL/min, por ejemplo, alrededor de 10 mL/min, 20 mL/min, 30 mL/min, 40 mL/min, 50 mL/min, 60 mL/min, 70 mL/min, 80 mL/min, 90 mL/min, o 100 mL/min.

En algunos casos, 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  
35 electroporación es de entre 0,04 y  $2,43 \times 10^4$ , donde la fuente de administración de fluido está configurado para administrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del

primer lumen hasta la segunda salida. En algunos casos, 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  $5 \times 10^{-5}$  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 células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida. En algunos casos, las velocidades de corte 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 1/s y  $2 \times 10^6$  1/s, donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen hacia la segunda salida. En algunos casos, 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  $1 \times 10^{-3}$  Pa and  $9,5 \times 10^4$  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. En algunas modalidades, 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 and 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. En algunos casos, 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 se encuentra entre  $1 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s y  $15 \times 10^{-4}$  m<sup>2</sup>/s, donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen a la segunda salida.

El tiempo de residencia de las células en la zona de electroporación de los dispositivos de la invención puede ser de alrededor de 0,5 ms a alrededor de 50 ms, por ejemplo, de alrededor de 0,5 ms a alrededor de 5 ms, de alrededor de 1 ms a alrededor de 10 ms, de alrededor de 5 ms a alrededor de 15 ms, alrededor de 10 ms a alrededor de 20 ms, alrededor de 15 ms a alrededor de 25 ms, alrededor de 20 ms a alrededor de 30 ms, alrededor de 25 ms a alrededor de 35 ms, alrededor de 30 ms a alrededor de 40 ms, alrededor de 35 ms a alrededor de 45 ms, o alrededor de 40 ms a alrededor de 50 ms, por ejemplo, alrededor de 0,5 ms, alrededor de 0,6 ms, alrededor de 0,7 ms, alrededor de 0,8 ms, alrededor de 0,9 ms, alrededor de 1 ms, alrededor de 1,5 ms, alrededor de 2 ms, alrededor de 2,5 ms, alrededor de 3 ms, alrededor de 3,5 ms, alrededor de 4 ms, alrededor de 4,5 ms, alrededor de 5 ms, alrededor de 5,5 ms, alrededor de 6 ms, alrededor de 6,5 ms, alrededor de 7 ms, alrededor de 7,5 ms, alrededor de 8 ms, alrededor de 8,5 ms, alrededor de 9 ms, alrededor de 9,5 ms, alrededor de 10 ms, alrededor de 10,5 ms, alrededor de 11 ms, alrededor de 11,5 ms, alrededor de 12 ms, alrededor de 12,5 ms, alrededor de 13 ms, alrededor de

13,5 ms, alrededor de 14 ms, alrededor de 14,5 ms, alrededor de 15 ms, alrededor de 20 ms, alrededor de 25 ms, alrededor de 30 ms, alrededor de 35 ms, alrededor de 40 ms, alrededor de 45 ms o alrededor de 50 ms. En algunas modalidades, el tiempo de residencia es de 5-20 ms (por ejemplo, de 6-18 ms, 8-15 ms o 5-14 ms).

- 5 Los sistemas de la invención presentan típicamente un alojamiento que contiene y soporta el dispositivo o dispositivos de la invención y cualquier conexión eléctrica necesaria, por ejemplo, conexiones de electrodos. El alojamiento puede configurarse para sostener y energizar un solo dispositivo de la invención, o alternatively, puede configurarse para sostener y energizar simultáneamente una pluralidad de dispositivos de la invención. Por ejemplo, en la modalidad de
- 10 un sistema de la invención mostrado en las Figuras 2A-2B, el alojamiento está configurado como una repisa que puede aceptar y energizar simultáneamente 96 dispositivos individuales de la invención que operan en paralelo. El alojamiento puede incluir un controlador térmico que es capaz de regular la temperatura de los dispositivos de la invención o regular térmicamente un componente del sistema, por ejemplo, un fluido, por ejemplo, un amortiguador o suspensión que
- 15 contiene células, durante la electroporación. El controlador térmico puede configurarse para calentar los dispositivos de la invención, o un componente de un sistema de este, enfriar los dispositivos de la invención o un componente de un sistema de este, o realizar ambas operaciones. Cuando se configuran para calentar los dispositivos de la invención, o un componente de un sistema de este, los controladores térmicos adecuados incluyen, de forma no
- 20 taxativa, bloques o mantos calefactores, calentamiento de líquidos, por ejemplo, baños de fluidos de inmersión o circulantes, calentadores operados por baterías o calentadores resistivos, por ejemplo, calentadores de película delgada, por ejemplo, cinta térmica. Cuando se configuran para enfriar los dispositivos de la invención, o un componente de un sistema de este, los controladores térmicos adecuados incluyen, de forma no taxativa, refrigeración líquida, por ejemplo, baños de
- 25 fluidos de inmersión o circulantes, refrigeradores evaporativos o termoelectrónicos, por ejemplo, refrigeradores Peltier. Por ejemplo, cuando se implementa con refrigeración líquida, un dispositivo de la invención o un alojamiento configurado para contener dispositivos de la invención puede estar en contacto directo con una tubería que hace circular un fluido enfriado o rodeada de una camisa de refrigeración que incluye una tubería que hace circular un fluido enfriado. Se conocen
- 30 en la técnica otros elementos de calentamiento y enfriamiento.

En algunas modalidades, el alojamiento (por ejemplo, un cartucho) está configurada para su uso con y/o la inserción en un sistema cerrado automatizado que se utiliza para administrar terapias celulares a pacientes en un entorno clínico u hospitalario.

- En algunas modalidades, el alojamiento (por ejemplo, cartucho) incluye además un área/espacio
- 35 de enfriamiento/calentamiento para el almacenamiento de la suspensión celular y/o amortiguador durante, antes y luego de la electroporación del espécimen. En algunas modalidades, el sistema

(por ejemplo, dispositivo y alojamiento) se alimenta externamente.

En algunas modalidades, los dispositivos de la invención incluyen una interfaz de usuario en una pantalla táctil u otra interfaz de usuario alternativa que permite al usuario seleccionar parámetros tales como velocidad de flujo, formas de onda, potencial aplicado, volumen a transfectar, retardo

5 de tiempo, características de enfriamiento, características de calentamiento, estado de electroporación o transfección, progreso y otros parámetros utilizados para optimizar el protocolo de transfección. En algunas modalidades, la interfaz de usuario también contiene selecciones de parámetros formuladas previamente que le permiten al usuario operar el sistema en condiciones estándar que han sido previamente validadas por el usuario o recomendadas por los fabricantes.

10 En algunas modalidades, la interfaz de usuario puede estar conectada a la programación que permite el funcionamiento automatizado del sistema y/o ejecutar un algoritmo para optimizar la transfección para una muestra determinada de un tipo de célula conocido. En algunas modalidades, los algoritmos de optimización tienen la capacidad de ajustar los parámetros electromecánicos de forma independiente o autónoma si el usuario selecciona esta funcionalidad.

15 En algunas modalidades, los algoritmos de optimización permiten el ajuste continuo de los parámetros utilizados en el proceso de electroporación o electromecánico que pueden depender del tipo de célula, la conductividad de las suspensiones de células, el volumen de las suspensiones de células, la viscosidad, la vida útil del o los cartuchos de electroporación, el estado físico, el estado de la suspensión o el estado del o los dispositivos de transfección.

20 En algunas modalidades, los algoritmos de optimización tienen la capacidad de realizar análisis predictivos en función de los parámetros del tipo de célula de entrada conocidos y de ajustar los parámetros de electromecánica en consecuencia. En algunas modalidades, los algoritmos de optimización ajustan los parámetros de electromecánicos en función de las señales eléctricas dentro de cualquiera de los dispositivos de la invención. En algunas modalidades, los algoritmos

25 de optimización ajustan los parámetros de transfección en función de los parámetros de flujo detectados dentro de cualquiera de los dispositivos de la invención. En algunas modalidades, los algoritmos de optimización ajustan los parámetros de electroporación en función de los parámetros de entrada adimensionales únicos. En algunas modalidades, los algoritmos de optimización tienen la capacidad de ajustar los parámetros de electroporación en función de las combinaciones únicas

30 multivariadas de parámetros que predicen resultados de alta viabilidad, resultados de alta eficiencia o resultados de viabilidad y eficiencia equiparados.

Los sistemas de la invención pueden incluir una o más estructuras externas que están configuradas para cubrir los electrodos de uno o más dispositivos de la invención, por ejemplo, para reducir la exposición del usuario final a conexiones eléctricas activas. Normalmente, un

35 dispositivo de la invención (por ejemplo, un dispositivo FLOWFECT™) incluirá una estructura exterior que cubre sus electrodos y la zona de electroporación. La estructura exterior puede ser un

material no conductor, por ejemplo, un polímero no conductor, que incluye características estructurales para acoplar electromecánicamente las partes del dispositivo, por ejemplo, los electrodos o la zona de electroporación. La estructura exterior puede incluir uno o más huecos, recortes o aberturas similares dentro de la estructura para acomodar el dispositivo. La estructura exterior puede configurarse para ser un componente que se puede quitar del dispositivo. Por ejemplo, la estructura exterior puede incluir dos componentes separados conectados por una bisagra, por ejemplo, una bisagra viva, de modo que pueda plegarse sobre el dispositivo de la invención. Alternativamente, la estructura exterior puede ser una o más piezas separadas que se pueden conectar entre sí mediante el uso de características de acoplamiento adecuadas para formar una única estructura. En estas modalidades, la estructura exterior puede fijarse al dispositivo de la invención mediante el uso de cualquier sujetador adecuado, por ejemplo, broches, pestillos, botones o clips, que pueden estar integrados en la estructura exterior o conectados externamente a la estructura exterior. Se conocen en la técnica otros tipos de sujetadores adecuados. En algunas modalidades, la estructura exterior incluye una o más características de alineación, por ejemplo, pasadores, divots, ranuras o lengüetas, que aseguran la alineación correcta de una o más piezas de la estructura exterior. En algunos casos, la estructura exterior está configurada para estar conectada permanentemente a los dispositivos de la invención.

En algunas modalidades, el alojamiento (por ejemplo, un cartucho, por ejemplo, una estructura externa) encapsula una o más de las invenciones anteriormente indicadas o uno o más dispositivos de electroporación utilizados para la electroporación de flujo continuo. En algunas modalidades, el alojamiento (por ejemplo, un cartucho) está configurado para permitir su uso con y/o la inserción en un sistema cerrado automatizado que administra terapias celulares a los pacientes. En algunas modalidades, el alojamiento incluye además un área/espacio de enfriamiento/calentamiento para el almacenamiento de la suspensión celular y/o amortiguador durante, antes y luego de la electroporación del espécimen. En algunas modalidades, el sistema (por ejemplo, uno o más dispositivos y alojamiento) se alimenta externamente.

En algunas modalidades, el sistema también incluye algoritmos de optimización tienen la capacidad de ajustar los parámetros electromecánicos de forma independiente o autónoma si el usuario selecciona esta funcionalidad. Estos algoritmos de optimización permiten un ajuste continuo de los parámetros utilizados en el proceso de electroporación que puede depender del tipo de célula, conductividad, volumen de suspensiones, viscosidad, vida útil del catucho de electroporación, el estado físico de la suspensión o el estado del dispositivo de electroporación.

En cualquiera de las modalidades de la estructura exterior descritas en este documento, la estructura exterior proporciona una conexión eléctrica entre una fuente externa de potencial eléctrico y los electrodos de los dispositivos de la invención. Por ejemplo, la estructura exterior puede incluir una o más entradas eléctricas para conexiones eléctricas, por ejemplo, palas,

conectores tipo banana o bayoneta, por ejemplo, conectores BNC, que facilitan la conexión eléctrica entre la fuente de potencial eléctrico y los electrodos de los dispositivos de la invención dentro de la estructura exterior.

Los dispositivos y estructuras externas de la invención pueden combinarse con componentes externos adicionales, tales como reactivos, por ejemplo, amortiguadores, por ejemplo, amortiguadores de transfección o recuperación, y/o muestras, en un kit. En algunos casos, un amortiguador de transfección incluye una composición apropiada para la electroporación celular. En algunos casos, el amortiguador de transfección incluye una concentración adecuada de una o más sales (por ejemplo, cloruro de potasio, cloruro de sodio, fosfato de potasio, dihidrogenofosfato de potasio) o azúcares (por ejemplo, dextrosa o mioinositol), o cualquier combinación de estos, en una concentración de 0,1 a 200 mM (por ejemplo, de 0,1 a 1,0 mM, de 1,0 mM a 10 mM, o de 10 mM a 100 mM).

#### *Amortiguadores y medios*

Los dispositivos y sistemas de la invención se pueden usar con amortiguador de transfección o con medio de crecimiento de cultivo celular que contiene aditivos para apoyar la transfección. Se pueden agregar ciertos aditivos para controlar la conductividad del amortiguador de transfección y/o medio de crecimiento de cultivo celular utilizado, que incluye KCl, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, glucosa, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, manitol, succinato, dextrosa, ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico (HEPES), trehalosa, CaCl<sub>2</sub>, dimetilsulfóxido (DMSO), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ácido etilenbis (oxietilenitrilo) tetraacético (EGTA), KOH, NaOH, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, amortiguador de histidina, amortiguador de citrato, fosfato salina amortiguada (PBS), sal disódica de ATP y NaHCO<sub>3</sub>. Se pueden agregar ciertos aditivos para controlar la viscosidad del amortiguador de transfección y/o medio de crecimiento de cultivo celular utilizado, que incluye Ficoll, dextrano, polietilenglicol (PEG), metilcelulosa (MethoCel), colágeno I y Matrigel.

#### *Métodos*

La invención presenta métodos para introducir una composición, por ejemplo, transfección, en al menos una parte de una pluralidad de células suspendidas en un fluido, mediante el uso de los dispositivos de electroporación descritos en este documento. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para aumentar en gran medida el rendimiento de la administración de composiciones en tipos de células, a menudo considerados como un cuello de botella en los campos de investigación de la ingeniería genética y los campos terapéuticos de las terapias celulares modificadas por genes. En particular, los métodos descritos en este documento han aumentado significativamente el número de células recuperadas, la eficacia de transfección y la viabilidad celular después de la transfección con aplicaciones a más tipos de células que los métodos típicos de transfección, por ejemplo, transfección lentiviral, o instrumentos de transfección de células disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema de transfección NEON® (Thermo

Fisher, Carlsbad, CA) o el 4D-NUCLEOFECTOR (Lonza, Suiza).

Se introduce una composición en al menos una parte de una pluralidad de células suspendidas en un fluido pasando el fluido con las células suspendidas, que también contiene la composición que se va a introducir en las células, a través de un dispositivo de la invención, por ejemplo, un dispositivo de electroporación, como se describe en este documento. La composición y las células suspendidas en el fluido se pueden administrar a través del dispositivo de la invención mediante la aplicación de una presión positiva, por ejemplo, desde una bomba conectada a una fuente de fluido, por ejemplo, una bomba peristáltica, una pipeta digital o una fuente de manipulación de líquido automática. La composición y las células suspendidas en el fluido pasan desde el primer electrodo, por ejemplo, inclusive una zona de entrada, a una zona de electroporación conectada flúidicamente al primer electrodo, y luego a la zona de recuperación, que está conectada fluidamente a la zona de electroporación. A medida que la composición y las células suspendidas en el fluido fluyen a través del primer electrodo hacia la zona de electroporación, se aplica una diferencia de potencial al primer y segundo electrodos, produciendo y exponiendo así las células a un campo eléctrico en la zona de electroporación. La exposición de las células al campo eléctrico generado mejora la permeabilidad temporal de la pluralidad de células, introduciendo así la composición en al menos una parte de la pluralidad de células.

En algunos casos de los métodos, el fenotipo de las células puede o no estar alterado con respecto a una medición inicial del fenotipo celular al salir de la zona de electroporación de los dispositivos de la invención. En algunos casos, el fenotipo de las células se altera de 0 % a alrededor de 25 % en relación con una medición de referencia del fenotipo celular al salir de la zona de electroporación de los dispositivos de la invención, por ejemplo, de alrededor de 0 % a alrededor de 2,5 %, de alrededor de 1 % a alrededor de 5 %, de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %, de alrededor de 5 % a alrededor de 15 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 20 %, de alrededor de el 15 % a alrededor de 25 %, o de alrededor de 20 % a alrededor de 25 %, por ejemplo, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 13 %, alrededor de 14 %, alrededor de 15 %, alrededor de 16 %, alrededor de 17 %, alrededor de 18 %, alrededor de 19 %, alrededor de 20 %, alrededor de 21 %, alrededor de 22 %, alrededor de 23 %, alrededor de 24 % o alrededor de 25 %. En casos particulares, la pluralidad de células no presenta ningún cambio fenotípico al salir de la zona de electroporación. Por ejemplo, una medida de referencia o de control para establecer el fenotipo celular puede ser la medida de la expresión de un marcador de superficie celular en células que no han sido transfectadas usando dispositivos de la invención. Puede usarse una medición idéntica correspondiente de la expresión de este marcador celular en células que han sido transfectadas mediante el uso de dispositivos de la invención para evaluar cambios en el fenotipo celular. El

fenotipo celular se evalúa mediante análisis de citometría de flujo de la expresión del marcador de superficie celular para asegurar que el fenotipo celular cambia mínimamente o no cambia después de la electroporación. Los ejemplos de marcadores de superficie celular para evaluar incluyen, de forma no taxativa, CD3, CD4, CD8, CD19, CD45RA, CD45RO, CD28, CD44, CD69, CD80, CD86, CD206, receptor de IL-2, CTLA4, OX40, PD-1 y TIM3. La morfología celular se evalúa mediante el uso de microscopía de campo brillante o fluorescente para confirmar la ausencia de cambios fenotípicos después de la electroporación.

En algunos casos, después de la introducción de la composición en al menos una parte de la pluralidad de células, la pluralidad de células se almacena en un amortiguador de recuperación. El amortiguador de recuperación está configurado para promover el cierre final de los poros que se formaron en la pluralidad de células. Los amortiguador de recuperación normalmente incluyen medios de cultivo celular que pueden incluir otros ingredientes para la nutrición y el crecimiento celular, por ejemplo, suero, minerales, etc. Un experto en la materia puede apreciar que la elección del amortiguador de recuperación dependerá del tipo de célula sometida a electroporación.

En algunas modalidades del método descrito en el presente documento, el volumen de fluido con las células suspendidas (por ejemplo, volumen de desplazamiento) y la composición que se introducirá en las células que fluyen a través de la zona de electroporación de los dispositivos de la invención puede ser de alrededor de 0,001 mL a alrededor de 2000 mL, alrededor de 0,001 mL a alrededor de 1000 mL, por ejemplo, 0,001 mL a alrededor de 1000 mL, por ejemplo, de alrededor de 0,001 mL a alrededor de 0,1 mL, alrededor de 0,01 mL a alrededor de 1 mL, alrededor de 0,01 mL a alrededor de 750 mL, alrededor de 0,01 mL a alrededor de 1500 mL, alrededor de 0,1 mL a alrededor de 5 mL, alrededor de 0,1 mL a 500 mL, alrededor de 0,1 mL a alrededor de 2000 mL, alrededor de 1 mL a alrededor de 10 mL, alrededor de 1 mL a alrededor de 1000 mL, alrededor de 2 mL a alrededor de 2000 mL, alrededor de 2,5 mL a alrededor de 20 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 40 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 60 mL, alrededor de 10 mL a 1000 mL, alrededor de 20 mL a alrededor de 2000 mL, alrededor de 30 mL a alrededor de 80 mL, alrededor de 50 mL a alrededor de 200 mL, alrededor de 100 mL a alrededor de 500 mL, o 250 mL a alrededor de 750 mL, alrededor de 500 mL a alrededor de 1000 mL, alrededor de 500 mL a 2000 mL, alrededor de 750 mL a 1500 mL o alrededor de 1000 mL a 2000 mL, por ejemplo, alrededor de 0,01 mL a 100 mL, alrededor de 0,1 mL a alrededor de 99 mL, alrededor de 1 mL a alrededor de 97 mL o alrededor de 10 mL a alrededor de 95 mL, por ejemplo, alrededor de 0,0025 mL a alrededor de 10 mL, alrededor de 0,01 mL a alrededor de 1 mL, o alrededor de 0,025 mL a alrededor de 0,1 mL, por ejemplo, alrededor de 0,001 mL, alrededor de 0,0025 mL, alrededor de 0,005 mL, alrededor de 0,0075 mL, alrededor de 0,01 mL, alrededor de 0,025 mL, alrededor de 0,05 mL, alrededor de 0,075 mL, alrededor de 0,1 mL, alrededor de 0,25 mL, alrededor de 0,5 mL, alrededor de 0,75 mL, alrededor de 1 mL, alrededor de 2 mL, alrededor de 3 mL, alrededor de 4

mL, alrededor de 5 mL, alrededor de 6 mL, alrededor de 7 mL, alrededor de 8 mL, alrededor de 9 mL, alrededor de 10 mL, alrededor de 15 mL, alrededor de 20 mL, alrededor de 25 mL, alrededor de 30 mL, alrededor de 35 mL, alrededor de 40 mL, alrededor de 45 mL, alrededor de 50 mL, alrededor de 55 mL, alrededor de 60 mL, alrededor de 65 mL, alrededor de 70 mL, alrededor de 75 mL, alrededor de 80 mL, alrededor de 85 mL, alrededor de 90 mL, alrededor de 95 mL, alrededor de 100 mL, alrededor de 150 mL, alrededor de 200 mL, alrededor de 250 mL, alrededor de 300 mL, alrededor de 350 mL, alrededor de 400 mL, alrededor de 450 mL, alrededor de 500 mL, alrededor de 550 mL, alrededor de 600 mL, alrededor de 650 mL, alrededor de 700 mL, alrededor de 750 mL, alrededor de 800 mL, alrededor de 850 mL, alrededor de 900 mL, alrededor de 950 mL, alrededor de 1000 mL, alrededor de 1050 mL, alrededor de 1100 mL, alrededor de 1150 mL, alrededor de 1200 mL, alrededor de 1250 mL, alrededor de 1300 mL, alrededor de 1350 mL, alrededor de 1400 mL, alrededor de 1450 mL, alrededor de 1500 mL, alrededor de 1550 mL, alrededor de 1600 mL, alrededor de 1650 mL, alrededor de 1700 mL, alrededor de 1750 mL, alrededor de 1800 mL, alrededor de 1850 mL, alrededor de 1900 mL, alrededor de 1950 mL o alrededor de 2000 mL.

En algunas modalidades, el volumen de fluido que fluye a través de la zona de electroporación de los dispositivos de la invención (por ejemplo, el volumen de desplazamiento), la velocidad de desplazamiento u otros parámetros controlados pueden afectar o no la eficacia de transfección de una pluralidad de células. En algunas modalidades, los dispositivos de la invención están configurados para su uso con una plataforma automatizada de manipulación de fluidos que puede procesar una pluralidad de células en volúmenes inferiores a 100  $\mu$ L que pueden acumularse hasta volúmenes que oscilan entre más de 100  $\mu$ L y alrededor de 2000 mL. En algunas modalidades, la plataforma automatizada de manejo de fluidos está configurada para su uso con una o más fuentes de suministro de fluido (por ejemplo, bombas, por ejemplo, bombas de jeringa, microbombas o bombas peristálticas) que entregan el volumen de fluido que fluye a través de la zona de electroporación de los dispositivos de la invención. En algunas modalidades, el volumen de fluido que fluye a través de la zona de electroporación de los dispositivos de la invención puede suministrarse mediante el desplazamiento de un fluido de trabajo contra un depósito del fluido a administrar o mediante el desplazamiento de aire. En algunas modalidades, la fuente de administración de fluido está configurada para hacer fluir células suspendidas en un fluido mediante la aplicación de una presión positiva.

En determinados aspectos, la conductividad eléctrica del fluido en el que están suspendidas las células puede afectar a la electroporación y, por tanto, a la administración de una composición a las células de la suspensión. La conductividad del fluido con las células suspendidas puede ser de alrededor de 0,001 mS a alrededor de 500 mS, por ejemplo, de alrededor de 0,001 mS a alrededor de 0,1 mS, alrededor de 0,01 mS a alrededor de 1 mS, alrededor de 0,1 mS a alrededor de 10 mS,

- alrededor de 1 mS a alrededor de 50 mS, alrededor de 10 mS a alrededor de 100 mS, alrededor de 25 mS a alrededor de 200 mS, alrededor de 50 mS a alrededor de 400 mS o alrededor de 100 mS a alrededor de 500 mS, por ejemplo, alrededor de 0,01 mS a alrededor de 100 mS, alrededor de 0,1 mS a alrededor de 50 mS o alrededor de 1 a 20 mS, por ejemplo, alrededor de 0,001 mS,
- 5 alrededor de 0,002 mS, alrededor de 0,003 mS, alrededor de 0,004 mS, alrededor de 0,005 mS, alrededor de 0,006 mS, alrededor de 0,007 mS, alrededor de 0,008 mS, alrededor de 0,009 mS, alrededor de 0,01 mS, alrededor de 0,02 mS, alrededor de 0,03 mS, alrededor de 0,04 mS, alrededor de 0,05 mS, alrededor de 0,06 mS, alrededor de 0,07 mS, alrededor de 0,08 mS, alrededor de 0,09 mS, alrededor de 0,1 mS, alrededor de 0,2 mS, alrededor de 0,3 mS, alrededor
- 10 de 0,4 mS, alrededor de 0,5 mS, alrededor de 0,6 mS, alrededor de 0,7 mS, alrededor de 0,8 mS, alrededor de 0,9 mS, alrededor de 1 mS, alrededor de 2 mS, alrededor de 3 mS, alrededor de 4 mS, alrededor de 5 mS, alrededor de 6 mS, alrededor de 7 mS, alrededor de 8 mS, alrededor de 9 mS, alrededor de 10 mS, alrededor de 15 mS, alrededor de 20 mS, alrededor de 25 mS, alrededor de 30 mS, alrededor de 35 mS, alrededor de 40 mS, alrededor de 45 mS, alrededor de 50 mS,
- 15 alrededor de 55 mS, alrededor de 60 mS, alrededor de 65 mS, alrededor de 70 mS, alrededor de 75 mS, alrededor de 80 mS, alrededor de 85 mS, alrededor de 90 mS, alrededor de 95 mS, alrededor de 100 mS, alrededor de 150 mS, alrededor de 200 mS, alrededor de 250 mS, alrededor de 300 mS, alrededor de 350 mS, alrededor de 400 mS, alrededor de 450 mS o alrededor de 500 mS.
- 20 Los métodos de la invención pueden administrar composiciones a una variedad de tipos de células que incluyen, de forma no taxativa, células de mamíferos, eucariotas, procariotas, células sintéticas, células humanas, células animales, células vegetales, células primarias, líneas celulares, células en suspensión, células adherentes, células no estimuladas, células estimuladas o células activadas células inmunes, células madre (por ejemplo, células madre pluripotentes
- 25 inducidas por humanos primarios, por ejemplo, iPSC, células madre embrionarias, por ejemplo, ESC, células madre mesenquimales, por ejemplo, MSC o células madre hematopoyéticas, por ejemplo, HSC), células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos rojos), linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanas primarias), linfocitos B, células presentadoras de antígenos (APC), células citolíticas (NK) (por ejemplo, células NK humanas primarias), monocitos (por ejemplo, monocitos
- 30 humanos primarios), macrófagos (por ejemplo, macrófagos humanos primarios) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC), neutrófilos, células dendríticas, células de riñón embrionario humano (por ejemplo, HEK-293) o células de ovario de hámster chino (por ejemplo, células CHO-K1). El número de células típicas que pueden ser a electroporación puede ser de
- 35 alrededor de  $10^4$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, (por ejemplo, alrededor de  $10^4$  células a alrededor de  $10^5$  células, alrededor de  $10^4$  células a alrededor de  $10^6$  células, alrededor del  $10^4$  células para alrededor de  $10^7$  células, alrededor de  $5 \times 10^4$  células a alrededor de  $5 \times 10^5$  células,

- alrededor de  $10^5$  células a alrededor de  $10^6$  células, alrededor de  $10^5$  células a alrededor de  $10^7$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^5$  células a alrededor de  $10^6$  células, alrededor de  $5 \times 10^5$  células a alrededor de  $5 \times 10^6$  células, alrededor de  $10^6$  células a alrededor de  $10^7$  células, alrededor de  $10^6$  células a alrededor de  $10^8$  células, alrededor de  $10^6$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, alrededor de  $5 \times 10^6$  células a alrededor de  $5 \times 10^7$  células, alrededor de  $10^7$  células a alrededor de  $10^8$  células, alrededor de  $10^7$  células a alrededor de  $10^9$  células, alrededor de  $10^7$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, alrededor de  $5 \times 10^7$  células a alrededor de  $5 \times 10^8$  células, alrededor de  $10^8$  células a alrededor de  $10^9$  células, alrededor de  $10^8$  células a alrededor de  $10^{10}$  células, alrededor de  $10^8$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, alrededor de  $5 \times 10^8$  células a alrededor de  $5 \times 10^9$  células, alrededor de  $10^9$  células a alrededor de  $10^{10}$  células, alrededor de  $10^9$  células a alrededor de  $10^{11}$  células, alrededor de  $10^{10}$  células a alrededor de  $10^{11}$  células, alrededor de  $10^{10}$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, o alrededor de  $10^{11}$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, por ejemplo, alrededor de  $10^4$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^4$  células, alrededor de  $5 \times 10^4$  células, alrededor de  $10^5$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^5$  células, alrededor de  $5 \times 10^5$  células, alrededor de  $10^6$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^6$  células, alrededor de  $5 \times 10^6$  células, alrededor de  $10^7$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^7$  células, alrededor de  $5 \times 10^7$  células, alrededor de  $10^8$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^8$  células, alrededor de  $5 \times 10^8$  células, alrededor de  $10^9$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^9$  células, alrededor de  $5 \times 10^9$  células, alrededor de  $10^{10}$  células, alrededor de  $5 \times 10^{10}$  células, alrededor de  $10^{11}$  células o alrededor de  $10^{12}$  células).
- Las concentraciones de células, es decir, número de células por mL de fluido, para obtener los números de poración celular de alrededor de  $10^4$  células a alrededor de  $10^{12}$  células oscila típicamente de alrededor de  $10^3$  células/mL a alrededor de  $10^{11}$  células/mL, por ejemplo, alrededor de  $10^3$  células/mL a células  $10^4$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^3$  células/mL a alrededor de  $5 \times 10^4$  células/mL, alrededor de  $10^5$  células/mL a alrededor de  $10^5$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^5$  células/mL a alrededor de  $5 \times 10^6$  células/mL, alrededor de  $10^6$  células/mL a alrededor de  $10^7$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^6$  células/mL a alrededor de  $5 \times 10^7$  células/mL, alrededor de  $10^7$  células/mL a alrededor de  $10^8$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^7$  células/mL a alrededor de  $5 \times 10^8$  células/mL, alrededor de  $10^8$  células/mL a alrededor de  $10^9$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^8$  células/mL a alrededor de  $5 \times 10^9$  células/mL, alrededor de  $10^9$  células/mL a alrededor de  $10^9$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^9$  células/mL a alrededor de  $5 \times 10^{10}$  células/mL, o alrededor de  $10^{10}$  células/mL a alrededor de  $10^{11}$  células/mL, por ejemplo, alrededor de  $10^3$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^3$  células/mL, alrededor de  $10^4$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^4$  células/mL, alrededor de  $10^5$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^5$  células/mL, alrededor de  $10^6$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^6$  células/mL, alrededor de  $10^7$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^7$  células/mL, alrededor de  $10^8$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^8$  células/mL, alrededor de  $10^9$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^9$  células/mL, alrededor de  $10^{10}$  células/mL, alrededor de  $5 \times 10^{10}$  células/mL, o alrededor de  $10^{11}$  células/mL.

células/mL.

Los métodos de la invención descritos en el presente documento pueden administrar cualquier composición a las células suspendidas en el fluido. Las composiciones que pueden administrarse a las células incluyen, de forma no taxativa a, agentes terapéuticos, vitaminas, nanopartículas, moléculas cargadas, por ejemplo, iones en solución, moléculas no cargadas, ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN, complejo CRISPR-Cas, proteína, polímeros, una ribonucleoproteína (RNP), nucleasas modificadas genéticamente, nucleasas del efector similar al activador de transcripción (TALEN), nucleasas de dedos de cinc (ZFN), nucleasas autoguiadas, meganucleasas (MN), megaTAL, enzimas, péptidos, transposones o polisacáridos, por ejemplo, dextrano, por ejemplo, sulfato de dextrano. Las composiciones de ejemplo que se pueden administrar a las células en una suspensión incluyen ácidos nucleicos, anticuerpos (o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento biespecífico, un fragmento inespecífico, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, o un fragmento variable monocatenario (scFv)), aminoácidos, péptidos, proteínas, terapias génicas, terapias de ingeniería del genoma, terapias de ingeniería de epigenomas, carbohidratos, fármacos químicos, agentes de contraste, partículas magnéticas, perlas de polímero, nanopartículas de metal, micropartículas de metal, puntos cuánticos, antioxidantes, agentes antibióticos, hormonas, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas, lipoproteínas, esteroides, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos, agentes quimioterapéuticos, exosomas, vesículas de la membrana externa, vacunas, virus, bacteriófagos, adyuvantes, vitaminas, minerales y combinaciones de estos. Una composición a administrar puede incluir un solo compuesto, tales como los compuestos descritos en el presente documento. Alternativamente, la composición a administrar puede incluir una pluralidad de compuestos o componentes dirigidos a diferentes genes.

Las concentraciones típicas de la composición en el fluido pueden encontrarse de alrededor de 0,0001 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL (por ejemplo, de alrededor de 0,0001 µg/mL a alrededor de 0,001 µg/mL, alrededor de 0,001 µg/mL a alrededor de 0,01 µg/mL, alrededor de 0,001 µg/mL a alrededor de 5 µg/mL, alrededor de 0,005 µg/mL a alrededor de 0,1 µg/mL, alrededor de 0,01 µg/mL a alrededor de 0,1 µg/mL, alrededor de 0,01 µg/mL a alrededor de 1 µg/mL, alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 1 µg/mL, alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 5 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 10 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL a unos 50 µg/mL, alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL, alrededor de 2,5 µg/mL a alrededor de 15 µg/mL, alrededor de 5 µg/mL a alrededor de 25 µg/mL, alrededor de 5 µg/mL a alrededor de 50 µg/mL, alrededor de 5 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 7,5 µg/mL a alrededor de 75 µg/mL, alrededor de 10 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL, alrededor de 10 µg/mL a alrededor de 1000 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL a alrededor de 50 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL a alrededor de 250 µg/mL, alrededor de 25 µg/mL a alrededor de 500 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 100 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 250 µg/mL, alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 750 µg/mL, sobre 100

5  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 300  $\mu\text{g/mL}$ , sobre 100  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 200  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 400  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 250  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 500  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 350  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 500  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 400  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 500  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 750  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 650  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , o alrededor de 800  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , por ejemplo, alrededor de 0,0001  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,0005  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,001  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,005  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,02  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,03  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,04  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,06  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,07  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,08  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,09  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,2  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,3  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,4  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,6  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,7  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,8  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 0,9  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 1  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , sobre 2  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 3  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 3,5  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 4  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 4,5  $\mu\text{g/mL}$ , como 5  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 5,5  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 6  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 6,5  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 7  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 7,5  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 8  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 8,5  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 9  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 9,5  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 10  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 15  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 20  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 25  $\mu\text{g/mL}$ , al rededor de 30  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 35  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 40  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 45  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 50  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 55  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 60  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 65  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 70  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 75  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 80  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 85  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 90  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 95  $\mu\text{g/mL}$ , sobre 100  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 200  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 250  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 300  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 350  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 400  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 450  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 500  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 550  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 600  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 650  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 700  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 750  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 800  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 850  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 900  $\mu\text{g/mL}$ , alrededor de 950  $\mu\text{g/mL}$ , o alrededor de 1000  $\mu\text{g/mL}$ ).

En algunos casos, la temperatura del fluido con las células suspendidas y la composición se controla mediante un controlador térmico que se incorpora a un alojamiento que soporta el dispositivo o dispositivos de la invención. La temperatura del fluido se controla para reducir los efectos del calentamiento Joule que se origina en el campo eléctrico generado en la zona de electroporación, ya que una temperatura demasiado alta puede comprometer la viabilidad de la célula después de la electroporación. La temperatura del fluido puede ser de alrededor de 0 °C a alrededor de 50 °C, por ejemplo, de alrededor de 0 °C a alrededor de 10 °C, alrededor de 1 °C a alrededor de 5 °C, alrededor de 2 °C a alrededor de 15 °C, alrededor de 3 °C a alrededor de 20 °C, alrededor de 4 °C a alrededor de 25 °C, alrededor de 5 °C a alrededor de 30 °C, alrededor de 7 °C a alrededor de 35 °C, alrededor de 9 °C a alrededor de 40 °C, alrededor de 10 °C a alrededor de 43 °C, alrededor de 15 °C a alrededor de 50 °C, alrededor de 20 °C a alrededor de 40 °C,

alrededor de 25 °C a alrededor de 50 °C o alrededor de 35 °C a alrededor de 45 °C, por ejemplo, alrededor de 0 °C, alrededor de 1 °C, alrededor de 2 °C, alrededor de 3 °C, alrededor de 4 °C, alrededor de 5 °C, alrededor de 6 °C, alrededor de 7 °C, alrededor de 8 °C, alrededor de 9 °C, alrededor de 10 °C, alrededor de 11 °C, alrededor de 12 °C, alrededor de 13 °C, alrededor de 14 °C, alrededor de 15 °C, alrededor de 16 °C, alrededor de 17 °C, alrededor de 18 °C, alrededor de 19 °C, alrededor de 20 °C, alrededor de 21 °C, alrededor de 22 °C, alrededor de 23 °C, alrededor de 24 °C, alrededor de 25 °C, alrededor de 26 °C, alrededor de 27 °C, alrededor de 28 °C, alrededor de 29 °C, alrededor de 30 °C, alrededor de 31 °C, alrededor de 32 °C, alrededor de 33 °C, alrededor de 34 °C, alrededor de 35 °C, alrededor de 36 °C, alrededor de 37 °C, alrededor de 38 °C, alrededor de 39 °C, alrededor de 40 °C, alrededor de 41 °C, alrededor de 42 °C, alrededor de 43 °C, alrededor de 44 °C, alrededor de 45 °C, alrededor de 46 °C, alrededor de 47 °C, alrededor de 48 °C, alrededor de 49 °C o alrededor de 50 °C.

Las células transfectadas mediante el uso de los métodos de la invención se transfectan de manera más eficaz y tienen una viabilidad mayor que con el uso de métodos típicos de la transfección, por ejemplo, la transfección lentiviral, o instrumentos de transfección de células disponibles comercialmente, por ejemplo, el Sistema de NEON® Transfección (Thermo Fisher, Carlsbad, CA) o 4D-NUCLEOFECTOR (Lonza, Suiza). Por ejemplo, la eficacia de transfección, es decir, la eficacia de administrar satisfactoriamente una composición a una célula, para los métodos descritos en el presente documento, puede ser de alrededor de 0,1 % a alrededor de 99,9 %, por ejemplo, de alrededor de 0,1 % a alrededor de 5 %, alrededor de 1 % a alrededor de 10 %, alrededor de 2,5 % a alrededor de 20 %, alrededor de 5 % a alrededor de 40 %, alrededor de 10 % a alrededor de 60 %, alrededor de 30 % a alrededor de 80 %, o alrededor de 50 % a alrededor de 99,9 %, por ejemplo, de alrededor de 10 % a alrededor de 90 %, de alrededor de 25 % a alrededor de 85 %, por ejemplo, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,15 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,25 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,35 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,45 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,55 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,65 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,75 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,85 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 0,95 %, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, o alrededor de 99,9 %.

La viabilidad celular, es decir, el número o porcentaje de células que sobrevivieron la electroporación, de las células suspendidas en el fluido luego de introducir una composición en estas mediante los métodos de la invención descritos en la presente puede ser de alrededor de

0,1 % a alrededor de 99,9 %, por ejemplo, de alrededor de 0,1% a alrededor de 5 %, alrededor de 1 % a alrededor de 10 %, alrededor de 2,5 % a alrededor de 20 %, alrededor de 5 % a alrededor de 40 %, alrededor de 10 % a alrededor de 60 %, alrededor de 30 % a alrededor de 80 %, o alrededor de 50 % a alrededor de 99,9 %, por ejemplo, de alrededor de 10 % a alrededor de 90 %,  
 5 de alrededor de 25 % a alrededor de 85 %, por ejemplo, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,15 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,25 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,35 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,45 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,55 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,65 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,75 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,85 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 0,95 %, alrededor de 1%, alrededor de 2 %, alrededor de  
 10 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % o alrededor de 99,9  
 15 %.

El número de las células recuperadas, es decir, el número de las células vivas recolectadas luego de electroporación, puede ser de alrededor de  $10^4$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, (por ejemplo, alrededor de  $10^4$  células a alrededor de  $10^5$  células, alrededor de  $10^4$  células a alrededor de  $10^6$  células, alrededor del  $10^4$  células para alrededor de  $10^7$  células, alrededor de  $5 \times 10^4$  células  
 20 a alrededor de  $5 \times 10^5$  células, alrededor de  $10^5$  células a alrededor de  $10^6$  células, alrededor de  $10^5$  células a alrededor de  $10^7$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^5$  células a alrededor de  $10^6$  células, alrededor de  $5 \times 10^5$  células a alrededor de  $5 \times 10^6$  células, alrededor de  $10^6$  células a alrededor de  $10^7$  células, alrededor de  $10^6$  células a alrededor de  $10^8$  células, alrededor de  $10^6$  células a  
 25 alrededor de  $10^{12}$  células, alrededor de  $5 \times 10^6$  células a alrededor de  $5 \times 10^7$  células, alrededor de  $10^7$  células a alrededor de  $10^8$  células, alrededor de  $10^7$  células a alrededor de  $10^9$  células, alrededor de  $10^7$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, alrededor de  $5 \times 10^7$  células a alrededor de  $5 \times 10^8$  células, alrededor de  $10^8$  células a alrededor de  $10^9$  células, alrededor de  $10^8$  células a  
 30 alrededor de  $10^{10}$  células, alrededor de  $10^8$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, alrededor de  $5 \times 10^8$  células a alrededor de  $5 \times 10^9$  células, alrededor de  $10^9$  células a alrededor de  $10^{10}$  células, alrededor de  $10^9$  células a alrededor de  $10^{11}$  células, alrededor de  $10^{10}$  células a alrededor  $10^{11}$  células, alrededor del  $10^{10}$  células a alrededor de  $10^{12}$  células, o alrededor de  $10^{11}$  células a  
 alrededor de  $10^{12}$  células, por ejemplo, alrededor de  $10^4$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^4$  células, alrededor de  $5 \times 10^4$  células, alrededor del  $10^5$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^5$  células, alrededor de  $5 \times 10^5$  células, alrededor de  $10^6$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^6$  células, alrededor de  $5 \times 10^6$  células,  
 35 alrededor de  $10^7$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^7$  células, alrededor de  $5 \times 10^7$  células, alrededor de  $10^8$  células, alrededor de  $2,5 \times 10^8$  células, alrededor de  $5 \times 10^8$  células, alrededor de  $10^9$  células,

alrededor de  $2,5 \times 10^9$  células, alrededor de  $5 \times 10^9$  células, alrededor de  $10^{10}$  células, alrededor de  $5 \times 10^{10}$  células, alrededor de  $10^{11}$  células o alrededor de  $10^{12}$  células.

El rendimiento de recuperación, es decir, el porcentaje de células vivas modificadas genéticamente recogidas después de la electroporación, puede ser de alrededor de 0,1 % a alrededor de 500 %,

5 por ejemplo, de alrededor de 0,1% a alrededor de 5 %, alrededor de 1 % a alrededor 10 %, alrededor de 2,5 % a alrededor de 20 %, alrededor de 5 % a alrededor 40 %, alrededor del 10 % a alrededor 60 %, alrededor del 30 % a alrededor 80 %, alrededor del 50 % a alrededor 99,9 %, desde alrededor de 75 % a alrededor de 150 %, de alrededor de 100 % a alrededor de 200 %, de alrededor de 150 % a alrededor de 250 %, de alrededor de 200 % a alrededor de 300 %, de  
10 alrededor de 250 % a alrededor de 350 %, de alrededor de 300 % a alrededor de 400 %, de alrededor de 350 % a alrededor de 450 %, o de alrededor de 400 % a alrededor de 500 %, por ejemplo, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,15 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,25 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,35 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,45 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,55 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,65 %, alrededor de 0,7 %, 15 alrededor de 0,75 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,85 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 0,95 %, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, 20 alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 99,9 %, alrededor de 100 %, alrededor de 110 %, alrededor de 120 %, alrededor de 130 %, alrededor de 140 %, alrededor de 150 %, alrededor de 160 %, alrededor de 170 %, alrededor de 180 %, alrededor de 190 %, alrededor de 200 %, alrededor de 210 %, alrededor de 220 %, alrededor de 230 %, alrededor de 240 %, alrededor de 25 250 %, alrededor de 260 %, alrededor de 270 %, alrededor de 280 %, alrededor de 290 %, alrededor de 300 %, alrededor de 310 %, alrededor de 320 %, alrededor de 330 %, alrededor de 340 %, alrededor de 350 %, alrededor de 360 %, alrededor de 370 %, alrededor de 380 %, alrededor de 390 %, alrededor de 400 %, alrededor de 410 %, alrededor de 420 %, alrededor de 430 %, alrededor de 440 %, alrededor de 450 %, alrededor de 460 %, alrededor de 470 %, 30 alrededor de 480 %, alrededor de 490 % o alrededor de 500 %.

Un experto en la materia apreciará que las condiciones óptimas pueden variar dependiendo del tipo de célula u otros factores. Para cada nuevo tipo de celda, los siguientes parámetros se pueden ajustar según sea necesario: forma de onda, campo eléctrico, duración del pulso, tiempo de exposición del amortiguador, temperaturas del amortiguador y condiciones posteriores a la  
35 electroporación.

### Ejemplos

### *Ejemplo 1 - Dispositivos y sistemas*

Se diseñó y fabricó un dispositivo de electroporación de flujo continuo y un sistema relacionado para permitir el uso de una pluralidad de dispositivos en paralelo para mejorar o maximizar el número de eventos de electroporación celular que ocurren en una ventana de tiempo fija, mejorando o maximizando así el rendimiento de la ingeniería celular y/o acelerando el descubrimiento biológico. El dispositivo de electroporación está configurado para ser compatible con los sistemas de manejo de fluidos automatizados actuales, por ejemplo, dispensadores basados en puntas de pipeta, bombas de fluidos robóticas, etc.

La Figura 1A muestra un esquema de una modalidad de ejemplo de un dispositivo de electroporación mostrado, en esta configuración, como una punta de pipeta. La Figura 1A muestra una vista de cerca de un área activa del dispositivo, que incluye una zona de electroporación. Este dispositivo permite la manipulación genética de flujo continuo de células eucariotas y procariotas en una plataforma que se puede automatizar fácilmente mediante la integración con robots de manipulación de líquidos. En el dispositivo de las Figuras 1A-1C, el área activa del dispositivo incluye tres zonas distintas: la zona de entrada, la zona de electroporación y la zona de recuperación. En la realización mostrada en las Figuras 1A-1C, una composición a introducir en las células y las células a transfectar se colocan en la zona de entrada. Las células y la composición se pasan a través de la zona de electroporación y las células transfectadas se dispensan en un amortiguador para su almacenamiento en la zona de recuperación. Por tanto, el espacio entre las zonas de entrada y recuperación es la zona de electroporación, y las tres zonas están en comunicación fluida (por ejemplo, conectadas fluidamente), de modo que hay una vía de flujo a través del dispositivo.

En la modalidad mostrada en la Figura 1A, la zona de entrada y la zona de recuperación están fabricadas con electrodos huecos hechos de un material adecuado, por ejemplo, acero inoxidable, donde el electrodo de la zona de entrada actúa como electrodo energizado y el electrodo de zona de recuperación actuando como electrodo conectado a tierra, completando así el circuito mientras se permite que se desarrolle un campo eléctrico entre los dos electrodos (en combinación con la conductividad del fluido que transporta las células y la composición).

Los dispositivos de electroporación de la invención se han diseñado para cumplir los requisitos de las técnicas de fabricación de moldeo por inyección y por inserción, ambas de naturaleza escalable, y se muestran en las Figuras 1B y 1C. En las Figuras 1B y 1C, el cuerpo del dispositivo se integra con la zona de electroporación, que se encuentra entre los electrodos comerciales de acero inoxidable, donde el campo eléctrico está activo. La geometría de la zona de electroporación se modificó para exhibir una sección transversal sustancialmente uniforme, lo que tiene como resultado una exposición al campo eléctrico más predecible durante el tiempo de residencia de la muestra de electroporación. Con el uso de los métodos de producción actuales, por ejemplo, la

impresión 3D, se pueden fabricar aproximadamente 100 dispositivos por día; esto es escalable a más de 10 000 dispositivos por día mediante el uso de métodos de producción a gran escala más robustos, por ejemplo, moldeo por inyección y por inserción.

Se puede configurar un alojamiento para energizar una pluralidad de dispositivos de electroporación, por ejemplo, 96 dispositivos de electroporación en paralelo en una bandeja de puntas de pipeta de 96 pocillos estándar de la industria con electrodos de rejilla, para energizar todos los dispositivos de electroporación simultáneamente con un pulso de voltaje aplicado idéntico de manera que el campo eléctrico dentro de cada dispositivo de electroporación es idéntico. Se puede utilizar una única fuente de alimentación para suministrar energía eléctrica. Por tanto, puede ser necesario un mecanismo para distribuir la energía a cada dispositivo de electroporación. Un método para implementar esto se muestra en la Figura 2A, con una vista despiezada en la Figura 2B. Este diseño presenta electrodos cargados por resorte en los que los 96 dispositivos de electroporación individuales ingresan a la carcasa donde el primer y segundo electrodos de cada dispositivo de electroporación hacen contacto físico con las rejillas eléctricas del alojamiento. Los electrodos cargados por resorte están conectados en paralelo a las rejillas eléctricas del alojamiento, que a su vez está conectada a la fuente de alimentación mediante un solo juego de cables. El alojamiento es reutilizable de modo que una vez conectada a la fuente de alimentación puede facilitar la modificación genética de hasta 96 muestras discretas simultáneamente. La fuente de alimentación puede incluir circuitos o programación adicionales configurados para modular la entrega de pulsos de modo que cada dispositivo individual de la invención, por ejemplo, 96 dispositivos individuales, reciba un voltaje diferente o una forma de onda diferente.

#### *Ejemplo 2 - Desarrollo inicial de parámetros experimentales para una transfección óptima*

Se han realizado experimentos para estudiar los parámetros físicos y biológicos que influyen en la electroporación de la línea de linfocitos T inmortalizada Jurkat mediante el uso de dispositivos de la presente invención. Mediante el uso de métodos de citometría de flujo estándar de la industria, se evaluaron tanto la viabilidad celular (medida por la exclusión del colorante 7-AAD) como la eficiencia de transfección (medida por la expresión de GFP) de las células Jurkat diseñadas con nuestros dispositivos, los cuales son medidas comunes del éxito de la electroporación en el campo de la administración de genes.

A menos que se especifique lo contrario, los resultados experimentales mostrados a continuación fueron generados por electroporación una población de células Jurkat a una concentración de  $1 \times 10^6$  células en 100  $\mu$ L de amortiguador con 5  $\mu$ g de plásmido (por ejemplo, GFP plásmido de expresión). Los experimentos de electroporación se realizaron a 100 Hz con formas de onda cuadradas y una duración de pulso de 9,5 ms. Después de 24 horas de incubación, las células se tiñeron con tinción 7-AAD y se analizaron mediante citometría de flujo para medir las células

viables y las células vivas que expresan GFP. Los experimentos se realizaron por triplicado, con barras de error que representan el error estándar de la media (SEM). La Tabla 1 a continuación presenta un resumen de los parámetros usados para la transfección mediante el uso de dispositivos de la invención.

- 5 La mayoría de los parámetros enumerados en la Tabla 1 son independientes entre sí, con las notables excepciones que se encuentran dentro de dos grupos distintos. El primer grupo de parámetros dependientes son los que varían según las dimensiones del canal físico y los parámetros del proceso, como el número de Reynolds, la velocidad, la velocidad media, las tasas de corte y la presión máxima. Un experto en la materia apreciará que el número de Reynolds es
- 10 una función de la velocidad media, la viscosidad cinemática y el diámetro del canal. La velocidad (que puede variar localmente dentro del canal), la velocidad promedio, las tasas de cizallamiento y la presión máxima son funciones de la tasa de flujo y las dimensiones del canal. El segundo grupo de parámetros dependientes son los relacionados con el resultado biológico de la transfección, incluidas las células recuperadas, la viabilidad celular, la eficiencia de la transfección y el
- 15 rendimiento de las células de entrada. Estos parámetros dependen de una serie de factores, incluido el tipo de célula que se transfecta y la combinación de los parámetros físicos indicados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Parámetros experimentales usados en este documento.**

| Parámetro [Unidades]    | Valor mínimo        | Valor operativo | Valor máximo |
|-------------------------|---------------------|-----------------|--------------|
| Muestras en paralelo    | 1, 4, 8, 12, 24, 48 | 96              | 384, 1536    |
| Muestras en serie       | 1                   | 8               | 12           |
| Número de electrodo     | 1                   | 2               | 3+           |
| Calibre de electrodo    | 6                   | 16              | 34           |
| Diámetro del canal [mm] | 0,005               | 0,5 – 1,0       | 50           |
| Longitud del canal [mm] | 0,005               | 4,0-8,0         | 50           |
| Tasa de flujo [mL/min]  | 0,001               | 5-50            | 1000         |
| Frecuencia [Hz]         | 1                   | 100-500         | 50 000       |
| Ciclo de trabajo [%]    | 0,001               | 10-95           | 100          |
| Número de pulso         | 1                   | 10              | 1 000 000    |
| Duración del pulso [ms] | 0,01                | 1-10            | 1000         |
| Campo eléctrico [V/cm]  | 2,0                 | 100-1 000       | 50 000       |
| Voltaje aplicado [V]    | 10                  | 200-600         | 3 000        |
| Conductividad eléctrica | 0,001               | 1-20            | 500          |

|                                              |                                                                                                                                                                                                                                                      |                   |           |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|
| [mS/cm]                                      |                                                                                                                                                                                                                                                      |                   |           |
| Temperatura de la muestra [°C]               | 1,0                                                                                                                                                                                                                                                  | 4,0-37            | 50        |
| Volumen de la muestra [mL]                   | 0,001                                                                                                                                                                                                                                                | 0,025-0,10        | 2 000 000 |
| Numero de células                            | 1.0E4                                                                                                                                                                                                                                                | 21E5 – 10E6       | 100.0E10  |
| Células recuperadas post EP                  | 1.0E4                                                                                                                                                                                                                                                | 1.0E6 – 10E6      | 100.0E10  |
| Concentración celular [células/mL]           | 1.0E3                                                                                                                                                                                                                                                | 1.0E7             | 1.0E11    |
| Concentración de carga útil [µg/mL]          | 0,01                                                                                                                                                                                                                                                 | 1-10              | 1000      |
| Células recuperadas [%]                      | 0,1                                                                                                                                                                                                                                                  | 50                | 99,9      |
| Viabilidad celular [%]                       | 0,1                                                                                                                                                                                                                                                  | 50                | 99,9      |
| Eficacia de transfección [%]                 | 0,1                                                                                                                                                                                                                                                  | 50                | 99,9      |
| Rendimiento de las células de entrada [%]    | 0,1                                                                                                                                                                                                                                                  | 99,9              | 500       |
| Número de Reynolds [1] *                     | 0,04                                                                                                                                                                                                                                                 | 183-1530          | 2.43E4    |
| Velocidad [m/s] *                            | 5E-5                                                                                                                                                                                                                                                 | 0,26-2,08         | 32,7      |
| Tasas de cizallamiento [s <sup>-1</sup> ] *  | 0,1                                                                                                                                                                                                                                                  | 2.6E3 – 5.4E4     | 2E6       |
| Presión pico [Pa] *                          | 1E-3                                                                                                                                                                                                                                                 | 136-1600          | 9.5E4     |
| Velocidad media [m/s] *                      | 1.5E-5                                                                                                                                                                                                                                               | 7.79E-2 – 7.81E-1 | 15,9      |
| Viscosidad cinemática [m <sup>2</sup> /s] ** | 1E-6                                                                                                                                                                                                                                                 | 1.3E-6 – 5.6E-4   | 15E-4     |
| Forma de onda / Forma de pulso               | Cuadrado, Pulso, Bipolar, Sinusoidal, Rampa, Bipolar asimétrico, Alto voltaje - Bajo voltaje, Bajo voltaje - Alto voltaje, Corriente continua (CC), Unipolar, (+) SOLAMENTE Polaridad, (-) Polaridad SOLAMENTE, (+)/(-) Polaridad, (-)/(+) Polaridad |                   |           |
| Carga útil                                   | Moléculas cargadas, moléculas no cargadas, ADN, ARN, CRISPR-Cas9, proteínas, polímeros, ribonucleoproteína                                                                                                                                           |                   |           |

|                               |                                                                                                           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                               | (RNP), dextrano                                                                                           |
| <b>Material del electrodo</b> | Acero inoxidable 304, acero inoxidable 316, oro, platino, carbono, líquido conductor, solución conductora |

*\*Valores calculados a partir de la simulación*

*\*\*Valores aproximados a través de materiales potencialmente utilizados en la formulación de amortiguador*

### *Ejemplo 3 - Datos de transfección mediante el uso de dispositivos de la invención*

5 Los dispositivos de la invención muestran un rendimiento de transfección máximo cuando el caudal se maximiza a través del canal de electroporación (Figuras 3A y 3B). La tasa de flujo deseada se logró utilizando una pipeta de tasa de dispensación controlada para aumentar tanto la viabilidad como la eficacia, correspondiente a un ~6,5 ms tiempo de residencia de la muestra celular dentro del campo eléctrico. Se logró una viabilidad celular máxima del 54 %, con una eficacia de transfección de 65 %, lo que demuestra un avance significativo en la transfección de células inmunes humanas con dispositivos de la invención.

10 Las Figuras 4A-4D ilustran la simulación del caudal a lo largo de una zona activa de ejemplo del dispositivo (es decir, desde un primer lumen de electrodo, a través de la zona de electroporación y hacia el interior del segundo lumen de electrodo). En esta modalidad, un medio contiene células biológicas que fluyen. Del flujo de fluido simulado a 10 mL/min y 100 mL/min, se determina la velocidad lineal promedio de las muestras que atraviesan la zona de electroporación. El menor caudal de 10 mL/min tiene como resultado una velocidad lineal promedio de 324 mm/s. La velocidad de flujo superior de 100 mL/min tiene como resultado en una velocidad lineal promedio de 2990 mm/s. Las dos velocidades lineales pueden correlacionarse con el tiempo de residencia estimado ( $\tau_{res}$ ) de 12,35 ms y 1,34 ms, respectivamente. Estos dispositivos proporcionaron una velocidad de flujo de 16 mL por minuto. En particular, para que los sistemas comerciales tengan como resultado una eficiencia de transfección equivalente, se requieren exposiciones de alrededor de 30 ms o más bajo una exposición similar a un campo eléctrico. Esto demuestra que la combinación de altas velocidades de flujo y campo eléctrico tiene como resultado una entrega mejorada de material genético en células biológicas mediante el uso de dispositivos de la presente invención.

20 La eficacia de la transfección mediante el uso de dispositivos de la invención está influenciada por la intensidad del campo eléctrico. Las Figuras 5A y 5B muestran la viabilidad celular y la eficacia de transfección, respectivamente, que resultan de diversas intensidades de campo eléctrico. Se logró una eficiencia de transfección del 86 % y una viabilidad del 77 %.

30 Los dispositivos de la invención mostraron ~20 % aumento tanto la viabilidad celular como la eficiencia de transfección enfriando la muestra en hielo para minimizar cualquier efecto térmico

deletéreo potencial que pueda afectar la viabilidad celular debido al aumento de temperatura durante la electroporación (Figuras 6A y 6B). También se desarrolló un modelado numérico en COMSOL Multiphysics acoplando el campo eléctrico, el flujo de fluido y los efectos térmicos para comprender mejor el impacto de la temperatura de la muestra en el dispositivo de la invención, mediante el uso de un voltaje aplicado, en este modelo, de 225 V o 275 V. Los resultados, mostrados en las Figuras 7A-7D, muestran un campo eléctrico sustancialmente uniforme en la zona de electroporación. Las Figuras 8A-8D muestran distribuciones de temperatura en el dispositivo a lo largo del tiempo.

La electroporación que usa dispositivos de la invención no mostró cambios significativos en el rendimiento cuando la electroporación se realizó en un intervalo de duraciones de pulso con frecuencias emparejadas (Figuras 9A y 9B). Al variar el número de pulsos dentro de una duración de 9,5 ms de 1 a 5, no se observaron cambios significativos ni en la viabilidad ni en la eficiencia, lo que demuestra la flexibilidad de la forma de onda para la electroporación usando dispositivos de la invención. En este experimento, se logró una viabilidad celular máxima del 83 %, con una eficacia de transfección de 88 %.

La electroporación a través del uso de dispositivos de la invención no mostró cambios significativos en el rendimiento cuando la electroporación se realizó en un intervalo de volúmenes y densidades celulares (Figuras 10A y 10B). Al variar el número de células en un intervalo de volúmenes de 25 a 100  $\mu\text{L}$ , no se observaron cambios significativos ni en la viabilidad ni en la eficiencia, lo que demuestra la flexibilidad de la reacción física para la electroporación mediante el uso de dispositivos de la invención. En este experimento, se logró una viabilidad celular máxima del 83 %, con una eficiencia de transfección de 86 %.

La electroporación que usa dispositivos de la invención no mostró cambios significativos en el rendimiento cuando la electroporación se realizó en un intervalo de dimensiones de sección transversal de la zona de electroporación (Figuras 11A y 11B). Al variar las dimensiones de la sección transversal de la zona de electroporación de 500 a 900  $\mu\text{m}$ , se observaron viabilidades similares, sin cambios significativos en la eficacia cuando las velocidades de flujo se modificaron para coincidir con el tiempo de residencia total dentro de la zona de electroporación, lo que demuestra la flexibilidad de dimensión de sección transversal para electroporación mediante el uso de dispositivos de la invención. En este experimento, se logró una viabilidad celular máxima del 51 %, con una eficiencia de transfección de 67 %.

La viabilidad y la eficiencia dependían de las formas de onda del pulso de voltaje, como se muestra en las Figuras 12A y 12B. Al cambiar la forma de la forma de onda, se ajustó el tiempo y la fuerza de la corriente eléctrica a la que está expuesta cada celda Jurkat, alterando así la viabilidad o eficiencia. En este experimento, se observó una alta viabilidad celular en combinación

con una alta eficiencia de transfección (sobre el 50 %) mediante el uso de formas de onda cuadradas, sinusoidales y de rampa. Las formas de onda de ejemplo útiles para los dispositivos de la invención se muestran en las Figuras 12C-12L.

Las Figuras 13A y 13B muestran la viabilidad y eficiencia de los dispositivos de la invención utilizando un caudal de 10-25 mL por minuto con un campo eléctrico de 400-700 V/cm en condiciones de frío. Todas las optimizaciones realizadas permitir la entrega de ácidos nucleicos en una mayor eficiencia en comparación con el estado de la técnica comercialmente disponibles NEON® sistema de transfección en múltiples experimentos independientes (Figuras 13A y 13B).

*Ejemplo 4 - Aplicaciones de los dispositivos de la invención a la ingeniería genética*

La aplicación terapéutica de linfocitos T humanos primarios ha mostrado un avance significativo en el campo de la inmunooncología al dirigirse al sistema inmunitario del paciente para que sea eficaz en la lucha contra el cáncer. Varias tecnologías, incluidos los receptores de antígenos quiméricos y los receptores de linfocitos T modificados genéticamente, han mostrado éxito clínico en los últimos años. Sin embargo, las aplicaciones de modificación genética del sistema inmunológico del paciente siguen estando algo limitadas al tratamiento de los cánceres de la sangre, ya que el microambiente tumoral de los tumores sólidos inhibe la función de los linfocitos T en el sitio del tumor. Para superar algunos de los desafíos biológicos de la supresión del microambiente tumoral, existe el deseo de modificar aún más los linfocitos T para que sean más eficaces mediante la desactivación de genes que expresan ligandos reguladores en la superficie de los linfocitos T. La identificación de estos genes a menudo se logra a través de pantallas CRISPR, en las que Cas9 y bibliotecas de ARN guía se administran a los linfocitos T para eliminar una amplia gama de genes endógenos para lograr mejoras funcionales contra tumores específicos. Sin embargo, la entrega de estas bibliotecas sigue siendo un obstáculo para la identificación de genes en tipos de células "difíciles de transfectar", como los linfocitos T primarios y las células citotóxicas. Normalmente, en estos casos, las bibliotecas CRISPR se entregan como partículas lentivirales que infectarán las células y transducirán las secuencias de Cas9/ARN guía en el genoma celular, que luego eliminará el gen de interés de una manera específica de secuencia. Estas bibliotecas son muy laboriosas de producir, lo que requiere la clonación de plásmidos de expresión viral y la purificación de las partículas virales para su liberación. Además, esta metodología deja el "bagaje" no deseado de secuencias de Cas9/ARN guía genéticamente incorporadas en sitios de inserción genómica aleatorios, que pueden interrumpir otros genes funcionales. El uso de la entrega no viral para los complejos de ribonucleoproteína Cas9 es un método atractivo para superar estos obstáculos, lo que permite a los investigadores seleccionar una gran cantidad de inactivaciones en ausencia de incorporación viral utilizando una entrega transitoria de la proteína Cas9 complejada con las moléculas de ARN guía.

La Figura 13C es un diagrama de flujo de un método para administrar complejos de

ribonucleoproteína Cas9 a células mediante el uso de dispositivos de la invención. La entrega de complejos de ribonucleoproteína Cas9 a las células con electroporación permite un análisis de alto rendimiento de las inactivaciones de CRISPR dirigidas de una manera altamente eficaz, transformando el proceso de descubrimiento de nuevos genes objetivo para aplicaciones terapéuticas. Los estudios utilizan un subconjunto de 200-1000 genes o más, por ejemplo, 25 000, de bibliotecas de receptores de superficie celular disponibles comercialmente para identificar genes que inhiben la supresión del microambiente tumoral de la supervivencia y persistencia de los linfocitos T.

#### *Ejemplo 5 - Electroporación de células humanas*

Las Figuras 14A y 14B muestran datos de viabilidad y eficacia para la electroporación de linfocitos T humanos primarios mediante el uso de dos pesos moleculares diferentes de moléculas de dextrano fluorescentes con una intensidad de campo eléctrico de 700 V/cm. En este experimento, se logró una viabilidad celular máxima del 30 %, con una eficacia de transfección de 67 %, lo que demuestra un avance significativo en la transfección de células inmunitarias humanas primarias usando dispositivos de la invención.

En un experimento relacionado, electroporación utilizando dispositivos de la invención muestra un aumento significativo de rendimiento en comparación con NEON® en la línea celular de monocitos THP-1 (número TIB-202 de la ATCC) protocolos de monocitos sistema de transfección electroporación utilizando NEON publicado® (Figuras 15A y 15B). En este experimento, se observó un aumento de la viabilidad celular de 56,4 % mediante el uso dispositivos de la invención, en comparación con 23,4 % con el sistema de transfección NEON®, mientras que la eficiencia de transfección se mantuvo a 6 %.

La electroporación utilizando dispositivos de la invención mostró un aumento del rendimiento en comparación con sistema de transfección NEON® en monocitos humanos primarios que utilizan NEON publicado® protocolos de monocitos sistema transfectar electroporación (Figuras 16A y 16B). En este experimento, se observó un aumento de la viabilidad celular de 22,3 % utilizando dispositivos de la invención, en comparación con 16,6 % observada con el sistema de transfección NEON® y el aumento de la eficiencia de transfección de 21,6 % se observó mediante el uso de dispositivos de la invención en comparación con 4,7 % observado con el sistema de transfección NEON®.

La electroporación con el uso de los dispositivos de la invención mostró un aumento de rendimiento en comparación con sistema de transfección NEON® en experimentos independientes y para la entrega exitosa de 40 moléculas de dextrano kDa en líneas celulares citolíticas de Linajes NK-92 (ATCC) (Figuras 17A y 17B) y NK-92MI (ATCC) (Figuras 18A y 18B). Estos resultados confirman la capacidad de los dispositivos de la invención para administrar moléculas fuera del espacio de ácido nucleico con viabilidad celular comparable y eficacia de transfección mejorada a

plataformas no escalables comercialmente disponibles.

*Administración de ARNm de SIRPalpha a monocitos primarios*

En otro estudio, se logró la expresión transitoria de SIRPalpha en monocitos humanos primarios con el uso de dispositivos de la invención (Figuras 19A-19F). Esta entrega de un ARNm no GFP en monocitos humanos primarios muestra además la capacidad del dispositivo de esta plataforma de transfección para funcionar en esta población de células inmunitarias históricamente "difíciles de transfectar". Como control para esta demostración de sobreexpresión, se usaron linfocitos T primarios, que son en gran parte negativos para SIRPalpha (solo el 3,4 % de los linfocitos T vivos fueron positivos para el marcador de superficie; Figura 19B). Después de la transfección, el 86,9 % de los linfocitos T vivos fueron positivos para el marcador de superficie SIRPalpha (Figura 19B). En monocitos primarios, que tienen una línea de base alta (86,5 % positivo para el marcador de superficie (Figura 19A)), se cuantificó la intensidad de fluorescencia media (MFI) para determinar si la densidad de expresión del receptor aumentaba después de la transfección. Se observó un aumento de 1,8 veces con respecto a la línea base de las células de control en la expresión de SIRPalpha 24 horas después de la administración del ARNm (Figura 19F).

*Entrega de Cas9-RNP dirigida a CXCR4 a macrófagos primarios*

Cas9-RNP marcado con eGFP también se ha administrado con éxito a macrófagos humanos derivados de monocitos mediante el uso de dispositivos de la invención. La administración de Cas9-RNP marcado con eGFP al núcleo se confirmó mediante microscopía y citometría de flujo. Se observó expresión de eGFP en hasta el 21,4 % de los macrófagos diferenciados 24 horas después de la transfección, que descendió al 5,1 % en cinco días. Si bien no se observó edición de genes en el punto de tiempo de 24 horas, a las 48 horas, se observó una eficacia de KO del 13,9 %. La eficacia de la inactivación, determinada por citometría de flujo, aumentó al 16,5 % el día cinco.

*Modificación genética de linfocitos T no activados con administración de ARNm*

Se electroporaron linfocitos T no activados aislados (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup>) se electroporaron con ARNm que codifica GFP utilizando el dispositivo de la invención. Después de 24 horas, las células se analizaron en busca de métricas de viabilidad y eficacia. Los recuentos de células no activadas y la viabilidad de las células electroporadas fueron equivalentes a las de las células no tratadas, y se observó ~40 % la eficacia de suministro (Figura 20A-20D). Además, las células se tiñeron para los marcadores de linfocitos T no activados CD45RA y CD45RO. Esta tinción demostró que no hubo cambios en el fenotipo de las células electroporadas y que las células retuvieron su estado CD45RA<sup>+</sup> "no activado"/CD45RO<sup>-</sup> (Figuras 21A y 21B). Por último, los linfocitos T no activados se expandieron con CD3/CD28 reactivos de activación. En este experimento, las tasas de crecimiento de las células electroporadas fueron equivalentes a las de las células no tratadas hasta seis días después de la activación (Figura 22).

*Ejemplo 6 - Dispositivos para activar una pluralidad de dispositivos de la invención*

Las Figuras 23A-23F muestran modalidades de ejemplo de dispositivos de electroporación de la invención integrados en un dispositivo externo que puede integrarse adicionalmente en un sistema de manipulación de líquidos para energizar los dispositivos de la invención y completar el proceso de electroporación en una plataforma de manipulación de líquidos automatizada. El dispositivo externo, llamado máquina de descarga electrónica (EDM) se utiliza para energizar los dispositivos de la invención durante el proceso de electroporación. En los dispositivos mostrados en las Figuras 23B, 23C y 23E, 23.1 son vigas paralelas que se integran con rieles de soporte. Estos vigas son intercambiables y permiten el cambio en los mecanismos/estilos de contacto eléctrico. Además, la viga permite el posicionamiento final de los contactos eléctricos. 23.2 son contactos eléctricos retráctiles mecánicamente. Los electrodos usan un mecanismo similar a un resorte para permitir que diferentes regiones del dispositivo se deslicen por el EDM mientras mantienen el contacto con el cuerpo del dispositivo de electroporación. Este elemento puede conmutarse por otros contactos eléctricos más flexibles, por ejemplo, ballestas como las que se muestran en la Figura 23E o electrodos tipo cepillo de alambre. 23.3 es un depósito del dispositivo de electroporación de la invención. 23.4 es un riel de soporte oscilante que permite una deflexión adicional del electrodo si es necesario. Esta característica del riel utiliza un mecanismo similar a un resorte para rotar y permitir una mayor desviación del contacto eléctrico mientras un operador o sistema automatizado coloca en posición el dispositivo de electroporación, por ejemplo, un brazo robótico. 23.5 es un riel deslizante que permite la traslación lineal de una placa de sujeción de muestras, como la placa de muestras que se observa en 23.6. 23.7 es un sistema de alineación que proporciona un posicionamiento adecuado del dispositivo de electroporación sobre la placa de muestra. El sistema de alineación se utiliza como indicador visual cuando no hay funciones de alineación automatizadas, por ejemplo, no hay ningún control robótico aplicado al EDM. Con la aplicación de algún tipo de dispositivo de traslado lineal, el sistema tiene la capacidad de completar 1 o más muestras en cualquier formato de matriz. 23.8 es la zona de electroporación de los dispositivos de la invención y está conectada de forma fluida tanto a la zona de entrada 23.9 como a la zona de recuperación 23.10. 23.11 es un riel de soporte que soporta los contactos eléctricos retráctiles mecánicamente (23.2). El riel de soporte 23.11 puede ser eléctricamente conductor de modo que todos los contactos eléctricos mecánicamente retráctiles (23.2) puedan activarse para un experimento de electroporación simultánea. Alternativamente, el riel de soporte 23.11 puede ser un material no conductor que aisle los contactos eléctricos mecánicamente retráctiles (23.2) de modo que se puedan realizar experimentos de electroporación individuales.

Cuando se configura como un sistema automatizado, la muestra del espécimen de interés es aspirada en otro lugar de la plataforma de manipulación de líquidos mediante los dispositivos de la invención. Luego, la muestra se transporta al EDM donde los contactos del electrodo se

suspenden sobre la superficie de la placa de muestra. A continuación, los dispositivos de la invención se introducen en el dispositivo para establecer contacto con los contactos de los electrodos del EDM. El mecanismo representado en las Figuras 23A-23C usa una conexión de clavija pogo para cerrar el circuito mientras que la modalidad de las Figuras 23D-23F utiliza un resorte flexible, por ejemplo, un resorte de láminas, electrodos para cerrar el circuito. Los métodos alternativos para conectar los circuitos incluyen el uso de fluidos conductores o electrolitos, diafragmas conductores que se expandieron para hacer contacto u otros materiales flexibles conductores que tienen una constante de resorte suficiente para desviarse durante el proceso de inserción. Esto permite que el EDM sea apto para el uso de una variedad de dispositivos de diferentes tamaños de la invención. El sistema se puede utilizar para electroporar una o más muestras de forma independiente o simultánea en función de los objetivos experimentales. Esta tecnología se puede escalar para aumentar en todo momento. Por ejemplo, el EDM se puede usar con una pluralidad de dispositivos de electroporación de la invención, o alternatively, con un solo dispositivo de la invención en un experimento de muestra única o experimento de múltiples muestras mediante la adición de dos mecanismos de traslado lineal.

Las Figuras 24A y 24B proporcionan modalidades de ejemplo de un alojamiento configurado para activar dispositivos conductores de la invención con una temperatura controlada. En el dispositivo de la Figura 24A, 24.1 son electrodos huecos que están configurados para conectarse a un colector de manipulación de líquidos. Los electrodos pueden incorporar además un collar de interacción para reducir la tensión en el material del electrodo inducida por la fricción generada por la conexión al colector de control de líquidos. 24.2 es un canal de conexión que está conectado de forma fluida a los electrodos huecos y configurado para amplificar el campo eléctrico generado al energizar los electrodos. El canal de conexión actúa además como una barrera para confinar el flujo de fluido con el fin de aumentar y controlar el pulso eléctrico que experimenta la muestra. 24.3 es un electrodo de base conductor que se conecta al canal de conexión 24.2. 24.4 es una base de soporte que está configurada para sostener el electrodo hueco 24.1, el canal de conexión 24.2 y el electrodo de base conductor 24.3. 24.5 es una base conductora que soporta el electrodo hueco 24.1, el canal de conexión 24.2, el electrodo base conductor 24.3 y la base de soporte 24.4 y se conecta eléctricamente al electrodo base conductor 24.3 para completar el circuito de electroporación. La base conductora 24.5 incluye conexiones de fluido 24.6 para hacer circular fluido de calentamiento o enfriamiento a través de la base conductora 24.5 para regular la temperatura del proceso de electroporación. En la Figura 24B, 24.7 es un marco exterior que soporta los otros componentes.

En el dispositivo, las Figuras 24A y 24B, a medida que el fluido fluye desde el electrodo hueco 24.1, la conductividad del fluido de muestra forma un circuito cerrado después de la interacción con la superficie de los electrodos base 24.3. Los electrodos base 24.3 pueden tener cualquier

forma que permita una exposición sistemática y controlable al campo eléctrico que experimentan las células que indujo la electroporación. La posición de los electrodos huecos 24.1 se puede manipular en la coordenada Z desde la base de soporte 24.4 para limitar la exposición de las células al campo eléctrico. En esta configuración, el electrodo de base 24.3 se eleva desde la parte inferior de la base de soporte 24.4 a una posición que se sitúa por encima de un límite de recogida de volumen especificado. La célula electroporada experimentará un campo eléctrico finito en toda la muestra (excepto para cerrar el circuito de electroporación). Este diseño reduce los efectos de cizallamiento en las celdas de muestra y aumenta la uniformidad del flujo en la región donde ocurre la electroporación. Además, para crear un campo eléctrico estable o manipular aún más el campo eléctrico, el canal de conexión 24.2 se agrega al extremo del electrodo hueco 24.1, lo que permite al operador amplificar y controlar el pulso eléctrico y, por lo tanto, el campo eléctrico, experimentado por el espécimen. Además, la configuración de electrodos en este sistema utiliza una configuración de electrodos no paralelos donde la cánula es circular y paralela al eje de las muestras que fluyen, pero la superficie 24.3 del electrodo base está en algún ángulo mayor de 0 grados con respecto al eje de la cánula. Una variación de este diseño es el uso de un electrodo suspendido que se cierne sobre la placa de pocillos. A medida que la muestra fluye a través de la superficie del electrodo base 24.3 y se electropora, la muestra cae dentro del pocillo. En esta configuración, los electrodos no están unidos físicamente a la placa de pocillos.

*Ejemplo 7 - Dispositivos de electroporación basados en chips de fluidos*

Las Figuras 25A-25B muestran realizaciones ejemplares de un dispositivo de electroporación basado en chip de fluido que está configurado para aceptar puntas de pipeta convencionales estándar de la industria de 1-5 000  $\mu\text{L}$  para introducir muestras en el dispositivo. En el dispositivo de las Figuras 25A, 25.1 y 25.2 son electrodos que están conectados fluidica y eléctricamente por una zona de electroporación. 25.3 es una región de inserción de la punta de pipeta conectada de forma fluida a la zona de electroporación y 25.4 es un depósito de recolección. Los electrodos 25.1 y 25.2 del dispositivo de electroporación basado en chips de fluidos son activados por una fuente de alimentación externa. En la vista en despiece de la Figura 25B, 25.5 son puntas de pipeta, 25.6 es el dispositivo de electroporación fluidica basado en chip de la Figura 25A y 25.7 muestran una placa de recolección para contener especies después de la electroporación.

Las puntas de pipeta 25.5 flotan sobre la superficie de un dispositivo de electroporación 25.6 basado en chips de fluido. El dispositivo de electroporación basado en chip de fluido incluye dos componentes: una placa de electroporación que contiene una disposición encapsulada de electrodos y una placa de cubierta que tiene canales de microfluidos integrados que permiten al usuario modular el pulso del campo eléctrico que se administra a las células. La placa de electroporación permite el flujo a través de la electroporación de múltiples muestras de forma simultánea o individual si se desea. Después de que ocurre la electroporación de la muestra en la

placa de electroporación, la muestra fluye hacia el fondo de la placa de recolección 25.7. Este sistema utiliza componentes de manipulación de líquidos estándar de la industria, por ejemplo, puntas de pipeta de 1-5000  $\mu\text{L}$ , lo que facilita la integración en los colectores de manipulación de líquidos estándar de la industria.

#### 5 *Ejemplo 8 - Dispositivo de electroporación de flujo continuo de gran volumen (escalable)*

Las Figura 26A-26B muestran modalidades de ejemplo de dispositivos de electroporación de flujo continuo diseñados para su uso con la fabricación de celdas de gran volumen. En la modalidad mostrada en la Figura 26A, 26.1 y 26.2 son una entrada y una salida, respectivamente, para hacer circular un fluido, por ejemplo, una solución amortiguadora. 26.3 es un alojamiento exterior que  
 10 contiene el dispositivo de electroporación. 26.4 es la zona de electroporación y está conectada de forma fluida a la entrada de fluido 26.5 y la salida de fluido 26.9. Después de la entrada 26.5 y antes de la salida 26.9 están los electrodos cilíndricos 26.7 y 26.8 que tienen poros 26.6 en su superficie. 26.10 es un depósito para contener un fluido, por ejemplo, un medio de crecimiento.

Los electrodos cilíndricos 26.7 y 26.8 en esta modalidad están hechos de material poroso  
 15 conductor que permite que el fluido viaje a través de sus poros 26.6 hacia la cavidad del dispositivo. Los poros 26.6 en el electrodo cilíndrico 26.7, 26.8 permiten que una solución amortiguadora establezca las reacciones químicas en la superficie de los electrodos cilíndricos 26.7, 26.8 y minimice la transición de pH observada debido a la aplicación de un potencial eléctrico durante el proceso de electroporación. El amortiguador introducido por los electrodos cilíndricos  
 20 porosos 26.7, 26.8 permite un cambio en el flujo del fluido para crear un flujo "lubricante" o envolvente en la superficie interna de los electrodos cilíndricos 26.7, 26.8 o para inducir otros elementos de dinámica de fluidos al proceso de electroporación (como la rotación de la suspensión con células) a medida que se somete a electroporación. La reducción de la transición del pH reduce los efectos negativos de las altas variaciones en el pH de las muestras suspendidas  
 25 utilizadas durante la electroporación. Los electrodos cilíndricos 26.7 y 26.8 completan el requisito del circuito externo y permiten que el sistema se energice mediante una fuente de alimentación externa. En una modalidad alternativa, la salida 26.2 del dispositivo de electroporación se puede usar para eliminar un amortiguador altamente conductor, por ejemplo, un medio de crecimiento o PBS, y la entrada 26.1 se puede usar para introducir un amortiguador de baja conductividad  
 30 eléctrica para minimizar el calentamiento de la muestra líquida como fluye a través de la zona de electroporación 26.4. Este intercambio de amortiguador dará como resultado una mayor viabilidad celular y una mayor eficiencia de transfección que, en última instancia, generará un mayor número de células diseñadas con éxito. El amortiguador de baja conductividad puede luego extraerse en la salida después de la zona de electroporación y complementarse con medio de crecimiento al  
 35 entrar en contacto con la entrada después de la zona de electroporación.

#### *Ejemplo 9 - Modelado de campos eléctricos en un nuevo electrodo helicoidal*

Un dispositivo Flowfect con una configuración de electrodo particular para ayudar a aumentar la eficacia de transformación/transfección de las células que fluyen fue diseñado y moldeado de forma informática. La Figura 27A demuestra la naturaleza helicoidal de la configuración del electrodo que es responsable de la rotación del campo eléctrico cuando las células fluyen a través de la región de electroporación. Sin seguir la teoría, esta configuración permite que una fracción mayor de la superficie de la celda sea electroporada y por lo tanto requiere campos eléctricos más bajos para lograr efectos equivalentes. Las Figuras 27B-27F muestran el área de la sección transversal de la región de electroporación, vista desde diferentes ejes. Los electrodos energizados y conectados a tierra son perpendiculares a la dirección del flujo en oposición a la dirección paralela, por ejemplo, como en las Figuras 1A-1C. Este diseño permite un volumen de muestra más bajo y un voltaje aplicado reducido, lo cual es deseable, por ejemplo, en aplicaciones tales como electroporación de células humanas primarias (por ejemplo, células inmunitarias o células madre), en las que el número de células es limitado. En otra modalidad, los electrodos helicoidales no están en contacto fluido con la zona de electroporación; el uso de pulsos de alta frecuencia puede inducir un campo eléctrico dentro de la zona de electroporación (por ejemplo, a través de un medio intermedio) para administrar la composición a las células.

*Ejemplo 10 - Dispositivos de dos partes de la invención para escalabilidad de fabricación*

Las Figuras 28A-28C muestran una modalidad de un dispositivo de la invención que está configurado para ser fabricado en dos componentes separados que se acoplan para formar un dispositivo completo que es capaz de usarse con sistemas de manejo de líquidos disponibles comercialmente. En esta configuración, los electrodos moldeados con inserto, mostrados como pequeños puntos cerca de la unión de los dos componentes en las Figuras 28A-28B se soldarán entonces mediante procesos industriales establecidos (por ejemplo, soldadura por rotación, sónica, por ejemplo, ultrasónica, soldadura térmica, por ejemplo, una placa caliente o láser). En este diseño, el flujo de fluido de una muestra, por ejemplo, una muestra de ADN celular, a través del dispositivo se desacopla de la exposición al campo eléctrico requerida para la electroporación.

Las Figuras 29A y 29B muestran el dispositivo representado en las Figuras 28A-28C, por ejemplo, dimensiones internas idénticas, con una distancia de 4 mm entre electrodos moldeados con inserto por encima y por debajo de una zona de electroporación de 700  $\mu\text{m}$  de diámetro. La diferencia entre esta modalidad del dispositivo de la invención y la modalidad mostrada en las Figuras 28A-28C es que en este concepto el control del flujo de fluido está acoplado con la exposición al campo eléctrico. Específicamente, la cánula (mostrada en la parte superior del dispositivo de las Figuras 29A-29B) es la interfaz entre el sistema de manipulación de líquidos y el dispositivo de electroporación de la invención. Una vez que el dispositivo de electroporación de la invención se enclava en la cánula, los electrodos incrustados (mostrados en rojo en el dispositivo de las Figuras 29A y 29B) estarán en conexión eléctrica con la fuente de alimentación para la entrega de

impulsos de voltaje. En la modalidad mostrada en las Figuras 29A-29B, se muestra una única cánula, pero se puede ampliar en un sistema de la invención para incluir una pluralidad de dispositivos de electroporación de la invención, por ejemplo, un sistema que contiene 4 (Figura 29C), 8, 12, 24, 36, 64, 96 o 384 dispositivos de electroporación de la invención configurados para electroporar células suspendidas en un fluido en paralelo. La Figura 29C ilustra tal método/dispositivo que puede aumentar el número de transfecciones simultáneas o secuenciales que se producen mediante el uso de una pluralidad de cartuchos o una pluralidad de controladores. En particular, incorpora las múltiples entradas para modificar células en combinación/de forma individual con el uso de múltiples limitaciones/restricciones de fluido que se exponen a señales eléctricas similares/diferentes y velocidades de desplazamiento similares/diferentes. Alternativamente, las cavidades para la modificación celular son cartuchos independientes que son integradas en un/una multitud de sistemas de control o el sistema de control puede aceptar uno/una multitud de cartuchos.

*Ejemplo 11 - Ejemplos de alojamiento e interfaces*

Las Figuras 30A y 30B proporcionan modalidades de ejemplo de dispositivos de la invención que muestran un alojamiento exterior que incluye una interfaz de usuario (Figura 30A) y una pluralidad de dispositivos de la invención conectados de forma fluida a un colector dispensador de líquido y una placa de muestra (Figura 30B).

La Figura 30A es una encarnación del sistema de transfección/transformación de flujo continuo. El modelo 3D muestra un sistema de electroporación autónomo que contiene una interfaz de usuario de pantalla táctil (30.1) u otra interfaz de usuario alternativa que permite al usuario seleccionar parámetros como velocidad de flujo, formas de onda, potencial aplicado, volumen a electroporar, retardo de tiempo, elementos de enfriamiento, elementos de enfriamiento, estado de electroporación, progreso y otros parámetros utilizados para optimizar el protocolo de electroporación. La interfaz de usuario también contiene selecciones de parámetros formuladas previamente que permiten al usuario operar el sistema en condiciones estándar que han sido previamente validadas por el usuario o recomendadas por los fabricantes. La interfaz de usuario puede estar conectada a la programación que permite el funcionamiento automatizado del sistema y/o ejecutar un algoritmo para optimizar la transfección para una muestra determinada de un tipo de célula conocido. El dispositivo también contiene un cartucho (30.2) que encapsula una o más de las invenciones anteriormente mencionadas u otros dispositivos de electroporación utilizados para la electroporación de flujo continuo. El dispositivo también contiene un área/recinto de enfriamiento/calentamiento (30.3) para almacenar células/amortiguador durante, antes y después de la electroporación de la muestra. El sistema se alimenta externamente. El sistema también contiene algoritmos que tienen la capacidad de ajustar los parámetros de forma independiente/autónoma si el usuario selecciona esta funcionalidad. Estos algoritmos de

optimización permiten un ajuste continuo de los parámetros utilizados en el proceso de electroporación que puede depender del tipo de célula, conductividad, volumen de suspensiones, viscosidad, vida útil del catucho de electroporación, el estado físico de la suspensión o el estado del dispositivo de electroporación.

- 5 La Figura 30B muestra una serie de dispositivos de electroporación previamente descritos en el documento. 30.4 es el colector de manipulación de líquidos que transporta la invención a través de la plataforma de manipulación de líquidos y permite que el dispositivo aspire líquido. 30.5 es el dispositivo mostrado en las Figuras 1A-1C. 30.6 es una placa de pocillos que se utiliza para almacenar la muestra antes, durante, y/o después de la transferencia de la muestra.

10 *Ejemplo 12 - Estrategias de activación de la citometría de flujo para optimizar los parámetros de electroporación*

La Figura 31 proporciona un ejemplo que compara dos estrategias de activación. Históricamente, los desarrolladores de la tecnología de electroporación han utilizado una prepuerta canónica de "linfocitos", que ignora las células que no están dentro de la población de "linfocitos", como las que  
 15 tienen una morfología alterada o están en apoptosis. Como se muestra en la Figura 31, esto aumenta artificialmente las métricas de viabilidad al seleccionar una subpoblación específica de células para el análisis. Una pre-activación de "célula total" es una descripción más precisa de los resultados experimentales de la electroporación. Por lo tanto, las viabilidades informadas que se muestran en la tabla a continuación pueden parecer más bajas de lo esperado en el campo, pero  
 20 los datos se han procesado para enfocarse en métricas de rendimiento que representan el impacto de los dispositivos de electroporación de la invención en todas las células de entrada. En la Figura 31, FSC significa Dispersión Frontal y SSC es Dispersión Lateral, que indica cómo se recopilan los datos de morfología celular durante el análisis de citometría de flujo.

Mediante el uso de la estrategia de activación descrita en este documento, los datos de  
 25 rendimiento de las células Jurkat, los linfocitos T humanos primarios activados, los monocitos THP-1, los monocitos humanos primarios y los macrófagos humanos primarios diferenciados se muestran a continuación en la Tabla 2. En la Tabla 2, el rendimiento representa la relación entre el número de células que son viables y que expresan la carga útil de interés y el número de entrada de células que entraron en el proceso. Por ejemplo, un rendimiento de 0,5X significa que la mitad  
 30 de las células de entrada son viables y expresan la carga útil deseada en el momento del análisis. En perspectiva, se administra un producto de terapia celular a un paciente si el rendimiento con liberación viral es mayor que alrededor de 0,1X en el momento de la recolección.

**Tabla 2. Métricas de rendimiento representativas logradas con dispositivos de la invención en diferentes células primarias y líneas celulares con una amplia variedad de cargas útiles.**

| Entrada | Mediciones de rendimiento máximo |
|---------|----------------------------------|
|---------|----------------------------------|

| Tipo de célula                                        | Carga útil | Viabilidad | Eficiencia | Rendimiento |
|-------------------------------------------------------|------------|------------|------------|-------------|
| Línea celular<br>Jurkat                               | dextrano   | 75-80%     | 55-60%     | 0,3X        |
|                                                       | ADNp       | 70-75%     | 55-60%     | 0,2X        |
|                                                       | ARNm       | 75-80%     | 90-95%     | 0,6X        |
| Linfocitos T<br>humanos<br>primarios<br>(activados)   | dextrano   | 75-80%     | 85-90%     | 0,5X        |
|                                                       | ARNm       | 75-80%     | 90-95%     | 0,6X        |
| THP-1                                                 | dextrano   | 65-70%     | 85-90%     | 0,5X        |
| Monocitos<br>humanos<br>primarios                     | dextrano   | 45-50%     | 85-90%     | 0,3X        |
|                                                       | ARNm       | 55-60%     | 80-85%     | 0,4X ‡      |
| Macrófagos<br>humanos<br>primarios<br>(diferenciados) | dextrano   | 70-75%     | 70-75%     | 0,4X ‡      |
|                                                       | ARNm       | 45-50%     | 75-80%     | 0,2X        |

‡ Representa el rendimiento basado en recuentos de control sin electroporación no tratados

*Ejemplo 13 - Electroporación en células de ovario de hámster chino (CHO-K1) y células de riñón embrionario humano (HEK-293T)*

Se ha realizado la electroporación de las líneas celulares CHO-K1 (células de ovario de hámster chino) y HEK-293T (células de riñón embrionario humano). Los dispositivos de la invención pueden usarse para la electroporación de células adherentes que se han levantado y resuspendido en un amortiguador de electroporación. Las células CHO-K1 (Figura 32A y 32B) y HEK-293T (Figura 33A-33D) pueden transfectarse satisfactoriamente con ADN plasmídico de GFP mediante el uso de los dispositivos de la invención. Se observó una eficacia de transfección máxima en células HEK-293T después de un cultivo de 48 horas, después de la electroporación. Sin estar ligado a la teoría, la viabilidad celular reducida puede deberse a levantar las células adherentes y colocarlas en suspensión para su análisis mediante citómetro de flujo, mientras que los métodos de microscopía mostraron células GFP+ sanas con morfología normal (Figura 34A, 34B, 35A y 35B ).

*Ejemplo 14 - Transfección de linfocitos T primarios*

Se han realizado estudios en linfocitos T primarios. Los indicadores fluorescentes que se han utilizado principalmente para el análisis de la eficacia de la electroporación incluyen moléculas pequeñas fluorescentes (por ejemplo, dextrano marcado con FITC), genes expresados a partir de ADN plasmídico (por ejemplo, GFP) y genes expresados a partir de mRNA (por ejemplo, GFP). La liberación y expresión de estos indicadores se determinan mediante el uso de citometría de flujo,

en la que las células vivas se preactivan usando la estrategia de activación como se describe en el presente documento para determinar la detección fluorescente sobre una base de una sola célula. Estos ensayos demuestran la detección intercelular del indicador fluorescente y, en algunos casos, la entrega nuclear directa. Debido a la naturaleza suave de las electroporaciones realizadas con los dispositivos de la invención, se logran recuentos de células más altos después de la transfección en comparación con los sistemas comerciales, por ejemplo, el sistema Lonza 4D-NUCLEOFECTOR o el sistema de transfección NEON® (Thermo Fisher, Carlsbad, CA).

*a. Demostraciones ampliadas de linfocitos T*

Transfección utilizando dispositivos de la invención para administrar moléculas de dextrano (40 kDa) marcadas con fluorescencia (FITC) en linfocitos T humanos primarios (comenzando con una densidad celular de  $10^6$  células/condición experimental), y se realizó el análisis de cuatro métricas frente a un dispositivo de electroporación de sobremesa disponible comercialmente (por ejemplo, un sistema de transfección Thermo Fisher NEON®): recuento total de células (post EP), viabilidad celular, eficiencia de transfección y número total de células vivas transfectadas. Los resultados se muestran en las Figuras 36A-36D. Además de los datos mostrados en las Figuras 36A-36D utilizando moléculas marcadas con fluorescencia, se probó el suministro de ADN plasmídico que codifica GFP (3.5 kB) en linfocitos T humanos primarios (a una densidad celular de  $10^6$  células/condición experimental) utilizando dispositivos de la invención. Estos experimentos demostraron nuevamente superioridad con respecto al sistema de transfección NEON®, que se muestra como el número total de linfocitos T que expresan GFP después de una incubación de 24 h representada en la Figura 37. Es importante destacar que la expresión de GFP a partir del plásmido de ADN también demostró una entrega eficaz de información genética (es decir, ácidos nucleicos) en el núcleo, donde el ADN se transcribe en ARN antes de la traducción a la proteína GFP final.

*b. Administración de ARNm con comparación de plataforma*

También se demostró la administración de ARNm a las células usando dispositivos de la invención. Estos experimentos se realizaron con un ARNm de origen comercial a dos densidades de células operativas. Los experimentos se completaron luego en dos sistemas disponibles comercialmente (Lonza 4D-NUCLEOFECTOR y Thermo Fisher NEON® Transfection System) y los dispositivos de la invención para comparación como se muestra en las Figuras 38A-38D). Los dispositivos de la invención superaron a los sistemas disponibles comercialmente en términos de viabilidad, eficiencia y rendimiento. Además, el rendimiento de los dispositivos de la invención fue independiente de la concentración celular, a diferencia de los sistemas disponibles comercialmente, como indican los resultados experimentales mostrados en las Figuras 38A-38D.

*Ejemplo 15 - Administración de una carga útil no transitoria*

Cada una de las cargas útiles descritas en los Ejemplos 13 y 14 son transitorias en el momento de

la administración. Para demostrar la entrega de reactivos de modificación del genoma estable (es decir, desactivación del gen CRISPR), se realizaron experimentos con complejos de ribonucleoproteína Cas9 (RNP) para la desactivación de CRISPR en células primarias. Como se muestra en las Figuras 39A-39D, la desactivación de un gen endógeno en linfocitos T primarios, según se confirmó mediante tinción del receptor de superficie en una base de células individuales, tuvo éxito mediante el uso de dispositivos de la invención y se confirmó usando citometría de flujo. Los dispositivos de la invención también pueden usarse para la integración CRISPR simultánea de un gen exógeno para demostrar una integración genómica estable mediante electroporación de RNP de Cas9.

*Ejemplo 16 - Transfección de líneas celulares de monocitos (THP-1) y células citolíticas (NK-92MI)*

Las Figuras 40A y 40B muestran gráficos de barras que comparan el suministro de plásmido GFP y dextrano marcado con FITC a células THP-1 y NK-92MI, respectivamente, mediante el uso de dispositivos de la invención y un sistema de transfección NEON® comercial. Como se observa en las Figuras 40A y 40B, la electroporación que usa dispositivos de la invención supera consistentemente al NEON® para producir células transfectadas viables de cualquier tipo con cualquier carga útil. Como ejemplo comparativo adicional, las Figuras 41A y 41B muestran una mayor viabilidad celular y eficiencia de transfección en muestras que contienen monocitos THP-1, donde se administró ARNm de GFP mediante el uso de dispositivos de la invención en comparación con el sistema de transfección NEON®.

THP-1, una línea celular de monocitos inmortalizados, se usó adicionalmente para estudios de comparación con monocitos y macrófagos. La activación de células THP-1 con endotoxina LPS (lipopolisacárido) induce células inmortalizadas de tipo macrófago THP1-Mac. Como se muestra en las Figuras 42A-42C y FIGS. 43A y 43B, tanto las células THP-1 (Figuras 42A-42C) como las células THP1-Mac (Figuras 43A y 43B) se transfectaron satisfactoriamente con ARNm de GFP usando dispositivos de la invención.

*Ejemplo 17 - Transfección de monocitos primarios y macrófagos diferenciados*

Se han transfectado con éxito células primarias de monocitos humanos, un tipo de célula notoriamente difícil de transfectar por medios convencionales, mediante el uso dispositivos de la invención. Como se muestra en las Figuras 44A-44D, se transfectaron monocitos humanos primarios, aislados de sangre periférica, con éxito con moléculas de dextrano marcadas con FITC y ARNm de GFP usando dispositivos de la invención.

Las Figuras 45A y 45B muestran la expresión de marcadores específicos en monocitos de sangre periférica primaria transfectados con ARNm de GFP mediante el uso de dispositivos de la invención. Como se muestra en las Figuras 45A y 45B, la capacidad de los monocitos CD86+ (activados en células GFP+ viables) para activarse (representada en la presente como expresión de CD80) después de que la estimulación con LPS se mantuvo hasta 96 horas, lo que indica que

la electroporación no afecta negativamente la expresión del marcador de activación CD80 (Figura 45A) o marcador de linaje CD86 (Figura 45B).

Además, los monocitos primarios electroporados usando dispositivos de la invención retuvieron la capacidad de diferenciarse en macrófagos, como se muestra en las Figuras 46A-46C, que indica que las células conservan su función después de la electroporación. Como se muestra en las Figuras 47A-47D, se transfectaron con éxito macrófagos humanos diferenciados con moléculas de dextrano marcadas con FITC (Figuras 47A-47B) y ARNm de GFP (Figuras 47C-47D) mediante el uso de dispositivos de la invención. Los macrófagos se electroporaron usando dispositivos de la invención polarizados en fenotipos M1 o M2 (como se muestra en las Figuras 48A-48B), lo que sugiere que la salud y función celular se conservan después de la electroporación mediante el uso de dispositivos de la invención. Los macrófagos electroporados se polarizaron en fenotipos M1 (FIGS. 48A) o M2 (FIGS. 48B) y retuvieron la expresión de ARNm de GFP hasta 72 horas después de la electroporación mediante de dispositivos de la invención.

Los dispositivos de la invención pueden superar al sistema de transfección comercial para la electroporación de monocitos primarios. Como se muestra en las Figuras 49A-49C, la administración de dextrano marcado con FITC en monocitos primarios mediante el uso de dispositivos de la invención supera el rendimiento del sistema de transfección NEON® para células humanas primarias, con un marcado aumento en el número total de células vivas de salida que se transfectan con éxito.

*Ejemplo 18 - Dispositivos de flujo continuo de la invención: fabricación de células de gran volumen y alto número de células*

Los dispositivos de la invención pueden usarse para la electroporación de grandes volúmenes y suspensiones de alto número de células de una manera de flujo verdaderamente continuo. Las tecnologías existentes, como la unidad Lonza 4D-NUCLEOFECTOR™ LV y los sistemas de transfección escalables Maxcyte (STX, VLX o GT) se basan en el flujo de fluido para cargar las muestras en su cartucho NUCLEOCUVETTE™ o ensamblaje de procesamiento, respectivamente. Sin embargo, durante la entrega de impulsos eléctricos, la células y las suspensiones de carga útil están estacionarias. Los sistemas de electroporación disponibles comercialmente tratan suspensiones de células estáticas o estacionarias, lo cual es una diferencia crítica con respecto a los dispositivos de la invención. Los dispositivos de la invención permiten el flujo continuo de la célula y la suspensión de la carga útil durante la exposición a los campos eléctricos. Específicamente, las células que fluyen rápidamente se exponen a un campo eléctrico suficiente para romper la membrana celular e internalizar la carga útil genética de interés, pero se dispensan inmediatamente en sus medios de crecimiento para la recuperación celular. Además, cualquier calor que se genera durante el proceso de electroporación se disipa debido a la transferencia de calor por convección que es facilitada por las muestras que fluyen directamente al

medio de recuperación. Este estudio amplía significativamente los datos generados, tanto en tipo de célula como en escala de las electroporaciones.

*a. Demostración inicial en células Jurkat*

Se usó un intervalo de densidades de células y volúmenes de electroporación para demostrar la escalabilidad de una plataforma de flujo continuo en relación con una plataforma de dispositivo único usando dispositivos de la invención. En estos experimentos, se demuestra que la plataforma escalable de la invención opera en una amplia gama de densidades de células Jurkat, mostradas en las Figuras 50A-50D.

*b. Estudios de comparabilidad entre plataformas de la invención*

Se realizaron experimentos de seguimiento para comparar el rendimiento de electroporación de los dispositivos de la invención y la plataforma de electroporación de flujo continuo de la invención mediante las mismas condiciones de administración tanto para Jurkat como para los linfocitos T primarios. En estos experimentos comparativos, se procesaron 5 millones de células a través de la plataforma de flujo continuo, mostrando resultados comparables a los dispositivos de un solo canal de la invención para células Jurkat y linfocitos T primarias, como se muestra en las Figuras 51A y 51B.

*c. Mayor escala de electroporación de linfocitos T*

Para probar si la electroporación dependía de la densidad celular, los experimentos de electroporación descritos en las Figuras 51A y 51B se expandieron a suspensiones de células que contenían hasta 100 millones de linfocitos T primarios. En el primer experimento, se procesaron números crecientes de linfocitos T a la misma densidad celular, aumentando la escala de 5 millones (como se muestra en la Figura 51B) hasta 100 millones de linfocitos T (como se muestra en las Figuras 52A-52D), sin una pérdida de rendimiento. Se evaluó entonces densidad celular deseada, que muestra que los linfocitos T pueden ser procesados a través de la plataforma escalable de la invención a velocidades de hasta  $100 \times 10^6$  células/mL, como se muestra en las Figuras 53A-53D. Es importante destacar que el procesamiento de 100 millones de linfocitos T fue exitoso con cantidades de ARNm 5 veces más bajas en comparación con los linfocitos T procesadas a la densidad celular más baja, lo que demuestra un posible ahorro en el costo de bienes para cargas útiles entregadas a densidades celulares altas. El tiempo total de procesamiento de los 100 millones de linfocitos T en este experimento varió de 2,4 a 24 segundos.

*d. Estudio de comparabilidad con el sistema Lonza de gran volumen (LV)*

Se realizó una comparación de la plataforma escalable de la invención con el sistema Lonza 4D LV mediante el uso de linfocitos T primarios con cargas útiles de ARNm de FITC-dextrano y EGFP. Los experimentos se realizaron con 50 millones de linfocitos T. A las 24 horas, la tinción celular reveló que la morfología y el fenotipo de las células tratadas con Lonza diferían significativamente de las células no tratadas (mostradas en los gráficos de citometría de flujo de la Figura 54).

Además, se observaron poblaciones de células muertas significativas con las células tratadas con Lonza LV. Estos resultados no ocurrieron en los linfocitos T electroporados con la plataforma de flujo continuo de la invención, lo que indica que la plataforma de flujo continuo de la invención mantuvo la morfología de los linfocitos T a través del proceso de electroporación. Como se muestra en la Figura 55, el rendimiento total de células mediante el uso de la plataforma de flujo continuo de la invención es mayor que el del sistema Lonza 4D LV, independientemente de la carga útil que se entregue, por ejemplo, dextrano marcado con FITC o ARNm de GFP.

La plataforma de flujo continuo de la invención ha mostrado una electroporación satisfactoria de cargas útiles en suspensiones de muy alta densidad, por ejemplo, mil millones de células. Como se muestra en las Figuras 56A y 56B, mil millones de células THP-1 en un volumen de 10 ml (concentración de  $100 \times 10^6$  células/mL) se transfectaron con éxito con moléculas de dextrano marcadas con FITC de 40 kDa mediante el uso de la plataforma de flujo continuo de la invención. La Figura 57 muestra el rendimiento, representado como el recuento de células FITC vivas, para el experimento mostrado en las Figuras 56A y 56B, medidos hasta 72 horas después de la electroporación. En este momento, el número de células positivas para FITC era de aproximadamente 500 millones, como resultado de un recuento de células de entrada de mil millones, lo que indica la capacidad de la plataforma de flujo continuo de la invención para entregar 1 de cada 2 células de entrada como productos de células modificadas a las 72 horas.

*Ejemplo 19 - Formas de onda pulsadas, voltaje de CC, combinación de alto voltaje - bajo voltaje y combinaciones de estos*

Los dispositivos de la invención se probaron con fuentes de alimentación tanto de pulso como de corriente continua (CC), como se muestra en las Figuras 58A-58D. A los voltajes más altos probados, ambas fuentes de alimentación mostraron una eficiencia de suministro similar de FITC-dextrano en células Jurkat. Además, se probaron electroporaciones iniciales con combinaciones de alto y bajo voltaje para el mismo sistema. Como se muestra en las Figuras 59A-59D, hemos analizado el uso de formas de onda modificadas para la mejora de la electroporación usando dispositivos de la invención con combinaciones de alto y bajo voltaje para la optimización del suministro de linfocitos T humanos primarios, inicialmente con FITC-dextrano. El experimento de las Figuras 59A-59D para el suministro de una carga útil de ARNm disponible comercialmente que codifica la proteína informadora fluorescente de eGFP, que se muestra en las Figuras 60A-60D.

*Ejemplo 20 - Electroporación por Dynabead*

Para demostrar la compatibilidad de los dispositivos de la invención con ciertos protocolos de expansión de linfocitos T, las linfocitos T que se habían expandido con las Dynabeads CD3/CD28 se sometieron a electroporación mediante el uso dispositivos de la invención. La electroporación de muestras expandidas con Dynabead se realizó con la adición inmediata de perlas (5 minutos antes de la electroporación) a la suspensión de 1 millón de linfocitos T humanas primarias o

después de un tratamiento durante la noche (OVN), con ambos períodos de tiempo a través resultados de eficiencia equivalentes cuando las perlas magnéticas estaban presentes hasta cuando las perlas no estaban presentes (Figura 61).

*Ejemplo 21 - Estructura exterior para energizar dispositivos de la invención*

5 La invención proporciona una estructura exterior que se ajusta y asegura a los dispositivos de la invención, diseñada para mejorar la facilidad de uso, la eficacia y la seguridad durante la electroporación con los dispositivos de la invención. La estructura exterior está hecha de polímeros no conductores en las superficies exteriores que protegen a los usuarios de exposiciones a alto voltaje y minimizan el riesgo de descarga eléctrica para el usuario durante el flujo de trabajo de electroporación. La estructura exterior se adapta al diseño actual de los dispositivos de la invención y puede modificarse para aceptar variaciones de diseños futuros de los dispositivos de la invención. La estructura exterior acepta la señal eléctrica suministrada desde una fuente de alimentación o un amplificador de alto voltaje y redistribuye la señal a los electrodos de los dispositivos de la invención encapsulando el dispositivo dentro de la estructura exterior. La encapsulación del electrodo de los dispositivos de la invención crea un entorno de trabajo más seguro para el usuario de los dispositivos al minimizar las superficies de alto voltaje que están expuestas. La estructura exterior también facilita la realización de experimentos repetidamente sin quitar las conexiones eléctricas. En las Figuras 62A y 62B se muestra una modalidad de una estructura exterior de la invención que presenta una bisagra de estilo concha de almeja y una abrazadera. En la Figura 62A, 62.1 es un orificio pasante de un electrodo positivo/negativo para las conexiones al suministro de energía.

62.2 es un segundo orificio pasante de electrodo positivo/negativo para conexiones al suministro de energía. 62.3 es la bisagra de estilo concha. Por ejemplo, la bisagra puede ser una bisagra viva, lo que permite que la estructura exterior se cierre sobre sí misma y se acople al mecanismo de bloqueo. Este mecanismo de cerramiento permite que la estructura exterior encierre los electrodos del dispositivo de la invención, asegurando el contacto eléctrico entre ambos dispositivos. 62.4 es un pestillo u otro sujetador mecánico que se utiliza para asegurar el cierre de la estructura exterior durante la electroporación. Este diseño también permite que la estructura exterior sea reutilizable al hacer que el mecanismo de cierre se active temporalmente. 62.5 es un pasador de alineación que asegura que las estructuras externas se plieguen con la alineación correcta para minimizar cualquier desviación que distorsionaría las conexiones de los electrodos entre la estructura externa y los dispositivos de la invención. 62.6 son ranuras para los electrodos del dispositivo de la invención. 62.7 y 62.8 son el cuerpo de un dispositivo de la invención y el primer y segundo electrodos definen la zona de electroporación del dispositivo de la invención, respectivamente.

En uso, la estructura externa conectada a los dispositivos de la invención no mostró una pérdida

significativa en la eficiencia o viabilidad de la transfección cuando se realiza la electroporación usando dispositivos de la invención sin la estructura externa. Como se muestra en las Figuras 63A-63B, la viabilidad y eficiencia de los monocitos THP-1 transfectados con dextrano marcado con FITC fue aproximadamente la misma usando dispositivos de la invención con o sin la estructura exterior sobre los electrodos del dispositivo.

*Ejemplo 22 - Material de fabricación para dispositivos desechables*

Los dispositivos de la invención se construyen a partir de formulaciones de resina producidas y vendidas por Formlabs (Somerville, MA, EE.UU.). En particular, los dispositivos de la invención se fabrican a partir de la "resina transparente" o la "resina duradera" comercializada por Formlabs. La principal diferencia entre las resinas Duradera y Transparente son las propiedades mecánicas. La resina transparente es más frágil en términos de comportamiento mecánico y la resina duradera tiene una mayor ductilidad en la medida que el rendimiento mecánico es más similar al del polipropileno, el material con el que se fabrican las puntas de pipeta convencionales.

Los dispositivos de la invención se imprimen en 3D utilizando tecnología de estereolitografía con fines de creación de prototipos. Para el procesamiento a gran escala, como el moldeo por inyección, el dispositivo de la invención se fabricará a partir de otras resinas, como la resina duradera, que simula fielmente propiedades mecánicas del polipropileno. Para examinar si el material de resina impacta en la electroporación, las FIGS. 64A y 64B muestran la administración de dextrano marcado con FITC en monocitos THP-1 utilizando dispositivos de la invención fabricados a partir de la resina transparente y las resinas duraderas de Formlabs. La elección del material no tuvo como resultado un cambio significativo en el rendimiento de los dispositivos de la invención.

*Ejemplo 23 - Transfección automatizada frente a conducción de muestras manual (electrónica)*

Los dispositivos de la invención han permitido la ingeniería rápida, de alto rendimiento y automatizada de células humanas. Las aplicaciones de esta tecnología están muy extendidas, desde la investigación fundamental en fisiología celular hasta el descubrimiento de nuevos objetivos para terapias celulares. Las aplicaciones en terapias celulares por sí solas pueden contribuir a una creciente industria multimillonaria. El estado actual de la técnica en manipulación genética a escala de investigación es manual intensivo y difícil de incorporar con sistemas automatizados de manipulación de líquidos. Los dispositivos de la invención se pueden incorporar fácilmente a una amplia gama de plataformas de manipulación de líquidos. Esta integración permitirá a los investigadores del mundo académico y de la industria explorar rápidamente una amplia gama de cuestiones relacionadas con la genética. Los dispositivos de la invención tienen el potencial de facilitar la ingeniería celular a escala de investigación miles de veces más rápido que el estado actual de la técnica, lo que lleva a descubrimientos que cambian vidas en la atención médica y las ciencias biológicas fundamentales.

Los experimentos en linfocitos T descritos en el presente documento se realizaron originalmente con dispositivos de la invención de un solo uso. Con el sistema automatizado que incorpora dispositivos de la invención, la transfección se puede simplificar y configurar de una manera de alto rendimiento. Se programaron ocho jeringas controladas de forma independiente para impulsar la suspensión celular en los dispositivos de la invención de un solo uso. Se aspiraron muestras de 100 µl por encima de la zona de electroporación de cada dispositivo y se energizaron durante la dispersión activa en el medio de crecimiento de recuperación. Se compararon tres métodos automatizados de transfección que utilizaban desplazamiento de aire (pipeta electrónica manual) o desplazamiento de fluido (sistema automatizado) para impulsar las muestras. La viabilidad resultante se mantuvo en niveles elevados (>90 %) cuando se usa la metodología de la puerta de linfocitos para los 3 sistemas evaluados (mostrados en las FIGS 65A y 65B). Sin embargo, al observar la eficiencia de la transfección, está claro que el sistema automatizado, que emplea tecnología de desplazamiento de fluidos para controlar con precisión la velocidad de flujo, es superior al manual.

*Ejemplo 24 - Coadministración de reactivo de ARNm en linfocitos T primarios*

Se evaluó la coadministración de dos tipos de ARNm en linfocitos T usando dispositivos de la invención. Estos experimentos se realizaron con dos ARNm de origen comercial que codifican GFP o mCherry. Los experimentos se completaron en paralelo (el mismo día) o en serie (con dos días de diferencia). Los dispositivos de la invención pudieron administrar con éxito ambos ARNm, como lo demuestra la expresión de GFP y mCherry observada en las Figuras 66A-66E.

*Ejemplo 25 - Transfecciones de células mononucleares de sangre periférica de poblaciones mixtas*

También se demostró la administración de ARNm en poblaciones primarias de células mixtas humanas (es decir, PBMC) usando dispositivos de la invención. Estos experimentos se llevaron a cabo con un ARNm comercialmente disponible que codifica GFP, seguido de tinción de fenotipos de los receptores de superficie para identificar las poblaciones de células específicas. Se logró la administración de ARNm a tanto linfocitos T sin activar (CD45RA+) y de memoria (CD45RO+), como se muestra en la Figura 67A. Además, entrega de ARNm a los linfocitos B (CD19+) y células citolíticas NK (CD56+) de la población mixta, como se muestra en la Figura 67B.

*Ejemplo 26 - Transfección de ARNm de iPSC adherentes primarias*

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) se seccionaron con eGFP-mRNA, en suspensión, usando un dispositivo de la invención (FLOWFECT™). Las células se evaluaron 24 horas después de la transfección en busca de indicios de transfección positiva usando microscopía fluorescente. Las imágenes se representan como una imagen superpuesta de GFP y campo claro para capturar la adherencia, la morfología celular y la expresión de eGFP-mRNA (imágenes representativas mostradas con un aumento de 10x; Figura 69A). Las células también se evaluaron a las 96 horas después de la transfección mediante un citómetro de flujo para determinar la

proporción de células viables (7AAD<sup>-</sup>) y transfectadas positivamente (GFP + 7AAD<sup>-</sup>) (datos representativos mostrados como media  $\pm$  SEM; Figuras 69B y 69C).

*Ejemplo 27 - Transfección de ARNm de células asesinas naturales humanas primarias*

Las células citolíticas (CD56<sup>+</sup>) se sometieron a electroporación con ARNm que codifica GFP.

- 5 Después de 24 horas, las células se analizaron en busca de viabilidad y eficiencia. Los recuentos y viabilidades de células citolíticas se muestran en las Figuras 70A-70B. Los dispositivos de la invención pudieron administrar ARNm con éxito, como lo demuestra el ~95 % de expresión de GFP observada en la Figura 70C. El rendimiento total de células vivas de GFP<sup>+</sup> en comparación con las células vivas no tratadas a las 24 horas fue ~57 %, como se muestra en la Figura 70D.

10 *Ejemplo 28 - Comparación cruzada de plataformas*

Se transfectaron linfocitos T primarios humanos con una molécula informadora mediante el uso de un dispositivo de la invención, la plataforma de transfección ThermoFisher's Neon (2100V/1 pulsos/20ms), o Lonza 4D-Nucleofector (Programa: EO115) utilizando los ajustes recomendados por el fabricante como se indica. Se muestran en las Figuras 71A y 71B la viabilidad y la eficacia de transfección 24 horas después de la transfección. Con el uso de la misma configuración, se procesaron linfocitos T primarios humanos sin carga útil y se evaluó la desregulación génica seis horas después del procesamiento (Figura 71C).

*Ejemplo 29 - Perfiles de voltaje - velocidad de flujo*

- 20 Se transfectaron linfocitos T primarios humanos con ARNm informador de GFP mediante el uso de múltiples combinaciones de velocidad de flujo y energía aplicada. Se muestra en las Figuras 72A-72D y 73A-73D mapas térmicos para el recuento relativo de células, la viabilidad (porcentaje de células 7AAD<sup>-</sup>), la eficacia (porcentaje de células GFP<sup>+</sup> vivas) y el recuento de células de rendimiento (recuentos de células GFP<sup>+</sup> vivas) por reacción a las 24 horas después de la transfección, que se muestran como una función de  $V_{rms}$  (eje y) y la velocidad de flujo (eje x) variables.

- 25 La Figura 74 muestra el rendimiento de células vivas a través de diferentes energías aplicadas ( $V_{rms}^2/R$ )s y velocidades de flujo. Se transfectaron linfocitos T primarios humanos con FITC Dextrano usando múltiples combinaciones de velocidad de flujo (FR) y energía aplicada (VV). Se muestra una gráfica de densidad que muestra que la misma energía aplicada a diferentes velocidades de flujo tiene como resultado diferentes recuentos de rendimiento (recuentos de células FITC<sup>+</sup> en vivo).

**Modalidades numeradas**

Algunas modalidades de la tecnología descrita en este documento se pueden definir de acuerdo con cualquiera de los siguientes párrafos numerados:

- 35 1. Un dispositivo para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, el dispositivo comprende:

- (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
- 5 (c) una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, en la que la zona de electroporación comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a alrededor de 100  $\mu\text{m}$ , 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
- 10 de fluidos, donde la composición se suministra a la pluralidad de células suspendidas en el fluido al entrar en la zona de electroporación.
2. Un dispositivo para electroporar una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, que comprende:
- (a) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen
- 15 del primer electrodo comprende una zona de entrada;
- (b) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación; y
- (c) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida
- a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona
- 20 de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación,
- donde la pluralidad de células suspendidas en el fluido se electroporan al entrar en la zona de electroporación.
- 25 3. El dispositivo del párrafo 1 o del párrafo 2, que comprende además un primer depósito conectado de forma fluida a la zona de entrada.
4. El dispositivo del párrafo 1 o del párrafo 2, que comprende además un segundo depósito conectado de forma fluida a la zona de recuperación.
5. El dispositivo del párrafo 1 o del párrafo 2, donde la sección transversal de la zona de
- 30 electroporación se selecciona del grupo que consiste en circular, cilíndrica, elipsoidal, poligonal, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.
6. El dispositivo del párrafo 1 o párrafo 2, donde la dimensión de corte transversal de la zona de entrada se encuentra entre 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.
- 35 7. El dispositivo del párrafo 1 o el párrafo 2, donde la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación o la dimensión de la sección transversal de la zona de recuperación se

encuentra entre el 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de la sección transversal más grande de la zona de electroporación.

8. El dispositivo del párrafo 1 o del párrafo 2, donde la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm.

5 9. El dispositivo del párrafo 1 o del párrafo 2, donde la longitud de la zona de electroporación se encuentra entre 0,005 mm y 50 mm.

10. El dispositivo del párrafo 1 o del párrafo 2, donde la dimensión de sección transversal de cualquiera de cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo se encuentra entre 0,01 mm y 500 mm.

10 11. El dispositivo del párrafo 1 o el párrafo 2, donde ninguna de la zona de entrada, zona de recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido.

12. El dispositivo del párrafo 1 o párrafo 2, donde la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular luego de salir de la zona de electroporación.

13. El dispositivo del párrafo 1 o párrafo 2, la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación.

14. El dispositivo del párrafo 1 o párrafo 2, que comprende adicionalmente una estructura externa que comprende un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del dispositivo.

15. El dispositivo del párrafo 14, donde la estructura exterior comprende una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.

16. El dispositivo del párrafo 14 o del párrafo 15, donde la estructura exterior es integral al dispositivo.

17. El dispositivo del párrafo 14 o del párrafo 15, donde la estructura exterior se conecta de forma removible al dispositivo.

18. Un dispositivo para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, comprende:

30 (a) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;

(b) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación;

35 (c) una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida intersecan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida;

(d) una cuarta entrada y una cuarta salida, donde la cuarta entrada y la cuarta salida intersecan el

segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida;

(e) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida de la zona de entrada y la segunda entrada de la zona de recuperación, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación, donde la composición se administra a la pluralidad de célula suspendida en el fluido luego de ingresar a la zona de electroporación.

19. Un dispositivo para electroporar una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, que comprende:

(a) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;

(b) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación,

(c) una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida intersecan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida;

(d) una cuarta entrada y una cuarta salida, donde la cuarta entrada y la cuarta salida intersecan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida;

(e) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida de la zona de entrada y la segunda entrada de la zona de recuperación, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación, donde la pluralidad de células suspendidas en el fluido se electroporan al entrar en la zona de electroporación.

20. El dispositivo del párrafo 18 o del párrafo 19, que comprende además un primer depósito conectado de forma fluida a la zona de entrada.

21. El dispositivo del párrafo 18 o del párrafo 19, que comprende además un segundo depósito conectado de forma fluida a la zona de recuperación.

22. El dispositivo del párrafo 18 o del párrafo 19, que comprende adicionalmente un tercer depósito conectado de forma fluida a la tercera entrada y a la tercera salida.

23. El dispositivo del párrafo 18 o del párrafo 19, que comprende adicionalmente un depósito adicional conectado adicionalmente a la cuarta entrada y a la cuarta salida.

24. El dispositivo del párrafo 18 o del párrafo 19, donde la sección transversal de la zona de electroporación se selecciona del grupo que consiste en circular, elipsoidal, poligonal (por ejemplo, polígono regular, polígono irregular), estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.

25. El dispositivo del párrafo 18 o párrafo 19, donde la dimensión de corte transversal de la zona de entrada se encuentra entre 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.
- 5 26. El dispositivo del párrafo 18 o párrafo 19, donde la dimensión de corte transversal de la zona de recuperación se encuentra entre 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.
27. El dispositivo del párrafo 18 o del párrafo 19, donde la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm.
- 10 28. El dispositivo del párrafo 18 o del párrafo 19, donde la longitud de la zona de electroporación se encuentra entre 0,005 mm y 50 mm.
29. El dispositivo del párrafo 18 o del párrafo 19, donde la dimensión de sección transversal de cualquier de cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo se encuentra entre 0,1 mm y 5 mm.
- 15 30. El dispositivo del párrafo 18 o del párrafo 19, donde cualquiera del primer electrodo o del segundo electrodo es poroso.
31. El dispositivo del párrafo 18 o el párrafo 19, donde ninguna de la zona de entrada, zona de recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de la sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido.
- 20 32. El dispositivo del párrafo 18 o párrafo 19, donde la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular luego de salir de la zona de electroporación.
33. El dispositivo del párrafo 18 o párrafo 19, donde la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación.
- 25 34. El dispositivo del párrafo 18 o párrafo 19, que comprende adicionalmente una estructura externa que comprende un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del dispositivo.
35. El dispositivo del párrafo 34, donde la estructura exterior comprende una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.
- 30 36. El dispositivo del párrafo 34 o del párrafo 35, donde la estructura exterior es integral al dispositivo.
37. El dispositivo del párrafo 34 o del párrafo 35, donde la estructura exterior se conecta de forma removible al dispositivo.
38. Un sistema para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de  
35 células suspendidas en un fluido, comprende:
- (a) un dispositivo, que comprende:

- (i) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;
  - (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación; y
  - 5 (iii) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación;
  - 10 (b) una fuente de potencial eléctrico, donde el primer y segundo electrodos del dispositivo están conectados de manera removible a la fuente de potencial eléctrico, donde la composición se administra en la pluralidad de célula suspendida en el fluido luego de ingresar a la zona de electroporación.
39. Un sistema para electroporar una composición en una pluralidad de células suspendidas en un
- 15 fluido, que comprende:
- (a) un dispositivo, que comprende:
    - (i) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;
    - (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un
    - 20 lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación; y
    - (iii) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce
    - 25 un campo eléctrico en la zona de electroporación;
  - (b) una fuente de potencial eléctrico, donde el primer y segundo electrodos del dispositivo están conectados de manera removible a la fuente de potencial eléctrico, donde la pluralidad de células suspendidas en el fluido se electroporan al entrar en la zona de electroporación.
- 30 40. El sistema del párrafo 38 o párrafo 39, donde la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular luego de salir de la zona de electroporación del dispositivo.
41. El sistema del párrafo 38 o párrafo 39, donde la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación.
- 35 42. El sistema del párrafo 38 o párrafo 39, donde el dispositivo que comprende adicionalmente una estructura exterior que comprende un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, el

segundo electrodo y la zona de electroporación del dispositivo.

43. El sistema del párrafo 38 o párrafo 39, donde la estructura exterior comprende una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.

5 44. El sistema del párrafo 43, donde la fuente de potencial eléctrico está conectada de forma removible a la primera y segunda entrada eléctrica de la estructura exterior.

45. El sistema del párrafo 44, donde la conexión removible entre la primera o segunda entrada eléctrica y la fuente de potencial eléctrico se selecciona del grupo que consiste en una abrazadera, un clip, un resorte, una funda, un cepillo de alambre o una combinación de estos.

10 46. El sistema del párrafo 38 o del párrafo 39, donde la estructura exterior es integral al dispositivo.

47. El sistema del párrafo 38 o del párrafo 39, donde la estructura exterior se conecta de forma removible al dispositivo.

48. El sistema del párrafo 38 o del párrafo 39, donde la electroporación es una electroporación reversible sustancialmente no térmica.

15 49. El sistema del párrafo 38 o del párrafo 39, donde la electroporación es una electroporación irreversible sustancialmente no térmica.

50. El sistema del párrafo 38 o del párrafo 39, donde la electroporación es una electroporación reversible sustancialmente térmica.

20 51. El sistema del párrafo 38 o párrafo 39, donde la conexión removible entre el dispositivo y la fuente de potencial eléctrico se selecciona del grupo que consiste en una abrazadera, un clip, un resorte, una funda, un cepillo de alambre o una combinación de estos.

52. El sistema del párrafo 51, donde la conexión removible entre el dispositivo y la fuente de potencial eléctrico es un resorte.

25 53. El sistema del párrafo 38 o del párrafo 39, que comprende además un primer depósito conectado de forma fluida a la zona de entrada.

54. El dispositivo del párrafo 38 o del párrafo 39, que comprende además un segundo depósito conectado de forma fluida a la zona de recuperación.

30 55. El sistema del párrafo 38 o del párrafo 39, donde la sección transversal de la zona de electroporación se selecciona del grupo que consiste en circular, elipsoidal, poligonal, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.

56. El sistema del párrafo 38 o párrafo 39, donde la dimensión de corte transversal de la zona de entrada se encuentra entre 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.

35 57. El dispositivo del párrafo 38 o párrafo 39, donde la dimensión de corte transversal de la zona de recuperación se encuentra entre 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.

58. El sistema del párrafo 38 o el párrafo 39, donde ninguna de la zona de entrada, zona de recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de la sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en un fluido.
59. El sistema del párrafo 38 o el párrafo 39, donde el ciclo de trabajo de la electroporación está entre 0,001 % y 100 %.
60. El sistema del párrafo 38 o del párrafo 39, donde la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm.
61. El dispositivo del párrafo 38 o del párrafo 39, donde la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm.
62. El dispositivo del párrafo 38 o del párrafo 39, donde la dimensión de sección transversal de cualquier de cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo se encuentra entre 0,1 mm y 5 mm.
63. El sistema de párrafo 38 o párrafo 39, que comprende adicionalmente una fuente de administración de fluido conectada de forma fluida a la zona de entrada, donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar la pluralidad de células suspendidas en el fluido a través de la zona de entrada a la zona de comparación.
64. El sistema del párrafo 63, donde la tasa de suministro desde la fuente de suministro de fluido está entre 0,001 mL/min y 1000 mL/min.
65. El sistema del párrafo 38 o del párrafo 39, donde el tiempo de residencia de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido está entre 0,5 ms y 50 ms.
66. El sistema del párrafo 38 o el párrafo 39, que comprende además un controlador acoplado operativamente a la fuente de potencial eléctrico para administrar pulsos de voltaje al primer electrodo y el segundo electrodo para generar una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y el segundo electrodo.
67. El sistema del párrafo 66, donde los pulsos de voltaje tienen una amplitud entre 0,01 kV y 3 kV.
68. El sistema del párrafo 66, donde los pulsos de tensión tienen una duración de entre 0,01 ms y 1000 ms.
69. El sistema del párrafo 66, donde los pulsos de voltaje se aplican al primer y segundo electrodos a una frecuencia entre 1 Hz y 50 000 Hz.
70. El sistema de párrafo 66, donde la forma de onda del pulso de voltaje se selecciona del grupo que consiste en CC, cuadrado, pulso, bipolar, sinusoidal, rampa, bipolar asimétrico, arbitrario y cualquier superposición o combinaciones de estos.
71. El sistema del párrafo 66, 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.
72. El sistema de cualquiera de los párrafos 38-71, donde el fluido tiene una conductividad de entre 0,001 mS/cm y 500 mS/cm.

73. El sistema de cualquiera de los párrafos 36-68, que comprende además un alojamiento configurada para albergar el dispositivo.
74. El sistema del párrafo 73, donde el alojamiento comprende además un controlador térmico configurado para aumentar o disminuir la temperatura del alojamiento.
- 5 75. El sistema del párrafo 74, donde el controlador térmico es un elemento térmico seleccionado del grupo que consiste en un bloque térmico, flujo del líquido, calentador activado mediante batería y un calentador de película fina.
76. El sistema del párrafo 74, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado del grupo que consiste en un flujo de líquido, enfriador evaporativo y un dispositivo
- 10 de Peltier.
77. El sistema de cualquiera de los párrafos 38-76, que comprende además una pluralidad de dispositivos de poración de células.
78. El sistema del párrafo 77, que comprende además una pluralidad de estructuras externas.
79. Un sistema para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de
- 15 células suspendidas en un fluido, comprende:
- (a) un dispositivo, que comprende:
- (i) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;
- (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un
- 20 lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación,
- (iii) una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida intersecan el primer electrodo entre la primera entrada y la primera salida;
- (iv) una cuarta entrada y una cuarta salida, en la que la cuarta entrada y la cuarta salida intersecan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida;
- 25 (v) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida de la zona de entrada y la segunda entrada de la zona de recuperación, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación; y
- 30 (b) una fuente de potencial eléctrico, donde el primer y segundo electrodos del dispositivo están conectados de manera removible a la fuente de potencial eléctrico, donde la composición se administra en la pluralidad de célula suspendida en el fluido luego de ingresar a la zona de electroporación.
80. Un sistema para electroporar una composición en una pluralidad de células suspendidas en un
- 35 fluido, que comprende:
- (a) un dispositivo, que comprende:

- (i) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;
  - (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación,
  - 5 (iii) una tercera entrada y una tercera salida, donde la tercera entrada y la tercera salida intersecan 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 intersecan el segundo electrodo entre la segunda entrada y la segunda salida;
  - (v) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida
  - 10 a la primera salida de la zona de entrada y la segunda entrada de la zona de recuperación, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación; y
  - (b) una fuente de potencial eléctrico, donde el primer y segundo electrodos del dispositivo están
  - 15 conectados de manera removible a la fuente de potencial eléctrico, donde la pluralidad de células suspendidas en el fluido se electroporan al entrar en la zona de electroporación.
81. El sistema del párrafo 79 o párrafo 80, donde la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular luego
- 20 de salir de la zona de electroporación del dispositivo.
82. El sistema del párrafo 79 o párrafo 80, donde la pluralidad de células no tiene ningún cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación.
83. El sistema del párrafo 79 o párrafo 80, donde el dispositivo que comprende adicionalmente una estructura exterior que comprende un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, el
- 25 segundo electrodo y la zona de electroporación del dispositivo.
84. El sistema del párrafo 79 o párrafo 80, donde la estructura exterior comprende una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.
85. El sistema del párrafo 79 o párrafo 80, donde la fuente de potencial eléctrico está conectada de
- 30 forma removible a la primera y segunda entrada eléctrica de la estructura exterior.
86. El sistema del párrafo 85, donde el que la conexión removible entre la primera o segunda entrada eléctrica y la fuente de potencial eléctrico se selecciona del grupo que consiste en una abrazadera, un clip, un resorte, una funda, un cepillo de alambre o una combinación de estos.
87. El sistema del párrafo 83, donde la estructura exterior es integral al dispositivo.
- 35 88. El sistema del párrafo 83, donde la estructura exterior se conecta de forma removible al dispositivo.

89. El sistema del párrafo 79 o del párrafo 80, donde la electroporación es una electroporación reversible sustancialmente no térmica.
90. El sistema del párrafo 79 o del párrafo 80, donde la electroporación es una electroporación irreversible sustancialmente no térmica.
- 5 91. El sistema del párrafo 79 o del párrafo 80, donde la electroporación es una electroporación reversible sustancialmente térmica.
92. El sistema del párrafo 79 o del párrafo 80, que comprende además un primer depósito conectado de forma fluida a la zona de entrada.
93. El dispositivo del párrafo 79 o del párrafo 80, que comprende además un segundo depósito  
10 conectado de forma fluida a la zona de recuperación.
94. El sistema del párrafo 79 o del párrafo 80, que comprende adicionalmente un tercer depósito conectado de forma fluida a la tercera entrada y a la tercera salida.
95. El sistema del párrafo 79 o del párrafo 80, que comprende adicionalmente un cuarto yacimiento conectado de forma fluida a la cuarta entrada y la cuarta salida.
- 15 96. El dispositivo del párrafo 79 o del párrafo 80, donde la sección transversal de la zona de electroporación se selecciona del grupo que consiste en circular, elipsoidal, poligonal, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.
97. El sistema del párrafo 79 o párrafo 80, donde la dimensión de corte transversal de la zona de entrada se encuentra entre 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona  
20 de electroporación.
98. El sistema del párrafo 79 o párrafo 80, donde la dimensión de corte transversal de la zona de recuperación se encuentra entre 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.
99. El sistema del párrafo 79 o el párrafo 80, donde ninguna de la zona de entrada, zona de  
25 recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de la sección transversal de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en un fluido.
100. El sistema del párrafo 79 o el párrafo 80, donde el ciclo de trabajo de la electroporación está entre 0,001 % y 100 %.
101. El sistema de párrafo 79 o párrafo 80, donde la dimensión de sección transversal de la zona  
30 de electroporación se encuentra entre 0,005 mm y 50 mm.
102. El dispositivo del párrafo 79 o del párrafo 80, donde la dimensión de la sección transversal de la zona de electroporación se encuentra entre 0,005 mm y 50 mm.
103. El dispositivo del párrafo 79 o del párrafo 80, donde la dimensión de sección transversal de cualquier de cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo se encuentra entre 0,1 mm y  
35 5 mm.
104. El sistema de párrafo 79 o párrafo 80, que comprende adicionalmente una fuente de

administración de fluido conectada de forma fluida a la zona de entrada, donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar la pluralidad de células suspendidas en el fluido a través de la zona de entrada a la zona de comparación.

105. El sistema del párrafo 104, donde la tasa de suministro desde la fuente de suministro de fluido está entre 0,001 mL/min y 1000 mL/min.
106. El sistema del párrafo 79 o del párrafo 80, donde el tiempo de residencia de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido está entre 0,5 ms y 50 ms.
107. El sistema del párrafo 79 o el párrafo 80, que comprende además un controlador acoplado operativamente a la fuente de potencial eléctrico para administrar pulsos de voltaje al primer electrodo y el segundo electrodo para generar una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y el segundo electrodo.
108. El sistema del párrafo 107, donde los pulsos de voltaje tienen una amplitud entre 0,01 kV y 3 kV.
109. El sistema del párrafo 107, donde los pulsos de tensión tienen una duración de entre 0,01 ms y 1000 ms.
110. El sistema del párrafo 107, donde los pulsos de voltaje se aplican al primer y segundo electrodos a una frecuencia entre 1 Hz y 50 000 Hz.
111. El sistema de párrafo 107, donde la forma de onda del pulso de voltaje se selecciona del grupo que consiste en CC, cuadrado, pulso, bipolar, sinusoidal, rampa, bipolar asimétrico, arbitrario y cualquier superposición o combinaciones de estos.
112. El sistema del párrafo 107, 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.
113. El sistema del párrafo 79 o párrafo 80, donde el fluido tiene una conductividad de entre 0,001 mS/cm y 500 mS/cm.
114. El sistema de cualquiera de los párrafos 79-113, que comprende además una pluralidad de dispositivos de transfección celular.
115. El sistema del párrafo 114, que comprende además una pluralidad de estructuras externas.
116. Un método de administración electromecánica de una composición en al menos una parte de una pluralidad de células suspendidas en un fluido, el método comprende:
  - (a) que proporciona un dispositivo que comprende:
    - (i) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;
    - (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación; y
    - (iii) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, y donde la

aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación,

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

(c) hacer pasar la pluralidad de células suspendidas en el fluido con la composición a través del campo eléctrico en la zona de electroporación del dispositivo;

donde el flujo de la pluralidad de células suspendidas en fluido con la composición a través del campo eléctrico en la zona de electroporación mejora la permeabilidad temporal de la pluralidad de células, introduciendo así la composición en al menos una parte de la pluralidad de células.

117. Un método de administración electromecánica de una composición en al menos una parte de una pluralidad de células suspendidas en un fluido, el método comprende:

(a) que proporciona un dispositivo que comprende:

(i) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;

(ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación; y

(iii) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación;

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

(c) hacer pasar la pluralidad de células suspendidas en el fluido con la composición a través del campo eléctrico en la zona de electroporación del dispositivo;

donde el flujo de la pluralidad de células suspendidas en fluido con la composición a través del campo eléctrico en la zona de electroporación mejora la permeabilidad temporal de la pluralidad de células, lo que electropora, de esta manera, la composición en al menos una parte de la pluralidad de células.

118. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, que comprende además evaluar la salud de una parte de la pluralidad de células suspendidas en el fluido.

119. El método del párrafo 118, donde la evaluación comprende medir la viabilidad de la parte de la pluralidad de células suspendidas en el fluido.

120. El método del párrafo 118, donde la evaluación comprende medir la eficacia de la transfección de la pluralidad de células suspendidas en el fluido.

121. El método del párrafo 118, donde la evaluación comprende medir la tasa de recuperación celular de la parte de la pluralidad de células suspendida en el fluido.
122. El método del párrafo 118, donde la evaluación comprende un análisis por citometría de flujo de la expresión del marcador de la superficie celular.
- 5 123. El método del párrafo 116 o párrafo 117, donde la pluralidad de células tiene de 0 % a alrededor de 25 % de cambio fenotípico con respecto a una medición de referencia del fenotipo celular luego de salir de la zona de electroporación del dispositivo.
124. El método del párrafo 116 o el párrafo 117, donde la pluralidad de células no tiene un cambio fenotípico luego de salir de la zona de electroporación del dispositivo.
- 10 125. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, donde la electroporación es una electroporación reversible sustancialmente no térmica.
126. El sistema del párrafo 116 o del párrafo 117, donde la electroporación es una electroporación irreversible sustancialmente no térmica.
127. El sistema del párrafo 116 o del párrafo 117, donde la electroporación es una electroporación reversible sustancialmente térmica.
- 15 128. El método del párrafo 116 o párrafo 117, donde la zona de electroporación del dispositivo tiene una dimensión de sección transversal uniforme.
129. El dispositivo del párrafo 116 o del párrafo 117, donde el zona de electroporación del dispositivo tiene una dimensión de sección transversal no uniforme.
- 20 130. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, donde el dispositivo comprende además una pluralidad de zonas de electroporación.
131. El método del párrafo 130, donde cada una de la pluralidad de zonas de electroporación tiene una sección transversal uniforme.
132. El método del párrafo 130, donde cada una de la pluralidad de zonas de electroporación tiene una sección transversal uniforme.
- 25 133. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, donde la parte c) ocurre mediante la aplicación de una presión positiva.
134. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, donde las células de la pluralidad de células de la muestra se seleccionan del grupo que consiste en células de mamífero, eucariotas, células sintéticas, células humanas, células animales, células vegetales, células primarias, líneas celulares, células en suspensión, células adherentes, células inmunes, células madre, células sanguíneas, glóbulos rojos, linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, células dendríticas, células presentadoras de antígeno (APC), células citolíticas (NK), monocitos, macrófagos, sangre periférica células mononucleares (PBMC), células de riñón embrionario humano (HEK-293) o células de ovario de hámster chino (CHO).
- 30 135. El método del párrafo 134, donde las células comprenden células Jurkat.

136. El método del párrafo 134, donde las células comprenden linfocitos T humanos primarios.
137. El método del párrafo 134, donde las células comprenden células THP-1.
138. El método del párrafo 134, donde las células comprenden macrófagos primarios y humanos.
139. El método del párrafo 134, donde las células comprenden linfocitos T humanos primarios.
- 5 140. El método del párrafo 134, donde las células comprenden células citolíticas.
141. El método del párrafo 134, donde las células comprenden células renales embrionarias humanas.
142. El método del párrafo 134, donde las células comprenden linfocitos B.
143. El método del párrafo 116 o párrafo 117, donde la composición comprende al menos un  
10 compuesto seleccionado del grupo que consiste en agentes terapéuticos, vitaminas, nanopartículas, moléculas cargadas, moléculas no cargadas, ADN, ARN, complejo CRISPR-Cas, proteínas, virus, polímeros, una ribonucleoproteína (RNP) y polisacáridos.
144. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, donde la composición tiene una concentración en el fluido de entre 0,0001 µg/mL y 1000 µg/mL.
- 15 145. El dispositivo del párrafo 116 o del párrafo 117, que comprende además un primer depósito conectado de forma fluida a la zona de entrada.
146. El dispositivo del párrafo 116 o del párrafo 117, que comprende además un primer depósito conectado de forma fluida a la zona de entrada.
147. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, donde la sección transversal de la zona de  
20 electroporación se selecciona del grupo que consiste en circular, elipsoidal, poligonal, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.
148. El dispositivo del párrafo 116 o párrafo 117, donde la dimensión de corte transversal de la zona de entrada se encuentra entre 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.
- 25 149. El dispositivo del párrafo 116 o párrafo 117, donde la dimensión de corte transversal de la zona de recuperación se encuentra entre 0,01 % y 100 000 % de la dimensión de sección transversal de la zona de electroporación.
150. El método del párrafo 116 o el párrafo 117, donde ninguna de la zona de entrada, zona de recuperación o zona de electroporación reduce la dimensión de la sección transversal de  
30 cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido.
151. El método del párrafo 116 o el párrafo 117, donde el ciclo de trabajo de la electroporación está entre 0,001 % y 100 %.
152. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, donde la dimensión de la sección transversal más grande de la zona de electroporación está entre 0,005 mm y 50 mm.
- 35 153. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, donde la longitud de la zona de electroporación se encuentra entre 0,005 mm y 50 mm.

154. El dispositivo del párrafo 116 o del párrafo 117, donde la dimensión de sección transversal de cualquier de cualquiera del primer electrodo o el segundo electrodo se encuentra entre 0,1 mm y 5 mm.
- 5 155. El método del párrafo 116 o párrafo 117, donde el dispositivo comprende adicionalmente una estructura exterior que comprende un alojamiento configurado para contener el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del dispositivo.
156. El método del párrafo 155, donde la estructura exterior comprende una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo y una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.
- 10 157. El método del párrafo 155, donde la estructura exterior es integral al dispositivo.
158. El método del párrafo 155, donde la estructura exterior se conecta de forma removible al dispositivo.
159. El método del párrafo 116 o el párrafo 117, donde la tasa de administración del paso c) se encuentra entre 0,001 mL/min y 1000 mL/min.
- 15 160. El método del párrafo 116 o del párrafo 117, donde el tiempo de residencia de cualquiera de la pluralidad de células suspendidas en el fluido está entre 0,5 ms y 50 ms.
161. El método del párrafo 116 o el párrafo 117, que comprende además un controlador acoplado operativamente a la fuente de potencial eléctrico para administrar pulsos de voltaje al primer electrodo y el segundo electrodo para generar una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y el segundo electrodo.
- 20 162. El método del párrafo 161, donde los pulsos de voltaje tienen una amplitud entre 0,01 kV y 3 kV.
163. El método del párrafo 161, donde los pulsos de voltaje tienen una duración de entre 0,01 ms y 1000 ms.
- 25 164. El método del párrafo 161, donde los pulsos de voltaje se aplican al primer y segundo electrodos a una frecuencia entre 1 Hz y 50 000 Hz.
165. El método de párrafo 161, donde la forma de onda del pulso de voltaje se selecciona del grupo que consiste en CC, cuadrado, pulso, bipolar, sinusoidal, rampa, bipolar asimétrico, arbitrario y cualquier superposición y combinación de estos.
- 30 166. El método del párrafo 161, 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.
167. El método del párrafo 116 o párrafo 117, donde el fluido tiene una conductividad de entre 0,001 mS/cm y 500 mS/cm.
168. El método del párrafo 116 o el párrafo 117, que comprende además un alojamiento configurada para albergar el dispositivo.
- 35 169. El método del párrafo 168, donde el alojamiento comprende además un controlador térmico

configurado para aumentar o disminuir la temperatura del alojamiento.

170. El método del párrafo 169, donde el controlador térmico es un elemento térmico seleccionado del grupo que consiste en un bloque térmico, flujo del líquido, calentador activado mediante batería y un calentador de película fina.

5 171. El método del párrafo 169, donde el controlador térmico es un elemento de enfriamiento seleccionado del grupo que consiste en un flujo de líquido, enfriador evaporativo y un dispositivo de Peltier.

172. El método de cualquiera de los párrafos 118-171, donde la temperatura de la pluralidad de células suspendida en el fluido es entre 0 °C a 50 °C.

10 173. El método de cualquiera de los párrafos 116-172, donde el dispositivo comprende una pluralidad de dispositivos de poración de células.

174. El método del párrafo 173, donde el dispositivo comprende una pluralidad de estructuras externas.

15 175. El método de cualquiera de los párrafos 116-174, que comprende además almacenar la pluralidad de células suspendidas en el fluido en un amortiguador de recuperación después de la poración.

176. El método de cualquiera de los párrafos 116-175, donde las células electroporadas tienen una viabilidad después de la introducción de la composición entre 0,1 y 99,9 %.

20 177. El método de cualquiera de los párrafos 116-176, donde la eficiencia de la introducción de la composición en las células está entre 0,1 y 99,9 %.

178. El método de cualquiera de los párrafos 116-177, donde el número de células recuperadas es de entre  $10^4$  células y  $10^{12}$  células.

179. El método de cualquiera de los párrafos 116-178, donde el rendimiento de las células vivas modificadas genéticamente se encuentra entre 0,1 y 500 %.

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

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

(i) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;

30 (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación; y

(iii) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde

35 la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación;

(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 electromecánicamente el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del al menos un dispositivo;

5 (ii) una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo; y

(iii) una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo; y

(c) un amortiguador de transfección para el suministro electromecánico de la composición en la pluralidad de células suspendidas en el fluido.

10 181. Un kit para electroporar 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:

(i) un primer electrodo que comprende una primera entrada y una primera salida, donde un lumen del primer electrodo comprende una zona de entrada;

15 (ii) un segundo electrodo que comprende una segunda entrada y una segunda salida, donde un lumen del segundo electrodo comprende una zona de recuperación; y

(iii) una zona de electroporación, donde la zona de electroporación está conectada de forma fluida a la primera salida del primer electrodo y la segunda entrada del segundo electrodo, donde la zona de electroporación tiene una dimensión de sección transversal sustancialmente uniforme, y donde la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico con el primer y segundo electrodos produce un campo eléctrico en la zona de electroporación;

(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 electromecánicamente el primer electrodo, el segundo electrodo y la zona de electroporación del al menos un dispositivo;

25 (ii) una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo; y

(iii) una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo; y

(c) un amortiguador de transfección para electroporar la pluralidad de células suspendidas en el fluido.

30 182. El kit del párrafo 180 o del párrafo 181, donde las estructuras exteriores son parte integral de la pluralidad de dispositivos.

183. El kit del párrafo 180 o del párrafo 181, donde la estructura exterior se conecta de forma removible a la pluralidad del dispositivo.

Otras modalidades de la tecnología descrita en este documento se pueden definir de acuerdo con cualquiera de los siguientes párrafos numerados:

35 1. Un dispositivo para la electroporación de la composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, el dispositivo comprende:

- (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
- 5 (c) una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, en la que la zona de electroporación comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme;
- 10 donde la primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos.
2. Un dispositivo para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, el dispositivo comprende:
- (a) un primer electrodo que comprende una primera entrada, una primera salida y un primer lumen que comprende una dimensión de sección transversal mínima;
- 15 (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 zona de electroporación comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal
- 20 sustancialmente uniforme;
- donde la primera salida, la zona de electroporación y la segunda entrada están en comunicación de fluidos.
3. El dispositivo del párrafo 1 o el párrafo 2, donde una sección transversal de la zona de electroporación es una forma seleccionada de un grupo que consiste en circular, disco, elíptica,
- 25 polígono regular, polígono irregular, forma curvilínea, estrella, paralelogramo, trapezoidal e irregular.
4. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-3, donde la zona de electroporación tiene una sección transversal sustancialmente circular.
5. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-4, donde la zona de electroporación tiene una
- 30 dimensión de sección transversal mínima de entre 0,1 mm y 50 mm.
6. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-5, donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal de entre alrededor de 7850  $\mu\text{m}^2$  y alrededor de 2000  $\text{mm}^2$ .
7. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-6, donde la zona de electroporación tiene una longitud de entre 0,1 mm y 50 mm.
- 35 8. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-7, 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.

9. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-8, donde una relación entre la dimensión de 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.

5 10. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-9, 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.

11. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-10, 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  
10 de la sección transversal de la zona de electroporación se encuentra entre 1:10 y 10:1.

12. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-11, 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.

13. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-12, que comprende además un tercer depósito en  
15 comunicación de fluidos con el primer lumen o el segundo lumen.

14. El dispositivo del párrafo 13, donde el primer electrodo o el segundo electrodo tiene una entrada o salida adicional para la comunicación de fluidos con el tercer depósito.

15. El dispositivo de cualquiera de los párrafos 1-14, donde el dispositivo comprende además una o más zonas de electroporación adicionales.

20 16. Un sistema para electroporar una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, que comprende:

(a) un dispositivo, que comprende:

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

25 (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

(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  $\mu\text{m}$ , donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal  
30 sustancialmente uniforme;

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

(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.

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

(a) un dispositivo, que comprende:

(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

(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  $\mu\text{m}$ , 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

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

18. El sistema del párrafo 16 o del párrafo 17, que comprende además un primer depósito en comunicación de fluidos con la primera entrada.

19. El sistema de cualquiera de los párrafos 16-18, que comprende además un segundo depósito en comunicación de fluidos con la segunda salida.

20. El sistema de cualquiera de los párrafos 16-19, 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.

21. El sistema de cualquiera de los párrafos 16-20, 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.

22. El sistema de cualquiera de los párrafos 16-21, 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.

23. El sistema de cualquiera de los párrafos 16-22, donde el dispositivo comprende además una o más zonas de electroporación adicionales.

24. El sistema del párrafo 23, que comprende además un alojamiento configurado para activar las zonas de electroporación en paralelo, en serie o desplazadas 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 activado por resorte, un primer electrodo mecánicamente conectado o un primer electrodo inductivamente conectado, donde un exterior del

5 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

10 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

15 fuente de potencial eléctrico.

25. El sistema del párrafo 24, 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

20 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.

26. El sistema del párrafo 25, donde la fuente de potencial eléctrico incluye circuitos o programación adicionales configurados para modular la entrega de pulsos de voltaje a los

25 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.

27. Un sistema para electroporar una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, que comprende:

- 30 (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
- 35 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

(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  $\mu\text{m}$ , 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 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 están en contacto operativo de forma removible con la fuente de potencial eléctrico.

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

(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 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

(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  $\mu\text{m}$ , 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 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 están en contacto operativo de forma removible con la fuente de potencial eléctrico.

29. Un método de electroporación de una composición en una pluralidad de células suspendidas

5 en un líquido que fluye, el método comprende:

(a) que proporciona un dispositivo que comprende:

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

10 (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 alrededor de 100  $\mu\text{m}$ , donde la zona de electroporación tiene un área de sección transversal sustancialmente uniforme;

15 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

20 (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.

30. 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:

25 (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

30 (iii) una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda salida, donde la zona de electroporación comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a alrededor de 100  $\mu\text{m}$ , 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;

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

(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 introduce la composición en la pluralidad de células.

31. El método del párrafo 29 o del párrafo 30, donde la pluralidad de células se encuentra en un líquido separado de la composición antes del paso (b).

32. El método del párrafo 30 o 31, donde el paso (b) comprende aplicar una presión positiva impulsada por fluido.

33. El método de cualquiera de los párrafos 30-32, 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 líquido se comprima temporalmente.

34. El método de cualquiera de los párrafos 30-33, 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 de células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.

35. El método de cualquiera de los párrafos 30-34, 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 configurado para administrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.

36. El método de cualquiera de los párrafos 30-35, 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  $5 \times 10^{-5}$  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 células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.

37. El método de cualquiera de los párrafos 30-36, donde las velocidades de corte 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 1/s y  $2 \times 10^6$  1/s, donde la fuente de administración de fluido se configura para administrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen hacia la segunda salida.

38. El método de cualquiera de los párrafos 30-37, 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  $1 \times 10^{-3}$  Pa y  $9,5 \times 10^4$  Pa, donde la fuente de administración de fluido está configurado para administrar el líquido y/o la pluralidad de células en suspensión a través del primer lumen hasta la segunda salida.

39. El método de cualquiera de los párrafos 30-38, 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.
40. El método de cualquiera de los párrafos 30-39, 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  $1 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s and  $15 \times 10^{-4}$  m<sup>2</sup>/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.
41. El método de cualquiera de los párrafos 30-40, 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.
42. El método de cualquiera de los párrafos 30-41, 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 introduce la composición en la pluralidad de células.
43. El método de cualquiera de los párrafos 30-41, donde el campo eléctrico se produce mediante pulsos de voltaje.
44. El método del párrafo 43, 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 así una diferencia de potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodos.
45. El método del párrafo 43 o 44, donde los pulsos de voltaje tienen cada uno una amplitud entre - 3 kV y 3 kV.
46. El método de cualquiera de los párrafos 43-45, donde los pulsos de voltaje tienen una duración de entre 0,01 ms y 1000 ms.
47. El método de cualquiera de los párrafos 43-46, donde los pulsos de voltaje se aplican al primer y segundo electrodos a una frecuencia entre 1 Hz y 50 000 Hz.
48. El método de cualquiera de los párrafos 43-47, 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.
49. El método de cualquiera de los párrafos 43-48, 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.
50. El método de cualquiera de los párrafos 43-49, donde un ciclo de trabajo de los pulsos de voltaje se encuentra entre 0,001 % y 100 %.
51. El método de cualquiera de los párrafos 30-50, donde el líquido tiene una conductividad de entre 0,001 mS/cm y 500 mS/cm.

52. El método de cualquiera de los párrafos 30-51, donde la temperatura del líquido está entre 0 °C y 50 °C.
53. El método de cualquiera de los párrafos 30-52, que comprende además almacenar la pluralidad de células en un amortiguador de recuperación después de la administración electromecánica de la composición.
54. El método de cualquiera de los párrafos 30-53, 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), nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas autoguiadas, meganucleasas (MN), megaTAL y transposones.
55. El método de cualquiera de los párrafos 30-54, donde la composición tiene una concentración en el líquido de entre 0,0001 µg/mL y 1000 µg/mL.
56. El método de cualquiera de los párrafos 30-55, donde la pluralidad de células comprende células eucariotas, células vegetales, células procariotas o células sintéticas.
57. El método del párrafo 56, donde la pluralidad de células comprende células humanas o células animales.
58. El método de cualquiera de los párrafos 30-57, donde la pluralidad de células comprende células primarias, células de una línea celular, células adherentes, células no estimuladas, células 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).
59. El método del párrafo 58, donde la pluralidad de células comprende células inmunitarias adaptativas y/o células inmunitarias innatas.
60. El método de cualquiera de los párrafos 30-58, 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).
61. El método de cualquiera de los párrafos 30-58, 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.
62. Un kit para electroporar una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, que comprende:
- (a) una pluralidad de dispositivos, cada uno de la pluralidad de dispositivos comprende:

- (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
- 5 (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  $\mu\text{m}$ , 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
- 10 un campo eléctrico en la zona de electroporación; y
- (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;
  - 15 (ii) una primera entrada eléctrica acoplada operativamente al primer electrodo; y
  - (iii) una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.
- 63. Un kit para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un fluido, comprende:
  - (a) una pluralidad de dispositivos, cada uno de la pluralidad de dispositivos comprende:
    - 20 (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
    - (iii) una zona de electroporación dispuesta entre la primera salida y la segunda entrada, donde la
    - 25 zona de electroporación comprende una dimensión de sección transversal mínima superior a alrededor de 100  $\mu\text{m}$ , 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
    - 30 (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
      - 35 (iii) una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.
  - 64. Un kit para electroporar 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 los párrafos 1-15; y

(b) una pluralidad de estructuras externas configuradas para contener la pluralidad de dispositivos,

5 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

(vi) una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.

10 65. Un kit para el suministro electromecánico de una composición en una pluralidad de células suspendidas en un líquido, comprende:

(a) una pluralidad de dispositivos, cada uno de la pluralidad de dispositivos de cualquiera de los párrafos 1-15; y

(b) una pluralidad de estructuras externas configuradas para contener la pluralidad de dispositivos,

15 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

(vi) una segunda entrada eléctrica acoplada operativamente al segundo electrodo.

## 20 **Otras modalidades**

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan en la presente mediante referencia en la misma medida que si cada publicación o solicitud de patente independiente se indicara de forma individual y específica como incorporada mediante referencia. En el caso de una definición en conflicto entre esta y cualquier

25 referencia incorporada en este documento, se aplica la definición proporcionada en este documento.

Si bien la descripción se ha descrito en relación con modalidades específicas de esta, se entenderá que es capaz de realizar modificaciones adicionales y esta solicitud está destinada a cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la descripción siguiendo, en general, los principios

30 de la descripción e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación que entran dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la descripción y pueden aplicarse a las características esenciales expuestas anteriormente en este documento, y siguen en el alcance de las reivindicaciones.

Otras modalidades se encuentran dentro de las reivindicaciones.