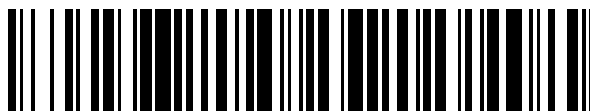


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 422**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2016** **E 16184648 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018** **EP 3138920**

54 Título: **Cartucho desechable para electroporación**

30 Prioridad:

07.09.2015 US 201562215133 P

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

25.10.2018

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**KABAHA, EIAD;
BODDENBERG, JAN;
MILTENYI, STEFAN y
PETERS, RALF-PETER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 687 422 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

Cartucho desechable para electroporación

5 Antecedentes

Esta invención se refiere a un dispositivo desechable para efectuar la electroporación de las células, un proceso para electroporación de células que utiliza el sistema desechable y cerrado que comprende el desechable.

10 La electroporación, o electroporación, es una técnica de biología molecular en la que se aplica un campo eléctrico a las células para aumentar la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo que los ácidos nucleicos se introduzcan en la célula.

15 La electroporación se usa para introducir ácidos nucleicos en las células, especialmente en las células de mamíferos. Los ácidos nucleicos transferidos se pueden usar para la expresión transitoria de proteínas. Especialmente la electroporación de ARNm se usa para expresar transitoriamente proteínas de interés. El plásmido se puede usar para expresión transitoria, así como para integración estable. La integración del plásmido en el genoma puede mejorarse introduciendo roturas de doble cadena y secuencias homólogas que reemplazarán el segmento del genoma roto por recombinación homóloga. Otra posibilidad es usar transposasas para integrar información genética flanqueada por motivos de transposasa en el genoma. Los ácidos nucleicos transferidos también pueden codificar paranucleasas. Las nucleasas específicas de sitio son una herramienta común para eliminar genes mediante la unión final no homóloga.

20 De ese modo, la electroporación se puede usar en el proceso de producción de células transgénicas o inactivadas. Usando células embrionarias animales, las células transgénicas o inactivadas también se pueden usar para desarrollar animales transgénicos o inactivados. Las células modificadas mediante electroporación de ácido nucleico se utilizan para el tratamiento de tumores, la terapia génica u otras terapias basadas en células.

25 La electroporación se realiza con electroporadores, dispositivos especialmente diseñados que crean un campo eléctrico aplicado a una suspensión celular que contiene los ácidos nucleicos para ser transferidos a las células. Por lo general, la suspensión celular se pipetea en una cubeta de vidrio o plástico que tiene dos electrodos en sus lados. Antes de la electroporación, la suspensión celular se mezcla con los ácidos nucleicos a transformar. La mezcla se pipetea en la cubeta, se ajustan el voltaje y la capacitancia, y la cubeta se inserta en el electroporador. El electroporador aplicará un campo eléctrico. El campo eléctrico se define por la intensidad de campo, por ejemplo, el voltaje aplicada por distancia de los electrodos, el tiempo y la capacitancia. Para los pulsos de decaimiento exponencial, el voltaje y la capacitancia se establecen y el campo eléctrico decae debido a la corriente que pasa la suspensión de la celda. Para pulsos de onda cuadrada, se usa una alta capacitancia y se aplica un campo eléctrico por un tiempo dado. Debido a la alta capacitancia, el decaimiento del campo eléctrico por la corriente que pasa la suspensión celular debe ser mínima. Durante la electroporación, los campos eléctricos generan agujeros en la membrana celular que permiten que moléculas más grandes, como los ácidos nucleicos, pasen por la membrana celular. Las membranas lipídicas de bicapa, como las membranas celulares, pueden alterarse por un intenso potencial eléctrico transmembrana como lo divulgó Tsong, T. Y., "Electroporation of cell membranes", Biophys J, 1991. 60(2): pág. 297-306. Si un campo eléctrico transmembrana excede la resistencia dieléctrica de una membrana celular, la conductancia de la membrana aumenta drásticamente. Este potencial de ruptura ha sido reportado por Tsong et al. entre 150 y 500 mV para duraciones de campo de μ s a ms para bicapas lipídicas de 5 nm de grosor. Esto se traduce en una resistencia dieléctrica de 300-1000 V/cm. La penetración de moléculas de bajo peso molecular se ha detectado para la intensidad del campo eléctrico $>0.3-0.4$ kV/cm por Rols, M. P. y J. Teissie, "Electroporación de células de mamífero a macromoléculas: control por duración del pulso". Biophys J, 1998. 75(3): p. 1415-23. La intensidad del campo umbral para la permeabilización de la membrana ha sido descrita por Wolf, H., et al., "Control mediante parámetros de pulso de transferencia génica mediada por campo eléctrico en células de mamífero", Biophys J, 1994. 66(2 Pt 1): p. 524-31 para ser 580 V/cm.

La diferencia de potencial eléctrico que encuentra una membrana celular ha sido descrita mediante:

$$\Delta V_{max} = \frac{3}{2} E_0 r$$

55 Por lo tanto, la diferencia de potencial es proporcional a la intensidad inicial del campo eléctrico E_0 y al radio r de la célula (Neumann, E., et al., Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. Embo J, 1982. 1(7): p. 841-5).

60 Para un radio de celda típico de 5 μ m, el umbral de permeabilización de, por ejemplo, 300 mV se puede lograr con una intensidad de campo eléctrico >400 V/cm. Para una celda más pequeña ($r=1$ μ m), la intensidad de campo requerida se puede estimar en al menos 2000 V/cm.

Además de la difusión pasiva de los ácidos nucleicos en las células, se puede aplicar electroforesis adicional de los ácidos nucleicos en un campo eléctrico. Los campos eléctricos necesarios para la electroforesis son más pequeños que para la electroporación. Los pulsos de decaimiento exponencial probablemente permeabilicen la membrana celular con el campo eléctrico alto al comienzo y el campo en decaimiento transporta posteriormente los ácidos nucleicos a las células. Para pulsos de onda cuadrada, se pueden generar dos o más pulsos para combinar la electroporación y la electroforesis.

Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Como el ADN es más estable, mezclando el ADN, por ejemplo, los plásmidos junto con las suspensiones celulares por lo general no dañan el ADN. Por el contrario, el ARN es propenso a la degradación, por ejemplo, por RNasas secretadas por células o por tampones contaminados. Por lo tanto, el ARN generalmente se agrega antes del paso de electroporación para minimizar el riesgo de degradación del ARN antes de que el ARN pueda ingresar a la célula. Dentro de la célula, el ARN queda protegido por las proteínas de unión a ácidos nucleicos y la maquinaria de traducción.

Para un dispositivo de electroporación automatizado, los ácidos nucleicos, especialmente el ARN, también deben mezclarse con la suspensión celular justo antes de la electroporación. Actualmente, la mezcla de ácidos nucleicos y la suspensión celular seguida de una etapa de electroporación no puede realizarse automáticamente. Mientras que hay muchos dispositivos para la electroporación semiautomatizada o automatizada, la preparación de muestra, por ejemplo, la mezcla de ácidos nucleicos y la suspensión celular tiene que efectuarse a mano el proceso de electroporación. El proceso de mezcla comprende agregar las dos soluciones, por ejemplo, suspensión celular y solución de ácido nucleico, en una proporción constante para producir una mezcla homogénea.

La concentración de ácidos nucleicos durante el proceso de electroporación es crucial y, para obtener resultados reproducibles, la relación definida debe mantenerse durante el proceso. Lo mismo es cierto para la homogeneidad de la mezcla. Para la electroporación celular homogénea, la concentración de ácido nucleico local debe ser la misma para todas las células. En la mezcla homogénea dará lugar a una mezcla de células sin ácidos nucleicos, cantidades bajas y cantidades elevadas. Como las células electroporadas usualmente se cultivarán después de la electroporación o incluso se administrarán a pacientes, el proceso de mezclado y electroporación debe realizarse en un ambiente estéril.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de un dispositivo que permita la mezcla de ácidos nucleicos y células y que permita la electroporación de las células en condiciones estériles.

Resumen

La presente invención está dirigida a un dispositivo desechable para la electroporación de células, que comprende un compartimento de fluido en un interior del desechable;

un primer puerto de fluido para proporcionar la suspensión de células al compartimento de fluido, y un segundo puerto de fluido para suministrar un fluido que comprende al menos un compuesto para ser electroporado en las células al compartimento de fluido;

un primer electrodo y un segundo electrodo dispuestos en el compartimento de fluido;

al menos un puerto de salida que libera el fluido desde el compartimento de fluido en el que el primer y el segundo puerto de fluido tienen una comunicación de fluido a un canal de mezcla que tiene una comunicación fluida con el compartimento de fluido, caracterizado porque el primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido se proporcionan con canales que tienen diferente resistencia microfluídica a los fluidos.

El cartucho desechable permite la mezcla de al menos dos fluidos en una relación dada para lograr un fluido combinado homogéneo. Esta mezcla se lleva a cabo mediante un dispositivo microfluídico que define la relación de mezcla volumétrica y permite una mezcla de fluidos homogénea. El cartucho puede montarse en un conjunto de tubos que permite el manejo de células estériles. Se usa una bomba peristáltica o una bomba de vacío para mover fluidos dentro y fuera del conjunto de electroporación, minimizando así el riesgo de fugas o defectos. El conjunto de tubos también se puede combinar con otros pasos de procesamiento de células como la separación de células o el cultivo de células.

Breve descripción de los dibujos

Se describen diversos detalles a modo de ejemplo con referencia a las siguientes figuras, en las que:

La Fig. 1 es una vista en perspectiva de una realización genérica de un conjunto de cartucho de electroporación desechable;

La Fig. 2 es una vista lateral del conjunto de cartucho de electroporación desechable;

La Fig. 3 es una vista en perspectiva desde arriba de un conjunto de cartucho de electroporación desechable;

La Fig. 4a es una vista en planta de la superficie exterior de la mitad inferior del conjunto de cartucho de electroporación desechable de la FIG. 3;

5 La fig. 4b es una vista en planta de la superficie interna de la mitad inferior del conjunto de cartucho de electroporación desechable de la FIG. 1;

La Fig. 5a es una vista en planta de la superficie exterior de la mitad superior del conjunto de cartucho de electroporación desechable de la FIG. 3;

10 La fig. 5b es una vista en planta de la superficie interna de la mitad superior del conjunto de cartucho de electroporación desechable de la FIG. 3;

15 La Fig. 6a es una vista en planta de la superficie inferior del conjunto de cartucho de electroporación desechable de la FIG. 1;

La fig. 6b es una vista en planta de la superficie superior del conjunto de cartucho de electroporación desechable de la FIG. 1; y

20 La Fig. 7 es una vista en perspectiva de la superficie inferior del conjunto de cartucho de electroporación desechable de la FIG. 3.

La Fig. 8 muestra la dependencia de la relación de mezcla y el vacío dentro de la cubeta de electroporación

25 La Fig. 9 muestra el resultado de la electroporación de células Jurkat con la eficacia de transfección monitorizada por la expresión de mCherry/eGFP.

Debe entenderse que los dibujos no son necesariamente a escala, y que los mismos números pueden referirse a características similares.

30 Descripción detallada

El dispositivo de la invención permite la transfección de células mediante la mezcla de al menos dos fluidos que comprenden células y al menos un compuesto para ser electroporado en las células con una relación de mezcla volumétrica predefinida y aplicar un campo eléctrico a los fluidos mezclados.

40 El compuesto que se va a electroporar en las células puede ser cualquier compuesto conocido en la técnica que sea útil para la electroporación, como ácidos nucleicos, oligonucleótidos, polinucleótidos, ADN, ARN, péptidos, proteínas y moléculas pequeñas como hormonas, citoquinas, quimiocinas, fármaco, o precursores de fármacos. En lo que sigue, el término "ácidos nucleicos" como compuesto que se va a electroporar se utiliza como sinónimo de todos los compuestos que se van a electroporar, como oligonucleótidos, polinucleótidos, ADN, ARN, péptidos, proteínas y moléculas pequeñas como hormonas, citoquinas y quimiocinas, fármacos o precursores de fármacos.

45 Con el fin de realizar la electroporación sobre un fluido mezclado homogéneamente y evitar el flujo laminar en los canales, el canal de mezcla del desechable tiene una forma de serpentina y/o comprende elementos agitadores y/o una cámara de mezclado. Después de mezclar la suspensión celular y la solución de ácido nucleico, se aplica un campo eléctrico, que induce los poros en las membranas celulares. Los ácidos nucleicos pueden entrar en las células a través de los poros por difusión o electroforesis.

50 En una realización del dispositivo, la relación de mezcla volumétrica de al menos dos fluidos está definida por al menos dos canales microfluídicos que tienen diferente resistencia microfluídica, es decir, el primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido de puerto de fluido están provistos de canales que tienen diferente resistencia microfluídica a los fluidos.

55 El flujo de cada fluido depende de la resistencia del canal respectivo, por ejemplo, el canal 112 y 122 en la FIG. 4a. Menos fluido pasará por el canal con mayor resistencia en comparación con al menos otro canal que tenga una menor resistencia. De ese modo, la relación de mezcla puede definirse por la relación de resistencias de al menos dos canales de entrada. Preferiblemente, el primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido de puerto de fluido están provistos de canales que tienen una resistencia microfluídica para mantener una relación de mezcla de 1:5 a 1:10 del primer fluido al segundo fluido. El uso de diferentes volúmenes produce cambios en la presión hidrostática de cada solución. De este modo, las diferencias de presión hidrostática deterioraron la relación de mezcla definida por las resistencias de los canales microfluídicos.

65 Los fluidos pueden ser bombeados o absorbidos en el dispositivo. Por consiguiente, el primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido de puerto de fluido del desechable están en comunicación fluida con al menos una bomba

que suministra fluidos al compartimento de fluido y/o al menos un puerto de salida está en comunicación de fluido con al menos una fuente de vacío absorbiendo fluidos hacia el compartimento de fluido.

- 5 La bomba o fuente de vacío debe proporcionar una diferencia de presión de al menos 100 mbar entre el primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido en un lado y el al menos un puerto de salida en fluido en el otro lado. Preferible, la diferencia de presión está entre 100 y 800 mbar, especialmente entre 200 y 500 mbar.

10 Los fluidos mezclados son forzados por la diferencia de presión en el compartimento de fluido entre las dos placas de electrodos del dispositivo. El proceso de llenado, es decir, el nivel de llenado del compartimento de fluido puede controlarse y/o automatizarse midiendo la capacitancia entre el primer y el segundo electrodo. El llenado puede continuar hasta, por ejemplo, que se alcance la capacidad máxima entre el primer y el segundo electrodo. Como alternativa, la resistencia eléctrica entre los electrodos de conexión a tierra (como se explica más adelante) se puede usar para determinar el nivel de llenado del compartimento de fluido. En alternativa, el nivel de llenado puede determinarse controlando la diferencia de presión aplicada al compartimento de fluido. Al controlar el nivel de llenado del compartimento de fluido, el dispositivo puede operarse en un modo semicontinuo.

20 Después de llenar el volumen entre las placas de electrodos, se aplica un campo eléctrico. El campo eléctrico generalmente se da como pulso eléctrico. La forma del pulso puede ser decaimiento exponencial, onda cuadrada o diferentes combinaciones. Es importante destacar que la intensidad del campo eléctrico debe ser suficiente para crear poros en las membranas celulares. Los ácidos nucleicos pueden entrar en las células por difusión o electroforesis. Después, las células electroporadas se eliminan del dispositivo, opcionalmente para un procesamiento adicional como, detección, enriquecimiento y/o agotamiento de ciertos subconjuntos de células y/o cultivo celular. Para electroporar más células (cantidades más altas de células o un mayor volumen de suspensión celular), se puede repetir el proceso de llenado, mezclado, electroporación y eliminación. Además, el propio proceso de electroporación se puede repetir en la misma muestra de células, con o sin etapa de lavado, cultivo o separación.

30 El campo eléctrico aplicado puede destruir electrodos hechos de metales como el aluminio. Para permitir múltiples secuencias de electroporación del dispositivo usando las mismas placas de electrodos, las placas pueden recubrirse con metales resistentes a la corrosión electroquímica. Revestimientos conductivos como metales nobles, por ejemplo, el oro puede usarse para proteger las placas de los electrodos. En una variante, el desechable de la invención comprende un primer electrodo de metal y el segundo electrodo de metal fabricado de titanio cubierto con una capa de oro. Para evitar diferentes intensidades de campo entre los electrodos, los electrodos deben estar dispuestos en paralelo con una distancia constante entre sí sobre toda la superficie de los electrodos. Preferiblemente, el primer electrodo de metal y el segundo electrodo de metal están separados por una distancia de 2-4 mm en una disposición paralela con variaciones de distancia menores que $\pm 20 \mu\text{m}$. Además, la superficie de los electrodos debe ser lo más suave posible sin poros ni picos. Se prefieren los electrodos que tienen una rugosidad R_z de 1 a $10 \mu\text{m}$.

40 La Fig. 1 es una vista en perspectiva de un cartucho de electroporación desechable simplificado. Los elementos en el cartucho son un puerto 11 de entrada y un segundo puerto 12 de entrada, y ellos mezclan la columna 13. En el puerto 11 de entrada, el segundo puerto 12 de entrada y la columna 13 de mezcla comprenden los elementos de entrada al cartucho 10 desechable. Al salir de la columna 13 de mezcla, el fluido de muestra entra luego en una cavidad que incluye el primer electrodo 21 y el segundo electrodo 23. Los electrodos 21 y 23 pueden ser condensadores de plano paralelo, de modo que los elementos 21 y 23 son planos o estructuras conductoras separadas por un pequeño espacio. El voltaje se aplica a la placa 21 y 23 mediante las pestañas 20 y 22 y el fluido sale del cartucho desechable a través del puerto 15 de salida.

50 Puede introducirse una muestra de fluido a través del puerto 11 de entrada, elementos adicionales tales como, por ejemplo, ARN, entran a través del puerto 12 de entrada secundario. Por ejemplo, se puede introducir una suspensión de células a través del puerto 11 de entrada y se puede llenar una solución de ácido nucleico a través del segundo puerto 12 de entrada. La suspensión celular y la solución de ácido nucleico se mezclan en el canal 13 de mezcla y se introducen en una cavidad que contiene las placas electrostáticas de 21 y 23.

55 La suspensión celular, habiéndose mezclado con la solución de ácido nucleico, fluye a través del espacio entre las placas 21 y 23 y se somete al campo eléctrico aplicado entre las dos placas. Como es bien sabido en la técnica, este campo eléctrico genera poros en las membranas celulares, permitiendo que el ácido nucleico se difunda dentro de la célula. Después de la electroporación, las células modificadas pueden ser retiradas del desechable por el puerto 15 de salida.

60 El desechable de acuerdo con la invención se forma preferiblemente uniendo dos mitades del desechable, comprendiendo las mitades respectivamente el primer o el segundo electrodo. Esta realización se muestra con más detalle en la FIG. 2 en vista lateral. El cartucho 10 desechable de electroporación puede estar compuesto de dos partes, una superficie 100 superior y una parte 200 inferior. Estas dos partes pueden estar hechas de plástico moldeado y soldarse juntas mediante radiación láser o un campo de HF. El cartucho 10 desechable de electroporación puede incluir además un puerto 160 adicional y dos puertos 140 y 150, de salida cuya función se describirá a continuación. Finalmente, el cartucho 100 de electroporación desechable también puede incluir las dos placas 210 y 220, de electrodo que están separadas por un espacio. La distancia entre los dos electrodos (espacio) se elegirá según

el voltaje aplicado y el campo eléctrico requerido. Las distancias comunes de los electrodos son de 2 a 4 mm. Los espacios más pequeños podrían ser favorables para permitir campos eléctricos altos de más de 2 kV/cm, por ejemplo, 100 μ m. Además, el espacio debe ser suficiente para permitir el flujo del fluido de entrada y no debe dañar las células, por ejemplo, por el estrés de cizallamiento. En algunas realizaciones, el campo eléctrico puede ser del orden de 2 kV/cm.

La fig. 3 es una vista en perspectiva de un cartucho 10 de electroporación desechable ensamblado. La vista ensamblada incluye la superficie 100 superior y la superficie 200 inferior que se muestran juntas y la FIG. 3 también muestra los dos puertos 110 y 120 de entrada en esta superficie 100 inferior, junto con la primera placa 210 de electrodo también en la superficie 100 inferior.

En la superficie 200 superior están los dos puertos 140 y 150 de salida, junto con la segunda placa 220 de electrodo. Debe entenderse que los términos superior e inferior, son arbitrarios, y el cartucho 10 puede verse en cualquier orientación arbitraria. La fig. 3 también muestra los puertos 140 y 150 de salida, que están en la superficie 200 superior. Por último, la superficie 200 superior también puede incluir, como puede verse en la FIG. 3, el canal 130 de mezcla conectado al primer canal 110 de entrada, y el canal 120 de entrada secundario. El canal de mezcla está destinado a mezclar el contenido de los dos canales de entrada. El canal 130 de mezcla puede tener forma de serpentina o cualquier otra estructura que soporte los dos fluidos para fusionarse. El canal 130 de mezcla introduce el fluido mezclado en la cavidad que contiene las placas 210 y 220 de electrodo. El canal 130 de mezcla puede incluir entre cinco y 15 vueltas de serpentina. Las vueltas de serpentina provocan la mezcla caótica de los dos componentes, la suspensión celular y la solución de ácido nucleico.

El compartimento de fluido tiene una forma preferible para permitir el llenado y el drenaje sin burbujas. Por lo tanto, el canal de mezcla y al menos un puerto de salida pueden estar ubicados en los lados más opuestos del compartimento de fluido, es decir, en el punto más alto y más bajo del compartimento de fluido. Además, el compartimento de fluido y las placas 220 y 230 de electrodo pueden tener una forma particular que evita el espacio muerto, como ángulos obtusos y/o ángulo agudo. Como se ilustra en la figura. 3, el compartimento de fluido y las placas opcionales pueden tener una forma de paralelogramo o trapezoidal.

Se debe entender que este paralelogramo es una realización a modo de ejemplo, y que la forma del compartimento de fluido y los electrodos puede tener cualquier forma arbitraria, incluyendo rectangular, circular, trapezoidal o cualquier otra forma de acuerdo con los requisitos de llenado sin burbujas del dispositivo.

En otra realización de la invención, el desechable comprende adicionalmente al menos un electrodo adicional que aplica un potencial de tierra a al menos uno del primer puerto de fluido, el segundo puerto de fluido o el puerto de salida. Esta realización se muestra en las Figs. 3-5 con lengüetas 230 y 240 de conexión a tierra. Estas lengüetas se pueden usar para aplicar un potencial de tierra al fluido de entrada en el canal 112 y 122 y a los canales 140 y 150 de salida en consecuencia. La entrada y salida de fluido de la cavidad que contiene las placas de electrodos puede ser potencial de tierra.

Las Figuras. 4A y 4B ilustran con mayor detalle algunas de las características de la superficie 100 superior, que se mostró en la figura. 3. La figura 4A muestra la superficie exterior de la pieza 100 superior, y la figura 4B muestra la superficie interna de la porción 100 superior. Como se muestra en la figura 4A, la porción 100 superior puede incluir los dos puertos 110 y 120 de entrada, junto con la placa 210 de electrodo. Finalmente, la porción superior también puede incluir la lengüeta 240 de conexión a tierra.

La Figura 4B tiene topografía que está asociada con esas estructuras. Por ejemplo, la superficie interna de la estructura 100 superior puede tener un canal 112 que está asociado con el puerto 110 de entrada. Este canal 112 puede servir para suministrar el fluido desde el puerto 110 de entrada al canal 130 de mezcla. De forma similar, la superficie interna de la porción 100 superior también puede tener otro canal 122 asociado con el puerto 120 de entrada secundario. El canal 122 sirve para entregar el material adicional que se introduce a través del segundo puerto 120 al canal 130 de mezcla. El diámetro y la longitud del canal 112 y 122 definen una resistencia a los microfluidos. La proporción de la resistencia a los microfluidos se usa para definir la proporción de los dos fluidos entregados a través del puerto 110 y 120 de entrada respectivamente. En el conjunto representado, el canal 112 comprende una parte estrecha más larga en comparación con el canal 110 para el cual la parte estrecha es más corta.

El canal 130 de mezcla como se describió anteriormente, puede tener una forma de serpentina que sirve para mezclar los contenidos del canal 122 con los contenidos del canal 112. En esta variante del desechable, los contenidos del canal 122 con los contenidos del canal 112 se mejoran adicionalmente mediante la cámara 114 de mezcla. La cámara 114 de mezcla proporciona un volumen en el que un posible flujo laminar de los fluidos se convierte en flujo turbulento.

En una realización de ejemplo, el canal 110 de entrada secundario sirve para suministrar ácido nucleico a una suspensión de células que se introduce en el canal 112 de entrada. La solución de ácido nucleico se mezcla con las células diana que se incluyen en el fluido de entrada que se introdujo en el puerto 120 de entrada. En el canal 130 de mezcla, el ácido nucleico se mezcla con las células diana de manera que el fluido que entra en la cavidad tiene esos elementos combinados.

La huella de la placa de electrodo a 210 también se muestra en la figura 4B. En esta vista, puede mostrarse que la esquina inferior de la placa 210 de electrodo puede mostrarse por estar acoplada al puerto 160 de salida.

- 5 También se muestra en la figura 4B la pestaña 240 metálica. Esta pestaña puede usarse para aplicar un potencial de tierra a los puertos 140 y 150 de salida en consecuencia. El fluido que sale de la cavidad que contiene placas de electrodos puede tener potencial de tierra.

10 Las figuras 5A y 5B muestran las superficies interna y externa de la porción 200 inferior. Como las Figuras 4A y 4B, incluidos en la ilustración son los electrodos y la salida y los puertos. Y en particular, la porción 200 inferior puede incluir un electrodo 220 y su lengüeta 220 metálica asociada, a lo largo de la lengüeta 230 metálica. Como se describió previamente, la placa 220 de electrodo puede servir para ser la placa opuesta de un condensador de placa paralela, que está formado por una placa de electrodo a 210 y una placa 220 de electrodo.

15 Finalmente, la superficie 200 inferior también puede contener los puertos 140 y 150 de salida. Como se muestra en la figura 5A, el puerto 150 de salida puede acoplarse al hombro ascendente de la cavidad, mientras que el puerto 140 de salida puede acoplarse al hombro inferior de la cavidad. De esta manera, la salida 150 puede servir para evacuar aire, por ejemplo, burbujas de la cavidad.

20 Las figuras 6A y 6B son vistas en planta del conjunto de cartucho completo. La figura 6A muestra desde abajo, mientras que la figura 6B muestra una vista desde arriba. Una vez más, debe entenderse que los términos “debajo” y “arriba” son arbitrarios, y el cartucho puede mantenerse para facilitar la claridad, sin embargo, la figura 6A se menciona como unos pocos desde abajo, y la figura 6B se conoce como una vista desde arriba. En cualquier caso, los cartuchos se muestran como ensamblados, con la porción 100 superior unida a la porción 200 inferior. Incluidos en el conjunto están, una vez más, los dos puertos 110 y 120 de entrada y los puertos 140, 150 y 160 de salida. También se muestran las tomas 230 y 240 de puesta a tierra, así como las placas 220 y 210 de electrodo.

30 Como se describió con brevedad anteriormente, el conjunto 10 de cartucho desechable puede construirse a partir de plástico moldeado por inyección como poliestireno, polietileno, polipropileno o policarbonato. Los contornos de las diversas estructuras, que incluyen las placas 210 y 220 electrostáticas, pueden formarse en el material plástico. Además, ubicando áreas para las lengüetas de puesta a tierra. Como con la figura 6, los dos puertos 110 y 120 de entrada se muestran fijados a la porción 100 superior, y la salida hacia 140 y 150 o se muestran como pareja a la porción 200 inferior. Además, las lengüetas de conexión 230 y 240 a tierra se muestran mejor desde abajo. Los orificios 110, 120, 140, 150 y 160 de fluido pueden formarse en el material plástico moldeado por inyección. Al mismo tiempo, la estructura de serpentina y/o los elementos agitadores del canal de mezcla y la cámara de mezclado opcional también pueden formarse en la parte apropiada del desechable. Pueden formarse áreas de ubicación para todos los componentes metálicos, que incluyen las cintas 230 y 240 de puesta a tierra, y las placas 220 y 210 de electrodo en los elementos apropiados. El plástico moldeado por inyección se puede encontrar con el área de asiento para cada uno de estos componentes. Las partes metálicas pueden moldearse directamente en las partes. Alternativamente, se puede aplicar pegamento al material plástico y las estructuras metálicas se pueden pegar en su lugar. Una vez que la placa de electrodo 220 se forma en la porción 200 inferior, y la placa 210 de electrodo se forma en la porción 100 superior, las porciones superior e inferior se pueden ensamblar juntas. El ensamblaje puede ser fijado mediante soldadura láser, soldadura de HF, unión por plasma, encolado o cualquier otra técnica adecuada para fijar dos piezas de plástico juntas.

45 Después de la fabricación, otros elementos de fluido como tubos pueden unirse a los dos puertos 110 y 120 de entrada, así como a los puertos 140, 150 y 160 de salida. Una fuente neumática puede estar acoplada al puerto 160 de escape. El elemento neumático puede servir para absorber líquidos en el espacio entre los electrodos.

50 El suministro de voltaje 300 puede estar acoplado a las lengüetas metálicas 210 y 220, para aplicar un potencial de voltaje entre las dos placas 210 y 220 de electrodo. Luego se aplica vacío al puerto 140 o 150 de salida y por lo tanto también al canal 130 y al puerto 110 de entrada, así como también al puerto 120 de entrada secundario. Los extremos del fluido se mezclan en el canal 130 de mezcla, y se permite que el fluido pase a través de la cavidad, y entre los electrodos 210 y 220. Después de que el espacio entre los electrodos se haya llenado, se puede aplicar un campo eléctrico. El campo eléctrico induce poros en las membranas celulares, permitiendo que los ácidos nucleicos entren en las células diana por difusión o electroforesis. Al salir a través del puerto 160 de salida, la corriente de fluido incluye células diana cargadas con los ácidos nucleicos. El tiempo total para que esto suceda dependerá de la aplicación, pero quizás del orden de 10 a 20 minutos. El volumen total de la cavidad puede ser del orden de 0.05 a 5 ml.

60 Otro objeto de la invención es un proceso para la electroporación de células en el desechable como ya se ha divulgado, en el que se proporciona una suspensión celular a un primer puerto de fluido como primer fluido y se proporciona un fluido que comprende al menos un compuesto para ser electroporado en las células al segundo puerto de fluido como segundo fluido; los fluidos primero y segundo se proporcionan al compartimento de fluido en una proporción de mezcla predefinida aplicando una diferencia de presión entre el primer y el segundo puerto de fluido y al menos un puerto de salida; aplicar un campo eléctrico entre el primer y el segundo electrodo, electroporando así las células con al menos un compuesto; y retirando los fluidos del compartimento de fluido.

El proceso de la invención puede realizarse en varias variantes. Para permitir el procesamiento automático continuo o semicontinuo, el primer y el segundo fluido se proporcionan al compartimento de fluido a un nivel de llenado predefinido. El nivel de llenado del compartimento de fluido se puede determinar midiendo la capacitancia entre el primer y el segundo electrodo, por ejemplo, midiendo la capacidad hasta que se alcanza la capacidad máxima. En otra variante, el nivel de llenado se determina midiendo la resistencia entre los electrodos de puesta a tierra (230 y 240 en la figura 3). Además, el nivel de llenado podría controlarse mediante la diferencia de presión aplicada al desechable.

En otra variante del proceso, después de retirar los fluidos del compartimento de fluido, las células electroporadas se detectan y agotan de los fluidos. Las células electroporadas así concentradas podrían procesarse y/o cultivarse adicionalmente. La detección de las células electroporadas y su agotamiento se puede lograr por métodos conocidos por una persona experta en la técnica para la clasificación celular como FACS o clasificación magnética. Por otro lado, las células no electroporadas (agotadas de las células electroporadas) se pueden proporcionar a otro paso del proceso de electroporación para mejorar el rendimiento global de la electroporación.

En otra variante más del proceso, las células electroporadas se cultivan después de eliminar los fluidos del compartimento de fluido. Cualquier método conocido por una persona experta en la técnica se puede usar para el cultivo. En una realización preferida, el cultivo se realiza en una cámara centrífuga como se divulgó, por ejemplo, en los documentos WO2009072003A2 y/o WO2013072288 A1. Para esta variante de la invención, se pueden usar diversos líquidos (medios) de cultivo celular conocidos en la técnica de cultivo celular, que incluyen uno o más de los siguientes medios DMEM, HBSS, DPBS, RPMI, medio de Iscove, X-VIVO™, cada uno opcionalmente complementado, por ejemplo, con suero de ternera fetal, suero humano o sustitutos de suero u otros nutrientes o estímulos celulares como citoquinas. Los medios pueden ser medios celulares estándar como los medios mencionados anteriormente o medios especiales para, por ejemplo, cultivo de células humanas primarias (por ejemplo, para células endoteliales, hepatocitos o queratinocitos) o células madre (por ejemplo, maduración de células dendríticas, expansión hematopoyética, queratinocitos, células madre mesenquimales o expansión de células T). Los medios pueden tener suplementos o reactivos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, albúminas y proteínas de transporte, aminoácidos y vitaminas, antibióticos, factores de fijación, factores de crecimiento y citoquinas, hormonas o agentes solubilizantes. Varios medios están disponibles comercialmente, por ejemplo, de LifeTechnologies o Sigma-Aldrich.

La temperatura durante el proceso de cultivo puede controlarse y ajustarse según corresponda para los tipos de células que han sido electroporadas. Además, las células pueden suministrarse con gases tales como O₂, N₂ y CO₂ según sea apropiado y conocidos por los expertos en la técnica. Si la etapa de cultivo de células se realiza en una cámara de centrífuga, las células pueden suministrarse con líquidos y gases de cultivo celular durante la rotación de la cámara de centrífuga.

El tipo de célula a electroporar no está particularmente limitado. Con el método de la invención, se pueden procesar especialmente células eucariotas, que pueden originarse de cualquier fuente de mamífero o humano, tal como tumor, sangre, tejido, médula ósea o líneas celulares. Son adecuados, por ejemplo, los tipos celulares seleccionados del grupo que consiste en células humanas, fibroblastos, células madre embrionarias, células pluripotentes inducidas, queratinocitos, melanocitos, células madre mesenquimales, células epiteliales, células T, células T reguladoras, células B, Células NK, células neuronales, células dendríticas, células madre (adultas, embrionarias, hematopoyéticas), células procedentes del epitelio, ectodermo, endodermo, endotelio, mesodermo, tejido epitelial, lámina basal, vasculatura, tejido conjuntivo, tejidos fibrosos, tejido muscular, músculo visceral o liso, músculo esquelético, músculo cardíaco, tejido nervioso, cerebro, médula espinal, nervios craneales, nervios espinales o neuronas motoras.

El dispositivo y el método de la invención se pueden usar en un proceso de electroporación continuo o semicontinuo de células, seguido opcionalmente por una etapa de cultivo (expansión) de las células electroporadas. Para reducir las pérdidas y/o la contaminación de las células, se propone un sistema cerrado (en cuanto al medio ambiente). Por consiguiente, un objeto adicional de la invención es un sistema para la electroporación de células que comprende el desechable como se divulgó, un primer recipiente de almacenamiento que contiene una suspensión celular; un segundo contenedor de almacenamiento que contiene un fluido que comprende al menos un compuesto para ser electroporado en las células; un tercer contenedor de almacenamiento para células electroporadas; una bomba y/o una fuente de vacío; y un conjunto de tubos que proporciona comunicación fluida entre los contenedores de almacenamiento y el desechable, en el que el sistema está cerrado a la atmósfera exterior. Preferible, el tercer contenedor de almacenamiento se configura como cámara de cultivo. Si es necesario, pueden proporcionarse recipientes de almacenamiento adicionales para fracciones de células empobrecidas/enriquecidas, fluidos de lavado, medios de cultivo o desechos.

El término "cerrado a la atmósfera exterior" se refiere a un sistema que está configurado para excluir cualquier intercambio fluido o gaseoso en el sistema, por ejemplo, utilizando contenedores cerrados como bolsas de plástico como contenedor de almacenamiento provisto de conectores mecánicos al conjunto de tubos (como conectores Luer) y si es necesario, filtros estériles apropiados. En vista del proceso, el término "cerrado a la atmósfera exterior" se refiere a un sistema que está configurado para mantener la esterilidad durante todo el proceso de electroporación.

Aunque se han descrito varios detalles junto con las implementaciones de ejemplo, descritas anteriormente, diversas alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalentes sustanciales, ya sean conocidos o que sean o puedan ser actualmente imprevisibles, pueden ser evidentes tras revisar la divulgación anterior. Además, los detalles relacionados con los métodos específicos, dimensiones, usos de materiales, formas, técnicas de fabricación, etc. están destinados a ser solo ilustrativos, y la invención no se limita a tales formas de realización. Los descriptores como arriba, abajo, izquierda, derecha, atrás, etc. son arbitrarios, ya que se debe entender que los sistemas y métodos se pueden realizar en cualquier orientación. En consecuencia, las implementaciones ejemplares expuestas anteriormente, tienen la intención de ser ilustrativas, no limitativas.

Ejemplos

Proporción de mezcla definida por los canales de resistencia

Para determinar la proporción de mezcla usando los canales microfluídicos, se usó una solución tamponada con fosfato para imitar la suspensión celular y una solución de tinta para imitar la solución de ácido nucleico. Un cartucho de electroporación como se muestra en las Figs. 1-7 se presentó con estas soluciones conectándose a una línea de vacío y la solución así mezclada se retiró nuevamente del cartucho. Para varios pasos de llenado, la solución mezclada se ha recogido y la relación de mezcla se determinó de acuerdo con valores estándar determinados mezclando diferentes proporciones de tampón y tinta.

Para determinar la relación de mezcla de las muestras y los patrones, se midió la absorción de la tinta usando un fotómetro óptico. Se llenaron 15 a 20 ml de solución tamponada con fosfato en una bolsa conectada al puerto 120 de entrada del cartucho de electroporación mediante un tubo corto. Una segunda bolsa llena con aproximadamente 3 a 4 ml de solución de tinta se conectó al segundo puerto 110 de entrada del cartucho de electroporación por otro tubo corto. El fluido de cada tubo era controlado por una válvula de perforación. Una bomba peristáltica se conectó al puerto 140 de salida a través de otro tubo. La conexión de la bomba al cartucho de electroporación también podría controlarse con otra válvula de perforación. Se conectó un cuarto tubo en el puerto 160 de salida para recoger la mezcla de las dos soluciones. El fluido de salida también fue controlado por una válvula de perforación. Se cargó aproximadamente 1 ml en el cartucho de electroporación y se midió la absorbancia de cada mezcla eliminada.

Como se muestra en la FIG. 8, la relación de mezcla aumenta de aproximadamente 1:7 a más de 1:60 si dos válvulas de entrada y la válvula 140 de salida se abren simultáneamente cuando se arrancan las bombas peristálticas. A medida que el nivel de fluido en las bolsas y tubos de entrada disminuye, la diferencia de presión hidrostática cambia y, por lo tanto, la proporción de mezcla de microfluidos se deteriora (línea punteada). Cuando la bomba peristáltica genera un vacío bajo por adelantado y luego las válvulas se abren, observamos un aumento en la relación de mezcla, pero menos dramático. Incrementando aún más el vacío a menos de -100 mbar dio una relación de mezcla constante de 1:5.1.

Electroporación

Con el fin de probar la fiabilidad del dispositivo de la invención, se sometió a electroporación una suspensión de células Jurkat y, después de la electroporación, las células se analizaron mediante un citómetro de flujo. Los resultados se muestran en la fig. 9a-g, con a) Electroporación de control sin plásmidos, b) Electroporación de control con solo plásmido mCherry, c) Electroporación de control con solo plásmido eGFP, d) Electroporación de control con plásmido mCherry y eGFP se mezcla manualmente antes de la electroporación, e) Células de electroporación premezcladas con plásmido mCherry y posteriormente añadido plásmido eGFP sin mezcla de microfluidos, f) Células de electroporación premezcladas con plásmido mCherry y plásmido eGFP añadido mediante mezcla de microfluidos. Lo siguiente se refiere a la FIG. 9:

Sin ningún ácido nucleico, no se detectó fluorescencia (a). Mezclando manualmente las células con un plásmido que codifica la proteína roja fluorescente mCherry, aproximadamente el 35% de las células expresan la proteína fluorescente roja como puede detectarse mediante la fluorescencia roja. Mezclando las células con un plásmido que codifica la proteína fluorescente verde GFP, aproximadamente el 44% de las células expresan la proteína verde fluorescente como puede detectarse mediante la fluorescencia verde. Cuando ambos plásmidos se mezclan manualmente con la suspensión celular, las células electroporadas presentan fluorescencia en rojo y verde. Las células con el plásmido que codifica la proteína roja fluorescente mCherry se mezclaron manualmente y se aplicaron a la bolsa conectada al puerto 120 de entrada del cartucho de electroporación mediante un tubo corto. Una segunda bolsa llena con una solución que contiene un plásmido que codifica la proteína fluorescente verde GFP se conectó al segundo puerto 110 de entrada del cartucho de electroporación mediante otro tubo corto. El fluido de cada tubo fue controlado por una válvula de perforación. Una bomba peristáltica se conectó al puerto 140 de salida a través de otro tubo. La conexión de la bomba al cartucho de electroporación también podría controlarse con otra válvula de perforación. Se utilizó un cuarto tubo conectado en el puerto 160 de salida para recoger la mezcla de las dos soluciones. El fluido de salida también fue controlado por una válvula de perforación. Se llenaron aproximadamente 0.8 ml de suspensión celular en el cartucho de electroporación seguido de aproximadamente 0.2 ml de solución de ácido nucleico. Luego se aplicó un pulso eléctrico. Después de la electroporación, se recogió la suspensión celular y las células se analizaron mediante citometría de flujo.

Como se puede ver en la FIG. 9e, además de la expresión de las células de ambas proteínas fluorescentes, aproximadamente el 7% expresa solo la proteína fluorescente roja. Estas células no se mezclaron bien con el plásmido que codifica la proteína fluorescente verde. A continuación, las células usadas se mezclaron manualmente con el plásmido que codifica la proteína roja fluorescente mCherry y esta mezcla se aplicó en una bolsa conectada al puerto 120 de entrada del cartucho de electroporación mediante un tubo corto. Una segunda bolsa llena con una solución que contiene un plásmido que codifica la proteína fluorescente verde GFP se conectó al segundo puerto 110 de entrada del cartucho de electroporación mediante otro tubo corto. El fluido de cada tubo fue controlado por una válvula de perforación. Una bomba peristáltica se conectó al puerto 140 de salida a través de otro tubo. La conexión de la bomba al cartucho de electroporación también podría controlarse con otra válvula de perforación. Se utilizó un cuarto tubo conectado en el puerto 160 de salida para recoger la mezcla de las dos soluciones. El fluido de salida también fue controlado por una válvula de perforación. Se cargó aproximadamente 1 ml en el cartucho de electroporación usando los canales de mezcla de microfluidos y el elemento 130 de mezcla de microfluidos. Luego se aplicó un pulso eléctrico. Después de la electroporación, se recogió la suspensión celular y las células se analizaron mediante citometría de flujo. La fig. 9f) muestra que las células electroporadas expresan ambas proteínas fluorescentes que muestran la mezcla homogénea de las células con la solución de ácido nucleico del plásmido que codifica la proteína fluorescente verde.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un desechable para la electroporación de células, que comprende un compartimento de fluido en un interior del desechable; un primer puerto de fluido para proporcionar la suspensión de células al compartimento de fluido, y un segundo puerto de fluido para suministrar un fluido que comprende al menos un compuesto para ser electroporado en las células al compartimento de fluido; un primer electrodo y un segundo electrodo dispuestos en el compartimento de fluido;
- 10 al menos un puerto de salida que suministra el fluido desde el compartimento de fluido donde el primer y segundo puerto de fluido tienen una comunicación de fluido a un canal de mezcla que tiene una comunicación de fluido al compartimento de fluido caracterizado porque el primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido son provisto de canales con diferente resistencia microfluidica a los fluidos.
- 15 2. El desechable de la reivindicación 1, en el que el canal de mezcla tiene una forma de serpentina y/o comprende elementos agitadores o una cámara de mezcla.
- 20 3. El desechable de la reivindicación 1, en el que el primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido están provistos de canales que tienen una resistencia microfluidica para mantener una relación de mezcla de 1:5 a 1:10 del primer fluido al segundo fluido.
- 25 4. El desechable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido están en comunicación fluida con al menos una bomba que suministra fluidos desde el primer puerto de fluido y el segundo fluido al compartimento de fluido.
- 30 5. El desechable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos un puerto de salida está en comunicación fluida con al menos una fuente de vacío absorbiendo de esta manera fluidos desde el primer puerto de fluido y el segundo puerto de fluido al compartimento de fluido.
- 35 6. El desechable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el canal de mezcla y al menos un puerto de salida están situados en los lados más opuestos del compartimento de fluido para permitir el llenado sin burbujas del compartimento de fluido con fluido.
7. El desechable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además al menos un electrodo adicional que aplica un potencial de tierra a al menos uno del primer puerto de fluido, segundo puerto de fluido o puerto de salida.
- 40 8. El desechable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el primer electrodo de metal y el segundo electrodo de metal comprenden titanio cubierto con una capa de oro.
- 45 9. Procedimiento para la electroporación de células en un dispositivo desechable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se proporciona una suspensión celular a un primer puerto de fluido como primer fluido y se proporciona un fluido que comprende al menos un compuesto para ser electroporado en las células al segundo puerto de fluido como segundo fluido; los fluidos primero y segundo se proporcionan al compartimento de fluido en una proporción de mezcla predefinida aplicando una diferencia de presión entre el primer y el segundo puerto de fluido y al menos un puerto de salida; aplicar un campo eléctrico entre el primer y el segundo electrodo, electroporando así las células con al menos un compuesto; y retirar los fluidos del compartimento de fluido.
- 50 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que los fluidos primero y segundo se proporcionan al compartimento de fluido a un nivel de llenado predefinido; y en el que el nivel de llenado del compartimento de fluido se determina midiendo la capacitancia entre el primer y el segundo electrodo.
- 55 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que después de retirar los fluidos del compartimento de fluido, las células sometidas a electroporación se detectan y agotan de los fluidos.
- 60 12. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, en el que después de eliminar los fluidos del compartimento de fluido, se cultivan las células electroporadas.
- 65 13. Sistema para la electroporación de células que comprende un desechable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, un primer contenedor de almacenamiento que contiene una suspensión de células; un segundo contenedor de almacenamiento que contiene un fluido que comprende al menos un compuesto para ser electroporado en las células; un tercer contenedor de almacenamiento para celdas electroporadas; una bomba y/o una fuente de vacío; y un conjunto de tubos que proporciona comunicación fluida entre los recipientes de almacenamiento y el desechable, en el que el sistema está cerrado a la atmósfera exterior.
14. Sistema según la reivindicación 13, en el que el tercer contenedor de almacenamiento está configurado como cámara de cultivo.

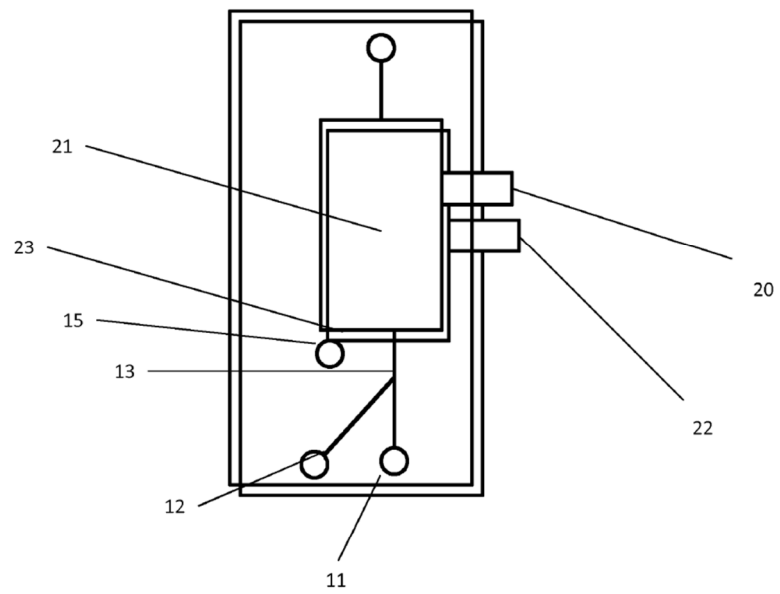


Fig. 1

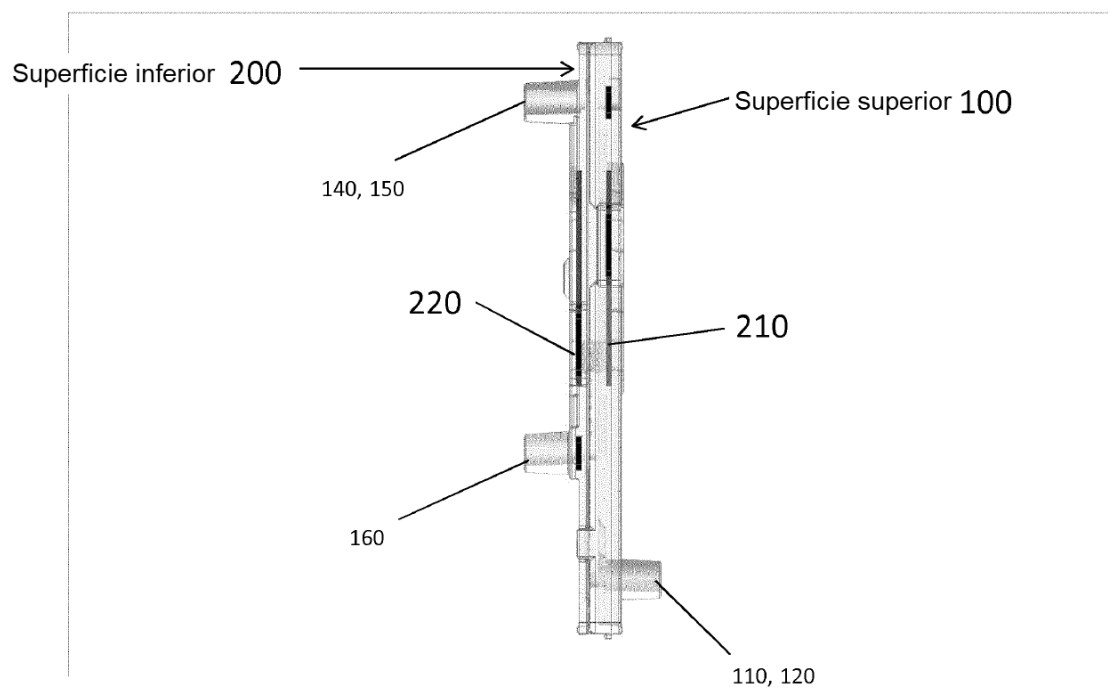


Fig. 2

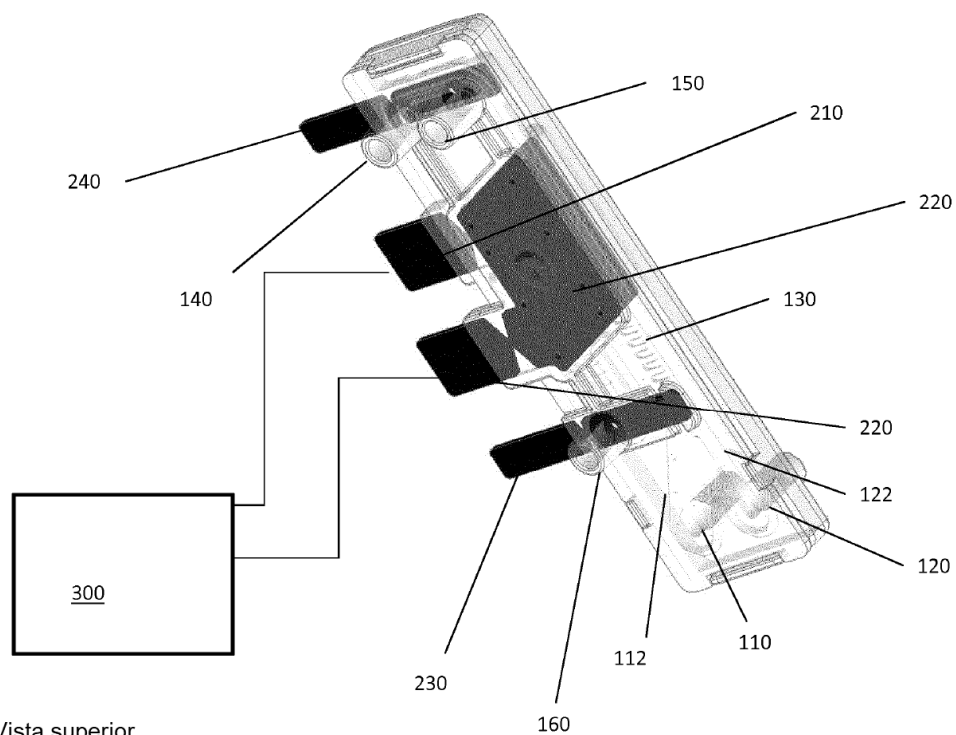


Fig. 3 Vista superior

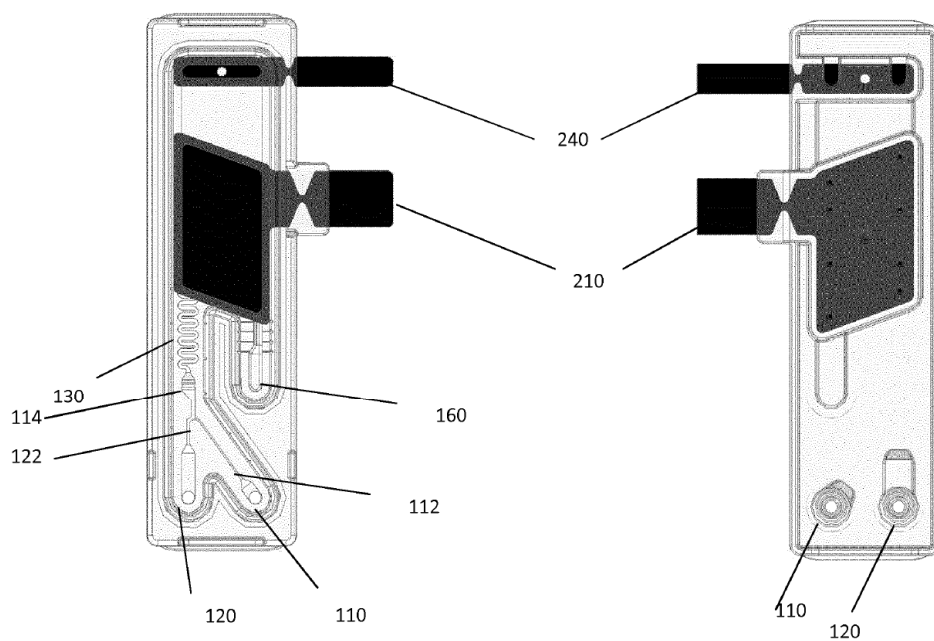


FIG. 4a Superficie exterior superior

FIG. 4b Superficie interior superior

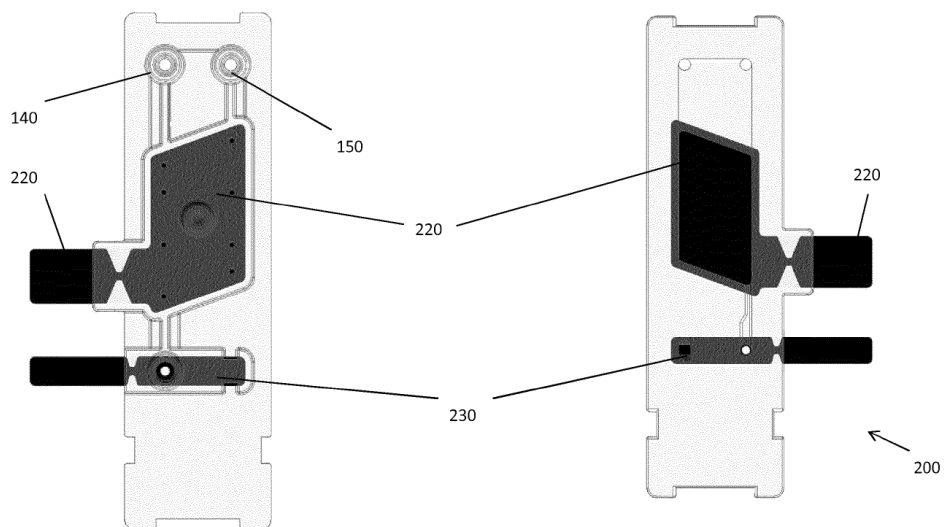


FIG. 5a Superficie exterior inferior

FIG. 5b Superficie interior inferior

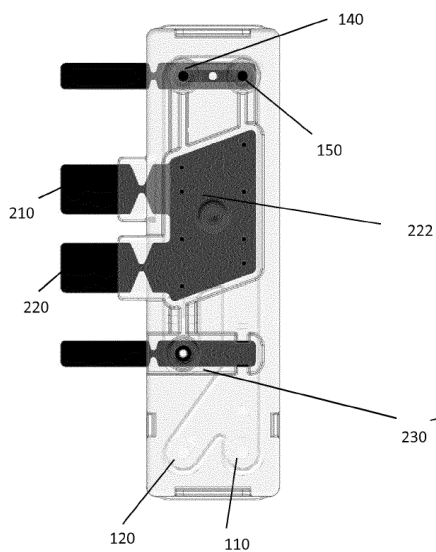


FIG. 6a Superficie inferior de ensamblado

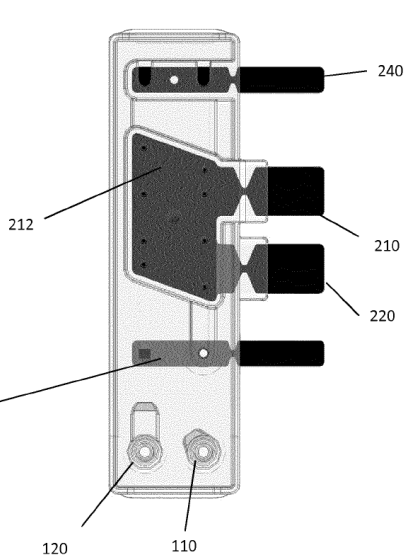


FIG. 6b Superficie superior de ensamblado

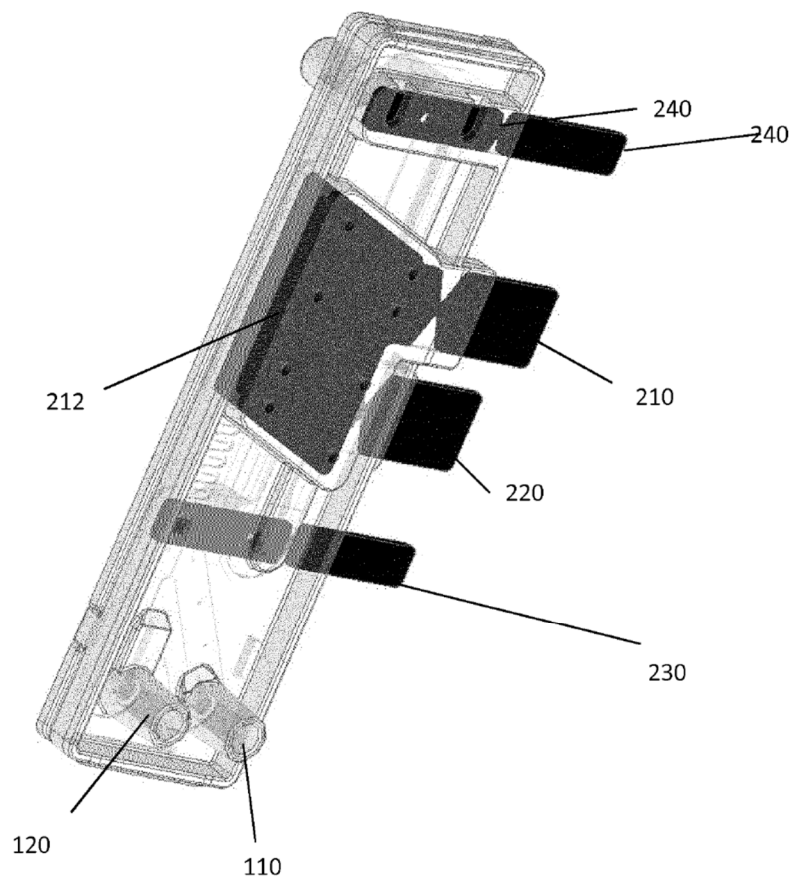


Fig. 7

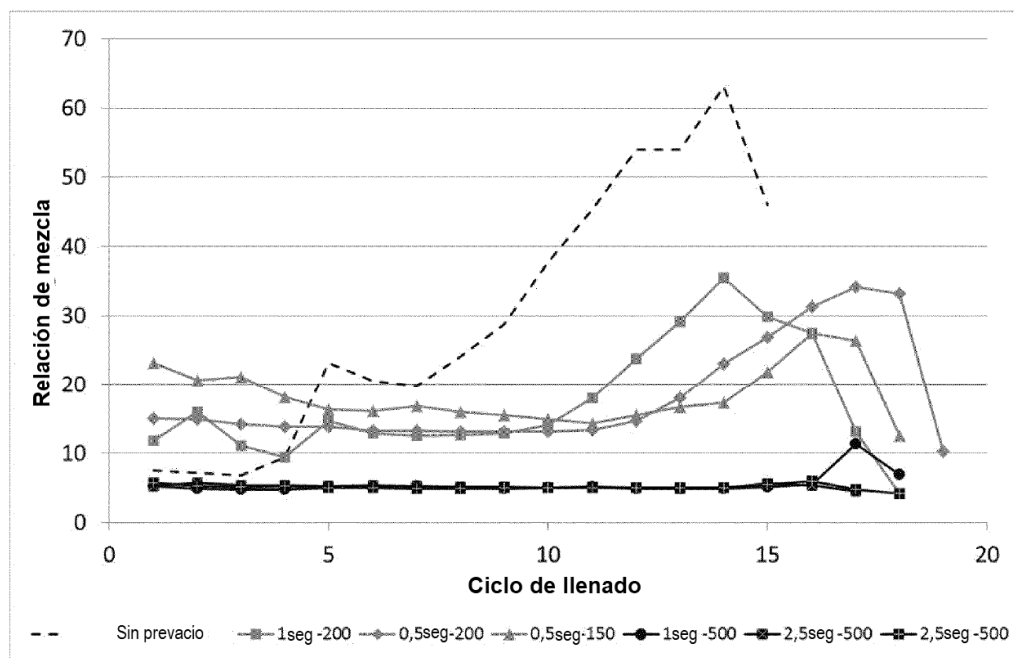
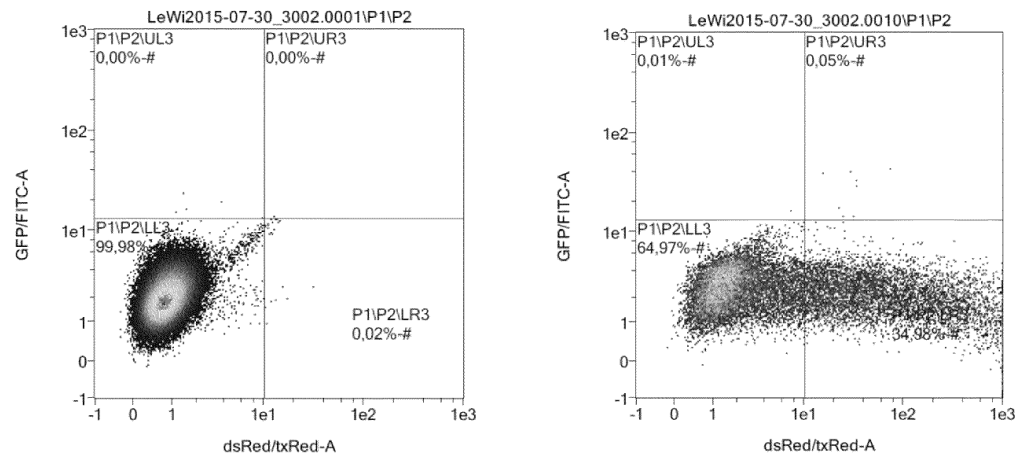


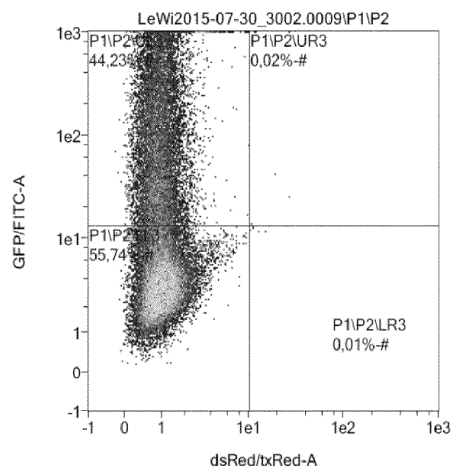
Fig. 8



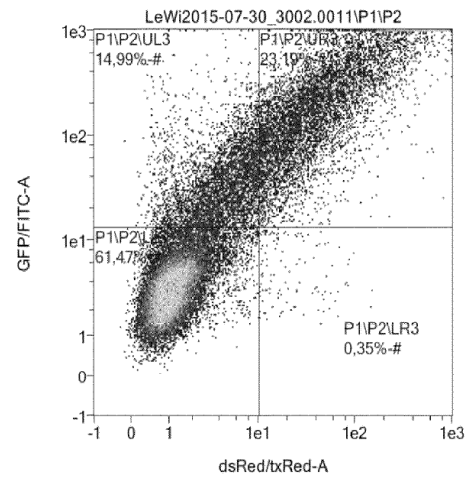
a) sin control de plásmido

b) mCherry solamente control

Fig. 9

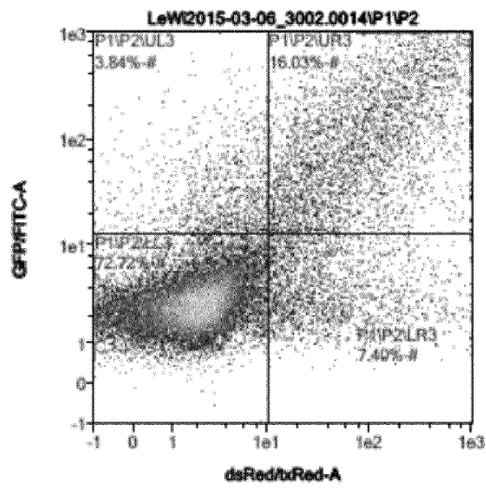


c) GFP solamente control

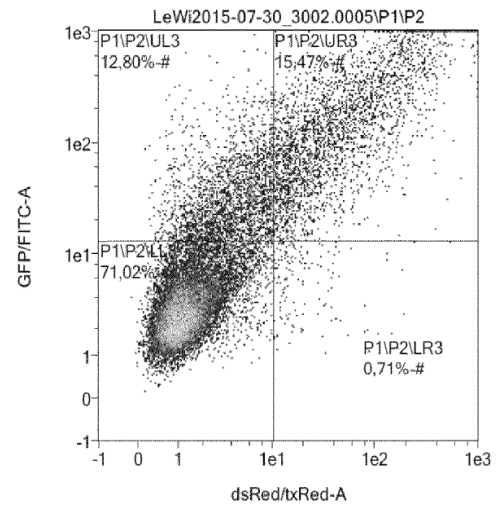


d) control manualmente mezclado

Fig. 9



e) muestra secuencialmente llena
sin mezcla microfluídica



f) muestra mezclada microfluídica

Fig. 9