

MÉTODOS DE ELECTROPORACIÓN SECUENCIAL

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de los Estados Unidos serie N.º 63/181,583 que se presentó el 29 de abril de 2021 y cuyo contenido se incorpora a modo de referencia en el presente documento en su totalidad.

ANTECEDENTES

I. Campo de la divulgación

[0002] La presente divulgación se refiere, de manera general, a métodos y equipos para la introducción de agentes en células vivas, partículas celulares o vesículas lipídicas.

II. Antecedentes

[0003] La electroporación es la aplicación de pulsos eléctricos controlados y breves para transformar bacterias, levaduras, protoplastos de plantas, células cultivadas, otras células, partículas celulares, liposomas, vesículas, tejidos u otros vehículos biológicos. El pulso induce un potencial transmembranario que causa la ruptura reversible de la membrana celular. Esto da por resultado la permeación o “formación de poros” de la membrana celular, lo que permite que se introduzca un agente extracelular, tal como moléculas pequeñas (tales como sondas moleculares, fármacos, tinciones, oligonucleótidos o péptidos) o moléculas grandes (tales como proteínas, DNA y RNA), a las células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos. Este procedimiento también es muy eficiente para la introducción de agentes químicos o biológicos que intervienen específicamente en vías moleculares en células de cultivos de tejidos o células primarias, especialmente células de mamíferos. Por ejemplo, la electroporación se utiliza en el proceso para producir ratones con genes inactivados, así como en el tratamiento de tumores, en la terapia génica y en la terapia con base en células.

[0004] Con respecto a la transfección de células, muchos factores contribuyen a la complicación o al éxito de la transfección. Por ejemplo, la unión celular y la

internalización de complejos reactivo-gen; la liberación de ácidos nucleicos en el citoplasma, a absorción nuclear y la expresión de uno o más genes; la salud, actividad metabólica, tasa de endocitosis y tasa de división celular; y la edad, confluencia y número de pasajes de células de cultivo son todos factores que pueden hacer que las células sean difíciles de transfectar. Las células inmaduras, incluidas las células madre y las células progenitoras no asignadas, carecen de estas características. De manera similar, las células primarias, las cuales se utilizan cada vez más como modelos en los descubrimientos de fármacos, en toxicología y en la investigación básica, no se dividen, tienen una capacidad de internalización baja y a menudo carecen de la capacidad de unirse a complejos de transfección.

[0005] El resultado de un proceso de electroporación es controlado en gran medida por la magnitud del pulso del campo eléctrico (EF) aplicado y por la duración del pulso. Mientras la magnitud del pulso esté por encima de cierta cantidad, un aumento en la magnitud o en la duración del pulso generalmente da por resultado una mayor acumulación de moléculas extracelulares dentro de la célula.

[0006] Cada pulso eléctrico aplicado a una suspensión celular puede caracterizarse por una cantidad determinada de energía, la cual es igual al producto de voltaje en los electrodos, corriente a través del tampón y duración del pulso de alto voltaje. Sin embargo, únicamente un pequeño porcentaje de la energía eléctrica aplicada se gasta en el trabajo útil de modificar las membranas lipídicas y mover materiales extracelulares dentro de las células. El resto de la energía eléctrica se disipa en forma de calor producido en el medio circundante. La disipación de la carga que calienta ligeramente la suspensión celular es una consecuencia inevitable de aplicar EF, a pesar de que el calor en sí mismo no causa permeabilización de las células. Cuanto más conductor es el tampón de electroporación, más energía se gasta en la producción de calor. La acumulación de calor hasta temperaturas mayores que los 20 grados a 24 grados por encima de la temperatura ambiente puede ocasionar daños permanentes a las células y

a los componentes celulares, y disminuir la eficiencia del proceso de electroporación; esto limita la cantidad de energía que se puede utilizar para una electroporación exitosa de las células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos.

[0007] Los aumentos de temperatura en las muestras de electroporación también están relacionados con un aumento en la conductividad eléctrica de las muestras, la cual, en soluciones simples de sal, aumenta aproximadamente un 2% por °C. El campo eléctrico aplicado causa un flujo de corriente a través de la células o suspensión de partículas, lo que ocasiona un aumento de temperatura, y esto se traduce en un aumento de conductividad y en mayor corriente atraída de la fuente de energía, etcétera. Si dicho proceso de retroalimentación positivo no se interrumpe (p. ej., apagando el pulso), el aumento de la corriente continua como una avalancha y termina moviéndose en arcos y arruinando la muestra. Este efecto se observa principalmente en intensidades de campo relativamente altas (>2 kV/cm).

[0008] La electroporación de células difíciles de transfectar, tales como células inmaduras o primarias, por ejemplo, necesita campos eléctricos fuertes y, por lo tanto, se debe limitar la conductividad del tampón o el ancho del pulso. Sin embargo, las células son extremadamente sensibles a los cambios bioquímicos del entorno, y los cambios físico-químicos en el entorno asociados con la aplicación del campo eléctrico a células, partículas celulares, vesículas lipídicas o tejidos puede modular el estado fisiológico, las propiedades de activación y la función biológica de las células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos, lo que impacta en la capacidad de los materiales electroporados para administrar un efecto clínico.

[0009] Por lo tanto, los inventores creen que son necesarios métodos para electroporar células, partículas celulares, vesículas lipídicas o tejidos difíciles de transfectar con agentes de interés con alta eficiencia y sin dañar las células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos más allá de su capacidad para producir un efecto clínico.

SUMARIO

[0010] En el presente documento se describe, en algunos aspectos, métodos y equipos para la electroporación eficiente de células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos difíciles de transfectar con agentes de interés utilizando un protocolo de electroporación nuevo que comprende pulsos eléctricos secuenciales. En determinados aspectos, la electroporación secuencial de células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos lleva sorprendentemente a una expresión transgénica significativamente mayor en comparación con la electroporación simple de células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos. En determinados aspectos, los métodos y equipos descritos en el presente documento son únicos porque pueden aumentar la eficiencia de carga de un agente de interés en células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos, mientras que mantienen la viabilidad de las células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos y mantienen la capacidad de las células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos de producir un efecto clínico. En determinados aspectos, los métodos y equipos divulgados en el presente documento pueden optimizar la eficiencia y viabilidad después de la electroporación secuencial al variar la energía de electroporación utilizada durante cada ronda de electroporación.

[0011] Los aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos de agentes de transfección de interés; métodos para permeabilizar membranas transitoriamente para permitir el transporte de agentes de interés a través de las membranas; métodos para electroporar células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos; métodos para producir células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos electroporados; y métodos para aumentar la eficiencia de la electroporación mientras se mantiene el efecto clínico de los materiales electroporados. Los pasos y aspectos analizados en esta divulgación se contemplan como parte de cualquiera de estos métodos. En algunos aspectos, los métodos contemplados en el presente documento pueden

comprender o excluir 1, 2, 3, 4, 5 o más de los siguientes pasos: someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un agente según un primer protocolo; someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un agente según un segundo protocolo; someter la muestra a una demora entre un primer pulso eléctrico y un segundo pulso eléctrico; proporcionar, en la muestra, un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña; someter a las células, partículas celulares o vesículas lipídicas a condiciones suficientes como para electroporar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas; expresar un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína electroporados en una célula; y modificar la eficiencia de carga de uno o más agentes en una o más muestras, el efecto clínico de una o más muestras electroporadas y/o la viabilidad de la muestra al modificar los parámetros eléctricos de los pulsos eléctricos y/o la demora entre ellos a los cuales se someten las muestras. Puede excluirse uno o más de estos pasos de los métodos divulgados.

[0012] Los aspectos de la presente divulgación pueden incluir métodos de electroporación que comprenden lo siguiente:

[0013] (1) someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un primer agente según un primer protocolo; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según un segundo protocolo; donde la primera fuerza de campo

y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso;

[0014] (2) someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un primer agente según un primer protocolo; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según un segundo protocolo;

[0015] (3) someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un primer agente según un primer protocolo; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según un segundo protocolo; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso;

[0016] (4) someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un primer agente; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente; donde

la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso;

[0017] (5) someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un primer agente; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente; o

[0018] (6) someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un primer agente; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso.

[0019] Los aspectos de la presente divulgación incluyen métodos para editar de manera serial genes celulares que comprenden lo siguiente:

[0020] (1) someter una muestra que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células con un primer agente según un primer protocolo; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células con un segundo agente según un segundo protocolo; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso;

[0021] (2) someter una muestra que comprende una o más células a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células con un primer agente según un primer protocolo; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células con un segundo agente según un segundo protocolo;

[0022] (3) someter una muestra que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células con un primer agente según un primer protocolo; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células con un segundo agente según un segundo protocolo; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso;

[0023] (4) someter una muestra que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células con un primer agente; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células con un segundo agente; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso;

[0024] (5) someter una muestra que comprende una o más células a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células con un primer agente; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda

duración de pulso suficientes como para cargar las células con un segundo agente; o

[0025] (6) someter una muestra que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar las células con un primer agente; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar las células con un segundo agente; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso;

[0026] Más aspectos de la presente divulgación pueden incluir métodos de electroporación que comprenden lo siguiente:

[0027] (1) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar células con un primer agente que comprende RNA según un primer protocolo; permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar células con un segundo agente que comprende RNA según un segundo protocolo; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso;

[0028] (2) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar células con un primer agente que comprende DNA según un primer protocolo; permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar células con un segundo agente que comprende DNA según un segundo protocolo; donde la primera

fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso; o

[0029] (3) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar células con un primer agente que comprende una o más proteínas según un primer protocolo; permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar células con un segundo agente que comprende una o más proteínas según un segundo protocolo; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso; o

[0030] (4) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar células con un primer agente que comprende una ribonucleoproteína según un primer protocolo; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar células con un segundo agente que comprende una ribonucleoproteína según un segundo protocolo; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso; o

[0031] (5) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar células con un primer agente que comprende RNA; permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar células con un segundo agente que comprende

RNA; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso;

[0032] (6) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar células con un primer agente que comprende DNA; permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar células con un segundo agente que comprende DNA; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso; o

[0033] (7) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar células con un primer agente que comprende una o más proteínas; permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar células con un segundo agente que comprende una o más proteínas; donde la primera fuerza de campo y/o la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso; o

[0034] (8) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico con una primera fuerza de campo y una primera duración de pulso suficientes como para cargar células con un primer agente que comprende una ribonucleoproteína; permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico con una segunda fuerza de campo y una segunda duración de pulso suficientes como para cargar células con un segundo agente que comprende una ribonucleoproteína; donde la primera fuerza de campo y/o

la primera duración de pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o segunda duración de pulso.

[0035] En algunos aspectos, el primero y el segundo agente son el mismo agente. En algunos aspectos, el primero y el segundo agente son agentes diferentes. En algunos aspectos, el primero y el segundo agente son ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas o moléculas pequeñas. En algunos aspectos, el ácido nucleico es RNA, y donde el RNA es mRNA, miRNA, shRNA, siRNA o un oligonucleótido antisentido. En algunos aspectos, el ácido nucleico es DNA, y donde el DNA es un oligonucleótido antisentido, un vector o un DNA lineal de doble sentido. En algunos aspectos, la proteína es una ribonucleoproteína. En algunos aspectos, la ribonucleoproteína comprende una proteína Cas9 y un RNA guía.

[0036] En algunos aspectos, el método además comprende un paso de reposo después del primero y/o segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, el paso de reposo comprende la incubación de la muestra durante 10 a 30 minutos. En algunos aspectos, el paso de reposo comprende la incubación de la muestra a entre 25 °C y 50 °C. En algunos aspectos, el paso de reposo comprende la incubación de la muestra a entre el 3% y el 8% de CO₂. En algunos aspectos, la muestra no se somete a un paso de reposo después del primero y/o segundo pulso eléctrico.

[0037] En algunos aspectos, la primera fuerza de campo es igual a la segunda fuerza de campo, y la primera duración de pulso es mayor que la segunda duración de pulso. En algunos aspectos, la primera fuerza de campo es igual a la segunda fuerza de campo, y la primera duración de pulso es menor que la segunda duración de pulso. En algunos aspectos, la primera fuerza de campo es igual a la segunda fuerza de campo, y la primera duración de pulso es igual a la segunda duración de pulso. En algunos aspectos, la primera fuerza de campo es menor que la segunda fuerza de campo, y la primera duración de pulso es igual a la segunda duración de pulso. En algunos aspectos, la primera fuerza de campo es mayor que la segunda fuerza de campo, y la primera duración de pulso

igual a la segunda duración de pulso. En algunos aspectos, la primera fuerza de campo es menor que la segunda fuerza de campo, y la primera duración de pulso es mayor que la segunda duración de pulso. En algunos aspectos, la primera fuerza de campo es mayor que la segunda fuerza de campo, y la primera duración de pulso es mayor que la segunda duración de pulso. En algunos aspectos, la primera fuerza de campo es menor que la segunda fuerza de campo, y la primera duración de pulso es menor que la segunda duración de pulso. En algunos aspectos, la primera fuerza de campo es mayor que la segunda fuerza de campo, y la primera duración de pulso es menor que la segunda duración de pulso.

[0038] En algunos aspectos, la intensidad de campo del primer impulso eléctrico y la duración del impulso del primer impulso eléctrico producen una primera energía eléctrica total aplicada, y la intensidad de campo del segundo impulso eléctrico y la duración del impulso del segundo impulso eléctrico producen una segunda energía eléctrica total aplicada. energía eléctrica, y la primera energía eléctrica total aplicada es mayor que la segunda energía eléctrica total aplicada. En algunos aspectos, la primera energía eléctrica total aplicada es menor que la segunda energía eléctrica total aplicada.

[0039] En algunos aspectos, las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. La magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos puede estar entre 0,001 Volts y 10.000 Volts, 0,01 Volts y 10.000 Volts, 0,1 Volts y 10.000 Volts, 1 Volt y 10.000 Volts, 1 Volt y 9000 Volts, 1 Volt y 8000 Volts, 1 Volt y 7000 Voltios, 1 Voltio y 6000 Voltios, 1 Voltio y 5000 Voltios, 1 Voltio y 4000 Voltios, 1 Voltio y 3000 Voltios, 1 Voltio y 2000 Voltios, o 1 Voltio y 1000 Voltios. En algunos aspectos, la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos está entre 100 voltios y 900 voltios. En algunos aspectos, la conductividad de la muestra es función de parámetros que comprenden la composición iónica del tampón de electroporación, la concentración de un agente que se va a cargar en

las celdas, la densidad celular, la temperatura y la presión. La conductividad de la muestra puede estar entre 0,01 Siemens/metro y 10 Siemens/metro, 0,01 Siemens/metro y 1 Siemens/metro, 0,1 Siemens/metro y 10 Siemens/metro, 0,1 Siemens/metro y 1 Siemens/metro, o 1 Siemens/metro y 10 Siemens/metro. En algunos aspectos, la conductividad de la muestra está entre 1,0 Siemens/metro y 3,0 Siemens/metro. En algunos aspectos, las intensidades de campo primera y segunda son además una función de la geometría de una cámara de electroporación. La cámara de electroporación puede comprender una distancia entre electrodos de 0,001 cm y 10 cm, 0,001 cm y 1 cm, 0,01 cm y 10 cm, 0,01 cm y 1 cm, 0,1 cm y 10 cm, 0,1 cm y 1 cm, o 1 cm y 10 cm. En algunos aspectos, la cámara de electroporación comprende un espacio entre electrodos de entre 0,01 cm y 1 cm.

[0040] Las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo pueden estar entre 0,01 kV/cm y 10 kV/cm, 0,01 kV/cm y 1 kV/cm, 0,1 kV/cm y 10 kV/cm, 0,1 kV/cm y 1 kV/cm, o 1 kV/cm y 10 kV/cm. En algunos aspectos, las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo están entre 0,3 kV/cm y 3 kV/cm.

[0041] Las duraciones del primer y segundo impulso del primer y segundo impulso eléctrico pueden estar entre 10^{-6} segundos y 10 segundos, 10^{-6} segundos y 1 segundo, 10^{-3} segundos y 10 segundos, o 10^{-3} segundos y 1 segundo. En algunos aspectos, las duraciones de los pulsos primero y segundo de los pulsos eléctricos primero y segundo están entre 1 microsegundo y 100 milisegundos.

[0042] En algunos aspectos, los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, ancho, forma, patrón o polaridad del pulso. El número de pulso puede estar entre 1 pulso y 1000 pulsos, 1 pulso y 900 pulsos, 1 pulso y 800 pulsos, 1 pulso y 700 pulsos, 1 pulso y 600 pulsos, 1 pulso y 500 pulsos, 1 pulso y 400 pulsos, 1 pulso y 300 pulsos, 1 pulso y 200 pulsos, 1 pulso y 100 pulsos, 1 pulso y 90 pulsos, 1 pulso y 80 pulsos, 1 pulso y 70 pulsos, 1 pulso y 60 pulsos, 1 pulso y 50 pulsos, 1 pulso

y 40 pulsos, 1 pulso y 30 pulsos, 1 pulso y 20 pulsos, o 1 pulso y 10 pulsos. En algunos aspectos, el número de pulsos está entre 1 pulso y 130 pulsos.

[0043] En algunos aspectos, el ancho del pulso es función de una tasa de decaimiento exponencial. En algunos aspectos, la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación. La resistencia de la muestra puede estar entre 1 ohm y 10.000 ohm, 1 ohm y 9000 ohm, 1 ohm y 8000 ohm, 1 ohm y 7000 ohm, 1 ohm y 6000 ohm, 1 ohm y 5000 ohm, 1 ohm y 4000 ohm, 1 ohm y 3000 ohm, 1 ohm y 2000 ohm, 1 ohm y 1000 ohm, 1 ohm y 900 ohm, 1 ohm y 800 ohm, 1 ohm y 700 ohm, 1 ohm y 600 ohm, 1 ohm y 500 ohm, 1 ohm y 400 ohms, 1 ohm y 300 ohms, 1 ohm y 200 ohms, 1 ohm y 100 ohms, 1 ohm y 90 ohms, 1 ohm y 80 ohms, 1 ohm y 70 ohms, 1 ohm y 60 ohms, 1 ohm y 50 ohms, 1 ohm y 40 ohms, 1 ohm y 30 ohms, 1 ohm y 20 ohms, o 1 ohm y 10 ohms. En algunos aspectos, la resistencia de la muestra está entre 1 ohm y 1000 ohms. La capacitancia de la fuente de alimentación puede estar entre 1 μF y 1.000.000 μF , 1 μF y 100.000 μF , 1 μF y 10.000 μF , 1 μF y 1000 μF o 1 μF y 100 μF . En algunos aspectos, la capacitancia de la fuente de alimentación está entre 1000 μF y 5000 μF .

[0044] En algunos aspectos, la forma del pulso es un pulso de onda cuadrada o un pulso de onda de caída exponencial. En algunos aspectos, el patrón de pulsos comprende un solo pulso correspondiente a la duración del primer o segundo pulso. En algunos aspectos, el patrón de pulsos comprende pulsos múltiples, donde una duración combinada de los pulsos múltiples corresponde a la duración del primer o segundo pulso. En algunos aspectos, la polaridad de los pulsos eléctricos primero y segundo es positiva o negativa.

[0045] En algunos aspectos, la muestra se somete al segundo pulso eléctrico al menos 12 horas a por lo menos 48 horas después de que la muestra se somete al primer pulso. En algunos aspectos, la muestra se somete al segundo pulso

eléctrico al menos 24 horas después de que la muestra se somete al primer pulso.

[0046] Los métodos pueden ser realizados por un sistema de electroporación que tiene un medio legible por computadora no transitorio que comprende instrucciones que, cuando son ejecutadas por un procesador, hacen que el procesador ejecute el primer y segundo protocolo para electroporar la muestra. En algunos aspectos, el sistema de electroporación comprende un aparato de electroporación de flujo y la muestra se somete a los pulsos eléctricos mientras la muestra fluye dentro del aparato de electroporación de flujo.

[0047] En algunos aspectos, las células pueden ser células de mamífero y, en algunos aspectos, las células son células humanas, células murinas, células de rata, células de hámster o células de primate. En algunos aspectos, las células son células primarias. En algunos aspectos, las células son células cultivadas y las células cultivadas pueden ser líneas celulares cultivadas que pueden comprender 3T3, 697, 10T½, 1321N1, A549, AHR77, B-LCL, B16, B65, Ba/F3, BHK, C2C12, C6, CaCo-2, CAP, CaSki, ChaGo-K-1, CHO, COS, DG75, DLD-1, EL4, H1299, HaCaT, HAP1, HCT116, HEK, HeLa, HepG2, HL60, HOS, HT1080, HT29, Huh-7, HUVEC, INS-1/GRINCH, Jurkat, K46, K562, KG1, KHYG-1, L5278Y, L6, LNCaP, LS180, MCF7, MDA-MB-231, ME-180, MG-63, Min- 6, MOLT4, Nalm6, ND7/23, Neuro2a, NK92, NS/0, P3U1, Panc-1, PC-3, PC12, PER.C6, PM1, Ramos, RAW 264.7, RBL, Renca, RLE, SH-SY5Y, SK-BR-3, SK-MES-1, SK-N-SH, SK-OV-3, SP2/0, SW403, THP-1, U2OS, U937, Vero, YB2/0, o derivados de estos. Las células pueden comprender adipocitos, condrocitos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, hepatocitos, queratinocitos, miocitos, neuronas, osteocitos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), esplenocitos, células madre o timocitos. En algunos aspectos, las PBMC son linfocitos de sangre periférica (PBL), que pueden ser células asesinas naturales (NK), células T o células B. En algunos aspectos, las PBMC son monocitos, que pueden ser macrófagos o células dendríticas, y los macrófagos pueden ser microglia. En algunos aspectos, las células madre son células madre

adiposas, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesenquimales o células madre neurales.

[0048] En algunos aspectos, la eficiencia de carga del agente es de al menos 50, 60, 70, 80 o 90%.

[0049] En algunos aspectos, la viabilidad celular puede ser de al menos un 50% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico; al menos 60% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico; al menos el 70% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico; al menos el 80% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico; o al menos el 90% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.

[0050] En algunos aspectos, las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico; aproximadamente 50% a 90% viable 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico; aproximadamente 50% a 90% viable 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico; aproximadamente 50% a 90% viable 24 horas después del segundo pulso eléctrico; aproximadamente 60% a 90% viable 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico; aproximadamente 60% a 90% viable 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico; aproximadamente 60% a 90% viable 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico; o aproximadamente 60% a 90% viable 24 horas después del segundo pulso eléctrico.

[0051] Los aspectos de la divulgación también se relacionan con un sistema de electroporación que tiene un medio legible por computadora no transitorio que comprende instrucciones que, cuando son ejecutadas por un procesador, hacen que el procesador: seleccione un primer protocolo asociado con un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una duración del primer pulso; someter una muestra que comprende una o más células intactas, partículas celulares o vesículas lipídicas al primer pulso eléctrico definido por el primer protocolo suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un primer agente según el primer protocolo; seleccionar

un segundo protocolo asociado con un segundo pulso eléctrico que tenga una segunda intensidad de campo y una segunda duración del pulso; y someter la muestra al segundo pulso eléctrico definido por el segundo protocolo suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según el segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración del pulso son diferentes de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso.

[0052] Los aspectos de la divulgación también incluyen una célula, partícula celular o vesícula lipídica electroporada producida usando cualquier método descrito en el presente documento o producida usando cualquier sistema de electroporación que tenga un medio no transitorio legible por computadora que comprenda instrucciones que, cuando las ejecuta un procesador, hacen que el procesador ejecutar cualquier método descrito en el presente documento.

[0053] Otros aspectos de la divulgación incluyen un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o afección que comprende administrar un producto de cualquiera de los métodos descritos en una cantidad que mitiga la enfermedad o afección. En ciertos aspectos, un producto de los métodos es un vehículo de administración de fármacos y se contempla que una amplia variedad de fármacos conocidos se pueden administrar *a través* de partículas cargadas producidas por los métodos descritos. Una enfermedad o afección puede incluir cualquier enfermedad o afección susceptible de administración de un fármaco o agente *a través* de partículas de liposomas, partículas celulares o vehículos de administración similares que se preparan (p. ej., se cargan) mediante el uso de métodos de electroporación.

[0054] Todavía otros aspectos de la divulgación incluyen métodos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o afección mediante la administración de una cantidad eficaz de un fármaco, un biológico u otra molécula bioactiva comprendida en una partícula producida por los métodos descritos. En ciertos aspectos, la enfermedad es una enfermedad infecciosa que

incluye, a mero título enunciativo, una infección bacteriana, fúngica, parasitaria o viral. En otro aspecto, la infección bacteriana es una infección micobacteriana. En otro aspecto más, la infección vírica es una infección retrovítica que incluye, a mero título enunciativo, la infección por HIV. En otro aspecto, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria o un cáncer o una enfermedad vascular oclusiva.

[0055] Los aspectos de la divulgación incluyen un sistema de electroporación configurado para realizar cualquiera de los métodos descritos.

[0056] También se divulgan los siguientes aspectos 1 a 201 de la presente divulgación.

[0057] El aspecto 1 es un método de electroporación que comprende: someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una duración del primer pulso suficientes para cargar las células, partículas celulares o lípidos. vesículas con un primer agente según un primer protocolo; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una segunda duración de pulso suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según un segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración del pulso son diferentes de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso.

[0058] El aspecto 2 es un método de electroporación que comprende: someter una muestra que comprende una o más células intactas, partículas celulares o vesículas lipídicas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una duración del primer pulso suficientes para cargar las células, partículas celulares o lípidos. vesículas con un primer agente según un primer protocolo; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una segunda duración de pulso suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente de acuerdo con un segundo protocolo.

[0059] El aspecto 3 es un método de electroporación que comprende: someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una duración del primer pulso suficientes para cargar las células, partículas celulares o lípidos. vesículas con un primer agente según un primer protocolo; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una segunda duración de pulso suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según un segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración del pulso son diferentes de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso.

[0060] El aspecto 4 es un método de edición en serie de genes celulares que comprende: someter una muestra que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una duración del primer pulso suficientes para cargar las células con un primer agente según un primer protocolo; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una duración de un segundo pulso suficiente para cargar las células con un segundo agente según un segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración del pulso son diferentes de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso.

[0061] El aspecto 5 es un método de edición en serie de genes celulares que comprende: someter una muestra que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una duración del primer pulso suficientes para cargar las células con un primer agente según un primer protocolo; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una segunda duración de pulso suficiente para cargar las células con un segundo agente según un segundo protocolo.

[0062] El aspecto 6 es un método de edición en serie de genes celulares que comprende: someter una muestra que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una duración del primer pulso suficientes para cargar las células con un primer agente según un primer protocolo; permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una duración de un segundo pulso suficiente para cargar las células con un segundo agente según un segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración del pulso son diferentes de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso.

[0063] El Aspecto 7 es el método de los Aspectos 1 a 6, donde el primer y el segundo agente son el mismo agente. El Aspecto 8 es el método de los Aspectos 1 a 7, donde el primer y el segundo agente son agentes diferentes. El Aspecto 9 es el método de los Aspectos 1 a 8, donde los agentes primero y segundo son un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. El Aspecto 10 es el método de los Aspectos 1 a 9, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña. El Aspecto 11 es el método de los Aspectos 1 a 10, donde el primer agente es un ácido nucleico y el segundo agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña. El Aspecto 12 es el método de los Aspectos 1 a 10, donde el primer agente es un polipéptido y el segundo agente es un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. El Aspecto 13 es el método de los Aspectos 1 a 10, donde el primer agente es una proteína y el segundo agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña. El Aspecto 14 es el método de los Aspectos 1 a 10, donde el primer agente es una molécula pequeña y el segundo agente es un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. El Aspecto 15 es el método de los Aspectos 1 a 14, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es un ácido nucleico. El Aspecto

16 es el método de los Aspectos 1 a 14, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es un polipéptido. El Aspecto 17 es el método de los Aspectos 1 a 14, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es una proteína. El Aspecto 18 es el método de los Aspectos 1 a 14, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es una molécula pequeña. El Aspecto 19 es el método de los Aspectos 1 a 18, donde el ácido nucleico es RNA, y donde el RNA es mRNA, miRNA, shRNA, siRNA o un oligonucleótido antisentido. El Aspecto 20 es el método de los Aspectos 1 a 19, donde el ácido nucleico es DNA, y donde el DNA es un oligonucleótido antisentido, un vector o un DNA lineal de doble sentido. El Aspecto 21 es el método de los Aspectos 1 a 20, donde la proteína es una ribonucleoproteína. El Aspecto 22 es el método de los Aspectos 1 a 21, donde la ribonucleoproteína comprende una proteína Cas9 y un RNA guía.

[0064] El aspecto 23 es un método de electroporación que comprende: (a) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una primera duración de pulso suficientes para cargar las células con un primer agente que comprende RNA según un primer protocolo; (b) permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y (c) someter la muestra celular a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una duración del segundo pulso suficiente para cargar las células con un segundo agente que comprende RNA según un segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración del pulso son diferentes de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso.

[0065] El aspecto 24 es un método de electroporación que comprende: (a) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una primera duración de pulso suficientes para cargar las células con un primer agente que

comprende DNA según un primer protocolo; (b) permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y (c) someter la muestra celular a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una duración del segundo pulso suficiente para cargar las células con un segundo agente que comprende DNA según un segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración del pulso son diferentes de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso.

[0066] El aspecto 25 es un método de electroporación que comprende: (a) someter una muestra de células que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una primera duración de pulso suficientes para cargar las células con un primer agente que comprende una o más proteínas de acuerdo con un primer protocolo; (b) permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y (c) someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una duración de segundo pulso suficiente para cargar las células con un segundo agente que comprende una o más proteínas según un segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración del pulso son diferentes de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso.

[0067] El aspecto 26 es un método de edición de celdas en serie que comprende: (a) someter una muestra celular que comprende una o más células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una duración del primer pulso suficientes para cargar las células con un primer agente que comprende una ribonucleoproteína según un primer protocolo; (b) permitir que la muestra de células se recupere durante al menos 24 horas; y (c) someter la muestra de células a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una duración de segundo pulso suficiente para cargar las células con un segundo agente que comprende una ribonucleoproteína según un segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera

duración del pulso son diferentes de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso.

[0068] El Aspecto 27 es el método de los Aspectos 23 a 26, donde el primer y el segundo agente son el mismo agente. El Aspecto 28 es el método de los Aspectos 23 a 26, donde el primer y el segundo agente son agentes diferentes. El Aspecto 29 es el método de los Aspectos 23 a 28, donde los agentes primero y segundo son un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. El Aspecto 30 es el método de los Aspectos 23 a 29, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña. El Aspecto 31 es el método de los Aspectos 23 a 30, donde el primer agente es un ácido nucleico y el segundo agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña. El Aspecto 32 es el método de los Aspectos 23 a 30, donde el primer agente es un polipéptido y el segundo agente es un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. El Aspecto 33 es el método de los Aspectos 23 a 30, donde el primer agente es una proteína y el segundo agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña. El Aspecto 34 es el método de los Aspectos 23 a 30, donde el primer agente es una molécula pequeña y el segundo agente es un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. El Aspecto 35 es el método de los Aspectos 23 a 34, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es un ácido nucleico. El Aspecto 36 es el método de los Aspectos 23 a 34, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es un polipéptido. El Aspecto 37 es el método de los Aspectos 23 a 34, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es una proteína. El Aspecto 38 es el método de los Aspectos 23 a 34, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es una molécula pequeña. El Aspecto 39 es el método de los Aspectos

23 a 38, donde el ácido nucleico es RNA, y donde el RNA es mRNA, miRNA, shRNA, siRNA o un oligonucleótido antisentido. El Aspecto 40 es el método de los Aspectos 23 a 39, donde el ácido nucleico es DNA, y donde el DNA es un oligonucleótido antisentido, un vector o un DNA lineal de doble sentido. El Aspecto 41 es el método de los Aspectos 23 a 40, donde la proteína es una ribonucleoproteína. El Aspecto 42 es el método de los Aspectos 23 a 41, donde la ribonucleoproteína comprende una proteína Cas9 y un RNA guía.

[0069] El Aspecto 43 es el método de los Aspectos 1 a 42, que comprende además un paso de descanso después del primer y/o segundo pulso eléctrico. El Aspecto 44 es el método de los Aspectos 1 a 43, que comprende además un paso de reposo después del primer y/o segundo pulso eléctrico, donde el paso de reposo comprende la incubación de la muestra durante 10 a 30 minutos. El Aspecto 45 es el método de los Aspectos 1 a 44, que comprende además un paso de reposo después del primer y/o segundo pulso eléctrico, el paso de reposo comprende la incubación de la muestra a 25 °C a 50 °C. El Aspecto 46 es el método de los Aspectos 1 a 45, que comprende además un paso de reposo después del primer y/o segundo pulso eléctrico, en el que el paso de reposo comprende la incubación de la muestra al 3% al 8% de CO₂. El Aspecto 47 es el método de los Aspectos 1 a 46, donde la muestra no se somete a un paso de reposo después del primer y/o segundo pulso eléctrico. El Aspecto 48 es el método de los Aspectos 1 a 47, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más larga que la duración del segundo pulso. El Aspecto 49 es el método de los Aspectos 1 a 47, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más corta que la duración del segundo pulso. El Aspecto 50 es el método de los Aspectos 1 a 47, donde la primera intensidad de campo es menor que la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es igual a la duración del segundo pulso. El Aspecto 51 es el método de los Aspectos 1 a 47, donde la primera intensidad de campo es mayor que la segunda intensidad de campo, y donde la

duración del primer pulso es igual a la duración del segundo pulso. El Aspecto 52 es el método de los Aspectos 1 a 47, donde la primera intensidad de campo es menor que la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es mayor que la duración del segundo pulso. El Aspecto 53 es el método de los Aspectos 1 a 47, donde la primera intensidad de campo es mayor que la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es mayor que la duración del segundo pulso. El Aspecto 54 es el método de los Aspectos 1 a 47, donde la primera intensidad de campo es menor que la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más corta que la duración del segundo pulso. El Aspecto 55 es el método de los Aspectos 1 a 47, donde la primera intensidad de campo es mayor que la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más corta que la duración del segundo pulso. El Aspecto 56 es el método de los Aspectos 1 a 55, donde la primera intensidad de campo y la primera duración del pulso producen una primera energía eléctrica total aplicada y la segunda intensidad de campo y la segunda duración del pulso producen una segunda energía eléctrica total aplicada, y donde la primera energía eléctrica total aplicada la energía eléctrica es diferente de la segunda energía eléctrica total aplicada. El Aspecto 57 es el método de los Aspectos 1 a 56, donde la primera intensidad de campo y la primera duración del pulso producen una primera energía eléctrica total aplicada y la segunda intensidad de campo y la segunda duración del pulso producen una segunda energía eléctrica total aplicada, donde la primera energía eléctrica total aplicada la energía es diferente de la segunda energía eléctrica total aplicada, y donde la primera energía eléctrica total aplicada es mayor que la segunda energía eléctrica total aplicada. El Aspecto 58 es el método de los Aspectos 1 a 57, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. El Aspecto 59 es el método de los Aspectos 1 a 58, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una

función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. y donde la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos está entre 0,001 Voltios y 10.000 Voltios, 0,01 Voltios y 10.000 Voltios, 0,1 Voltios y 10.000 Voltios, 1 Volt y 10.000 Voltios, 1 Volt y 9000 Voltios, 1 Volt y 8000 Voltios, 1 Volt y 7000 Voltios, 1 Voltio y 6000 Voltios, 1 Voltio y 5000 Voltios, 1 Voltio y 4000 Voltios, 1 Voltio y 3000 Voltios, 1 Voltio y 2000 Voltios, o 1 Voltio y 1000 Voltios. El Aspecto 60 es el método de los Aspectos 1 a 59, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. y donde la magnitud del voltaje de los impulsos eléctricos está entre 100 voltios y 900 voltios. El Aspecto 61 es el método de los Aspectos 1 a 60, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. y donde la conductividad de la muestra es una función de los parámetros que comprenden una composición iónica del tampón de electroporación, la concentración de un agente a cargar en las celdas, la densidad celular, la temperatura y la presión. El Aspecto 62 es el método de los Aspectos 1 a 61, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. y donde la conductividad de la muestra está entre 0,01 Siemens/metro y 10 Siemens/metro, 0,01 Siemens/metro y 1 Siemens/metro, 0,1 Siemens/metro y 10 Siemens/metro, 0,1 Siemens/metro y 1 Siemens/metro, o 1 Siemens/metro y 10 Siemens/metro. El Aspecto 63 es el método de los Aspectos 1 a 62, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. y donde la conductividad de la muestra está entre 1,0 Siemens/metro y 3,0 Siemens/metro.

El Aspecto 64 es el método de los Aspectos 1 a 63, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. y donde las intensidades de campo primera y segunda son además una función de la geometría de una cámara de electroporación. El Aspecto 65 es el método de los Aspectos 1 a 64, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. donde las intensidades de campo primera y segunda son además una función de la geometría de una cámara de electroporación, y donde la cámara de electroporación comprende una distancia entre electrodos de entre 0,001 cm y 10 cm, 0,001 cm y 1 cm, 0,01 cm y 10 cm, 0,01 cm y 1 cm, 0,1 cm y 10 cm, 0,1 cm y 1 cm, o 1 cm y 10 cm. El Aspecto 66 es el método de los Aspectos 1 a 65, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra. donde las intensidades de campo primera y segunda son además una función de la geometría de una cámara de electroporación, y donde la cámara de electroporación comprende una distancia entre electrodos de entre 0,01 cm y 1 cm. El Aspecto 67 es el método de los Aspectos 1 a 66, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos están entre 0,01 kV/cm y 10 kV/cm, 0,01 kV/cm y 1 kV/cm, 0,1 kV/cm y 10 kV/cm, 0,1 kV/cm y 1 kV/cm, o 1 kV/cm y 10 kV/cm. El Aspecto 68 es el método de los Aspectos 1 a 67, donde las intensidades de campo primera y segunda de los impulsos eléctricos primero y segundo están entre 0,3 kV/cm y 3 kV/cm. El Aspecto 69 es el método de los Aspectos 1 a 68, donde las duraciones del primer y segundo pulso del primer y segundo pulso eléctrico están entre 10^{-6} segundos y 10 segundos, 10^{-6} segundos y 1 segundo, 10^{-3} segundos y 10 segundos. , o 10^{-3} segundos y 1 segundo. El Aspecto 70 es el método de los Aspectos 1 a 69,

donde las duraciones del primer y segundo pulso del primer y segundo pulso eléctrico están entre 1 microsegundo y 100 milisegundos. El Aspecto 71 es el método de los Aspectos 1 a 70, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, ancho, forma, patrón o polaridad del pulso. El Aspecto 72 es el método de los Aspectos 1 a 71, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número de pulso, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad, y donde el número de pulso está entre 1 pulso y 1000 pulsos, 1 pulso y 900 pulsos, 1 pulso y 800 pulsos, 1 pulso y 700 pulsos, 1 pulso y 600 pulsos, 1 pulso y 500 pulsos, 1 pulso y 400 pulsos, 1 pulso y 300 pulsos, 1 pulso y 200 pulsos, 1 pulso y 100 pulsos, 1 pulso y 90 pulsos, 1 pulso y 80 pulsos, 1 pulso y 70 pulsos, 1 pulso y 60 pulsos, 1 pulso y 50 pulsos, 1 pulso y 40 pulsos, 1 pulso y 30 pulsos, 1 pulso y 20 pulsos, o 1 pulso y 10 pulsos. El Aspecto 73 es el método de los Aspectos 1 a 72, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número de pulso, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad, y donde el número de pulso está entre 1 pulso y 130 pulsos. El Aspecto 74 es el método de los Aspectos 1 a 73, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, y donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial. El Aspecto 75 es el método de los Aspectos 1 a 74, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial, y donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación. El Aspecto 76 es el método de los Aspectos 1 a 75, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de

decaimiento exponencial, donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación, y donde la resistencia de la muestra está entre 1 ohm y 10000 ohm, 1 ohm y 9000 ohm, 1 ohm y 8000 ohm, 1 ohm y 7000 ohm, 1 ohm y 6000 ohm, 1 ohm y 5000 ohm, 1 ohm y 4000 ohm, 1 ohm y 3000 ohm, 1 ohm y 2000 ohm, 1 ohm y 1000 ohm, 1 ohm y 900 ohm, 1 ohm y 800 ohm, 1 ohm y 700 ohm, 1 ohm y 600 ohm, 1 ohm y 500 ohm, 1 ohm y 400 ohm, 1 ohm y 300 ohm, 1 ohm y 200 ohm, 1 ohm y 100 ohm, 1 ohm y 90 ohms, 1 ohm y 80 ohms, 1 ohm y 70 ohms, 1 ohm y 60 ohms, 1 ohm y 50 ohms, 1 ohm y 40 ohms, 1 ohm y 30 ohms, 1 ohm y 20 ohms, o 1 ohm y 10 ohms. El Aspecto 77 es el método de los Aspectos 1 a 76, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial, donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación, y donde la resistencia de la muestra está entre 1 ohm y 1000 ohm. El Aspecto 78 es el método de los Aspectos 1 a 77, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial, donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación, y donde la capacitancia de la fuente de alimentación está entre 1 μF y 1.000.000 μF , 1 μF y 100.000 μF , 1 μF y 10.000 μF , 1 μF y 1000 μF , o 1 μF y 100 μF . El Aspecto 79 es el método de los Aspectos 1 a 78, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial, donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la

resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación, y donde la capacitancia de la fuente de alimentación está entre 1000 μF y 5000 μF . El Aspecto 80 es el método de los Aspectos 1 a 79, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, y donde la forma del pulso es un pulso de onda cuadrada o una onda de caída exponencial. legumbres. El Aspecto 81 es el método de los Aspectos 1 a 80, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, y donde el patrón del pulso comprende un solo pulso correspondiente a la duración del primer o segundo pulso. El Aspecto 82 es el método de los Aspectos 1 a 81, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, la anchura, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, y donde el patrón del pulso comprende múltiples pulsos, donde la duración combinada de los pulsos múltiples corresponde a la duración del primer o segundo pulso. El Aspecto 83 es el método de los Aspectos 1 a 82, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, y donde la polaridad del pulso eléctrico primero y segundo es positiva o negativa. El Aspecto 84 es el método de los Aspectos 1 a 83, donde la muestra se somete al segundo pulso eléctrico al menos 12 horas a al menos 48 horas después de que la muestra se somete al primer pulso. El Aspecto 85 es el método de los Aspectos 1 a 84, donde la muestra se somete al segundo pulso eléctrico al menos 24 horas después de que la muestra se somete al primer pulso. El Aspecto 86 es el método de los Aspectos 1 a 85, donde el método se realiza mediante un sistema de electroporación que tiene un medio legible por computadora no transitorio que comprende instrucciones que, cuando las ejecuta un procesador, hacen que el procesador ejecute el primer y el segundo protocolo para electroporar la muestra. El aspecto 87 es el método de los aspectos 1 a 86, donde el sistema

de electroporación comprende un aparato de electroporación de flujo. El Aspecto 88 es el método de los Aspectos 1 a 87, donde el sistema de electroporación comprende un aparato de electroporación de flujo, y donde la muestra se somete a pulsos eléctricos mientras la muestra fluye dentro del aparato de electroporación de flujo. El Aspecto 89 es el método de los Aspectos 1 a 88, donde las células son células de mamífero. El Aspecto 90 es el método de los Aspectos 1 a 89, donde las células son células humanas, células murinas, células de rata, células de hámster o células de primate. El Aspecto 91 es el método de los Aspectos 1 a 90, donde las celdas son celdas primarias. El Aspecto 92 es el método de los Aspectos 1 a 91, donde las células son células cultivadas. El aspecto 93 es el método de los aspectos 1 a 92, donde las células son células cultivadas y donde las células cultivadas son líneas celulares cultivadas. El Aspecto 94 es el método de los Aspectos 1 a 93, donde las células son líneas celulares cultivadas y donde las líneas celulares cultivadas comprenden 3T3, 697, 10T½, 1321N1, A549, AHR77, B-LCL, B16, B65, Ba/F3, BHK, C2C12, C6, CaCo-2, CAP, CaSki, ChaGo-K-1, CHO, COS, DG75, DLD-1, EL4, H1299, HaCaT, HAP1, HCT116, HEK, HeLa, HepG2, HL60, HOS, HT1080, HT29, Huh-7, HUVEC, INS-1/GRINCH, Jurkat, K46, K562, KG1, KHYG-1, L5278Y, L6, LNCaP, LS180, MCF7, MDA-MB-231, ME-180, MG- 63, Min-6, MOLT4, Nalm6, ND7/23, Neuro2a, NK92, NS/0, P3U1, Panc-1, PC-3, PC12, PER.C6, PM1, Ramos, RAW 264.7, RBL, Renca, RLE , SH-SY5Y, SK-BR-3, SK-MES-1, SK-N-SH, SK-OV-3, SP2/0, SW403, THP-1, U2OS, U937, Vero, YB2/0, o derivados de estos. El Aspecto 95 es el método de los Aspectos 1 a 94, donde las células comprenden adipocitos, condrocitos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, hepatocitos, queratinocitos, miocitos, neuronas, osteocitos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), esplenocitos, células madre, o timocitos. El Aspecto 96 es el método de los Aspectos 1 a 95, donde las células comprenden PBMC y donde las PBMC son linfocitos de sangre periférica (PBL). El aspecto 97 es el método de los aspectos 1 a 95, donde las células comprenden PBMC, donde las PBMC comprenden PBL y donde los PBL

son células asesinas naturales (NK), células T o células B. El Aspecto 98 es el método de los Aspectos 1 a 95, donde las células comprenden PBMC y donde las PBMC son monocitos. El aspecto 99 es el método de los aspectos 1 a 95, donde las células comprenden PBMC, donde las PBMC son monocitos y donde los monocitos son macrófagos o células dendríticas. El Aspecto 100 es el método de los Aspectos 1 a 95, donde las células comprenden PBMC, donde las PBMC son monocitos, donde los monocitos son macrófagos o células dendríticas, y donde los macrófagos son microglia. El Aspecto 101 es el método de los Aspectos 1 a 95, donde las células comprenden células madre, y donde las células madre son células madre adiposas, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesenquimales o células madre neurales. El Aspecto 102 es el método de los Aspectos 1 a 101, donde la eficiencia de carga del agente es al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90%. El Aspecto 103 es el método de los Aspectos 1 a 102, donde la viabilidad celular es al menos del 50% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 104 es el método de los Aspectos 1 a 103, donde la viabilidad celular es al menos del 60% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 105 es el método de los Aspectos 1 a 104, donde la viabilidad celular es al menos del 70% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 106 es el método de los Aspectos 1 a 105, donde la viabilidad celular es al menos del 80% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 107 es el método de los Aspectos 1 a 106, donde la viabilidad celular es al menos del 90% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 108 es el método de los Aspectos 1 a 107, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 109 es el método de los Aspectos 1 a 108, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 110 es el método de los Aspectos 1 a 109, donde las células sometidas a electroporación son

aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 111 es el método de los Aspectos 1 a 110, donde las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables 24 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 112 es el método de los Aspectos 1 a 111, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 113 es el método de los Aspectos 1 a 112, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 114 es el método de los Aspectos 1 a 113, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 115 es el método de los Aspectos 1 a 114, donde las células electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables 24 horas después del segundo pulso eléctrico.

[0070] El Aspecto 116 es una célula, partícula celular o vesícula lipídica electroporada producida utilizando el método de los Aspectos 1-115.

[0071] El aspecto 117 es un sistema de electroporación que tiene un medio legible por computadora no transitorio que comprende instrucciones que, cuando son ejecutadas por un procesador, hacen que el procesador: seleccione un primer protocolo asociado con un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una primera duración de pulso; someter una muestra que comprende una o más células intactas, partículas celulares o vesículas lipídicas al primer pulso eléctrico definido por el primer protocolo suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un primer agente según el primer protocolo; seleccionar un segundo protocolo asociado con un segundo pulso eléctrico que tenga una segunda intensidad de campo y una segunda duración del pulso; y someter la muestra al segundo pulso eléctrico definido por el segundo protocolo suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según el segundo protocolo; donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración del pulso son diferentes de

la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración del pulso. El aspecto 118 es el sistema de electroporación del aspecto 117, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más larga que la duración del segundo pulso. El aspecto 119 es el sistema de electroporación del aspecto 117, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más larga que la duración del segundo pulso. El aspecto 120 es el sistema de electroporación del aspecto 117, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más larga que la duración del segundo pulso. El aspecto 121 es el sistema de electroporación del aspecto 117, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más larga que la duración del segundo pulso. El aspecto 122 es el sistema de electroporación del aspecto 117, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más larga que la duración del segundo pulso. El aspecto 123 es el sistema de electroporación del aspecto 117, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más larga que la duración del segundo pulso. El aspecto 124 es el sistema de electroporación del aspecto 117, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más larga que la duración del segundo pulso. El aspecto 125 es el sistema de electroporación del aspecto 117, donde la primera intensidad de campo es igual a la segunda intensidad de campo, y donde la duración del primer pulso es más larga que la duración del segundo pulso. El Aspecto 126 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 125, donde la primera intensidad de campo y la primera duración del pulso producen una primera energía eléctrica total aplicada y la segunda intensidad de campo y la segunda duración del pulso producen una segunda energía eléctrica total aplicada, y donde la primera la energía eléctrica total aplicada es diferente de la

segunda energía eléctrica total aplicada. El Aspecto 127 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 126, donde la primera intensidad de campo y la primera duración del pulso producen una primera energía eléctrica total aplicada y la segunda intensidad de campo y la segunda duración del pulso producen una segunda energía eléctrica total aplicada, donde la primera energía eléctrica total la energía eléctrica aplicada es diferente de la segunda energía eléctrica total aplicada, y donde la primera energía eléctrica total aplicada es mayor que la segunda energía eléctrica total aplicada. El Aspecto 128 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 127, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos son una función de la magnitud del voltaje de los impulsos eléctricos, la duración de los impulsos eléctricos y la conductividad de los impulsos eléctricos. muestra. El Aspecto 129 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 128, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos son una función de la magnitud del voltaje de los impulsos eléctricos, la duración de los impulsos eléctricos y la conductividad de los impulsos eléctricos. muestra, y donde la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos está entre 0,001 Voltios y 10.000 Voltios, 0,01 Voltios y 10.000 Voltios, 0,1 Voltios y 10.000 Voltios, 1 Volt y 10.000 Voltios, 1 Volt y 9000 Voltios, 1 Volt y 8000 Voltios, 1 Voltio y 7000 Voltios, 1 Voltio y 6000 Voltios, 1 Voltio y 5000 Voltios, 1 Voltio y 4000 Voltios, 1 Voltio y 3000 Voltios, 1 Voltio y 2000 Voltios, o 1 Voltio y 1000 Voltios. El Aspecto 130 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 129, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos son una función de la magnitud del voltaje de los impulsos eléctricos, la duración de los impulsos eléctricos y la conductividad de los impulsos eléctricos. muestra, y en donde la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos está entre 100 voltios y 900 voltios. El Aspecto 131 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 130, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos son una función de la magnitud del voltaje de los

impulsos eléctricos, la duración de los impulsos eléctricos y la conductividad de los impulsos eléctricos. muestra, y donde la conductividad de la muestra es función de parámetros que comprenden la composición iónica del tampón de electroporación, la concentración de un agente a cargar en las celdas, la densidad celular, la temperatura y la presión. El Aspecto 132 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 131, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos son una función de la magnitud del voltaje de los impulsos eléctricos, la duración de los impulsos eléctricos y la conductividad de los impulsos eléctricos. muestra, y donde la conductividad de la muestra está entre 0,01 Siemens/metro y 10 Siemens/metro, 0,01 Siemens/metro y 1 Siemens/metro, 0,1 Siemens/metro y 10 Siemens/metro, 0,1 Siemens/metro y 1 Siemens/metro, o 1 Siemens/metro y 10 Siemens/metro. El Aspecto 133 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 132, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos son una función de la magnitud del voltaje de los impulsos eléctricos, la duración de los impulsos eléctricos y la conductividad de los impulsos eléctricos. muestra, y donde la conductividad de la muestra está entre 1,0 Siemens/metro y 3,0 Siemens/metro. El Aspecto 134 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 133, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos son una función de la magnitud del voltaje de los impulsos eléctricos, la duración de los impulsos eléctricos y la conductividad de los impulsos eléctricos. muestra, y donde las intensidades de campo primera y segunda son además una función de la geometría de una cámara de electroporación. El Aspecto 135 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 134, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos son una función de la magnitud del voltaje de los impulsos eléctricos, la duración de los impulsos eléctricos y la conductividad de los impulsos eléctricos. muestra, en la que las intensidades de campo primera y segunda son además una función de la geometría de una

cámara de electroporación, y en la que la cámara de electroporación comprende una distancia entre electrodos de entre 0,001 cm y 10 cm, 0,001 cm y 1 cm, 0,01 cm y 10 cm, 0,01 cm y 1 cm, 0,1 cm y 10 cm, 0,1 cm y 1 cm, o 1 cm y 10 cm. El Aspecto 136 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 135, donde las intensidades de campo primera y segunda de los pulsos eléctricos primero y segundo son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de los pulsos eléctricos. muestra, en la que las intensidades de campo primera y segunda son además una función de la geometría de una cámara de electroporación, y en la que la cámara de electroporación comprende una distancia entre electrodos de entre 0,01 cm y 1 cm. El Aspecto 137 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 136, donde las intensidades de campo primera y segunda del primer y segundo impulsos eléctricos están entre 0,01 kV/cm y 10 kV/cm, 0,01 kV/cm y 1 kV/cm, 0,1 kV/cm y 10 kV/cm, 0,1 kV/cm y 1 kV/cm, o 1 kV/cm y 10 kV/cm. El Aspecto 138 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 137, donde las intensidades de campo primera y segunda de los impulsos eléctricos primero y segundo están entre 0,3 kV/cm y 3 kV/cm. El Aspecto 139 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 138, donde las duraciones del primer y segundo pulso del primer y segundo pulso eléctrico están entre 10^{-6} segundos y 10 segundos, 10^{-6} segundos y 1 segundo, 10^{-3} segundos y 10 segundos, o 10^{-3} segundos y 1 segundo. El Aspecto 140 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 139, donde las duraciones del primer y segundo pulso del primer y segundo pulso eléctrico están entre 1 microsegundo y 100 milisegundos. El Aspecto 141 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 140, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, ancho, forma, patrón o polaridad del pulso. El Aspecto 142 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 141, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número de pulso, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad, y donde el número

de pulso está entre 1 pulso y 1000 pulsos. 1 pulso y 900 pulsos, 1 pulso y 800 pulsos, 1 pulso y 700 pulsos, 1 pulso y 600 pulsos, 1 pulso y 500 pulsos, 1 pulso y 400 pulsos, 1 pulso y 300 pulsos, 1 pulso y 200 pulsos, 1 pulso y 100 pulsos, 1 pulso y 90 pulsos, 1 pulso y 80 pulsos, 1 pulso y 70 pulsos, 1 pulso y 60 pulsos, 1 pulso y 50 pulsos, 1 pulso y 40 pulsos, 1 pulso y 30 pulsos, 1 pulso y 20 pulsos, o 1 pulso y 10 pulsos. El Aspecto 143 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 142, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número de pulso, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad, y donde el número de pulso está entre 1 pulso y 130 pulsos. El Aspecto 144 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 143, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, y donde el ancho del pulso es una función de una tasa de exponencial. decadencia. El Aspecto 145 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 144, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial. , y donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación. El Aspecto 146 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 145, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial. , donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación, y donde la resistencia de la muestra está entre 1 ohm y 10.000 ohm, 1 ohm y 9000 ohm, 1 ohm y 8000 ohms, 1 ohm y 7000 ohms, 1 ohm y 6000 ohms, 1 ohm y 5000 ohms, 1 ohm y 4000 ohms, 1 ohm y 3000 ohms, 1 ohm y 2000 ohms, 1 ohm y

1000 ohms, 1 ohm y 900 ohm, 1 ohm y 800 ohm, 1 ohm y 700 ohm, 1 ohm y 600 ohm, 1 ohm y 500 ohm, 1 ohm y 400 ohm, 1 ohm y 300 ohm, 1 ohm y 200 ohm, 1 ohm y 100 ohm, 1 ohm y 90 ohm, 1 ohm y 80 ohm, 1 ohm y 70 ohm, 1 ohm y 60 ohm, 1 ohm y 50 ohm, 1 ohm y 40 ohm, 1 ohm y 30 ohm ms, 1 ohm y 20 ohms, o 1 ohm y 10 ohms. El Aspecto 147 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 146, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial. , donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación, y donde la resistencia de la muestra está entre 1 ohm y 1000 ohms. El Aspecto 148 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 147, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial. , donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación, y donde la capacitancia de la fuente de alimentación está entre 1 μF y 1.000.000 μF , 1 μF y 100.000 μF , 1 μF y 10.000 μF , 1 μF y 1000 μF , o 1 μF y 100 μF . El Aspecto 149 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 148, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el ancho del pulso es una función de una tasa de decaimiento exponencial. , donde la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación, y donde la capacitancia de la fuente de alimentación está entre 1000 μF y 5000 μF . El Aspecto 150 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 149, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas

con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde la forma del pulso es un pulso de onda cuadrada o una caída exponencial. pulso de onda El Aspecto 151 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 150, donde los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número, el ancho, la forma, el patrón o la polaridad del pulso, donde el patrón del pulso comprende un solo pulso correspondiente a la duración del el primer o segundo pulso. El Aspecto 152 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 150, donde el patrón de pulsos comprende múltiples pulsos, donde una duración combinada de los múltiples pulsos corresponde a la duración del primer o segundo pulso. El Aspecto 153 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 152, donde la polaridad del primer y segundo impulsos eléctricos es positiva o negativa. El Aspecto 154 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 153, donde la muestra se somete al segundo pulso eléctrico al menos 12 horas a al menos 48 horas después de que la muestra se somete al primer pulso. El Aspecto 155 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 154, donde la muestra se somete al segundo pulso eléctrico al menos 24 horas después de que la muestra se somete al primer pulso. El Aspecto 156 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 155, donde el sistema de electroporación comprende un aparato de electroporación de flujo. El aspecto 157 es el sistema de electroporación del aspecto 117 al aspecto 156, donde el sistema de electroporación comprende un aparato de electroporación de flujo, y donde la muestra se somete a pulsos eléctricos mientras la muestra fluye dentro del aparato de electroporación de flujo. El Aspecto 158 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 157, donde las células son células de mamífero. El Aspecto 159 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 158, donde las células son células humanas, células murinas, células de rata, células de hámster o células de primate. El Aspecto 160 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 159, donde las células son células primarias. El Aspecto 161 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al

Aspecto 160, donde las células son células cultivadas. El Aspecto 162 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 161, donde las células son células cultivadas y donde las células cultivadas son líneas celulares cultivadas. El Aspecto 163 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 162, donde las células son líneas celulares cultivadas y donde las líneas celulares cultivadas comprenden 3T3, 697, 10T½, 1321N1, A549, AHR77, B-LCL, B16, B65, Ba/F3, BHK, C2C12, C6, CaCo-2, CAP, CaSki, ChaGo-K-1, CHO, COS, DG75, DLD-1, EL4, H1299, HaCaT, HAP1, HCT116, HEK, HeLa, HepG2, HL60, HOS, HT1080, HT29, Huh-7, HUVEC, INS-1/GRINCH, Jurkat, K46, K562, KG1, KHYG-1, L5278Y, L6, LNCaP, LS180, MCF7, MDA-MB-231, ME-180, MG-63, Min-6, MOLT4, Nalm6, ND7/23, Neuro2a, NK92, NS/0, P3U1, Panc-1, PC-3, PC12, PER.C6, PM1, Ramos, RAW 264.7, RBL, Renca, RLE, SH-SY5Y, SK-BR-3, SK-MES-1, SK-N-SH, SK-OV-3, SP2/0, SW403, THP-1, U2OS, U937, Vero, YB2/0, o derivados de estos. El Aspecto 164 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 163, donde las células comprenden adipocitos, condrocitos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, hepatocitos, queratinocitos, miocitos, neuronas, osteocitos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), esplenocitos, células madre células o timocitos. El Aspecto 165 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 164, donde las células comprenden PBMC y donde las PBMC son linfocitos de sangre periférica (PBL). El Aspecto 166 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 164, donde las células comprenden PBMC, donde las PBMC son PBL y donde los PBL son células asesinas naturales (NK), células T o células B. El Aspecto 167 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 164, donde las células comprenden PBMC y donde las PBMC son monocitos. El Aspecto 168 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 164, donde las células comprenden PBMC, donde las PBMC son monocitos, y donde los monocitos son macrófagos o células dendríticas. El Aspecto 169 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 164, donde las células comprenden PBMC, donde las

PBMC son monocitos, donde los monocitos son macrófagos o células dendríticas, y donde los macrófagos son microglia. El Aspecto 170 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 164, donde las células comprenden células madre, donde las células madre son células madre adiposas, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesenquimales o células madre neurales. El Aspecto 171 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 170, donde el primer y el segundo agente son el mismo agente. El Aspecto 172 es el sistema de electroporación del Aspecto 117 al Aspecto 170, donde el primer y el segundo agente son agentes diferentes. El Aspecto 173 es el método de los Aspectos 117 a 172, donde los agentes primero y segundo son un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. El Aspecto 174 es el método de los Aspectos 117 a 173, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña. El Aspecto 175 es el método de los Aspectos 117 a 174, donde el primer agente es un ácido nucleico y el segundo agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña. El Aspecto 176 es el método de los Aspectos 117 a 174, donde el primer agente es un polipéptido y el segundo agente es un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. El Aspecto 177 es el método de los Aspectos 117 a 174, donde el primer agente es una proteína y el segundo agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña. El Aspecto 178 es el método de los Aspectos 117 a 174, donde el primer agente es una molécula pequeña y el segundo agente es un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. El Aspecto 179 es el método de los Aspectos 117 a 178, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es un ácido nucleico. El Aspecto 180 es el método de los Aspectos 117 a 178, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es un polipéptido. El Aspecto 181 es el

método de los Aspectos 117 a 178, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es una proteína. El Aspecto 182 es el método de los Aspectos 117 a 178, donde el primer agente es un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña, y donde el segundo agente es una molécula pequeña. El Aspecto 183 es el método de los Aspectos 117 a 182 donde el ácido nucleico es RNA, y donde el RNA es mRNA, miRNA, shRNA, siRNA o un oligonucleótido antisentido. El Aspecto 184 es el método de los Aspectos 117 a 183, donde el ácido nucleico es DNA, y donde el DNA es un oligonucleótido antisentido, un vector o un DNA lineal de doble sentido. El Aspecto 185 es el método de los Aspectos 117 a 184, donde la proteína es una ribonucleoproteína. El Aspecto 186 es el método de los Aspectos 117 a 185, donde la ribonucleoproteína comprende una proteína Cas9 y un RNA guía. El Aspecto 187 es el método de los Aspectos 117 a 186, donde la eficiencia de carga del agente es al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90%. El Aspecto 188 es el método de los Aspectos 117 a 187, donde la viabilidad celular es al menos del 50% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 189 es el método de los Aspectos 117 a 188, donde la viabilidad celular es al menos del 60% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 190 es el método de los Aspectos 117 a 189, donde la viabilidad celular es al menos del 70% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 191 es el método de los Aspectos 117 a 190, donde la viabilidad celular es al menos del 80% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 192 es el método de los Aspectos 117 a 191, donde la viabilidad celular es al menos del 90% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 193 es el método de los Aspectos 117 a 192, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 194 es el método de los Aspectos 117 a 193, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 195 es el método de los Aspectos 117 a 194, donde

las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 196 es el método de los Aspectos 117 a 195, donde las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables 24 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 197 es el método de los Aspectos 117 a 196, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 198 es el método de los Aspectos 117 a 197, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 199 es el método de los Aspectos 117 a 198, donde las células sometidas a electroporación son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico. El Aspecto 200 es el método de los Aspectos 117 a 199, donde las células electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables 24 horas después del segundo pulso eléctrico.

[0072] El Aspecto 201 es una célula, partícula celular o vesícula lipídica electroporada producida mediante el sistema de electroporación de los Aspectos 117 a 200.

[0073] A lo largo de esta solicitud, el término "célula" o "vehículo de suministro" cuando se refiere a un objetivo de electroporación o un vehículo para el suministro de un agente, fármaco o agente terapéutico incluye células humanas o animales en el sentido biológico.

[0074] Como se usa en el presente documento, el término "energía" se refiere al calor producido durante un pulso eléctrico (o pulsos combinados) aplicado a una muestra, y es proporcional tanto a la fuerza del campo como a la duración del pulso (o duración del pulso combinado) aplicado a la muestra. muestra durante el pulso eléctrico (o pulsos combinados). Por lo tanto, para aplicar un pulso de "alta energía" a una muestra, las proporciones de las variables, incluida la intensidad del campo y la duración del pulso (o la duración del pulso combinado) se modifican de manera que se produzca una mayor cantidad de calor durante

el pulso eléctrico (o pulsos combinados) en comparación con cuando se aplica a la muestra un pulso eléctrico de "energía media" o "energía baja" (o pulsos combinados), siempre que la composición del tampón, el ensamblaje de procesamiento y el volumen de la muestra se mantengan constantes. Por el contrario, para aplicar un pulso de "baja energía" a una muestra, las proporciones de las variables, incluida la intensidad del campo y la duración del pulso (o la duración del pulso combinado) se modifican de modo que se produzca una menor cantidad de calor durante el pulso eléctrico (o pulsos combinados) en comparación con cuando se aplica a la muestra un pulso eléctrico de "energía alta" o "energía media" (o pulsos combinados), siempre que la composición del tampón, el ensamblaje de procesamiento y el volumen de la muestra se mantengan constantes.

[0075] A lo largo de esta solicitud, los términos "sobre", "sustancialmente" y "aproximadamente" se utilizan para indicar que un valor incluye la variación inherente del error para el método de medición o cuantificación.

[0076] El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" puede significar "uno", pero también es consecuente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

[0077] La frase "y/o" significa "y" o "o". Para ilustrar, A, B y/o C incluye: A solo, B solo, C solo, una combinación de A y B, una combinación de A y C, una combinación de B y C, o una combinación de A, B y C. En otras palabras, "y/o" opera como un inclusivo o.

[0078] Las composiciones y métodos para su uso pueden "comprender", "consistir esencialmente en" o "consistir en" cualquiera de los ingredientes o pasos descritos a lo largo de la memoria. Las composiciones y métodos "que consisten esencialmente en" cualquiera de los ingredientes o pasos divulgados limitan el alcance de la reivindicación a los materiales o pasos especificados que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la divulgación. Tal como se utiliza en esta memoria y reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, como "comprende" y

"comprende"), "tener" (y cualquier forma de tener, como "tener" y "tiene"), "incluido" (y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contiene") son inclusivos o abiertos -terminados y no excluyen otros elementos no citados o pasos del método. Se contempla que los aspectos descritos en el presente documento en el contexto del término "que comprende" también pueden implementarse en el contexto del término "que consiste en" o "que consiste esencialmente en".

[0079] Se contempla específicamente que cualquier limitación discutida con respecto a un aspecto de la divulgación puede aplicarse a cualquier otro aspecto de la divulgación. Además, cualquier composición de la divulgación puede usarse en cualquier método de divulgación, y cualquier método de divulgación puede usarse para producir o utilizar cualquier composición de la divulgación. Los aspectos de un aspecto expuesto en los Ejemplos también son aspectos que pueden implementarse en el contexto de los aspectos discutidos en otra parte de un Ejemplo diferente o en otra parte de la solicitud, tal como en el Resumen, la Descripción detallada, las Reivindicaciones y la Breve descripción de los dibujos.

[0080] Otros objetos, características y ventajas de la presente divulgación se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican aspectos específicos de la divulgación, se brindan solo a modo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la divulgación serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0081] Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente divulgación. La divulgación puede entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de los aspectos específicos presentados en el presente documento.

[0082] La Figura 1 ilustra una vista en perspectiva superior izquierda de un conjunto de procesamiento de electroporación en una posición cerrada, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0083] La Figura 2 ilustra una vista en perspectiva superior izquierda del conjunto de procesamiento de la **Figura 1** en una posición abierta, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0084] La Figura 3 ilustra una vista en perspectiva derecha superior trasera del conjunto de procesamiento de la **Figura 1** en la posición abierta, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0085] La Figura 4 ilustra una vista en perspectiva derecha superior trasera del conjunto de procesamiento de la **Figura 1** en la posición abierta, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0086] La Figura 5 ilustra una vista despiezada en perspectiva del conjunto de procesamiento de la **Figura 4**, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0087] La Figura 6 ilustra una vista despiezada en perspectiva del conjunto de procesamiento de la **Figura 4**, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0088] La Figura 7 ilustra una vista en perspectiva superior derecha del ensamblaje de procesamiento de la **Figura 1** con una etiqueta, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0089] La Figura 8 ilustra una vista en perspectiva superior izquierda del ensamblaje de procesamiento de la **Figura 1** con una etiqueta, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0090] La Figura 9 ilustra una vista en perspectiva superior derecha del ensamblaje de procesamiento de la **Figura 1** con un dispositivo de carga insertado, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0091] La Figura 10 ilustra una vista en perspectiva superior derecha del ensamblaje de procesamiento de la **Figura 9**, con porciones del ensamblaje de

procesamiento quitadas de la vista, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0092] La Figura 11 ilustra una vista en perspectiva superior derecha de una bandeja que contiene conjuntos de procesamiento de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0093] La Figura 12 ilustra una vista frontal de bandejas que contienen conjuntos de procesamiento de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0094] La Figura 13 ilustra una vista en perspectiva superior derecha de una bandeja que contiene conjuntos de procesamiento de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0095] La Figura 14 ilustra vistas frontales de una pluralidad de juntas, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0096] La Figura 15 ilustra una vista superior de un conjunto de juntas y una vista frontal de una junta, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0097] La Figura 16 ilustra la vista frontal de una bolsa y un aparato de procesamiento en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0098] La Figura 17 ilustra una vista frontal de una junta, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0099] La Figura 18 ilustra una vista en perspectiva superior derecha de otro conjunto de procesamiento de electroporación en una posición cerrada, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0100] La Figura 19 ilustra una vista en perspectiva superior derecha del conjunto de procesamiento de la **Figura 18** en una posición abierta, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0101] La Figura 20 ilustra una vista despiezada en perspectiva del conjunto de procesamiento de la **Figura 18**, consecuente con aspectos de la presente divulgación;

[0102] La Figura 21 ilustra una bandeja que contiene una pluralidad de conjuntos de procesamiento de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0103] La Figura 22 ilustra un conjunto de procesamiento de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0104] La Figura 23 ilustra bandejas para contener una pluralidad de conjuntos de procesamiento de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0105] La Figura 24 ilustra una bandeja para contener una pluralidad de conjuntos de procesamiento de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0106] La Figura 25 ilustra un estante para contener una pluralidad de conjuntos de procesamiento de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0107] La Figura 26 ilustra un estante para contener una pluralidad de conjuntos de procesamiento de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0108] La Figura 27 ilustra sistemas de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0109] La Figura 28 ilustra una estación de acoplamiento en una posición abierta con un conjunto de procesamiento de electroporación retirado, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0110] La Figura 29 ilustra la estación de acoplamiento de la **Figura 28** en una posición abierta con un conjunto de procesamiento insertado, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0111] La Figura 30 ilustra la estación de acoplamiento de la **Figura 28** en una posición cerrada con un conjunto de procesamiento insertado, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0112] La Figura 31 ilustra una estación de acoplamiento en una posición abierta, una posición cerrada y conectada a un sistema de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0113] La Figura 32 ilustra una estación de acoplamiento conectada a un sistema de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación;

[0114] La Figura 33 ilustra un dispositivo de electroporación, un conjunto de procesamiento, una estación de acoplamiento, bandejas y un aparato de llenado, en concordancia con aspectos de esta divulgación;

[0115] La Figura 34 ilustra recipientes de ejemplo para el suministro de un sistema de electroporación, en concordancia con aspectos de la presente divulgación.

[0116] La Figura 35 ilustra un diseño experimental para la electroporación secuencial de linfocitos expandidos con dos concentraciones diferentes de mRNA de GFP (100 µg/mL y 200 µg/mL).

[0117] La Figura 36 muestra datos de citometría de flujo de los días 3 y 4 después de la electroporación secuencial de células de linfocitos expandidas con mRNA de GFP.

[0118] Las Figuras 37A-37B muestran la activación de linfocitos y viabilidad de linfocitos sometidos a electroporación secuencial.

[0119] Las Figuras 38A-38B muestran la expresión de GFP y la intensidad de fluorescencia media (MFI) de GFP para linfocitos electroporados secuencialmente.

[0120] Las Figuras 39A-39E ilustran diseños experimentales para electroporación secuencial de linfocitos expandidos a diferentes energías de electroporación con dos concentraciones diferentes de mRNA de GFP (100 µg/mL y 200 µg/mL).

[0121] Las Figuras 40A-40B muestran poblaciones de linfocitos que expresan mRNA de GFP en tres momentos diferentes (24 horas, 48 horas y 72 horas) después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos a diferentes

energías de electroporación (EP) con dos concentraciones de mRNA de GFP diferentes (100 µg/mL y 200 µg/mL).

[0122] Las Figuras 41A-41B muestran que la viabilidad de los linfocitos fue comparable después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos a diferentes energías de electroporación (EP) para las cuatro combinaciones de energía ilustradas en las **Figuras 39A-39E**.

[0123] Las Figuras 42A-42B muestran la expresión de GFP por linfocitos en tres puntos temporales diferentes (24 horas, 48 horas y 72 horas) después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos a diferentes energías de electroporación (EP) con dos concentraciones diferentes de mRNA de GFP (100 µg/mL y 200 µg/mL).

[0124] Las Figuras 43A-43B muestran la intensidad de fluorescencia media (MFI) de GFP para los linfocitos en tres puntos temporales diferentes (24 horas, 48 horas y 72 horas) después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos a diferentes energías de electroporación (EP) con dos concentraciones diferentes de mRNA de GFP (100 µg/mL y 200 µg/mL).

[0125] Las Figuras 44A-44B ilustran un diseño experimental, incluido el cultivo celular (**Figura 44A**) y condiciones de (**Figura 44B**) electroporación, para la electroporación secuencial de células T activadas con dos construcciones diferentes de ribonucleoproteína (RNP) para eliminar TRAC y PD1.

[0126] La Figura 45 muestra la activación de las células T después de la incubación con citocinas durante 2 días.

[0127] Las Figuras 46A-46F muestran una estrategia de activación de FACS para medir la eficacia de inactivación de TRAC y PD1 en linfocitos.

[0128] Las Figuras 47A-47E muestran una estrategia de activación de FACS para medir los recuentos totales de células y linfocitos después de la electroporación con una construcción RNP para eliminar TRAC.

[0129] La Figura 48 es un esquema de un aspecto del presente sistema de electroporación.

[0130] La **Figura 49** representa un aspecto de los presentes métodos para someter una muestra a dos o más pulsos eléctricos, que pueden implementarse mediante el sistema de electroporación de la **Figura 48**.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0131] Ciertos aspectos de la divulgación están dirigidos a métodos y aparatos para la electroporación secuencial de células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos que proporcionan la administración de múltiples rondas de electroporación separadas en el tiempo para aumentar la eficacia de entrada de uno o más agentes de interés en células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos, y para minimizar el daño por arco eléctrico o choque térmico.

I. Electroporación

[0132] Conforme se usa en el presente documento, la electroporación o electrocarga se refiere a la aplicación de una corriente eléctrica o un campo eléctrico para facilitar la entrada de un agente de interés en las células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos. Un experto en la técnica comprenderá que la presente divulgación contempla cualquier método y técnica de electroporación.

[0133] El proceso de electroporación implica generalmente la formación de poros en una membrana celular, o en una vesícula o liposoma, mediante la aplicación de pulsos de campo eléctrico a través de una suspensión celular líquida que contiene células, vesículas o liposomas. Durante el proceso de electroporación, las células a menudo se suspenden en un medio líquido y luego se someten a un pulso de campo eléctrico. El medio puede ser electrolito, no electrolito o una mezcla de electrolitos y no electrolitos. La fuerza del campo eléctrico aplicado a la suspensión y la duración del pulso (el tiempo que se aplica el campo eléctrico a una suspensión celular) varía según el tipo de célula. Para crear un poro en la membrana externa de una célula, el campo eléctrico debe aplicarse durante un periodo de tiempo y a un voltaje tal que aumenten la

permeabilidad de la membrana celular para permitir que un agente de interés ingrese a la célula.

[0134] Los parámetros de electroporación se pueden ajustar para optimizar la fuerza del campo eléctrico aplicado y/o la duración de la exposición, de modo que los poros formados en las membranas por el pulso eléctrico se vuelvan a sellar después de un corto periodo de tiempo, durante el cual los compuestos extracelulares tienen la oportunidad de entrar en la célula. Sin embargo, la exposición excesiva de células vivas a campos eléctricos puede causar apoptosis y/o necrosis, lo que da como resultado la muerte celular. Esto se debe en parte a que, durante un proceso de electroporación, la corriente eléctrica que fluye a través de un medio conductor provoca el calentamiento del medio y un aumento posterior de la conductividad del medio. Si no se controla adecuadamente, tal aumento de conductividad conduce a que se extraiga aún más corriente de una fuente de alimentación, lo que puede provocar la formación de arcos y la pérdida de la muestra. Este efecto se observa típicamente en fuerzas de campo relativamente altas (>2 kV/cm). Sin embargo, la electroporación de células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos difíciles de transfectar, por ejemplo, requiere campos eléctricos relativamente fuertes.

[0135] A modo de ejemplo, los tampones desarrollados para la electroporación suelen tener una conductividad relativamente alta y se utilizan pulsos eléctricos muy cortos. Sin embargo, para cargar eficazmente células o liposomas difíciles de transfectar con un agente de interés, puede ser necesaria la aplicación de altos voltajes a medios altamente conductores durante intervalos de tiempo relativamente largos. Estas tres condiciones no se cumplen fácilmente al mismo tiempo y hacerlo puede dar como resultado un daño irreversible a las células o liposomas. Antes de realizar los experimentos descritos en el presente documento, los inventores propusieron que múltiples rondas de electroporación podrían proporcionar una carga eficiente de liposomas o células difíciles de transfectar con un agente de interés. En la actualidad, sin embargo, se evita

generalmente la electroporación secuencial ya que, al igual que con la aplicación de altos voltajes a medios altamente conductores durante intervalos de tiempo relativamente largos, se sabe que múltiples rondas de electroporación dañan irreversiblemente las células o los liposomas y provocan la muerte celular. Por ejemplo, O'Dea *et al.* (Vector-free intracellular delivery by reversible permeabilization. *PLoS ONE*. 2017; 12(3):e0174779) señala explícitamente que los métodos de permeabilización celular reversible sin vector descritos hacen posible la dosificación múltiple de material genético a las células, en contraste con técnicas tales como la electroporación, para las cuales no es posible la dosificación múltiple ya que las rondas múltiples de electroporación provocan la muerte celular. De hecho, Plews *et al.* (Activation of Pluripotency Genes in Human Fibroblast Cells by a Novel mRNA Based Approach. *PLoS ONE*. 2010; 5(12): e14397) demostró en realidad que intentar múltiples rondas de electroporación causaba una muerte celular masiva. De manera similar, Rols y Teissie (Electropermeabilization of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration. *Biophys. J.* 1998; 75(3): 1415-1423) muestran en las Figuras 2A y 2C una disminución drástica en la viabilidad celular con un aumento en la duración del pulso o en el número de pulsos aplicados en secuencia.

[0136] Una solución a este problema implica los métodos y aparatos descritos para la electroporación que proporcionan rondas secuenciales de electroporación mientras minimizan el daño a las células, partículas celulares, vesículas lipídicas o tejidos por el arco eléctrico o choque térmico; aumentan la eficacia de carga de un agente de interés, y mantienen la viabilidad de las células, partículas celulares, vesículas lipídicas o tejidos y la capacidad de las células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos para producir un efecto clínico. Los inventores han desarrollado métodos de electroporación que comprenden someter una muestra que comprende una o más de células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a dos o más pulsos eléctricos que poseen diferentes fuerzas de campo eléctrico y/o diferentes duraciones de pulso y, además o alternativamente, permiten que la muestra se

recupere durante al menos 24 horas entre los dos o más pulsos eléctricos. De manera sorprendente, los inventores descubrieron que estos métodos de electroporación pueden cargar muestras difíciles de transfectar de forma más eficaz con un agente de interés sin reducir la integridad de la muestra o, para las muestras celulares, la viabilidad celular, en comparación con los métodos descritos anteriormente.

[0137] Algunos aspectos incluyen métodos para encapsular agentes de interés; métodos de permeabilización transitoria de membranas para permitir el transporte de agentes de interés a través de las membranas; métodos de electroporación de células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos; métodos para producir células electroporadas, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos; y métodos para aumentar la eficacia de la electroporación mientras se mantiene el efecto clínico de los materiales electroporados. Algunos aspectos también incluyen una célula, partícula celular o vesícula lipídica electroporada producida mediante cualquiera de los métodos o aparatos de electroporación descritos en el presente documento.

[0138] Algunos de los presentes métodos incluyen someter una muestra que comprende una o más células, partículas celulares o vesículas lipídicas intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera fuerza de campo y una duración del primer pulso de manera suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un agente según un primer protocolo y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda fuerza de campo y una duración del segundo pulso suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un agente según un segundo protocolo. En algunos de tales métodos, la primera fuerza de campo y/o la duración del primer pulso son diferentes de la segunda fuerza de campo y/o la duración del segundo pulso. Complementaria o alternativamente, algunos métodos incluyen permitir que la muestra se recupere durante al menos 24 horas después de someter la muestra al primer pulso eléctrico.

[0139] En algunos aspectos, el agente es un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña. En algunos aspectos, el ácido nucleico es RNA y el RNA es mRNA, miRNA, shRNA, siRNA o un oligonucleótido antisentido. En algunos aspectos, el ácido nucleico es DNA, y el DNA es un oligonucleótido antisentido, un vector o un DNA lineal de doble sentido. En algunos aspectos, la proteína es una ribonucleoproteína. En algunos aspectos, la ribonucleoproteína comprende una proteína Cas9 y un RNA guía.

[0140] En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento son realizados por un sistema de electroporación que posee un medio legible por computadora no transitorio que comprende instrucciones que, al ser ejecutadas por un procesador, hacen que el procesador ejecute el primer y segundo protocolo para electroporar la muestra. En algunos aspectos, el sistema de electroporación comprende un aparato de electroporación de flujo, y la muestra se somete a los pulsos eléctricos mientras la muestra fluye dentro del aparato de electroporación de flujo.

[0141] En algunos aspectos, la temporización del primer y segundo pulso eléctrico y/o el campo eléctrico aplicado y/o la duración de la exposición proporcionada por los dos o más pulsos eléctricos pueden ajustarse de manera tal que se minimice el daño a las células, partículas celulares, vesículas lipídicas o tejidos por arco eléctrico o choque térmico; se aumenta la eficacia de carga de un agente de interés, y se mantiene la viabilidad de las células, partículas celulares, vesículas lipídicas o tejidos y la capacidad de las células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos para producir un efecto clínico.

[0142] En algunos aspectos, se permite dejar reposar la muestra después de un pulso eléctrico (p. ej., de un primer y/o segundo pulso eléctrico). En algunos aspectos, la muestra se deja reposar después de un pulso eléctrico durante 10 a 30 minutos a 25-50 °C y 3-8% de CO₂. Por lo tanto, en algunos aspectos, la muestra se deja reposar después de un pulso eléctrico como máximo, como mínimo o 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 minutos, o cualquier margen o valor derivable de este. En algunos

aspectos, la muestra se deja reposar después de un pulso eléctrico al menos, como máximo o aproximadamente 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o a 50 °C, o cualquier margen o valor derivable de este. En algunos aspectos, la muestra se deja reposar después de un pulso eléctrico de al menos, como máximo o aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 u 8% de CO₂, o cualquier margen o valor derivable de este. En aspectos específicos, la muestra se deja reposar después de un pulso eléctrico durante 20 minutos a 37 °C y 5% de CO₂. En algunos aspectos, la muestra no se deja reposar después de un pulso eléctrico (p. ej., de un primer y/o segundo pulso eléctrico).

[0143] En algunos aspectos, se permite que la muestra que comprende una o más de células intactas se recupere al cultivar las células durante al menos, como máximo, o 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114 o 120 horas, o cualquier margen o valor derivable de este, después de que la muestra se somete al primer pulso. En algunos aspectos, se permite que la muestra que comprende una o más de células intactas se recupere al cultivar las células durante un máximo o al menos de 6 horas a 120 horas, de 6 horas a 96 horas, de 6 horas a 72 horas, de 6 horas a 48 horas, 6 horas a 24 horas, 6 horas a 12 horas, o cualquier margen o valor derivable de este, después de que la muestra se somete al primer pulso. De esta manera, en algunos aspectos, la muestra se somete al segundo pulso eléctrico como mínimo, como máximo, o 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114 o 120 horas, o cualquier margen o valor derivable de este, después de que la muestra se somete al primer pulso. En algunos aspectos, la muestra se somete al segundo pulso eléctrico como máximo o al menos 6 horas a 120 horas, 6 horas a 96 horas, 6 horas a 72 horas, 6 horas a 48 horas, 6 horas a 24 horas, 6 horas a 12 horas, o cualquier margen o valor derivable de este, después de que la muestra se somete al primer pulso. En algunos aspectos, la muestra se somete al segundo pulso eléctrico entre 6 horas y 120 horas, 6 horas y 96 horas, 6 horas y 72 horas, 6 horas y 48 horas, 6 horas y 24 horas, 6 horas y 12 horas, o cualquier

margen o valor derivable de este, después de que la muestra se somete al primer pulso. En algunos aspectos, la muestra se somete al segundo pulso eléctrico de al menos aproximadamente 12 horas a al menos aproximadamente 48 horas después de que la muestra se somete al primer pulso. En algunos aspectos, la muestra se somete al segundo pulso eléctrico al menos aproximadamente 24 horas después de que la muestra se somete al primer pulso. En algunos aspectos, la muestra que comprende una o más de células intactas no se recupera al cultivar las células después de someter la muestra al primer pulso.

[0144] Recuperar la muestra o permitir que la muestra se recupere significa cultivar las células de la muestra en cualquiera de los recipientes de cultivo celular y medios de cultivo celular descritos en el presente documento en condiciones tal como las que se describen en el presente documento que sean apropiadas y suficientes para facilitar la restauración o devolución de las células a un estado o condición mejorada o deseada. Por ejemplo, la recuperación en cultivo puede permitir que las células se recuperen del trauma de la electroporación, por ejemplo, al reparar las paredes celulares y comenzar a expresar o metabolizar el agente cargado en las células tras la electroporación de las células.

[0145] Con respecto a la fuerza de campo y la duración del pulso, en algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico es igual a la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico, y la duración del pulso del primer pulso eléctrico es más larga que la duración del pulso del segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico es igual a la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico, y la duración del pulso del primer pulso eléctrico es más corta que la duración del pulso del segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico es igual a la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico, y la duración del pulso del primer pulso eléctrico es igual a la duración del pulso del segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico es mayor que la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico, y la duración del

pulso del primer pulso eléctrico es igual a la duración del pulso del segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico es mayor que la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico, y la duración del pulso del primer pulso eléctrico es mayor que la duración del pulso del segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico es mayor que la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico, y la duración del pulso del primer pulso eléctrico es más corta que la duración del pulso del segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico es menor que la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico, y la duración del pulso del primer pulso eléctrico es igual a la duración del pulso del segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico es menor que la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico, y la duración del pulso del primer pulso eléctrico es mayor que la duración del pulso del segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico es menor que la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico, y la duración del pulso del primer pulso eléctrico es más corta que la duración del pulso del segundo pulso eléctrico.

[0146] En algunos aspectos, la fuerza de campo del primer pulso eléctrico y la duración del pulso del primer pulso eléctrico producen una primera energía eléctrica total aplicada, y la fuerza de campo del segundo pulso eléctrico y la duración del pulso del segundo pulso eléctrico producen una segunda energía eléctrica total aplicada. En algunos aspectos, la primera energía eléctrica aplicada total es diferente de la segunda energía eléctrica aplicada total. En algunos aspectos, la primera energía eléctrica aplicada total es mayor de la segunda energía eléctrica aplicada total. En algunos aspectos, la primera energía eléctrica total aplicada es menor que la segunda energía eléctrica total aplicada.

[0147] Para lograr que una primera fuerza de campo y/o una primera duración de pulso sea igual, menor o mayor a una segunda fuerza de campo y/o una segunda duración de pulso, se pueden optimizar una o más de variables o

parámetros de electroporación mediante los procedimientos y métodos descritos en el presente documento. Los aspectos de la divulgación pueden utilizarse en contexto con sistemas de electroporación estática y de flujo.

1. Fuerza de campo eléctrico

[0148] La fuerza de campo se mide como el voltaje suministrado a través de un espacio entre electrodos y puede expresarse como kV/cm. La fuerza de campo es crucial para superar el potencial eléctrico de la membrana celular con el fin de permitir que se produzca la permeación reversible temporal o la formación de poros en la membrana celular, y los métodos de la presente divulgación son capaces de someter las células a una serie de fuerzas de campo eléctrico. En algunos aspectos, las primeras y segundas fuerzas de campo de los primeros y segundos pulsos eléctricos pueden ser, ser al menos, o ser como máximo 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, o 10 kV/cm, o cualquier margen o valor derivable de este. En algunos aspectos, las primeras y segundas fuerzas de campo de los primeros y segundos pulsos eléctricos son como máximo o al menos aproximadamente 0,01 kV/cm a 10 kV/cm, 0,01 kV/cm a 1 kV/cm, 0,1 kV/cm a 10 kV/cm, 0,1 kV/cm a 1 kV/cm, 1 kV/cm a 10 kV/cm, o cualquier valor de 0,01 kV/cm a 10 kV/cm o margen derivable de este. En algunos aspectos, las primeras y segundas fuerzas de campo de los primeros y segundos pulsos eléctricos están entre 0,01 kV/cm y 10 kV/cm, 0,01 kV/cm y 1 kV/cm, 0,1 kV/cm y 10 kV/cm, 0,1 kV/cm y 1 kV/cm, 1 kV/cm y 10 kV/cm, o cualquier margen de 0,01 kV/cm a 10 kV/cm o margen derivable de este. En algunos aspectos, las primeras y segundas fuerza de campo de los primeros y segundos pulsos eléctricos están entre 0,3 kV/cm y 3 kV/cm, cualquier valor entre 0,3 kV/cm y 3 kV/cm, o cualquier margen o valor derivable de este.

[0149] La fuerza de campo es una función de varios factores, incluida la magnitud del voltaje de un pulso eléctrico aplicado, la duración del pulso eléctrico y la conductividad de la muestra que se electropora. Por lo tanto, en algunos aspectos, las primeras y segundas fuerzas de campo de los primeros y segundos pulsos eléctricos son una función de la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos, la duración de los pulsos eléctricos y la conductividad de la muestra.

[0150] En algunos aspectos, la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos puede ser, puede ser aproximadamente, ser al menos o ser como máximo 0,001, 0,010, 0,020, 0,030, 0,040, 0,050, 0,060, 0,070, 0,080, 0,090, 0,100, 0,110, 0,120, 0,130, 0,140, 0,150, 0,160, 0,170, 0,180, 0,190, 0,200, 0,210, 0,220, 0,230, 0,240, 0,250, 0,260, 0,270, 0,280, 0,290, 0,300, 0,310, 0,320, 0,330, 0,340, 0,350, 0,360, 0,370, 0,380, 0,390, 0,400, 0,410, 0,420, 0,430, 0,440, 0,450, 0,460, 0,470, 0,480, 0,490, 0,500, 0,510, 0,520, 0,530, 0,540, 0,550, 0,560, 0,570, 0,580, 0,590, 0,600, 0,610, 0,620, 0,630, 0,640, 0,650, 0,660, 0,670, 0,680, 0,690, 0,700, 0,710, 0,720, 0,730, 0,740, 0,750, 0,760, 0,770, 0,780, 0,790, 0,800, 0,810, 0,820, 0,830, 0,840, 0,850, 0,860, 0,870, 0,880, 0,890, 0,900, 0,910, 0,920, 0,930, 0,940, 0,950, 0,960, 0,970, 0,980, 0,990, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600,

4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, 9900 o 10.000 voltios, o cualquier margen o valor derivable de este. En algunos aspectos, la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos es como máximo o al menos aproximadamente 0,001 voltios a 10.000 voltios, 0,01 voltios a 10.000 voltios, 0,1 voltios a 10.000 voltios, 1 voltio a 10.000 voltios, 1 voltio a 9000 voltios, 1 voltio a 8000 voltios, 1 voltio a 7000 voltios, 1 voltio a 6000 voltios, 1 voltio a 5000 voltios, 1 voltio a 4000 voltios, 1 voltio a 3000 voltios, 1 voltio a 2000 voltios, 1 voltio to 1000 voltios o cualquier valor de 0,001 voltios a 10.000 voltios o margen derivable de este. En algunos aspectos, la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos está entre 0,001 voltios y 10.000 voltios, 0,01 voltios y 10.000 voltios, 0,1 voltios y 10.000 voltios, 1 voltio y 10.000 voltios, 1 voltio y 9000 voltios, 1 voltio y 8000 voltios, 1 voltio y 7000 voltios, 1 voltio y 6000 voltios, 1 voltio y 5000 voltios, 1 voltio y 4000 voltios, 1 voltio y 3000 voltios, 1 voltio y 2000 voltios, 1 voltio y 1000 voltios, o cualquier valor de 0,001 voltios a 10.000 voltios o margen derivable de este. En algunos aspectos, la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos está entre 100 voltios y 900 voltios, cualquier valor de 100 voltios a 900 voltios, o cualquier margen o valor derivable derivado.

[0151] En algunos aspectos, la conductividad de la muestra es una función de parámetros que comprenden una composición iónica del tampón de electroporación, la concentración de un agente que se va a cargar en las células, la densidad celular, la temperatura y la presión. En algunos aspectos, la conductividad de la muestra puede ser, ser al menos, o ser como máximo 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5,

9,6, 9,7, 9,8, 9,9, o 10 siemens/metro, o cualquier margen o valor derivable de este. En algunos aspectos, la conductividad de la muestra es como máximo o al menos aproximadamente de 0,01 siemens/metro a 10 siemens/metro, de 0,01 siemens/metro a 1 siemens/metro, de 0,1 siemens/metro a 10 siemens/metro, de 0,1 siemens/metro a 1 siemens/metro, de 1 siemens/metro a 10 siemens/metro, o cualquier valor de 0,01 siemens/metro a 10 siemens/metro o margen derivable de este. En algunos aspectos, la conductividad de la muestra está entre 0,01 siemens/metro y 10 siemens/metro, 0,01 siemens/metro y 1 siemens/metro, 0,1 siemens/metro y 10 siemens/metro, 0,1 siemens/metro y 1 siemens/metro, 1 siemens/metro y 10 siemens/metro, o cualquier valor de 0,01 siemens/metro a 10 siemens/metro o margen derivable de este. En algunos aspectos, la conductividad de la muestra está entre 1,0 y 3,0 siemens/metro, cualquier valor entre 1,0 siemens/metro y 3,0 siemens/metro, o cualquier margen o valor derivable de este.

[0152] La composición iónica de un tampón utilizado para la electroporación puede variar según el tipo de célula. Por ejemplo, se pueden usar tampones altamente conductivos tal como PBS (solución salina tamponada con fosfato <30 ohms) y HBSS (tampón Hepes <30 ohms) o medios de cultivo normalizado, que pueden contener suero. Otros tampones incluyen tampones hipoosmolares en los que las células absorben agua poco antes de un pulso eléctrico, lo que puede provocar la hinchazón de las células y puede reducir el voltaje de permeación óptimo al tiempo que garantiza que la membrana sea más fácilmente permeable. Las celdas que requieren el uso de tampones de alta resistencia (>3000 ohms) pueden requerir preparación y lavado de las celdas para eliminar el exceso de iones de sal y reducir la posibilidad de formación de arcos y pérdida de muestra. La fuerza iónica de un tampón de electroporación tiene un efecto directo sobre la resistencia de la muestra, que a su vez afecta la duración del pulso o la constante de tiempo del pulso. El volumen de líquido en contacto con un electrodo también tiene un efecto significativo en la resistencia de la muestra para soluciones iónicas, y la resistencia de la muestra es inversamente

proporcional al volumen de la solución y al pH. A medida que aumenta el volumen, disminuye la resistencia, lo que aumenta la probabilidad de formación de arco y pérdida de muestra, mientras que al reducir el volumen aumenta la resistencia y disminuye el potencial de arco.

[0153] El tamaño y la concentración de un agente tendrán un efecto sobre los parámetros eléctricos utilizados para transfectar la célula. Las moléculas más pequeñas (por ejemplo, siRNA o miRNA) pueden necesitar voltajes más altos con longitudes de pulso de microsegundos, mientras que las moléculas más grandes (por ejemplo, DNA y proteínas) pueden necesitar voltajes más bajos con longitudes de pulso más largas. La concentración de un oligonucleótido durante un procedimiento de electroporación puede ser de aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 a aproximadamente 350, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 o 5000 µg/mL o cualquier valor de 0,01 µg/mL a 5000 µg/mL o el margen derivable del mismo. En ciertos aspectos, la concentración del oligonucleótido es de al menos 1 µg/mL. En aspectos adicionales, la concentración del oligonucleótido es al menos, como máximo o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 µg/mL, o cualquier valor de 1 µg/mL a 300 µg/mL o margen derivable en el mismo. La concentración de un polipéptido durante un procedimiento de electroporación puede ser de aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 a aproximadamente 350, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 o 5000 µg/mL, o cualquier valor de 0,01 µg/mL a 5000 µg/mL o el margen derivable del mismo. En ciertos aspectos, la concentración del polipéptido es de al menos 1 µg/mL. En aspectos adicionales, la concentración del polipéptido es al menos, como máximo o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o

300 µg/ml, o cualquier valor a partir de 1 µg/mL a 300 µg/mL o margen derivable en el mismo.

[0154] La densidad celular se puede relacionar con el tamaño celular. En general, los tamaños de celdas más pequeños requieren voltajes más altos, mientras que los tamaños de celdas más grandes requieren voltajes más bajos para una penetración exitosa de la membrana celular.

[0155] La temperatura a la que se mantienen las células durante la electroporación puede afectar a la eficacia de la electroporación. Las muestras pulsadas a alto voltaje o expuestas a numerosos pulsos y pulsos de larga duración pueden provocar el calentamiento de la muestra, lo que puede contribuir a una mayor muerte celular y una menor eficiencia de transfección. Mantener la muestra a una temperatura más baja puede disminuir los efectos del sobrecalentamiento en la viabilidad y eficiencia de la celda. En general, el voltaje de pulso normalizado utilizado para las células a temperatura ambiente debe duplicarse aproximadamente para la electroporación a 4 °C para penetrar de forma eficaz en la membrana celular.

[0156] En algunos aspectos, la geometría de una cámara de electroporación se puede ajustar para ajustar la intensidad del campo eléctrico. La fuerza de campo se calcula usando el voltaje dividido por el tamaño del espacio. La geometría de una cámara de electroporación puede ser una función de la distancia entre los electrodos o "tamaño del espacio". Así, en algunos aspectos, el tamaño del espacio de los electrodos dentro de una cámara de electroporación puede controlarse para ajustar la intensidad del campo eléctrico. Al aumentar el tamaño del espacio, la intensidad del campo se puede aumentar sin cambiar el voltaje. Para derivar el voltaje necesario para lograr la electroporación si se conocen la intensidad de campo deseada y el tamaño del espacio, la intensidad del campo (kV) se multiplica por el tamaño del espacio (cm). Los electrodos de las cámaras de electroporación pueden comprender dos o más electrodos de "placa". Las placas de electrodos pueden comprender cualquier material biocompatible y conductor útil, incluidos aluminio, titanio y oro. La placa de electrodos puede ser

direccionable con un pulso eléctrico según lo determinado por la presente divulgación. Los electrodos pueden comprender una matriz de entre 1 y 100 cátodos y 1 y 100 ánodos, existiendo un número par de cátodos y ánodos para formar pares de electrodos positivo y negativo. Las placas pueden comprender una dimensión de ancho que generalmente es mayor que la distancia, o el espacio, entre electrodos opuestos, o mayor que el doble de la distancia del espacio.

[0157] Los electrodos de cátodo y ánodo pueden estar espaciados en lados interiores opuestos de una cámara de electroporación de manera que la cámara de electroporación comprenda un tamaño de espacio entre electrodos de al menos, como máximo o aproximadamente 0,001, 0,010, 0,020, 0,030, 0,040, 0,050, 0,060, 0,070, 0,080, 0,090, 0,100, 0,110, 0,120, 0,130, 0,140, 0,150, 0,160, 0,170, 0,180, 0,190, 0,200, 0,210, 0,220, 0,230, 0,240, 0,250, 0,260, 0,270, 0,280, 0,290, 0,300, 0,310, 0,320, 0,330, 0,340, 0,350, 0,360, 0,370, 0,380, 0,390, 0,400, 0,410, 0,420, 0,430, 0,440, 0,450, 0,460, 0,470, 0,480, 0,490, 0,500, 0,510, 0,520, 0,530, 0,540, 0,550, 0,560, 0,570, 0,580, 0,590, 0,600, 0,610, 0,620, 0,630, 0,640, 0,650, 0,660, 0,670, 0,680, 0,690, 0,700, 0,710, 0,720, 0,730, 0,740, 0,750, 0,760, 0,770, 0,780, 0,790, 0,800, 0,810, 0,820, 0,830, 0,840, 0,850, 0,860, 0,870, 0,880, 0,890, 0,900, 0,910, 0,920, 0,930, 0,940, 0,950, 0,960, 0,970, 0,980, 0,990, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,6, 1,7, 1,6, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2, 9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 o 10 cm, o cualquier margen o valor derivable en el mismo. Los electrodos de cátodo y ánodo pueden estar espaciados en lados interiores opuestos de una cámara de electroporación de manera que la cámara de electroporación comprenda un tamaño de espacio entre electrodos de como máximo o al menos aproximadamente 0,001 cm a 10 cm, 0,001 cm a 1 cm, 0,01 cm a 10 cm, 0,01 cm a 1 cm, 0,1 cm a 10 cm,

0,1 cm a 1 cm, 1 cm a 10 cm, o cualquier valor de 0,001 cm a 10 cm o margen derivable del mismo. La Figura 5 muestra una cámara de electroporación 108 formada, en algunos aspectos, por buses de electrodos de aluminio opuestos 120 colocados alrededor de la cámara de electroporación 108 y rodeando una junta 130 dentro de la cámara 108; el espacio entre electrodos comprende el grosor de la junta 130, correspondiendo el grosor de la junta a un lado de la junta 130 que se extiende entre los buses de electrodos opuestos 120. En aspectos en los que la cámara de electroporación 108 está formada por un bus de electrodos 120 y una película de plástico recubierta de oro 128 que se coloca frente al bus de electrodos opuesto 120 de manera que la película de plástico recubierta de oro 128 se interpone entre los buses de electrodos opuestos 120 , el grosor de la junta que comprende el espacio entre electrodos corresponde a un lado de la junta 130 que se extiende entre un bus de electrodos 120 y la película de plástico recubierta de oro 128 que se coloca frente al bus de electrodos opuesto 120. En algunos aspectos, la cámara de electroporación comprende una distancia entre electrodos que puede, ser al menos o ser como máximo 0,001, 0,010, 0,020, 0,030, 0,040, 0,050, 0,060, 0,070, 0,080, 0,090, 0,100, 0,110, 0,120, 0,130 , 0,140, 0,150, 0,160, 0,170, 0,180, 0,190, 0,200, 0,210, 0,220, 0,230, 0,240, 0,250, 0,260, 0,270, 0,280, 0,290, 0,300, 0,310, 0,320, 0,330, 0,340, 0,350, 0,360, 0,370, 0,380, 0,390, 0,400, 0,410, 0,420, 0,430, 0,440, 0,450, 0,460, 0,470, 0,480, 0,490, 0,500, 0,510, 0,520, 0,530, 0,540, 0,550, 0,560, 0,570, 0,580, 0,590, 0,600, 0,610, 0,620, 0,630, 0,640, 0,650, 0,660, 0,670, 0,680, 0,690, 0,700, 0,710, 0,720, 0,730, 0,740, 0,750, 0,760, 0,770, 0,780, 0,790, 0,800, 0,810, 0,820, 0,830, 0,840, 0,850, 0,860, 0,870, 0,880 , 0,890, 0,900, 0,910, 0,920, 0,930, 0,940, 0,950, 0,960, 0,970, 0,980, 0,990, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 9, 2, 2, 2, 1, , 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8 , 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 o 10 cm, o

cualquier margen o valor que se pueda derivar del mismo. En algunos aspectos, la cámara de electroporación comprende una distancia entre electrodos de 0,001 cm y 10 cm, 0,001 cm y 1 cm, 0,01 cm y 10 cm, 0,01 cm y 1 cm, 0,1 cm y 10 cm, 0,1 cm y 1 cm, 1 cm y 10 cm, o cualquier valor de 0,001 cm a 10 cm o margen derivable del mismo. En algunos aspectos, la cámara de electroporación comprende un espacio entre electrodos entre 0,01 cm y 1 cm, cualquier valor entre 0,01 cm y 1 cm, o cualquier margen derivable del mismo. En algunos aspectos, la cámara de electroporación comprende un espacio entre electrodos entre 0,4 cm y 1 cm, cualquier valor entre 0,4 cm y 1 cm, o cualquier margen derivable del mismo. Cada par de dichos ánodos y cátodos puede activarse con una resistencia de carga (en ohms) dependiendo del tamaño de la cámara.

2. Características del pulso eléctrico

[0158] La duración del pulso, o longitud del pulso, es la duración del tiempo que la muestra está expuesta a un pulso eléctrico y normalmente se mide como tiempo en intervalos de micro a milisegundos. La longitud del pulso funciona indirectamente con la intensidad del campo para aumentar la formación de poros y, por lo tanto, la captación de moléculas objetivo. Generalmente, un aumento en el voltaje debe ser seguido por una disminución incremental en la duración del pulso. Disminuyendo el voltaje, lo contrario es cierto.

[0159] Las duraciones de los pulsos primero y segundo de los pulsos eléctricos primero y segundo a los que se someten las muestras descritas en el presente documento pueden ser aproximadamente, pueden ser al menos aproximadamente o pueden ser como máximo aproximadamente 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos, o cualquier margen o valor que se pueda derivar del mismo. Las duraciones de los pulsos primero y segundo de los pulsos eléctricos primero y segundo a los que están sujetas las muestras descritas en el presente documento pueden ser como máximo aproximadamente o al menos aproximadamente 10^{-6} segundos a 10 segundos, 10^{-6} segundos a 1 segundo, 10^{-3} segundos a 10 segundos, 10^{-3} segundos a 1 segundo, o cualquier margen o valor derivable del mismo. En algunos aspectos, las

duraciones del primer y segundo pulso del primer y segundo pulso eléctrico están entre 10-6 segundos y 10 segundos, 10-6 segundos y 1 segundo, 10-3 segundos y 10 segundos, 10-3 segundos y 1 segundo, o cualquier valor de 10-6 segundos a 10 segundos o margen derivable del mismo. En algunos aspectos, las duraciones de los pulsos primero y segundo de los pulsos eléctricos primero y segundo están entre 1 microsegundo y 100 milisegundos, cualquier valor entre 1 microsegundo y 100 milisegundos, o cualquier margen derivable de los mismos. En algunos aspectos, las duraciones de los pulsos primero y segundo de los pulsos eléctricos primero y segundo están entre 6 microsegundos y 65 milisegundos, cualquier valor entre 6 microsegundos y 65 milisegundos, o cualquier margen derivable de los mismos.

[0160] Además de la duración del pulso, los pulsos eléctricos también se pueden caracterizar por el número de pulso, el ancho del pulso, la forma del pulso, el patrón del pulso y la polaridad del pulso. Por lo tanto, en algunos aspectos, los pulsos eléctricos primero y segundo comprenden además características relacionadas con el número de pulso, el ancho del pulso, la forma del pulso, el patrón del pulso o la polaridad del pulso.

[0161] La electroporación se puede llevar a cabo como un solo pulso o como múltiples pulsos como se describe en este documento para lograr la máxima eficiencia de transfección. En algunos aspectos, el número de pulsos puede ser, ser al menos o ser como máximo 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 o 1000 pulsos, o cualquier margen derivable de los mismos. En algunos aspectos, el número de pulsos puede ser como máximo o al menos 1 pulso a 1000 pulsos, 1 pulso a 900 pulsos, 1 pulso a 800 pulsos, 1 pulso a 700 pulsos, 1 pulso a 600 pulsos, 1 pulso a 500 pulsos,

1 pulso a 400 pulsos, 1 pulso a 300 pulsos, 1 pulso a 200 pulsos, 1 pulso a 100 pulsos, 1 pulso a 90 pulsos, 1 pulso a 80 pulsos, 1 pulso a 70 pulsos, 1 pulso a 60 pulsos, 1 pulso a 50 pulsos, 1 pulso a 40 pulsos, 1 pulso a 30 pulsos, 1 pulso a 20 pulsos, 1 pulso a 10 pulsos, o cualquier valor de 1 pulso a 1000 pulsos o margen derivable del mismo. En algunos aspectos, el número de pulsos está entre 1 pulso y 1000 pulsos, 1 pulso y 900 pulsos, 1 pulso y 800 pulsos, 1 pulso y 700 pulsos, 1 pulso y 600 pulsos, 1 pulso y 500 pulsos, 1 pulso y 400 pulsos, 1 pulso y 300 pulsos, 1 pulso y 200 pulsos, 1 pulso y 100 pulsos, 1 pulso y 90 pulsos, 1 pulso y 80 pulsos, 1 pulso y 70 pulsos, 1 pulso y 60 pulsos, 1 pulso y 50 pulsos, 1 pulso y 40 pulsos, 1 pulso y 30 pulsos, 1 pulso y 20 pulsos, o 1 pulso y 10 pulsos, o cualquier valor de 1 pulso a 1000 pulsos o margen derivable del mismo. En algunos aspectos, el número de pulsos está entre 1 y 130 pulsos, cualquier valor de 1 a 130 pulsos, o cualquier margen derivable del mismo.

[0162] El ancho del pulso depende de la forma de onda generada por un generador de pulsos de un sistema de electroporación. La forma de pulso, o forma de onda, generalmente se divide en dos categorías, onda cuadrada u onda de caída exponencial. Los pulsos de onda cuadrada aumentan rápidamente hasta un grado de voltaje establecido y mantienen este grado durante la duración del pulso establecido antes de apagarse rápidamente. En algunos aspectos, el generador de pulso genera un pulso de onda cuadrada y el ancho del pulso se puede ingresar directamente. Las ondas de decaimiento exponencial generan un pulso eléctrico al permitir que un capacitor se descargue por completo. Se descarga un pulso en una muestra y el voltaje aumenta rápidamente hasta el valor máximo establecido y luego disminuye con el tiempo. En algunos aspectos, el generador de pulsos genera un pulso de onda de caída exponencial, y el ancho del pulso es función de una tasa de caída exponencial.

[0163] El ancho de pulso en un sistema de onda de decaimiento exponencial corresponde a la constante de tiempo y se caracteriza por la velocidad a la que la energía o el voltaje del pulso decae a 1/3 del voltaje establecido original. La constante de tiempo se modifica ajustando los valores de resistencia y

capacitancia en una caída exponencial, y el cálculo del tiempo es $T = RC$, donde T es el tiempo, R es la resistencia de una muestra y C es la capacitancia de la fuente de alimentación del sistema de electroporación. Así, en algunos aspectos, la tasa de decaimiento exponencial es una función de la resistencia de la muestra y la capacitancia de una fuente de alimentación utilizada para efectuar la electroporación.

[0164] La resistencia de una muestra puede ser, puede ser al menos, o puede ser como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, 9900, 9900, o 10.000 ohms, o cualquier margen o valor derivable del mismo. La resistencia de una muestra puede ser como máximo o como mínimo 1 ohm a 10.000 ohms, 1 ohm a 9000 ohms, 1 ohm a 8000 ohms, 1 ohm a 7000 ohms, 1 ohm a 6000 ohms, 1 ohm a 5000 ohms, 1 ohm 4000 ohms, 1 ohm a 3000 ohms, 1 ohm a 2000 ohms, 1 ohm a 1000 ohms, 1 ohm a 900 ohms, 1 ohm a 800 ohms, 1 ohm a 700 ohms, 1 ohm a 600 ohms, 1 ohm a 500

ohms, 1 ohm a 400 ohms, 1 ohm a 300 ohms, 1 ohm a 200 ohms, 1 ohm a 100 ohms, 1 ohm a 90 ohms, 1 ohm a 80 ohms, 1 ohm a 70 ohms, 1 ohm a 60 ohms, 1 ohm a 50 ohms, 1 ohm a 40 ohms, 1 ohm a 30 ohms, 1 ohm a 20 ohms, 1 ohm a 10 ohms, o cualquier valor de 1 ohm a 10.000 ohms o el margen derivable del mismo. En algunos aspectos, la resistencia de la muestra está entre 1 ohm y 10.000 ohm, 1 ohm y 9000 ohm, 1 ohm y 8000 ohm, 1 ohm y 7000 ohm, 1 ohm y 6000 ohm, 1 ohm y 5000 ohm, 1 ohm y 4000 ohm, 1 ohm y 3000 ohm, 1 ohm y 2000 ohm, 1 ohm y 1000 ohm, 1 ohm y 900 ohm, 1 ohm y 800 ohm, 1 ohm y 700 ohm, 1 ohm y 600 ohm, 1 ohm y 500 ohm , 1 ohm y 400 ohm, 1 ohm y 300 ohm, 1 ohm y 200 ohm, 1 ohm y 100 ohm, 1 ohm y 90 ohm, 1 ohm y 80 ohm, 1 ohm y 70 ohm, 1 ohm y 60 ohm, 1 ohm y 50 ohms, 1 ohm y 40 ohms, 1 ohm y 30 ohms, 1 ohm y 20 ohms, 1 ohm y 10 ohms, o cualquier valor de 1 ohm a 10.000 ohms o el margen derivable del mismo. En algunos aspectos, la resistencia de la muestra está entre 1 ohm y 1000 ohms, cualquier valor entre 1 ohm y 1000 ohms, o cualquier margen derivable del mismo.

[0165] La capacidad de la fuente de alimentación puede ser, puede ser al menos o puede ser como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 , 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 , 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 , 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 , 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 , 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520 , 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770 , 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200 , 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2 500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300,

5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, 9900, 9900, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000, 20.000, 21.000, 22.000, 23.000, 24.000, 25.000, 26.000, 27.000, 28.000, 29.000, 30.000, 31.000, 32.000, 33.000, 34.000, 35.000, 36.000, 37.000, 38.000, 39.000, 40.000, 41.000, 42.000, 43.000, 44.000, 45.000, 46.000, 47.000, 48.000, 49.000, 50.000, 51.000, 52.000, 53.000, 54.000, 55.000, 56.000, 57.000, 58.000, 59.000, 60.000, 61.000, 62.000, 63.000, 64.000, 65.000, 66.000, 67.000, 68.000, 69.000, 70.000, 71.000, 72.000, 73.000, 74.000, 75.000, 76.000, 77.000, 78.000, 79.000, 80.000, 81.000, 82.000, 83.000, 84.000, 85.000, 86.000, 87.000, 88.000, 89.000, 90.000, 91.000, 92.000, 93.000, 94.000, 95.000, 96.000, 97.000, 98.000, 99.000, 100.000, 110.000, 120.000, 130.000, 140.000, 150.000, 160.000, 170.000, 180.000, 190.000, 200.000, 210.000, 220.000, 230.000, 240.000, 250.000, 260.000, 270.000, 280.000, 290.000, 300.000, 310.000, 320.000, 330.000, 340.000, 350.000, 360.000, 370.000, 380.000, 390.000, 400.000, 410.000, 420.000, 430.000, 440.000, 450.000, 460.000, 470.000, 480.000, 490.000, 500.000, 510.000, 520.000, 530.000. 540.000, 550.000, 560.000, 570.000, 580.000, 590.000, 600.000, 610.000, 620.000, 630.000, 640.000, 650.000, 660.000, 670.000, 680.000, 690.000, 700.000, 710.000, 720.000, 730.000, 740.000, 750.000, 760.000, 770.000, 780.000, 790.000, 800.000, 810.000, 820.000, 830.000, 840.000, 850.000, 860.000, 870.000, 880.000. 890.000, 900.000, 910.000, 920.000, 930.000, 940.000, 950.000, 960.000, 970.000, 980.000, 990.000 o 1.000.000 μF , o cualquier intervalo o valor derivado del mismo. La capacitancia de la fuente de alimentación puede ser como máximo o al menos 1 μF a 1.000.000 μF , 1 μF a 100.000 μF , 1 μF a 10.000 μF , 1 μF a 1000 μF , 1 μF a 100 μF , o cualquier valor de 1 μF a 1.000.000 μF o margen derivable en el mismo. En algunos aspectos, la capacitancia de la fuente de alimentación está entre 1 μF y 1.000.000 μF , 1 μF y 100.000 μF , 1 μF y 10.000 μF , 1 μF y 1000 μF , 1 μF y

100 μF , o cualquier valor de 1 μF a 1.000.000 μF o margen derivable en el mismo. En algunos aspectos, la capacitancia de la fuente de alimentación está entre 1000 μF y 5000 μF , cualquier valor entre 1000 μF y 5000 μF , o cualquier margen derivable del mismo.

[0166] En algunos aspectos, el patrón de pulsos comprende un solo pulso correspondiente a la duración del primer y/o segundo pulso. En algunos aspectos, el patrón de pulsos comprende múltiples pulsos, y una duración combinada de los múltiples pulsos corresponde a la duración del primer y/o segundo pulso. Así, en algunos aspectos, la duración del pulso es el resultado del efecto aditivo de múltiples pulsos.

[0167] La polaridad del primer y segundo impulsos eléctricos a los que se pueden someter las muestras en el presente documento descritas puede ser positiva o negativa. En algunos aspectos, la polaridad del primer y segundo pulso es positiva. En algunos aspectos, la polaridad del primer y segundo pulso es negativa. En algunos aspectos, la polaridad del primer pulso es positiva y la polaridad del segundo pulso es negativa. En algunos aspectos, la polaridad del primer pulso es negativa y la polaridad del segundo pulso es positiva.

[0168] En ciertos aspectos, la carga eléctrica puede llevarse a cabo como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5,612,207 (específicamente incorporada en el presente documento por referencia), Patente de EE.UU. n.º 5,720,921 (específicamente incorporada en el presente documento por referencia), Patente de EE.UU. n.º 6,074,605 (incorporado específicamente en el presente documento como referencia); Patente de EE.UU. n.º 6,090,617 (incorporado específicamente en el presente documento como referencia); Patente de EE.UU. n.º 6,485,961 (incorporado específicamente en el presente documento como referencia); Patente de EE.UU. n.º 7,029,916 (específicamente incorporada en el presente documento por referencia), Patente de EE.UU. n.º 7,141,425 (específicamente incorporada en el presente documento por referencia), Patente de EE.UU. n.º 7,186,559 (específicamente incorporada en el presente documento por referencia), Patente de EE.UU. n.º 7,771,984 (específicamente

incorporada en el presente documento como referencia) y/o publicación de EE.UU. número 2011/0065171 (específicamente incorporada en el presente documento como referencia).

[0169] Otros métodos y dispositivos para electrocarga que pueden usarse en el contexto de la presente divulgación también se describen, por ejemplo, en las solicitudes PCT publicadas Nos. WO 03/018751 y WO 2004/031353; solicitud de patente de EE.UU. n.º2004/0214333 y n.º2004/0115784; y la patente de EE.UU. n.º 6,773,669, 6,090,617, 6,617,154 y 7,029,916, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

[0170] En ciertos aspectos de la divulgación, la electroporación puede llevarse a cabo como se describe en la patente de EE.UU. n.º 7,141,425, concedida el 28 de noviembre de 2006, cuya descripción completa se incorpora específicamente en el presente documento como referencia.

II. Descripción del aparato de electroporación representativo

[0171] Como se muestra en la **Figura 48**, algunos aspectos de la presente divulgación también pueden incluir un sistema de electroporación 300 que incluye un dispositivo (p. ej., un controlador, 800) y un medio legible por computadora no transitorio (p. ej., uno o más dispositivos de almacenamiento, 804) que comprende (p. ej., almacenar) instrucciones, que cuando son ejecutadas por un procesador 808, hacen que el procesador 808 ejecute cualquiera de los métodos descritos en este documento.

[0172] El controlador 800 puede acoplarse física o inalámbricamente a uno o más de los otros componentes del sistema de electroporación 300 y puede configurarse para controlar el funcionamiento del sistema de electroporación 300 a través de uno o más comandos o parámetros automáticos o iniciados por el usuario. El controlador 800 puede incluir el procesador 808 (por ejemplo, microcontrolador/microprocesador, una unidad central de procesamiento (CPU), un dispositivo de matriz de puerta programable en campo (FPGA), un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC), otro dispositivo de hardware, un firmware dispositivo, o cualquier combinación de estos) y un medio legible por

computadora no transitorio (como la memoria) 804 configurado para (y lo hace) almacenar instrucciones, uno o más conjuntos de datos, o similares. Un medio legible por computadora no transitorio puede incluir cualquier medio de almacenamiento tangible o no transitorio o medio de memoria, como medios electrónicos, magnéticos u ópticos. Los términos "tangible" y "no transitorio", tal como se utilizan en este documento, pretenden describir un medio legible por computadora no transitorio (como la memoria) que excluye la propagación de señales electromagnéticas, pero no pretenden limitar el tipo de computadora física. dispositivo de almacenamiento legible que está abarcado por la frase medio o memoria legible por computadora no transitoria. Por ejemplo, los términos "medio legible por computadora no transitorio" o "memoria tangible" pretenden abarcar tipos de dispositivos de almacenamiento que no necesariamente almacenan información de forma permanente, incluida, por ejemplo, la memoria de acceso aleatorio (RAM). Las instrucciones y los datos del programa almacenados en un medio de almacenamiento tangible accesible por computadora en forma no transitoria pueden transmitirse además por medios de transmisión o señales como señales eléctricas, electromagnéticas o digitales, que pueden transmitirse a través de un medio de comunicación como una red y/o un enlace inalámbrico.

[0173] Las instrucciones de la memoria pueden ser ejecutables por el procesador 808 para realizar o iniciar una o más operaciones o funciones como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, el controlador 800 puede incluir una o más interfaces, uno o más dispositivos de E/S, una fuente de alimentación, uno o más sensores, un generador de señales (por ejemplo, un generador de RF) o una combinación de estos. Por ejemplo, el controlador 800 puede incluir un dispositivo de E/S que permite que un usuario ingrese información (por ejemplo, el protocolo deseado) para controlar la operación del sistema de electroporación 300.

[0174] Ahora, en referencia a la Figura 49, se muestra un aspecto 900 de los presentes métodos para someter una muestra a dos o más pulsos eléctricos,

que pueden implementarse usando el sistema de electroporación 300 representado en la Figura 48. En el aspecto mostrado, en el paso 904, el medio no transitorio legible por computadora 804 del sistema de electroporación 300 comprende instrucciones que, cuando son ejecutadas por el procesador 808, hacen que el procesador 808 seleccione un primer protocolo asociado con un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo. y una primera duración del pulso. En el paso 908, en este aspecto, el controlador 800 controla el sistema de electroporación 300 para crear corriente eléctrica de un primer pulso eléctrico definido por el primer protocolo y enviarlo a través de una muestra que comprende una o más células intactas, partículas celulares o vesículas lipídicas, la primera el pulso eléctrico es suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un agente según el primer protocolo. Opcionalmente, después del paso 908, se permite que la muestra se recupere en cultivo al menos, como máximo o aproximadamente 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114 o 120 horas, o cualquier margen o valor que se pueda derivar del mismo. En algunos aspectos, después del paso 908, se permite que la muestra se recupere en cultivo como máximo o al menos de 6 horas a 120 horas, de 6 horas a 96 horas, de 6 horas a 72 horas, de 6 horas a 48 horas, de 6 horas a 24 horas , 6 horas a 12 horas, o cualquier margen o valor derivable del mismo. En el paso 912, en este aspecto, el medio no transitorio legible por computadora 804 del sistema de electroporación 300 comprende instrucciones que, cuando son ejecutadas por el procesador 808, hacen que el procesador 808 seleccione un segundo protocolo asociado con un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo. y una segunda duración de pulso. En el paso 916, en este aspecto, el controlador 800 controla el sistema de electroporación 300 para crear corriente eléctrica de un segundo pulso eléctrico definido por el segundo protocolo y enviarlo a través de la muestra que comprende una o más células intactas, partículas celulares o vesículas lipídicas. La intensidad del primer campo y/o la duración del primer pulso son diferentes de la intensidad del segundo campo y/o

la duración del segundo pulso, y la muestra que comprende una o más células intactas, partículas celulares o vesículas lipídicas se somete al segundo pulso eléctrico, que es suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un agente según el segundo protocolo.

[0175] En algunos aspectos, el sistema de electroporación 300 puede ser controlado por el controlador 800 para crear corriente eléctrica y enviarla a través de una solución celular. En algunos aspectos, los métodos actuales usan un aparato de electroporación estática. En algunos aspectos, los métodos actuales usan un aparato de electroporación de flujo, que puede ser controlado por el controlador 800 para crear corriente eléctrica para la estimulación eléctrica de suspensiones de células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos, la electroporación de flujo aparato que tiene uno o más portales de flujo de entrada, uno o más portales de flujo de salida y uno o más canales de flujo, estando compuestos los canales de flujo de dos o más paredes, estando además configurados los canales de flujo para recibir y contener transitoriamente un flujo continuo de partículas en suspensión de los portales de flujo de entrada; y pares de electrodos dispuestos en relación con los canales de flujo de manera que cada electrodo forme al menos una pared de los canales de flujo, que comprende además colocar los electrodos en comunicación eléctrica con una fuente de energía eléctrica, por lo que las suspensiones que fluyen a través de los canales pueden estar sujetas a un campo eléctrico formado entre los electrodos

[0176] En algunos aspectos, la electroporación de flujo se realiza utilizando instrumentación de electroporación de flujo MaxCyte STX®, MaxCyte VLX® o MaxCyte GT®. En algunos aspectos, la electroporación de flujo se realiza con MaxCyte ExPERT STx®, MaxCyte ExPERT ATx®, MaxCyte ExPERT GTx® o MaxCyte ExPERT VLx™. En aspectos específicos, se usa electroporación estática o de flujo con parámetros descritos a lo largo de la divulgación.

[0177] En algunos aspectos, el uso de la electroporación de flujo puede ayudar a superar las limitaciones prácticas con respecto a la cantidad de celdas que se

pueden electroporar, el tiempo en el que se pueden electroporar y el volumen de solución en el que se suspenden que atienden estática o métodos de electroporación por lotes. Con este método, se pasa una suspensión celular a través de electrodos de barras paralelas que están contenidos en una celda de flujo que puede ser desechable. Debe entenderse que se pueden usar diferentes configuraciones de celdas de flujo en la presente divulgación. Durante este paso, las células se someten a pulsos eléctricos con características predeterminadas. A continuación, la molécula de interés se difunde en la célula siguiendo los gradientes de concentración y/o eléctricos. Además, se puede transfectar una población de linfocitos por electroporación de la muestra en menos de 5 horas, preferentemente menos de 4 horas, más preferiblemente en menos de 3 horas y lo más preferentemente en menos de 2 horas. El tiempo de electroporación es el tiempo que la muestra es procesada por el proceso de electroporación de flujo. En ciertos aspectos, las células $1E10$ se transfectan en 30 minutos o menos usando electroporación de flujo. En otros aspectos, las células $2E11$ pueden transfectarse en 30 minutos, o 60 minutos o menos, usando electroporación de flujo.

[0178] El proceso de electroporación de flujo puede iniciarse, p. ej., colocando una cámara de electroporación en comunicación fluida con soluciones y suspensiones celulares en recipientes (p. ej., a través de tubos), que puede llevarse a cabo en un entorno aséptico o estéril. Se puede introducir una suspensión de células y/u otros reactivos en la cámara de electroporación utilizando una o más bombas, aspiradoras, válvulas, otros dispositivos mecánicos que cambian la presión o el volumen del aire dentro de la cámara de electroporación y combinaciones de estos, lo que puede causar que la suspensión de células y/u otros reactivos fluyan hacia la cámara de electroporación en el momento deseado y a la velocidad deseada. Si una parte de la suspensión celular y/u otros reactivos se colocan en la cámara de electroporación, se aplican pulsos eléctricos de un voltaje, duración y/o intervalo deseado a la suspensión celular y/u otros reactivos. Después de la

electroporación, la suspensión celular procesada y/u otros reactivos pueden retirarse de la cámara de electroporación usando una o más bombas, aspiradoras, válvulas, otros dispositivos eléctricos, mecánicos, neumáticos o microfluídicos que cambian el desplazamiento, la presión o el volumen dentro de la cámara de electroporación y combinaciones de estos. En ciertos aspectos, la transferencia manual o por gravedad se puede usar para mover la muestra o la muestra procesada dentro o fuera de una cámara de electroporación. Si se desea, se puede introducir una nueva suspensión de células y/u otros reactivos en la cámara de electroporación. Una muestra electroporada se puede recolectar por separado de una muestra que aún no ha sido electroporada. La serie anterior de eventos puede ser coordinada temporalmente por una computadora acoplada, p. ej., a un circuito electrónico (p. ej., que proporciona el pulso eléctrico), bombas, vacíos, válvulas, combinaciones de estos y otros componentes que efectúan y controlan el flujo de una muestra dentro y fuera de la cámara de electroporación. Como ejemplo, el proceso de electroporación puede ser implementado por una computadora, incluso por un operador a través de una interfaz gráfica de usuario en una pantalla (p. ej., un monitor) y/o un teclado. Los ejemplos de válvulas adecuadas incluyen válvulas de manguito, válvulas de mariposa y/o válvulas de bola. Los ejemplos de bombas adecuadas incluyen bombas centrífugas o de desplazamiento positivo.

[0179] Como ejemplo, un dispositivo de electroporación de flujo puede comprender al menos dos electrodos separados por un espaciador, donde el espaciador y los al menos dos electrodos definen una cámara. En algunos aspectos, la cámara de electroporación puede comprender además al menos tres puertos que atraviesan el espaciador, donde un primer puerto es para el flujo de la muestra hacia la cámara, un segundo puerto es para el flujo de la muestra procesada fuera de la cámara y un tercer puerto es para el flujo de fluido que no es de muestra dentro o fuera de la cámara. En algunos aspectos, el fluido que no es de muestra sale de la cámara cuando una muestra entra en la cámara, y el fluido que no es de muestra entra en la cámara cuando la muestra procesada

sale de la cámara. Como otro ejemplo, un dispositivo de electroporación de flujo puede comprender una cámara de electroporación que tiene una parte superior e inferior que comprende al menos dos electrodos paralelos, la cámara se forma entre los dos electrodos y tiene dos puertos de cámara en la parte inferior de la cámara de electroporación y dos cámaras. puertos en la parte superior de la cámara de electroporación. Dicho dispositivo puede comprender además al menos un recipiente de muestra en comunicación fluida con la cámara de electroporación a través de un primer puerto de cámara en la parte inferior de la cámara, y la cámara de electroporación puede estar en comunicación fluida con el recipiente de muestra a través de un segundo puerto de cámara en la porción superior de la cámara, formando una primera ruta de fluido. Además, al menos un contenedor de producto puede estar en comunicación fluida con la cámara de electroporación a través de un puerto de la tercera cámara en la parte inferior de la cámara, y la cámara de electroporación puede estar en comunicación fluida con el contenedor del producto a través de un puerto de la cuarta cámara en la parte superior. porción de la cámara, formando una segunda ruta de fluido. En algunos aspectos, puede usarse una cámara de electroporación de un solo puerto. En otros aspectos, se pueden usar varias otras combinaciones adecuadas de electrodos, espaciadores, puertos y contenedores. La cámara de electroporación puede comprender un volumen interno de aproximadamente 1 mL a 10 mL; sin embargo, en otros aspectos, la cámara de electroporación puede comprender un volumen interno menor (p. ej., 0,75 mL, 0,5 mL, 0,25 mL o menos) o un volumen interno mayor (p. ej., 15 mL, 20 mL, 25 mL o más). En algunos aspectos, la cámara de electroporación y los componentes asociados pueden ser desechables (p. ej., materiales de clase VI de grado médico), tales como bolsas de PVC, tubos de PVC, conectores, tubos de bomba de silicona y similares.

[0180] Cualquier número de recipientes (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) puede estar en comunicación fluida con la cámara de electroporación. Los contenedores pueden ser contenedores plegables, expandibles o de volumen fijo. Por ejemplo,

un primer contenedor (p. ej., una fuente de muestra o un contenedor de muestra) puede comprender una suspensión celular y puede incluir o no una sustancia que pasará a las células en la suspensión celular durante la electroporación. Si no se incluye la sustancia, se puede incluir un segundo recipiente que comprende esta sustancia de modo que la sustancia se pueda mezclar en línea antes de entrar en la cámara de electroporación o en la cámara de electroporación. En otra configuración, se puede unir otro contenedor, que puede contener fluido que será desechado. Se pueden usar uno o más contenedores como muestra procesada o contenedor de producto. El contenedor de muestra o producto procesado contendrá células u otros productos producidos a partir del proceso de electroporación. Además, uno o más contenedores pueden comprender varios fluidos o gases que no son de muestra que pueden usarse para separar la muestra en volúmenes separados o unidades de volumen. El contenedor de fluido o gas que no es de muestra puede estar en comunicación fluida con la cámara de electroporación a través de un tercer y/o cuarto puerto. El contenedor de fluido o gas que no es de muestra puede incorporarse al contenedor de muestra procesada o al contenedor de muestra (p. ej., el contenedor de fluido que no es de muestra puede comprender una parte del contenedor de muestra procesada o del contenedor de muestra); y así, el fluido o gas que no es de muestra puede transferirse desde el recipiente de muestra procesada a otro recipiente (que puede incluir el recipiente de muestra) durante el procesamiento de la muestra. El recipiente de gas o fluido que no es de muestra puede incorporarse a la cámara, siempre que la compresión del gas o fluido que no sea de muestra no afecte a la electroporación. Otros aspectos de la divulgación pueden incluir otros recipientes que se acoplan al recipiente de muestras y pueden suministrar reactivos u otras muestras a la cámara.

[0181] Un aparato de electroporación de flujo que se puede usar junto con la presente divulgación está, en un aspecto, compuesto por lo siguiente: un sistema de electroporación que tiene una computadora que se comunica con un módulo electrónico para ejecutar procesos de electroporación en tiempo real y

administrar procesos de electroporación asociados. datos y un monitor (p. ej., que puede ser parte de un dispositivo móvil o un dispositivo diseñado para usar en un escritorio, mesa, carro o similar) que muestra una interfaz gráfica de usuario y permite la interacción del usuario. Un operador ingresa un voltaje deseado y otros parámetros en el sistema de electroporación de flujo. Tal y como se señaló anteriormente, un margen de configuraciones está disponible opcionalmente. La computadora se comunica con el módulo electrónico para cargar un banco de capacitores al voltaje deseado. Luego, los interruptores apropiados manipulan el voltaje antes de que se entregue a la ruta de flujo para crear el campo eléctrico. Los interruptores proporcionan pulsos o ráfagas alternas para minimizar el desgaste de los electrodos provocado por la exposición prolongada al campo eléctrico. El voltaje se entrega según con los parámetros de duración y frecuencia establecidos en el sistema de electroporación de flujo por el operador. Los detalles de un ejemplo de un sistema de electroporación de flujo se describen en la patente de EE. UU. n.º 7.186.559, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

[0182] Los presentes sistemas y métodos de electroporación también pueden incluir ensamblajes de procesamiento, bandejas, juntas, estaciones de acoplamiento, bastidores y recipientes para la entrega al sistema de electroporación.

[0183] Las Figuras 1-10 ilustran un conjunto de procesamiento 100 consecuente con aspectos de esta divulgación. El conjunto de procesamiento 100 se puede proporcionar para su uso en sistemas y dispositivos de electroporación. El conjunto de procesamiento 100 puede incluir un alojamiento 102 y una tapa 104 que cubre una abertura 106 a una cámara 108. En algunos aspectos, la cámara 108 puede recibir muestras, cultivos, medios líquidos, etc. que pueden proporcionarse a un sistema o dispositivo de electroporación con el que puede ser compatible el conjunto de procesamiento 100.

[0184] La tapa 104 puede tener una conexión articulada 110 al alojamiento 102 que permite que la tapa 104 se mueva entre una posición cerrada (Figura 1) donde la tapa cubre la abertura 106 y se conecta a la carcasa 102 y una posición abierta (Figura 2) donde la tapa está articulada alejándose de la abertura 106 y permite que la abertura 106 quede expuesta. La conexión articulada 110 de la tapa 104 puede proporcionar un mejor manejo y facilidad de uso del conjunto de procesamiento 100. En la posición cerrada, la tapa 104 puede evitar la contaminación del conjunto de procesamiento 100. En algunos aspectos, la tapa 104 puede girar sobre la conexión articulada 110 hasta 180° y puede conectarse a la carcasa 102. En algunos aspectos, la tapa 104 puede conectarse a la carcasa 102 a través de un ajuste de interferencia donde la tapa 104 se engancha a la carcasa 102. Por ejemplo, el ajuste de interferencia puede conectar la tapa 104 al alojamiento 102 en la posición cerrada en la conexión 109 y en la posición abierta en la conexión 111. El ajuste de interferencia puede mantener un sello hermético a través de los pozos dentro de la cámara 108 cuando la tapa 104 está cerrada. La tapa 104 puede incluir además una superficie contorneada 112 que puede conectarse y cubrir la abertura 106 y mantener un sello no contaminado.

[0185] El ensamblaje de procesamiento 100 puede incluir además buses de electrodos de aluminio 120 colocados alrededor de la cámara 108 y puede rodear una junta (p. ej., la junta 130) dentro de la cámara 108. El alojamiento 102 puede incluir un mango izquierdo 122 y un mango derecho 124 que se conectan entre sí para formar el alojamiento 102. El mango izquierdo 122 y el mango derecho 124 pueden estar separados por pasadores 125 que pueden colocarse uno frente al otro y pueden conectar el mango izquierdo 122 y el mango derecho 124. En algunos aspectos, los buses de electrodos 120 pueden envolverse alrededor del mango derecho 124. En otros aspectos, los buses de electrodos 120 se pueden colocar en un lado de la cámara 108 frente a una película de plástico recubierta de oro 128.

[0186] El ensamblaje de procesamiento 100 puede incluir además una película de plástico recubierta de oro 128 que puede recibirse entre el mango izquierdo 122 y el mango derecho 124 y colocarse frente a los buses de electrodos 120 y la junta de estructura 130. La película de plástico recubierta de oro 128 puede tener oro depositado al vacío en grandes rollos de película de plástico que se pueden troquelar a medida e instalar en el ensamblaje de procesamiento 100. En algunos aspectos, la película 128 recubierta de oro, el bus 120 de electrodos de aluminio y los rollos de la capa adhesiva pueden unirse.

[0187] El ensamblaje de procesamiento 100 puede incluir una junta 130 y un espaciador de plástico que puede recibirse en la cámara 108. La junta 130 puede adoptar al menos una de varias formas y tamaños, como se describe con más detalle a continuación. Por ejemplo, la junta 130 puede dimensionarse para recibir muestras de una o más de una serie de tamaños, incluidas muestras con un tamaño de 1000 μL , 400 μL , 100 μL , 100 $\mu\text{L} \times 2$, 50 $\mu\text{L} \times 3$ y 25 $\mu\text{L} \times 3$ variantes, entre otras. En algunos aspectos, la junta 130 puede estar hecha de caucho de silicona u otros materiales flexibles. El ensamblaje de procesamiento 100 puede configurarse para usarse con uno cualquiera de los tamaños y disposiciones de empaquetadura descritos en el presente documento, de modo que el ensamblaje de procesamiento 100 pueda usarse para cualquier cantidad de empaquetaduras 130 de tamaño.

[0188] El ensamblaje de procesamiento 100 puede incluir además una etiqueta de dispositivo 140 que se extiende alrededor de la carcasa 102 alejándose de los electrodos 120. En algunos aspectos, las etiquetas del dispositivo 140 pueden incluir un número de serie del producto único, tamaño, instrucciones, logotipos, etc. Algunos aspectos también pueden proporcionar espacio para escribir 141 en un extremo del ensamblaje de procesamiento 100.

[0189] El ensamblaje de procesamiento puede proporcionar varias ventajas, incluido un mayor margen de volumen de muestras dentro de la cámara 108 y la junta 130, mayor facilidad de uso y mejoras en la recuperación de células y un rendimiento constante. En algunos aspectos, la película de plástico recubierta de

oro 128 puede proporcionar una reducción de costos de fabricación y puede permitir volúmenes de reacción de 25 μL -1000 μL , p. ej., 25 μL , 50 μL , 75 μL , 100 μL , 125 μL , 150 μL , 175 μL , 200 μL , 225 μL , 250 μL , 275 μL , 300 μL , 325 μL , 350 μL , 375 μL , 400 μL , 425 μL , 450 μL , 475 μL , 500 μL , 525 μL , 550 μL , 575 μL , 600 μL , 625 μL , 650 μL , 675 μL , 700 μL , 725 μL , 750 μL , 775 μL , 800 μL , 825 μL , 850 μL , 875 μL , 900 μL , 925 μL , 950 μL , 975 μL o 1000 μL , o cualquier margen o valor derivado de estos, utilizando una o más de una serie de juntas.

[0190] Las Figuras 9 y 10 muestran que el conjunto de procesamiento 100 puede configurarse para llenarse a través de un dispositivo de carga 144 que puede insertarse en la cámara 108 a través de la abertura 106 con la tapa 104 en la posición abierta. El dispositivo de carga 144 puede llenar la cámara 108 con una muestra para su análisis o tratamiento en un sistema de electroporación. Después de que el dispositivo de carga 144 proporcione la muestra a la cámara 108, el dispositivo de carga 144 puede retirarse y la tapa 104 puede cerrarse para evitar la contaminación de la muestra.

[0191] Las Figuras 11-13 ilustran aspectos de la presente divulgación que también pueden proporcionar una o más bandejas 160. Las bandejas 160 pueden recibir uno o más conjuntos de procesamiento (p. ej., el conjunto de procesamiento 100 u otros conjuntos de procesamiento) en las ranuras 162 separadas a lo largo de la bandeja 106. En algunos aspectos, las bandejas 160 pueden tener forma rectangular y cada ranura 160 puede estar dispuesta paralelamente a las otras ranuras 160. En otros aspectos, la bandeja 160 puede ser curva, circular o semicircular y puede tener ranuras 160 dispuestas en un patrón radial alrededor de la bandeja 160.

[0192] La bandeja 160 puede incluir una o más posiciones para recibir conjuntos de procesamiento. En algunos aspectos, la bandeja puede incluir una o más posiciones 164 de manera que la primera posición y la segunda posición pueden permitir que un usuario distinga un estado (p. ej., completo frente a incompleto, probado frente a no probado, distinguir entre tipo de muestra) del procesamiento.

conjunto colocado en la bandeja 160. Las bandejas 160 pueden tener patas 166 que pueden permitir que una o más bandejas 160 se apilen una encima de otra mientras se proporciona espacio para los conjuntos de procesamiento cargados en la bandeja. Las bandejas 160 pueden proporcionar mejoras en la transportabilidad y organización de los conjuntos de procesamiento y pueden permitir la esterilización de una serie de conjuntos de procesamiento a la vez.

[0193] La Figura 14 ilustra una pluralidad de juntas que podrían implementarse como junta 130 dentro del conjunto de procesamiento 100 conforme se describe arriba. La junta 130 puede dimensionarse para recibir muestras de una o más de una serie de tamaños, incluidas muestras de tamaño 4 x 50 μ L, 3 x 25 μ L, 2 x 100 μ L, 100 μ L, 400 μ L y 1 mL, entre otras. En algunos aspectos, las juntas de tamaño de 400 μ L y 1 mL pueden tener una superficie inferior inclinada que puede mejorar la carga y descarga de muestras.

[0194] En algunos aspectos, las juntas pueden otorgar flexibilidad cuando las selecciones de uno o varios pozos están diseñadas para optimizar el flujo de trabajo. Las juntas también pueden proporcionar escalabilidad al cambiar sin problemas entre pequeña y gran escala en una sola plataforma. Las juntas también pueden proporcionar una funcionalidad mejorada cuando el diseño funcional evita la contaminación de las muestras y proporciona facilidad de uso.

[0195] La Figura 15 ilustra una vista superior de un conjunto de juntas y una vista frontal de una junta, consecuente con los aspectos de la presente divulgación, donde cada junta tiene ocho pozos.

[0196] La Figura 16 ilustra una vista frontal de una bolsa y un aparato de procesamiento consecuente con aspectos de la presente divulgación. El aparato de procesamiento puede tener un diseño en forma de V para la recuperación de células. Además, el conjunto de procesamiento puede incluir una bolsa de 5 mL a 10 mL, p. ej., una bolsa de 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL o 10 mL, o cualquier margen o valor que se pueda derivar de ella, para cerrar un hueco.

[0197] La Figura 17 ilustra una junta 170 que tiene ocho pocillos 172, que pueden dimensionarse para muestras de 50 μ L en cada pocillo 172. La junta 170 puede

configurarse para ser recibida o insertada en un conjunto de procesamiento de múltiples pozos 200. Las Figuras 18-20 ilustran el ensamblaje de procesamiento de múltiples pozos 200 que puede configurarse para permitir el procesamiento de múltiples pozos cargados (p. ej., pozos 172) mediante un sistema de electroporación.

[0198] El ensamblaje de procesamiento de múltiples pozos 200 puede incluir un alojamiento 202 con una tapa 204 que se extiende a lo largo del alojamiento y cubre una abertura 206 a una cámara 208. En algunos aspectos, la cámara 108 puede recibir muestras, cultivos, medios líquidos, etc., que pueden proporcionarse a un sistema o dispositivo de electroporación con el que puede ser compatible el conjunto de procesamiento 200.

[0199] La tapa 204 puede tener una conexión articulada 210 a un lado de la carcasa 202 que permite que la tapa 204 se mueva entre una posición cerrada (Figura 18) donde la tapa cubre la abertura 206 y se conecta a la carcasa 202 y una posición abierta (Figura 19) donde la tapa está articulada alejándose de la abertura 206 y permite que la abertura 206 quede expuesta. En la posición cerrada, la tapa 204 puede evitar la contaminación del conjunto de procesamiento 200. En algunos aspectos, la tapa 204 puede conectarse a la carcasa 202 a través de un ajuste de interferencia donde la tapa 204 se engancha a la carcasa 202. En algunos aspectos, la tapa 204 puede retirarse del alojamiento 202. En algunos aspectos, el conjunto de procesamiento 200 puede tener una base 205 que permite que la carcasa 202 se sostenga por sí misma, lo que puede proporcionar facilidad de uso, carga y estabilidad durante la carga.

[0200] El ensamblaje de procesamiento 200 puede incluir además buses de electrodos de aluminio 220 colocados alrededor de la cámara 208 y que pueden rodear una junta (p. ej., la junta 170) dentro de la cámara 208. El alojamiento 202 puede incluir un mango izquierdo 222 y un mango derecho 224 que se conectan entre sí para formar el alojamiento 202 (p. ej., Figura 20). El mango izquierdo 222 y el mango derecho 224 pueden estar separados por pasadores 225 que pueden colocarse uno frente al otro y pueden conectar el mango izquierdo 222 y

el mango derecho 224. En algunos aspectos, los buses de electrodos 220 pueden envolverse alrededor del mango derecho 224. En otros aspectos, los buses de electrodos 220 se pueden colocar en un lado de la cámara 208 frente a una película de plástico recubierta de oro 228.

[0201] El ensamblaje de procesamiento 200 puede incluir además una película de plástico recubierta de oro 228 que puede recibirse entre el mango izquierdo 122 y el mango derecho 124 y colocarse frente a los buses de electrodos 120 y la junta de estructura 130. La película de plástico recubierta de oro 128 puede tener oro depositado al vacío en grandes rollos de película de plástico que se pueden troquelar a medida e instalar en el ensamblaje de procesamiento 100. En algunos aspectos, la película 128 recubierta de oro, el bus 120 de electrodos de aluminio y los rollos de la capa adhesiva pueden unirse. En algunos aspectos, la película de plástico recubierta de oro 228 puede tener un recubrimiento de oro dispuesto en una forma que refleja o sigue la forma de la junta 170.

[0202] El ensamblaje de procesamiento 200 puede incluir una junta 170 y un espaciador de plástico que puede recibirse en la cámara 208. La junta 170 puede adoptar al menos una de varias formas. Por ejemplo, la junta 170 puede tener ocho pocillos 172, que pueden dimensionarse para muestras de 50 μL en cada pocillo 172. En algunos aspectos, la junta 170 puede estar hecha de caucho de silicona u otros materiales flexibles. El ensamblaje de procesamiento 200 se puede configurar para usar con cualquier tamaño de junta y las disposiciones descritas en el presente documento, de modo que el ensamblaje de procesamiento 200 se puede usar para cualquier número de juntas de tamaño 170.

[0203] La Figura 21 ilustra una bandeja 260 configurada para recibir una pluralidad de ensamblajes de procesamiento de múltiples pozos 200. Como se ilustra en las Figuras 21 y 22, los conjuntos de procesamiento de múltiples pocillos pueden cargarse en la bandeja 260 sin tapas. La bandeja 260 puede recibir doce conjuntos de procesamiento 200, y cada conjunto de procesamiento

puede incluir ocho pozos (p. ej., pozos 172). En consecuencia, cada bandeja 260 puede incluir noventa y seis pocillos.

[0204] La Figura 23 ilustra una bandeja 261 configurada para recibir seis ensamblajes de procesamiento 200, que pueden usarse en un flujo de trabajo manual, y una bandeja 262 configurada para recibir doce ensamblajes de procesamiento o doce muestras de juntas individuales, que pueden incluir una tapa o cierre de tapa 270.

[0205] La Figura 24 ilustra un estante de múltiples pozos 280 que puede recibir una pluralidad de ensamblajes de procesamiento 200 y puede permitir la carga, descarga y organización de los ensamblajes de procesamiento 200.

[0206] Las Figuras 25 y 26 ilustran la bandeja 260 con una cubierta o cierre de tapa 270 y la carga y descarga de los conjuntos de procesamiento 200 en la bandeja 260.

[0207] La Figura 27 ilustra ejemplos de sistemas de electroporación 300 con los que los aspectos descritos pueden ser compatibles.

[0208] Las Figuras 28-32 ilustran una estación de acoplamiento 320 que puede conectar conjuntos de procesamiento (p. ej., el conjunto de procesamiento 200) a un sistema de electroporación (p. ej., el sistema de electroporación 300). La estación de acoplamiento 320 puede incluir una tapa 322 que se puede conectar a través de una conexión de bisagra a la estación de acoplamiento 320. La tapa 322 puede configurarse para moverse entre una posición abierta (Figuras 28 y 29) y una posición cerrada (Figura 30). La estación de acoplamiento 320 puede tener un puerto 324 configurado para recibir uno o más ensamblajes de procesamiento 200. La estación de acoplamiento 320 también puede tener contactos eléctricos 326 que pueden conectarse a receptáculos en un sistema de electroporación (p. ej., el sistema de electroporación 300).

[0209] La Figura 33 muestra el conjunto de procesamiento de múltiples pozos 200, el sistema de electroporación 300, la estación de acoplamiento 320, la bandeja 260, el dispositivo de carga 144 y la gradilla 280.

[0210] Las Figuras 34A-34C ilustran aspectos ejemplares de bolsas para uso en conjuntos de electroporación de flujo. Como se muestra en la Figura 34A, la bolsa 450 puede incluir un interior en forma de V que drena en la salida 452 que puede tener una pluralidad de conectores 453. Como se muestra en la Figura 34B, la bolsa 460 puede incluir una cámara interna más estrecha que tiene superficies inferiores en ángulo 462, una de las superficies inferiores 462 puede incluir uno o más conectores 464 y la bolsa 460 también puede incluir una salida 466 ubicada en el centro. Como se muestra en la Figura 34C, la bolsa 470 puede incluir una cámara superior ancha 472 y una cámara inferior angosta 474, la cámara inferior 474 puede incluir conectores 476 en cada superficie inferior en ángulo y una salida 478 ubicada en el centro. Las bolsas 450, 460, 470 pueden incluir accesorios Luer, puertos Luer activados, tubos, abrazaderas de tubos y etiquetas (véase diagrama). Las bolsas se pueden usar como bolsa de muestra, bolsa de recolección y bolsa de aire.

III. Objetivos de electroporación

[0211] Los objetivos para la electroporación incluyen varios tipos de células o partículas derivadas de varios organismos y fuentes. En algunos aspectos, el objetivo puede ser células o partículas nucleadas o anucleadas. Las células o partículas de la divulgación pueden ser células primarias o una línea celular o una partícula derivada de la misma. Por ejemplo, una diana puede ser una célula procariótica, de levadura, de insecto, de mamífero, de roedor, de hámster, de primate, humana, de pájaro, de planta, o porciones/fragmentos de estos. En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere a composiciones, métodos y aparatos para la introducción de agentes de interés en varios tipos de células vivas o partículas celulares o vesículas sintéticas o liposomas. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a un método y aparato para la introducción de agentes de interés en células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos. Estos objetivos de electroporación se pueden utilizar como un sistema de administración de agentes para dirigirse a un sitio de infección, metástasis u otra lesión patológica.

A. Cultivo celular

[0212] Como se usa en el presente documento, los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden usarse indistintamente. Todos estos términos también incluyen tanto células recién aisladas como células cultivadas, activadas o expandidas ex vivo. Todos estos términos también incluyen su progenie, que es cualquiera y todas las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo, "célula hospedadora" se refiere a una célula procariótica o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como receptora de vectores o virus. Una célula hospedadora puede ser "transfectada" o "transformada", lo que se refiere a un proceso mediante el cual un ácido nucleico exógeno, tal como una secuencia que codifica una proteína recombinante, se transfiere o introduce en la célula hospedadora. Una célula transformada incluye la célula objeto principal y su progenie.

[0213] En ciertos aspectos, la electroporación puede llevarse a cabo en cualquier célula procariótica o eucariota. En algunos aspectos, la electroporación implica la electroporación de una célula de mamífero. En algunos aspectos, la célula de mamífero es una célula humana. En otros aspectos, las células de mamífero son células animales, p. ej., células murinas, células de rata, células de hámster o células de primate.

[0214] En ciertos aspectos, la electroporación implica la electroporación de una línea celular o un tipo de célula híbrida. En algunos aspectos, la célula o células que se someten a electroporación son células cancerosas, células tumorales o células inmortalizadas. En algunos casos, se inducen tumor, cáncer, células inmortalizadas o líneas celulares, y en otros casos, tumor, cáncer, células inmortalizadas o líneas celulares entran en su respectivo estado o condición de forma natural.

[0215] En ciertos aspectos, las células o líneas celulares electroporadas pueden ser 697, 10T½, 1321N1, A549, AHR77, células B, B-LCL, B16, B65, Ba/F3, BHK, C2C12, C6, CaCo-2, CAP/, CAP-T, CaSki, ChaGo-K-1, CHO, CHO2, CHO-DG44, CHO-K1, COS, COS-1, Cos-7, CV-1, células dendríticas, DG75, DLD-1, EL4, Células madre embrionarias (ES) o derivados, H1299, HaCaT, HAP1, HCT116, HEK, 293, 293T, 293FT, HeLa, Hep G2, HL60, Células madre hematopoyéticas, HOS, HT1080, HT29, Huh-7, HUVEC, Pluripotente inducida Célula madre (iPS) o derivado, INS-1/GRINCH, Jurkat, K46, K562, KG1, KHYG-1, L5278Y, L6, LNCaP, LS180, MCF7, MDA-MB-231, MDCK, ME-180, Células mesenquimales , MG-63, Min-6, célula monocítica, MOLT4, Nalm6, ND7/23, Neuro2a, NK92, NIH 3T3, NIH3T3L1, NS/0, células NK, P3U1, Panc-1, PC12, PC-3, PER.C6, PM1, Células de sangre periférica, Células plasmáticas, Fibroblastos primario, Ramos, RAW 264,7, RBL, Renca, RLE, SF21, SF9, SH-SY5Y, SK-BR-3, SK-MES-1, SK-N- SH, SK-OV-3, SP3/0, SL3, SW403, célula o derivado de adquisición de pluripotencia desencadenada por estímulo (STAP) te SW403, células T, THP-1, células tumorales, U2OS, U205, U937, linfocitos de sangre periférica, células T expandidas, células madre hematopoyéticas, YB2/0, células Vero o derivados de estos.

[0216] En algunos aspectos, las células son adipocitos, condrocitos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, hepatocitos, queratinocitos, miocitos, neuronas, osteocitos, linfocitos de sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células T expandidas, esplenocitos, células madre, células madre hematopoyéticas o timocitos. En algunos aspectos, las células son células primarias. En algunos aspectos, las células son células cultivadas. En algunos aspectos, las células son líneas celulares cultivadas. En algunos aspectos, las PBMC son linfocitos de sangre periférica (PBL). En algunos aspectos, los PBL son células asesinas naturales (NK), células T o células B. En algunos aspectos, las PBMC son monocitos. En algunos aspectos, los monocitos son macrófagos o células dendríticas. En algunos aspectos, los macrófagos son microglia. En algunos aspectos, las

células madre son células madre adiposas, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesenquimales o células madre neurales. Una o más de las células divulgadas anteriormente están excluidas en algunos aspectos.

[0217] En algunos aspectos, las células son células primarias aisladas de un paciente. En algunos aspectos, las células están recién aisladas. Las células aisladas pueden ser células alogénicas y pueden obtenerse de fuentes estándar, por ejemplo, servicios hospitalarios. Los donantes pueden evaluarse utilizando historias y análisis de sangre estándar. En algunos aspectos, las células se transfectan en un periodo de tiempo menor o exactamente 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 días o cualquier valor de 20 a 1 días o cualquier intervalo que derive de este, o menos o exactamente 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1 hora o cualquier valor de 24 a 1 hora o cualquier intervalo de este. En algunos aspectos, las células aisladas nunca han sido congeladas. En algunos aspectos, las células aisladas nunca se han transferido o cultivado, *in vitro*. En algunos aspectos, las células aisladas se han transferido o cultivado menos de o exactamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces, o cualquier intervalo que derive de este. El término “transferido” pretende referirse al proceso de cultivo y división de células para producir una gran cantidad de células a partir de las preexistentes. El paso implica dividir las células y transferir un pequeño número a cada recipiente nuevo para el cultivo. Para cultivos adherentes, primero se deben separar las células, lo que habitualmente se hace con una mezcla de tripsina y EDTA. Luego, se puede usar una pequeña cantidad de células separadas para sembrar un nuevo cultivo, mientras que el resto se descarta. Además, la cantidad de células cultivadas se puede aumentar fácilmente distribuyendo todas las células en matraces nuevos.

[0218] En ciertos aspectos, la célula es conocida en la técnica por ser difícil de transfectar. Dichas células son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, células primarias, células de insecto, células SF9, células Jurkat, células CHO, células madre, células que se dividen lentamente y células que no se dividen. En

algunos aspectos, la célula es una célula germinal tal como un óvulo o un espermatozoide. En algunos aspectos, la célula es un embrión fertilizado. En algunos aspectos, la célula es un embrión humano fertilizado.

[0219] En algunos aspectos, las células mantienen una alta viabilidad durante y después del proceso de electroporación secuencial. La viabilidad celular puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden contar antes y después de la electroporación mediante un aparato contador de células. En otros aspectos, se mide la apoptosis. Se cree que la introducción de grandes cantidades de ácidos nucleicos puede inducir la apoptosis. Se contempla que los métodos descritos en el presente documento conducirán a menos apoptosis que otros métodos en la técnica. En ciertos aspectos, la cantidad de células que presentan apoptosis después de la electroporación secuencial es inferior al 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5%. La apoptosis se refiere al proceso específico de muerte celular programada y puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la apoptosis puede medirse mediante ensayos de anexina V, ensayos de detección de caspasa 3/7 activada y ensayo de apoptosis Vybrant® (Life Technologies).

[0220] La viabilidad es habitualmente superior al 50% o superior. La viabilidad de las células electroporadas secuencialmente puede ser como máximo o al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% (o un valor del 5% al 95% o cualquier intervalo que deriva de este), de la viabilidad de la población inicial no electroporada o una población electroporada transfectada con una construcción de control. En algunos aspectos, la viabilidad celular puede ser, puede ser al menos, o puede ser como máximo 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% o 90% 12 a 96 horas después de una segunda toma eléctrica pulso administrado según un método de electroporación

que comprende someter una muestra que comprende una o más células intactas, partículas celulares o vesículas lipídicas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera intensidad de campo y una duración del primer pulso suficiente para cargar las células, partículas celulares o lípidos vesículas con un agente según un primer protocolo; y someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda intensidad de campo y una segunda duración de pulso suficiente para cargar las células, partículas celulares o vesículas lipídicas con un agente según un segundo protocolo. En algunos aspectos, la viabilidad celular es de al menos un 50% de 12 a 96 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la viabilidad celular es de al menos un 60% de 12 a 96 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la viabilidad celular es de al menos un 70% de 12 a 96 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la viabilidad celular es de al menos un 80% de 12 a 96 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, la viabilidad celular es de al menos un 90% de 12 a 96 horas después de un segundo pulso eléctrico.

[0221] En algunos aspectos, las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 96 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 72 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 48 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables 24 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, las células electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 96 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, las células electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 72 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, las células electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 48 horas después de un segundo pulso eléctrico. En algunos aspectos, las células

electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables 24 horas después de un segundo pulso eléctrico.

[0222] En algunos aspectos, las células pueden someterse a métodos de dilución limitantes para permitir la expansión de poblaciones clonales de células. Los métodos de clonación por dilución limitante son bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos se han descrito, por ejemplo, para hibridomas, pero se pueden aplicar a cualquier célula. Dichos métodos se describen en “Cloning hybridoma cells by limiting dilution,” *Journal of Tissue Culture Methods*, 1985, volumen 9, número 3, páginas 175-177, por Joan C. Renner, Bruce L. Brown y Roland M. Nardone, que se incorpora en el presente documento como referencia.

[0223] En algunos aspectos, las células se cultivan antes de la electroporación o después de la electroporación. En algunos aspectos, se permite que las células se recuperen en cultivo antes de la electroporación o después de la electroporación. Como se usa en el presente documento, “permitir que una muestra se recupere”, “recuperar una muestra” o “recuperar en cultivo” significa cultivar células, incluidas, a mero título enunciativo, células de una muestra, en cualquiera de los recipientes de cultivo celular y medios de cultivo celular que se divulgan en el presente documento en condiciones tales como las descritas en el presente documento que son apropiadas y suficientes para facilitar la restauración o el retorno de las células a un estado o condición mejorada o deseada. Por ejemplo, la recuperación en cultivo puede permitir que las células se recuperen del trauma de la electroporación, por ejemplo, al reparar las paredes celulares y comenzar a expresar o metabolizar un agente cargado en las células tras la electroporación de las células.

[0224] En otros aspectos, las células se cultivan durante la fase de selección después de la electroporación. En otros aspectos más, las células se cultivan durante una fase de mantenimiento y selección clonal y expansión inicial. En otros aspectos más, las células se cultivan durante una fase de cribado. En otros aspectos, las células se cultivan durante una fase de producción a gran escala.

Los métodos para cultivar células en suspensión y adherentes son bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0225] En ciertos aspectos, la densidad de células durante la electroporación es una variable controlada. La densidad celular de las células durante la electroporación puede variar o variar según, a mero título enunciativo, el tipo de célula, la eficacia de electroporación deseada o la viabilidad deseada de las células electroporadas resultantes. En ciertos aspectos, la densidad celular es constante a lo largo de la electroporación. En otros aspectos, la densidad celular varía durante el proceso de electroporación. En ciertos aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^4 células/mL a $(y) \times 10^4$, donde y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^5 células/mL a $(y) \times 10^5$, donde y es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^6 células/mL a $(y) \times 10^6$, donde y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En ciertos aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^7 células/mL a $(y) \times 10^7$, donde y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^7 células/mL a 1×10^8 células/mL, 1×10^8 células/mL a 1×10^9 células/mL, 1×10^9 células/mL a 1×10^{10} células/mL, 1×10^{10} células/mL a 1×10^{11} células/mL, 1×10^{11} células/mL a 1×10^{12} células/mL o cualquier valor de 1×10^7 células/mL a 1×10^{12} células/mL o intervalo que derive de allí. En ciertos aspectos, la densidad celular antes de la electroporación puede ser $(y) \times 10^6$, donde y puede ser cualquiera de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o cualquier valor de 0,01 a 100 o intervalo que derive de allí. En ciertos aspectos, la densidad

celular antes de la electroporación puede ser $(y) \times 10^{10}$, donde y puede ser cualquiera de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 (o cualquier valor de 0,01 a 1000 o intervalo que derive de allí).

[0226] En ciertos aspectos, la densidad de células durante la electroporación es una variable controlada. La densidad celular de las células durante la electroporación puede variar o variar según, a mero título enunciativo, el tipo de célula, la eficacia de electroporación deseada o la viabilidad deseada de las células electroporadas resultantes. En ciertos aspectos, la densidad celular es constante a lo largo de la electroporación. En otros aspectos, la densidad celular varía durante el proceso de electroporación. En ciertos aspectos, la densidad celular durante la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^4 células/mL a $(y) \times 10^4$, donde y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, la densidad celular durante la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^5 células/mL a $(y) \times 10^5$, donde y es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, la densidad celular durante la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^6 células/mL a $(y) \times 10^6$, donde y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En ciertos aspectos, la densidad celular durante la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^7 células/mL a $(y) \times 10^7$, donde y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, la densidad celular durante la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^7 células/mL a 1×10^8 células/mL, 1×10^8 células/mL a 1×10^9 células/mL, 1×10^9 células/mL a 1×10^{10} células/mL, 1×10^{10} células/mL a 1×10^{11} células/mL, 1×10^{11} células/mL a 1×10^{12} células/mL o cualquier valor de 1×10^7 células/mL a 1×10^{12} células/mL o intervalo que derive de allí. En ciertos aspectos, la densidad celular durante la electroporación puede ser $(y) \times 10^6$, donde y puede ser cualquiera de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08,

0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o cualquier valor de 0,01 a 100 o intervalo que derive de allí. En ciertos aspectos, la densidad celular durante la electroporación puede ser $(y) \times 10^{10}$, donde y puede ser cualquiera de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 (o cualquier valor de 0,01 a 1000 o intervalo que derive de allí).

[0227] En ciertos aspectos, la densidad celular después de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^4 células/mL a $(y) \times 10^4$, donde y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, la densidad celular después de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^5 células/mL a $(y) \times 10^5$, donde y es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, la densidad celular después de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^6 células/mL a $(y) \times 10^6$, donde y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En ciertos aspectos, la densidad celular después de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^7 células/mL a $(y) \times 10^7$, donde y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o cualquier valor de 2 a 10 o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, la densidad celular después de la electroporación puede estar en el intervalo de 1×10^7 células/mL a 1×10^8 células/mL, 1×10^8 células/mL a 1×10^9 células/mL, 1×10^9 células/mL a 1×10^{10} células/mL, 1×10^{10} células/mL a 1×10^{11} células/mL, 1×10^{11} células/mL a 1×10^{12} células/mL o cualquier valor de 1×10^7 células/mL a 1×10^{12} células/mL o intervalo que derive de allí. En ciertos aspectos, la densidad celular después de la electroporación puede ser $(y) \times 10^6$, donde y puede ser cualquiera de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o cualquier valor de 0,01 a 100 o intervalo que derive de allí. En ciertos aspectos, la densidad celular después de la electroporación puede ser $(y) \times 10^{10}$, donde y puede ser cualquiera de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08,

0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 (o cualquier valor de 0,01 a 1000 o intervalo que derive de allí).

[0228] En algunos casos, se puede someter a electroporación un determinado número de células en un determinado periodo de tiempo. Dada la flexibilidad, compatibilidad y reproducibilidad de la plataforma descrita, hasta o más de aproximadamente $(y) \times 10^4$, $(y) \times 10^5$, $(y) \times 10^6$, $(y) \times 10^7$, $(y) \times 10^8$, $(y) \times 10^9$, $(y) \times 10^{10}$, $(y) \times 10^{11}$, $(y) \times 10^{12}$, $(y) \times 10^{13}$, $(y) \times 10^{14}$ o $(y) \times 10^{15}$ células (o cualquier valor de $(y) \times 10^4$ a $(y) \times 10^{15}$ o intervalo que derive de allí) se puede electroporar, donde y puede ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 (o valor de 1 a 9 o intervalo que derive de allí), en menos de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 segundos (o cualquier valor de 0,01 segundos a 100 segundos o intervalo que derive de allí). En otros casos, hasta o más de aproximadamente $(y) \times 10^4$, $(y) \times 10^5$, $(y) \times 10^6$, $(y) \times 10^7$, $(y) \times 10^8$, $(y) \times 10^9$, $(y) \times 10^{10}$, $(y) \times 10^{11}$, $(y) \times 10^{12}$, $(y) \times 10^{13}$, $(y) \times 10^{14}$ o $(y) \times 10^{15}$ células (o cualquier valor de $(y) \times 10^4$ células a $(y) \times 10^{15}$ células o intervalo que derive de allí) se pueden electroporar, donde y puede ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 (o valor de 1 a 9 o intervalo que derive de allí), en menos de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 120 minutos (o cualquier valor de 0,01 minutos a 120 minutos o intervalo que derive de allí). En otros aspectos, hasta o más de aproximadamente $(y) \times 10^4$, $(y) \times 10^5$, $(y) \times 10^6$, $(y) \times 10^7$, $(y) \times 10^8$, $(y) \times 10^9$, $(y) \times 10^{10}$, $(y) \times 10^{11}$, $(y) \times 10^{12}$, $(y) \times 10^{13}$, $(y) \times 10^{14}$ o $(y) \times 10^{15}$ células (o cualquier valor de $(y) \times 10^4$ células a $(y) \times 10^{15}$ células o intervalo que derive de allí) se pueden electroporar, donde y puede ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 (o valor de 1 a 9 o intervalo que derive de allí), en menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas (o cualquier valor de 1 hora a 24 horas o intervalo que derive de allí).

[0229] La expresión “ $(y) \times 10^e$ ” se entiende como una variable “y” que puede tomar cualquier valor numérico, multiplicado por 10 que se eleva a un valor exponencial, e. Por ejemplo, $(y) \times 10^4$, donde y es 2, se entiende que significa 2×10^4 , que equivale a 2×10.000 , igual a 20.000. $(y) \times 10e4$ también se puede escribir como $(y) * 10e4$ o $(y) \times 10^4$ o $(y) * 10^4$.

[0230] Los volúmenes de células o medios pueden variar dependiendo de la cantidad de células a electroporar, la cantidad de células a cribar, el tipo de células a cribar, el tipo de proteína a producir, la cantidad de proteína deseada, la viabilidad celular y ciertas características celulares relacionadas con concentraciones celulares deseables. Los ejemplos de volúmenes que se pueden usar en métodos y composiciones incluyen, a mero título enunciativo, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 mL o L (o cualquier valor de 0,01 mL o L a 1000 mL o L o intervalo que derive de allí), y cualquier intervalo que derive de este. Los contenedores que pueden contener dichos volúmenes se contemplan para su uso en los aspectos descritos en el presente documento. Dichos contenedores incluyen, a mero título enunciativo, placas de cultivo celular, placas de Petri, matraces, biobolsas, biocontenedores, biorreactores o cubas. Se contemplan particularmente los contenedores para volúmenes a gran escala, tales como aquellos capaces de contener más de 10 L o más. En ciertos aspectos, se utilizan volúmenes de 100 L o más.

[0231] En algunos aspectos, las células se cultivan en suspensión, utilizando recipientes de cultivo celular y medios de cultivo celular comercialmente disponibles. Algunos ejemplos de recipientes de cultivo disponibles comercialmente que pueden usarse en algunos aspectos, incluidas placas ADME/TOX (GIBCO™), portaobjetos y cubreobjetos de cámaras celulares, equipo de recuento celular, superficies de cultivo celular, recipientes de cultivo celular HYPERFLASK® (CORNING®), recipientes de cultivo recubiertos, Cryoware NALGENE®, cámara de cultivo, placas de cultivo, frascos de cultivo de vidrio, frascos de cultivo de plástico, formatos de cultivo 3D, placas multipocillo de cultivo, insertos de placas de cultivo, tubos de cultivo de vidrio, tubos de cultivo de plástico, recipientes de cultivo celular apilables, cámara de cultivo hipóxico, placa de Petri y soportes de matraces, recipientes de cultivo Quickfit, cultivo celular de escala utilizando botellas giratorias, matraces giratorios, cultivo celular 3D o bolsas de cultivo celular.

[0232] En otros aspectos, los medios pueden formularse usando componentes bien conocidos por los expertos en la técnica. Las formulaciones y métodos de cultivo de células se describen en detalle en las siguientes referencias: Short Protocols in Cell Biology, J. Bonifacino, *et al.*, ed., John Wiley & Sons, 2003, 826 pp; Live Cell Imaging: A Laboratory Manual, D. Spector & R. Goldman, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, 450 pp.; Stem Cells Handbook, S. Sell, ed., Humana Press, 2003, 528 pp.; Animal Cell Culture: Essential Methods, John M. Davis, John Wiley & Sons, Mar 16, 2011; Basic Cell Culture Protocols, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005; Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 806, Mitry, Ragai R.; Hughes, Robin D. (Eds.), 3rd ed. 2012, XIV, 435 p. 89, Humana Press; Cancer Cell Culture: Method and Protocols, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005; Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 806, Mitry, Ragai R.; Hughes, Robin D. (Eds.), 3rd ed. 2012, XIV, 435 p. 89, Humana Press; Cancer Cell Culture: Method and Protocols, Simon P. Langdon, Springer, 2004; Molecular Cell Biology. 4th edition., Lodish H, Berk A, Zipursky S L, *et al.*,

New York: W. H. Freeman; 2000, Section 6.2 Growth of Animal Cells in Culture, los cuales se incorporan en el presente documento como referencia.

[0233] En algunos aspectos, durante la fase de cribado y expansión y/o durante la fase de producción a gran escala (también denominada lote alimentado y comparación), las células electroporadas expandidas que resultan de la selección o cribado pueden comprender un agente de interés.

B. Fabricación y recolección objetivo

[0234] Las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar en aplicaciones terapéuticas. Un ejemplo del uso terapéutico de las composiciones descritas en el presente documento es formular un agente terapéutico de interés en un tampón apropiado a una concentración requerida y procesar la formulación utilizando sistemas tales como los sistemas de electroporación descritos en el presente documento. Si el agente terapéutico de interés y el objetivo de la electroporación se esterilizan por filtración en un recipiente con puertos apropiados, el agente terapéutico de interés puede pasar por un sistema estéril cerrado en un entorno de laboratorio de rutina. El proceso se puede completar en 2 a 3 horas. Las variables de rendimiento del sistema se generan en tiempo real y pueden ayudar en las operaciones de control de calidad.

[0235] Por lo general, la fabricación del objetivo cargado con agente se puede realizar en una instalación central o en los puntos de atención. Si va a haber una instalación central (o varias regionales), la estabilidad del objetivo cargado de agente es un factor importante. La estabilidad durante al menos varios días podría respaldar una operación de pedido personalizado. En un sistema de punto de atención, los agentes terapéuticos formulados de interés se suministrarían a los sitios donde se requiere la terapia. Los objetivos o los vehículos de entrega se pueden obtener en esos sitios y el paso final de fabricación se lleva a cabo en las instalaciones de procesamiento por parte del personal técnico utilizando procedimientos operativos estándar detallados. Esto sería análogo a la

preparación final de los productos de transfusión en el sitio. En este caso, la estabilidad del producto final no es crucial.

C. Aplicaciones terapéuticas

[0236] La divulgación abarca además métodos para administrar agentes terapéuticos de interés usando una entidad u objetivo electroporado, (p. ej., células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos) como vehículo de administración. La presente divulgación también incluye un método para tratar a un paciente que necesita un agente terapéutico de interés que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas o tejidos que contienen el agente terapéutico de interés.

[0237] Las formulaciones de agentes activos que se producen con los métodos descritos en el presente documento suelen tener un efecto sostenido y una menor toxicidad, lo que permite una administración menos frecuente y un índice terapéutico mejorado. Los agentes terapéuticos se generan preparando primero células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos cargados con al menos un agente terapéutico de interés, obtenido según los métodos descritos en el presente documento.

[0238] En ciertos aspectos de la presente divulgación, los agentes de interés pueden cargarse o introducirse en un vehículo de entrega (es decir, un objetivo de electroporación, por ejemplo, células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos). Los ejemplos de agentes de interés adecuados incluyen, a mero título enunciativo, fármacos; agentes estabilizadores, trazadores, etiquetas fluorescentes y otras sustancias de formación de imágenes tal como radiomarcadores; crioprotectores; ácidos nucleicos; polipéptidos; moléculas pequeñas; carbohidratos; y materiales bioactivos. Los materiales bioactivos particularmente adecuados para la incorporación en objetivos de electroporación incluyen, a mero título enunciativo, agentes terapéuticos y profilácticos. Los ejemplos de materiales bioactivos incluyen, a mero título enunciativo, proteínas y péptidos (sintéticos, naturales y

miméticos), oligonucleótidos (antisentido, ribozimas, etc.), ácidos nucleicos (p. ej., DNA lineal de doble sentido, RNA inhibidor, siRNA, miRNA, shRNA, vectores de expresión, etc.), ribonucleoproteínas, vectores, moléculas pequeñas, carbohidratos, citocinas, agentes hemoterapéuticos, medicamentos contra el cáncer, medicamentos antiinflamatorios, medicamentos antifúngicos, medicamentos antivirales, medicamentos antimicrobianos, agentes trombomoduladores, agentes inmunomoduladores y similares. Debe entenderse que también pueden introducirse otros agentes de interés en el vehículo de administración u otras células para administración al tejido dañado. Estos agentes de interés incluyen, a mero título enunciativo, inhibidores del músculo liso, agentes antiinfecciosos (p. ej., antibióticos, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, agentes antivirales), agentes quimioterapéuticos/antineoplásicos y similares.

[0239] Los agentes de interés pueden introducirse en el vehículo de administración mediante uno o más de una serie de métodos, siendo el método más preferible según el aparato y/o los métodos de la presente divulgación. En algunos aspectos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más agentes de interés se introducen en serie en el vehículo de entrega. En algunos aspectos, los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más agentes que se introducirán en serie en el vehículo de entrega pueden ser el mismo agente, diferentes agentes o una combinación de estos. Por ejemplo, en algunos aspectos, los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más agentes que se introducirán en serie en el vehículo de entrega pueden ser el mismo agente. En algunos aspectos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de los agentes a introducir en serie en el vehículo de entrega pueden ser agentes diferentes. En algunos aspectos, los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más agentes que se introducirán en serie en el vehículo de entrega pueden ser una combinación de estos y diferentes agentes (p. ej., el segundo, tercer y cuarto agente pueden ser todos el mismo agente, mientras que los agentes quinto a décimo pueden ser un agente diferente o una combinación de agentes diferentes).

[0240] En algunos aspectos, los métodos reivindicados de transfección de células por electroporación, tal como la electroporación de flujo, logran eficiencias de carga o transfección de un agente de interés de al menos, como máximo o aproximadamente 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 o 90%, o cualquier intervalo o valor derivado de este. Los métodos reivindicados de transfección de células por electroporación, tal como la electroporación de flujo, son capaces de lograr eficiencias de carga o transfección de un agente de interés de más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, superior al 80% o superior al 90% (o cualquier intervalo o valor derivado de este). En algunos aspectos, la eficiencia de carga de un agente de interés es de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90%. La eficacia de la transfección se puede medir por el porcentaje de células que expresan el producto del gen o el grado de secreción del producto expresado por el gen.

[0241] La dosificación de cualquier composición de la presente divulgación variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, la naturaleza y gravedad del trastorno a tratar o prevenir, la vía de administración y la forma de la composición en cuestión. Cualquiera de las formulaciones en cuestión puede administrarse en una sola dosis o en dosis divididas. Las dosis para las composiciones de la presente divulgación se pueden determinar fácilmente mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica o como se enseña en el presente documento.

[0242] En algunos aspectos, la dosificación de los compuestos en cuestión puede ser, puede ser como máximo o puede ser al menos 0,001, 0,010, 0,020, 0,030, 0,040, 0,050, 0,060, 0,070, 0,080, 0,090, 0,100, 0,110, 0,120, 0,130, 0,140, 0,150, 0,160, 0,170, 0,180, 0,190, 0,200, 0,210, 0,220, 0,230, 0,240, 0,250, 0,260, 0,270, 0,280, 0,290, 0,300, 0,310, 0,320, 0,330, 0,340, 0,350, 0,360, 0,370, 0,380, 0,390, 0,400, 0,410, 0,420, 0,430, 0,440, 0,450, 0,460, 0,470, 0,480, 0,490, 0,500, 0,510, 0,520, 0,530, 0,540, 0,550, 0,560, 0,570,

0,580, 0,590, 0,600, 0,610, 0,620, 0,630, 0,640, 0,650, 0,660, 0,670, 0,680, 0,690, 0,700, 0,710, 0,720, 0,730, 0,740, 0,750, 0,760, 0,770, 0,780, 0,790, 0,800, 0,810, 0,820, 0,830, 0,840, 0,850, 0,860, 0,870, 0,880, 0,890, 0,900, 0,910, 0,920, 0,930, 0,940, 0,950, 0,960, 0,970, 0,980, 0,990, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,100, 2,200, 2,300, 2,400, 2,500, 2,600, 2,700, 2,800, 2,900, 3,000, 3,100, 3,200, 3,300, 3,400, 3,500, 3,600, 3,700, 3,800, 3,900, 4,000, 4,100, 4,200, 4,300, 4,400, 4,500, 4,600, 4,700, 4,800, 4,900, 5,000, 5,100, 5,200, 5,300, 5,400, 5,500, 5,600, 5,700, 5,800, 5,900, 6,000, 6,100, 6,200, 6,300, 6,400, 6,500, 6,600, 6,700, 6,800, 6,900, 7,000, 7,100, 7,200, 7,300, 7,400, 7,500, 7,600, 7,700, 7,800, 7,900, 8,000, 8,100, 8,200, 8,300, 8,400, 8,500, 8,600, 8,700, 8,800, 8,900, 9,000, 9,100, 9,200, 9,300, 9,400, 9,500, 9,600, 9,700, 9,800, 9,900 o 10,000 pg/ng/mg/g por kg de peso corporal, o cualquier intervalo o valor que derive de allí. En ciertos aspectos, la dosificación de los compuestos en cuestión estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,001, 0,01, 1, 5, 10 pg/ng/mg a aproximadamente 0,1, 1, 5, 10 pg/ng/mg/g por kg de peso corporal, incluidos todos los valores e intervalos entre ellos.

1. Agentes antiinfecciosos

[0243] En un aspecto, el agente de interés es un antiinfeccioso. Los antiinfecciosos son agentes que actúan contra infecciones, tales como infecciones bacterianas, micobacterianas, fúngicas, virales o protozoarias. Los antiinfecciosos cubiertos por la divulgación incluyen, a mero título enunciativo, aminoglucósidos (p. ej., estreptomicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, kanamicina y similares), tetraciclinas (p. ej., clortetraciclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina, minociclina y similares), sulfonamidas (p. ej., sulfanilamida, sulfadiazina, sulfametaoxazol, sulfisoxazol, sulfacetamida y similares), ácido paraaminobenzoico, diaminopirimidinas (p. ej., trimetoprim, a menudo utilizado junto con sulfametoxazol, pirazinamida y similares), quinolonas (p. ej., ácido nalidíxico, cinoxacino, ciprofloxacino y norfloxacino y similares), penicilinas (p. ej., penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina,

bacampicilina, carbenicilina, carbenicilina indanilo, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, piperacilina y similares), penicilina resistente a la penicilinasa (p. ej., meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina y similares), cefalosporinas de primera generación (p. ej., cefadroxilo, cefalexina, cefradina, cefalotina, cefapirina, cefazolina y similares), cefalosporinas de segunda generación (p. ej., cefaclor, cefamandol, cefonicid, cefoxitina, cefotetan, cefuroxime, cefuroxime axetil, cefmetazol, cefprozil, loracarbef, ceforanida y similares), cefalosporinas de tercera generación (p. ej., cefepima, cefoperazona, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno y similares), otros betalactámicos (p. ej., imipenem, meropenem, aztreonam, ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y similares), inhibidores de betalactamasa (p. ej., ácido clavulánico), cloranfenicol, macrólidos (p. ej., eritromicina, azitromicina, claritromicina y similares), lincomicina, clindamicina, espectinomicina, polimixina B, polimixinas (p. ej., polimixina A, B, C, D, E1 [colistina A] o E2, colistina B o C, y similares), colistina, vancomicina, bacitracina, isoniazida, rifampicina, etambutol, etionamida, ácido aminosalicílico, cicloserina, capreomicina, sulfonas (p. ej., dapsona, sulfoxona sódica y similares), clofazimina, talidomida y cualquier otro agente antibacteriano que pueda encapsularse en lípidos.

[0244] En determinados aspectos, los antimicrobianos incluyen antimicobacterianos, incluido, a mero título enunciativo, isoniazida, rifampin, estreptomina, rifabutina, etambutol, pirazinamida, etionamida, aminosalicílico y cicloserina.

[0245] Los antiinfecciosos pueden incluir agentes antifúngicos, incluido antifúngicos de polieno (p. ej., anfotericina B, nistatina, natamicina y similares), flucitosina, imidazoles (p. ej., n-ticonazol, clotrimazol, econazol, ketoconazol y similares), triazoles (p. ej., itraconazol, fluconazol y similares), griseofulvina, terconazol, butoconazol ciclopirax, ciclopirox olamina, haloprogina, tolnaftato, naftifina, terbinafina y cualquier otro antifúngico que puede encapsulado o formado en complejos en lípidos. Pueden utilizarse combinaciones de fármacos.

[0246] En determinados aspectos, antiinfecciosos incluyen antivíricos, incluidos, a mero título enunciativo, agentes contra el herpes tal como aciclovir, famciclovir, foscarnet, ganciclovir, aciclovir, idoxuridina, sorivudina, trifluridina, valaciclovir y vidarabina; agentes antiretrovíricos tal como ritonavir, didanosina, estavudina, zalcitabina, tenofovir y zidovudina; y otros agentes antivíricos tales como, a mero título enunciativo, amantadina, interferón-alfa, ribavirina y rimantadina.

[0247] También se incluyen como antiinfecciosos adecuados usados en las formulaciones de la presente divulgación las sales de adición farmacéuticamente aceptables y los complejos de fármacos. En casos donde los compuestos pueden tener uno o más de centros quirales, a menos que esté especificado, la presente divulgación comprende cada compuesto racémico único, y también cada compuesto no racémico único.

2. Agentes antineoplásicos

[0248] En un aspecto, un agente activo es un fármaco antineoplásico. En la actualidad, hay aproximadamente veinte clases reconocidas de fármacos antineoplásicos aprobados. Las clasificaciones son generalizaciones basadas en una estructura habitual compartida por fármacos particulares, o están basadas en un mecanismo de acción habitual por los fármacos. Una lista parcial de algunos de los agentes antineoplásicos conocidos habitualmente por clasificación es como se indica a continuación:

[0249] Las clases basadas en estructura incluyen fluoropirimidinas—5-FU, Fluorodesoxiuridina, Ftorafur, 5'-desoxifluorouridina, UFT, S-1 Capecitabina; nucleósidos de pirimidina—desoxicitidina, citosina arabinosida, 5-Azacitosina, Gemcitabina, 5-Azacitosina-Arabinosida; purinas—6-Mercaptopurina, tioguanina, Azatioprina, Alopurinol, Cladribina, Fludarabina, Pentostatin, 2-cloro adenosina; análogos de platino—Cisplatino, Carboplatino, Oxaliplatino, Tetraplatino, DACH platino, Ormaplatino, CI-973, JM-216; Antraciclinas/Antracenodionas—Doxorrubicina, Daunorubicina, Epirubicina, Idarubicina, Mitoxantrona; Epipodofilotoxinas—Etopósido, Tenipósido; Camptotecinas—Irinotecán, Topotecan, 9-Amino Camptotecina, 10,11-

Metilenodioxi Camptotecina, 9-Nitro Camptotecina, TAS 103, 7-(4-metil-piperazino-metileno)-10,11-etilenodioxi-20(S)-camptotecina, 7-(2-N-isopropilamino)etil)-20(S)-camptotecina; Hormonas y análogos hormonales—Dietilstilbestrol, Tamoxifeno, Toremefina, Tolmudex, Timitaq, Flutamida, Bicalutamida, Finasterida, Estradiol, Trioxifeno, Droloxifeno, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, Aminoglutetimido, Testolactona y otros; enzimas, proteínas y anticuerpos—Asparaginasa, Interleucinas, Interferones, Leuprolido, Pegaspargasa y otros; alcaloides de vinca — Vincristina, Vinblastina, Vinorelbina, Vindesina; Taxanos—Paclitaxel y Docetaxel.

[0250] Las clases basadas en mecanismo incluyen antihormonales—Anastrozol; Antifolatos—Metotrexato, Aminopterina, Trimetrexato, Trimetoprim, Piritrexim, Pirimetamina, Edatrexato, MDAM; agentes antimicrotúbulo—Taxanos y alcaloides de Vinca; mostazas de nitrógeno de agentes alquilantes (clásicos y no clásicos) (Mecloretamina, Clorambucilo, Melfalán, mostaza de Uracilo), Oxazafosforinas (Ifosfamida, Ciclofosfamida, Perfosfamida, Trofosfamida), Alquil sulfonatos (Busulfán), Nitrosoureas (Carmustina, Lomustina, estreptozocina), tiotepa, dacarbazina y otros; antimetabolitos—purinas, pirimidinas y nucleósidos, enumerados anteriormente; antibióticos—antraciclinas/Antracenodionas, Bleomicina, Dactinomicina, Mitomicina, Plicamicina, Pentostatina, estreptozocina; inhibidores de topoisomerasa—Camptotecinas (Topo I), Epipodofilotoxinas, m-AMSA, elipticinas (Topo II); Antivíricos—AZT, Zalcitabina, Gemcitabina, Didanosina y otros; agentes citotóxicos misceláneos—siRNA, miRNA, hidroxurea, Mitotano, toxinas de fusión, PZA, Briostatina, retinoides, ácido butírico y derivados, Pentosán, Fumagilina y otros.

3. Agentes antiangiogénicos

[0251] Los agentes antiangiogénicos pueden incorporarse en los direccionamientos de electroporación. Los fármacos antiangiogénicos incluyen, a mero título enunciativo, AGM-1470 (TNP-470) o antagonistas de uno de sus

receptores, MetAP-2; antagonistas del factor de crecimiento o anticuerpos contra los factores de crecimiento (incluidos VEGF o bFGF); antagonistas del receptor del factor de crecimiento o anticuerpos contra receptores del factor de crecimiento; inhibidores de metaloproteinasas incluido TIMP, batimastat (BB-94) y marimastat; inhibidores de la tirosina cinasa incluido genisteína y SU5416; antagonistas de integrina incluidos antagonistas alfaVbeta3/5 o anticuerpos contra integrinas; retinoides incluido ácido retinoico o el fenretinida de retinoide sintético; esteroides 11 α -epihidrocortisol, corteloxona, tetrahidrocortisona y 17 α -hidroxiprogesterona; inhibidores de la proteína cinasa incluido estaurosporina y MDL 27032; derivados de vitamina D incluido 22-oxa-1 alfa y 25-dihidroxitamina D3; inhibidores del ácido araquidónico incluido indometacina y sulindac; derivados de tetraciclina incluido minociclina; talidomida y análogos de talidomida y derivados; 2-metoxiestradiol; factor de necrosis tumoral-alfa; proteína 10 interferón-gamma-inducible (IP-10); interleucina 1 e interleucina 12; interferón alfa, beta o gamma; proteína de angiostatina o fragmentos de plasminógeno; fragmentos de proteína endostatina o colágeno 18; proteína relacionada con proliferina; toxina del grupo B streptococcus; CM101; CAI; troponina I; escualamina; inhibidores de la sintasa de óxido nítrico incluido L-NAME; trombospondina; wortmanina; amilorida; espironolactona; ácido ursodesoxicólico; bufalina; suramina; sodio de tecogalán; ácido linoleico; captopril; irsogladina; FR-118487; ácidos triterpeno; castanospermina; factor inhibidor de leucemia; lavendustina A; plaqueta factor-4; herbimicina A; diaminoantraquinona; taxol; ácido aurintricarboxílico; DS-4152; pentosán polisulfito; radicicol; fragmentos de prolactina humana; erbstatina; eponemicina; cartílago de tiburón; protamina; Louisianina A, C y D; PAF antagonista WEB 2086; auranofina; éteres ascórbicos; y polisacárido D 4152 sulfatado.

4. Agentes biomoleculares

[0252] Los genes que se dirigirán con agentes de ácido nucleico usando los métodos de la divulgación incluyen, sin limitación, aquellos cuya expresión está correlacionada con un rasgo fenotípico no deseable. Por lo tanto, pueden

seleccionarse los genes que se relacionan con el cáncer y los virus, por ejemplo. Los genes que se relacionan con el cáncer incluyen oncogenes (p. ej., K-ras, c-myc, bcr/abl, c-myb, c-fms, c-fos y cerb-B), genes de factor de crecimiento (p. ej., genes que codifican el factor de crecimiento epidérmico y su receptor, proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblasto), genes de metaloproteínasa de matriz (p. ej., el gen que codifica MMP-9), genes de la molécula de adhesión (p. ej., el gen que codifica integrina VLA-6), genes supresores tumorales (p. ej., bcl-2 y bcl-X1), genes de angiogénesis y genes metastásicos. Los genes víricos incluyen genes del virus del papiloma humano (relacionados, por ejemplo, con el cáncer cervical), genes de la hepatitis B y C y genes del citomegalovirus (CMV) (relacionados, por ejemplo, con retinitis). También se pueden seleccionar otros genes que se relacionan con estas enfermedades u otros. En determinados aspectos, los ácidos nucleicos pueden dirigirse a mRNA que codifica c-myc, VEGF, CD4, CCR5, gag, MDM2, Apex, Ku70 o ErbB2.

[0253] Los métodos de regulación génica incluyen administrar siRNA, miRNA, shRNA, oligonucleótidos antisentido y otros ácidos nucleicos inhibidores y/o administración de vectores o ácidos nucleicos que codifican un polinucleótido, proteína, ribonucleoproteína o péptido terapéuticos. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para preparar y/o administrar al sujeto una dosificación de una molécula de oligonucleótido o ácido nucleico inhibidor terapéutico (oligonucleótido antisentido, ribozima, siRNA, shRNA, miRNA, dsRNA), donde el ácido nucleico administrado inhibe un proceso biológico tal como transcripción o traducción. La presente divulgación proporciona métodos de administrar una o más moléculas de ácido nucleico terapéutico a un sujeto, usando un vehículo del suministro de ácido nucleico preparado usando los métodos descritos, para proporcionar un beneficio terapéutico al sujeto. Tal como se utiliza en el presente documento, una “molécula de ácido nucleico terapéutico” o “ácido nucleico terapéutico” es cualquier ácido nucleico (p. ej., DNA, RNA, ácidos nucleicos que no ocurren de forma natural y sus análogos tal como ácidos nucleicos de péptido y sus conjugados químicos) que, como un

ácido nucleico o como un ácido nucleico o polipéptido expresado, confiere un beneficio terapéutico a un sujeto. El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ratón o un ser humano.

[0254] Los métodos de regulación genética también incluyen la edición génica de células para eliminar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más genes endógenos en las células. Los métodos de edición génica incluyen, a mero título enunciativo, endonucleasas guiadas por RNA (RGEN) (p. ej., ribonucleoproteínas), enzimas de restricción, nucleasas de dedo de zinc (ZFN) y nucleasas efectoras similares al activador de transcripción (TALEN). En aspectos particulares, se modifican uno o más de genes endógenos de las células, tal como interrupción en la expresión donde la expresión se reduce en parte o en su totalidad. En aspectos específicos, uno o más de genes se inactivan o eliminan usando procesos de la divulgación. La disrupción de la expresión génica y de activación o eliminación génica puede lograrse mediante células de electroporación para introducir uno o más de RGEN, enzimas de restricción, ZFN o TALEN, según el aparato de electroporación y/o métodos de la presente divulgación. En algunos aspectos, las células se electroporan secuencialmente para permitir la edición serial de las células a medida que se introducen uno o más de RGEN, enzimas de restricción, ZFN o TALEN secuencialmente para interrumpir, inactivar o eliminar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más genes. Los genes que se editan en las células pueden ser de cualquier tipo, pero en aspectos específicos, los genes son genes cuyos productos génicos se correlacionan con un rasgo fenotípico no deseado, como se describe en el presente documento.

a. Ácidos nucleicos

[0255] Los aspectos que implican células de electroporación, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos con una composición que comprende un ácido nucleico terapéutico. En determinados aspectos, la molécula del ácido nucleico puede estar en la forma de un oligonucleótido.

[0256] El término “oligo” o “oligonucleótido” se refiere a polinucleótidos tal como ácido desoxirribonucleico (DNA), y, cuando corresponda, ácido ribonucleico (RNA). El término también debe comprenderse como que incluye, como equivalentes, derivados, variantes y análogos de RNA o DNA creados a partir de análogos de nucleótidos, y, según corresponde con el aspecto que se describe, polinucleótidos monocatenarios (sentido o antisentido) y bicatenarios. Los desoxirribonucleótidos incluyen desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina y desoxitimidina. Para fines de claridad, cuando en el presente documento se refiere a un nucleótido de un ácido nucleico, que puede ser DNA o un RNA, se utilizan los términos “adenosina”, “citidina”, “guanosina” y “timidina”. Se comprende que si el ácido nucleico es RNA, un nucleótido que tiene una base de uracilo es uridina.

[0257] Los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de estos. Los polinucleótidos pueden tener una estructura tridimensional y pueden llevar a cabo cualquier función, conocida o no. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia, RNA ribosómico, ribozimas, cDNA, dsRNA, siRNA, miRNA, shRNA, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, DNA aislado de cualquier secuencia, RNA aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus nucleótidos análogos. De haberlas, se pueden impartir modificaciones a la estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede ser modificado adicionalmente luego de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcado. El término también se refiere a moléculas bicatenarias y monocatenarias. A menos

que se especifique o requiera lo contrario, cualquier aspecto de esta divulgación que sea un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria y cada uno de las dos formas monocatenarias complementarias conocidas o predichas para formar la forma bicatenaria.

[0258] El oligonucleótido de DNA puede ser de al menos, a lo sumo, o aproximadamente 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, o 600 nucleótidos a al menos, a lo sumo o aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3250, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4750 o 5000 nucleótidos en longitud, o cualquier valor de 10 nucleótidos a 5000 nucleótidos o intervalos derivables de estos. En determinados aspectos, el oligonucleótido es más de 10 nucleótidos o más de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 o 40 nucleótidos. En aspectos específicos, el oligonucleótido es de aproximadamente 30 a aproximadamente 300 nucleótidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos o de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 nucleótidos. En determinados aspectos, el oligonucleótido, independientemente de la longitud de una secuencia de codificación, pueden combinarse con otras secuencias de ácido nucleico, tal como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción, varios sitios de clonación, otros segmentos de codificación y similares, tal como su longitud general puede variar considerablemente.

[0259] La concentración del oligonucleótido durante el procedimiento de electroporación puede ser la concentración final del oligonucleótido en la cámara de electroporación y/o envase de la muestra. La concentración del oligonucleótido puede ser de al menos, a lo sumo o aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9,

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250 o 300 a aproximadamente 350, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 o 5000 $\mu\text{g/mL}$ o cualquier valor de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ a 5000 $\mu\text{g/mL}$ o intervalo derivable de estos. En determinados aspectos, la concentración del oligonucleótido es al menos 1 $\mu\text{g/mL}$. En aspectos adicionales, la concentración del oligonucleótido es al menos, a lo sumo o exactamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 $\mu\text{g/mL}$ o cualquier valor de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 300 $\mu\text{g/mL}$ o intervalo derivable de estos.

[0260] En el contexto de esta divulgación, el término “oligonucleótido no modificado” se refiere en general a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA). En algunos aspectos, una molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido no modificado. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases que ocurren de forma natural, azúcares y enlaces de internucleósido covalentes. El término “análogo de oligonucleótido” se refiere a oligonucleótidos que tienen una o más de porciones que no ocurren de forma natural que funcionan de manera similar a los oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos que no ocurren de forma natural a menudo se seleccionan en lugar de las formas que ocurren de forma natural debido a las propiedades deseables tal como, por ejemplo, un aumento de la absorción celular, un aumento de la afinidad para otros oligonucleótidos o direccionamientos de ácido nucleico y aumento de la estabilidad en la presencia de nucleasas. El término “oligonucleótido” puede usarse para referirse a oligonucleótido no modificados o análogos de oligonucleótido.

[0261] Los ejemplos específicos de las moléculas de ácido nucleico incluyen las moléculas de ácido nucleico que contienen enlaces de internucleósido modificados, *es decir*, que no ocurren de forma natural. Dichos enlaces de internucleósido que no ocurren de forma natural a menudo se seleccionan en lugar de las formas que ocurren de forma natural debido a las propiedades deseables tal como, por ejemplo, un aumento de la absorción celular, un

aumento de la afinidad para otros oligonucleótidos o direccionamientos de ácido nucleico y aumento de la estabilidad en la presencia de nucleasas. En un aspecto específico, la modificación comprende un grupo de metilo.

[0262] Las moléculas de ácido nucleico pueden tener uno o más de enlaces de internucleósido modificados. Tal como se define en esta memoria, los oligonucleótidos que contienen enlaces internucleósidos modificados incluyen enlaces de internucleósidos que retienen o carecen de un átomo de fósforo. A los fines de esta memoria, y como a veces se hace referencia en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en la cadena internucleósida principal también pueden considerarse oligonucleósidos.

[0263] Las modificaciones a las moléculas de ácido nucleico pueden incluir modificaciones donde se modifica uno o ambos nucleótidos terminales.

[0264] Un enlace de internucleósidos modificado que contiene fósforo adecuado es el enlace de internucleósidos de fosforotioato. Una cantidad de otras cadenas principales de oligonucleótido modificado (enlaces de internucleósido) son conocidas en la técnica y pueden ser útiles en el contexto de este aspecto. Algunas patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de enlaces de internucleósidos que contienen fósforo incluyen, a mero título enunciativo, patente de EE. UU. N.º 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697; 5,625,050; 5,489,677; y 5,602,240, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

[0265] Las cadenas principales de oligonucleótidos (conexiones de internucleósidos) modificados que no incluyen un átomo de fósforo en ella tienen conexiones de internucleósidos formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mezclados y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estas incluyen aquellas que

tienen cadenas principales de amida; y otras, incluidas aquellas que tienen partes del componente de N, O, S y CH₂ mezcladas. Algunas patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores que no contienen fósforo incluyen, a mero título enunciativo, patente de EE. UU. N.º 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269; y 5,677,439, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

[0266] Los compuestos oligoméricos también pueden incluir imitadores de oligonucleótidos. El término imitador tal como se aplica a oligonucleótidos tiene previsto incluir los compuestos oligoméricos donde solamente el anillo de furanosa o ambos, el anillo de furanosa y el enlace de internucleótido son reemplazados con grupos nuevos, el reemplazo de solamente el anillo de furanosa con, por ejemplo, un anillo de morfolino, también se refiere en la técnica como sustituto del azúcar. La porción de base heterocíclica o porción de base heterocíclica modificada se mantiene para la hibridación con un ácido nucleico dirigido adecuado. Los imitadores de oligonucleótido pueden incluir compuestos oligoméricos tal como ácidos nucleicos de péptidos (PNA) y ácidos nucleicos de ciclohexenilo (conocido como CeNA, véase Wang *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602). Algunas patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de imitadores de oligonucleótido incluyen, a mero título enunciativo, patente de EE. UU. N.º 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia. Otra clase de imitador de oligonucleótido se refiere como ácido nucleico de fosfonomonoéster e incorpora un grupo de fósforo en la cadena principal. Se informa que esta clase de oligonucleótido imitador tiene propiedades físicas, biológicas y farmacológicas útiles en las áreas de inhibición de expresión genética (oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos sentido y

oligonucleótidos de formación triple), como sondas para la detección de ácidos nucleicos y como auxiliares para usar en biología molecular. Se ha informado otro imitador de oligonucleótido donde se ha reemplazado el anillo de furanosilo por una porción de ciclobutilo.

[0267] Las moléculas de ácido nucleico también pueden contener una o más de porciones de azúcar modificadas o sustituidas. Las porciones de bases se mantienen para hibridación con un compuesto objetivo adecuado de ácido nucleico. Las modificaciones de azúcar pueden impartir estabilidad de las nucleasas, afinidad de unión u otras propiedades biológicas beneficiosas para los compuestos oligoméricos.

[0268] Los azúcares modificados representativos incluyen azúcares carbocíclicos o acíclico, azúcares que tienen grupos de sustituyentes en una o más de sus posiciones 2', 3' o 4', azúcares que tienen sustituyentes en lugar de uno o más de átomos de hidrógeno donde el azúcar y azúcares que tienen un enlace entre uno cualquiera de otros átomos en el azúcar. Una gran cantidad de modificaciones de azúcar son conocidas en la técnica, azúcares modificados en la posición 2' y aquellos que tienen un puente entre uno cualquiera de 2 átomos del azúcar (de forma tal que el azúcar es bicíclico) son particularmente útiles en este aspecto. Los ejemplos de modificaciones de azúcar útiles en este aspecto incluyen, a mero título enunciativo compuestos que comprenden un grupo de sustituyentes de azúcar seleccionado de: OH; F; O-, S- o N-alquilo; o O-alquilo-O-alquilo, donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C1 a C10 sustituido o no sustituido o alquenilo y alquinilo C2 a C10. Particularmente adecuados son: 2-metoxietoxi (también conocido como 2'-O-metoxietil, 2'-MOE o 2'-OCH₂CH₂OCH₃), 2'-O-metil (2'-O-CH₃), 2'-fluoro (2'-F) o nucleósidos modificados de azúcar bicíclico que tienen un grupo de enlace que conecta el átomo de carbono 4' con el átomo de carbono 2' donde los grupos de enlace de ejemplo incluyen —CH₂-O—, —(CH₂)₂-O— o —CH₂-N(R₃)-O donde R₃ es H o alquilo C1-C12.

[0269] Una modificación que imparte el aumento de la resistencia de nucleasa y una alta afinidad de unión a los nucleótidos es la cadena lateral de 2'-MOE (Baker *et al.*, J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Una de las ventajas inmediatas de la sustitución de 2'-MOE es la mejora en la afinidad de unión, que es mayor que muchas modificaciones similares de 2' tales como O-metilo, O-propilo y O-aminopropilo. Los oligonucleótidos que tienen el sustituyente de 2'-MOE también han demostrado ser inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para el uso *in vivo* (Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann *et al.*, Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann *et al.*, Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; and Altmann *et al.*, Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).

[0270] Los grupos de los sustituyentes de azúcar 2' pueden estar en la posición arabino (arriba) o la posición ribo (abajo). Una modificación de 2'-arabino es 2'-F. También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones en el compuesto oligomérico, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleósido terminal 3' en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los compuestos oligoméricos también pueden tener imitadores de azúcar, tales como porciones de ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Algunas patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de dichos azúcares modificadas incluyen, a mero título enunciativo, la patente de los EE. UU. N.º 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; y 5,700,920, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

[0271] Los grupos sustituyentes de azúcar representativos se divulgan en la patente de EE. UU. N.º 6,172,209 titulada "Oligonucleótidos 2'-oxietoxi caperuzado", incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad. Los grupos sustituyentes de azúcar cíclico representativos se divulgan en la patente de EE. UU. N.º 6,271,358 titulada "Compuestos oligoméricos 2'".

dirigidos a RNA que están organizados previamente de manera conformativa”, incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad. Los grupos sustituyentes de guanidino representativos se divulgan en la patente de EE. UU. N.º 6,593,466 titulada “Oligómeros funcionalizados”, incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad. Los grupos sustituyentes de acetamido representativos se divulgan en la patente de EE. UU. N.º 6,147,200 que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

[0272] Las moléculas de ácido nucleico también pueden contener una o más modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominada en la técnica simplemente como “base”) que son distinguibles estructuralmente de las nucleobases sin modificar que ocurren de forma natural o sintéticas, pero aun funcionalmente intercambiables con estas. Dichas modificaciones de nucleobase pueden impartir estabilidad de las nucleasas, afinidad de unión u otras propiedades biológicas beneficiosas para los compuestos oligoméricos. Como se usa en el presente documento, las nucleobases “no modificadas” o “naturales” incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas también se denominan en el presente documento porciones de base heterocíclicas e incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, y muchos ejemplos son 5-metilcitosina (5-me-C), citosina 5-hidroximetilo, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina, entre otros.

[0273] Las fracciones de bases heterocíclicas también pueden incluir aquellas en las que se reemplaza la base de purina o pirimidina por otras bases heterocíclicas, por ejemplo, 7-deazaadenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Algunas nucleobases incluyen a aquellas descritas en la patente de los EE. UU. N.º 3,687,808, aquellos divulgados en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, y aquellos

divulgados por Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6, incluidas 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

[0274] Las modificaciones adicionales a las moléculas de ácido nucleico están divulgadas en la publicación de la patente de EE. UU. 2009/0221685, que se incorpora en el presente documento como referencia. En el presente documento también se divulgan conjugados adecuados adicionales a las moléculas de ácido nucleico.

b. Proteínas

[0275] Los aspectos que implican células de electroporación, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos con una composición que comprende una proteína o péptido terapéuticos.

[0276] Tal como se utiliza en el presente documento, una “proteína” o “péptido” o “polipéptido” se refiere a una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácido. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “natural” se refiere a la versión endógena de una molécula que ocurre de manera natural en un organismo. En algunos aspectos, las versiones naturales de una proteína o un polipéptido se emplean, sin embargo, en muchos aspectos de la divulgación, una proteína o un polipéptido modificado se emplea para generar una respuesta inmunitaria. Los términos descritos anteriormente pueden utilizarse indistintamente. Una “proteína modificada” o “polipéptido modificado” o una “variante” se refiere a una proteína o polipéptido cuya estructura química, particularmente su secuencia de aminoácidos, se altera con respecto a la proteína o polipéptido naturales. En algunos aspectos, una proteína o un polipéptido modificado/variante tiene al menos una actividad o función modificada (con el reconocimiento de que las proteínas o los polipéptidos pueden tener varias actividades o funciones). Se contempla específicamente que una

proteína o un polipéptido modificado/variante puede alterarse con respecto a una actividad o función y aun así conservar una actividad o función naturales en otros aspectos, tal como inmunogenia.

[0277] Donde se menciona específicamente una proteína en el presente documento, en general es una referencia de una proteína nativa (natural) o recombinante (modificada) u, opcionalmente, una proteína en que se ha eliminado cualquier secuencia señalizadora. La proteína puede aislarse directamente del organismo del que es nativo, producida mediante métodos de expresión de DNA recombinante/exógeno, producido mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) u otros métodos *in vitro*. En aspectos particulares, hay segmentos aislados de ácido nucleico y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido (p. ej., un anticuerpo o fragmento de este). El término “recombinante” puede usarse en conjunto con un polipéptido o el nombre de un polipéptido específico y esto en general se refiere a un polipéptido producido a partir de una molécula de ácido nucleico que ha sido manipulada *in vitro* o que es un producto de réplica de dicha molécula.

[0278] En determinados aspectos, el tamaño de la proteína o polipéptido (natural o modificado) puede comprender, a mero título enunciativo, al menos, a lo sumo o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 residuos de aminoácido o mayor o cualquier valor de 1 aminoácido a 2500 aminoácidos o intervalo derivable de estos o derivado de una secuencia amino correspondiente descrita o que se hace referencia en el

presente documento. Se contempla que los polipéptidos pueden montarse mediante truncamiento, lo que los hace más cortos que su forma natural correspondiente. Además, pueden alterarse mediante fusión o conjugación de una secuencia heteróloga de proteína o polipéptido con una función particular (p. ej., para direccionamiento o localización, para un aumento en la inmunogenia, para fines de purificación, *etc.*). Tal como se utiliza en el presente documento, el término “dominio” se refiere a cualquier unidad funcional o estructural distinta de una proteína o un polipéptido y en general se refiere a una secuencia de aminoácidos con una estructura o función reconocible por un experto en la técnica.

[0279] El nucleótido así como la proteína, el polipéptido y las secuencias peptídicas para varios genes han sido previamente divulgados, y se pueden encontrar en las bases de datos computarizadas. Dos bases de datos utilizadas comúnmente son la del Centro Nacional para GENE BANK® de Información de Biotecnología y las bases de datos GENPEPT® (de la Red Mundial de Internet en ncbi.nlm.nih.gov) y and El Recurso de Proteína Universal (UNIPROT®; de la Red Mundial de Internet en uniprot.org). Las regiones codificantes de estos genes se pueden electroporar utilizando las técnicas divulgadas en el presente documento o como se conocerían a aquellas de habilidad normal en la materia.

[0280] La concentración de la proteína o polipéptido durante el procedimiento de electroporación puede ser la concentración final de la proteína en la cámara de electroporación y/o envase de muestra. La concentración de un polipéptido durante un procedimiento de electroporación puede ser de al menos, como máximo, o alrededor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 a al menos, como máximo, o alrededor de 350, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, o 5000 µg/mL, o cualquier valor desde 0,01 µg/mL a 5000 µg/mL o intervalo derivable en eso. En ciertos aspectos, la concentración del polipéptido es de al menos 1 µg/mL. En algunos aspectos, la concentración del polipéptido es al menos, como máximo, o exactamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, o 300 µg/mL, o cualquier desde 1 µg/mL a 300 µg/mL o intervalo derivable en esto.

[0281] Las proteínas de la divulgación pueden comprimir subunidades de aminoácidos alternativas de la proteína comparadas con la proteína de tipo salvaje para crear un equivalente, o incluso polipéptidos variantes de segunda generación o péptidos. Debido a que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína es la que define su actividad funcional, ciertos substitutos de aminoácidos pueden transformarse en una secuencia de proteína y su correspondiente codificación de DNA, and sin embargo, producir una proteína con propiedades similares o deseables.

[0282] El término “codón funcionalmente equivalente” se utiliza en el presente para referirse a los codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los seis diferentes codones para la arginina. Se consideran también los “substitutos neutrales” o “mutaciones neutrales” que se refieren a un cambio en el codón o codones que codifican biológicamente los aminoácidos equivalentes.

[0283] Los variantes de la secuencia de aminoácidos de la divulgación pueden ser variantes substitutas, de inserción, o de delección. Una variación en un polipéptido de la divulgación puede afectar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, o más aminoácidos no contiguos o contiguos de la proteína o del polipéptido, comparado con el de tipo salvaje. Un variante puede comprender una secuencia de aminoácido que es al menos 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, incluso todos los valores e intervalos de estos, idéntico a la secuencia de proteína de tipo salvaje. Una variante incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más aminoácidos substitutos, por ejemplo.

[0284] Se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir residuos adicionales tales como aminoácidos adicionales N o del extremo C, o secuencias de ácidos nucleicos de 5' o 3', respectivamente, y aun

ser esencialmente idénticas a la secuencia de tipo salvaje, siempre que la secuencia mantenga la actividad de la proteína biológica donde se afecta la expresión proteica. La adición de secuencias terminales concierne particularmente a las secuencias ácido nucleicas que pueden, por ejemplo, incluir varias secuencias no codificantes que escoltan porciones de 5' o 3' de la región codificante.

[0285] Las variantes de delección típicamente carecen de uno más residuos de la proteína nativa o la de tipo salvaje. Se pueden borrar los residuos individuales o se pueden borrar un número de aminoácidos contiguos. Se puede presentar un codón de parada (mediante sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico de codificación.

[0286] Los mutantes de inserción involucran la adición de residuos de aminoácidos en un punto no terminal del polipéptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más residuos de aminoácidos. Se pueden generar también adiciones terminales y se pueden incluir proteínas de fusión, que son multímeros o concatémeros de uno o más péptidos o polipéptidos descritos o referenciados en el presente documento.

[0287] Las variantes sustitutivas normalmente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína o el polipéptido, y pueden estar diseñadas para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, se sustituye un aminoácido por otro de propiedades químicas similares. Las "sustituciones conservadoras de aminoácidos" pueden implicar el intercambio de un miembro de una clase de aminoácidos por otro miembro de la misma clase. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden incluir residuos de aminoácidos no naturales, que normalmente se incorporan por síntesis química de péptidos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen los peptidomiméticos u otras formas revertidas o invertidas de los restos de aminoácidos.

[0288] Alternativamente, las sustituciones pueden ser "no conservadoras" (también "no conservadoras"). En algunos aspectos, una sustitución no conservadora afecta a una función o actividad del polipéptido. En algunos aspectos, una sustitución no conservadora no afecta a una función o actividad del polipéptido. Los cambios no conservadores normalmente involucran la sustitución de un residuo de aminoácido por otro que es químicamente distinto, como un aminoácido polar o cargado por uno no polar o no cargado, y viceversa. Las sustituciones no conservadoras pueden involucrar el intercambio de un miembro de una de las clases de aminoácidos por un miembro de otra clase.

c. Ribonucleoproteínas

[0289] Los aspectos se refieren a la electroporación de células con una composición que comprende uno o más ácidos nucleicos de unión al DNA, como la alteración *mediante* una endonucleasa guiada por RNA (RGEN) (*ej.*, una ribonucleoproteína) para la edición de genes de las células. En ciertos aspectos, la ribonucleoproteína comprende repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) y proteínas asociadas a CRISPR (Cas).

[0290] En general, el "sistema CRISPR" se refiere en conjunto a los transcritos y otros elementos que participan en la expresión o dirigen la actividad de los genes asociados a CRISPR ("Cas"), incluidas las secuencias que codifican un gen Cas, una secuencia tracr (CRISPR trans-activador) (*ej.*, tracrRNA o un tracrRNA parcial activo), una secuencia tracr-mate (que abarca una "repetición directa" y una repetición directa parcial procesada por tracrRNA en el contexto de un sistema CRISPR endógeno), una secuencia guía (también denominada "espaciador" en el contexto de un sistema CRISPR endógeno), y/o otras secuencias y transcripciones de un locus CRISPR.

[0291] El sistema de nucleasas CRISPR/Cas o nucleasas CRISPR/Cas puede incluir una molécula de RNA no codificante (guía), que se une específicamente a la secuencia del DNA, y una proteína Cas (*ej.*, Cas9), con funcionalidad de nucleasa (por ejemplo, dos dominios de nucleasa). Uno o más elementos de un sistema CRISPR pueden derivar de un sistema CRISPR de tipo I, de tipo II o de

tipo III, ej., derivados de un organismo particular que comprende un sistema CRISPR endógeno, como *Streptococcus pyogenes*.

[0292] En algunos aspectos, se introducen en la célula una nucleasa Cas y un gRNA. En general, los sitios objetivos en el extremo 5' del gRNA dirigen la nucleasa Cas al sitio objetivo, ej., el gen, utilizando el emparejamiento de base complementaria. El sitio objetivo puede seleccionarse basado en función de su ubicación inmediatamente 5' de una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM), como normalmente NGG, o NAG. En este sentido, el gRNA se dirige a la secuencia deseada modificando los primeros 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 nucleótidos del RNA guía para que se correspondan con la secuencia de DNA objetivo. En general, un sistema CRISPR se caracteriza por los elementos que promueven la formación de un complejo CRISPR en el sitio de una secuencia objetivo. Normalmente, la "secuencia objetivo" hace referencia a una secuencia con la que una secuencia guía está diseñada para tener complementariedad, donde la hibridación entre la secuencia objetivo y una secuencia guía promueve la formación de un complejo CRISPR. No se requiere necesariamente una complementariedad total, siempre que haya suficiente complementariedad para provocar la hibridación y promover la formación de un complejo CRISPR.

[0293] El sistema CRISPR puede inducir roturas de doble cadena (DSB) en el lugar de destino, seguidas de disrupciones o alteraciones, como se analizan en el presente documento. En otros aspectos, las variantes de Cas9, denominadas "nicasas", se utilizan para cortar una sola hebra en el sitio objetivo. Para mejorar la especificidad pueden utilizarse p. ej., nicasas emparejadas, cada una dirigida por un par de diferentes gRNA que apunten a secuencias que al introducir las nicasas simultáneamente, se introduzca un saliente de 5'. En otros aspectos, la Cas9 catalíticamente inactiva se fusiona con un dominio efector heterólogo, como un represor o activador transcripcional, para afectar a la expresión génica.

[0294] La secuencia objetivo puede componerse de cualquier polinucleótido, como polinucleótidos de DNA o RNA. La secuencia dirigida puede estar

localizada en el núcleo o en el citoplasma de la célula, como por ejemplo dentro de un orgánulo de la misma. Normalmente, una secuencia o plantilla que puede utilizarse para la recombinación en el locus objetivo que comprende las secuencias objetivo se denomina "plantilla de edición" o "polinucleótido de edición" o "secuencia de edición". En algunos aspectos, un polinucleótido plantilla exógeno puede llamarse plantilla de edición. En algunos aspectos, la recombinación es una recombinación homóloga.

[0295] Normalmente, en el contexto de un sistema CRISPR endógeno, la formación del complejo CRISPR (que comprende la secuencia guía hibridada a la secuencia objetivo y acompañada con una o más proteínas Cas) causa la escisión de una o ambas cadenas en o cerca (p. ej., dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 o más pares de bases de) la secuencia objetivo. La secuencia tracr, que consta de o consiste en todas o una porción de una secuencia tracr de tipo salvaje (p. ej. como máximo, como mínimo, alrededor de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, o más nucleótidos de secuencia tracr de tipo salvaje), también puede formar parte del complejo CRISPR, como por ejemplo mediante la hibridación a lo largo de al menos una porción de la secuencia tracr con toda o una porción de una secuencia tracr mate que se encuentra operativamente unida a la secuencia guía. La secuencia tracr tiene suficiente complementariedad con una secuencia tracr mate para hibridarse y participar en la formación del complejo CRISPR, como por ejemplo al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de complementariedad de la secuencia a lo largo de la longitud de la secuencia tracr mate cuando está óptimamente alineada.

[0296] Uno o más vectores que impulsan la expresión de uno o más elementos del sistema CRISPR se pueden introducir en la célula (p. ej., electroporación) de manera que la expresión de los elementos del sistema CRISPR dirija la formación del complejo CRISPR en uno o más sitios objetivo. Los componentes

pueden entregarse a las células proteínas y/o RNA y/o ribonucleoproteínas. Por ejemplo, una enzima Cas, una secuencia guía vinculada a una secuencia tracr, y una secuencia tracr podrían estar vinculadas a elementos reguladores separados en vectores distintos. Alternativamente, dos o más de los elementos expresados a partir de los mismos o diferentes elementos reguladores, pueden combinarse en un único vector, con uno o más vectores adicionales que proporcionen cualquier componente del sistema CRISPR no incluido en el primer vector. El vector puede constar de uno o más sitios de inserción, tales como una secuencia de reconocimiento de endonucleasas de restricción (también llamada “sitio de clonación”). En algunos aspectos, uno o más sitios de inserción están situados aguas arriba y/o aguas abajo de uno o más elementos de secuencia de uno o más vectores. Cuando se utilizan múltiples secuencias guía diferentes, una única construcción de expresión puede utilizarse para dirigir la actividad CRISPR a múltiples secuencias objetivo diferentes y correspondientes dentro de una célula.

[0297] Un vector puede comprender un elemento regulador unido de forma operable a una secuencia de codificación de la enzima CRISPR, como una proteína Cas. Ejemplos no limitantes de proteínas Cas incluyen Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocidas como Csn1 y Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, sus homólogos o versiones modificadas de estos. Estas enzimas son conocidas; por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína Cas9 de *S. pyogenes* puede encontrarse en la base de datos SWISSPROT® con el número de acceso Q99ZW2.

[0298] La enzima CRISPR puede ser Cas9 (p. ej. de *S. pyogenes* o *S. pneumoniae*). La enzima CRISPR puede dirigir la escisión de una o ambas cadenas en la ubicación de una secuencia objetivo, como por ejemplo dentro de la secuencia objetivo y/o dentro del complemento de la secuencia objetivo. El vector puede

codificar una enzima CRISPR que está mutada con respecto a una enzima correspondiente de tipo salvaje, de tal manera que la enzima CRISPR mutada carece de la capacidad de escindir una o ambas hebras de un polinucleótido objetivo que contiene una secuencia objetivo. Por ejemplo, una sustitución de aspartato por alanina (D10A) en el dominio catalítico RuvC I de Cas9 de *S. pyogenes* convierte a Cas9 de una nucleasa que corta ambas hebras a una nicasa (corta una sola hebra). En algunos aspectos, se puede utilizar una nicasa Cas9 en combinación con secuencia(s) guía, p. ej., dos secuencias guía, que se dirigen respectivamente a las cadenas sentido y anti sentido del DNA objetivo. Esta combinación permite cortar ambas hebras y utilizarlas para inducir NHEJ o HDR.

[0299] En algunas aspectos, la secuencia codificante que codifica la enzima CRISPR es un codón optimizado por expresión en células particulares, tales como las células eucariotas. Las células eucariotas pueden ser las de un organismo particular o derivadas de él, como las de un mamífero, que incluye sin limitarse a humanos, ratones, ratas, conejos, perros o primates no humanos. En general, la optimización de codones se refiere a un proceso de modificación de una secuencia de ácidos nucleicos para la expresión mejorada en las células hospedadoras de interés mediante la sustitución de al menos un codón de la secuencia nativa con codones que se utilizan con mayor frecuencia o más frecuentemente en los genes de esa célula hospedadora, manteniendo la secuencia de aminoácidos nativa. Varias especies muestran un sesgo particular para determinados codones de un aminoácido en particular. La preferencia codónica (las diferencias en el uso de codones entre organismos) a menudo se correlaciona con la eficiencia de la traducción del RNA mensajero (mRNA), que a su vez se cree que depende, entre otras cosas, de las propiedades de los codones que se traducen y de la disponibilidad de determinadas moléculas de RNA de transferencia (tRNA). El predominio de determinados tRNA en una célula puede ser, generalmente reflejo de los codones utilizados con más frecuencia en la síntesis de péptidos. En consecuencia, los genes se pueden adaptar para una

expresión genética óptima en un organismo determinado según la optimización de codones.

[0300] En general, una secuencia guía es cualquier secuencia polinucleotídica que tiene suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica objetivo para hibridarse con la secuencia objetivo y dirigir la unión específica de la secuencia del complejo CRISPR a la secuencia objetivo. En algunos aspectos, el grado de complementariedad entre una secuencia guía y su correspondiente secuencia objetivo, cuando se alinea de forma óptima utilizando un algoritmo de alineación adecuado, es de aproximadamente o más del 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o más.

[0301] Puede determinarse el alineamiento óptimo con el uso de cualquier algoritmo adecuado para alinear secuencias, ejemplos no limitados de los que se incluyen, el algoritmo de Smith-Waterman, el algoritmo de Needleman-Wunsch, los algoritmos basados en la Burrows-Wheeler Transform (ej., el Burrows Wheeler Aligner), Clustal W, Clustal X, BLAT, Novoalign (Tecnologías Novocraft), ELAND (ILLUMINA®, San Diego, Calif.), SOAP (disponible en soap.genomics.org.cn), y Maq (disponible en maq.sourceforge.net).

[0302] La enzima CRISPR puede formar parte de una proteína de fusión que comprende uno o más dominios proteicos heterólogos. Una proteína de fusión enzimática CRISPR puede comprender cualquier secuencia proteica adicional y, opcionalmente, una secuencia de enlace entre dos dominios cualesquiera. Los ejemplos de dominios proteicos que pueden fusionarse a una enzima CRISPR incluyen, sin limitación, etiquetas epitópicas, secuencias de genes informadores y dominios proteicos que tienen una o más de las siguientes actividades: actividad de metilasa, actividad de desmetilasa, actividad de activación de la transcripción, actividad de represión de la transcripción, actividad de factor de liberación de la transcripción, actividad de modificación de histonas, actividad de escisión de RNA y actividad de unión de ácidos nucleicos. Los ejemplos no limitantes de etiquetas epitópicas incluyen etiquetas de histidina (His), etiquetas V5, etiquetas FLAG, etiquetas de hemaglutinina de la gripe (HA), etiquetas Myc,

etiquetas VSV-G y etiquetas de tiorredoxina (Trx). Los ejemplos de genes informadores son, entre otros, la glutatión-5-transferasa (GST), la peroxidasa de rábano picante (HRP), la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), la beta galactosidasa, la beta-glucuronidasa luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), HcRed, DsRed, proteína cian fluorescente (CFP), proteína amarilla fluorescente (YFP) y proteínas autofluorescentes, incluida la proteína azul fluorescente (BFP). Una enzima CRISPR puede fusionarse a una secuencia genética que codifica una proteína o un fragmento de una proteína que se une a moléculas de DNA o que se une a otras moléculas celulares, que incluye, entre otras, la proteína de unión a la maltosa (MBP), la etiqueta S, las fusiones del dominio de unión al DNA (DBD) Lex A, las fusiones del dominio de unión al DNA GAL4A y las fusiones de la proteína BP16 del virus del herpes simple (VHS). Los dominios adicionales que pueden formar parte de una proteína de fusión que comprende una enzima CRISPR se describen en el documento de EE.UU 20110059502, incluido en el presente documento como referencia.

d. Vectores

[0303] Los polinucleótidos, proteínas, ribonucleoproteínas o péptidos terapéuticos pueden estar codificados por una molécula de ácido nucleico en la composición. En ciertos aspectos, la molécula de ácido nucleico puede estar en forma de vector de ácido nucleico.

[0304] El término "vector" se utiliza para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que puede insertarse una secuencia de ácido nucleico heteróloga para introducirla en una célula en la que puede replicarse y expresarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "heteróloga", lo que significa que se encuentra en un contexto ajeno a la célula en la que se está introduciendo el vector o al ácido nucleico en el que se incorpora, lo que incluye una secuencia homóloga a una secuencia de la célula o del ácido nucleico, pero en una posición dentro de la célula o del ácido nucleico huésped donde normalmente no se encuentra. Los vectores incluyen DNA, RNA, plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas

artificiales (ej., YAC). Un experto en la materia estará bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001; Ausubel *et al.*, 1996, ambos incluidos en el presente documento como referencia).

[0305] El término "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una parte de un producto génico capaz de ser transcrito o integrado de forma estable en el genoma de una célula huésped y ser transcrito posteriormente. En algunos casos, las moléculas de ácidos nucleicos se traducen luego en una proteína, polipéptido o péptido. Para expresar los polinucleótidos, las proteínas, las ribonucleoproteínas o los péptidos, el DNA que codifica los polinucleótidos, las proteínas, las ribonucleoproteínas o los péptidos se insertan en vectores de expresión de tal manera que la zona del gen esté vinculada operativamente a "secuencias de control" transcripcional y traslacional. Los vectores de expresión pueden contener una o más de una serie de "secuencias de control," que se refieren a secuencias ácido nucleicas necesarias para la transcripción y posiblemente para la traducción de una secuencia de codificación unida operativamente en un organismo hospedador determinado. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que desempeñen además otras funciones y se describen más abajo.

[0306] Normalmente, los vectores de expresión utilizados en cualquiera de las células huésped contienen secuencias para el mantenimiento de plásmidos o virus y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenos. Dichas secuencias, denominadas en su conjunto "secuencias de flaqueo", suelen incluir una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos vinculadas operativamente: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia completa de intrones que contiene un sitio de empalme donante y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción del polipéptido, un

sitio de unión a ribosomas, una secuencia de poliadenilación, una región polilinker para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento marcador de selección. Dichas secuencias y métodos de utilización de lo mismo se conocen en la técnica.

[0307] Un “promotor” es una secuencia de control. Un "promotor" es normalmente una región de una secuencia de ácido nucleico en la cual se controlan la iniciación y el ritmo de transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que se pueden unir proteínas y moléculas reguladoras, tales como la RNA polimerasa y otros factores de transcripción. Las frases "posicionado operativamente", "vinculado operativamente", "bajo control" y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una ubicación y/o orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar la iniciación transcripcional y la expresión de dicha secuencia. Un promotor puede o no utilizarse junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción cis que participa en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

[0308] El promotor particular que se emplea para controlar la expresión de un polinucleótido codificador de péptidos o proteínas no se considera que sea crítico, siempre que sea capaz de expresar el polinucleótido en una célula objetivo, preferentemente una célula bacteriana. Cuando el objetivo es una célula humana, es preferible situar la región codificante del polinucleótido adyacente y bajo el control de un promotor que sea capaz de expresarse en una célula humana. En general, dicho promotor podría incluir un promotor bacteria, humano o viral.

[0309] Una señal de iniciación específica también puede ser necesaria para la traducción eficaz de las secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Se pueden proporcionar señales de control de traducción exógenas incluido el codón de iniciación ATG. Alguien con conocimientos en la materia podría determinar esto fácilmente y proporcionar las señales necesarias.

[0310] Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene muchos sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales se puede usar junto con tecnología convencional para digerir el vector. (Véase Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, and Cocea, 1997, incluidos en el presente documento como referencia).

[0311] La mayoría de las moléculas de RNA eucariotas transcritas se someterán a un empalme de RNA para eliminar los intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias genómicas eucariotas pueden requerir sitios de empalme donantes y/o aceptores para garantizar el procesamiento adecuado del transcrito para la expresión de proteínas. (Véase Chandler *et al.*, 1997, incluido en el presente documento como referencia).

[0312] Los vectores y o construcciones se componen generalmente al menos de una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" se compone de las secuencias de DNA implicadas en la terminación específica de un transcrito de RNA por una RNA polimerasa. Por lo tanto, en ciertos aspectos, se contempla una señal de terminación que termina la producción de un transcrito de RNA. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para alcanzar los niveles de mensaje deseables. En los sistemas eucariotas, la región del terminador también puede incluir secuencias de DNA específicas que permiten la escisión del nuevo transcrito para exponer un sitio de poliadenilación. Esto indica a una polimerasa endógena especializada que agrega un tramo de unos 200 residuos A (poliA) al extremo 3' del transcrito. Las moléculas de RNA modificadas con esta cola de poliA parecen ser más estables y se traducen con mayor eficacia. Por lo tanto, en otros aspectos que implican a las eucariotas, se prefiere que el terminador comprenda una señal para la escisión del RNA, y se prefiere más que la señal del terminador promueva la poliadenilación del mensaje. La expresión de un gen, especialmente en la expresión de un gen eucariota, se suele incluir una señal de poliadenilación para realizar la poliadenilación adecuada del transcripto.

[0313] Para propagar un vector en una célula huésped, el vector también puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (a menudo denominados "ori"), que es una secuencia específica de ácido nucleico en la que se inicia la replicación. Alternativamente, puede emplearse una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula huésped es la levadura.

[0314] Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que permiten que el vector se replique y/o se exprese tanto en células procariotas como eucariotas. Un experto en la materia comprenderá además las condiciones en las que se deben incubar todas las células huésped descritas anteriormente para mantenerlas y permitir la replicación de un vector. También se entienden y se conocen las técnicas y condiciones que permitirán la producción a gran escala de vectores, así como la producción de los ácidos nucleicos codificados por los vectores y sus polipéptidos, proteínas o péptidos afines.

[0315] La concentración del vector durante el procedimiento de electroporación puede ser la concentración final del vector en la cámara de electroporación y/o envase de la muestra. La concentración del vector puede ser, puede ser al menos, o puede ser a lo sumo 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 a aproximadamente 350, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 $\mu\text{g/mL}$, o cualquier valor de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ a 5000 $\mu\text{g/mL}$ o intervalo derivable de estos. En determinados aspectos, la concentración del vector es al menos 10 $\mu\text{g/mL}$. En aspectos adicionales, la concentración del vector es al menos, a lo sumo o exactamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 $\mu\text{g/mL}$ o cualquier valor de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 300 $\mu\text{g/mL}$ o intervalo derivable de estos.

[0316] Se contempla que los vectores de expresión que expresan algún marcador pueden ser útiles en la divulgación. En otros aspectos, el marcador está codificado en un mRNA y no en un vector de expresión.

[0317] En determinados aspectos específicos, la composición transfectada en el vehículo de suministro mediante electroporación es no viral (*es decir*, no contiene ningún componente vírico). Se contempla que los métodos no víricos puedan reducir la toxicidad y/o mejorar la seguridad del método.

e. Marcadores

[0318] En determinados aspectos, células, partículas celulares, vesículas lipídicas, liposomas, tejidos o derivados de estos que han sido transfectadas con una composición de la presente divulgación pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* al incluir un marcador en la composición. Dichos marcadores confieren un cambio identificable a la célula, lo que permite una identificación sencilla de las células que han sido transfectadas con la composición.

[0319] En general, un marcador de selección es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positivo es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador de selección negativo es el que su presencia evita su selección. En determinados aspectos, después de la electroporación, los vehículos de suministro que han internalizado las composiciones electroporadas son seleccionados mediante la selección negativa. En otros aspectos, después de la electroporación, las células que han internalizado los constructos electroporados son seleccionados mediante la selección positiva.

[0320] Un ejemplo de un marcador de selección positivo es un marcador de resistencia al fármaco o un gen/marcador de resistencia al antibiótico. Generalmente, la inclusión de un marcador de selección de fármaco colabora con la clonación e identificación de los transformados, por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina, G418, fleomicina, blasticidina e histidinol son marcadores de selección útiles.

[0321] En algunos aspectos, la selección implica exponer las células a concentraciones de un agente de selección que comprometerá la viabilidad de una célula que no expresa el gen de resistencia de la selección o absorberá el

gen de resistencia de la selección durante la electroporación. En algunos aspectos, la selección implica exponer las células a una concentración condicionalmente letal del agente de selección. En determinados aspectos, el agente o compuesto de selección es un antibiótico. En otros aspectos, el agente de selección es G418 (también conocido como geneticina y sulfato de G418), puromicina, zeocina, higromicina, fleomicina o blasticidina, ya sea solos o en combinación. En determinados aspectos, la concentración del agente de selección puede ser, puede ser al menos o puede ser a lo sumo 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 o 500 µg/L, mg/L o g/L o cualquier intervalo o valor derivable de estos. En determinados aspectos, la concentración del agente de selección está en el intervalo de 0,1 µg/L a 0,5 µg/L, 0,5 µg/L a 1 µg/L, 1 µg/L a 2 µg/L, 2 µg/L a 5 µg/L, 5 µg/L a 10 µg/L, 10 µg/L a 100 µg/L, 100 µg/L a 500 µg/L, 0,1 mg/L a 0,5 mg/L, 0,5 mg/L a 1 mg/L, 1 mg/L a 2 mg/L, 2 mg/L a 5 mg/L, 5 mg/L a 10 mg/L, 10 mg/L a 100 mg/L, 100 mg/L a 500 mg/L, 0,1 g/L a 0,5 g/L, 0,5 g/L a 1 g/L, 1 g/L a 2 g/L, 2 g/L a 5 g/L, 5 g/L a 10 g/L, 10 g/L a 100 g/L o 100 g/L a 500 g/L o cualquier valor de 0,1 µg/L a 500 g/L o intervalo derivable de estos. En determinados aspectos, la concentración del agente de selección es (y)g/L, donde 'y' puede ser cualquier valor que incluye, a mero título enunciativo, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04,

0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o cualquier valor de 0,01 a 100 o intervalo derivable de estos. En algunos aspectos, el agente de selección está presente en el medio del cultivo en una concentración condicionalmente letal de al menos, a lo sumo o aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 o 10 g/L o cualquier valor de 0,1 a g/L a 10 g/L o intervalo derivable de estos.

[0322] Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformadores según la implementación de las condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores incluidos los marcadores detectables, tal como GFP. En determinados aspectos, el marcador es un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un marcador luminiscente, un marcador fotoactivable, un marcador fotoconvertible o un marcador colorimétrico. Los marcadores fluorescentes incluyen, por ejemplo, GFP y variantes tales como YFP, RFP *etc.* y otras proteínas fluorescentes tales como DsRed, mPlum, mCherry, YPet, Emerald, CyPet, T-Sapphire y Venus. Los marcadores fotoactivables incluyen, por ejemplo, KFP, PA-mRFP y Dronpa. Los marcadores fotoconvertibles incluyen, por ejemplo, mEosFP, KikGR y PS-CFP2. Las proteínas luminiscentes incluyen, por ejemplo, Neptune, FP595 y fialidina. De manera alternativa, se pueden utilizar enzimas detectables, tales como la timidina cinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la técnica también sabrá como emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con el análisis de FACS. Un experto en la técnica conoce más ejemplos de marcadores de selección y detección.

[0323] El marcador usado puede codificarse en un RNA o DNA. En algunos aspectos, el marcador es codificado en RNA.

IV. Ejemplos

[0324] Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar aspectos preferidos de la divulgación. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para que funcionen bien en la práctica de la divulgación y, por lo tanto, puedan considerarse para constituir modos preferidos para esta práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben, en vistas de la presente divulgación, apreciar que muchos cambios pueden hacerse en los aspectos específicos que se divulgan y aun así obtener un resultado similar sin desviarse del espíritu y alcance de la divulgación.

A. Ejemplo 1: Electroporación repetida de células T expandidas con mRNA

[0325] La **Figura 35** ilustra un diseño experimental para la electroporación secuencial de linfocitos expandidos con dos concentraciones diferentes de mRNA de GFP (100 µg/mL y 200 µg/mL). El Día 0, después de haber sido expandido durante 3 días con perlas CD3/CD28, 5×10^7 células T/mL se suspendieron en tampón de electroporación (EP). Se llevó a cabo la electroporación +/- mRNA de proteína fluorescente verde (GFP) y se colocaron en placas las células. El Día 1 o Día 2, las células que expresan GFP se volvieron a suspender en el tampón EP y se electroporaron una segunda vez con GFP y se colocaron en placas las células. La viabilidad celular se midió *a través de* Nucleocounter los días 1 a 5 y se analizó la expresión de GFP *a través de* citometría de flujo los días 3 y 4.

[0326] La **Figura 36** muestra los datos de citometría de flujo de los Días 3 y 4 después de la electroporación secuencial de las células linfocitos expandidas con mRNA de GFP. Todas las células transfectadas con mRNA fueron >95% de GFP+.

[0327] Las **Figuras 37A y 37B** muestran la selección de linfocitos y la viabilidad celular de linfocitos sometidos a electroporación secuencial. La electroporación secuencial con o sin mRNA los días consecutivos produjeron un impacto mínimo en el ajuste de la célula según lo evaluado por el porcentaje de linfocitos y

exclusión de tinte. El aumento de la brecha entre los pulsos EP a 48 horas (electroporación secuencial de Día 0 y Día 2) provocó un ajuste de célula levemente más bajo en comparación con un EP único o un EP secuencial el Día 0 y Día 1.

[0328] La Figura 38A muestra la expresión de GFP mediante linfocitos secuencialmente electroporados y la **Figura 38B** muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de GFP para linfocitos secuencialmente electroporados. El EP secuencial de mRNA aumentó significativamente la concentración y duración de la expresión del transgén en comparación con un EP único.

B. Ejemplo 2: Electroporación repetida de células T expandidas con mRNA, efecto de energía de electroporación

[0329] Para los experimentos descritos en el presente documento, el término "energía" se refiere al calor producido durante un pulso eléctrico (o pulsos combinados) aplicado a una muestra y es proporcional a la concentración del campo y la duración del pulso (o duración del pulso combinado) aplicada a la muestra durante el pulso eléctrico (o pulsos combinados). Por lo tanto, para aplicar un pulso de "alta energía" a una muestra, las proporciones de las variables, incluida la intensidad del campo y la duración del pulso (o la duración del pulso combinado) se modifican de manera que se produzca una mayor cantidad de calor durante el pulso eléctrico (o pulsos combinados) en comparación con cuando se aplica a la muestra un pulso eléctrico de "energía media" o "energía baja" (o pulsos combinados), siempre que la composición del tampón, el ensamblaje de procesamiento y el volumen de la muestra se mantengan constantes. Por el contrario, para aplicar un pulso de "baja energía" a una muestra, las proporciones de las variables, incluida la intensidad del campo y la duración del pulso (o la duración del pulso combinado) se modifican de modo que se produzca una menor cantidad de calor durante el pulso eléctrico (o pulsos combinados) en comparación con cuando se aplica a la muestra un pulso eléctrico de "energía alta" o "energía media" (o pulsos combinados), siempre que

la composición del tampón, el ensamblaje de procesamiento y el volumen de la muestra se mantengan constantes.

[0330] Las Figuras 39A a 39E ilustran un diseño experimental para la electroporación secuencial de linfocitos expandidos en diferentes energías de EP con dos concentraciones diferentes de mRNA de GFP (100 µg/mL y 200 µg/mL). En la **Figura 39A**, los linfocitos se sometieron a un primer pulso eléctrico de energía media el día 0, seguido de un segundo pulso eléctrico de energía baja el día 1. El primer pulso eléctrico de energía media el día 0 usó una concentración de campo inicial de 1,5 kV/cm y el segundo pulso eléctrico de energía baja el día 1 usó una concentración de campo inicial de 1,3 kV/cm. En la **Figura 39B**, los linfocitos se sometieron a un primer pulso eléctrico de energía media el día 0, seguido de un segundo pulso eléctrico de energía alta el día 1. El primer pulso eléctrico de energía media el día 0 usó una concentración de campo inicial de 1,5 kV/cm y el segundo pulso eléctrico de energía alta el día 1 usó una concentración de campo inicial de 1,88 kV/cm. En la **Figura 39C**, los linfocitos se sometieron a un primer pulso eléctrico de energía media el día 0, seguido de un segundo pulso eléctrico de energía media el día 1. El primer pulso eléctrico de energía media el día 0 usó una concentración de campo inicial de 1,5 kV/cm y el segundo pulso eléctrico de energía media el día 1 usó una concentración de campo inicial de 1,5 kV/cm. En la **Figura 39D**, los linfocitos se sometieron a un primer pulso eléctrico de energía alta el día 0, seguido de un segundo pulso eléctrico de energía baja el día 1. El primer pulso eléctrico de energía alta el día 0 usó una concentración de campo inicial de 1,88 kV/cm y el segundo pulso eléctrico de energía baja el día 1 usó una concentración de campo inicial de 1,3 kV/cm. En la **Figura 39E**, los linfocitos se sometieron a un primer pulso eléctrico de energía alta el día 0, seguido de un segundo pulso eléctrico de energía media el día 1. El primer pulso eléctrico de energía alta el día 0 usó una concentración de campo inicial de 1,88 kV/cm y el segundo pulso eléctrico de energía media el día 1 usó una concentración de campo inicial de 1,5 kV/cm.

[0331] Las Figuras 40A y 40B muestran poblaciones de linfocitos que expresan mRNA de GFP en tres puntos temporales diferentes (24 h, 48 h y 72 h) después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos en diferentes energías de EP con dos concentraciones diferentes de mRNA de GFP (100 µg/mL y 200 µg/mL).

[0332] Las poblaciones de linfocitos de células sometidas a un primer pulso eléctrico de energía media se muestran en la **Figura 40A** (Ex-célula T 2). Los linfocitos se sometieron a un primer pulso eléctrico de energía media y un segundo pulso eléctrico de energía baja (**Figura 40A**, Ex-célula T 1) según se describe para y se ilustra por la **Figura 39A**; un primer pulso eléctrico de energía media y un segundo pulso eléctrico de energía alta (**Figura 40A**, Ex-célula T 3) según se describe para y se ilustra por la **Figura 39B**; y un primer pulso eléctrico de energía media y un segundo pulso eléctrico de energía media (**Figura 40A**, Ex-célula T 2) según se describe para y se ilustra por la **Figura 39C**.

[0333] Las poblaciones de linfocitos de células sometidas a un primer pulso eléctrico de energía alta se muestran en la **Figura 40B** (Ex-célula T 3). Los linfocitos se sometieron a un primer pulso eléctrico de energía alta y un segundo pulso eléctrico de energía baja (**Figura 40B**, Ex-célula T 1) según se describe para y se ilustra por la **Figura 39D**; y un primer pulso eléctrico de energía alta y un segundo pulso eléctrico de energía media (**Figura 40B**, Ex-célula T 2) según se describe para y se ilustra por la **Figura 39E**.

[0334] Si se comparan los datos de la población de linfocitos después de que se sometieron las células a un primer pulso eléctrico de energía media o a un primer pulso eléctrico de energía alta y un segundo pulso eléctrico de energía baja, media o alto, la recuperación del linfocito fue comparable después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos en diferentes energías de EP para las cinco combinaciones de energía descritas para e ilustradas por las **Figuras 39A-39E**.

[0335] Las **Figuras 41A y 41B** muestran que la viabilidad del linfocito fue comparable después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos

en diferentes energías de EP para las cinco combinaciones de energía de EP descritas para e ilustradas por las **Figuras 39A-39E**.

[0336] Las **Figuras 42A y 42B** muestran la expresión de GFP mediante linfocitos en tres puntos temporales diferentes (24 h, 48 h y 72 h) después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos en diferentes energías de EP con dos concentraciones diferentes de mRNA de GFP (100 µg/mL y 200 µg/mL).

[0337] La expresión de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía media se muestran en la **Figura 42A** (Ex-célula T 2). La **Figura 42A** proporciona la expresión de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía media y un segundo pulso eléctrico de energía baja (Ex-célula T 1) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39A**. La **Figura 42A** proporciona la expresión de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía media y un segundo pulso eléctrico de energía alta (Ex-célula T 3) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39B**. Finalmente, la **Figura 42A** proporciona la expresión de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía media y un segundo pulso eléctrico de energía media (Ex-célula T 2) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39C**.

[0338] La expresión de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía alta se muestran en la **Figura 42B** (Ex-célula T 3). La **Figura 42B** proporciona la expresión de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía alta y un segundo pulso eléctrico de energía baja (Ex-célula T 1) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39D**. La **Figura 42B** también proporciona la expresión de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía alta y un segundo pulso eléctrico de energía media (Ex-célula T 2) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39E**.

[0339] Si se compara la expresión de GFP mediante linfocitos después de que se sometieron las células a un primer pulso eléctrico de energía media o a un primer pulso eléctrico de energía alta y un segundo pulso eléctrico de energía

baja, media o alto, la expresión de GFP fue comparable después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos en diferentes energías de EP para las cinco combinaciones de energía de EP descritas para e ilustradas por las **Figuras 39A-39E**.

[0340] Las **Figuras 43A y 43B** muestran la intensidad de fluorescencia media (MFI) de GFP para los linfocitos en tres puntos temporales diferentes (24 h, 48 h y 72 h) después de la electroporación secuencial de linfocitos expandidos en diferentes energías de EP con dos concentraciones diferentes de mRNA de GFP (100 µg/mL y 200 µg/mL).

[0341] La MFI de GFP para los linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía media se muestran en la **Figura 43A** (Ex-célula T 2). La **Figura 43A** proporciona la MFI de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía media y un segundo pulso eléctrico de energía baja (Ex-célula T 1) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39A**. La **Figura 43A** también proporciona la MFI de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía media y un segundo pulso eléctrico de energía alta (Ex-célula T 3) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39B**. Finalmente, la **Figura 43A** proporciona la MFI de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía media y un segundo pulso eléctrico de energía media (Ex-célula T 2) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39C**.

[0342] La MFI de GFP para los linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía alta se muestran en la **Figura 43B** (Ex-célula T 3). La **Figura 43B** proporciona la MFI de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía alta y un segundo pulso eléctrico de energía baja (Ex-célula T 1) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39D**. La **Figura 43B** también proporciona la MFI de GFP mediante linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía alta y un segundo pulso eléctrico de energía media (Ex-célula T 2) según lo descrito para e ilustrado por la **Figura 39E**. Se observó una MFI más alta con linfocitos sometidos a un primer pulso eléctrico de energía alta.

[0343] Estos datos demuestran que la electroporación repetida de células con mRNA los días secuenciales conduce a una expresión del transgén significativamente más alta en comparación con una electroporación única. Las células T activadas pueden electroporarse secuencialmente usando las permutaciones de pulso eléctrico de energía descritas debido a que no hay diferencias importantes entre las poblaciones de linfocitos, la viabilidad celular y expresión de GFP para las varias permutaciones de pulso eléctrico de energía.

C. Ejemplo 3: Electroporación repetida y edición génica serial de las células T activadas

[0344] La **Figura 44** ilustra un diseño experimental para la electroporación secuencial de células T activadas con dos diferentes constructos de ribonucleoproteína (RNP) para desactivar TRAC y PD1. Como se muestra en las **Figuras 44A y 44B**, PBMC se descongelaron y las células T se activaron el día 0 mediante el cultivo de 2×10^6 /mL células durante dos días con 100 IU/mL de IL2, 10 ng/mL de IL-7 y 5 ng/mL de IL-15, y también perlas magnéticas conjugadas por anti-CD3/CD28 en una proporción de 1:2,5 células/perlas. La **Figura 45** muestra la activación de T-células según lo medido por la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para células T teñidas con CD3⁺- y CD25⁺ después de la incubación con citocinas y perlas de CD3/CD28 durante 2 días.

[0345] Después de la activación durante dos días, el Día 2, se lavaron 1×10^8 células T/mL, se suspendieron en tampón de electroporación por un volumen de reacción total de 50 μ L (5×10^6 células) y se electroporaron con 2 μ M de ribonucleoproteína (RNP) de TRAC de una existencia de 30,5 μ M de RNP de TRAC que comprende 1:2 de Cas9:sgRNA preparado al mezclar 61 μ M de Cas9 de tipo natural (GENSCRIPT®) con 122 μ M de sgRNA de TRAC (SYNTHEGO®). La primera electroporación de energía alta el día 2 usó un pulso eléctrico con una concentración de campo inicial de 1,7 kV/cm (protocolo de célula T 3). Después de la electroporación para la inactivación de TRAC, se recuperaron las células T durante 20 minutos a 37 °C, 5% de CO₂. Luego, se

cultivaron 2×10^6 de células T/mL electroporadas durante 24 horas, y después se añadió 100 IU/mL de IL2, 10 ng/mL de IL-7 y 5 ng/mL de IL-15. También se evaluó una condición de no reposo en la que después de la electroporación para la inactivación de TRAC, las células no se sometieron a reposo durante 20 minutos a 37 °C, 5% de CO₂ y en su lugar se transfirieron inmediatamente para el cultivo durante 24 horas.

[0346] El Día 3, se lavaron 4×10^7 células T/mL, se suspendieron en tampón de electroporación por un volumen de reacción total de 50 µL (2×10^6 células) y se electroporaron con 2 µM de ribonucleoproteína (RNP) de PD1 de una existencia de 30,5 µM de RNP de PD1 que comprende 1:2 de Cas9:sgRNA preparado al mezclar 61 µM de Cas9 de tipo natural (GENSCRIPT®) con 122 µM de sgRNA de PD1 (SYNTHOGO®). La segunda electroporación de energía media el día 3 usó un pulso eléctrico con una concentración de campo inicial de 1,5 kV/cm (protocolo de célula T 2). Después de la electroporación para la inactivación de PD1, se recuperaron las células T durante 20 minutos a 37 °C, 5% de CO₂. Luego, se cultivaron 2×10^6 de células T/mL electroporadas durante 24 horas, y después se añadió 100 IU/mL de IL2, 10 ng/mL de IL-7 y 5 ng/mL de IL-15, y las células se volvieron a estimular con perlas de CD3/CD28 en una proporción de 1:2,5 células/perlas.

[0347] Los controles experimentales incluyeron células T que fueron activadas pero no fueron sometidas a electroporación y las células T activadas que se sometieron a una primera electroporación de energía alta sin RNP u otro agente el día 2 usando un pulso eléctrico con una concentración de campo inicial de 1,7 kV/cm (protocolo de célula T 3).

[0348] El día 6, cuatro días después de la electroporación para la inactivación de TRAC y tres días después de la electroporación para la inactivación de PD1, se añadió 100 IU/mL de IL2, 10 ng/mL de IL-7 y 5 ng/mL de IL-15 y se llevó a cabo FACS para evaluar la eficacia de inactivación de TRAC y PD1 en 30000 eventos recopilados. **La Figura 46A** muestra la selección representativa para células T no teñidas. **La Figura 46B** muestra la selección representativa para las células T

de TRAC+ y PD1+ para experimentos en los que las células T no se electroporaron con RNP para la inactivación de TRAC y PD1. La **Figura 46C** muestra la selección representativa para las células T de TRAC+ y PD1+ para experimentos en los que las células T se electroporaron con RNP para la inactivación de TRAC y PD1. Los datos de FACS obtenidos el día 6 para cada una de las condiciones de electroporación descritas en la **Figura 44** fueron cuantificados para mostrar la población de células T frente a la viabilidad de la célula T en la **Figura 46D** y eficiencia de la inactivación de TRAC y PD1 en la **Figura 46E**. Como se muestra en la **Figura 46D**, la viabilidad de la célula T es mínimamente afectada por la electroporación secuencial a las células de edición serial, ya que la viabilidad celular después del primer y segundo evento de electroporación fue similar al control en el que no se realizó electroporación. Como se muestra en la **Figura 46E**, la electroporación secuencial de dos diferentes RNP puede generar una alta eficiencia de inactivación para los locus de TRAC y PD1, con una disminución de la expresión de ambos TRAC y PD1 a menos del 5% después de la electroporación de RNP. Además, como se muestra en la **Figura 46F**, permitir que las células T electroporadas con RNP de TRAC reposaran durante 20 minutos a 37 °C, 5% de CO₂ después de la electroporación antes del cultivo durante 24 horas no aumentó la eficiencia de inactivación de TRAC en comparación con las células T electroporadas con RNP de TRAC que no se sometieron a reposo durante 20 minutos a 37 °C, 5% de CO₂ después de la electroporación, sino que se transfirieron inmediatamente para el cultivo durante 24 horas.

[0349] La FACS también se realizó el día 6 para medir los recuentos totales de células y linfocitos de 30 µL de células cultivadas para evaluar los efectos de un periodo de descanso de célula durante 20 minutos a 37 °C, 5% de CO₂ en la viabilidad celular después de la electroporación con un constructo de RNP para inactivar TRAC. La selección para las células T no teñidas y teñidas vivas/muertas de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) se muestra en la **Figura 47A**. Como se muestra en las **Figuras 47B-47E**, la población de linfocitos (**Figura**

47B), la viabilidad de linfocitos (**Figura 47C**), recuento celular total (**Figura 47D**) y recuento total de linfocitos viables (**Figura 47E**) también fueron afectados mínimamente, donde la condición de no reposo tuvo ~5% menos de recuento de linfocitos vivos en comparación con las células T el reposo durante 20 minutos a 37 °C, 5% de CO₂ después de la electroporación.

* * *

[0350] La memoria y los ejemplos anteriores proporcionan una descripción completa de la estructura y el uso de aspectos ilustrativos. Aunque se han descrito determinados aspectos anteriormente con un determinado grado de particularidad o con referencia a uno o más de aspectos individuales, los expertos en la técnica pueden hacer varias alteraciones a los aspectos divulgados sin desviarse del alcance de esta invención. Como tal, los varios aspectos ilustrativos de los métodos y sistemas no tienen previsto estar limitados a las formas particulares divulgadas. En su lugar, incluyen todas las modificaciones y alternativas que se categorizan dentro del alcance de las reivindicaciones y los aspectos que no son los que se muestran pueden incluir algunas o todas las características del aspecto representado. Por ejemplo, pueden omitirse o combinarse los elementos como una estructura unitaria y/o pueden sustituirse las conexiones. Además, cuando corresponda, los aspectos de uno cualquiera de los ejemplos descritos arriba pueden combinarse con aspectos de uno cualquiera de los otros ejemplos descritos para formar ejemplos adicionales que tienen propiedades y/o funciones comparables o diferentes, y abordar los mismos problemas o problemas diferentes. De manera similar, se comprenderá que los beneficios y las ventajas descritos anteriormente pueden referirse a un aspecto o pueden referirse a varios aspectos.

[0351] Las reivindicaciones no tienen previsto incluir y no deben interpretarse como que incluyen limitaciones de medios más función o limitaciones de paso más función, a menos que dicha limitación se liste explícitamente en una reivindicación determinada usando las frases “medios para” o “paso para”, respectivamente.