

LO QUE SE REIVINDICA:

1. Un método de electroporación CARACTERIZADO PORQUE 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 primera duración de pulso suficientes para cargar las células, las partículas celulares o las vesículas lipídicas 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 suficientes para cargar las células, las partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según un segundo;
donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración de campo son distintas de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración de pulso.
2. Un método de electroporación CARACTERIZADO PORQUE 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 primera duración de pulso suficientes para cargar las células, las partículas celulares o las vesículas lipídicas con un primer agente según un primer protocolo;
permitir que la célula 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 suficientes para cargar las células, las partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según un segundo.
3. Un método de electroporación CARACTERIZADO PORQUE 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 primera duración de pulso suficientes para cargar las células, las partículas celulares o las vesículas lipídicas con un primer agente según un primer protocolo;

permitir que la célula 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 suficientes para cargar las células, las partículas celulares o vesículas lipídicas con un segundo agente según un segundo;

donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración de campo son distintas de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración de pulso.

4. Un método de genes de célula de edición serial CARACTERIZADO PORQUE comprende:

someter una muestra que comprende una o más de células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera concentración de campo y una primera duración de pulso suficiente 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 concentración de campo y una segunda duración de 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 de campo son distintas de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración de pulso.

5. Un método de genes de célula de edición serial CARACTERIZADO PORQUE comprende:

someter una muestra que comprende una o más de células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera concentración de campo y una primera duración de pulso suficiente para cargar las células con un primer agente según un primer protocolo;

permitir que la célula se recupere durante al menos 24 horas; y

someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda concentración de campo y una segunda duración de pulso suficiente para cargar las células con un segundo agente según un segundo protocolo.

6. Un método de genes de célula de edición serial CARACTERIZADO PORQUE comprende:

someter una muestra que comprende una o más de células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera concentración de campo y una primera duración de pulso suficiente para cargar las células con un primer agente según un primer protocolo;

permitir que la célula se recupere durante al menos 24 horas; y

someter la muestra a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda concentración de campo y un segunda duración de 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 de campo son distintas de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración de pulso.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, CARACTERIZADO PORQUE el primer y segundo agente son el mismo agente.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, CARACTERIZADO PORQUE el primer y segundo agente son agentes diferentes.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, CARACTERIZADO PORQUE el primer y segundo agente son un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña.

10. El método de la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE el ácido nucleico es RNA y donde el RNA es mRNA, miRNA, shRNA, siRNA o un oligonucleótido antisentido.

11. El método de la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE el ácido nucleico es DNA y donde el DNA es un oligonucleótido antisentido, un vector o un DNA lineal de doble sentido.

12. El método de la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE la proteína es una ribonucleoproteína.

13. El método de la reivindicación 12, CARACTERIZADO PORQUE la ribonucleoproteína comprende una proteína Cas9 y un RNA guía.

14. Un método de electroporación CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) someter una muestra de célula que comprende una o más de células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera concentración de campo y una

primera duración de pulso suficiente para cargar células con un primer agente que comprende RNA según un primer protocolo;

(b) permitir que la muestra de la célula se recupere durante al menos 24 horas;
y

(c) someter la muestra de la célula a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda concentración de campo y un segunda duración de pulso suficiente para cargar células con un segundo agente que comprende RNA según un segundo protocolo;

donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración de campo son distintas de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración de pulso.

15. Un método de electroporación CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) someter una muestra de célula que comprende una o más de células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera concentración de campo y una primera duración de pulso suficiente para cargar células con un primer agente que comprende DNA según un primer protocolo;

(b) permitir que la muestra de la célula se recupere durante al menos 24 horas;
y

(c) someter la muestra de la célula a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda concentración de campo y un segunda duración de pulso suficiente para cargar células con un segundo agente que comprende DNA según un segundo protocolo;

donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración de campo son distintas de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración de pulso.

16. Un método de electroporación CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) someter una muestra de célula que comprende una o más de células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera concentración de campo y una primera duración de pulso suficiente para cargar células con un primer agente que comprende una o más de proteínas según un primer protocolo;

(b) permitir que la muestra de la célula se recupere durante al menos 24 horas;
y

(c) someter la muestra de la célula a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda concentración de campo y un segunda duración de pulso suficiente para cargar células con un segundo agente que comprende una o más de proteínas según un segundo protocolo;

donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración de campo son distintas de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración de pulso.

17. Un método de células de edición serial CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) someter una muestra de célula que comprende una o más de células intactas a un primer pulso eléctrico que tiene una primera concentración de campo y una primera duración de pulso suficiente para cargar células con un primer agente que comprende una ribonucleoproteína según un primer protocolo;

(b) permitir que la muestra de la célula se recupere durante al menos 24 horas;

y

(c) someter la muestra de la célula a un segundo pulso eléctrico que tiene una segunda concentración de campo y un segunda duración de pulso suficiente para cargar células con un segundo agente que comprende una ribonucleoproteína según un segundo protocolo;

donde la primera intensidad de campo y/o la primera duración de campo son distintas de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración de pulso.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, CARACTERIZADO PORQUE el primer y segundo agente son el mismo agente.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, CARACTERIZADO PORQUE el primer y segundo agente son agentes diferentes.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, CARACTERIZADO PORQUE el primer y segundo agente son un ácido nucleico, polipéptido, proteína o molécula pequeña.

21. El método de la reivindicación 20, CARACTERIZADO PORQUE el ácido nucleico es RNA y donde el RNA es mRNA, miRNA, shRNA, siRNA o un oligonucleótido antisentido.
22. El método de la reivindicación 20, CARACTERIZADO PORQUE el ácido nucleico es DNA y donde el DNA es un oligonucleótido antisentido, un vector o un DNA lineal de doble sentido.
23. El método de la reivindicación 20, CARACTERIZADO PORQUE la proteína es una ribonucleoproteína.
24. El método de la reivindicación 23, CARACTERIZADO PORQUE la ribonucleoproteína comprende una proteína Cas9 y un RNA guía.
25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, CARACTERIZADO PORQUE comprende, además, un paso de reposo después del primer y/o segundo pulso eléctrico.
26. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE el paso de reposo comprende la incubación de la muestra durante 10 a 30 minutos.
27. El método de la reivindicación 25 o la reivindicación 26, CARACTERIZADO PORQUE el paso de reposo comprende la incubación de la muestra de 25 °C a 50 °C.
28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 25-27, CARACTERIZADO PORQUE el paso de reposo comprende la incubación de la muestra de 3% a 8% de CO₂.
29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, CARACTERIZADO PORQUE la muestra no está sometida a un paso de reposo después del primer y/o segundo pulso eléctrico.
30. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es igual a la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más larga que la segunda duración de pulso.
31. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es igual a la

segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más corto que la segunda duración de pulso.

32. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es menos de la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es igual a la segunda duración de pulso.

33. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es mayor que la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es igual a la segunda duración de pulso.

34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es menos de la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más larga que la segunda duración de pulso.

35. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es mayor que la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso más larga que la segunda duración de pulso.

36. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es menos de la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más corto que la segunda duración de pulso.

37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es mayor que la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más corto que la segunda duración de pulso.

38. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo y primera duración de pulso produce una primera energía eléctrica total aplicada y la segunda concentración de campo y segunda duración de pulso produce una

segunda energía eléctrica total aplicada y donde la primera energía eléctrica total aplicada es diferente de la segunda energía eléctrica total aplicada.

39. El método de la reivindicación 38, CARACTERIZADO PORQUE la primera energía eléctrica total aplicada es mayor que la segunda energía eléctrica total aplicada.

40. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda concentración del campo del primer y segundo pulso eléctrico son una función de una magnitud de voltaje de los pulsos eléctricos, duración de los pulsos eléctricos y una conductividad de la muestra.

41. El método de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos es 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 o 1 voltio y 1000 voltios.

42. El método de la reivindicación 40 o la reivindicación 41, CARACTERIZADO PORQUE la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos es entre 100 voltios y 900 voltios.

43. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 40 a 42, CARACTERIZADO PORQUE la conductividad de la muestra es una función de parámetros que comprende una composición iónica de tampón de electroporación, concentración de un agente que se cargará en las células, densidad celular, temperatura y presión.

44. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 40 a 43, CARACTERIZADO PORQUE la conductividad de la muestra es 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.

45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 40 a 44, CARACTERIZADO PORQUE la conductividad de la muestra es entre 1,0 y 3,0 Siemens/metro.
46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 40 a 45, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda concentración del campo son, además, una función de una geometría de una cámara de electroporación.
47. El método de la reivindicación 46, CARACTERIZADO PORQUE la cámara de electroporación comprende una brecha de electrodos 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.
48. El método de la reivindicación 46 o la reivindicación 47, CARACTERIZADO PORQUE la cámara de electroporación comprende una brecha de electrodos entre 0,01 cm y 1 cm.
49. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda concentración del campo del primer y segundo pulso eléctrico son 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.
50. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda concentración del campo del primer y segundo pulso eléctrico son entre 0,3 kV/cm y 3 kV/cm.
51. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 50, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda duración del pulso del primer y segundo pulso eléctrico son 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.
52. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda duración del pulso del primer y segundo pulso eléctrico son entre 1 microsegundo y 100 milisegundos.
53. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52, CARACTERIZADO PORQUE el primer y segundo pulso eléctrico comprenden,

además, características que se relacionan a número de pulso, ancho, forma, patrón o polaridad.

54. El método de la reivindicación 53, CARACTERIZADO PORQUE el número de pulso es 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.

55. El método de la reivindicación 53 o la reivindicación 54, CARACTERIZADO PORQUE el número de pulso es entre 1 pulso y 130 pulsos.

56. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53 a 55, CARACTERIZADO PORQUE el ancho de pulso es una función de una tasa de descomposición exponencial.

57. El método de la reivindicación 56, CARACTERIZADO PORQUE la tasa de descomposición exponencial es una función de una resistencia de la muestra y una capacitancia de un suministro eléctrico usada para efectuar la electroporación.

58. El método de la reivindicación 57, CARACTERIZADO PORQUE la resistencia de la muestra es entre 1 ohm y 10.000 ohms, 1 ohm y 9000 ohms, 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 ohms, 1 ohm y 800 ohms, 1 ohm y 700 ohms, 1 ohm y 600 ohms, 1 ohm y 500 ohms, 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.

59. El método de la reivindicación 57 o la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE la resistencia de la muestra es entre 1 ohm y 1000 ohms.

60. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 59, CARACTERIZADO PORQUE la capacitancia del suministro de energía es 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 .
61. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 60, CARACTERIZADO PORQUE la capacitancia del suministro de energía es entre 1000 μF y 5000 μF .
62. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53 a 61, CARACTERIZADO PORQUE la forma del pulso es un pulso de onda cuadrado o un pulso de onda de descomposición exponencial.
63. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53 a 62, CARACTERIZADO PORQUE el patrón de pulso comprende un pulso único que corresponde a la duración del primer o segundo pulso.
64. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53 a 62, CARACTERIZADO PORQUE el patrón de pulso comprende varios pulsos, donde una duración combinada de varios pulsos corresponde a la duración del primer o segundo pulso.
65. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53 a 64, CARACTERIZADO PORQUE la polaridad del primer y segundo pulso eléctrico es positiva o negativa.
66. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, CARACTERIZADO PORQUE la muestra es sometida al segundo pulso eléctrico al menos 12 horas a al menos 48 horas después de que se somete la muestra al primer pulso.
67. El método de la reivindicación 66, CARACTERIZADO PORQUE la muestra es sometida al segundo pulso eléctrico al menos 24 horas después de que la muestra es sometida al primer pulso.
68. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 67, CARACTERIZADO PORQUE el método se lleva a cabo mediante un sistema de electroporación que tiene un medio legible por computadora no transitorio que

comprende instrucciones que, cuando se ejecutan por un procesador, provocan que el procesador ejecute el primer y segundo protocolo para electroporar la muestra.

69. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68, CARACTERIZADO PORQUE el sistema de electroporación comprende un aparato de electroporación de flujo y donde la muestra es sometida a los pulsos eléctricos mientras que la muestra fluye dentro del aparato de electroporación de flujo.

70. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 69, CARACTERIZADO PORQUE las células son células de mamíferos.

71. El método de la reivindicación 70, CARACTERIZADO PORQUE las células son células humanas, células murina, células de rata, células de hámster o células de primates.

72. El método de la reivindicación 70 o la reivindicación 71, CARACTERIZADO PORQUE las células son células primarias.

73. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 70 a 72, CARACTERIZADO PORQUE las células son células cultivadas.

74. El método de la reivindicación 73, CARACTERIZADO PORQUE las celulares cultivadas son las líneas celulares cultivadas.

75. El método de la reivindicación 74, CARACTERIZADO PORQUE 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/O, 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/O, SW403, THP-1, U2OS, U937, Vero, YB2/O o derivados de estos.

76. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 70 a 74, CARACTERIZADO PORQUE las células comprenden adipocitos, condrocitos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, hepatocitos, keratinocitos, miocitos, neuronas, osteocitos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), esplenocitos, células madre o timocitos.
77. El método de la reivindicación 76, CARACTERIZADO PORQUE las PBMC son linfocitos de sangre periférica (PBL).
78. El método de la reivindicación 77, CARACTERIZADO PORQUE las PBL son células citolíticas (NK), células T o células B.
79. El método de la reivindicación 76, CARACTERIZADO PORQUE las PBMC son monocitos.
80. El método de la reivindicación 79, CARACTERIZADO PORQUE los monocitos son macrófagos o células dendríticas.
81. El método de la reivindicación 80, CARACTERIZADO PORQUE los macrófagos son microglia.
82. El método de la reivindicación 76, CARACTERIZADO PORQUE las células madre son células madre adiposas, células madre embrionicas, células madre hematopoyéticas, citoblastos pluripotentes inducidos, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales o neurocitoblastos.
83. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 82, CARACTERIZADO PORQUE una eficiencia de carga del agente es al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90%.
84. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 83, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es al menos 50% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
85. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 84, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es al menos 60% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.

86. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 85, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es al menos 70% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
87. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 86, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es al menos 80% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
88. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 87, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es al menos 90% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
89. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 88, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente 50% a 90% viable 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
90. El método de la reivindicación 89, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente 50% a 90% viable 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico.
91. El método de la reivindicación 89, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente 50% a 90% viable 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico.
92. El método de la reivindicación 89, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente 50% a 90% viable 24 horas después del segundo pulso eléctrico.
93. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 89, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente 60% a 90% viable 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
94. El método de la reivindicación 93, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente 60% a 90% viable 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico.
95. El método de la reivindicación 93, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente 60% a 90% viable 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico.

96. El método de la reivindicación 93, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente 60% a 90% viable 24 horas después del segundo pulso eléctrico.

97. Una célula electroporada, partícula celular o vesícula lipídica producida usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 96.

98. Un sistema de electroporación que tienen un medio legible por computadora no transitorio CARACTERIZADO PORQUE comprende instrucciones que, cuando se ejecutan por un procesador, provocan que el procesador haga lo siguiente:

seleccionar un primer protocolo asociado con un primer pulso eléctrico que tiene una primera concentración de campo y una primera duración de pulso;

someter una muestra que comprende una o más de 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 tiene una segunda concentración de campo y un segunda duración de 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 de campo son distintas de la segunda intensidad de campo y/o la segunda duración de pulso.

99. El sistema de electroporación de la reivindicación 98, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es igual a la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más larga que la segunda duración de pulso.

100. El sistema de electroporación de la reivindicación 98, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es igual a la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más corto que la segunda duración de pulso.

101. El sistema de electroporación de la reivindicación 98, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es menos de la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es igual a la segunda duración de pulso.

102. El sistema de electroporación de la reivindicación 98, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es mayor que la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es igual a la segunda duración de pulso.

103. El sistema de electroporación de la reivindicación 98, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es menos de la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más larga que la segunda duración de pulso.

104. El sistema de electroporación de la reivindicación 98, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es mayor que la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso más larga que la segunda duración de pulso.

105. El sistema de electroporación de la reivindicación 98, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es menos de la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más corto que la segunda duración de pulso.

106. El sistema de electroporación de la reivindicación 98, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo es mayor que la segunda concentración de campo y donde la primera duración de pulso es más corto que la segunda duración de pulso.

107. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98-106, CARACTERIZADO PORQUE la primera concentración de campo y primera duración de pulso produce una primera energía eléctrica total aplicada y la segunda concentración de campo y segunda duración de pulso produce una segunda energía eléctrica total aplicada y donde la primera energía eléctrica total aplicada es diferente de la segunda energía eléctrica total aplicada.

108. El sistema de electroporación de la reivindicación 107, CARACTERIZADO PORQUE la primera energía eléctrica total aplicada es mayor que la segunda energía eléctrica total aplicada.
109. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 108, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda concentración del campo del primer y segundo pulso eléctrico son una función de una magnitud de voltaje de los pulsos eléctricos, duración de los pulsos eléctricos y una conductividad de la muestra.
110. El sistema de electroporación de la reivindicación 109, CARACTERIZADO PORQUE la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos es 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 o 1 voltio y 1000 voltios.
111. El sistema de electroporación de la reivindicación 109 o la reivindicación 110, CARACTERIZADO PORQUE la magnitud del voltaje de los pulsos eléctricos es entre 100 voltios y 900 voltios.
112. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 109 a 111, CARACTERIZADO PORQUE la conductividad de la muestra es una función de parámetros que comprenden una composición iónica de tampón de electroporación, concentración de un agente que se cargará en las células, densidad celular, temperatura y presión.
113. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 109 a 111, CARACTERIZADO PORQUE la conductividad de la muestra es 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.
114. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 109 a 113, CARACTERIZADO PORQUE la conductividad de la muestra es entre 1,0 y 3,0 Siemens/metro.

115. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 109 a 114, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda concentración del campo son, además una función de una geometría de una cámara de electroporación.

116. El sistema de electroporación de la reivindicación 115, CARACTERIZADO PORQUE la cámara de electroporación comprende una brecha de electrodos 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.

117. El sistema de electroporación de la reivindicación 115 o la reivindicación 116, CARACTERIZADO PORQUE la cámara de electroporación comprende una brecha de electrodos entre 0,01 cm y 1 cm.

118. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 117, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda concentración del campo del primer y segundo pulso eléctrico son 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.

119. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 118, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda concentración del campo del primer y segundo pulso eléctrico son entre 0,3 kV/cm y 3 kV/cm.

120. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 119, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda duración del pulso del primer y segundo pulso eléctrico son 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.

121. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 120, CARACTERIZADO PORQUE la primera y segunda duración del pulso del primer y segundo pulso eléctrico son entre 1 microsegundo y 100 milisegundos.

122. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 121, CARACTERIZADO PORQUE el primer y segundo pulso eléctrico

comprenden, además, características que se relacionan a número de pulso, ancho, forma, patrón o polaridad.

123. El sistema de electroporación de la reivindicación 122, CARACTERIZADO PORQUE el número de pulso es 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.

124. El sistema de electroporación de la reivindicación 122 o la reivindicación 123, CARACTERIZADO PORQUE el número de pulso es entre 1 pulso y 130 pulsos.

125. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 122 a 124, CARACTERIZADO PORQUE el ancho de pulso es una función de una tasa de descomposición exponencial.

126. El sistema de electroporación de la reivindicación 125, CARACTERIZADO PORQUE la tasa de descomposición exponencial es una función de a la resistencia de la muestra y una capacitancia de un suministro eléctrico usado para efectuar la electroporación.

127. El sistema de electroporación de la reivindicación 126, CARACTERIZADO PORQUE la resistencia de la muestra es entre 1 ohm y 10.000 ohms, 1 ohm y 9000 ohms, 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 ohms, 1 ohm y 800 ohms, 1 ohm y 700 ohms, 1 ohm y 600 ohms, 1 ohm y 500 ohms, 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.

128. El sistema de electroporación de la reivindicación 125 o la reivindicación 126, CARACTERIZADO PORQUE la resistencia de la muestra es entre 1 ohm y 1000 ohms.
129. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 126 a 128, CARACTERIZADO PORQUE la capacitancia del suministro de energía es 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 .
130. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 126 a 129, CARACTERIZADO PORQUE la capacitancia del suministro de energía es entre 1000 μF y 5000 μF .
131. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 122 a 130, CARACTERIZADO PORQUE la forma del pulso es un pulso de onda cuadrado o un pulso de onda de descomposición exponencial.
132. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 122 a 131, CARACTERIZADO PORQUE el patrón de pulso comprende un pulso único que corresponde a la duración del primer o segundo pulso.
133. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 122 a 131, CARACTERIZADO PORQUE el patrón de pulso comprende varios pulsos, donde una duración combinada de varios pulsos corresponde a la duración del primer o segundo pulso.
134. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 122 a 133, CARACTERIZADO PORQUE la polaridad del primer y segundo pulso eléctrico es positiva o negativa.
135. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 134, CARACTERIZADO PORQUE 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.
136. El sistema de electroporación de la reivindicación 135, CARACTERIZADO PORQUE la muestra se somete al segundo pulso eléctrico al menos 24 horas después de que la muestra se somete al primer pulso.

137. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 136, CARACTERIZADO PORQUE el sistema de electroporación comprende un aparato de electroporación de flujo y donde la muestra se somete a los pulsos eléctricos mientras la muestra fluye dentro del aparato de electroporación de flujo.

138. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 137, CARACTERIZADO PORQUE las células son células de mamífero.

139. El sistema de electroporación de la reivindicación 138, CARACTERIZADO PORQUE las células son células humanas, células murinas, células de rata, células de hámster o células de primate.

140. El sistema de electroporación de la reivindicación 138 o la reivindicación 139, CARACTERIZADO PORQUE las células son células primarias.

141. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 138 a 140, CARACTERIZADO PORQUE las células son células cultivadas.

142. El sistema de electroporación de la reivindicación 141, CARACTERIZADO PORQUE las células cultivadas son líneas de células cultivadas.

143. El sistema de electroporación de la reivindicación 142, CARACTERIZADO PORQUE las líneas de células 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.

144. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 138 a 142, CARACTERIZADO PORQUE 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.

145. El sistema de electroporación de la reivindicación 144, CARACTERIZADO PORQUE las PBMC son linfocitos de sangre periférica (PBL).

146. El sistema de electroporación de la reivindicación 145, CARACTERIZADO PORQUE los PBL son células citolíticas naturales (NK), células T o células B.

147. El sistema de electroporación de la reivindicación 144, CARACTERIZADO PORQUE las PBMC son monocitos

148. El sistema de electroporación de la reivindicación 147, CARACTERIZADO PORQUE los monocitos son macrófagos o células dendríticas.

149. El sistema de electroporación de la reivindicación 148, CARACTERIZADO PORQUE los macrófagos son microglia.

150. El sistema de electroporación de la reivindicación 144, CARACTERIZADO PORQUE las células madre son células madre adiposas, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesenquimales o células madre neurales.

151. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 150, CARACTERIZADO PORQUE el primer y el segundo agente son el mismo agente.

152. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 150, CARACTERIZADO PORQUE el primer y segundo agente son agentes diferentes.

153. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 152, CARACTERIZADO PORQUE el primer y el segundo agente son un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína o una molécula pequeña.

154. El sistema de electroporación de la reivindicación 153, CARACTERIZADO PORQUE el ácido nucleico es RNA y donde el RNA es mRNA, miRNA, shRNA o siRNA.

155. El sistema de electroporación de la reivindicación 153, CARACTERIZADO PORQUE el ácido nucleico es DNA y donde el DNA es un oligonucleótido antisentido o un vector.
156. El sistema de electroporación de la reivindicación 153, CARACTERIZADO PORQUE la proteína es una ribonucleoproteína.
157. El sistema de electroporación de la reivindicación 156, CARACTERIZADO PORQUE la ribonucleoproteína comprende una proteína Cas9 y un RNA guía.
158. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 157, CARACTERIZADO PORQUE la eficiencia de carga del agente es al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90%.
159. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 158, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es de al menos el 50% de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
160. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 159, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es al menos 60% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
161. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 160, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es al menos 70% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
162. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 161, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es al menos 80% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
163. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 162, CARACTERIZADO PORQUE la viabilidad celular es al menos 90% 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
164. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 163, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.

165. El sistema de electroporación de la reivindicación 164, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico.
166. El sistema de electroporación de la reivindicación 164, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables de 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico.
167. El sistema de electroporación de la reivindicación 164, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente del 50% al 90% viables 24 horas después del segundo pulso eléctrico.
168. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 164, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 96 horas después del segundo pulso eléctrico.
169. El sistema de electroporación de la reivindicación 168, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 72 horas después del segundo pulso eléctrico.
170. El sistema de electroporación de la reivindicación 168, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables de 12 a 48 horas después del segundo pulso eléctrico.
171. El sistema de electroporación de la reivindicación 168, CARACTERIZADO PORQUE las células electroporadas son aproximadamente del 60% al 90% viables 24 horas después del segundo pulso eléctrico.
172. Una célula, partícula celular o vesícula lipídica sometida a electroporación producida usando el sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 171.