

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 641**

51 Int. Cl.:

**A61N 1/30** (2006.01)

**A61B 5/04** (2006.01)

**A61N 1/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2004 E 04822676 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1804908**

54 Título: **Método y dispositivo para la electroporación espacialmente confinada**

30 Prioridad:

**02.12.2003 US 726381**

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

**27.11.2013**

73 Titular/es:

**CELLECTRICON AB (100.0%)  
FABRIKSGATAN 7  
412 50 GOTEBOG, SE**

72 Inventor/es:

**ORWAR, OWE;  
RYTTSEN, FRIDA;  
LEVIN, MIKAEL;  
SAHLIN, ESKIL y  
WIGSTRÖM, JOAKIM**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 431 641 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método y dispositivo para la electroporación espacialmente confinada

**Campo de la invención**

5 La presente invención está relacionada con un electrodo de punta para la electroporación y distribución de uno o más agentes en objetivos espacialmente confinados, tales como poblaciones celulares, células individuales, orgánulos intracelulares y biomoléculas.

**Antecedentes de la invención**

10 Durante las dos últimas décadas, se ha producido un crecimiento enorme en métodos experimentales que permiten investigaciones bioquímicas y biofísicas de células individuales. Tales métodos incluyen grabaciones de pinzamientos zonales que pueden ser utilizadas para la medición de corrientes transmembranales a través de un solo canal iónico (Hamill y otros colaboradores, Pfluegers Arch. 391: 85 - 100, 1981); técnicas de formación de imágenes por microscopía confocal de láser que pueden ser utilizadas para localizar componentes bioactivos en células individuales y orgánulos individuales (Maiti y otros colaboradores, Science 275: 530-532, 1997); uso de sondas ópticas de campo cercano para mediciones de pH en el interior celular; y uso de ultramicroelectrodos para mediciones de la liberación de vesículas individuales que contienen catecol e indol-amina (Chow y otros colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10754-10758, 1991).

15 Hay disponibles sondas de enzimas, sustratos y proteínas altamente específicas que hacen posible detectar componentes particulares en las células (Tsien, Annu. Rev. Biochem. (1998), 67: 509-544). El principal reto, hasta ahora, en la aplicación de tales sondas, fármacos y otros efectores de la química intracelular, es introducirlos en el interior de las células. Muchos de estos agentes (por ejemplo, nanopartículas, tintes, fármacos, ADN, ARN, proteínas, péptidos y aminoácidos) son polares y los solutos polares son impermeables en las células e incapaces de traspasar las membranas biológicas. Por tanto, la barrera de la membrana de plasma de la célula actúa como una frontera física para la solución externa e impide la entrada de compuestos y partículas exógenos. En la actualidad, es extremadamente difícil, por ejemplo, identificar una célula de un cultivo celular con un tinte, o transfectarla con un gen sin identificar o transfectar su vecina contigua. Es incluso más difícil introducir moléculas polares en orgánulos, porque su tamaño, que muchas veces es menor que el límite de la resolución de un microscopio óptico, o al menos menor que unos pocas micras de diámetro.

20 Se han descrito también técnicas de microinyección para células individuales y núcleos individuales (véase por ejemplo Capecchi, Cell 22: 479-488, 1980), pero éstas se hacen cada vez más difíciles de implementar a medida que el tamaño de la célula u orgánulo disminuye. Para células y orgánulos que miden solamente unas pocas micras de diámetro o menos, las técnicas de microinyección se hacen virtualmente imposibles de utilizar.

25 Las membranas celulares pueden ser permeabilizadas mediante campos eléctricos por impulsos (véase por ejemplo Zimmermann, Biochim. Biophys. Acta (1982) 694: 227-277). Esta técnica es denominada electroporación. El suceso que conduce a la rotura de las membranas de plasma es la inducción de un potencial transmembranal por encima de un valor crítico, por el campo eléctrico aplicado. El potencial transmembranal  $\Delta V$ , para una célula esférica de radio  $r_c$  en un campo eléctrico homogéneo,  $E$ , se calcula generalmente a partir de:

$$\Delta V = 1.5 r_c E \cos \alpha (1 - e^{-t/\tau}) \quad (1)$$

30 donde 1,5 es un factor geométrico, y  $\alpha$  es el ángulo entre la situación en la membrana y la dirección del campo.  $t$  es la duración del impulso y  $\tau$  es el tiempo que se tarda para que la membrana consiga el potencial transmembranal inducido, y está descrito por:

$$\tau = r_c C_m (\rho_i + 0.5 \rho_e) \quad (2)$$

35 donde  $C_m$  es la capacitancia específica de la membrana por unidad de superficie, y  $\rho_i$  y  $\rho_e$  son las resistividades de las soluciones intracelular y extracelular, respectivamente.

40 La técnica de electroporación se utiliza ampliamente en grandes poblaciones de células (del orden de  $10^6$  células). Típicamente, las células se colocan entre grandes electrodos de placa que generan campos eléctricos homogéneos. Se ha descrito también la instrumentación que puede utilizarse para la electroporación de un pequeño número de células en suspensión (Kinosita y Tsong, Biochim. Biophys. Acta 554:479 - 497, 1979); Chang, J. biophys. 56: 641-652, 1989; Marszalek, y otros colaboradores, Biophys. J. 73: 1160-1168, 1997) y para un pequeño número de células adherentes cultivadas sobre un sustrato (Zheng, Biochim. Biophys. Acta 1088: 104 - 110, 1991); Teruel y Meyer, Biophys. J., 73:1785 - 1796, 1997). El diseño del dispositivo de electroporación construido por Marszalek y otros colaboradores, 1997, supra, está basado en alambres de platino de 6 mm de largo por 80  $\mu\text{m}$  de diámetro que están pegados en una configuración paralela a una distancia fija de 100  $\mu\text{m}$  a una sola micropipeta de vidrio. El

diseño de Kinoshita y Tsong, 1979, supra, utiliza electrodos fijos de latón, separados por una distancia del hueco de 2 mm. El diseño del microporador de Teruel y Meyer, 1997, supra, se basa en dos electrodos de platino que están separados por una distancia del hueco de alrededor de 5 mm, y el diseño de la cámara de electroporación de Chang utiliza alambres de platino de aproximadamente 1 mm de largo, separados a una distancia de 0,4 mm.

- 5 Estos dispositivos de electroporación, que están optimizados para el uso "in vitro", crean campos eléctricos que son de varios órdenes de magnitud mayores que el tamaño de una sola célula, que es típicamente de 10 µm de diámetros, y por tanto no pueden ser utilizados para la electroporación exclusiva de una sola célula o un solo orgánulo, o para la electroporación dentro de una sola célula. Las técnicas no ofrecen un control posicional e individual suficiente de los electrodos para seleccionar una sola célula, o una pequeña población de células.
- 10 Además, estas técnicas no están optimizadas para la electroporación "in vivo" ni para la electroporación de células y tejidos remotos.

- Se han diseñado también dispositivos de electroporación para aplicaciones clínicas e "in vivo". Los ejemplos incluyen dispositivos para la distribución mediante electroporación de drogas y genes a tumores (WO 96/39226) y a células sanguíneas (Patente de Estados Unidos núm. 5.501.662) y a células y tejidos remotos (patente de Estados Unidos núm. 5.389.069). El documento WO 95/23211 divulga un dispositivo para la incorporación eficiente de moléculas en las células. De igual manera, éstas no pueden ser utilizadas para crear un campo eléctrico altamente localizado para una electroporación espacialmente confinada.
- 15

### Sumario

- 20 La invención proporciona dispositivos para disponer de campos eléctricos espacialmente localizados en una diversidad de objetivos, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, células y estructuras celulares. Los dispositivos de acuerdo con la invención permiten un filtrado de alto rendimiento para tales agentes.

- La invención proporciona un electrodo de punta que comprende: un alojamiento que define un lumen para recibir un medio no sólido eléctricamente conductor; y una superficie eléctricamente conductora que comprende una estructura modelada para ajustarse en el alojamiento que define el lumen del electrodo de punta, para acoplarse con un generador de tensión o de corriente. El alojamiento comprende un extremo que mira hacia el objetivo que comprende una abertura en comunicación con el lumen, para distribuir un agente a través de la abertura hacia un objetivo. El lumen puede comprender, adicional o alternativamente, un medio eléctricamente conductor (por ejemplo, un líquido, un gel y similares).
- 25

La invención es como la que se describe en el conjunto anexo de reivindicaciones.

- 30 Los ejemplos de agentes incluyen, pero sin limitarse a ellos, genes; análogos de genes; ARN; análogos de ARN; siARN; oligonucleótidos antisentido; ribozimas; ADN; análogos del ADN; aptámeros; partículas coloidales; nanopartículas; receptores; ligandos receptores; antagonistas receptores; agonistas receptores; bloqueadores de receptores; enzimas; substratos de enzimas; inhibidores de enzimas; moduladores de enzimas, proteínas; análogos de proteínas; polipéptidos; análogos de polipéptidos; aminoácidos; análogos de aminoácidos; péptidos; análogos de péptidos; metabolitos; análogos de metabolitos; oligonucleótidos; análogos de oligonucleótidos; antígenos; análogos de antígenos; haptenes; análogos de haptenes; anticuerpos; análogos de anticuerpos; orgánulos; análogos de orgánulos; núcleos celulares; fracciones celulares; bacterias; virus; partículas virales; gametos; iones inorgánicos; iones orgánicos; metales; agentes que afectan la química celular; agentes que afectan al citoesqueleto; agentes que afectan a polímeros y combinaciones de los mismos.
- 35

- 40 En un aspecto, el alojamiento comprende un extremo afilado para facilitar su inserción en una membrana biológica.

- En otro aspecto, el lumen del alojamiento comprende un elemento que comprende una superficie eléctricamente conductora. Por ejemplo, el elemento puede ser en forma de superficie eléctricamente conductora, que es una estructura que penetra en las paredes del alojamiento en uno o ambos lados del alojamiento. Por ejemplo, la superficie eléctricamente conductora puede ser un alambre conectado sobre el exterior del alojamiento a una placa anular.
- 45

El electrodo en punta puede ser utilizado para la distribución de agentes y, en un aspecto, el medio eléctricamente conductor comprende un agente para la distribución a un objetivo.

- El alojamiento puede ser construido a partir de una diversidad de materiales, incluyendo, pero sin limitarse a ellos: el vidrio, sílice fundido; plástico, cerámica, un material de elastómero, un polímero, un metal, un material no conductor recubierto al menos parcialmente con un material conductor, y un material conductor recubierto al menos parcialmente con un material no conductor.
- 50

En un aspecto, el alojamiento comprende además un extremo receptor situado distalmente con respecto al extremo que mira hacia el objetivo, y comprende una abertura para recibir un medio eléctricamente conductor.

En otro aspecto, el electrodo en punta comprende además una superficie conductora que funciona como un contraelectrodo.

5 En un aspecto adicional, el alojamiento comprende un diámetro interior uniforme y un diámetro exterior uniforme o variable. En un aspecto adicional, la longitud del electrodo de punta es menor que aproximadamente a 10 cm. En otro aspecto más, la longitud del electrodo de punta es menor que aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ . En otro aspecto más, la longitud del electrodo de punta es menor que aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . En un aspecto adicional, la longitud del electrodo de punta es menor que aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ .

10 En un aspecto, el diámetro de la abertura en el extremo que mira al objetivo del electrodo de punta es menor o igual a aproximadamente 5000  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, el diámetro de la abertura en el extremo que mira al objetivo es menor que aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo es menor que aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , menor que aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , menor que aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , menor que aproximadamente 100 nm, o que aproximadamente 50 nm.

15 La invención proporciona adicionalmente una placa de electrodos que comprende al menos un punto de montaje para recibir un electrodo de punta. En un aspecto, el al menos un punto de montaje comprende un punto de sujeción flexible para recibir el electrodo de punta, permitiendo el desplazamiento vertical de un electrodo de punta desde el punto de montaje. Preferiblemente, la placa de electrodos, comprende una pluralidad de puntos de montaje. Por ejemplo, la placa puede comprender una fila de puntos de montaje para formar un conjunto lineal de electrodos de punta. Alternativamente, la placa puede comprender una pluralidad de filas de puntos de montaje para formar un conjunto bidimensional de electrodos de punta. En un aspecto, la distancia entre centros de cada punto de montaje  
20 corresponde a la distancia entre centros de pocillos en una placa microtituladora estándar industrial.

Preferiblemente, la placa de electrodos comprende al menos un punto de interfaz para un generador de tensión o de corriente. También, preferiblemente, la placa de electrodos comprende al menos un punto de interfaz para interconectar con un dispositivo de distribución de fluido.

25 En un aspecto, la placa de electrodos comprende al menos dos capas que incluyen una capa conductora y una capa aislante. Además, una capa de la placa de electrodos puede funcionar como un contraelectrodo.

Preferiblemente, una placa de electrodos que comprende al menos un punto de montaje, comprende además una abertura para recibir al electrodo de punta y en un aspecto, la invención proporciona una placa de electrodos donde al menos un electrodo de punta se monta en una placa de electrodos en el punto de montaje. Preferiblemente, se monta una pluralidad de electrodos de punta en la placa de electrodos.

30 En un aspecto, la placa de electrodos comprende al menos un conducto microfluídicos para distribuir fluidos sobre al menos una placa de electrodos de punta montada en la placa.

35 La invención proporciona adicionalmente una placa de electrodos de punta que comprende al menos un punto de montaje para recibir a un electrodo de punta de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores que comprende una placa sustancialmente plana en la cual se fabrica en ella al menos un elemento no plano donde un extremo del elemento no plano distal de la placa comprende una abertura para exponer el objetivo a un campo eléctrico y donde las paredes interiores del elemento no plano definen un lumen para contener un medio eléctricamente conductor. En un aspecto, las paredes interiores comprenden una superficie eléctricamente conductora. Por ejemplo, la superficie eléctricamente conductora puede comprender un recubrimiento conductor que al menos recubre parcialmente las paredes interiores del lumen. Preferiblemente, el extremo de al menos un elemento es cónico.

40 En un aspecto, la placa de electrodos de punta comprende una primera capa que comprende una pluralidad de depósitos y una segunda capa sustancialmente plana que comprende una pluralidad de elementos no planos elevados sobre la placa. Preferiblemente, cada elemento no plano comprende una abertura que mira al objetivo para exponer un objetivo a un campo eléctrico. La abertura se centra sobre cada depósito en la primera capa, y las paredes interiores del elemento no plano definen un lumen que se comunica con el depósito y la abertura.

45 La placa puede comprender adicionalmente una capa de contraelectrodos. Los depósitos pueden comprender adicionalmente un medio eléctricamente conductor. Preferiblemente, el medio eléctricamente conductor comprende un agente. En un aspecto, la capa de contraelectrodos contacta con el medio eléctricamente conductor.

50 La invención proporciona adicionalmente un kit que comprende cualquiera de los electrodos de punta descritos anteriormente y un recipiente para contener un objetivo. Los recipientes adecuados incluyen, pero no están limitados a ello: una placa microtituladora, un recipiente de cultivos de células de pocillos múltiples, una placa petri, un sustrato polimérico, un sustrato de vidrio, un chip microfluídico, y una membrana. En un aspecto, el kit proporciona además una placa de electrodos para recibir al electrodo de punta. En otro aspecto, la placa de electrodos y/o el recipiente comprenden al menos un conducto microfluídico. En otro aspecto, el kit comprende adicionalmente al menos un contraelectrodo. En otro aspecto más, el kit comprende un medio eléctricamente conductor para llenar al menos un electrodo de punta. En un aspecto adicional, el kit comprende al menos un agente y/o un objetivo (por  
55

ejemplo, células, estructuras celulares, y semejantes).

- 5 La invención también proporciona un sistema que comprende al menos un electrodo de punta, tales como cualquiera de los electrodos de punta descritos anteriormente. En un aspecto, el sistema comprende una superficie eléctricamente conductora en contacto con una placa de electrodos como se ha descrito anteriormente y un electrodo de punta. Preferiblemente, el alojamiento comprende un extremo que mira al objetivo que comprende una abertura en comunicación con el lumen para distribuir un agente a través de la abertura a un objetivo. También preferiblemente, la placa de electrodos se puede conectar a un generador de impulsos para distribuir un impulso de tensión o corriente a la superficie eléctricamente conductora. Además, preferiblemente, el sistema comprende un recipiente para contener un objetivo.
- 10 En otro aspecto, el sistema comprende adicionalmente un mecanismo para posicionar el al menos un electrodo de punta en proximidad a un objetivo y a un generador de impulsos en comunicación con la placa de electrodos para distribuir impulsos de tensión y corriente a través de al menos un electrodo de punta. Preferiblemente, el sistema comprende adicionalmente al menos un contraelectrodo.
- 15 En un aspecto adicional, el sistema comprende adicionalmente un mecanismo de distribución para distribuir un fluido y/o un agente al menos a un electrodo de punta. El mecanismo de distribución puede comprender uno o más entre: un mecanismo de bombeo, un mecanismo para electroósmosis, o un mecanismo para electroforesis de un agente a través del lumen del electrodo de punta.
- 20 En un aspecto, el sistema comprende una pluralidad de electrodos de punta, cada uno de los cuales está en contacto eléctrico con la placa de electrodos. Los electrodos de punta pueden separarse de la placa de electrodos o de una parte integrante de la misma. Los impulsos eléctricos se transmiten a través de cada electrodo de punta y preferiblemente se controlan independientemente a través de un procesador del sistema. La pluralidad de los electrodos de punta puede comprender una disposición del conjunto (por ejemplo, en filas). La placa de electrodos y/o recipiente puede comprender adicionalmente uno o más conductos microfluídicos.
- 25 En un aspecto preferido, el sistema comprende adicionalmente un detector, para detectar alteraciones de las propiedades eléctricas o de las propiedades ópticas de un objetivo de proximidad a un electrodo de punta y/o de la distribución de un fluido y/o un agente al objetivo.
- 30 En otro aspecto, la placa de electrodos comprende una primera capa que comprende una pluralidad de depósitos y una segunda placa sustancialmente plana que comprende una pluralidad de elementos no planos elevados por encima de la placa formando los electrodos de punta. La abertura que mira al objetivo del electrodo de punta está centrada por encima de cada depósito en la primera capa, y el lumen del electrodo de punta se comunica con el depósito. En un aspecto, el lumen de ese al menos un electrodo de punta comprende un medio eléctricamente conductor. Preferiblemente, el alojamiento de ese al menos un electrodo de punta comprende un extremo cónico. También, preferiblemente, la superficie eléctricamente conductora de ese al menos un electrodo de punta comprende un recubrimiento que recubre al menos parcialmente las paredes del alojamiento que definen el lumen.
- 35 Sin embargo, alternativamente, o adicionalmente, la superficie eléctricamente conductora comprende un elemento que comprende una superficie eléctricamente conductora insertada en el lumen del alojamiento. Por ejemplo, el elemento puede ser un cilindro, una varilla o un cable. En un aspecto, la superficie eléctricamente conductora es una estructura que penetra las paredes del alojamiento en uno o ambos lados del alojamiento. En otro aspecto, la superficie eléctricamente conductora es un cable conectado en el exterior del alojamiento a una placa anular. El medio eléctricamente conductor puede también ser un líquido o un gel y en un aspecto, el medio eléctricamente conductor comprende un agente para distribuir a un objetivo.
- 40 En un aspecto preferido, el sistema comprende adicionalmente un procesador para controlar uno o más parámetros seleccionados del grupo que consisten en: distribución del fluido al menos a un electrodo de punta, distribución de al menos un agente al menos a un electrodo de punta, llenado del electrodo de punta con un medio eléctricamente conductor, parámetros de tensión o corriente (por ejemplo, duración del impulso, forma de la onda, y amplitud del impulso), exploración de la placa de electrodos comprendiendo ese al menos un electrodo de punta con respecto a un objetivo, exploración de un objetivo con respecto a un electrodo de punta, desplazamiento vertical de un electrodo de punta, electroforesis a través de un electrodo de punta, electroósmosis a través de un electrodo de punta, bombeo del fluido a través de un electrodo de punta, y una función de un detector de un sistema.
- 45 También, preferiblemente, el sistema comprende adicionalmente un dispositivo de usuario que comprende un interfaz gráfico para visualizar operaciones del sistema y para alterar parámetros del sistema. En un aspecto, el sistema comprende adicionalmente un dispositivo de lectura para visualizar la salida desde el detector.
- 50 En otro aspecto, el sistema comprende adicionalmente un mecanismo de posicionamiento para restringir desplazamientos verticales de ese al menos un electrodo de punta. Preferiblemente, el mecanismo de posicionamiento se monta en el extremo que mira al objetivo de al menos un electrodo de punta. Sin embargo, el mecanismo de posicionamiento puede también ser una parte integrante del electrodo de punta.
- 55

- 5 Se divulga un método que comprende la exposición a un campo eléctrico enfocado de una muestra que comprende un objetivo y al menos un componente no objetivo, donde el campo eléctrico enfocado altera selectivamente las propiedades del objetivo. En un aspecto, el objetivo comprende una membrana biológica seleccionada y los componentes no objetivos comprenden membranas biológicas no seleccionadas. Los ejemplos de objetivos incluyen, pero no están limitados, una población de células, una célula simple, un orgánulo intracelular, una vesícula, un liposoma, una molécula, un grupo de moléculas, un ácido nucleico, proteína, polipéptido, péptido, enzima, fibra de carbono, reactivo químico y una superficie.
- 10 En un aspecto, el objetivo está suspendido en un líquido que comprende al menos un no objetivo. En otro aspecto, el objetivo está asociado con un sustrato. En un aspecto adicional, el sustrato comprende un conjunto. En otro aspecto más adicional, el sustrato comprende una placa microtituladora. Una pluralidad de objetivos se puede localizar en localizaciones discretas en un sustrato o en una solución y se pueden separar de otros objetivos mediante una barrera física.
- 15 En un aspecto, se proporciona el campo eléctrico mediante cualquiera de los electrodos de punta descritos anteriormente.
- 20 En otro aspecto, el método, que no es parte de la invención, comprende la exposición de cada uno de los objetivos en una muestra que comprende una pluralidad de componentes no objetivos a un campo eléctrico enfocado. Preferiblemente, cada campo eléctrico enfocado se sintoniza independientemente. En un aspecto, una pluralidad de electrodos de punta, tales como cualquiera de los descritos anteriormente, proporcionan los campos eléctricos enfocados. Se puede exponer la pluralidad de objetivos secuencialmente y/o en paralelo a la pluralidad de campos eléctricos enfocados. Cada una de las pluralidades de electrodos de punta se puede posicionar sobre el pocillo de una placa microtituladora o sobre un punto en el sustrato donde se sitúa un objetivo.
- 25 En un aspecto, el objetivo comprende una membrana biológica y la exposición genera poros en la membrana. Por tanto, el método, que no es parte de la invención, se puede usar para exponer un objetivo a un agente. En otro aspecto, se coordinan la exposición a un campo eléctrico y la exposición al agente.
- 30 En un aspecto adicional, el método, que no es parte de la invención, comprende la alteración de la condición o condiciones de una solución en la cual se baña al objetivo. Por ejemplo, el método, que no es parte de la invención, comprende el paso de alteración del pH, temperatura, fuerza iónica, osmolaridad, y/o combinaciones de viscosidad de una solución en la cual se baña al objetivo.
- 35 En un aspecto, se proporciona el campo eléctrico enfocado mediante un electrodo de punta el cual puede estar acoplado a una placa. La placa puede comprender al menos un conducto en comunicación fluidica con el lumen del electrodo de punta. Adicionalmente, o alternativamente, el sustrato puede comprender al menos un conducto en comunicación fluidica con el objetivo a través del cual se puede exponer el objetivo al agente. En un aspecto, el sustrato comprende una pluralidad de conductos en comunicación fluidica con el objetivo y se pueden distribuir desde la pluralidad de conductos una pluralidad de agentes y/o soluciones tampón secuencialmente o en paralelo al objetivo.
- 40 Se puede usar también la pluralidad de objetivos para exponer el objetivo al menos a una corriente de fluido desde ese al menos un objetivo. En un aspecto, se explora el objetivo a través de esa al menos una corriente fluida desplazando el objetivo, desplazando el sustrato, desplazando tanto el sustrato como el objetivo y/o mediante la variación de la presión a ese al menos un conducto del sustrato.
- 45 Se divulga adicionalmente un método que comprende la exposición de una muestra que comprende un objetivo y al menos un componente no objetivo a un campo eléctrico enfocado, donde el campo eléctrico enfocado altera selectivamente las propiedades del objetivo y detecta la propiedad alterada. El método, que no es parte de la invención, puede incluir el paso de monitorización de uno o más parámetros del campo eléctrico y en un aspecto, el método comprende adicionalmente el paso de alteración de un parámetro del campo eléctrico como respuesta a la detección de la propiedad alterada.
- 50 El método, que no es parte de la invención, puede incluir el paso de exposición de un objetivo a una corriente fluida para distribuir una corriente de fluido desde la salida de un conducto microfluidico en proximidad al objetivo. En un aspecto, el fluido comprende un agente y se coordina la distribución de la corriente de fluido con la exposición del objetivo al campo eléctrico. La distribución del agente a través del electrodo de punta se puede facilitar a través de la electroforesis o electroósmosis.
- En un aspecto, el campo eléctrico induce un dipolo en una o más moléculas objetivo.
- En otro aspecto, el campo eléctrico provoca que una o más moléculas se estiren, desplacen, unan, reaccionen, y/o se desvirtúen.
- En un aspecto adicional, el objetivo es una superficie y el electrodo de punta distribuye moléculas para modelar la

superficie con una pluralidad de moléculas, macromoléculas, células, o combinaciones de las mismas.

En un aspecto, el objetivo es una célula o estructura celular (por ejemplo, un orgánulo) y el agente es una etiqueta. En otro aspecto, la etiqueta interactúa con una molécula intracelular o una molécula intraorganular para producir una señal o reactivo detectables, y el método comprende adicionalmente el paso de detección de la señal o reactivo detectables, proporcionando con ello un medio para determinar la presencia, ausencia y/o cantidad de la molécula.

5

En otro aspecto, el objetivo es una célula o estructura celular que se precarga con la mitad de un par FRET y el método comprende adicionalmente el paso de la exposición del objetivo a la otra mitad del par FRET durante y/o tras la exposición del campo eléctrico. La producción de una señal FRET confirma la formación del poro.

Se puede usar el método, que no es parte de la invención, para transferir solutos del medio exterior al compartimento definido por una membrana (como por ejemplo, una célula) en el compartimento definido por la membrana. Alternativamente, se puede usar el método, que no es parte de la invención, para transferir solutos del medio interior al compartimento definido por la membrana (como por ejemplo, una célula) a una solución exterior a la membrana.

10

En un aspecto, el agente puede interactuar con una molécula intracelular, macromolécula, ión polímero, proteína, polipéptido, péptido, o ácido nucleico para producir un producto detectable, y el método, que no es parte de la invención, comprende además la detección del producto detectable. En otro aspecto, el método, que no es parte de la invención, comprende el paso de detección de una respuesta del compartimento de la internalización del agente. Por ejemplo, se puede realizar la detección mediante la monitorización de la capacidad, voltametría, amperometría, CARS (dispersión raman anti-stokes coherente), SERS (dispersión raman aumentada por superficie), fotofluorescencia, quimioluminiscencia, absorción UV-VIS-IR, microbalanza de cristal de cuarzo, o resonancia de plasmón superficial.

15

20

En un aspecto adicional, el objetivo es una célula de un tipo seleccionado y un no objetivo es una célula de un tipo diferente. Alternativamente, el objetivo puede ser un orgánulo de un tipo seleccionado mientras que el no objetivo es un orgánulo de un tipo no seleccionado.

25

Se divulga adicionalmente un método de filtrado para un agente que altera una interacción entre un primer componente intracelular y un segundo componente intracelular. El método, que no es parte de la invención, comprende el contacto de una célula que comprende el primer componente intracelular y el segundo componente intracelular con el agente, exponiendo la célula a un campo eléctrico enfocado usando cualquiera de los electrodos de punta descritos anteriormente, bajo condiciones que generan poros en la célula, y detectando un cambio en la interacción. El paso de exposición puede ocurrir antes, durante y/o después del paso de contacto.

30

En un aspecto, se etiqueta el primer y/o segundo componentes y el método, que no es parte de la invención, comprende la detección de un cambio en una señal producida por una o ambas etiquetas después de la exposición.

En otro aspecto, el método, que no es parte de la invención, comprende la detección de presencia o ausencia de una reacción o un cambio en ella, que ocurre cuando interactúan el primer y segundo componentes. Por ejemplo, el primer componente puede ser una enzima y el segundo componente un sustrato o cofactor. Se puede monitorizar la interacción del primer y segundo componentes mediante la detección de la presencia, ausencia o cambio en la cantidad de reactivos.

35

En un aspecto adicional, el método, que no es parte de la invención, comprende la detección de presencia o ausencia o un cambio en una función celular o extracelular o fenotipo asociado con la interacción del primer y segundo componente.

40

En un aspecto adicional más, la interacción comprende la unión del primer y segundo componente

Los componentes primero y segundo ejemplares se seleccionan independientemente del grupo consistiendo en una molécula intracelular, macromolécula, metabolito, polímero, proteína (es decir, un receptor, ligando, enzima, proteína citoesquelética, proteína señalizadora, conducto iónico, proteína de membrana de orgánulo, o proteína de membrana de célula), polipéptido, péptido, ácido nucleico, nucleobase, nucleótido, vesícula, componente de membrana de célula, orgánulo y combinaciones de los mismos.

45

En un aspecto, el agente es un agonista, antagonista o inhibidor del primer o segundo componentes.

En otro aspecto, el agente modula una ruta de señalización.

En un aspecto adicional, el agente modula una ruta metabólica.

50

En otro aspecto más, el primer componente es un receptor intracelular y el segundo componente es un ligante que une el receptor intracelular.

Se divulga también un método de filtrado de un agente que liga un componente intracelular. El método, que no es parte de la invención, comprende el contacto de una célula que comprende el componente intracelular con un agente ligante candidato, exponiendo la célula a un campo eléctrico enfocado que usa un electrodo de punta como se ha descrito anteriormente bajo condiciones que generan poros en la célula, y detectando la unión del agente con el componente. En un aspecto, se etiqueta el agente y/o componente intracelular y el método, que no es parte de la invención, comprende la detección de la formación de un complejo entre el agente y el componente intracelular. Alternativamente o adicionalmente, el método, que no es parte de la invención, comprende la detección de un fenotipo asociado con la unión. En otro aspecto, el método, que no es parte de la invención, comprende la detección de una reacción producida cuando un componente intracelular se une a un agente. En un aspecto, la reacción comprende un aumento de los niveles de una molécula señalizadora (por ejemplo como  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, y  $\text{K}^+$ ). El componente intracelular puede incluir, pero no está limitado a ello, un receptor intracelular, el dominio citoplasmático de una molécula de membrana de célula, o una enzima.

#### Breve descripción de las figuras.

Se pueden comprender mejor el objeto y las características de la invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada y a los dibujos que se acompañan.

La Figura 1 es una representación de un sistema de electroporación que comprende electrodos de punta de un aspecto de la invención. El sistema comprende un electrodo (1) de punta lleno de electrolito que tiene un electrodo interno (2) en contacto eléctrico con una placa (3) de electrodos. Se conecta la placa de electrodos a un generador (4) de impulsos para distribuir los pulsos de voltaje y corriente a través del electrodo de punta y tierra a un contraelectrodo (5). Se posiciona el electrodo de punta en un baño (6) de célula de forma que la solución electrolítica contenida en la punta está en contacto con la solución en el baño de célula.

La Figura 2A ilustra un electrodo de punta aislado de electroporación e internalización localizadas de agentes en células en un pocillo de una placa microtituladora o en una localización discreta o "punto" en un recipiente de cultivo de células, como una placa petri, de un aspecto de la invención. La Figura 2B ilustra un conjunto lineal de electrodos de punta alineados para una electroporación paralela de células en un número de pocillos o puntos. La Figura 2C ilustra un conjunto matricial bidireccional de electrodos de punta para la electroporación de una pluralidad de células contenidas en una pluralidad de pocillos o puntos.

Las Figuras 3A y 3B ilustran un diseño alternativo de los electrodos de punta donde una pluralidad de los electrodos de punta se moldean en paralelo en una placa. En un aspecto, la placa consiste en tres capas diferentes donde la capa (1) contiene pocillos que actúan tanto como electrodos como depósitos de electrolitos y son fabricados en parte con un material conductor; la capa (2) comprende una capa no conductora con puntas paralelas que corresponden a los pocillos en (1), y la capa (3) es una placa de contraelectrodos, ilustrada aquí con contraelectrodos circulares individuales correspondientes a cada electrodo de punta. La Figura 3A es un primer plano de un electrodo de punta individual de este modo y la Figura 3B ilustra la placa con una matriz bidireccional de electrodos de punta paralelos.

Las Figuras 4A y 4B ilustran ejemplos no limitativos de cómo se puede variar la geometría del extremo del electrodo de punta en proximidad a la célula o células. La Figura 4A ilustra los electrodos de punta con diámetros internos uniformes y diámetros exteriores variables, es decir, diámetros exteriores uniformes, que se estrechan o que se expanden. La Figura 4B ilustra los electrodos de punta con un diámetro interior que se estrecha y diámetros exteriores que se estrechan, uniformes o que se expanden.

Las Figuras 5A-C ilustran la placa de electrodos que recibe los electrodos de punta como se ilustra en la Figura 2. En el modo de realización ilustrado en la Figura, se pueden separar los electrodos de punta de la placa. La Figura 5A ilustra una placa de electrodos con una abertura para recibir un único electrodo de punta, la Figura 5B ilustra una placa de electrodos con aberturas para un conjunto lineal de electrodos de punta. La Figura 5C ilustra una placa de electrodos adaptada para una ordenación matricial de dos dimensiones de electrodos de punta.

Las Figuras 6A-C ilustran electrodos de punta montados en una placa de electrodos de un modo de realización de la invención para un único (Figura 6A), unos cuantos (Figura 6B) y una pluralidad (Figura 6C) de electrodos de punta. Las Figuras 6B y 6C ilustran además un aspecto de la invención en el cual los electrodos de punta se separan de forma que la distancia entre centros corresponde a una distancia entre centros en una placa microtituladora estándar industrial, para facilitar la electroporación paralela en cada uno de los pocillos de la placa microtituladora.

Las Figuras 7A-D ejemplifican diferentes recipientes o placas de células para cultivar células de diferentes aspectos de la invención. La Figura 7A ilustra una placa adecuada para electroporar un único punto de células. Las Figuras 7B-D ilustran placas adecuadas en el caso en que sean electroporados una pluralidad de puntos. Las Figuras 7B y C también ilustran placas adecuadas para electroporar selectivamente pocillos individuales de un recipiente de células tal como una placa microtituladora. La Figura 7D también ilustra un recipiente de células que sería adecuado para electroporar una gran población de células, tales como en un cultivo confluyente.

Las Figuras 8A-E ilustran diferentes sistemas de electroporación de la invención con números variables de

electrodos de punta y pocillos en los recipientes de células, tales como placas microtituladoras.

Las Figuras 9A-H ilustran cómo los diferentes componentes de un sistema de electroporación de la invención pueden ser alterados en el diseño y en la función. La Figura 9A ilustra ejemplos no limitativos de cómo se puede variar el electrodo de punta. La parte conductora de la punta se puede diseñar como un cable que penetra en la pared del alojamiento definiendo la punta y se puede conectar en el exterior a una placa anular (Figura 9A), como una varilla que penetra la pared de punta en un (Figura 9B) o en ambos (Figura 9C) lados, como un cable o una varilla adhiriéndose a la punta desde la parte superior (Figura 9D), o la parte conductora se puede recubrir en el interior, y parcialmente en el exterior de la punta (Figura 9E). La punta también puede contener orificios en la región de salida de forma que el campo eléctrico se puede extender en las tres dimensiones para permitir la electroporación de células suspendidas (Figura 9F). La Figura 9G ilustra cómo se puede variar el diseño del contraelectrodo. Se le puede dar forma de un único cable o varilla o una pluralidad de ellos, como un cilindro donde el electrodo de punta se sitúa en el centro, como un cable en forma de anillo con el electrodo de punta en el medio o como un pequeño electrodo de placa. La Figura 9H ilustra diferentes modos de realización en los cuales se monta un contraelectrodo en la placa de células en vez de hacerlo en la placa de electrodos, ya sea como un electrodo sólido o como una capa conductora recubierta en la placa de células.

Las Figuras 10A-C ilustran la expulsión de la solución desde un electrodo de punta provocada por electroforesis y electroósmosis durante una aplicación de un impulso de 50 ms. El electrodo de punta contenía 100  $\mu\text{M}$  de fluoresceína en una solución tampón de pH9, a 0 ms (Figura 10A), 25 ms (Figura 10B), y 50 ms (Figura 10C).

La solución a granel en la cual se baña la punta, se tampona a un pH 4 para desactivar la fluorescencia. La corriente surge de la migración electro-osmótica/electroforética de fluoresceína en el campo eléctrico; no se aplica ninguna presión adicional.

Las Figuras 11A-C ilustran cómo los conductos microfluídicos se pueden integrar en diferentes partes de un sistema de electroporación de la invención para la distribución y el intercambio de soluciones líquidas. Por ejemplo, los conductos microfluídicos se pueden integrar en la placa de electrodos de punta (Figura 11A) o en la placa de electrodos (Figura 11B) para la administración de tapones de agentes, o para la distribución secuencial de uno o varios agentes a través de los electrodos de punta. Los conductos microfluídicos también se pueden integrar en la placa de cultivo de células como se ilustra (Figura C) para un rápido intercambio de la solución envolvente de la célula, o para un continuo lavado/perfusión de la solución en el cultivo celular.

La Figura 12 ilustra un sistema de electroporación para un aspecto de la invención, además de una placa de electrodos de punta y una placa de células, un generador de impulsos, un sistema dispensador de líquidos, y un detector.

Las Figuras 13 A-G ilustran diferentes mecanismos de posicionamiento para controlar la distancia entre el extremo del electrodo que mira al objetivo y un objetivo. La Figura 13A ilustra un aspecto de la invención en el cual se junta o se integra un electrodo de punta rígido con una porción flexible de la placa de electrodos. La Figura 13B ilustra un aspecto de la invención en el cual el electrodo de punta es flexible y se junta o integra con la placa de electrodos. La Figura 13C ilustra un aspecto de la invención en la cual se proporciona un mecanismo de posicionamiento (por ejemplo, tal como una barra vertical) el cual también proporciona una superficie eléctricamente conductora. La Figura 13D ilustra un aspecto de la invención en la cual el electrodo de punta comprende en su punta un elemento integrado de posicionamiento. La Figura 13E ilustra un aspecto de la invención en el cual un electrodo de punta comprende en su punta un elemento extraíble. La Figura 13F ilustra otro elemento de posicionamiento ejemplar de acuerdo con la invención. La Figura 13G ilustra un aspecto de la invención en el cual se proporciona un elemento de posicionamiento que comprende un extremo cónico para formar la punta.

Las Figuras 14A-E ilustran la electroporación e internalización de las células de difosfato de fluoresceína (FDP) en PC12 situadas a 50 $\mu\text{m}$  bajo un electrodo de punta. El FDP no es fluorescente hasta que se descompone en el citosol para su fluorescencia por fosfatasas. Se llenó el electrodo de punta con una solución tampón salina Hepes (pH 7,4) con 500  $\mu\text{M}$  FDP. Se electroporaron las células con 5x10 impulsos, 3mA, de 100 ms de duración con un tiempo de retardo de 100 ms entre impulsos. La Figura 14A es una imagen en campo claro del cultivo celular y la Figura 14B ilustra el mismo cultivo en fluorescencia tras la electroporación. Las Figuras 14C-E ilustran simultáneamente la electroporación paralela de dos puntos de células en el mismo cultivo celular. Se electroporaron las células PC-12 con 500  $\mu\text{M}$  FDP en una solución tampón salina Hepes (pH 7,4) con un tren de impulsos de 4 mA de 20 impulsos de una duración de 100 ms y un tiempo de retardo entre impulsos de 100 ms. La distancia entre los electrodos de punta y el cultivo celular fue aproximadamente de 100  $\mu\text{m}$ . La Figura 14C es una imagen en campo claro del cultivo celular; la Figura 14D es una imagen fluorescente del cultivo y del extremo del electrodo de punta que mira al objetivo antes de la electroporación. La figura 14 E muestra la fluorescencia del mismo cultivo después de la electroporación.

#### Descripción detallada

La invención proporciona profundos electrodos de punta para la distribución espacialmente localizada de sustancias a uno o más objetivos biológicos presentes en una población que comprende moléculas, macromoléculas y/o células objetivo y no objetivo. La invención también proporciona placas de electrodos para recibir una o más de tales puntas,

placas de electrodos de punta que comprenden placas de electrodos que comprenden uno o más electrodos de punta, y sistemas que comprenden electrodos de punta y recipientes para contener uno o más objetivos biológicos, como por ejemplo, moléculas, macromoléculas, y/o células. Se divulgan además métodos para usar dichos sistemas y componentes de los mismos. En un aspecto preferido, se usan los sistemas para la electroporación espacialmente confinada de células y estructuras celulares. La invención facilita un filtrado de alto rendimiento de los agentes (por ejemplo, como los fármacos) que actúan sobre los objetivos intracelulares.

#### Definiciones

Se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos que se usan en la siguiente descripción escrita.

10 Tal y como se usa en la memoria y en las reivindicaciones, la forma singular “un”, “una” y “el”, “la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto claramente dictamine otra cosa. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de ellas. El término “una proteína” incluye una pluralidad de proteínas.

15 Un microcanal, como se usa aquí, hace referencia a un surco en un sustrato que comprende dos paredes, una base, al menos una entrada y al menos una salida. En un aspecto, un microcanal también tiene un techo. El término “micro” no implica un límite menor en tamaño, y el término “microcanal” se usa generalmente de forma intercambiable con “canal”. Preferiblemente, un microcanal oscila en tamaño entre en torno a 0,1  $\mu\text{m}$  y en torno a 1000  $\mu\text{m}$ , siendo más preferible una gama desde, 1  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

20 Como se usa aquí, “la exploración de un objetivo relativa a uno o más canales en un sustrato microfluídico” hace referencia a la exposición del objetivo a una pluralidad de corrientes fluidas desde al menos un canal en el sustrato. Esto se puede conseguir desplazando un objetivo pasando uno o más salidas de canales en un sustrato estacionario que proporciona tales corrientes o mediante el desplazamiento del sustrato relativo a un objetivo estacionario de forma que sea expuesto a corrientes de una o más salidas de canales del sustrato. Se puede lograr también la exploración desplazando tanto el sustrato como el objetivo. Se puede conseguir la exposición de una pluralidad de corrientes fluidicas desde un único conducto proporcionando diferentes corrientes fluidicas (es decir, que comprendan diferentes agentes, o diferentes dosis del mismo agente, o alterando el flujo de la solución tampón y el flujo de la corriente fluidica que contiene un agente, o algunas combinaciones de ellas) desde un único conducto y/o mediante la detención intermitente del flujo de fluido desde una salida del conducto en proximidad con el objetivo. En un modo de realización donde el objetivo es estacionario, se puede realizar la exploración variando la presión de uno o más canales. Se pueden usar combinaciones de los anteriores mecanismos de exploración durante un proceso de exploración y son obvias las variantes de tales combinaciones y quedan comprendidas dentro del alcance de la invención.

35 “Proteína”, tal y como se usa aquí, significa cualquier proteína, incluyendo, pero no estando limitada, a enzimas, glicoproteínas, hormonas, receptores, antígenos, anticuerpos, factores de crecimiento, etc., sin limitación. Actualmente, las proteínas preferidas incluyen aquellas comprendidas en al menos 25 residuos aminoácidos, más preferiblemente en al menos 35 residuos aminoácidos y aún más preferiblemente en al menos 50 residuos aminoácidos. Se usan aquí generalmente los términos “polipéptido” y “proteína” de forma intercambiable para hacer referencia a un polímero de residuos aminoácidos.

40 Como se usa aquí, un “polipéptido” hace referencia a una pluralidad de aminoácidos unidos con enlaces péptidos. Los aminoácidos pueden incluir D-, L-aminoácidos, y combinaciones de ellos, así como formas modificadas de ellos. Como se usa aquí, un polipéptido es mayor que alrededor de 20 aminoácidos. El término “polipéptido” se usa generalmente de forma intercambiable con el término “proteína”; sin embargo, también se puede usar el término polipéptido para hacer referencia a una proteína menor que la longitud completa (es decir, una proteína fragmentada) que es mayor que 20 aminoácidos.

45 Como se usa aquí, el término “receptor” hace referencia a una macromolécula capaz de interactuar específicamente con una molécula aglutinante. Los receptores pueden estar asociados con membranas de bicapa lipídica, tales como membranas celulares, golgi, mitocondrias, o membranas nucleares, o pueden estar presentes como moléculas libres o asociadas en un citoplasma de la célula, o pueden estar inmovilizadas en un sustrato.

50 Como se usa aquí, el término “en comunicación con” hace referencia a la habilidad de un sistema o componente de un sistema para recibir datos de entrada desde otro sistema o componente de un sistema y para proporcionar una respuesta de salida como respuesta a los datos de entrada. La “salida” puede estar en forma de datos, o puede estar en forma de una acción tomada por el sistema o componente del sistema. Por ejemplo, un procesador “en comunicación con un mecanismo de exploración” envía instrucciones de programa en forma de señales a un mecanismo de exploración para controlar diversos parámetros de exploración como se ha descrito anteriormente. Un “detector en comunicación con una cámara de mediciones” hace referencia a un detector en suficiente proximidad óptica a la cámara de mediciones para recibir señales ópticas (por ejemplo, luz) desde la cámara de mediciones. Una “fuente de luz en comunicación óptica” con un objetivo hace referencia a una fuente de luz en suficiente proxi-

alidad al objetivo para crear un camino de luz desde el objetivo a un detector del sistema de forma que se pueden detectar las propiedades ópticas del objetivo mediante el detector.

Como se usa aquí, “una respuesta cuantificable” hace referencia a una respuesta que difiere significativamente del fondo según se determina usando controles adecuados para una técnica dada.

5 Como se usa aquí, el término “electrodo” hace referencia a un dispositivo que transmite o conduce señales eléctricas.

10 Como se usa aquí, un electrodo de punta “a corta distancia de un objetivo” o en “proximidad a un objetivo”, significa que el extremo de salida del electrodo de punta se sitúa a una distancia adecuada de un objetivo (por ejemplo, una célula o estructura celular) para cambiar temporalmente las propiedades eléctricas (es decir, cambiar las propiedades dieléctricas y crear poros en una membrana celular). Preferiblemente, dicha distancia corta es menor que 1mm.

Como se usa aquí, el término “solución electrolítica”, hace referencia a la solución del interior del electrodo de punta. Se usa el término sin limitaciones a la composición real o a la fuerza iónica del electrolito.

Como se usa aquí, el término “solución de baño” hace referencia a la solución o medio que rodea a una célula o estructura celular.

15 Como se usa aquí, un “campo eléctrico enfocado sobre al menos un objetivo” o “campo eléctrico enfocado sobre al menos una célula o estructura celular”, significa que se enfoca el campo eléctrico sobre uno o varios objetivos/célula o células/estructuras celulares cuyas propiedades eléctricas se alteran esencialmente sin afectar a ningún objetivo/células/estructuras celulares circundantes.

20 La expresión “una fuerza suficiente para obtener la descomposición dieléctrica y formación de poros”, significa que el campo eléctrico es esencialmente exacto al que es necesario para la electroporación.

Como se usa aquí, un campo eléctrico “enfocado de forma elevada” hace referencia a un campo eléctrico confinado espacialmente el cual la mayoría de las veces no es uniforme en intensidad en ninguna de las dimensiones axiales o laterales.

25 Como se usa aquí, campo eléctrico “ajustable” hace referencia a un campo eléctrico que puede ser alterado con respecto a polaridad, fase, frecuencia, amplitud (tensión o corriente) o tiempo.

Como se usa aquí, la electroporación “confinada espacialmente” hace referencia a la electroporación de dominios seleccionados tales como un grupo de células en una superficie o en una solución donde no se tratan otros grupos de células en la misma solución o en la misma superficie.

30 Como se usa aquí, el término “membrana biológica” hace referencia a una bicapa lipídica que rodea un compartimento biológico, e incluye las membranas de células naturales o artificiales (por ejemplo, tales como liposomas), vesículas membranales o partes de ellas. El término “membrana biológica” abarca una membrana que rodea una célula entera (es decir, una membrana celular), una parte de una célula, una célula artificial, o una porción de una célula artificial, y abarca además una membrana de un orgánulo.

35 Como se usa aquí, el término “vidrio” hace referencia a cualquiera de la gran clase de materiales que están formados típicamente mediante fusión de silicatos con óxido de boro, óxido de aluminio o pentóxido de fósforo, pero no limitado a ellos.

40 Como se usa aquí, un “sustrato sustancialmente plano o placa que comprende un elemento no plano para alterar propiedades eléctricas de un objetivo” hace referencia a un sustrato que comprende un elemento cuya superficie se eleva o deprime en relación con la superficie de un sustrato, donde el elemento comprende al menos dos puntos que yacen en diferentes planos relativos a la superficie del sustrato sustancialmente plano y relativos entre sí.

#### **Sistemas de detección y distribución.**

45 Los sistemas de la invención comprenden al menos un electrodo de punta y un recipiente que recibe un objetivo para ser expuesto selectivamente a un campo eléctrico producido por un electrodo de punta para alterar las propiedades del objetivo. Por ejemplo, se puede usar un electrodo de punta de la invención para alterar las propiedades dieléctricas de una membrana celular o intracelular en su proximidad, creando así poros en la membrana.

50 Además, los electrodos de punta de la invención también proporcionan un dispositivo de distribución para distribuir agentes o alterar condiciones de una solución en la cual se baña un objetivo (por ejemplo, tal como pH, fuerza iónica, etc.). Como se ilustra en las Figuras 2A-C, en un aspecto, los electrodos de punta tienen propiedades tanto de una punta de pipeta como de un electrodo. Combinando estas propiedades, se puede coordinar la generación de un campo eléctrico por un electrodo con la distribución de un electrodo de punta y un agente, de una forma que

optimice la exposición del campo eléctrico (por ejemplo la creación de poros en una membrana celular) e interacciones con el agente (es decir, internalización del agente a través de los poros).

5 En un aspecto preferido, el sistema comprende adicionalmente una placa de electrodos para recibir al menos un electrodo de punta. La placa de electrodos, en combinación con una pluralidad de electrodos de punta, puede proporcionar una ordenación de electrodos de punta para exposiciones simultáneas o secuenciales (o alguna combinación de tales exposiciones) a un campo eléctrico y/o agente.

10 En funcionamiento, se acopla el dispositivo a una fuente de alimentación para distribuir corriente o tensión, y preferiblemente a una bomba para permitir la distribución precisa de cantidades de agentes. Ver, por ejemplo, la Figura 1. Además, para una óptima eficiencia se puede acoplar la robótica al dispositivo para pipetear de forma automatizada y un sistema de lectura de placa para obtener lecturas. A continuación se describen con más detalle los componentes del los sistemas de la invención.

#### Electrodos de punta

15 Un electrodo de punta comprende un alojamiento que define un lumen para la distribución de un agente y/o para la alteración de una condición en el entorno de la solución de un objetivo. El alojamiento puede ser en forma de un capilar corto, un tubo pequeño o una punta de pipeta. Los materiales adecuados del alojamiento incluyen, pero no están limitados a ellos: vidrio, sílice fundida, plástico, cerámica, elastómero, polímero, metal, o cualquier otro material preferiblemente eléctricamente no conductor. En un aspecto, el alojamiento del electrodo de punta comprende un extremo que mira al objetivo que comprende una abertura a través de la cual se puede distribuir un agente. El electrodo de punta comprende adicionalmente una superficie sólida eléctricamente conductora para exponer a un objetivo a un campo eléctrico en proximidad al extremo que mira al objetivo y al electrodo de punta.

20 Preferiblemente, el lumen del electrodo de punta comprende un medio no sólido eléctricamente conductor. El medio conductor no sólido puede ser un líquido, una pasta, un polímero, un medio semi-sólido como un gel, una resina, y similares. En un aspecto, el medio no sólido conductor es una solución electrolítica. En otro aspecto, el medio comprende una solución tampón fisiológica. En otro aspecto, el medio comprende uno o más agentes, que se pueden distribuir a un objetivo a través de las aberturas del extremo que mira al objetivo del electrodo de punta. Se puede lograr la inyección, o llenado, de los electrodos de punta usando técnicas estándar. Por ejemplo, se puede inyectar la solución electrolítica en la punta desde la abertura en el extremo que mira al objetivo del alojamiento o desde la abertura trasera del extremo del alojamiento distal al extremo que mira al objetivo ("el extremo que recibe"). Se pueden usar flujos por gravedad, bombeo basado en presiones o algunos otros medios.

30 Preferiblemente, la distribución de un agente se sincroniza con la distribución de una corriente o tensión conducidas desde la superficie eléctricamente conductora a través del medio.

35 La superficie eléctricamente conductora puede ser un elemento extraíble desde el alojamiento o puede ser un elemento integrado con el alojamiento. Véase, por ejemplo, la Figura 9D. En un aspecto, la superficie eléctricamente conductora del electrodo de punta tiene forma de varilla, cilindro, cable, u otra estructura eléctricamente conductora conformada para ajustarse al interior del lumen del electrodo de punta. Por ejemplo, se puede insertar la estructura eléctricamente conductora en el extremo receptor del alojamiento y en contacto con el medio eléctricamente conductor en el lumen del alojamiento. La superficie eléctricamente conductora se puede acoplar a una fuente de alimentación a través de una o más conexiones en el extremo receptor para transmitir un impulso de tensión o de corriente a través del medio eléctricamente conductor. También puede haber una abertura en el extremo receptor en comunicación con un sistema dispensador de líquido para sincronizar la generación de un campo eléctrico mediante el electrodo de punta con la distribución de uno o más agentes desde el extremo que mira al objetivo del alojamiento. Sin embargo, la estructura eléctricamente conductora se puede situar en cualquier parte del interior del lumen del alojamiento del electrodo de punta.

45 En otro aspecto, la parte conductora de la punta también puede ser un cable que penetre la pared del alojamiento. Por ejemplo, la estructura eléctricamente conductora puede ser un cable que se conecte en el exterior del alojamiento a una placa anular (Figura 9A), o una varilla que penetre la pared del alojamiento en uno (Figura 9B) o ambos lados (Figura 9C).

50 Sin embargo, en un aspecto adicional, la superficie eléctricamente conductora del electrodo de punta es parte del mismo alojamiento. Por ejemplo, las paredes interiores del alojamiento pueden comprender una superficie que es al menos parcialmente conductora y que está en contacto con la solución electrolítica. Véase, por ejemplo, la Figura 9E.

55 Se pueden disponer las superficies de electrodos en el alojamiento en un número no limitado de formas. Por ejemplo, se puede recubrir un alojamiento que comprende un material conductor con una película aislante en el exterior. También es posible recubrir el interior del alojamiento que comprende material no conductor con cualquier material conductor, no limitado a metales o polímeros conductores. Se puede recubrir el interior del alojamiento entera o parcialmente con un polímero conductor. En un aspecto, se puede recubrir el extremo que mira al objetivo

del alojamiento. A través de la superficie conductora del alojamiento y a través de la solución electrolítica se transporta una conexión eléctrica al alojamiento que distribuye un campo eléctrico enfocado a un objetivo.

5 El alojamiento puede comprender un diámetro variable exterior y/o interior, proporcionando un extremo cónico que mira al objetivo. Alternativamente, el alojamiento puede comprender un segundo extremo cilíndrico. Es posible usar cualquier diseño en el extremo que mire al objetivo y variaciones en los diámetros interior y/o exterior del alojamiento que optimiza el campo eléctrico generado por el electrodo de punta, en la forma más adecuada para un objetivo particular. Por ejemplo, el diseño del extremo de la punta se puede modificar en el número y tamaño de las células para ser electroporado mediante el electrodo de punta.

10 La Figura 4 ilustra ejemplos no limitativos de cómo se puede variar la geometría del extremo del electrodo de punta que mira al objetivo. La fila superior ilustra electrodos de punta con diámetros interiores uniformes y diámetros exteriores variables, es decir, diámetros exteriores uniformes, que se estrechan o que se expanden. La fila inferior ilustra electrodos de punta con diámetros interiores que se estrechan y diámetros exteriores que se estrechan, son uniformes, o que se expanden.

15 Preferiblemente, la longitud de un electrodo de punta es menor que en torno a 50 cm, menor que en torno a 25 cm, menor que en torno a 10 cm, menor que en torno a 5 cm, menor que en torno a 1 cm, menor que en torno a 500 μm, menor que en torno a 200 μm, menor que en torno a 100 μm, 10 μm, o incluso menor que en torno a 1 μm dependiendo de la aplicación. Generalmente, el diámetro de la abertura del extremo de un electrodo de punta que mira al objetivo es desde alrededor de un nanómetro a varios miles de micrómetros, tales como 50 nm a 5000 μm. Para la electroporación de pequeñas poblaciones de células, a menudo es adecuado usar puntas con un diámetro interior entre 50 y 2000 μm y un diámetro exterior entre 60 y 5000 μm, mientras que para la electroporación de células simples y orgánulos, son adecuadas puntas con un diámetro exterior de 0,03-50 μm y un diámetro interior de 0,025-49 μm.

25 Se pueden generar electrodos de punta usando una variedad de métodos de fabricación. Se pueden generar, por ejemplo, electrodos de punta usando dispositivos de extracción estándares equipados con un filamento que funde un material inicialmente alargado y que estira el material para formar una punta que tenga las dimensiones apropiadas. Para materiales con muy altas temperaturas de fusión como cuarzo o sílice fundido, se usan preferiblemente dispositivos de extracción equipados con un láser de dióxido de carbono o con filamentos de Tántalo. Tales métodos de fabricación son ideales para producir un pequeño número de nanoelectrodos. Alternativamente, se pueden usar para micro-fabricar una punta de dimensiones adecuadas, ataques químicos o de llama, procesos de deposición química o no química de vapor, expansión térmica, técnicas de polimerización tales como electropolimerización o implantación iónica. En ciertos aspectos, analizados más adelante, se fabrican los electrodos de punta como un componente integral de una placa de electrodos.

35 Se pueden usar los electrodos de punta de la invención para la distribución intracelular de uno o más agentes de membrana impermeable. Un impulso eléctrico aplicado a través de un electrodo de punta da lugar a un pequeño campo eléctrico enfocado y sintonizable fuera del término del electrodo de punta. Cuando el electrodo de punta se sitúa a una distancia adecuada desde una membrana, tal como una membrana celular o una membrana de un orgánulo intracelular, este campo eléctrico es suficiente para provocar la formación de poros en la membrana.

40 El campo eléctrico creado en el exterior de un electrodo de punta lleno de electrolito se puede estimar usando la solución del problema electroquímico de cálculo del cambio potencial en la solución en frente de un electrodo de disco circular en un plano aislante con densidad de corriente constante (Nanis y Kesselmann, J. Electrochem. Soc. 118: 454-461, 1971). La magnitud del campo eléctrico que se propaga en la solución a través del eje de simetría del electrodo de punta viene dada por:

$$E(Z, \Psi) = \frac{\Psi}{L_c} \left[ \frac{Z}{\left[1 + (Z)^2\right]^{\frac{1}{2}}} - 1 \right] \quad (3)$$

Donde Z es la distancia adimensional desde el exterior del electrodo de punta, z/a, donde z es la distancia desde el exterior y a es el radio del electrodo de punta. Ψ es el potencial aplicado en voltios y L<sub>c</sub> es la longitud del electrodo de punta. Esta ecuación se puede integrar para hallar la caída de potencial a lo largo del eje cilíndrico en el exterior del electrodo de punta:

$$V(Z) = \frac{a\Psi}{L_c} \left( (Z^2 + 1)^{\frac{1}{2}} - Z \right) \quad (4)$$

La potencia del campo eléctrico de la ecuación 3 se puede insertar en la ecuación 1 para cálculos del potencial transmembranal sobre la membrana celular.

Variando las dimensiones del electrodo de punta, o de los parámetros del campo eléctrico, se puede alterar el área afectada por el campo eléctrico, y por tanto, para aplicaciones celulares, se pueden controlar el número de células que se marcan como objetivo o se exponen al campo eléctrico y la distribución de líquido en el electrodo de punta. Por tanto, se pueden marcar como objetivo una única célula, una pluralidad de células aisladas, o una gran población de varios millones de células. La punta también puede contener orificios en la parte de la punta próxima al extremo que mira al objetivo de forma que se puede propagar el campo eléctrico en tres dimensiones para permitir la electroporación de las células suspendidas. Ver, por ejemplo, la Figura 9F.

En un aspecto preferido, los electrodos de punta están en comunicación eléctrica con uno o más contraelectrodos. El contraelectrodo se puede desplazar con respecto al electrodo de punta, es decir, en dos, o tres dimensiones. En otro aspecto, el electrodo de punta se puede desplazar con respecto al contraelectrodo. En otro modo de realización más, uno o ambos electrodos de punta y contraelectrodos se pueden desplazar con respecto a un objetivo. En un modo de realización adicional, el contraelectrodo está en una relación fija con respecto al electrodo de punta.

La Figura 9B ilustra ejemplos no limitativos de cómo se puede variar el diseño del contraelectrodo. Se le puede dar forma de un único o una pluralidad de cables o varillas, como un cilindro donde el electrodo de punta se sitúa en el centro, como un cable en forma de anillo con el electrodo de punta en el centro o como un pequeño electrodo de placa. La Figura 9C ilustra un contraelectrodo de otro aspecto de la invención, montado en un recipiente para contener objetivos para la electroporación/distribución de agente. Se puede proporcionar el electrodo como un elemento discreto dentro del recipiente o como una capa conductora recubierta sobre una placa para contener objetivos tales como células.

Placas de Electrodos y Conjunto de Puntas.

La invención proporciona además una placa de electrodos para recibir uno o más electrodos de punta. Los electrodos de punta pueden ser extraíbles de la placa de electrodos, o integrados como parte de ella. Las placas de electrodos proporcionan un medio para interconectar los electrodos de punta con dispositivos a macroescala tales como fuentes de alimentación, sistemas de distribución fluidica, bombas, y similares. En un aspecto, una placa de electrodos puede formar la interconexión entre los electrodos de punta y el generador de impulsos. Una placa de electrodos puede conducir la misma corriente/potencial a todos los electrodos de punta del sistema o tratar cada electrodo de punta individualmente.

En un aspecto, una placa de electrodos comprende una pluralidad de electrodos de punta para dirigirse a múltiples objetivos simultáneamente y/o para dirigirse consecutivamente a un único objetivo (por ejemplo, desplazando la placa de electrodos de forma que se expone el objetivo en secuencia a una pluralidad de electrodos de punta).

En un aspecto preferido, se configura una pluralidad de electrodos de punta en una única fila como una ordenación lineal. En otro aspecto, se configura la pluralidad de electrodos de punta en una pluralidad de filas formando una matriz de dos dimensiones. Generalmente, se pueden configurar los electrodos de punta sobre una placa de electrodos de cualquier manera que facilite la exposición de uno o más objetivos a los campos eléctricos y/o agentes en una manera espacialmente confinada y altamente enfocada. En un aspecto, las puntas se configuran para generar campos eléctricos enfocados en puntos en los que se localizan los objetivos. Por ejemplo, se pueden disponer las puntas en la placa de electrodos de forma en que la distancia entre centros de las puntas corresponde a la distancia entre centros de una placa microtitulada estándar industrial. Se pueden configurar otras disposiciones adecuadas basadas en la estructura de un recipiente objetivo, por ejemplo, como una placa petri, un recipiente multipocillo, y similares.

Como la distancia entre los extremos que miran al objetivo de los electrodos de punta puede ser muy pequeña, sólo unos cuantos micrómetros, se puede lograr una elevada resolución espacial de los diferentes objetivos.

La Figura 2B ilustra una ordenación lineal de los electrodos de punta alineados para electroporaciones paralelas de objetivos, tales como células, en una pluralidad de pocillos/puntos en un recipiente objetivo. La Figura 2C ilustra una ordenación matricial de dos dimensiones de electrodos de punta para la electroporación de una pluralidad de células contenidas en una pluralidad de pocillos o puntos de células. Los números en A, B y C ilustran una forma modular de electrodos de punta y de placa de electrodos donde los componentes son extraíbles entre sí. Por tanto, se puede ensamblar una punta (1) de pipeta; una estructura eléctricamente conductora (el componente electrodo del electrodo de punta); y un bastidor de montaje o placa (3) para recibir un bastidor de montaje para una pluralidad de electrodos de punta, de forma que se pueden usar estos tipos diferentes de electrodos de punta con diferentes placas de electrodos. Se pueden usar las diferentes placas de electrodos con uno o más tipos diferentes de puntas y se pueden usar diferentes configuraciones de estructuras de electrodos con un tipo único de alojamiento para un electrodo de punta.

Si se emplean electrodos de punta extraíbles, una placa de electrodos puede proporcionar alineaciones verticales de los electrodos de punta a una altura específica sobre una superficie que contiene un objetivo. La placa de electrodos puede albergar también uno o varios contraelectrodos. El diseño de la placa de electrodos puede variar dependiendo del número de electrodos de punta y de la aplicación. Para electrodos de punta extraíbles, se puede diseñar la placa

de electrodos como se ilustra en las Figuras 5A-C, con diferentes capas de materiales conductores y aislantes.

Las Figuras 5A-C, ilustran la placa de electrodos para recibir a los electrodos de punta ilustrados en la figura 2 y que son ejemplo de electrodos de punta extraíbles. La Figura 5A ilustra una placa de electrodos con una abertura para recibir un único electrodo de punta. La Figura 5B ilustra una placa de electrodos con aberturas para una ordenación lineal de electrodos de punta y la Figura 5C ilustra una ordenación matricial de dos dimensiones de electrodos de punta. Se puede diseñar la placa de electrodos con cualquier número deseado de aberturas y con cualquier distancia deseada entre centros, por ejemplo, para ajustar placas de microtitulación con varios números de pocillos. Se pueden fabricar los dos tipos de capas de la placa de electrodos (conductora y aislante) y un contraelectrodo, en cualquier tipo de material siempre que se cumplan sus características basales, es decir, tengan respectivamente una capa aislante y conductora. El número de contraelectrodos varía según la aplicación. El número normalmente tiene correlación con el número de pocillos/objetivos que se exponen al campo eléctrico (es decir, que se electroporan) y no con el número de electrodos de punta. Para electroporaciones paralelas de células o estructuras celulares en pocillos separados, se proporciona preferiblemente cada electrodo de punta con un contraelectrodo. Para electroporar dos o más puntos sobre una superficie en un depósito que contiene una célula, pueden funcionar varios electrodos de punta contra uno o unos cuantos contraelectrodos puestos a tierra. Consecuentemente, la aplicación determina el número de contraelectrodos que se necesita proporcionar.

La placa de electrodos contiene también contactos en las capas conductoras para el acoplamiento a un generador de corriente o tensión, ilustrado mediante dos tornillos.

Se pueden usar ejemplos no limitativos de diferentes materiales de sustrato para la capa conductora de la placa incluidos materiales semiconductores cristalinos (por ejemplo, silicio, nitruro de silicio, Germanio, Arseniuro de Galio) metales (por ejemplo, Aluminio, Níquel), vidrio, cuarzo, aislantes cristalinos o amorfos, cerámicas, plásticos, otros polímeros (por ejemplo, un fluoropolímero, como el Teflón<sup>®</sup>, polimetilmetacrilato, polidimetilsiloxano, polietileno, polipropileno, polibutileno, polimetilpenteno, poliestireno, poliuretano, polivinilcloruro, poliarilato, poliarilsulfona, policaprolactona, poliester carbonato, poliimida, policétido, polifenilsulfona, poliftalamida, polisulfona, poliamida, poliéster, polímeros epoxi, termoplásticos, y similares), otros materiales orgánicos e inorgánicos, y combinaciones de ellos.

Las técnicas de microfabricación son ideales para producir ordenaciones muy grandes de dispositivos de electrodos. Por ejemplo, se pueden manufacturar dispositivos de electrodos que comprenden electrodos de punta mediante procesos directos de un material conductor en estado sólido. Los materiales adecuados en estado sólido incluyen, pero no están limitados a ello, materiales de carbono, óxido de indio y estaño, óxido de iridio, níquel, platino, plata, u oro, otros metales y aleaciones de metal, polímeros conductores sólidos o fibras de carbono metalizadas, además de materiales en estado sólido con adecuadas propiedades eléctricas y mecánicas. En un aspecto, el dispositivo de electrodos comprende un material de carbono eléctricamente conductor, como el carbono plano basal, grafito pirolítico (BPG), o carbono vítreo.

En un aspecto, para crear dispositivos a nanoescala, se construyen ordenaciones en un sustrato semiconductor drogado mediante nanolitografía usando sondas exploradoras STM o AFM. Por ejemplo, se pueden depositar agrupaciones de metal tanto de una solución como mediante la evaporación de campo desde una punta de un Microscopio de Túnel de Barrido/Microscopio de Fuerza Atómica (STM/AFM) sobre dicho sustrato. Se puede oxidar la superficie del semiconductor de forma que se aísla sustancialmente toda la superficie excepto las puntas que sobresalen desde la superficie, las cuales están en contacto con las células, y minimizan por tanto el ruido de los electrodos.

También se pueden fabricar las placas de electrodos que comprenden electrodos de punta mediante un ataque químico o de llama, procesos de deposición de vapor, litografía, o similares.

En un aspecto adicional de la invención, el sustrato comprende un material eléctricamente no conductor en el que se perforan orificios o aberturas, por ejemplo, mediante luz láser, descargas eléctricas técnicas de nanofabricación basadas en litografías como puede ser la litografía de haz de electrones, o mediante perforación o voladura. Se llenan las aberturas con un medio eléctricamente conductor y preferiblemente un material conductor en estado sólido, como son las fibras de carbono o los polímeros o metales eléctricamente conductores. En un aspecto, se recubre el sustrato con un material eléctricamente conductor (por ejemplo, tal como un recubrimiento metálico), y se elevan los bordes de los orificios para formar puntas cónicas para la inserción en las membranas celulares. En otro aspecto, sólo son eléctricamente conductores los bordes elevados de las aberturas. En un aspecto adicional, sólo son eléctricamente conductoras las superficies de las aberturas que contienen células.

En las Figuras 6A-C se ilustran los electrodos de punta extraíbles insertados en una placa de electrodos para una única ordenación única, lineal y una matriz de dos dimensiones de electrodos de punta. Las Figuras 6A-C ilustran electrodos de punta montados en la placa de electrodos para un único (A), unos cuantos (B), y una pluralidad (C) de electrodos de punta. Las Figuras 6B y 6C ilustran para cada electrodo de punta la electroporación en pocillos individuales.

En las Figuras 3A-C se ilustra un modo de realización diferente. Como se ilustra en la Figura, se puede manufacturar una cantidad deseada de electrodos de punta paralelos como una única unidad comprendiendo una placa sustancialmente plana con elementos no planos fabricados en ella, formando los elementos no planos electrodos de punta. Como se ilustra en las Figuras, se puede separar la placa en diferentes capas.

- 5 En un aspecto, la capa superior de la placa contiene un depósito para distribuir un agente en un objetivo. Preferiblemente, el depósito comprende una superficie o estructura eléctricamente conductoras. Se pueden realizar las paredes interiores de los depósitos de un material conductor de forma que el depósito entero actúa como un electrodo, o el electrodo puede constituir un cable, varilla u otro tipo de estructura eléctricamente conductora, expuesta en cada pocillo. La segunda capa comprende regiones, preferiblemente espaciadas a intervalos regulares, que se elevan sobre el resto de la placa formando elevaciones, o puntas, que tienen aberturas centradas sobre cada depósito en la primera capa. Estas regiones elevadas comprenden paredes interiores que definen lúmenes que se comunican con los depósitos. Preferiblemente, los lúmenes comprenden un medio eléctricamente conductor para transmitir tensión o corriente desde el electrodo y desde los depósitos que contienen el agente. Más preferiblemente se hacen cónicos los extremos de los elementos no planos distales de la placa para facilitar la distribución localizada del agente desde el depósito.

Como se ilustra en las Figuras 3A-C, se puede añadir una tercera capa para proporcionar un contraelectrodo. En un aspecto, cada elemento no plano que forma un electrodo de punta incluye una capa de contraelectrodos. Tal configuración es adecuada, por ejemplo, usando las puntas para proporcionar campos eléctricos a pocillos individuales de una placa microtituladora, es decir, para realizar la electroporación. Alternativamente, se pueden proporcionar uno o unos cuantos contraelectrodos para la electroporación de varios puntos o localizaciones, por ejemplo, en un cultivo celular confluyente. En este aspecto, se puede posicionar el contraelectrodo en el fondo de un recipiente de objetivos que contiene múltiples elementos no objetivos (es decir, células no objetivos) a lo largo de uno o mas elementos objetivos (es decir, células objetivo). Por ejemplo, se puede posicionar el contraelectrodo en el fondo de una placa de cultivo u otro sustrato. Se pueden acoplar los electrodos de punta y un único, o una pluralidad de contraelectrodos, a un único o a varios generadores de corriente o tensión para la distribución del campo o campos eléctricos. Se pueden proporcionar uno o varios contraelectrodos para la electroporación de varios puntos o localizaciones, por ejemplo, en un cultivo celular confluyente. En este aspecto, se puede posicionar el contraelectrodo en el fondo de un recipiente de objetivos que contiene múltiples elementos no objetivo (es decir, células no objetivo) a lo largo de uno o más elementos objetivo (es decir, células objetivo). Por ejemplo, se puede posicionar el contraelectrodo en el fondo de una placa de cultivo u otro sustrato. Se pueden acoplar los electrodos de punta y un único, o una pluralidad de contraelectrodos, a un único o a varios generadores de corriente o tensión para la distribución del campo o campos eléctricos.

Las Figuras 3A-C ilustran un ejemplo de un modo de realización donde los electrodos de punta se disponen en paralelo en una placa. La placa consiste en tres placas diferentes donde (1) contiene pocillos que actúan tanto como electrodos como depósitos electrolíticos y que están fabricados al menos en parte con un material conductor, (2) es una capa no conductora con puntas paralelas que corresponden a los pocillos en (1), y (3) es una capa de contraelectrodos, ilustrada aquí con contraelectrodos circulares individuales para cada electrodo de punta. La Figura 3A es un primer plano de un electrodo de punta individual fabricado de esta forma y la Figura 3B ilustra una placa con una matriz de dos dimensiones de electrodos de punta paralelos. El número de capas y diseño de los electrodos puede variar dependiendo de que sea más adecuada una superficie de electrodo mayor o menor. Por ejemplo, se puede moldear o montar un filamento en la placa, exponiendo la misma superficie de electrodo en todos los electrodos de punta.

Adicionalmente, se puede proporcionar un sistema de canales microfluídicos en la capa más superior de la placa de electrodos de punta. Dichos canales pueden facilitar aplicaciones de distribución más avanzadas, por ejemplo, distribución de soluciones tampón de agentes, separadas por una solución tampón, o distribuciones secuenciales de varios agentes diferentes, etc. A continuación se tratarán en más detalle las aplicaciones microfluidicas.

#### Recipientes de Objetivos

Como se ha descrito anteriormente, el sistema de la invención comprende preferiblemente un recipiente de objetivos para contener uno o más objetivos para la exposición a campos eléctricos y agentes o condiciones proporcionadas mediante electrodos de punta o placas de electrodos. Aunque se hace referencia a un "recipiente" el recipiente de objetivos no comprende necesariamente paredes sino que puede ser proporcionado un sustrato sustancialmente plano, tal como un portaobjetos de vidrio, un chip microfluidico, o una membrana donde los objetivos están relativamente localizados, es decir, asociados establemente con una localización sobre el sustrato durante un tiempo suficiente para ser detectados como objetivos y expuestos a un campo eléctrico y/o a la distribución de un agente.

55 En un aspecto, se rodea un objetivo con una pluralidad de elementos no objetivo, por ejemplo, el objetivo es una o más células de una población de células en suspensión, adheridas al fondo de una placa de cultivo, o una tira de tejido o un explante de tejido. Las células pueden proceder de cultivos celulares primarios o establecidos, o de tejidos diseccionados. En un aspecto, el recipiente de objetivos comprende una placa microtituladora.

En las Figuras 7A-D se ilustran ejemplos de placas de tamaño variable y de un número variable de pocillos. Las Figuras ejemplifican placas diferentes para cultivar células antes y/o después de la electroporación dependiendo de si se ha de electroporar un único punto (Figura 7A) o varios puntos (Figuras 7B-D) y de si se usan pocillos individuales (Figuras 7B y C) o grandes cultivos confluentes (Figura 7D).

- 5 Preferiblemente se usan placas que se ajustan a las estaciones de trabajo automatizadas disponibles comercialmente, tales como estaciones de pipeteo robotizadas o lectores de placa. Las células pueden crecer como cultivos confluentes o en modelos diseñados definidos por la química de superficie o la topografía de superficie de una placa celular o por ambas. Para lecturas óptimas de experimentos de electroporación, se fabrica preferiblemente una placa de cultivo celular con material óptimamente transmisor. También es posible diseñar placas de cultivo de  
10 células con canales microfluídicos integrados, para una distribución líquida más avanzada, por ejemplo, para lavar o superfusionar células electroporadas con una solución tampón o para suministrar fármacos a las células en una forma controlada. A continuación se describirán soluciones microfluídicas con más detalle.

#### Canales Microfluídicos

- 15 Varias partes del sistema de detección de objetivos/distribución pueden incluir canales microfluídicos para la distribución de una solución líquida, por ejemplo, la placa de cultivo celular, la placa de electrodos, si se emplean electrodos de punta extraíbles, o la placa de electrodos de punta. Se pueden diseñar y dirigir redes de electrodos conductores y canales microfluídicos para distribuir y/o la distribución de líquidos a cualquier número de electrodos de punta escogidos montados o fabricados como parte de una placa de electrodos. Adicionalmente o  
20 alternativamente, los canales microfluídicos se pueden integrar en el recipiente de objetivos/placa de cultivo celular. Esto se ilustra esquemáticamente en las Figuras 11A-C.

- Por ejemplo, los canales microfluídicos se pueden integrar en la placa de electrodos de punta, como se ilustra en la Figura 11A o en la placa de electrodos como se ilustra en la Figura 11B, para la administración de soluciones tampón de agentes, o la distribución secuencial de uno o varios agentes a través de los electrodos de punta. Como se ilustra en la Figura 11C los canales microfluídicos se pueden también integrar en una placa de cultivo celular para  
25 un intercambio rápido de una solución envolvente de células, o un lavado/perfusión continuos de la solución en un cultivo celular.

- Se puede proporcionar la distribución microfluídica de solución a una solución que contiene un objetivo, tal como un baño celular, o un depósito de solución en una placa de electrodos de punta o placa de electrodos, mediante la fabricación de uno o más microcanales en el sustrato cuyas salidas se cruzan o alimenta a la parte respectiva del  
30 recipiente de objetivos que contiene la solución ("depósito de objetivos") o depósito en la placa de electrodos ("depósito de la placa de electrodos"), (colectivamente, "depósitos"). Se puede configurar el sustrato como una estructura bidimensional, como se describe adicionalmente a continuación. El sustrato generalmente comprende una pluralidad de microcanales cuyas salidas se cruzan con uno o varios de los depósitos.

- En un aspecto, cada microcanal comprende al menos una entrada (por ejemplo, para recibir una muestra o una solución tampón). Preferiblemente, la entrada recibe la solución desde los recipientes que son conformes en geometría y ubicación en el sustrato, a la geometría y ubicación de los pocillos en una placa microtituladora estándar industrial. Se pueden fabricar los microcanales usando métodos rutinarios en la técnica, tales como ataque iónico de reactivo profundo, litografía suave, etc. La anchura del canal puede variar dependiendo de la aplicación, como se describe adicionalmente a continuación y generalmente oscila entre alrededor de 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$   
40 aproximadamente, preferiblemente, entre alrededor de 1  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$  aproximadamente, mientras que las dimensiones de los depósitos pueden variar dependiendo de la configuración de las salidas del canal que alimenta los depósitos.

- Preferiblemente la solución que contienen los microcanales y los depósitos se puede reemplazar e intercambiar rápidamente y de forma eficiente. Se puede lograr el intercambio rápido de solución usando una diversidad de geometrías de red de diferentes microcanales. En un aspecto, una pluralidad de microcanales convergen o se alimentan de los depósitos, mientras que en otro aspecto, una pluralidad de microcanales convergen en un único canal, convergiendo él mismo en un depósito. La pluralidad de microcanales puede comprender canales interdigitantes para la distribución de sustancias y soluciones tampón, respectivamente.  
45

- Los microcanales se pueden usar para distribuir y retirar reagentes, fármacos, agentes internalizadores celulares, etc., desde las células. Si se diseña correctamente, se puede realizar extremadamente rápido la distribución y retirada desde los depósitos, por ejemplo, en sub-microsegundos. Adicionalmente, se puede diseñar de una manera particular una red microfluídica para crear gradientes de sustancias en los microcanales del sustrato (ver, por ejemplo, Chiu y otros colaboradores, JACS). Se describen a continuación construcciones ejemplares.  
50

#### Formato de Rueda de Radios Radiales Planos

- 55 En esta construcción, se configuran un gran número (por ejemplo, 96-1024) de microcanales como radios radiales que convergen en un depósito con dimensiones que abarcan desde alrededor de 10  $\mu\text{m}$  a 10mm aproximadamente.

Se selecciona el número de microcanales usados para acomodar el número de pocillos de muestra en una placa microtituladora industrial estándar, por ejemplo de 96 a 1024 pocillos. Además del número de microcanales que concuerda con el número de entradas desde las placas de pocillos, hay preferiblemente, al menos dos microcanales adicionales, uno para la distribución de la solución tampón y el otro para la retirada del sobrante.

- 5 Para proporcionar la sustitución eficiente de fluidos contenidos en el depósito mediante la entrada de los fluidos desde los canales, se optimiza el ángulo entre el canal de entrada y el canal de desechos. Son óptimos la mezcla y reemplazo fluidicos cuando este ángulo es de 180° aproximadamente y empeora progresivamente según este ángulo disminuye hacia 0 grados. Para tasas de flujo elevadas (cm/s a m/s), el efecto de este ángulo se hace progresivamente más importante, mientras que para tasas de flujo bajas, el ángulo entre el canal de entrada y el canal de desechos es menos importante.

10 Para maximizar la eficiencia de la sustitución de fluidos en tasas de flujo elevadas, el número de canales radiales se puede aumentar de forma que cada canal de entrada tenga un correspondiente canal de desechos, mejor que compartir todos los canales de entrada un canal común de desechos. En este formato, todos los ángulos entre los canales de entrada y salida son de alrededor de 180 grados, asegurando la sustitución fluidico óptimo. Otra estrategia contempla el uso de geometrías de canales ramificados, como se describe adicionalmente a continuación.

#### 15 Formato de Canales Ramificados

En este diseño, se dirigen preferiblemente dos canales al depósito, uno para la distribución de compuestos y otro para los desechos. Mejor que separar todos los canales de entrada y converger las salidas de cada canal de entrada de forma que se alimenten del depósito, se configuran los canales con una geometría ramificada. Para realizar un interfaz con la placa de pocillos 96-1024, se conecta el único canal de distribución a una multitud de microcanales de entrada, recibiendo cada canal de entrada las entradas desde un pocillo diferente de la placa de pocillos 96-1024. Se logra en rápida sucesión la distribución de un gran número de compuestos en el depósito mediante el control y la distribución multiplexada de fluidos que contienen compuestos en el único canal que alimenta directamente al depósito.

20 En un modo de realización preferido de este diseño, se fabrica una estructura de “espina de pez” con cada “espina” correspondiente a un microcanal de distribución de sustancia, el cual se cruza con un canal de “espina” principal que se conecta a un depósito de solución tampón. Se logra la distribución rápida y secuencial de la sustancia y de la solución tampón en el depósito aplicando primero una presión positiva a uno de los microcanales de distribución de sustancias, por tanto introduciendo un tapón de la muestra desde el microcanal al microcanal principal que contiene la solución tampón. Este tapón se introduce en el depósito aplicando una presión positiva al depósito de solución tampón, que transporta el tapón al depósito, y luego se lava con la solución tampón. Se repite este ciclo de distribución de muestra y solución tampón con diferentes muestras contenidas en diferentes microcanales. Las dimensiones (anchura y espesor) de los microcanales (tanto para la distribución de mezcla como para la distribución de solución tampón) pueden ser altamente variables, con márgenes de dimensiones típicos desde 1-100  $\mu\text{m}$ , y preferiblemente desde alrededor de 10-90  $\mu\text{m}$ . También se puede variar la tasa de flujo con tasas de flujo preferidas con márgenes desde  $\mu\text{m/s}$  a  $\text{cm/s}$ .

La presión es isotrópica, por tanto, sobre la aplicación de una presión positiva y negativa, los fluidos fluirán a lo largo de cualquier caída de presión sin preferencia por ninguna dirección particular. Por lo tanto, preferiblemente, se integran válvulas pasivas de una vía en la unión entre los microcanales de distribución de sustancia y el canal principal de solución tampón. El propósito de estas válvulas de una vía integradas es impedir que haya cualquier flujo desde el canal principal de solución tampón a cada uno de los microcanales de distribución de sustancia cuando se aplica una presión positiva al depósito de solución tampón, y permitir el flujo desde cada uno de los microcanales de distribución de sustancia a los canales principales de solución tampón cuando se aplica una presión positiva a los depósitos proporcionando la muestra a estos microcanales. Hay numerosos diseños adecuados de válvulas microfluidicas así como de mecanismos de bombeo.

Aunque el siguiente debate enfatiza el flujo accionado por presión debido a su simplicidad de implementación, se pueden diseñar un número apropiado de medios para transportar líquidos en microcanales, incluyendo pero no estando limitado a ello, el flujo accionado por presión, el flujo electroosmótico, el flujo accionado por tensión superficial, el flujo accionado por desplazamiento de paredes, el flujo accionado por gradiente térmico, el flujo inducido por ultrasonidos, y el flujo accionado por cizallamiento. Estas técnicas son conocidas en la técnica.

#### Valvulería y Bombeo

##### Uso de tabiques para dirigir microcanales Individuales

En este esquema, se sellan mediante un tabique los depósitos que se conectan a cada uno de los microcanales para proporcionar fuentes de agentes. Debido a que el tabique consigue un sellado hermético, la aplicación de una presión positiva (por ejemplo, con aire o nitrógeno) mediante una aguja o un tubo insertado a través del tabique, provocará que el fluido fluya descendentemente por el microcanal hacia el depósito (por ejemplo, al centro de una

rueda de radios donde los microcanales radiales convergen). La aplicación de una presión negativa con una pequeña succión a través de la aguja o del tubo insertado a través del tabique provocará que el fluido se retire en la dirección opuesta.

5 Una ordenación de dichas configuraciones de tabiques-aguja permite a cada recipiente ser diseccionado individualmente, y por lo tanto, cada microcanal. El uso de este esquema permite el bombeo simultáneo y secuencial y valvulería de los fluidos contenidos en cada uno de los microcanales. Mediante la ejercitación del control preciso de la presión positiva y negativa aplicada a cada uno de los microcanales, se puede lograr el flujo fluídico controlado y la distribución de componentes en cada depósito. Para diseños que no requieren el direccionamiento individual a los microcanales, será suficiente un único o unos pocos tabiques con un único o unos pocos dispositivos de control de presión.

Control de la resistencia fluídica mediante la variación de las dimensiones de los canales

15 Aunque el diseño anterior que usa tabiques individuales ofrece una gran flexibilidad y control, para ciertas aplicaciones en las cuales está predeterminada la secuencia de la distribución de compuestos y flujo fluídico, un diseño más simple ofrece simplicidad y facilidad en la implementación. En este esquema, se aplica igual presión positiva a todos los recipientes, por ejemplo, usando aire presurizado aplicado homogéneamente a todos los recipientes mediante un único tabique, o a través del uso de flujo de gravedad provocado por la diferencia de altura entre los depósitos de entrada y salida. Se consigue la distribución secuencial rápida de compuestos desde cada microcanal a los depósitos variando la resistencia fluídica de cada microcanal, lo que se logra fácilmente variando la anchura y longitud de cada microcanal.

20 La resistencia fluídica aumenta linealmente con la longitud y con la cuarta potencia del diámetro para un capilar circular. Variando gradual y sistemáticamente la dimensión de cada microcanal, se puede controlar el retraso de tiempo entre los microcanales en su distribución de compuestos sobre uno o más sensores en una cámara de sensores.

Control del Flujo Fluídico con Válvulas Externas

25 En esta configuración, se introducen los compuestos de cada uno de los pocillos de una placa con una ordenación de pocillos a través de tubos o capilares externos que son conectados a los correspondientes microcanales. Se pueden usar las válvulas externas unidas a estos tubos o capilares externos para controlar el flujo fluídico. Existe un número de válvulas externas adecuadas, incluyendo unas accionadas de forma manual, mecánica, electrónica, neumática, magnética, fluídica, o mediante medios químicos (por ejemplo, hidrogeles)

30 Control del Flujo Fluídico con Válvulas Internas

35 En lugar de controlar el flujo fluídico con válvulas externas, hay también un número de válvulas basadas en chips que se pueden usar. Estas válvulas basadas en chips se pueden basar en algunos de los mismos principios usados para las válvulas externas, o pueden ser completamente diferentes, tales como válvulas de bola, válvulas de burbuja, válvulas electrocinéticas, válvulas de diafragma, y válvulas de un solo paso. Las ventajas de usar válvulas basadas en chips es que están adaptadas inherentemente para la integración con los sistemas microfluídicos. Son de particular relevancia las válvulas pasivas de una vía, que son preferidas para la implementación de algunos diseños mencionados anteriormente (es decir, tal como el formato de canales ramificados)

### Sistemas de electroporación

40 En un aspecto, se adapta para la electroporación de células y/o orgánulos intracelulares y/o fracciones membranales, un sistema de detección de objetivos y de distribución para la exposición selectiva de objetivos a un campo eléctrico y para la distribución de uno o más agentes. El sistema proporciona campos eléctricos sumamente resueltos de forma espacial para romper físicamente la barrera membranal de las estructuras cerradas membranales como un medio para proporcionar un camino de difusión para que los agentes entren en tales estructuras cerradas membranales y por lo tanto para alterar el contenido bioquímico de por ejemplo, células y orgánulos simples.

45 En un aspecto, se obtienen dichos campos eléctricos altamente enfocados usando al menos un electrodo de punta con un diámetro exterior en un intervalo de unos cuantos nanómetros a unos cuantos micrómetros. Esto hace posible la electroporación de células simples e incluso de estructuras intracelulares. También, este método permite la disposición controlada de pequeñas cantidades de agentes en lugares bien definidos tales como macromoléculas únicas sobre una superficie. El electrodo de punta se controla individualmente con un microposicionador de alta graduación, de este modo permite alineaciones precisas de electrodos con respecto a una estructura para ser permeabilizada. Durante el tiempo efectivo de abertura del poro, los solutos impermeables celulares añadidos al medio extracelular o extraorganular pueden entrar en el interior de la célula u orgánulo mediante difusión.

50 En otro aspecto, se proporciona un sistema de electroporación que comprende al menos dos electrodos de punta. Debido a los campos eléctricos altamente enfocados producidos por los dos electrodos, se pueden usar distancias

entre electrodos extremadamente cortas, permitiendo la electroporación, y la distribución de agentes en los objetivos que están separados en nanómetros a micrómetros. Por supuesto también son posibles los objetivos situados a mayores distancias de separación, como por ejemplo, milímetros o centímetros. Por ejemplo, el sistema permite la electroporación de múltiples objetivos de una manera paralela. Los parámetros de los campos eléctricos y distribución de agentes se pueden controlar de forma independiente mediante cada electrodo de punta. En un aspecto, los electrodos de punta se pueden desplazar en el espacio tridimensional, mientras que en otro aspecto, se fijan esos al menos dos electrodos de punta con respecto al desplazamiento en una dirección x e y con respecto el uno al otro.

La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra un sistema de electroporación que usa electrodos de punta de un aspecto de la invención. El sistema comprende un electrodo (1) de punta lleno de electrolito que tiene un material o superficie sólidos (2) eléctricamente conductores en contacto eléctrico con una placa (3) de electrodos. Se conecta la placa de electrodos a un generador (4) de impulsos para la distribución de impulsos de tensión o corriente a través del electrodo de punta y tierra al contraelectrodo (5). El electrodo de punta se posiciona en un baño celular (6) de forma que la solución contenida en la punta esté en contacto con la solución en el baño celular. La solución contenida en el electrodo de punta es un medio conductor adecuado suplementado con los uno o varios agentes de interés para ser introducidos en las células. Preferiblemente, el baño celular contiene la misma solución sin agentes o un medio similar apropiado.

En el ejemplo ilustrado en la Figura 1, el electrodo de punta comprende una punta de pipeta con un electrodo de cable internalizado de platino que está en contacto con una placa anular conductora en el exterior del electrodo de punta. La placa anular conductora se pone en contacto con una capa conductora en la placa de electrodos. La placa de electrodos contiene cuatro capas. Una capa aislante con pequeñas superficies que se exponen a la segunda capa conductora para realizar el contacto entre electrodos de punta. La tercera capa es aislante para separar los impulsos eléctricos del contraelectrodo, es decir, tierra, y la cuarta es una capa conductora con un contra internalizado, es decir, electrodos de tierra que hacen contacto con el baño celular. El diseño de los electrodos de punta se puede alterar en un número de formas, como se ha descrito anteriormente, así como el diseño del contraelectrodo.

Se puede distribuir el fluido que contiene uno o más agentes portadores de células a células o estructuras celulares mediante algún modo de bombeo. Por ejemplo, se puede usar el bombeo basado en presiones, bombeo basado en flujo gravitacional, electroósmosis, electroforesis, o combinaciones de los mismos. Se pueden interconectar varios dispositivos a macroescala a una placa de electrodos para la distribución de agentes y soluciones a cada electrodo de punta.

La configuración se puede fabricar como partes o módulos independientes, siendo extraíbles los electrodos de punta desde la placa de electrodos, o como un sistema integrado con las puntas fijadas en la placa de electrodos. Pueden estar integradas en el sistema las funciones del manejo de líquidos y flujo de soluciones mediante la inclusión de microfluidos en una placa combinada de puntas y electrodos y/o en una placa celular. Por ejemplo, se pueden proporcionar canales microfluídicos como se ha descrito anteriormente, para suministrar fármacos, tintes, genes, soluciones tampón, etc., a las células antes, durante o después del tratamiento de electroporación, o alternativamente se puede utilizar tecnología microdispensadora más tradicional.

Preferiblemente, el sistema comprende adicionalmente un procesador de sistemas para controlar uno o más de: el funcionamiento del generador de impulsos, la distribución fluidica y de agentes a las placas de electrodos de punta y/o a los canales microfluídicos donde están incluidas, funcionamiento de válvulas e interruptores presentes para dirigir el flujo fluidico a través de los microcanales, desplazamiento de los compuestos del sistema (por ejemplo, la exploración mediante electrodos de punta, contraelectrodos (donde éstos son desplazables de forma independiente), placas celulares, y similares, funcionamiento y análisis de datos mediante un detector, y similares. Preferiblemente, el sistema también comprende un dispositivo de usuario en comunicación con el procesador del sistema que comprende un interfaz gráfico para visualizar las operaciones del sistema y para alterar los parámetros del sistema.

Por ejemplo, se pueden concebir muchos esquemas diferentes en los que el generador de impulsos se programa o controla manualmente para proporcionar unas condiciones óptimas de carga para distintos tipos de agentes portadores e células y células. Por tanto, se pueden cambiar usando un electrodo de punta tanto la duración del impulso, la polaridad, la forma de onda, la amplitud del impulso, como otros parámetros pertinentes, en el trascurso de carga celular. Preferiblemente, se usa un generador de impulsos programable para controlar dichos parámetros.

En un aspecto, un sistema completo para realizar la electroporación consiste en el dispositivo de detección de objetivos/distribución (con electrodos de punta, placa de electrodos y placa de cultivo celular), acoplada a un generador de campo eléctrico y a un dispositivo de bombeo de líquido controlado mediante un software informático, y combinado con un sistema de lectura adecuado para la detección del tratamiento de electroporación y la recogida y análisis de datos. Esto se ejemplariza en la Figura 12.

En otro aspecto de la invención, el sistema de electroporación es modular y uno o más de los componentes del sistema son extraíbles del sistema e intercambiables con otros componentes. Por ejemplo, se puede reemplazar una electroplaca para recibir a una única punta por una placa de electrodos para recibir a múltiples electrodos de punta. De forma similar, el sistema puede incluir una diversidad de placas celulares intercambiables como se ilustra en la

5 Figura 7 por ejemplo. Alternativamente, o adicionalmente se pueden integrar ciertas combinaciones de componentes, es decir, los electrodos de punta pueden ser partes integrantes de una placa de electrodos y no extraíbles de la placa de electrodos.

La Figura 8 ilustra diferentes combinaciones de puntas, placas de puntas y recipientes de células de la presente invención.

10 La Figura 12 ilustra la configuración de electroporación en combinación con el equipamiento adicional. Se controla preferiblemente un generador de impulsos y un sistema dispensador de líquidos mediante un programa software, para la calibración específica de los parámetros del campo eléctrico, número de impulsos, longitud de los impulsos y cantidad de solución que ha de ser dispensada. En el ejemplo ilustrado en la Figura, se proporciona un detector para detectar la electroporación y/o introducción de un agente en una célula. En un aspecto, el detector es capaz de

15 detectar moléculas identificadas de forma fluorescente. Por ejemplo, el detector puede comprender un láser para proporcionar una fuente de excitación, una cámara CCD y un ordenador para recoger y analizar los datos. Los sistemas de electroporación de la invención se montan fácilmente sobre plataformas microscópicas, o se pueden fabricar como una parte integrante de una estación robotizada de pipeteo y/o sistema de lectura de placa.

#### Funcionamiento de un Sistema de Electroporación

##### 20 Posicionamiento

Los electrodos de punta necesitan posicionarse en proximidad al objetivo u objetivos para ser electroporados. El desplazamiento del electrodo de punta en la dirección z se puede controlar usando microposicionadores de control automático o robótico, o usando cualquier obstáculo físico, como por ejemplo objetivos de guías verticales u horizontales para forzar al dispositivo a una posición definida. En ciertos modos de realización, se puede girar el

25 electrodo de punta. Si se detecta como objetivo un cultivo no confluyente, el electrodo de punta necesita también posicionarse en las direcciones x, y relativas al objetivo. Esto también se puede lograr mediante una técnica convencional de microposicionamiento, pero en lugar de desplazar el dispositivo mientras que se mantiene fijo el cultivo celular, es posible usar plataformas de traslación motorizada u otros dispositivos similares para desplazar el cultivo celular mientras que los electrodos de punta se mantienen en una posición fija.

30 En un aspecto, se usa una solución mecánica simple para posicionar simultáneamente múltiples electrodos de punta sobre múltiples objetivos. Se puede configurar la placa de electrodos con un número adecuado de puntos de montaje para electrodos de punta. Por ejemplo, la placa puede comprender 96 puntos de montaje que corresponden a la distancia entre centros entre una placa microtituladora industrial estándar de 96 pocillos. Cada punto de montaje contiene preferiblemente un orificio que atraviesa la placa y una parte adecuada para unir la pipeta.

35 Se puede lograr el posicionamiento empujando la placa de electrodos que comprende los electrodos de punta hacia abajo equipando la placa de electrodos con mecanismos de posicionamiento. Como se usa aquí, un "mecanismo de posicionamiento" comprende una parte, o mecanismo el cual sirve para mantener una distancia exacta entre el electrodo de punta y un recipiente de objetivos tal como una placa celular. Los mecanismos de posicionamiento, preferiblemente, uno para cada tipo de electrodo de punta, provoca que cada electrodo de punta se detenga

40 individualmente a una distancia preferida desde cada superficie.

En un aspecto, se proporciona un montaje flexible que permite un desplazamiento vertical restringido para un electrodo de punta. Se puede conseguir la flexibilidad de la suspensión de diversas formas no limitativas. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 13A, la parte más próxima al punto de montaje en la placa de electrodos puede comprender un muelle o una sección "como un fuelle" con "círculos" circulares concéntricos que en

45 combinación con las propiedades del material crea un efecto muelle permitiendo que la pieza de montaje se desplace. En otro aspecto, como se ilustra en la Figura 13B, el alojamiento del electrodo de punta puede incluir un fuelle flexible que proporciona flexibilidad. En el ejemplo ilustrado en la Figura, la pieza de montaje se fija a la placa. En un aspecto adicional, como se ilustra en la Figura 13C, se proporciona una barra flexible horizontal que comprende una pieza de montaje en un extremo fijo a la placa de electrodos, permitiendo el desplazamiento al punto

50 de montaje.

Se puede proporcionar un mecanismo de posicionamiento que esté fijo en su desplazamiento con respecto al electrodo de punta. El mecanismo de posicionamiento comprende una superficie que limita el desplazamiento del electrodo de punta a una distancia de la superficie definible previamente. Sin embargo, preferiblemente, se configura la superficie de forma que minimice el contacto entre la punta y la superficie. En un aspecto, el mecanismo de

55 posicionamiento comprende una barra vertical como se ilustra en la figura 13C que se une a un punto de montaje en movimiento. La punta inferior de la barra impide el desplazamiento adicional del electrodo de punta cuando contacta con la superficie del mecanismo de posicionamiento. En otro aspecto, ilustrado en las Figuras 13E, F y G, el

mecanismo de posicionamiento se monta en la punta o es una parte integrante del electrodo de punta como se ilustra en la Figura 13D.

En el modo de realización ilustrado en las Figuras, el mecanismo tiene una o más "alas" que pueden terminar en pequeños puntos y un lumen diseñado al menos para ajustar al menos una porción del electrodo de punta. El electrodo de punta y el mecanismo de posicionamiento se pueden diseñar tanto para permitir que el electrodo de punta llegue muy cerca del objetivo (Figura 13F) antes de que se bloquee, como para que se impida su movimiento adicional de cruce adicional a través del lumen del mecanismo de posicionamiento (Figura 13 G). En el último caso, la distancia entre electrodo de punta y la superficie depende sólo de la geometría del dispositivo de posicionamiento. En el ejemplo, ilustrado en la Figura 13G, una porción del mismo mecanismo de posicionamiento se puede hacer cónica en la punta la cual actúa como el extremo que mira al objetivo y actúa para enfocar adicionalmente la distribución de agente y/o el campo eléctrico.

En un aspecto adicional, uno o más de los electrodos de punta, placa de electrodos, recipiente de células/placa de células se pueden desplazar en una dirección x, y y/o z. Por ejemplo, se puede explorar un único electrodo de punta o una pluralidad de electrodos de punta en una placa de electrodos relativos a un objetivo en una placa de células desplazando el electrodo de punta, placa de electrodos de punta y/o placa de células para efectuar una exposición secuencial a un campo eléctrico y a diferentes agentes y/o solución tampón electrolítica.

#### Control del Campo Eléctrico

La magnitud y distribución de los campos eléctricos necesarios para provocar la electroporación varían en gran medida dependiendo del tipo y del tamaño de la estructura celular tratada. También es posible variar el potencial, polaridad, y forma de la onda sobre el electrodo de punta durante el transcurso de tiempo de distribución del agente a una estructura celular, es decir, la distribución y electroporación no se realizan con una intensidad del campo eléctrico constante. Se prefiere particularmente la programación de parámetros del campo eléctrico mediante un procesador del sistema en comunicación con una fuente de alimentación, como por ejemplo un generador de impulsos, cuando se introducen varios compuestos en una estructura celular en una forma secuencial.

La duración de un impulso puede variar de unos cuantos microsegundos a varios minutos, dependiendo del tipo y del tamaño de la estructura celular tratada así como dependiendo de la naturaleza del agente portador de células. El generador de impulsos transmite impulsos de tensión y corriente a través de los electrodos de punta con la suficiente intensidad para alterar transitoriamente las propiedades dieléctricas de membranas, creando por tanto poros en las membranas adecuados para la introducción de moléculas de membrana impermeable en otros casos.

Preferiblemente, el generador de impulsos genera un impulso eléctrico o un tren de impulsos, tanto de tensión como de corriente, que da lugar a una intensidad de campo eléctrico que es de aproximadamente 0,1 kV/cm a 10 kV/cm en la superficie de las estructuras celulares que se electroporan, y más preferiblemente es de aproximadamente 0,5 kV/cm a 1,5 kV/cm en estas superficies. Se puede distribuir el campo eléctrico como un único impulso, o como un tren de impulsos de varios impulsos. Preferiblemente un impulso es de aproximadamente 0,1  $\mu$ s a varios minutos, por ejemplo, en torno a 1-10 minutos. Más preferiblemente un impulso está en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ s a 5 s, y más preferiblemente es menor de 100 ms. El número de impulsos se encuentra preferiblemente entre alrededor de 1 a 1000 aproximadamente, y más preferiblemente entre alrededor de 1 a 50 aproximadamente. Cuando se usa más de un impulso, el intervalo entre impulsos está preferiblemente entre alrededor de 0,1  $\mu$ s a varios minutos, y más preferiblemente entre alrededor de 1  $\mu$ s a 5 s.

Durante la aplicación del impulso del campo eléctrico, se permeabiliza la estructura celular a través de la formación de poros, permitiendo a los solutos cargados y polares presentes en el medio extracelular y que de otra manera no pasarían a través de las membranas de bicapa biológica, la entrada al interior de la estructura celular a través de la difusión o del flujo hidrodinámico. La resolución espacial proporcionada por el sistema de la invención viene impuesta, por ejemplo, por el diámetro interior y exterior del electrodo de punta, la intensidad del campo eléctrico aplicada y la distancia de separación entre el electrodo de punta y el objetivo de electroporación. La distancia de separación depende principalmente del tamaño de la estructura celular que se va a electroporar y puede por tanto variar entre unos cuantos nanómetros y varios cientos de micrómetros. Dependiendo de la composición de la solución tampón, las condiciones se cambian en los electrodos. Las reacciones electroquímicas en los electrodos, por ejemplo, la reducción de agua y oxidación de cloruro, provocan alguna pérdida en la tensión y se puede calcular la tensión efectiva para cada conjunto de materiales de electrodo y sistemas de solución tampón dados para conseguir la óptima electroporación tal y como se conoce en la técnica.

Cuando se usan puntas eléctricamente aislantes, el campo eléctrico necesario para la electroporación de una estructura celular se lleva a cabo mediante electrodos contenidos en la solución en el lumen de los electrodos de punta. Donde el electrodo componente del electrodo de punta es una superficie eléctricamente conductora proporcionada en forma de una varilla, cilindro o cable insertado en el lumen, la superficie alimenta la corriente o tensión suministradas mediante un generador de impulsos en la solución electrolítica. Como se ha descrito anteriormente, el posicionamiento de tales electrodos de superficie no está limitado al extremo trasero del electrodo

de punta, se pueden situar la varilla, cable, cilindro, etc., en cualquier lugar del interior del electrodo de punta. Cuando la superficie conductora es un recubrimiento de un material conductor en al menos una porción de las paredes del alojamiento (es decir, las paredes que definen el lumen), se transporta la corriente o tensión suministradas desde el generador de impulsos al recubrimiento y adicionalmente a la solución electrolítica tanto mediante electrodos insertados a través de las paredes del alojamiento del electrodo de punta como a través del extremo receptor del alojamiento, o a través de una continuidad en la cobertura que se enfrenta al exterior del electrodo de punta que está en comunicación con el generador de impulsos.

#### Distribución del agente

Como se ha descrito anteriormente, se puede distribuir el fluido que contiene uno o más agentes portadores de células a las células o estructuras celulares mediante diversos medios que incluyen, pero no están limitados a ello, el bombeo basado en presión, el flujo gravitatorio, electroósmosis, electroforesis, o una combinación de ellos. La generación de un flujo de electroósmosis requiere que estén cargados eléctricamente un electrodo de punta con un diámetro y longitud apropiados, y también, el área de la superficie interior del electrodo de punta. Se crea en el exterior de un electrodo de punta un perfil de flujo de diámetro interior de 500  $\mu\text{m}$  durante un impulso como se ilustra en la Figura 10, por ejemplo.

Cuando no se usa la electroósmosis o la electroforesis para el bombeo, se pueden conectar cualquier otro aparato para crear el flujo tal como una bomba peristáltica, un microinyector/microbomba, u otro dispositivo para conducir fluidos, a un extremo de entrada/receptor de los electrodos de punta antes, durante, o después de la electroporación.

En algunos aspectos, puede ser ventajosa algunas veces la distribución de agentes a las células usando un método de bombeo y la aplicación de impulsos eléctricos para la electroporación en intervalos periódicos. Por ejemplo, se puede sincronizar el bombeo con la aplicación de campos eléctricos, de forma que se bombea un volumen de electrolito contenido en el lumen de un electrodo de punta en un electrodo de punta a una superficie celular, y después de un intervalo de tiempo seleccionado, se aplica la tensión adecuada para la electroporación a través de la superficie eléctricamente conductora del electrodo de punta. Se puede desconectar la tensión y se puede distribuir un nuevo volumen de solución/agente. Se pueden usar bombas peristálticas, de jeringa, u otras bombas adecuadas para proporcionar la distribución de impulsos de una solución/agente mientras que se proporcionan impulsos de tensión o corriente mediante un generador de impulsos en comunicación con el electrodo de punta o los electrodos de punta.

Dependiendo de la carga de agente que se internaliza en las células, (que normalmente depende del pH), es preferible usar un impulso de una polaridad que obligue al flujo de la solución electrolítica a salir hacia el objetivo y que no atraiga al flujo de la solución del recipiente de células de regreso al electrodo de punta. Sin embargo, se puede aplicar presión, como se ha descrito anteriormente, para dirigir el flujo de agentes contenido en el electrodo de punta a la solución que contiene las células, por ejemplo, cuando el impulso eléctrico no es eficiente para la distribución a través de la electromigración.

Las Figuras 10A-C ilustran la eyección de la solución desde el electrodo de punta mediante electroforesis y electroósmosis durante la aplicación de un impulso de 50 ms. El electrodo de punta contenía 100  $\mu\text{M}$  de fluoresceína en la solución tampón electrolítica con pH 9. La Figura 10A ilustra la eyección en 0 ms. La Figura 10B ilustra la eyección en 25 ms. La Figura 10C ilustra la eyección en 50 ms. La solución a granel se hace tampón con un pH 4 para amortiguar la fluorescencia. El flujo es un resultado de la migración electroosmótica/electroforética de fluoresceína en el campo eléctrico; no se aplica presión adicional.

Tras la electroporación del objetivo, se puede realizar el lavado de la placa de células para eliminar el exceso de agente o agentes si fuera necesario. Se reemplaza entonces la solución tampón por una solución tampón deficitaria en agentes ("solución tampón de lavado") que a cambio se puede reemplazar con una solución tampón de incubación, como por ejemplo un medio de crecimiento de cultivo celular o cualquier otro medio escogido. En un aspecto, la solución tampón de lavado se puede distribuir a través del mismo electrodo de punta que distribuyó el agente, usando un sistema de distribución fluidica que comprende tanto una solución tampón como líneas de alimentación de agentes en el interior del electrodo de punta, usando válvulas apropiadas o mecanismos de conmutación cuyo funcionamiento preferiblemente es bajo un control programable mediante un procesador de sistemas. Alternativamente, se pueden aspirar diferentes soluciones en el extremo apical de los electrodos de punta o pueden devolverse a los electrodos de punta o se pueden proporcionar mediante canales fluidicos como se ha descrito anteriormente.

Métodos de Tratamiento, que no son parte de la invención.

Los electrodos de punta y sistemas de electrodos de la invención ofrecen un control altamente espacial permitiendo el tratamiento de los objetivos con diferentes agentes y diferentes protocolos de impulsos a pesar de la pequeña separación de distancias entre los objetivos.

En particular, la invención hace posible el rápido filtrado, identificación, alteración, caracterización funcional, y

detección de objetivos intracelulares basados en la permeabilización de membranas bicapa fosfolípidas, es decir, electroporación. El método, que no es parte de la invención es escalable y pueden ser objetivos una única célula solitaria, una pluralidad de células, o una gran población de varios millones de células. Por tanto, los sistemas de la invención permiten el filtrado rápido de fármacos, identificación y validación de objetivos fármacos intracelulares y el filtrado de sustancias similares a los fármacos que afectan la química intracelular, de una forma automática y paralela.

#### Agentes

Usando los sistemas de la invención, es posible introducir esencialmente cualquier tipo de sustancia, agente o agente portadores de células en las estructuras de células electroporadas. Como se usa aquí, un “agente de carga celular” hace referencia a un agente que es típicamente polar y es típicamente incapaz de pasar de forma espontánea las membranas biológicas. Los ejemplos de tales sustancias o agentes portadores de células incluyen, pero no están limitados a ello, los siguientes agentes: genes, análogos de genes; ARN; análogos de ARN; ARN de silenciamiento, oligonucleótidos antisentido, ribozimas; ADN; análogos de ADN; actámeros. partículas coloidales, nanopartículas; receptores; ligandos receptores; antagonistas receptores; agonistas receptores; bloqueadores receptores, enzimas, sustratos de enzimas, inhibidores de enzimas, moduladores de enzimas, incluyendo moduladores de enzimas alostéricas; proteínas; análogos de proteínas; polipéptidos; análogos de polipéptidos; aminoácidos; análogos de aminoácidos; péptidos, análogos de péptidos; metabolitos; análogos de metabolitos; oligonucleótidos; análogos de oligonucleótidos; antígenos; análogos de antígenos; hapteno; análogos de hapteno; anticuerpos; análogos de anticuerpos; orgánulos; análogos de orgánulos; núcleos celulares; fracciones celulares; bacterias; virus; partículas virales; gametos; iones inorgánicos; iones orgánicos; iones metálicos; agrupación de metales; agentes que afectan a la química celular; agentes que afectan a la física celular (es decir, movilidad de células, mitosis, endocitosis, exocitosis, formación de vacuolas, función de actina, miosina, tubulina, y otras proteínas estructurales, etc.), agentes que afectan a polímeros (es decir, agentes que afectan a la replicación del ADN y al traslado de proteínas, montaje de tubulina, etc.) así como cualquier combinación de dos o más de estos agentes.

Sin embargo, como se usa aquí, un “agente”, también se refiere más generalmente a cualquier propiedad de una solución que fluya a través de un electrodo de punta que pueda ser usada para alterar el entorno de la solución alrededor del objetivo, por ejemplo, un agente introducido a través de un electrodo de punta puede alterar el pH, temperatura, fuerza iónica, osmolaridad, viscosidad y similares, del entorno de la solución alrededor del objetivo.

#### Objetivos

La exposición a un campo eléctrico y la distribución de un agente desde un electrodo de punta está “espacialmente confinada” en cuanto que puede limitarse a un pequeño punto que corresponde a un objetivo sin exponer no objetivos o mientras que se exponen otros objetivos a diferentes tipos de campos eléctricos y a agentes mediante otros electrodos de punta.

En un aspecto, los electrodos de punta se usan para facilitar la distribución de objetivos al citoplasma de una pequeña población de células. Estas células objetivo pueden estar en suspensión con otras células (“células no objetivo”) o en una localización discreta (es decir, una localización espacialmente confinada) en una superficie o en un depósito en el cual las células objetivo pueden o no pueden estar rodeadas por otras células. Por ejemplo, el objetivo se puede localizar en un pocillo de una placa de cultivo de múltiples pocillos como una placa microtituladora o en un punto sobre una superficie asociada establemente con la superficie a través de la unión con una proteína o una matriz de proteínas, moléculas de adhesión, química de superficie, topografía física, y similares.

Se pueden usar también electrodos de punta para facilitar la distribución a células únicas e incluso a compartimentos intracelulares.

En un aspecto, los electrodos de punta y los sistemas de la invención se usan para la distribución de agentes portadores de células de membrana impermeable a estructuras celulares. Se prefiere detectar como objetivo a pequeños números de células (procarióticas y eucarióticas) para la electroporación, tales como alrededor de 1 a al menos 100.000.000 células, y más preferiblemente desde alrededor de 5 - 1.000.000 células. Estas células pueden ser una parte de un cultivo o todo él (suspendidas o adheridas), una lámina de tejido, un tejido, o un órgano, o células diseñadas en una superficie. Las estructuras celulares que se pueden usar pueden ser estructuras intracelulares, orgánulos (aislados o contenidos en células vivas o muertas), vesículas membranales, bacterias o nanobacterias.

También es posible usar el método, que no es parte de la presente invención, en estructuras celulares formadas por estructuras membranales sintéticas tales como liposomas o gotitas de la emulsión. Tales estructuras celulares pueden ser tanto una como varias células o una o varias estructuras celulares. Estructuras celulares adicionales incluyen, pero no están limitadas a ellos: mitocondria, retículo endoplásmico suave o áspero, aparato de golgi, lisosomas, perioxomas, núcleos, nucleolos, vesículas de transporte, vesículas sinápticas, cloroplastos, y vacuolas.

Objetivos adicionales incluyen moléculas, macromoléculas, y superficies cuyas interacciones con agentes se pueden alterar a través de la exposición a un campo eléctrico enfocado y sintonizable. Por ejemplo, los objetivos pueden incluir, pero no están limitados a ellos: ácidos nucleicos; proteínas; polipéptidos; y péptidos; enzimas; fibras de carbono; reactantes químicos; y similares y la exposición a campos eléctricos enfocados puede facilitar la hibridación, polimerización, catálisis, síntesis química, y otros procesos. En algunos aspectos, la sensibilidad al campo eléctrico puede facilitar a través de las etiquetas (por ejemplo, tales como partículas de metal) que están acopladas a tales moléculas. Los campos eléctricos enfocados se pueden usar para orientar moléculas que son dipolos constantes o inducidos y para proporcionar energía de excitación térmica a los reactantes. De tal modo, un sistema de acuerdo con la invención se puede usar para controlar la química en regiones confinadas y sistemas interfaciales.

#### Electroporación

En un aspecto, se divulga un método para la distribución de sustancias principalmente polares e hidrofílicas contenidas en la solución dentro del citoplasma de una célula. Por tanto, el método, que no es parte de la invención, proporciona medios para romper la barrera membranal de las células creando campos eléctricos enfocados bien definidos en las inmediaciones de las células que son permeabilizadas. El método, que no es parte de la invención, se puede aplicar a una única célula o a varias, y se puede realizar de forma paralela a una pluralidad de células únicas o a una pluralidad de poblaciones de células, tanto en una superficie homogénea como aislada en diversos pocillos.

El método, que no es parte de la invención, también se puede usar para distribuir sustancias y campos eléctricos en superficies que no contienen células con fines, por ejemplo, de diseño de superficies con moléculas o creación de campos eléctricos enfocados.

Se puede realizar la electroporación de células únicas usando electrodos de punta de la invención mediante posicionamiento de alta resolución de un electrodo de punta relativo a una célula objetivo en un cultivo celular adherente, lámina de tejido, explante de tejido, ordenación de células asociadas establemente con un sustrato (por ejemplo, a través de moléculas matriz, proteínas adherentes, química de superficie del sustrato, otras células, topografía física, etc.).

El método, que no es parte de la invención, en principio puede funcionar mediante baterías porque el espacio entre electrodos es pequeño, típicamente 20  $\mu\text{m}$  o menos, que resulta en una intensidad de campo eléctrico elevado con una pequeña amplitud de impulso de tensión. Esta técnica proporciona la primera demostración de transferencia de soluto selectiva en estructuras biológicas usando campos eléctricos altamente enfocados de células únicas y dimensiones monocelulares y subcelulares.

Los métodos, que no son parte de la invención, se pueden usar en aplicaciones de biosensores donde una célula o una estructura similar a una célula se sitúa en un campo eléctrico permeabilizante de CC o CA y se suplementa con fármacos u otros compuestos de interés. Una aplicación especial es la combinación de electroporación y de separaciones químicas miniaturizadas, donde se usan electrodos líquidos profundos fabricados con sílice fundida o materiales similares.

En un aspecto, el método, que no es parte de la invención, comprende la disposición de al menos un electrodo de punta que está en comunicación con una fuente de alimentación tal como un generador de impulsos, proporcionando al menos un contraelectrodo, conectado también a la fuente de alimentación, situando el electrodo de punta en proximidad a una estructura celular, aplicando un campo eléctrico altamente enfocado de una intensidad suficiente para obtener la electroporación entre al menos un electrodo de punta y ese al menos un contraelectrodo.

En un aspecto, el electrodo de punta o los electrodos de punta y contraelectrodo o contraelectrodos se controlan de forma independiente mediante micromanipuladores de alta graduación. En otro aspecto, los electrodos de punta y contraelectrodos se desplazan de forma independiente entre sí sólo en la dirección z. En un aspecto adicional, los electrodos de punta y contraelectrodos son componentes integrados de una placa de electrodos y no se desplazan de forma independiente entre sí.

En un aspecto, el método, que no es parte de la invención, comprende la sincronización de la electroporación con la distribución de sustancias a través del electrodo de punta.

La población de células, estructuras celulares, células únicas o estructuras monocelulares se pueden pre-tratar antes de que se experimente la electroporación. Por ejemplo, se puede cargar un objetivo con un tinte como fluo-3-AM éster para la detección de eventos que resulta en concentraciones mayores de iones calcio en el citosol o se puede transfectar con un gen informador etiquetado o un gen que codifica una molécula fluorescente (por ejemplo, luciferasa, GFP, EGFP, etc.), medio par FRET, donde la producción de señales requiere una electroporación exitosa y la introducción de otra molécula (por ejemplo, un inductor de gen informador o la otra mitad de un par FRET) Las células también se pueden tratar con otros medios químicos o físicos en un depósito de células/placa celular. Por ejemplo, se pueden añadir fármacos de interés a la solución de baño celular antes, durante, o después del evento de

la electroporación. La distribución de tales agentes se puede arbitrar a través de capilares o pipetas adicionales añadidos al sistema, o mediante canales microfluídicos integrados en placas de cultivos celulares, tanto a granel (distribuyendo a todas las células o estructuras celulares o a una mayoría de células o estructuras celulares) como localmente, (distribuyendo sólo a las células o estructuras celulares afectadas por el campo eléctrico).

5 El impulso eléctrico de un generador de impulsos en comunicación con un electrodo de punta puede inducir un flujo electroforético y electroosmótico (dependiendo de la carga superficial) de electrolito contenido en el electrodo de punta. Según se llena el electrodo de punta con agentes cargadores de células, el flujo distribuye estos agentes en el lugar de la formación de los poros. Si se desea una cantidad específica de agente, o si se prefiere que la distribución de agentes sea antes o después del impulso de electroporación, se puede proporcionar una presión  
10 externa para complementar al flujo electroforético para la distribución de agente a la superficie o superficies celulares. La combinación de formación de poros, debido al impulso eléctrico, y la distribución de agentes a las superficies celulares hace posible la carga de materiales al interior del citoplasma o a los orgánulos de la célula o células.

15 Por tanto, se divulga un método de co-distribución de sustancias y un campo eléctrico enfocado a las células de una manera resuelta de forma bien definida y espacial.

El método, que no es parte de la invención, se puede usar tanto para transferir solutos desde un medio extracelular a una estructura celular permeabilizada, como para transferir a fuera solutos atrapados en la estructura celular al medio extracelular. El método, que no es parte de la invención, se puede usar también para transferir una sustancia desde el interior o hacia el exterior de un orgánulo, incluso cuando el orgánulo se localiza dentro de una célula.

20 El método, que no es parte de la invención, se adapta bien al estudio de migración celular, proliferación, crecimiento, y diferenciación, así como a una multitud de eventos bioquímicos o biofísicos. También abre nuevas posibilidades de distribución resuelta de forma altamente espacial de nanopartículas, fármacos, genes y diferentes marcadores bioquímicos, tales como tintes en células simples u orgánulos. El método, que no es parte de la invención, puede ser útil en aplicaciones clínicas como un modo de administración de fármacos y genes a pacientes.

25 En otro aspecto no limitativo el método, que no es parte de la invención, se puede usar para transferir orgánulos o células al citoplasma de otras células o a los tejidos.

30 El método, que no es parte de la invención, se puede usar para la alteración paralela y/o secuencial de alto rendimiento del contenido químico de células y estructuras celulares. Las células y/o estructuras celulares se pueden disponer en una pluralidad de puntos en pocillos separados o en un depósito de gran tamaño o en un sustrato (por ejemplo, lámina de vidrio, superficie plástica o polímera, membrana, chip microfluídico, y similares).

En un aspecto, el método que no es parte de la invención, comprende la disposición de al menos un electrodo de punta, preferiblemente junto a al menos un electrodo de tierra. Ese al menos un electrodo de punta se llena con un medio eléctricamente conductor como por ejemplo un líquido o un gel que comprende electrolitos y está en comunicación eléctrica con un generador de corriente o tensión.

35 En un aspecto, se aplica un impulso eléctrico entre al menos un electrodo de punta y un contraelectrodo o electrodo de tierra usando un generador de corriente o tensión, generando un campo eléctrico enfocado en al menos una célula o estructura celular esencialmente sin afectar a las células o estructuras celulares circundantes.

40 El campo eléctrico tiene una intensidad suficiente para obtener la descomposición dieléctrica y formación de poros en las membranas de al menos una célula o estructura celular. Preferiblemente, el generador de impulsos en comunicación con el electrodo de punta genera un impulso eléctrico o un tren de impulsos, tanto de tensión como de corriente, que da lugar a una intensidad de campo eléctrico que es de aproximadamente 0,1 kV/cm a 10 kV/cm en la superficie de las estructuras celulares que se electroporan, y más preferiblemente es de aproximadamente 0,5 kV/cm a 1,5 kV/cm en las superficies. Se puede distribuir el campo eléctrico como un único impulso, o como un tren de impulsos de varios impulsos. Preferiblemente un pulso es aproximadamente de 0,1  $\mu$ s a varios minutos (es decir en torno a 1-10 minutos). Mas preferiblemente un impulso está en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ s a 5 s, y más preferiblemente es menor que aproximadamente 100 ms. El número de impulsos está preferiblemente en torno a 1 y 1000 y más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 50. Cuando se usa más de un impulso, el intervalo entre impulsos es preferiblemente de aproximadamente 0,1  $\mu$ s a varios minutos, y más preferiblemente de aproximadamente 1  $\mu$ s a 5 s.

50 En un aspecto, el medio eléctricamente conductor comprende un agente (tal como una molécula de membrana impermeable) que se puede distribuir desde el medio a través de la abertura que mira al objetivo del electrodo de punta a la superficie de la célula o células objetivo / estructura o estructuras celulares. Se distribuye el agente a través de la abertura y se transporta a través de los poros en las membranas celulares generadas por la exposición al campo eléctrico producido por el electrodo de punta. La distribución del agente puede producirse  
55 simultáneamente, anterior o posteriormente a la exposición al campo eléctrico. Las exposiciones adicionales a los campos eléctricos pueden transportar adicionalmente agentes al interior de las estructuras celulares o pueden

permitir que se introduzcan agentes adicionales de mismo tipo o diferente, al interior de las estructuras celulares y/o que permanezca el agente residual en la superficie de la estructura celular para su introducción.

5 Si se emplean dos o más electrodos de punta, los electrodos de punta se alinean preferiblemente de forma vertical a la misma altura. En ciertos aspectos, uno o más de los electrodos de punta puede desplazarse en el espacio tridimensional, de forma independiente entre sí, por ejemplo, usando microposicionadores controlados independientemente. En otro aspecto, dos o más electrodos de punta pueden desplazarse independientemente en una dirección z (por ejemplo, a través de mecanismos de posicionamiento dispuestos en una placa de electrodos como se ha descrito anteriormente) pero están sin embargo fijados en las direcciones x e y, desplazándose como uno según se desplaza la placa de electrodos.

10 El método, divulgado aquí y que no es parte de la invención, se puede usar para transferir múltiples solutos, agentes, y partículas al interior de estructuras celulares permeabilizadas para determinar los efectos de tal introducción.

Métodos de Distribución Intracelular de Agentes, que no son parte de la invención.

15 Los métodos que se divulgan aquí, se pueden usar para facilitar filtrados paralelos de alto rendimiento de acciones de fármacos intracelulares u objetivos de fármacos intracelulares, como una técnica de transfección, o para la identificación de proteínas intracelulares y caminos de señalización. Ejemplos de dichas proteínas pueden ser enzimas, receptores, portadores, o proteínas estructurales. En estos casos, se usa la técnica de electroporación, por ejemplo, para la introducción de una o varias sondas de proteínas (tales como ligandos o sustratos fluorogénicos) en las células. Estas sondas se pueden introducir solas o en combinación con fármacos, sustratos o ligandos, inhibidores, agonistas, antagonistas, y otras moléculas, que interactúan directamente con una proteína o proteínas objetivo en el mismo camino de señalización. Por tanto, se pueden determinar tanto la presencia de diversas proteínas como su función a nivel monocelular o a nivel de población de células.

25 El uso de la invención, que no es parte de la invención, para el perfilado, filtrado, alteración, y sondeo de interacciones de biomoléculas intracelulares, tales como proteínas, o acciones de fármacos en células vivas, deben ser detectables los eventos relacionados con estas interacciones. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de marcadores de proteínas fluorescentes selectivos en combinación con microscopio de fluorescencia o sistemas de lectura de placa de fluorescencia. Como un ejemplo, para verificar la presencia de una cierta enzima en el interior de una célula, se puede usar un sustrato de membrana impermeable polar que no es fluorescente que se convierte tras la acción de la enzima en un producto fluorescente. Un aumento de la fluorescencia refleja la presencia de la enzima y se puede usar para medir la actividad enzimática. De forma similar, el método se puede usar para realizar un análisis basado en FRET de interacciones proteína-proteína, interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos e interacciones entre ácidos nucleicos y otros ácidos nucleicos. Sin embargo, se pueden usar diversos métodos eléctricos y ópticos para detectar la respuesta celular después de la internalización de un agente incluyendo pero no limitado a ello, la capacitancia, voltimetría, amperometría, CARS (dispersión raman anti-stockes coherente), SERS (dispersión raman aumentada por superficie), fotofluorescencia, quimioluminiscencia, absorción UV-VIS-IR, microbalanza de cristal de cuarzo, o resonancia de plasmón superficial.

35 Con este método, que no es parte de la invención, se pueden transferir agentes portadores de células únicas o múltiples en un modo simple, paralelo o secuencial a una población de células, estructuras celulares, células únicas o estructuras monocelulares (objetivo u objetivos). Más específicamente, el método divulgado, que no es parte de la invención, usa un único de electrodo de punta o una pluralidad de ellos acoplados a un generador de campo eléctrico para la electroporación de un objetivo u objetivos, mediante el posicionamiento del único o de la pluralidad de electrodos en las inmediaciones próximas de un objetivo u objetivos. Se transmite al menos un impulso de corriente o tensión a través del electrodo de punta o electrodos de punta generando un campo eléctrico, que provoca la formación de poros en la membrana o membranas del objetivo u objetivos.

45 Se distribuyen un único agente portador de células o una multitud de ellos contenidos en el único o en la pluralidad de electrodos de punta en el lugar de la formación del poro mediante un flujo tanto electroforético y/o electroosmótico creado en el único o en la pluralidad de electrodos de punta durante el impulso del campo eléctrico o a través, por ejemplo, de bombeo hidrodinámico, permitiendo al único o a los múltiples agentes portadores de células la translocación y la entrada al interior del objetivo u objetivo a través de los poros.

50 Se añaden preferiblemente los agentes portadores de células a la solución que contiene el electrolito en el electrodo de punta o electrodos de punta. Además, los electrodos de punta se pueden suplementar con fármacos, o agentes, para interactuar con los objetivos localizados en la membrana del plasma de la célula. Dichos objetivos incluyen receptores y enzimas con enlaces membranales de plasma.

55 Cuando se usan los sistemas de la invención en aplicaciones de filtrado intracelular (descritas con más detalle a continuación), se introduce preferiblemente, una pluralidad de diferentes agentes portadores de células en el citosol de uno a varias células, y/o estructuras celulares, en una manera controlada. Se logra el filtrado usando preferiblemente una distribución paralela o secuencial de agentes portadores al objetivo celular y se puede lograr,

por ejemplo, mediante uno de los siguientes modos de realización.

Del primer modo de realización, se logra la distribución paralela y secuencial de múltiples agentes portadores de células usando ordenaciones de electrodos de punta. Las configuraciones de electrodos de punta pueden ser ordenaciones de una dimensión (lineales), u ordenaciones de dos dimensiones. Preferiblemente se usan ordenaciones de 2-100.000 electrodos de punta, y más preferiblemente se emplearán ordenaciones de 8, 96 ó 384 electrodos de punta para adaptarse a formatos de placas microtituladoras estándar.

La distribución paralela significa la introducción de agentes mediante electroporación en una pluralidad de grupos de células o células simples usando una pluralidad de electrodos de punta. Se puede lograr la distribución paralela situando la ordenación de electrodos de punta sobre objetivos celulares en depósitos separados, de forma que cada electrodo de punta provoca la electroporación y la subsiguiente distribución de un tipo de agente portador o de una mezcla de varios agentes portadores al objetivo celular. Al tratamiento paralelo puede seguirle otro tratamiento paralelo con un nuevo tipo de agente portador o una mezcla de varios agentes portadores al objetivo celular. Se puede también lograr situando la ordenación de electrodos de punta sobre objetivos celulares en un gran depósito, por ejemplo, donde los objetivos celulares son tanto un cultivo de células confluentes o células crecidas en diseños deseados.

Para lograr en este modo de realización la distribución secuencial de agentes portadores usando ordenaciones de electrodos de punta, cada electrodo de punta contiene uno o diferentes tipos de agentes portadores de células o una mezcla de varios agentes portadores de células. Se puede lograr la distribución secuencial desplazando la ordenación de electrodos de punta sobre un objetivo monocelular en secuencia, provocando cada electrodo de punta la electroporación y subsiguiente distribución de cada tipo de agente portador de células o una mezcla de varios agentes portadores de células.

En vez de desplazar la ordenación de electrodos de punta, también es posible desplazar las estructuras celulares en relación a los electrodos de punta fijados espacialmente. También es posible usar el mismo tipo de configuración, donde cada electrodo de punta contiene uno o diferentes tipos de agentes portadores de células o una única mezcla de varios agentes portadores de células, pero en lugar de realizar la distribución secuencial al mismo objetivo celular, los agentes portadores de células se distribuyen a objetivos celulares separados y por tanto dan lugar a objetivos celulares con la internalización de agentes portadores individuales.

En un modo de realización, los agentes que han de cargarse en las células se pueden aspirar al interior de los electrodos de punta (carga frontal) usando la tecnología de pipeteo disponible comercialmente, tanto integrada en un dispositivo de robótica como en algún otro sistema dispensador. En otro modo de realización, donde las puntas se integran en un dispositivo, se pueden aspirar los agentes como se ha descrito anteriormente, o, si hay canales en el dispositivo y los canales se conectan a al menos una vía externa, se pueden cargar los agentes a través de la entrada superior de la punta (carga trasera). La combinación de la formación de poros y de la distribución de agentes suplementada a la solución electrolítica en el electrodo de punta, posibilita la carga de materiales en el citoplasma de una pequeña población de células o de células simples.

A veces es preferible cargar los electrodos de punta desde el extremo de la punta/salida del fondo usando fuerzas de capilaridad o aspiración/succión. Este procedimiento se puede usar para cargar una pluralidad de electrodos de punta simultáneamente. Los electrodos de punta se posicionan en viales individuales que contienen agentes portadores de células y se introduce una pequeña muestra en el electrodo de punta usando cualquiera de los métodos mencionados anteriormente.

El método, que no es parte de la invención, posibilita por tanto la distribución de agentes paralela en combinaciones con la electroporación. Debido a que las ordenaciones de electrodos de punta descritas en los modos de realización anteriores para la distribución secuencial de agentes portadores de células también se adaptan idealmente a la electroporación de células crecidas en diseños en una superficie o células contenidas en pocillos múltiples en una placa de pocillos múltiples, la presente invención proporciona una herramienta para las aplicaciones de filtrado intracelular paralelo. En la distribución paralela de un agente portador de células, cada salida de punta simple de una ordenación de electrodos de punta detecta como objetivo una población de células o células simples en una superficie o en una estructura de pocillos. Por tanto, se pueden detectar como objetivo, las células individuales o pequeñas poblaciones de células con el mismo, o diferentes compuestos que están internalizados simultáneamente en el citoplasma. Por tanto, tal y como se ha descrito anteriormente, se puede emplear para la electroporación de estructuras de células múltiples cualquiera de los modos de realización para la distribución secuencial de agentes.

Se puede usar la presente invención para internalizar agentes dentro de células usando la electroporación que comprende cualquiera de los métodos siguientes no limitativos:

1. Distribución intracelular de agentes de membrana impermeable a una población de células o a una célula simple de un tipo de células.
2. Distribución intracelular de agentes de membrana impermeable a células separadas físicamente en una

población de células o células simples del mismo tipo de células.

3. Distribución intracelular de agentes de membrana impermeable a células separadas físicamente en una población de células o células simples de diferentes tipos de células.

5 4. Distribución intracelular secuencial de agentes de membrana impermeable a una población de células o a una célula simple de un tipo de células.

5. Distribución intracelular secuencial de agentes de membrana impermeable a células separadas físicamente en una población de células o células simples del mismo tipo de células.

6. Distribución intracelular secuencial de agentes de membrana impermeable a células separadas físicamente en una población de células o células simples de diferentes tipos de células.

10 7. Distribución intracelular paralela de agentes de membrana impermeable usando varios electrodos de punta a una población de células o células simples de un tipo de células.

8. Distribución intracelular paralela de agentes de membrana impermeable usando varios electrodos de punta a células separadas físicamente en una población de células o células simples del mismo tipo de células.

15 9. Distribución intracelular paralela de agentes de membrana impermeable usando varios electrodos de punta a células separadas físicamente en una población de células o células simples de diferentes tipos de células.

10. Una combinación de distribuciones intracelulares paralelas y secuenciales de agentes de membrana impermeable usando varios electrodos de punta a una población de células o células simples de un tipo de células.

20 11. Una combinación de distribuciones intracelulares paralelas y secuenciales de agentes de membrana impermeable usando varios electrodos de punta a células separadas físicamente en una población de células o células simples del mismo tipo de células.

12. Una combinación de distribuciones intracelulares paralelas y secuenciales de agentes de membrana impermeable usando varios electrodos de punta a células separadas físicamente en una población de células o células simples de diferentes tipos de células.

25 13. Cualquier modo de distribución intracelular de agentes de membrana impermeable descritos anteriormente (1-12) usados en combinación.

#### Aplicaciones

30 Importantes aplicaciones del método, que no es parte de la presente invención, incluyen su uso en filtrado de fármacos, identificación de proteínas, y carga de células con agentes terapéuticos. En particular, aplicando un campo eléctrico permeabilizante sobre células o estructuras celulares, sondas específicas (marcadores), se pueden introducir sustratos o ligandos en el citoplasma para filtrar química intracelular tales como enzimas citosólicas y receptores en orgánulos. Más específicamente, esto facilita el filtrado de la acción intracelular de fármacos así como los análisis de proteínas intracelulares tales como enzimas, receptores o proteínas estructurales. Usando el método, que no es parte de la presente invención, se pueden introducir estos marcadores en combinación con los fármacos o ligandos que interactúan directamente con la proteína objetivo o con proteínas en los mismos caminos de señalización. Por tanto, es posible caracterizar, incluso a nivel de célula simple, tanto la presencia de varias proteínas como su función. El bloqueo de caminos particulares con ligandos específicos, antagonistas, inhibidores o moduladores puede hacer posible el control de procesos celulares y proporcionar guías para nuevos sistemas. Dichos compuestos se pueden introducir a una célula, por ejemplo, mediante su co-electroporación usando un electrodo de punta que contenga esos uno o varios ligandos de interés. Alternativamente, se pueden internalizar en una estructura celular mediante otros medios, por ejemplo, se pueden usar agentes de células permeables. El método, que no es parte de la invención, también es altamente adecuado para modificar y/o detectar ácidos nucleicos como ADN y ARN presentes en células, así como para transfectar células con ácidos nucleicos como ADN, ARN, siARN y oligonucleótidos antisentido.

45 En términos generales, el método, que no es parte de la invención, se puede usar en las siguientes áreas no limitativas de aplicaciones: proteómica, genómica, perfilado de fenotipos (fenómica), análisis de fármacos y filtrado, farmacocinética, fertilización in vitro, transgénicos, transferencia nuclear, transferencia de orgánulos, y diagnósticos. Más específicamente, pero también no limitativas, aplicaciones en las cuales el método, que no es parte de la invención, se puede usar son transfección de genes, identificación de genes, identificación de enzimas, identificación de proteínas, identificación de receptores, análisis de saturación, análisis de enzimas, análisis de enzimas competitivas, análisis de enzimas no competitivas, análisis de enzimas con moduladores, análisis de enzimas con inhibidores isostéricos, análisis de receptores, análisis de receptores con antagonistas, análisis de receptores con moduladores, análisis virales, análisis bacterianos, análisis de fármacos, análisis cinéticos, modificación de caminos metabólicos, y modificación de caminos de señalización.

Específicamente, el método, que no es parte de la invención, es muy adecuado para la identificación de receptores intracelulares y ligandos receptores. Los receptores intracelulares y los canales de iones que provocan la liberalización de moléculas de señalización tales como  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP,  $\text{K}^+$  etc. se pueden identificar y estudiar usando bibliotecas de ligandos que se electroporan en las células, preferiblemente en combinación con antagonistas receptores selectivos. Por ejemplo, se puede detectar el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde los almacenamientos intracelulares sobre la activación de un receptor intracelular usando agentes quelantes fluorogénicos tales como mag-fura-2 y fluo-3.

Además, para identificar al receptor, o para revelar las interacciones receptor-ligando, se puede usar y electroporar un antagonista receptor selectivo en la célula para bloquear selectivamente la acción del ligando. Además de las sondas de fluorescencia, se pueden usar radio-ligandos, métodos absorbentes o electrofisiológicos, y sustratos fluorogénicos. Los marcadores fluorogénicos son normalmente ésteres de célula permeable que se pueden añadir al medio de baño celular y no necesitan ser electroporados en las células. Por tanto, usando dichos ésteres, se pueden cargar las células con tintes antes de que se experimente la electroporación. Teniendo la habilidad de introducir tanto un agonista receptor además de un marcador para la activación específica del receptor es posible, por ejemplo, identificar el agonista receptor más potente de una biblioteca de agonistas o el antagonista receptor más potente de una biblioteca de antagonistas.

También es posible diseñar experimentos para obtener, por ejemplo, curvas de respuesta a la dosis. Por ejemplo, con el método, que no es parte de la presente invención, es posible introducir tanto un receptor agonista como un receptor antagonista en el citosol de la célula en diferentes concentraciones de los respectivos compuestos además de un marcador para la activación del receptor específica. También es posible introducir tanto un receptor agonista como un receptor antagonista en el citosol de la célula en diferentes concentraciones de los respectivos compuestos con el objetivo general de hallar la naturaleza del enlace del receptor agonista y del receptor antagonista, es decir, si es competitivo o no competitivo, etc. Se pueden realizar de esta forma además de la identificación de los receptores, y ligandos también llamada "pesca de ligandos" o "desorfanado". Una célula con una disposición conocida de receptores se usa como detector y se introducen una biblioteca de muestras potenciales de ligandos al citosol de la célula para filtrar las acciones de estos ligandos.

Además, la invención es adecuada para la identificación de enzimas intracelulares y sustratos de enzimas. Se pueden usar sustratos de enzimas altamente específicos que resultan de productos fluorescentes para la identificación de proteínas/enzimas en, por ejemplo, perfilados proteómicos y fenotipos de sistemas intracelulares individuales usando la técnica de la invención. Se puede introducir el sustrato sintético, posiblemente en combinación con un fármaco, inhibidor o modulador en la célula usando la electroporación de la presente invención. Hay una diversidad de sustratos disponibles que se pueden emplear como interruptores de luz en el paso de conversión del sustrato producto. Dichos sustratos incluyen sustratos para esterasas, sulfatasas, fosfatasas, y demás. El sustrato es fluorescente o bien el producto es no fluorescente o viceversa.

Para sistemas de reacción acoplada dentro de las células, por ejemplo, la degradación de alcohol mediante el alcohol deshidrogenasa que utiliza la conversión de  $\text{NAD}^+$  y NADH, provoca por tanto un cambio en la fluorescencia, la molécula objetivo no necesita ser fluorescente siempre que se acople a una reacción que produzca una molécula detectable. Otros ejemplos de tales compuestos fluorescentes naturales en las células son NADPH y flavinas.

También se puede usar la amplificación química con enzimas para aumentar la sensibilidad del sistema (Blaedel y otros colaboradores, en H.U. Bergmeyer (ed) Métodos de Análisis Enzimáticos, verlag Chemie/Academia Press, Nueva York 1974 vol1, p 131). El principio de este método es usar enzimas que convierten el sustrato en productos, y por tanto provoca un cambio de gran concentración del sustrato, que puede ser difícil de medir, en productos, que pueden ser medidos fácilmente.

Un ejemplo de un sustrato fluorogénico es el difosfato de fluoresceína (FDP) que se puede usar para la detección de fosfatasas. El sustrato se hidroliza con fosfatasa alcalina y produce la fluorescencia en el producto fluorescente. Otro sistema es la caseína BODIPY FL, que es un sustrato para las metalo-proteasas, serina-proteasas, proteasas ácidas y sulfidril-proteasas, incluyendo catepsina, quimotripsina, elastasa, papaína, pepsina, termolisina y tripsina. Otros ejemplos de sistemas son  $\beta$ -galactosidasa donde el sustrato es fluoresceína di- $\beta$ -D galactopiranosido (FDGP) que se hidroliza de forma secuencial mediante  $\beta$ -galactosidasa, primero a fluoresceína monogalactosidasa (FMG) y después a fluoresceína altamente fluorescente.

Las Figuras 14A-E ilustran el resultado experimental del uso del difosfato de fluoresceína (FDP) para detectar como objetivo a la fosfatasa alcalina de enzima intracelular que hidroliza catalíticamente las uniones fosfoésteres en el sustrato de forma que se forma en el citosol el producto de fluoresceína altamente fluorescente. Se suplementó el sustrato difosfato de fluoresceína (FDP) al electrolito en el electrodo de punta y se transfirió a la célula durante la electroporación. El sustrato es no fluorescente y el producto es fluorescente. La fluorescencia obtenida en las células en las Figuras 14B y E, que indica la presencia del producto, señala también la presencia de la enzima.

Las interacciones proteína-proteína son complejas e implican muchos procesos. El bloqueo de caminos particulares

con ligandos específicos puede permitir el control de procesos celulares y proporcionar guías para nuevos sistemas (Zutshi, y otros colaboradores., Curr. Opin. Chem. Biol. 2:62-66,1998). Por ejemplo, la actividad de la proteasa intracelular fue investigada usando una proteína, caseína, que estaba fuertemente cargada con la molécula fluorescente verde BODIPY FL como sustrato de enzima. En solución, la caseína BODIPY FL se pliega de forma que las configuraciones cuaternarias en la molécula apagan la fluorescencia. Cuando las uniones de péptidos se descomponen, por la acción de las proteasas citosólicas, los segmentos de péptidos libres etiquetados con BODIPY FL comienzan a fluorescer.

El método, que no es parte de la invención, se puede también usar en combinación con aplicaciones de fármacos y agentes que afectan a los receptores situados en la membrana del plasma celular. Por consiguiente, tanto los receptores de superficie como las interacciones (citoplasmáticas) intracelulares de uno o varios fármacos se pueden sondear simultáneamente, y usarse, por ejemplo, como un método para caracterizar caminos de señalización.

También se puede lograr de ese modo la electroporación de orgánulos individuales usando electrodos de punta de acuerdo con la invención. Con esta invención se pueden mantener bajo un campo eléctrico localizado incluso dominios intracelulares espacialmente bien definidos con una clase de orgánulos detectada como objetivo, permitiendo por tanto la transferencia de solutos polares en los orgánulos. Las aplicaciones de electroporación de orgánulos incluyen alteraciones del genoma mitocondrial. Es bien sabido que las mutaciones en el genoma mitocondrial pueden provocar multitud de enfermedades, y que la terapia genética puede potencialmente ser de la mayor importancia. Hasta el momento, sin embargo, la mitocondria tiene que ser aislada de las células antes de que se pueda realizar la transferencia de un nuevo fragmento genético a la mitocondria. Luego, se debe reinsertar la mitocondria en la célula. La técnica de acuerdo con la invención hace posible insertar directamente genes en la mitocondria cuando están contenidos en una célula. Esto es un avance significativo sobre los esquemas tradicionales de transfección de mitocondrias.

Los orgánulos pueden estar contenidos dentro de una célula simple o pueden estar aislados de una célula simple o de una población de células. En tales aplicaciones, las intensidades de los impulsos proporcionadas por un generador de impulsos en comunicación con el electrodo de punta o electrodos de punta dependen de la estructura a electroporar y de la distancia entre electrodos. Pequeñas estructuras organulares, como retículos endoplasmáticos, y mitocondrias, requieren una intensidad mayor para crear poros en la membrana. Se puede variar también la duración del impulso en el intervalo de unos cuantos microsegundos a varios minutos dependiendo de la estructura de membrana pero también de la estructura del compuesto a incorporar. Moléculas grandes con bajas velocidades de difusión requieren grandes periodos de tiempo para desplazarse en la célula. Para la electroporación de orgánulos en el interior de una célula, los electrodos de punta tienen preferiblemente vástagos de aislamiento eléctrico, de forma que la parte del electrodo que se pone en contacto con la membrana celular no tiene como consecuencia la formación de poros por inducción eléctrica. Las dimensiones físicas de los electrodos intracelulares para la electroporación de orgánulos pueden oscilar en diámetro desde unos cuantos nanómetros a unos cuantos micrómetros.

Preferiblemente, los electrodos de punta se disponen de forma que el orgánulo que se va a permeabilizar se sitúa entre los electrodos mientras que se aplica un campo eléctrico de suficiente intensidad. Se puede introducir una molécula de orgánulo impermeable en el orgánulo a través del lumen de uno o ambos electrodos de punta. Se repite este procedimiento hasta que se permeabilizan el número deseado de orgánulos. Se pueden retirar del citoplasma el exceso de moléculas usando caminos degradados, o mediante algunos otros medios, y las moléculas se sitúan exclusivamente dentro de una población de orgánulos permeabilizados.

Otra aplicación de la presente invención es para el uso con técnicas de biosensores. En particular, aplicado un campo eléctrico permeabilizante sobre una célula simple, se puede usar con fines biosensores. la química intracelular y los orgánulos. Como ejemplo, se puede analizar el inositol trifosfato, que activa los receptores en los retículos endoplasmáticos, para usar dichos esquemas. Se añade simplemente el compuesto a la solución tampón circundante a la célula permeabilizada y se difundirá en el interior de la célula y unirá a los receptores en el retículo endoplasmático. El retículo endoplasmático liberará iones calcio sobre la unión del inositol trifosfato a los receptores. Si luego se suplementa la célula con un tinte quelante de calcio fluorogénico, tal como fluo-3, se puede medir la activación del receptor como un aumento de fluorescencia.

Cuando se usan los electrodos de punta, de acuerdo a la presente invención, se pueden administrar a la célula las moléculas impermeables celulares añadidas al medio no sólido eléctricamente conductor usando un sistema de perfusión, tal como una bomba de microjeringa o una bomba peristáltica. De acuerdo a otro esquema, se pueden distribuir las moléculas de células impermeables contenidas en la solución electrolítica a una célula usando electroforesis o electroósmosis. Un campo eléctrico aplicado provoca la formación de poros en la célula tal y como se ha descrito anteriormente. Debido a que los componentes del interior del electrolito electrodo se separarán basándose en su relación carga/resistencia a la fricción, esto abre posibilidades para realizar la detección basada en el sensor de orgánulos de especies fraccionadas por electroforesis.

Si los métodos, que no son parte de la invención, se llevan a cabo "en vivo" es posible usar un microscopio

- quirúrgico para ver la estructura celular. Además, es posible usar un dispositivo esterotáctico para el posicionamiento de los electrodos de punta. Cuando el método se lleva a cabo “en vivo” no es posible por supuesto situar la estructura celular en algún tipo del recipiente con solución tampón. En lugar de ello, se administra el compuesto que se ha de incorporar a la estructura celular en una solución tampón fisiológica tanto separada  
5 mediante un catéter como directamente mediante un electrodo hueco de fibra. Cuando se usa un electrodo de punta, se administra el compuesto a la estructura celular a través de la abertura del extremo que mira al objetivo del electrodo de punta. Se acopla el extremo receptor del electrodo de punta a un sistema de distribución fluidica, tal como una jeringa controlada por una rosca micrométrica o una bomba de microinyección que hace posible la administración de un volumen exacto.
- 10 La posibilidad de añadir el compuesto tanto al mismo tiempo en el que ocurre la electroporación como con algún tiempo de demora hace a esta técnica muy útil. Se logra localmente una concentración muy alta en la célula seleccionada y la dispersión en ella será más rápida debido al mayor gradiente de concentración. Otras ventajas son el menor consumo de compuesto y la reducción al mínimo de los problemas debidos al procedimiento de lavado. Muchas veces se puede esperar que una administración focal, es decir, una administración directamente al conjunto  
15 de células con un funcionamiento inadecuado, de fármacos o genes, sea ampliamente superior que técnicas comúnmente empleadas de administración de fármacos intraperitoneales, orales, intraventriculares, o de cualquier otro tipo.
- Se puede conseguir la administración del fármaco y gen intracelular “en vivo” con el método descrito aquí y que no es parte de la invención. Debido a las dimensiones extremadamente pequeñas de los electrodos, en combinación  
20 con las bajas tensiones aplicadas, se espera muy poco trauma en el tejido. Además, es muy preciso el posicionamiento de los electrodos y la subsiguiente distribución de genes y fármacos. Se ha demostrado que las sondas de microdiálisis, que son del orden de unas cien veces mayores que los electrodos usados en el método de acuerdo con la presente invención, provoca un muy pequeño trauma en el tejido y una interrupción del metabolismo local.
- 25 Con el método descrito aquí y que no es parte de la invención, usado en combinación con terapia genética, será posible “reprogramar” las células; tanto para hacer trabajar a una célula con un funcionamiento inadecuado en la manera correcta, como darle a una célula una nueva función.
- Es por tanto posible usar el método en terapias y tratamientos de diferentes enfermedades y condiciones provocadas por el funcionamiento inadecuado de células simples o pequeñas poblaciones de células, tales como  
30 enfermedad de Parkinson y tumores cerebrales, como se ilustra con más detalle a continuación.
- Muchas enfermedades tanto si son adquiridas genéticamente o no, son debidas a interrupciones metabólicas. Por ejemplo, la enfermedad de Parkinson provocada por la degeneración de neuronas en el camino nigrostriatal es debido a un funcionamiento inadecuado de la maquinaria bioquímica para la producción de dopamina en una  
35 población de células aisladas. Esto a su vez es debido a déficits motores/de comportamiento. El tratamiento estándar de la enfermedad de Parkinson se realiza con administración oral de L-DOPA, un precursor de la dopamina. Alternativamente, se transplanta un tejido injertado con células neuronales que producen dopamina en el cerebro del paciente. Se puede llevar a cabo la administración de fármacos o genes “en vivo” en las estructuras cerebrales adecuadas usando un procedimiento de electroporación similar a aquel descrito en los dos ejemplos anteriores y usado como una estrategia terapéutica.
- 40 Se ha usado, con informes anecdóticos de éxito, el tratamiento experimental de tumores cerebrales que usan la distribución de genes, generalmente virus modificados genéticamente. El uso de virus como un sistema de distribución tiene limitaciones en cuanto que puede poseer un riesgo potencial si el virus muta. Usando un procedimiento de electroporación para la distribución de genes, por ejemplo “genes suicidas” para la citoquina deaminasa o la timidina quinasa, similar a la que se describe a continuación en los ejemplos, se elimina la necesidad  
45 de usar los sistemas de distribución de virus en la terapia del cáncer.
- Se puede realizar el posicionamiento de los electrodos de punta usando un atlas estereotáctico, representado en la figura por el sistema de coordenadas Cartesianas, y microposicionadores estereotácticos. Se puede lograr la perfusión como se ilustra en la figura con una jeringuilla o mediante algún otro medio apropiado. El posicionamiento  
50 de los electrodos y el del campo eléctrico aplicado pueden variarse de forma que se electroporan un número deseado de células.
- El agente que se electropora en las células se administra luego simplemente a través del canal estrecho en el centro del electrodo o electrodos mediante la aplicación de un flujo mediante una bomba de jeringuilla o una bomba peristáltica o cualquier otro tipo de sistema de bombeo de soluciones incluyendo la electroforesis.
- Una posibilidad especialmente interesante es usar implantes de perfusión/electroporación que funcionan con  
55 baterías en materiales biotolerables para aplicaciones continuas de solutos en las células. Debido a que se requieren potenciales tan bajos, se pueden usar baterías que proporcionen tensiones en el intervalo desde unos cuantos voltios a aproximadamente 20 voltios. Estas unidades de electroporación que funcionan con baterías se

pueden fabricar pequeñas, pueden estar incluidas en un chip que mida sólo unos cuantos milímetros cuadrados. Tal sistema podría incluir un depósito de solución que contiene un soluto, dos electrodos para electroporación, un circuito electrónico para una distribución y control temporizados de los parámetros de electroporación, es decir perfil de impulso, duración de impulso, repetición, y amplitud así como una fuente de batería, una entrada de relleno del depósito.

Cuando se usa el método para transferir al exterior de las estructuras celulares solutos atrapados, también llamada electroporación invertida, algunas de las aplicaciones son la distribución de fármacos a células simples o pequeñas poblaciones de células. Esto se usa, por ejemplo, para permeabilizar células y estructuras de células similares, tales como liposomas para transferir solutos impermeables de células desde el interior al medio extracelular. El gradiente de concentración de los solutos tiene entonces la dirección opuesta, es decir, una alta concentración de soluto dentro de la estructura celular y bajas concentraciones de soluto en el exterior de la estructura celular. En particular, los liposomas con fármacos atrapados se pueden vaciar de manera controlada cerca de una célula objetivo aplicando un impulso de tensión CA sobre su membrana a través de electrodos de punta de fibra de carbono posicionados de la misma forma que se ha descrito anteriormente. El uso de tal distribución basada en liposomas de fármacos desencadenados mediante electroporación se puede usar en una investigación básica así como en la industria farmacéutica, por ejemplo, para composiciones de liberación diferida.

### Ejemplos

Se ilustrará a continuación con más detalle la invención en los siguientes ejemplos, que en ningún caso limitan el alcance de la invención.

Ejemplo 1. Electroporación de un único punto de células en un cultivo confluyente.

Se cultivaron células PC-12 bajo procedimientos estándares en placas petri convencionales. El medio de cultivo celular se retiró y se reemplazó con una solución tampón salina Hepes, pH 7,4, y el cultivo celular se transfirió a la plataforma de un microscopio invertido (Leica, modelo DMIRB equipado con una plataforma de traslación x,y) Se llenó con la solución tampón salina Hepes suplementada con 500  $\mu\text{M}$  de difosfato de fluoresceína (FDP) un electrodo de punta fabricado con una punta de pipeta convencional con un cable de platino insertado horizontalmente en el interior de la punta. Se conectó el electrodo de punta a un generador de impulsos (simulador de impulsos aislado con sistemas AM, modelo 2100) mediante un osciloscopio para la visualización el impulso. Se conectó a tierra un contraelectrodo en el baño celular y la señal del potencial en el electrodo de punta fue negativa. Las salidas del electrodo de punta se posicionaron a una distancia de 50  $\mu\text{m}$  sobre el cultivo celular. Se expusieron las células a impulsos  $5 \times 10^4$  de 100 ms de duración, con un tiempo de demora de 100 ms entre impulsos de 3 mA de amplitud. Se transfirió el FDP fuera del electrodo de punta mediante fuerzas electroosmóticas, no añadiéndose al sistema una presión o bombeo adicional. Se detectó la internalización del FDP, tras la unión del FDP con la fluoresceína en el citosol de las células mediante fosfatasas inespecíficas, mediante el sistema de fluorescencia del microscopio, recogido por una cámara CCD y almacenado en un software de imágenes de fluorescencia. Se presenta el resultado en la Figura 13A. Como se observa en la figura, las células situadas por debajo de la pared del electrodo de punta se han electroporado con éxito y exponen una fluorescencia brillante. Esto es debido a la intensidad del campo eléctrico creado en el interfaz entre el baño de célula puesto a tierra y el campo eléctrico homogéneo dentro del electrodo de punta. En este experimento se han detectado como objetivo y electroporado con éxito aproximadamente 500 células.

Ejemplo 2. Electroporación paralela de puntos en un cultivo celular confluyente

Se cultivaron células PC-12 bajo procedimientos estándares en placas petri convencionales. El medio de cultivo celular se retiró y se reemplazó con una solución tampón salina Hepes, pH 7,4, y el cultivo celular se transfirió a la plataforma de un microscopio invertido. Dos electrodos de punta conectados a un generador de impulsos mediante una única varilla insertada a través de ambas puntas, se llenaron con la solución tampón salina Hepes suplementada con 500  $\mu\text{M}$  de difosfato de fluoresceína (FDP). Un contraelectrodo se situó en el baño celular y se conectó a tierra. Las salidas de los dos electrodos de punta se posicionaron a una distancia de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  sobre el cultivo celular. Se expusieron dos puntos de células, bajo los dos electrodos de punta, a impulsos  $4 \times 10^4$  de 100 ms de duración, con un tiempo de demora de 100 ms entre impulsos de 4 mA de amplitud. Se transfirió el FDP fuera de los electrodos de punta mediante fuerzas electroosmóticas, no añadiéndose al sistema una presión o bombeo adicional. Se realizó la detección y la formación de imágenes de la misma forma que en el ejemplo anterior. Se presenta el resultado en la Figura 14C-E. Ambas superficies situadas justo bajo los electrodos de punta se han electroporado con éxito y el FDP se ha internalizado en las células. La distancia entre los dos electrodos de punta es aproximadamente de 2 mm, y como se puede observar en la figura, la distancia se puede reducir sustancialmente.

Las variaciones, modificaciones, y otras implementaciones de lo que se ha descrito aquí se les ocurrirán a aquellos con experiencia normal en la técnica sin apartarse de la invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un electrodo (1) de punta que comprende: un alojamiento que define un lumen para recibir un medio no sólido eléctricamente conductor, y una superficie eléctricamente conductora (2) para acoplarse a un generador (4) de tensión o corriente, comprendiendo la superficie eléctricamente conductora (2) una estructura conformada para ajustarse en el alojamiento que define el lumen del electrodo (1) de punta y situada dentro del lumen, comprendiendo el alojamiento un extremo que mira al objetivo que comprende una abertura en comunicación con el lumen.
2. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la abertura en comunicación con el lumen es capaz de distribuir un agente a un objetivo a través de la abertura.
- 10 3. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el lumen comprende un medio eléctricamente conductor.
4. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el alojamiento comprende un extremo cónico.
5. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la superficie eléctricamente conductora (2) es en forma de cilindro, varilla, filamento, o cable.
- 15 6. El electrodo de punta de la reivindicación 5, donde la superficie eléctricamente conductora (2) es una estructura que penetra las paredes del alojamiento en uno o ambos lados del alojamiento.
7. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la superficie eléctricamente conductora (2) es un cable conectado al exterior del alojamiento a una placa anular.
8. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el medio eléctricamente conductor es un líquido.
9. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el medio eléctricamente conductor es un gel.
- 20 10. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el medio eléctricamente conductor comprende un agente para la distribución a un objetivo.
11. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el alojamiento comprende un material seleccionado del grupo consistente en vidrio, sílice fundida, plástico, cerámica, un material elastómero, un polímero, metal, un material no conductor recubierto al menos parcialmente con un material conductor, y un material conductor recubierto al menos parcialmente con un material no conductor.
- 25 12. El electrodo de punta de la reivindicación 2, donde el alojamiento comprende adicionalmente un extremo receptor distal al extremo que mira al objetivo y comprende una abertura para recibir al medio eléctricamente conductor.
13. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el electrodo de punta comprende adicionalmente una superficie conductora que funciona como un contraelectrodo (5).
- 30 14. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el alojamiento comprende un diámetro interior uniforme y un diámetro exterior uniforme o variable.
15. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el alojamiento comprende un diámetro exterior uniforme y un diámetro interior uniforme o variable.
- 35 16. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la longitud del electrodo de punta es menor que aproximadamente 10 cm.
17. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la longitud del electrodo de punta es menor que aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ .
- 40 18. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la longitud del electrodo de punta es menor que aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ .
19. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la longitud del electrodo de punta es menor que aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ .
20. El electrodo de punta de la reivindicación 2, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo es menor o igual que aproximadamente 5000  $\mu\text{m}$ .
- 45 21. El electrodo de punta de la reivindicación 2, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo es menor que aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .

22. El electrodo de punta de la reivindicación 2, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo es menor que aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ .
23. El electrodo de punta de la reivindicación 2, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo es menor que aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ .
- 5 24. El electrodo de punta de la reivindicación 2, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo es menor que aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ .
25. El electrodo de punta de la reivindicación 2, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo es menor que aproximadamente 100 nm.
- 10 26. El electrodo de punta de la reivindicación 2, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo es menor que aproximadamente 50 nm.
27. Una placa de electrodos que comprende al menos un punto de montaje para recibir a un electrodo (1) de punta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.
28. La placa de electrodos de la reivindicación 27, donde ese al menos un punto de montaje comprende un punto de fijación flexible para recibir al electrodo de punta, permitiendo el desplazamiento vertical de un electrodo de punta desde el punto de montaje.
- 15 29. La placa de electrodos de la reivindicación 27, que comprende una pluralidad de puntos de montaje.
30. La placa de electrodos de la reivindicación 29, donde la placa comprende una fila de puntos de montaje para formar una ordenación lineal de electrodos de punta.
31. La placa de electrodos de la reivindicación 29, donde la placa comprende una pluralidad de filas de puntos de montaje para formar una ordenación bidimensional de electrodos de punta.
- 20 32. La placa de electrodos de la reivindicación 29, donde la distancia entre centros de cada punto de montaje corresponde a la distancia entre centros de los pocillos de una placa microtituladora.
33. La placa de electrodos de la reivindicación 27, donde la placa (3) de electrodos comprende al menos un punto de interfaz para un generador de tensión o corriente.
- 25 34. La placa de electrodos de la reivindicación 27, donde la placa (3) de electrodos comprende al menos un punto de interfaz para interconectar con un dispositivo de distribución fluidica.
35. La placa de electrodos de la reivindicación 27, donde la placa (3) de electrodos comprende al menos dos capas que incluyen una capa conductora y una capa aislante.
- 30 36. La placa de electrodos de la reivindicación 27, donde ese al menos un punto de montaje comprende una abertura para recibir al electrodo (1) de punta.
37. La placa de electrodos de las reivindicaciones 36 ó 35, que comprende una capa que funciona como un contraelectrodo (5).
38. La placa de electrodos de la reivindicación 27, donde se monta al menos un electrodo (1) de punta a la placa de electrodos en el punto de montaje.
- 35 39. La placa de electrodos de cualquiera de las reivindicaciones 29-31, donde se monta una pluralidad de electrodos de punta en la placa de electrodos.
40. La placa de electrodos de la reivindicación 27, donde la placa de electrodos comprende al menos un canal microfluídico para la distribución de fluidos al menos a un electrodo de punta montado a la placa.
- 40 41. Una placa (3) de electrodos de punta que comprende al menos un electrodo de punta como se define en la reivindicación 1 y que comprende adicionalmente una placa sustancialmente plana sobre la cual se fabrica en ella al menos un elemento no plano para formar el electrodo (1) de punta, comprendiendo el elemento no plano un medio no sólido eléctricamente conductor y donde el extremo del elemento no plano distal respecto a la placa comprende la abertura para la exposición de un objetivo a un campo eléctrico y para la distribución de un agente desde la abertura al objetivo, y donde las paredes interiores del elemento no plano definen un lumen del electrodo (1) de punta.
- 45 42. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 41, donde las paredes interiores comprenden una superficie eléctricamente conductora (2) y el lumen comprende un medio eléctricamente conductor.

43. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 42 donde la superficie eléctricamente conductora es un recubrimiento conductor que recubre al menos parcialmente las paredes interiores del depósito.
- 5 44. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 41, donde la superficie eléctricamente conductora (2) comprende un cable, varilla o filamento en la base del lumen o el cual penetra en una o varias paredes del elemento no plano.
45. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 41, donde el extremo de al menos un elemento no plano es cónico.
- 10 46. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 41, donde la placa comprende una primera capa que comprende una pluralidad de depósitos y una segunda capa sustancialmente plana que comprende una pluralidad de elementos no planos elevados sobre la placa, donde cada elemento no plano comprende una abertura que mira al objetivo, centrada sobre cada depósito en la primera capa, para la exposición de un objetivo a un campo eléctrico, y donde las paredes interiores del elemento no plano definen un lumen que se comunican tanto como con el depósito como con la abertura.
- 15 47. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 46, donde la placa comprende adicionalmente una capa contraelectrodo.
48. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 41 ó 46, donde los depósitos comprenden un medio no sólido eléctricamente conductor.
49. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 48, donde el medio eléctricamente conductor comprende un agente.
- 20 50. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 47, donde la capa contraelectrodo contacta con el medio eléctricamente conductor.
51. La placa de electrodos de punta de la reivindicación 41 ó 46, donde los depósitos comprenden un agente.
52. Un kit que comprende un electrodo (1) de punta de la reivindicación 1 y un recipiente para contener un objetivo.
- 25 53. Un kit que comprende una placa de electrodos de la reivindicación 27 y al menos un electrodo (1) de punta para su montaje en la placa de electrodos.
54. El kit de la reivindicación 53, que comprende adicionalmente un recipiente para contener un objetivo.
55. El kit de la reivindicación 53, donde la placa (3) de electrodos comprende al menos un canal microfluídico.
56. El kit de la reivindicación 54, donde la placa (3) de electrodos y/o el recipiente comprenden al menos un canal microfluídico.
- 30 57. El kit de la reivindicación 54, donde el recipiente que contiene el objetivo se selecciona del grupo que consiste en una placa microtituladora, un recipiente de cultivo de células con múltiples pocillos, una placa petri, un sustrato polimérico, un sustrato vítreo, un chip microfluídico, y una membrana.
58. El kit de la reivindicación 53, donde el kit comprende adicionalmente al menos un contraelectrodo (5).
- 35 59. El kit de la reivindicación 53, donde el kit comprende adicionalmente un medio no sólido eléctricamente conductor para llenar al menos un electrodo (1) de punta.
60. El kit de la reivindicación 53, donde el kit comprende al menos un agente.
61. El kit de la reivindicación 53, donde el kit comprende al menos una célula.
62. Un kit que comprende una placa de electrodos de punta de la reivindicación 53, donde el kit comprende adicionalmente un recipiente para contener un objetivo.
- 40 63. El kit de la reivindicación 62, donde la placa de electrodos de punta y/o el recipiente comprenden adicionalmente al menos un canal microfluídico.
64. El kit de la reivindicación 63, donde el recipiente que contiene el objetivo de selecciona del grupo que consiste en una placa microtituladora, un recipiente de cultivo de células con múltiples pocillos, una placa petri, sustrato polimérico, un sustrato vítreo, un chip microfluídico, y una membrana.
- 45 65. El kit de la reivindicación 63, donde el kit comprende adicionalmente un medio no sólido eléctricamente conductor para llenar al menos un depósito.

66. El kit de la reivindicación 63, donde el kit comprende al menos un agente.
67. El kit de la reivindicación 63, donde el kit comprende al menos una célula.
- 5 68. Un sistema que comprende al menos un electrodo (1) de punta como se define en la reivindicación 1 y que comprende adicionalmente: una placa (3) de electrodos en contacto con la superficie eléctricamente conductora (2), donde la placa de electrodos se puede conectar a un generador (4) de impulsos para la distribución de un impulso de tensión o corriente a la superficie eléctricamente conductora (2).
69. El sistema de la reivindicación 68, que comprende adicionalmente un recipiente para contener un objetivo.
70. El sistema de la reivindicación 68, donde el sistema comprende adicionalmente un mecanismo para posicionar ese al menos un electrodo (1) de punta en proximidad a un objetivo.
- 10 71. El sistema de la reivindicación 68, donde el sistema comprende adicionalmente un generador de impulsos en comunicación con la placa de electrodos para la distribución de impulsos de tensión o corriente a través de ese al menos un electrodo de punta.
72. El sistema de la reivindicación 68, que comprende adicionalmente al menos un contraelectrodo (5).
- 15 73. El sistema de la reivindicación 68, donde el lumen de ese al menos un electrodo (1) de punta comprende un medio no sólido eléctricamente conductor.
74. El sistema de la reivindicación 73, donde el medio eléctricamente conductor comprende un agente.
75. El sistema de la reivindicación 73, donde el sistema comprende adicionalmente un mecanismo de distribución para la distribución de un fluido y/o un agente al menos a un electrodo (1) de punta.
- 20 76. El sistema de la reivindicación 75, donde el mecanismo de distribución comprende adicionalmente uno o más entre: un mecanismo de bombeo, un mecanismo para electroósmosis, o un mecanismo para electroforesis de un agente a través del lumen del electrodo (1) de punta.
77. El sistema de la reivindicación 68, donde el sistema comprende una pluralidad de electrodos de punta cada uno en contacto eléctrico con la placa (3) de electrodos.
- 25 78. El sistema de la reivindicación 77, donde los impulsos eléctricos transmitidos a través de cada electrodo de punta se controlan independientemente a través de un procesador del sistema.
79. El sistema de la reivindicación 77, donde la pluralidad de electrodos de punta están ordenados en una fila.
80. El sistema de la reivindicación 77, donde la pluralidad de electrodos de punta están ordenados en una pluralidad de filas.
- 30 81. El sistema de las reivindicaciones 69 ó 77, donde la placa (3) de electrodos y/o el depósito comprenden uno o más canales microfluídicos.
82. El sistema de la reivindicación 68, donde el sistema comprende adicionalmente un detector, para la detección de la alteración de las propiedades eléctricas o de las propiedades ópticas de la proximidad de un objetivo a un electrodo de punta y/o la distribución de un fluido y/o un agente al objetivo.
- 35 83. El sistema de la reivindicación 68, donde ese al menos un electrodo de punta es extraíble de la placa (3) de electrodos.
84. El sistema de la reivindicación 68, donde ese al menos un electrodo (1) de punta es una parte integrante de la placa (3) de electrodos.
- 40 85. El sistema de la reivindicación 84, donde la placa (3) de electrodos comprende una primera capa que comprende una pluralidad de depósitos y una segunda capa sustancialmente plana que comprende una pluralidad de elementos no planos elevados sobre la placa formando los electrodos de punta, donde la abertura que mira al objetivo del electrodo (1) de punta está centrada por encima de cada depósito en la primera capa, y donde el lumen del electrodo de punta se comunica con el depósito.
86. El sistema de la reivindicación 68, donde el lumen de ese al menos un electrodo (1) de punta comprende un medio no sólido eléctricamente conductor.
- 45 87. El sistema de la reivindicación 68, donde el alojamiento de ese al menos un electrodo (1) de punta comprende un extremo cónico.

88. El sistema de la reivindicación 68, donde la superficie eléctricamente conductora (2) de ese al menos un electrodo (1) de punta comprende un recubrimiento que cubre al menos parcialmente las paredes del alojamiento que definen el lumen.
- 5 89. El sistema de la reivindicación 68, donde la superficie eléctricamente conductora (2) comprende un elemento que comprende una superficie eléctricamente conductora insertada en el lumen del alojamiento.
90. El sistema de la reivindicación 68, donde el elemento es un cilindro, varilla o cable.
91. El sistema de la reivindicación 68, donde la superficie eléctricamente conductora (2) es una estructura que penetra en las paredes del alojamiento en uno o ambos lados del alojamiento.
- 10 92. El sistema de la reivindicación 68, donde la superficie eléctricamente conductora (2) es un cable conectado en el exterior del alojamiento a una placa anular.
93. El sistema de la reivindicación 68, donde el medio eléctricamente conductor es un líquido.
94. El sistema de la reivindicación 68, donde el medio eléctricamente conductor es un gel.
95. El sistema de la reivindicación 68, donde el medio eléctricamente conductor comprende un agente para la distribución a un objetivo.
- 15 96. El sistema de la reivindicación 68, donde el alojamiento comprende un material seleccionado entre el grupo consistente en vidrio, sílice fundida, plástico, cerámica, un material elastomérico, un polímero, un metal, un material no conductor recubierto al menos parcialmente con un material conductor, y un material conductor recubierto al menos parcialmente con un material no conductor.
- 20 97. El sistema de la reivindicación 68, donde el alojamiento de ese al menos un electrodo (1) de punta comprende adicionalmente un extremo receptor distal con respecto al extremo que mira al objetivo y comprende una abertura para recibir al medio eléctricamente conductor.
98. El sistema de la reivindicación 68, donde ese al menos un electrodo (1) de punta y/o placa (3) de electrodos comprenden adicionalmente una superficie eléctricamente conductora (2) que funciona como un contraelectrodo (5).
- 25 99. El sistema de la reivindicación 68, donde el alojamiento de ese al menos un electrodo (1) de punta comprende un diámetro interior uniforme y un diámetro exterior uniforme o variable.
100. El sistema de la reivindicación 68, donde el alojamiento de ese al menos un electrodo (1) de punta comprende un diámetro exterior uniforme y un diámetro interior uniforme o variable.
- 101 El sistema de la reivindicación 68, donde la longitud de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 10 cm.
- 30 102. El sistema de la reivindicación 68, donde la longitud de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ .
103. El sistema de la reivindicación 68, donde la longitud de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ .
- 35 104. El sistema de la reivindicación 68, donde la longitud de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ .
105. El sistema de la reivindicación 68, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor o igual que aproximadamente 5000  $\mu\text{m}$ .
106. El sistema de la reivindicación 68, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .
- 40 107. El sistema de la reivindicación 68, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ .
108. El sistema de la reivindicación 68, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ .
- 45 109. El sistema de la reivindicación 68, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ .
110. El sistema de la reivindicación 68, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo de ese al

menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 100 nm.

111. El sistema de la reivindicación 68, donde el diámetro de la abertura del extremo que mira al objetivo de ese al menos un electrodo (1) de punta es menor que aproximadamente 50 nm.

5 112. El sistema de la reivindicación 68, donde la placa (3) de electrodos comprende al menos un punto de montaje para recibir a un electrodo (1) de punta, y donde ese al menos un punto de montaje comprende una fijación flexible para recibir al electrodo (1) de punta permitiendo el desplazamiento vertical de un electrodo (1) de punta desde el punto de montaje.

113. El sistema de la reivindicación 112, donde la placa (3) de electrodos comprende una pluralidad de puntos de montaje.

10 114. El sistema de la reivindicación 112, donde la placa (3) de electrodos comprende una fila de puntos de montaje para formar una ordenación lineal de electrodos de punta.

115. El sistema de la reivindicación 112, donde la placa (3) de electrodos comprende una pluralidad de filas de puntos de montaje para formar una ordenación bidimensional de electrodos de punta.

15 116. El sistema de la reivindicación 112, donde la distancia entre centros de cada punto de montaje corresponde a la distancia entre centros de los pocillos de una placa microtituladora.

117. El sistema de la reivindicación 112, donde la placa (3) de electrodos comprende al menos un punto de interfaz para un generador (4) de tensión o corriente.

118. El sistema de la reivindicación 112, donde la placa (3) de electrodos comprende al menos un punto de interfaz para realizar la interfaz con un dispositivo de distribución fluidica.

20 119. El sistema de la reivindicación 112, donde la placa (3) de electrodos comprende al menos dos capas que incluyen una capa conductora y una capa aislante.

120. El sistema de la reivindicación 112 ó 119, donde la placa (3) de electrodos comprende una capa que funciona como un contraelectrodo (5).

25 121. El sistema de la reivindicación 112, donde al menos un punto de montaje comprende una abertura para recibir al electrodo (1) de punta.

122. El sistema de la reivindicación 69, donde la placa (3) de electrodos y/o recipiente comprende al menos un canal microfluídico.

30 123. El sistema de la reivindicación 68, que comprende adicionalmente un procesador para el control de uno o más parámetros seleccionados entre el grupo que consiste en: distribución del fluido a ese al menos un electrodo (1) de punta, distribución de al menos un agente a al menos un electrodo (1) de punta, llenado del electrodo (1) de punta con un medio eléctricamente conductor, parámetros de impulso de tensión o corriente, exploración de la placa (3) de electrodos que comprende ese al menos un electrodo (1) de punta con respecto a un objetivo, exploración de un objetivo con respecto a un electrodo (1) de punta, desplazamiento vertical de un electrodo (1) de punta, electroforesis a través de un electrodo (1) de punta, electroósmosis a través de un electrodo (1) de punta, bombeo del fluido a través de un electrodo (1) de punta, y funcionamiento de un detector del sistema.

35 124. El sistema de la reivindicación 123, donde los parámetros de impulso de tensión o corriente se seleccionan del grupo que consiste en duración del impulso, forma de la onda, y amplitud del impulso.

40 125. El sistema de la reivindicación 123 ó 124, donde el sistema comprende adicionalmente un dispositivo de usuario que comprende un interfaz gráfico para visualizar operaciones del sistema y/o para alterar parámetros del sistema.

126. El sistema de acuerdo con la reivindicación 82, donde el sistema comprende adicionalmente un dispositivo de lectura para visualizar la salida del detector.

127. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde el electrodo (1) de punta comprende una porción flexible.

45 128. El sistema de la reivindicación 68, donde ese al menos un electrodo (1) de punta comprende una porción flexible.

129. El sistema de la reivindicación 68, donde el sistema comprende adicionalmente un mecanismo de posicionamiento para restringir el desplazamiento vertical de ese al menos un electrodo (1) de punta.

130. El sistema de la reivindicación 129, donde se monta el mecanismo de posicionamiento al extremo que mira al

objetivo de ese al menos un electrodo (1) de punta.

131. El sistema de la reivindicación 129, donde el mecanismo de posicionamiento es una parte integrante del electrodo (1) de punta.

5 132. El electrodo de punta de la reivindicación 2, donde la punta comprende orificios en la parte de la punta proximal con respecto al extremo que mira al objetivo.

133. La placa de electrodos de la reivindicación 39, donde al menos una punta comprende orificios en una parte de la punta proximal con respecto al extremo que mira al objetivo.

134. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la superficie eléctricamente conductora (2) es un elemento extraíble del alojamiento.

10 135. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la superficie eléctricamente conductora (2) es un componente integrante del alojamiento.

136. El electrodo de punta de la reivindicación 1, donde la superficie eléctricamente conductora se acopla a una fuente de alimentación a través de una o más conexiones en el extremo receptor.

15 137. La placa (3) de electrodos de la reivindicación 42, donde la superficie eléctricamente conductora comprende una estructura conformada para ajustarse en el alojamiento definiendo un lumen del electrodo (1) de punta.

138. La placa de electrodos de la reivindicación 42, donde la superficie eléctricamente conductora (2) es un elemento extraíble del alojamiento.

139. La placa de electrodos de la reivindicación 42, donde la superficie eléctricamente conductora (2) es un componente integrante del alojamiento.

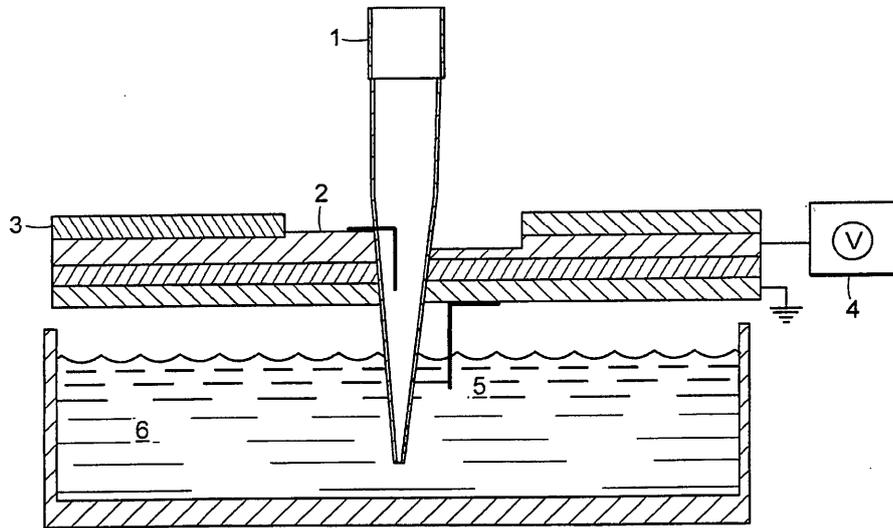


FIG. 1

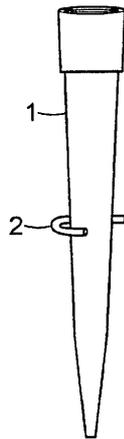


FIG. 2A

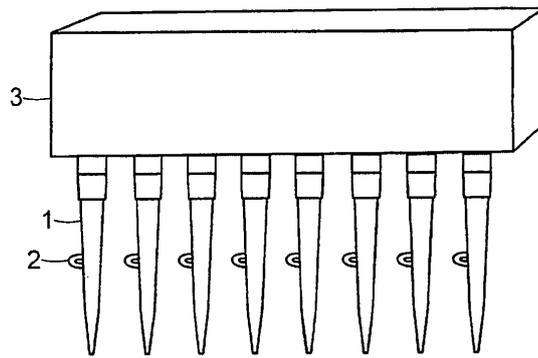


FIG. 2B

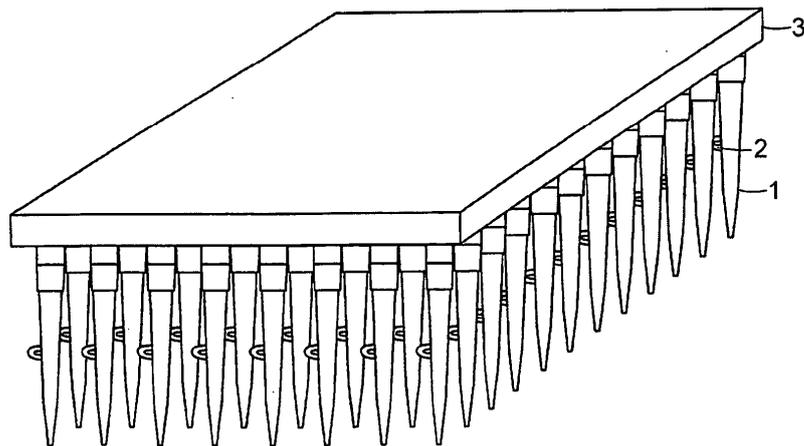


FIG. 2C

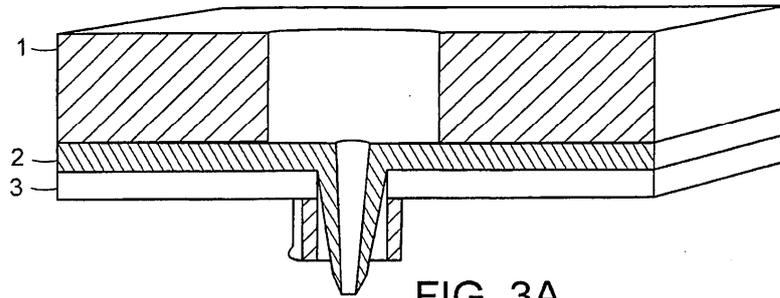


FIG. 3A

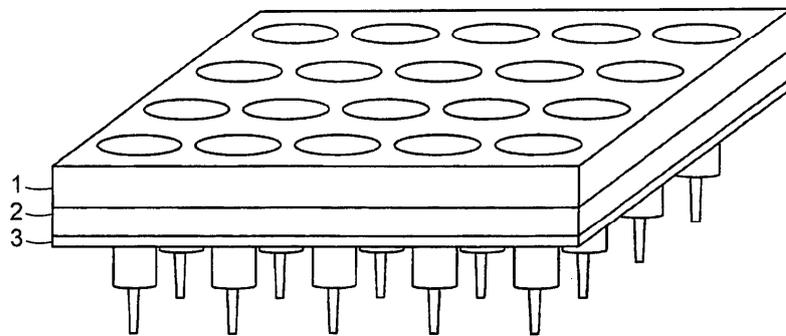


FIG. 3B

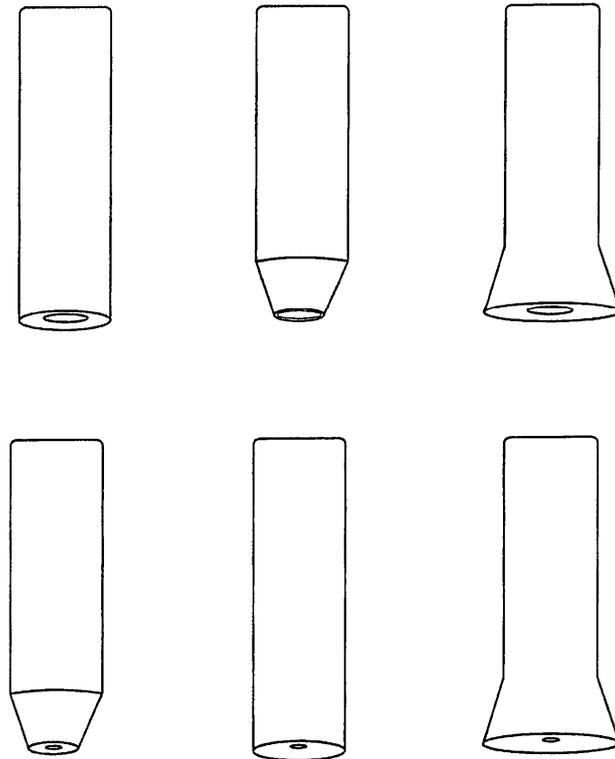


FIG. 4

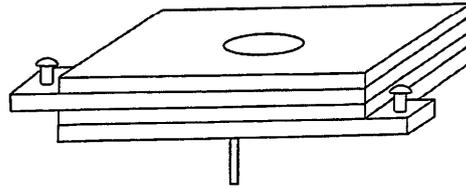


FIG. 5A

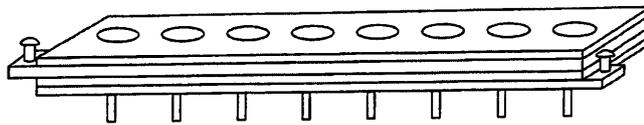


FIG. 5B

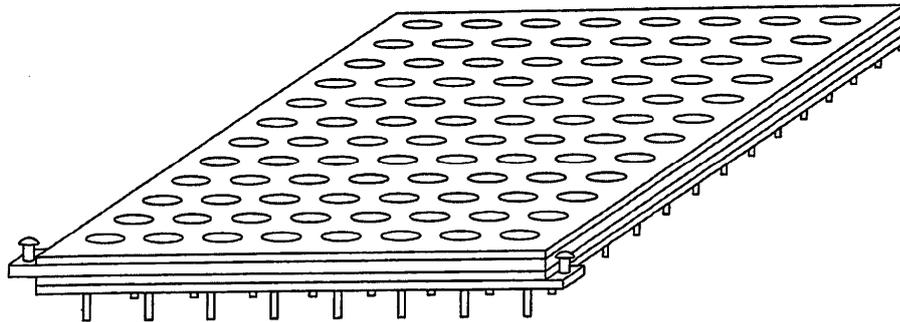


FIG. 5C

FIG. 6A

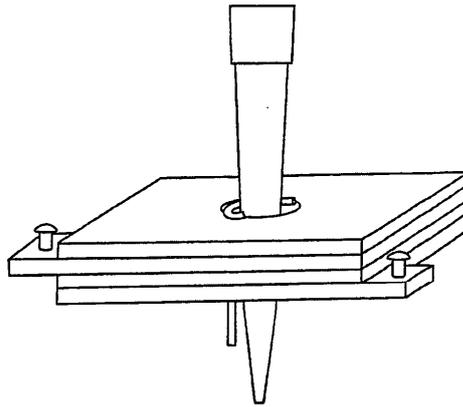


FIG. 6B

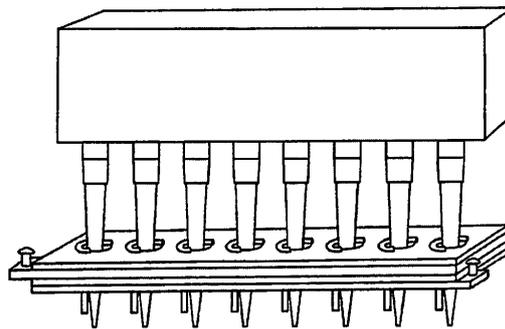


FIG. 6C

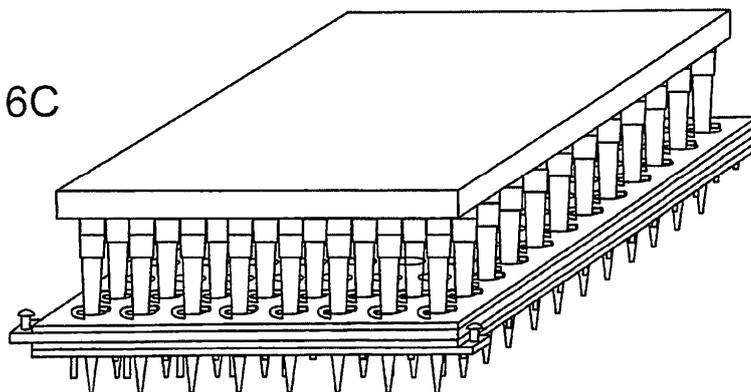


FIG. 7A

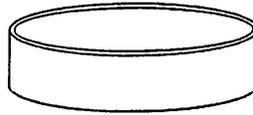


FIG. 7B

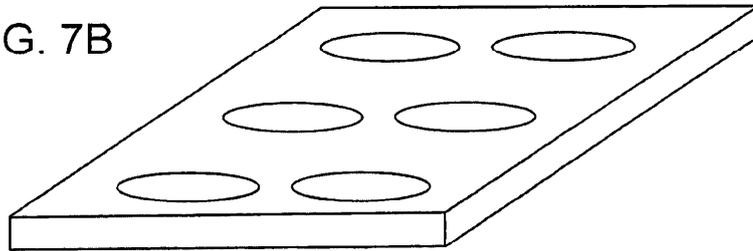


FIG. 7C

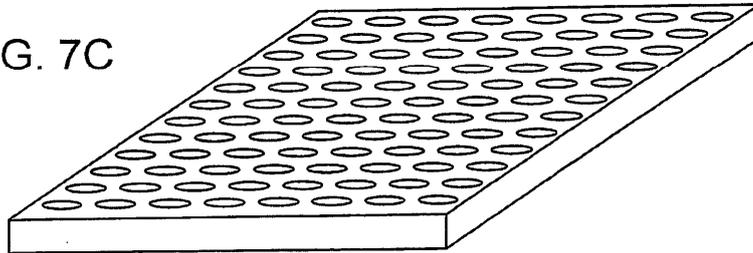
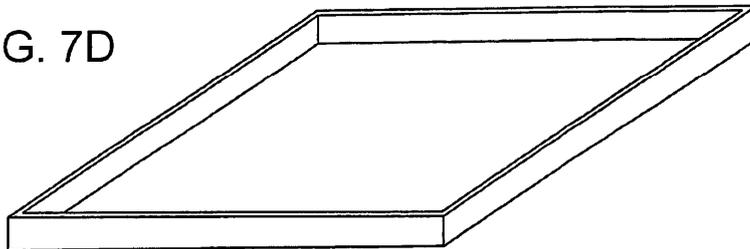
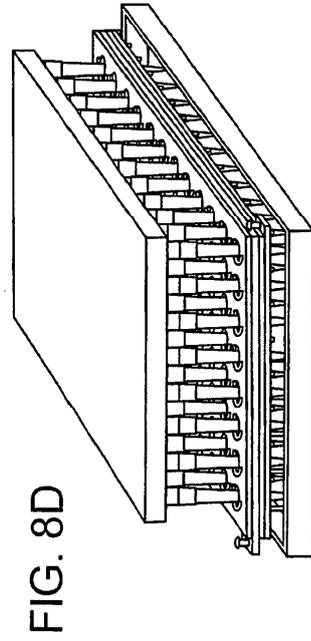
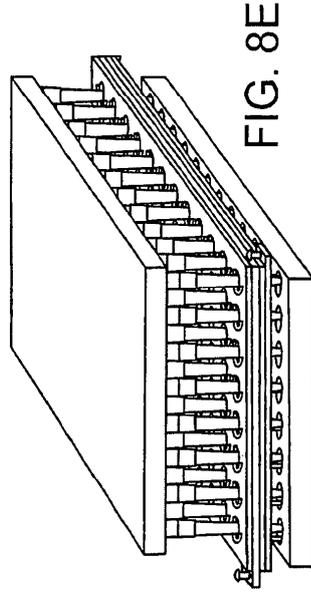
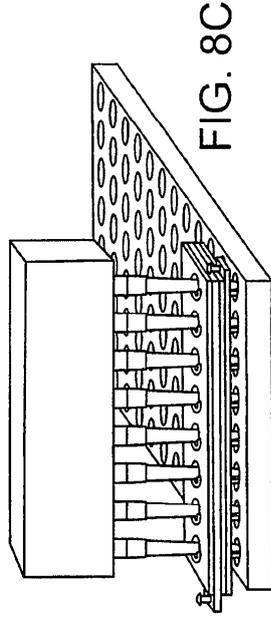
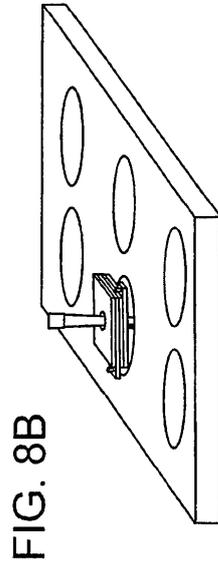
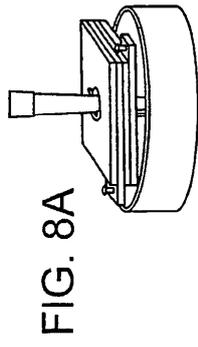


FIG. 7D





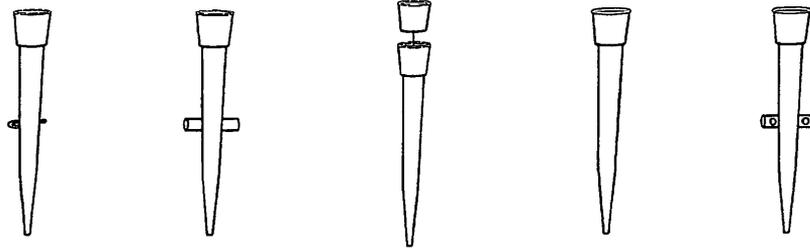


FIG. 9A FIG. 9B FIG. 9C FIG. 9D FIG. 9E

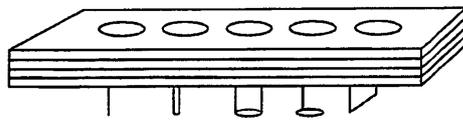


FIG. 9F

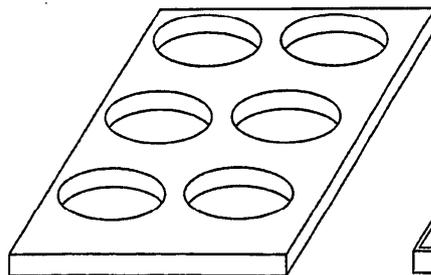


FIG. 9G

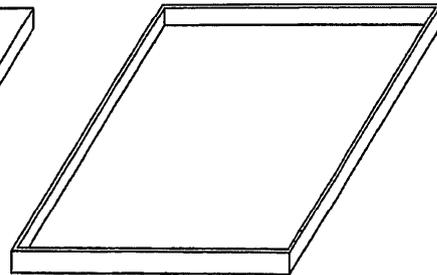


FIG. 9H



FIG. 10A



FIG. 10B

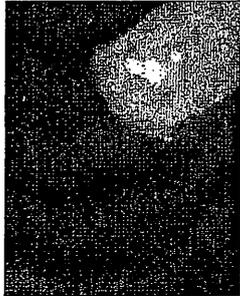


FIG. 10C

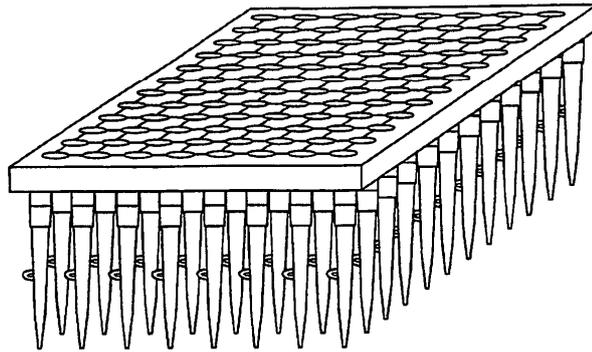


FIG. 11A

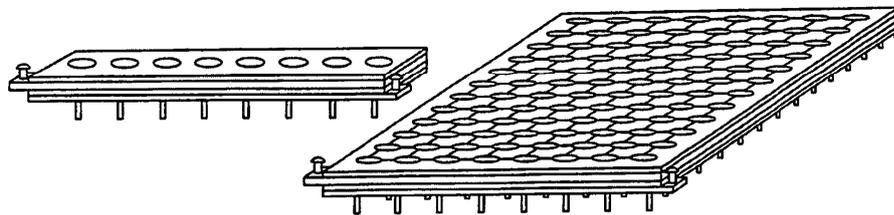


FIG. 11B

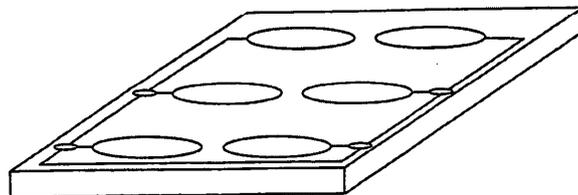


FIG. 11C

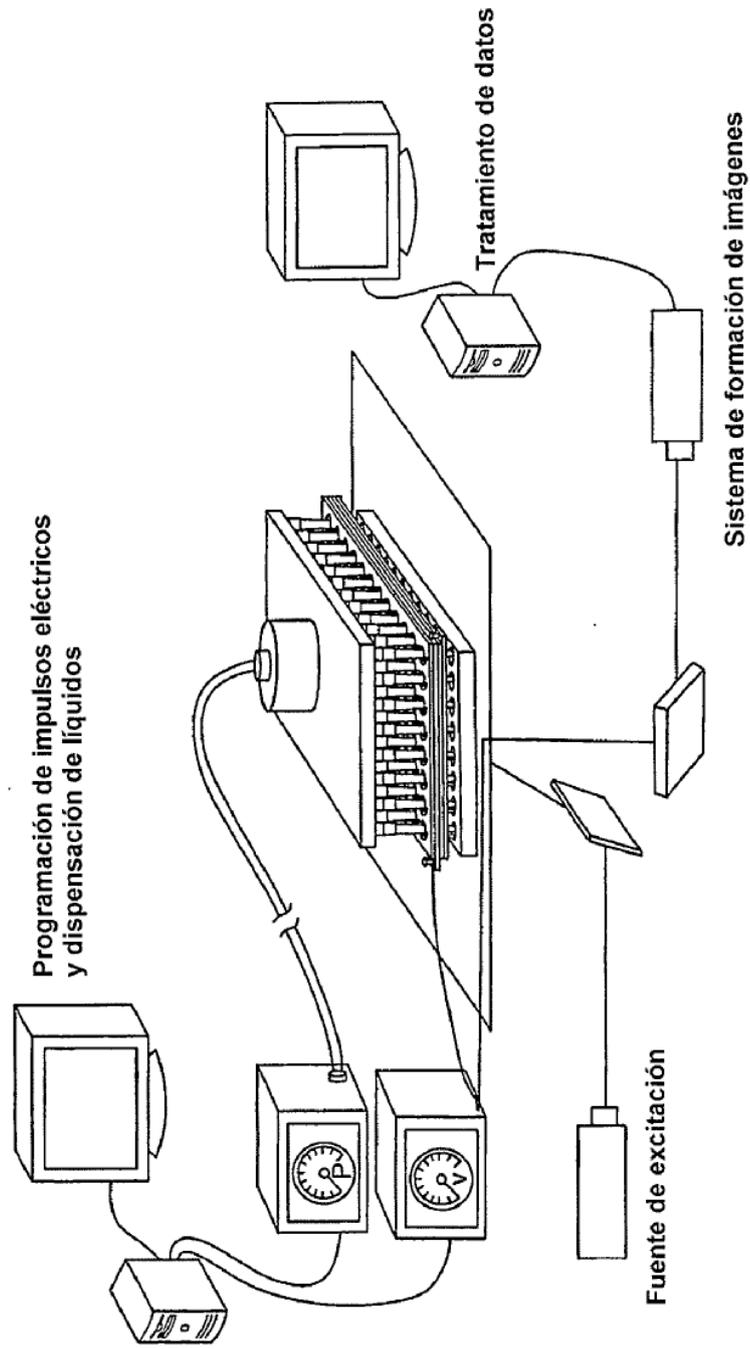


FIG 12

1) Pipeta rígida unida o integrada con una parte flexible en la placa

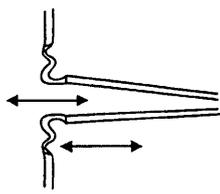


FIG. 13A

2) Pipeta flexible unida o integrada con la placa

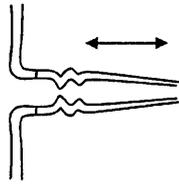


FIG. 13B

3) La barra vertical es un electrodo que sirve tanto como un electrodo como un dispositivo de posicionamiento

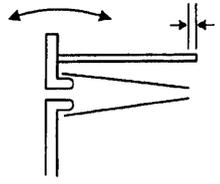


FIG. 13C

5) Principio de una pipeta que se desplaza con un dispositivo de posición integrado en la punta

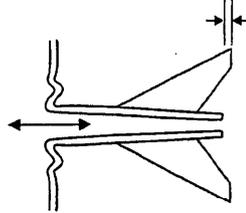


FIG. 13D

6) Principio de un dispositivo de posición montado en la punta de la pipeta que puede ser extraíble/conectable

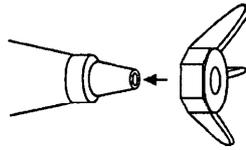


FIG. 13E

7) Ejemplo de dispositivo de posición montado en la punta de la pipeta que permite acercarse mucho al fondo

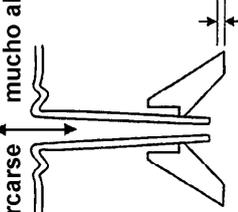


FIG. 13F

8) Otro ejemplo donde el dispositivo en la posición real sirve como punta

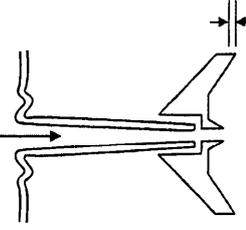


FIG. 13G

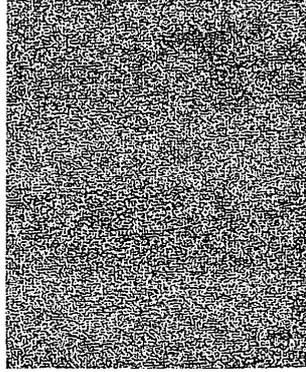


FIG. 14A

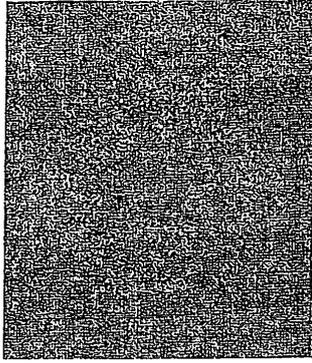


FIG. 14B

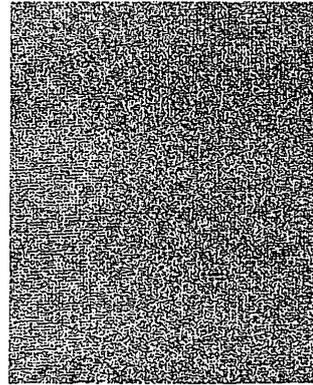


FIG. 14C

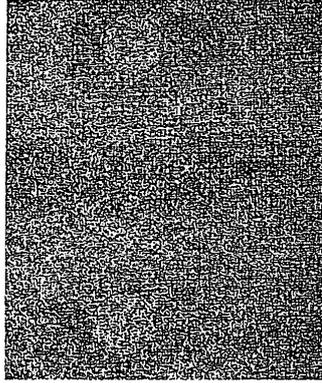


FIG. 14D

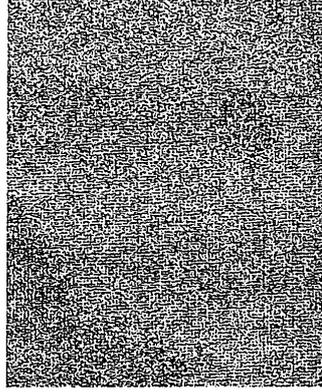


FIG. 14E