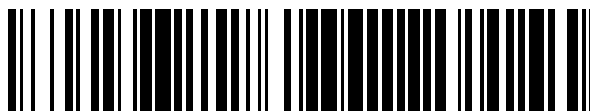


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 997**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2009 PCT/US2009/040698**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009 WO09129327**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2009 E 09731823 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2276829**

54 Título: **Punta de pipeta para dispositivo de electroporación**

30 Prioridad:

15.04.2008 KR 20080034744

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

05.06.2020

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)
5823 Newton Drive
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**CHANG, JUN-KEUN;
CHO, KEUN-CHANG;
CHUNG, CHAN-IL;
JUNG, NEON-CHEOL y
HUH, SEUNG, GIN**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 764 997 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

Punta de pipeta para dispositivo de electroporación

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una punta de pipeta para la electroporación.

Antecedentes de la invención

10

La electroporación es una técnica para introducir macromoléculas, que no pueden penetrar la membrana celular, en las células mediante el uso de impulsos eléctricos. La electroporación es un método usado ampliamente, y recomendado fuertemente, para los experimentos celulares y la terapia génica. Cuando se aplica un campo eléctrico alto, la membrana celular se vuelve porosa temporalmente y permeable a materiales extraños, tales como las macromoléculas. La electroporación de la membrana depende de diversos parámetros del campo eléctrico, tales como el ancho del impulso, la duración del impulso, la cantidad de impulsos, así como también otras condiciones experimentales. Se han realizado estudios con respecto a los parámetros mencionados anteriormente para entender el mecanismo de la electroporación que promueve el efecto de la transfección. Por ejemplo, se informa la magnitud del campo eléctrico para ser un parámetro importante para aumentar la permeabilidad de la membrana y para controlar la porción de la membrana celular a través de la que ocurre la transmisión.

15

20

Existen diversos dispositivos para realizar la electroporación. La **Figura 1** es una vista en perspectiva de una cubeta de la técnica anterior que puede usarse para realizar la electroporación. La **Figura 2** muestra un dispositivo y sistema de electroporación descritos en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 2007/0275454 A1 relacionada. La **Figura 3** es una vista lateral del dispositivo de electroporación mostrado en la **Figura 2**. La **Figura 4** es una vista lateral que ilustra los componentes de una punta de pipeta usada con el dispositivo mostrado en las **Figuras 2 & 3**.

25

30

Puede aplicarse un campo eléctrico a una suspensión celular y/o una mezcla de genes mediante el uso de la cubeta ilustrada en la **Figura 1**. En tal sistema, la cubeta puede equiparse con dos placas de electrodos paralelas **1**. Cuando se aplica un campo eléctrico alto entre las dos placas de electrodos, la membrana celular se vuelve permeable, lo que la hace posible para introducir un gen u otra materia extraña en la célula. Los electrodos de aluminio son baratos y pueden usarse con una cubeta desechable. Sin embargo, usar el Al crea iones Al^{3+} disueltos de los electrodos de aluminio, cuyos iones se han encontrado que influyen negativamente en las células. Además, cuando se usan los electrodos de aluminio, la magnitud del campo eléctrico puede variar debido a una caída en la tensión eléctrica provocada por la acumulación de capas de óxido en los electrodos. Por lo tanto, para generar un campo eléctrico más constante, puede ser preferible usar electrodos de platino u oro. Sin embargo, los electrodos hechos de estos materiales son costosos y por lo tanto no es práctico usar electrodos hechos de estos materiales para bienes consumibles.

35

40

Por lo tanto, los dispositivos de electroporación actuales tienen las siguientes desventajas. Primero, usar la cubeta para la electroporación puede ser costoso en dependencia del material del electrodo usado ya que existen dos electrodos montados en dos lados opuestos de la cubeta, y ya que cada electrodo tiene un área superficial amplia. Adicionalmente, se recomienda que las cubetas sean de un solo uso. Sin embargo, muchos usuarios realizan experimentos varias veces mediante el uso de la misma cubeta, por lo tanto, se crea una posibilidad alta de ocurrencia de error experimental. Segundo, debido a que el material del electrodo (Al) es reactivo en la solución, y la sobretensión relativa a la generación de hidrógeno es baja, realizar la electroporación mediante el uso de los dispositivos de electroporación actuales crea burbujas de aire debido a la descomposición del agua en las superficies de los electrodos. Tercero, se ha encontrado que el subproducto de iones (Al^{3+}) generado tiene un efecto negativo en las células. Cuarto, la resistencia superficial en el electrodo aumenta notablemente debido a la generación de una capa de óxido (Al_2O_3) en la superficie del electrodo. Quinto, el campo eléctrico entre los electrodos puede no permanecer constante. Esto puede ser debido a grandes cantidades de corriente que fluyen a través de las esquinas de los electrodos, lo que distorsiona de esta manera el campo eléctrico. Finalmente, el volumen de muestra necesitado puede ser grande, lo que puede hacer difícil analizar una pequeña cantidad de células en la muestra. Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar un nuevo dispositivo de electroporación para abordar estas desventajas.

45

50

55

Las **Figuras 2-4** ilustran versiones de la técnica anterior de un dispositivo de electroporación, una punta de pipeta, y los componentes detallados de los mismos para resolver las desventajas anteriores. Con referencia a las **Figuras 2-4**, los dispositivos de electroporación actuales pueden incluir un generador de impulsos **10** para generar un impulso eléctrico; un depósito de muestra **20**; una pipeta **30** con un lado en comunicación eléctrica con el generador de impulsos; y una punta de pipeta **40**, un extremo de la que puede insertarse sobre la porción extrema de la pipeta **30** y el otro extremo de la que puede insertarse en el depósito de muestra **20** y puede estar en comunicación fluida con la muestra. Adicionalmente, el extremo distal de la pipeta **30**, o la punta de pipeta **40**, puede estar en comunicación fluida con la muestra y la pipeta **30** puede ser capaz de extraer una muestra en la punta de pipeta **40**. Adicionalmente, un electrodo **50** puede insertarse en el depósito de muestra **20** y puede estar en comunicación fluida con la muestra. La superficie circunferencial exterior de la pipeta **30** comprende un cuerpo de contacto **31** formado con materiales conductores, en donde el cuerpo de contacto **31** puede conectarse eléctricamente con un émbolo **42** ubicado dentro de la punta de pipeta

60

65

5 **40** como se muestra en la **Figura 3**. La punta de pipeta **40** comprende un cuerpo tubular **41** que tiene aberturas en ambos extremos, en donde la abertura en un extremo puede ser una sección en forma de anillo que tiene un diámetro relativamente grande para insertarse en la porción extrema de la pipeta **30**, y el otro extremo puede ser una sección en forma de anillo que tiene un diámetro relativamente pequeño. La punta de pipeta **30** se inserta entonces en el depósito de muestra **20**, y el émbolo **42** se ubica a través del cuerpo **41** de la punta de pipeta **40**.

10 Al realizar la electroporación mediante el uso del sistema y dispositivo de electroporación mostrado en las **Figuras 2-4**, la pipeta extrae la muestra en el interior de la punta de pipeta **40** mientras se mantiene la presión y de esta manera se mantiene la muestra dentro de la punta de pipeta **40**. El depósito de muestra **20** puede entonces reemplazarse con un depósito que contiene una solución electrolítica. Al aplicar una corriente eléctrica a los émbolos **42** ubicados dentro del cuerpo **41** de la punta de pipeta **40** y al electrodo **50** que contacta la muestra en el depósito de muestra **40** o la solución electrolítica en el depósito de la solución electrolítica, una célula ubicada en la muestra extraída en la punta de pipeta **40** puede electroporarse, al pasar una corriente entre los dos electrodos y a través de cualesquiera células ubicadas entre los dos electrodos. La electroporación de las células ubicadas en la muestra dentro de la punta de pipeta **40** provoca que las membranas celulares se vuelvan más permeables, y por lo tanto facilita la introducción de macromoléculas, sondas moleculares, medicamentos, ADN, ARN, bacterias, genes, material proteico, células, o cualquier otra sustancia adecuada que normalmente no puede penetrar la membrana celular, en la célula.

20 En el sistema y dispositivo de electroporación de la técnica anterior como se muestra en las **Figuras 2-4**, la superficie circunferencial exterior de la pipeta **30** comprende un cuerpo de contacto separado **31**, y un émbolo separado **42** que puede estar en comunicación eléctrica con el cuerpo de contacto **31** en el cuerpo **41** de la punta de pipeta **40**. Ya que la superficie circunferencial exterior de la pipeta **30** incluye un cuerpo de contacto separado **31** y un émbolo separado **42** en comunicación eléctrica que se conecta con el cuerpo de contacto **31**, la estructura del dispositivo puede ser compleja lo que puede hacer que la fabricación del dispositivo sea tanto costosa como consume mucho tiempo. Ya que el cuerpo de contacto **31** y el émbolo **42** formado en la superficie circunferencial exterior de la pipeta **30** se conectan juntos en el interior del dispositivo, puede ser difícil para un usuario determinar el estado de la conexión entre el émbolo y el cuerpo de contacto.

30 Por lo tanto, sería útil desarrollar un dispositivo de electroporación donde la punta de pipeta en ella misma pueda servir como un electrodo y de esta manera aplicar una corriente eléctrica a la muestra sin la necesidad de una estructura separada (tal como el émbolo **42**) que sirva como el electrodo.

35 El documento WO 03/057819 se refiere a dispositivos usados para la electroporación de artículos seleccionados que se adaptan particularmente para permitir el uso por sistemas automatizados o semiautomatizados.

Resumen de la invención

40 Proporcionada en la presente descripción está una punta de pipeta para su uso con un dispositivo de electroporación que incluye una superficie exterior, un vacío ubicado dentro de la superficie exterior, y un conductor ubicado en un lado de la superficie exterior. El conductor es capaz de aplicar un campo eléctrico al vacío de la punta de pipeta y de esta manera aplicar un campo eléctrico a la muestra ubicada dentro de la punta de pipeta y a cualesquiera células en la misma. Las membranas celulares de las células se electroporan entonces por la punta de pipeta, y cualquier material ubicado dentro de la muestra puede entonces transferirse en las células.

45 Proporcionada además en la presente descripción está una punta de pipeta para su uso con un dispositivo de electroporación en donde la punta de pipeta en ella misma sirve como un electrodo para realizar la electroporación en donde la punta/el electrodo de pipeta contacta la muestra sin la necesidad de una estructura de electrodo separada. Adicionalmente, esto puede tener el efecto adicional de realizar fácilmente la electroporación al reducir la tasa de error y reducir la cantidad de prueba y error con el diseño simplificado. Por ejemplo, aunque se pretenden para un solo uso, las cubetas usadas actualmente para la electroporación pueden de hecho usarse múltiples veces. Con la liberación de iones en la solución de los electrodos ubicados en las cubetas y el efecto negativo que estos iones tienen en las células, la tasa de error entre las series puede aumentar. Adicionalmente, debido a que el vacío de la punta de pipeta no contiene una estructura adicional que sirve como el electrodo, tal como un émbolo que sirve como el electrodo, el vacío de la punta de pipeta de la presente invención puede succionar y expulsar fácilmente la muestra de la punta de pipeta mediante el uso simplemente de la presión de aire.

60 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una punta de pipeta para su uso en llevar a cabo la electroporación que comprende: una parte de combinación que tiene un cuerpo, un extremo proximal, un extremo distal, y un vacío de la parte de combinación; una parte de conexión que tiene un extremo proximal, un extremo distal y un vacío de la parte de conexión, y ubicado al menos parcialmente sobre o dentro del extremo distal del cuerpo; una parte alargada que tiene un vacío de la parte alargada y ubicado en el extremo distal de la parte de conexión, en donde el vacío de la parte de combinación, el vacío de la parte de conexión, y el vacío de la parte alargada están en comunicación fluida entre sí, la punta de pipeta que tiene una superficie exterior y un vacío ubicado dentro de la superficie exterior que comprende el vacío de la parte de combinación, el vacío de la parte de conexión y el vacío de la parte alargada; y que comprende además un conductor ubicado al menos parcialmente sobre o dentro de la superficie exterior, en donde el conductor está en comunicación eléctrica con al menos una porción de la superficie exterior y el vacío, el conductor que tiene una

superficie interior capaz de aplicar una corriente eléctrica al vacío de la parte de conexión, mediante lo que el conductor puede proporcionar un solo electrodo del par de electrodos requerido para realizar la electroporación y la punta de pipeta no contiene otra estructura de electrodo, y una muestra extraída tanto en el vacío de la parte de conexión como en el vacío de la parte alargada puede someterse a un campo eléctrico cuando la punta de pipeta se combina con otro electrodo en un sistema de electroporación. Tener el conductor ubicado al menos parcialmente sobre o dentro de la superficie exterior de la punta de pipeta elimina la necesidad de una estructura conductora eléctrica o un electrodo dentro del vacío. Por lo tanto el vacío sólo se llena con la muestra. El conductor está en comunicación fluida con el vacío. En algunas modalidades, el conductor puede ser en forma de anillo. Adicionalmente, el conductor puede incluir un cuerpo y una superficie, donde el cuerpo incluye un material conductor seleccionado de al menos uno de cobre, latón, níquel, oro, plata, aluminio, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor adecuado. En algunas modalidades, el cuerpo del conductor puede ser un conductor moldeado por inyección, en donde el conductor moldeado por inyección incluye al menos uno de plástico o de polímero conductor. En algunas modalidades, la superficie del conductor puede incluir al menos uno de latón, cobre, aluminio, níquel, oro, plata, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor adecuado. En algunas modalidades, la punta de pipeta puede comprender además al menos un poste de conexión. El poste de conexión puede o puede no ser en forma de embudo. En algunas modalidades, la punta de pipeta puede incluir al menos uno, al menos dos, o al menos tres postes de conexión. En algunas modalidades, los tres postes de conexión pueden ubicarse a 120 grados uno con respecto a los otros y con respecto a la superficie exterior.

Proporcionada además en la presente descripción está una punta de pipeta para su uso con un dispositivo de electroporación que comprende: un cuerpo que tiene un extremo proximal, un extremo distal, y un vacío; un conector que tiene un extremo proximal, un extremo distal, y un vacío y ubicado además en el extremo distal del cuerpo, el conector que comprende: al menos un poste de conexión; una parte de conexión en comunicación mecánica con el al menos un conector; un conductor ubicado al menos parcialmente sobre o dentro del cuerpo y que rodea al menos una porción del al menos un poste de conexión; y una parte alargada que tiene un vacío y ubicado en el extremo distal del conector, en donde el vacío del cuerpo, el conector, y la parte alargada están en comunicación fluida. Tener el conductor ubicado al menos parcialmente sobre o dentro de la superficie exterior de la punta de pipeta elimina la necesidad de una estructura conductora eléctrica o un electrodo dentro del vacío. Por lo tanto el vacío sólo se llena con la muestra. El conductor puede o puede no ser capaz de rodear el al menos un poste de conexión. El conductor puede incluir además una superficie interior capaz de aplicar una corriente eléctrica al vacío de la parte del conector. El conductor puede ser un material conductor seleccionado de al menos uno de níquel, oro, plata, cobre, latón, o aluminio. La superficie interior del conductor puede chaparse con un material conductor seleccionado de al menos uno de latón, aluminio, cobre, níquel, oro, plata, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor adecuado. El conductor puede moldearse por inyección con plástico o con un polímero conductor. Adicionalmente, la punta de pipeta puede incluir un diámetro de la parte de combinación y un diámetro del conductor, en donde el diámetro del conductor puede o puede no ser menor que el diámetro de la parte de combinación. La parte alargada puede estrecharse a lo largo de su longitud. La parte de conexión puede incluir un orificio de conexión en comunicación con el vacío de la parte de combinación. El orificio de conexión puede incluir además una ranura que se extiende radialmente desde el orificio de conexión. La parte de conexión puede incluir además al menos una proyección de conexión y una proyección de fijación, en donde la al menos una proyección de conexión y la proyección de fijación son capaces de entrelazarse juntas.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un sistema de electroporación que comprende un generador de impulsos; una pipeta que tiene una punta de pipeta del primer aspecto en comunicación eléctrica con el generador de impulsos; y un electrodo en comunicación con el generador de impulsos. La punta de pipeta puede estar en comunicación eléctrica con el electrodo.

Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone las modalidades ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos acompañantes de los que:

La **Figura 1** es una vista en perspectiva de una cubeta usada actualmente para realizar la electroporación;

La **Figura 2** muestra un ejemplo de un sistema y dispositivo usado para realizar la electroporación en la técnica anterior;

La **Figura 3** es una vista lateral del dispositivo mostrado en la **Figura 2**;

La **Figura 4** es una vista lateral de los componentes de una punta de pipeta usada con el dispositivo mostrado en la **Figura 2**;

La **Figura 5** es una vista en perspectiva que ilustra una punta de pipeta que es una modalidad de la invención;

La **Figura 6** es una vista en perspectiva que ilustra la punta de pipeta mostrada en la **Figura 5** con el conductor extraído;

La **Figura 7** es una vista en sección transversal de la punta de pipeta mostrada en la **Figura 5**;

La **Figura 8** es una vista en perspectiva de una punta de pipeta que es una modalidad de la invención;

La **Figura 9** es una vista en sección transversal de la punta de pipeta mostrada en la **Figura 8**.

La **Figura 10** es una vista en perspectiva de una punta de pipeta que es una modalidad de la invención;

La **Figura 11** es una vista en sección transversal de la punta de pipeta mostrada en la **Figura 10**; y

La **Figura 12** muestra un dispositivo y sistema de electroporación.

Descripción detallada de la invención

Proporcionada en la presente descripción está una punta de pipeta para su uso con un dispositivo de electroporación. La punta de pipeta facilita la electroporación ya que la punta de pipeta en ella misma puede usarse para proporcionar un electrodo y/o una corriente eléctrica a la muestra sin la necesidad de tener un electrodo separado, tal como el electrodo de émbolo mostrado en las Figuras 3 & 4. Por lo tanto, la punta de pipeta descrita en la presente descripción puede reducir el costo unitario de fabricación de un dispositivo de electroporación y puede por lo tanto facilitar la realización de la electroporación en una muestra y sus contenidos.

En algunas modalidades, proporcionada en la presente descripción está una punta de pipeta para su uso con un dispositivo de electroporación que incluye una superficie exterior, un vacío ubicado dentro de la superficie exterior, y un conductor ubicado en un lado de la superficie exterior. El conductor es capaz de aplicar un campo eléctrico al vacío de la punta de pipeta y a cualquier muestra y/o células ubicadas dentro de la punta de pipeta. La aplicación de un campo eléctrico a la membrana celular de una célula por la punta de pipeta electropora las células, y el material ubicado dentro de la muestra puede entonces transferirse en las células. Los ejemplos del material que puede introducirse en las células incluyen macromoléculas, sondas moleculares, medicamentos, terapéuticos, ADN, ARN, bacterias, genes, material proteico, células, o cualquier otro material adecuado.

Con referencia ahora a las Figuras 5-7, las Figuras 5-7 muestran diversas vistas de una modalidad de una punta de pipeta en donde la punta de pipeta 400 incluye: una parte de combinación 410 con un vacío 411 que puede conectarse a un extremo de una pipeta 300 (como se muestra en la Figura 12). La pipeta 300 está en comunicación fluida con el vacío 411. La punta de pipeta incluye además una parte alargada 430 que se extiende desde la parte de combinación 410. En algunas modalidades, la parte alargada 430 tiene un diámetro más pequeño en comparación con la parte de combinación 410. Un vacío 431 se ubica además dentro de la parte alargada 430 y se forma para contactar la muestra para extraerse en la punta de pipeta. La punta de pipeta incluye además una parte de conexión 420 ubicada entre la parte de combinación 410 y la parte alargada 430. La parte de conexión 420 incluye además un vacío 421 que está en comunicación con el vacío 411 de la parte de combinación 410 y el vacío 431 de la parte alargada 430. La conexión entre los vacíos 411, 421, 431 de la parte de combinación 410, la parte de conexión 420, y la parte alargada 430, respectivamente, facilita la aplicación de un campo eléctrico por la parte de conexión a la muestra. En algunas modalidades, la succión puede aplicarse por la pipeta 300. Cuando se presiona el émbolo de la pipeta, la succión creada por la pipeta 300 se transfiere a través de los vacíos 411, 421, 431 de la parte de combinación 410, la parte de conexión 420, y la parte alargada 430, respectivamente, para extraer una muestra en el vacío 431 de la parte alargada 430 y en el vacío 421 de la parte de conexión 420. En algunas modalidades, la punta de pipeta 400 se calibra para extraer una cantidad suficiente de muestra, de manera que la muestra sólo llene los vacíos 431, 421 de la parte alargada 430 y la parte de conexión 420, respectivamente. En algunas modalidades, la muestra puede extraerse en los vacíos 411, 421, 431 de la parte de combinación 410, la parte de conexión 420 y la parte alargada 430, respectivamente.

La parte de combinación 410 tiene dos extremos un extremo distal, o el extremo más alejado del usuario/la pipeta, y un extremo proximal, o el extremo más cercano al usuario/la pipeta. Ambos extremos de la parte de combinación 410 tienen aberturas, y un vacío 411 rodeado por una superficie exterior en el que puede extraerse la muestra. Adicionalmente, una superficie circunferencial exterior superior de la parte de combinación 410 tiene una longitud predeterminada para conectar o desconectar fácilmente la punta de pipeta 400 del extremo de la pipeta 300, y puede incluir además las proyecciones 412 que se extienden radialmente desde la parte de combinación 410.

Con referencia a la Figura 6, en algunas modalidades, la punta de pipeta incluye una parte de conexión 420 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, o más de tres postes de conexión en forma de cilindro 423 fijados en un extremo de la parte de combinación 410, una parte de conexión en forma de embudo 424 fijada en los extremos del uno o la pluralidad de postes de conexión 423; y un conductor 422 que rodea los postes de conexión 423. En algunas modalidades, el conductor se ubica al menos parcialmente sobre o dentro de la superficie de la parte de combinación 410. Tener el conductor ubicado al menos parcialmente sobre o dentro de la parte de combinación elimina la necesidad de una estructura conductora eléctrica, o un electrodo, dentro del vacío. Por lo tanto el vacío sólo se llena con la muestra. En algunas modalidades, pueden existir tres postes de conexión 423, el conductor 422 puede rodear los postes de conexión 423 al menos parcialmente o totalmente. En algunas modalidades, el conductor 422 es un conductor en forma de anillo. Los postes de conexión 423 pueden disponerse en cualquier posición alrededor de la parte de combinación 420. En algunas modalidades, los postes de conexión 423 pueden disponerse en un ángulo de 120° uno con respecto a los otros postes de conexión y relativos a la superficie más baja de la parte de combinación 410, y se forma un vacío 421 a través del centro de la parte de conexión 424. La superficie circunferencial interior del conductor 422 puede exponerse a través de espacios entre los postes de conexión 423 para facilitar la aplicación del campo eléctrico a una muestra extraída en la punta de pipeta. En algunas modalidades, el conductor consiste en un material conductor tal como, sólo para propósitos de ejemplo, níquel, oro, plata, cobre, latón, aluminio, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor adecuado, y/o la superficie del conductor puede chaparse con un material conductor tal como, para propósitos de ejemplo sólo, níquel, oro, plata, cobre, latón, aluminio, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor adecuado. En algunas modalidades, el conductor puede moldearse por inyección con un plástico. La superficie del conductor puede entonces chaparse con un material conductor tal como cobre, latón, aluminio, níquel, oro, plata, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor adecuado. En algunas modalidades, el conductor puede moldearse por inyección con un polímero conductor.

La parte alargada **430** puede tener cualquier longitud predeterminada adecuada en una dirección longitudinal de la parte de conexión **424** al fijarse a la superficie más baja de la parte de conexión **424**, y un vacío **431** que se comunica con el vacío **421** de la parte de conexión **424** puede formarse a través de su centro. En algunas modalidades, la parte alargada **430** puede estrecharse en diámetro a lo largo de su longitud para reducir la cantidad de muestra que permanece en el extremo de la parte alargada **430** cuando la punta de pipeta **400** se extrae del depósito de muestra.

Con referencia ahora a las **Figuras 8 & 9**, la **Figura 8** es una vista en perspectiva de una modalidad de una punta de pipeta proporcionada en la presente descripción, el exterior de la que es similar a la punta de pipeta mostrada en la **Figura 5**; la **Figura 9** es una vista en sección transversal de la punta de pipeta mostrada en la **Figura 8**. La punta de pipeta **600** para el dispositivo de electroporación de acuerdo con otra modalidad de la presente invención incluye: una parte de combinación **610** con un vacío **611** en el que puede insertarse un extremo de una pipeta **300** (como se muestra en la **Figura 12**) para comunicarse con el vacío **611**; una parte alargada **630** que tiene un vacío **631** en el que puede extraerse la muestra; y una parte de conexión **620** proporcionada entre dicha parte de combinación **610** y dicha parte alargada **630**, que tiene un vacío **621** dentro de manera que el vacío **631** de dicha parte de combinación **630** puede comunicarse con el vacío **611** de dicha parte alargada **610**. La parte del conector puede tener un diámetro más pequeño que la parte de combinación **610**. La parte de conexión **620** incluye un conductor **622** para aplicar un campo eléctrico a la muestra en el vacío de la punta de pipeta **600**.

La parte de combinación **610** tiene dos extremos con aberturas ubicadas en cada extremo y un vacío **611** en el centro. El vacío **611** se ubica en el centro de la parte de combinación **610**. El vacío **411** está en comunicación fluida con los vacíos **421**, **431** de la parte de conexión **420**, y la parte alargada **430**, respectivamente, en el que puede extraerse la muestra. En algunas modalidades, la muestra puede extraerse además en el vacío **611** de la parte de conexión **610**. La superficie circunferencial exterior superior de la parte de combinación **610** tiene una longitud predeterminada para conectar o desconectar fácilmente la punta de pipeta **600** del extremo de la pipeta **300**, y puede incluir además las proyecciones **612** que se extienden radialmente desde la parte de combinación **610**.

Con referencia a la **Figura 9**, en algunas modalidades, la punta de pipeta **600** tiene un orificio de conexión **613** que se comunica con el vacío **611** formado en una superficie más baja de la parte de combinación **610**, y una ranura en forma de anillo **614** que se extiende radialmente desde el orificio de conexión **613** y se rebaja en el lado del orificio de conexión **613** para adaptar un extremo superior de la parte de conexión **620**. En el extremo superior se forma una proyección de conexión **623** que tiene la forma correspondiente al orificio de conexión **613** de la parte de combinación **610** para adaptarse, y se forma una proyección de fijación **624** que tiene la forma correspondiente a la ranura de conexión **614** en el lado de la proyección de conexión **623** para insertarse en la ranura de conexión **614**, lo que conecta de esta manera la parte de combinación **610** y la parte de conexión **620**. Además, una proyección de conexión **623'** que tiene la forma correspondiente al orificio de conexión **613'** de la parte alargada **630** para ajustarse en la misma se forma en el extremo más bajo, y una proyección de fijación **624'** que tiene la forma correspondiente a la ranura de conexión **614'** se forma en el lado de la proyección de conexión **623'** para insertarse en la ranura de conexión **614'**, lo que conecta de esta manera la parte de combinación **610** y la parte alargada **630**.

Un vacío **621** en el que puede extraerse una muestra puede formarse a través del centro de la parte de conexión **620**. La parte de conexión **620** incluye un conductor **622** que puede hacerse de un material seleccionado de un material conductor tal como, sólo para propósitos de ejemplo, níquel, oro, plata, cobre, latón, aluminio, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor. El conductor **622** puede ubicarse al menos parcialmente sobre o dentro de la superficie de la parte de conexión **620**. Tener el conductor **622** ubicado al menos parcialmente sobre o dentro de la superficie de la parte de conexión **620** elimina la necesidad de una estructura conductora eléctrica o un electrodo dentro del vacío. Por lo tanto el vacío sólo se llena con la muestra. El conductor **622** puede por lo tanto aplicar un campo eléctrico a la muestra ubicada dentro ya sea del vacío **621** de la parte de conexión **620** o el vacío **631** de la parte alargada **630**, o ambos vacíos **621** y **631**. La superficie del conductor puede chaparse con un material conductor tal como, sólo para propósitos de ejemplo, níquel, oro, plata, cobre, latón, aluminio, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor adecuado. En algunas modalidades, el conductor **622** puede moldearse por inyección con plástico, la superficie del que puede entonces revestirse o chaparse con un material conductor tal como, por ejemplo, latón, aluminio, cobre, níquel, oro, plata, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor adecuado. En algunas modalidades, el conductor **622** puede moldearse por inyección con un polímero conductor.

Como se describió anteriormente, la forma de la superficie superior de la parte alargada **630** puede corresponder a la forma de la superficie de la parte de combinación **610** para facilitar la conexión de la parte de combinación **610**, la parte de conexión **620**, y la parte alargada **630**. Un vacío **631** que se comunica con la parte de combinación **621** de la parte de conexión **620** se forma a través de su centro y se extiende en una dirección longitudinal. En algunas modalidades, la parte alargada **630** puede estrecharse a lo largo de su longitud. En algunas modalidades, el extremo de la parte alargada **630** se estrecha en diámetro desde el extremo superior o proximal al extremo distal para reducir la cantidad de muestra en el extremo de la parte alargada **630** cuando la parte alargada **630** se extrae del depósito de muestra.

Por las estructuras anteriores, en caso de la extracción de la muestra mediante el uso de la punta de pipeta para la electroporación de acuerdo con una modalidad de la presente invención, la construcción del dispositivo de electroporación puede hacerse más simple al hacer la electroporación posible mediante el uso de la punta de pipeta en ella misma para

aplicar la electricidad a la muestra sin tener un émbolo adicional, de esta manera la presente invención puede reducir el costo unitario de fabricación. Adicionalmente, la presente invención puede realizar fácilmente la electroporación al reducir la tasa de error y reducir la cantidad de pruebas y errores con una estructura simple de aplicar el electrodo a la muestra. Además, ya que las puntas de pipeta actuales para su uso en un dispositivo de electroporación pueden tener una estructura separada que sirve como el electrodo, tal como el émbolo descrito en la técnica anterior, la estructura separada puede interferir con el uso de la presión de aire para extraer o expulsar la muestra de la punta de pipeta. Ya que la punta de pipeta para la electroporación de acuerdo con una modalidad de la presente invención no tiene un electrodo separado, la punta de pipeta puede extraer o expulsar fácilmente una muestra mediante el uso de la presión de aire para crear un vacío o expulsar la muestra.

La **Figura 10** es una vista en perspectiva que ilustra una modalidad de una punta de pipeta proporcionada en la presente descripción, y la **Figura 11** es una figura en sección transversal de la **Figura 10**. Con referencia ahora a las **Figuras 10-11**, la punta de pipeta **700** para la electroporación incluye: una parte de combinación **710** con un vacío **711** en el que se inserta un extremo de una pipeta **300** para comunicarse con el vacío **711**; y una parte alargada **730** que tiene un vacío **731** que se comunica con el vacío **711** de la parte de combinación **710** en el que se extrae la muestra, y un conductor **732** que tiene un diámetro relativamente más pequeño que la parte de combinación **710**, que se fija al extremo de la parte de combinación **710**, y que consiste en un material conductor en su lado. En algunas modalidades, el material conductor puede estar en el lado interno del conductor.

La parte de combinación tiene un extremo proximal y un extremo distal, y tanto los extremos proximal como distal de la parte de combinación **710** tienen aberturas. La parte de combinación tiene además un vacío **711** formado a través de su centro en el que puede extraerse la muestra. Adicionalmente, una superficie circunferencial exterior superior de la parte de combinación **710** tiene una longitud predeterminada para conectar o desconectar fácilmente la punta de pipeta **700** del extremo de la pipeta **300**. En algunas modalidades, la circunferencia exterior superior de la parte de combinación **710** puede incluir además las proyecciones **712** formadas que se extienden radialmente desde la parte de combinación **710**.

Una proyección de conexión **713** que tiene una altura predeterminada se ubica en el extremo distal de la parte de combinación **710**. La proyección de conexión **713** puede insertarse en una proyección de fijación **714** ubicada en el extremo proximal de la parte alargada **730**. Cuando se unen juntas, la proyección de conexión **713** y la proyección de fijación **714** fijan la parte de combinación **710** y la parte alargada **730** en el lado de la proyección de conexión **730**. Una ranura de conexión **732** que tiene una forma correspondiente a la proyección de conexión **713** puede formarse en el extremo proximal de la parte alargada **730** en el que se inserta la proyección de conexión **713**. En algunas modalidades, una ranura de fijación **733**, en donde se inserta y se combina la proyección de fijación **714** se forma en el lado interior de la ranura de conexión **732**. En algunas modalidades, el extremo de la parte alargada **730** se estrecha a lo largo de su longitud. En algunas modalidades, la parte alargada **730** se estrecha en diámetro desde el extremo superior o proximal al extremo distal para reducir la cantidad de muestra que permanece en el extremo de la parte alargada **730** después que la parte alargada **730** se ha extraído del depósito de muestra. El conductor **734** puede ubicarse al menos parcialmente sobre o dentro de la proyección de conexión **713**. Tener el conductor ubicado al menos parcialmente sobre o dentro de la superficie exterior de la punta de pipeta elimina la necesidad de una estructura conductora eléctrica o un electrodo dentro del vacío. Por lo tanto, el vacío sólo se llena con la muestra. El conector se ubica al menos parcialmente sobre o dentro de la parte de combinación **710**. En algunas modalidades, el conductor **734** puede consistir en materiales conductores tales como cobre, latón, aluminio, níquel, oro, plata, cualquier combinación de los mismos o cualquier otro material conductor adecuado, y la superficie del mismo puede chaparse con cualesquiera materiales conductores tales como, por ejemplo, cobre, latón, aluminio, níquel, oro, plata, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otro material conductor adecuado. En algunas modalidades, el conductor puede moldearse por inyección con plástico, o con un polímero conductor.

Con referencia ahora a la **Figura 12**, la **Figura 12** muestra un sistema de electroporación que incluye un dispositivo de electroporación que comprende una pipeta sobre la que puede montarse una punta de pipeta para la electroporación. Adicionalmente, proporcionado en la presente descripción está un método de uso del dispositivo y el sistema. El sistema de electroporación incluye un generador de impulsos **100** para generar un impulso eléctrico; un depósito de muestra **200**; una pipeta **300** capaz de extraer la muestra del depósito de muestra y que es capaz de mantener la muestra extraída; una punta de pipeta **400** conectada eléctricamente con el generador de impulsos **100** del que un extremo se conecta a la porción extrema de la pipeta **300**, y del que el otro extremo se inserta en el depósito de muestra **200** y en el que la muestra se extrae por la pipeta **300**; y un electrodo adicional **500** conectado eléctricamente con el generador de impulsos **100** y sumergido en el depósito **200**. Después que la muestra se extrae en la punta de pipeta **400** mediante el uso de la pipeta **300** como unos medios para mantener la presión, una célula o células, si están presentes, en la muestra extraída en la punta de pipeta **400** pueden entonces electroporarse al aplicar un impulso eléctrico a los conductores **422** del electrodo **500** y la punta de pipeta **400** mediante el uso del generador de impulsos **100**. En algunas modalidades, el depósito de muestra **200** puede contener un electrolito para conducir la corriente, en adición a la muestra. En algunas modalidades, el depósito de muestra **200** puede reemplazarse con un depósito de electrolitos que contiene un electrolito para conducir la corriente después que la muestra se ha extraído en la punta de pipeta **400**. La punta de pipeta **400** y el electrodo adicional **500** pueden entonces colocarse en el depósito de electrolitos. Los impulsos de corriente entonces pueden aplicarse a la membrana celular mediante el uso del electrodo y la punta de pipeta al pasar la corriente entre el electrodo y el conductor ubicado en la punta de pipeta. Los impulsos de corriente pueden entonces cambiar la configuración de la bicapa lipídica de la membrana celular para permitir que los materiales ubicados en la muestra que son típicamente

- 5 incapaces de pasar a través de la membrana celular pasen a través de la membrana celular. Los impulsos aplicados son de suficiente resistencia y duración para crear traspasos temporales para los materiales impermeables, que pueden entonces resellarse sin dañar o destruir la célula. Los ejemplos de los materiales que pueden entonces pasarse a través de la membrana celular incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas, sondas moleculares, medicamentos, terapéuticos, ADN, ARN, bacterias, genes, material proteico, células, o cualquier otro material adecuado. La pipeta puede usar el vacío y la expulsión para extraer y expulsar una muestra al mover el émbolo en el extremo distal de la pipeta como se indica por las flechas en la **Figura 12**.
- 10 Aunque las modalidades preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en la presente descripción, será obvio para los expertos en la técnica que tales modalidades se proporcionan sólo a modo de ejemplo. El alcance de la protección se determina por las reivindicaciones. Numerosas variaciones, cambios, y sustituciones se les ocurrirán ahora a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente descripción en la práctica de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una punta de pipeta (400, 600, 700) para su uso en llevar a cabo la electroporación que comprende:
 5 una parte de combinación que tiene un cuerpo (410, 610, 710), un extremo proximal, un extremo distal, y un vacío de la parte de combinación (411, 611, 711);
 una parte de conexión (420, 620) que tiene un extremo proximal, un extremo distal y un vacío de la parte de conexión (421, 621), y ubicado al menos parcialmente sobre o dentro del extremo distal del cuerpo;
 una parte alargada (430, 630, 730) que tiene un vacío de la parte alargada (431, 631, 731) y ubicado en el extremo distal de la parte de conexión, en donde el vacío de la parte de combinación, el vacío de la parte de conexión, y el
 10 vacío de la parte alargada está en comunicación fluida entre sí, la punta de pipeta que tiene una superficie exterior y un vacío ubicado dentro de la superficie exterior que comprende el vacío de la parte de combinación, el vacío de la parte de conexión y el vacío de la parte alargada; y
 que comprende además un conductor (422, 622, 734) ubicado al menos parcialmente sobre o dentro de la
 15 superficie exterior, en donde el conductor está en comunicación eléctrica con al menos una porción de la superficie exterior y el vacío, el conductor que tiene una superficie interior capaz de aplicar una corriente eléctrica al vacío de la parte de conexión, mediante lo que el conductor puede proporcionar un solo electrodo del par de electrodos requerido para realizar la electroporación y la punta de pipeta no contiene otra estructura de electrodo, y la muestra extraída tanto en el vacío de la parte de conexión como en el vacío de la parte alargada puede someterse a un campo eléctrico cuando la punta de pipeta se combina con otro electrodo en un sistema de electroporación.
2. Una punta de pipeta como se reivindica en la reivindicación 1 en donde el conductor (422, 734) rodea además al menos un poste de conexión (423, 713) parcialmente o totalmente, el al menos un poste de conexión que se ubica en la parte de conexión.
- 25 3. La punta de pipeta de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el conductor es en forma de anillo.
4. La punta de pipeta de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el conductor tiene un cuerpo moldeado por inyección que incluye al menos uno de plástico y o de polímero conductor, en donde si el cuerpo del conductor es plástico, la superficie se chapa con un material conductor.
- 30 5. La punta de pipeta de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el conductor incluye un cuerpo y una superficie y la superficie se chapa con al menos uno de latón, cobre, aluminio, níquel, oro o plata.
6. La punta de pipeta de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el conductor incluye un cuerpo y una superficie y el cuerpo incluye un material conductor, preferentemente al menos uno de cobre, latón, níquel, oro, plata, o aluminio.
- 35 7. La punta de pipeta de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde la superficie interior del conductor capaz de aplicar una corriente eléctrica al vacío de la parte de conexión se chapa con un material conductor seleccionado de al menos uno de latón, aluminio, cobre, níquel, oro o plata.
- 40 8. La punta de pipeta de la reivindicación 2, que comprende tres postes de conexión, ubicados preferentemente a 120 grados uno con respecto a los otros y con respecto a la superficie exterior.
- 45 9. Una punta de pipeta como se reivindica en la reivindicación 2 en donde la parte de conexión (420) comprende una pluralidad de postes de conexión (423) fijados en un extremo de la parte de combinación (410), un conector en forma de embudo (424) fijado en los extremos de los postes de conexión, y el conductor (422), en donde el conductor rodea los postes de conexión parcialmente o totalmente.
- 50 10. La punta de pipeta de la reivindicación 1 en donde la parte de conexión incluye (i) el conductor (622), (ii) una proyección de conexión (623) en el extremo superior que se adapta en un orificio de conexión (613) en la superficie más baja de la parte de combinación, dicha proyección de conexión que tiene una proyección de fijación (624) que se inserta en una ranura en forma de anillo (614) que se extiende radialmente desde el orificio de conexión y (iii) una proyección de conexión (623') en el extremo más bajo que se adapta en un orificio de conexión (613') de la parte alargada, la proyección de conexión que tiene una proyección de fijación (624') que se inserta en una ranura de conexión (614') mediante la que la parte de combinación se conecta a tanto la parte de conexión como la parte
 55 alargada.
11. La punta de pipeta de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la parte alargada se estrecha a lo largo de su longitud.
- 60 12. Un sistema de electroporación que comprende
 - a. un generador de impulsos (100);
 - b. una pipeta (300) que tiene una punta de pipeta como se reivindica en la reivindicación 1 en comunicación eléctrica con el generador de impulsos, y
 - 65 c. un electrodo (500) en comunicación con el generador de impulsos.

13. El sistema de electroporación de acuerdo con la reivindicación 12 en donde la punta de pipeta está en comunicación eléctrica con el electrodo.

[Técnica anterior]

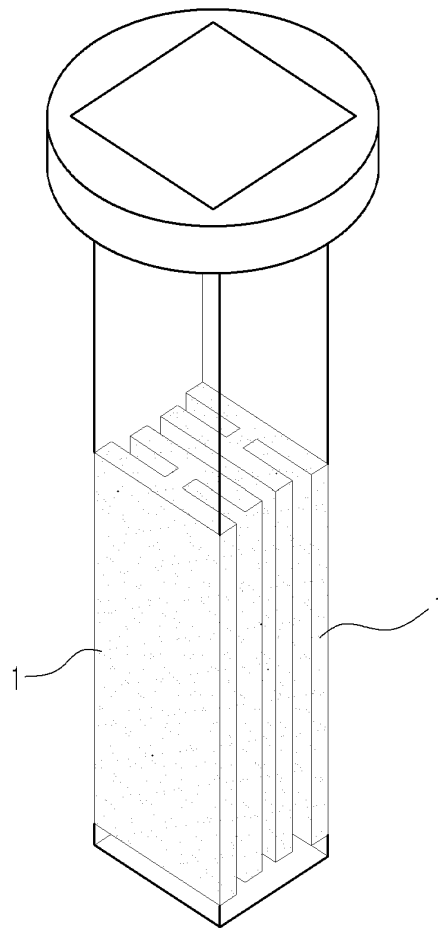


Figura 1

[Técnica anterior]

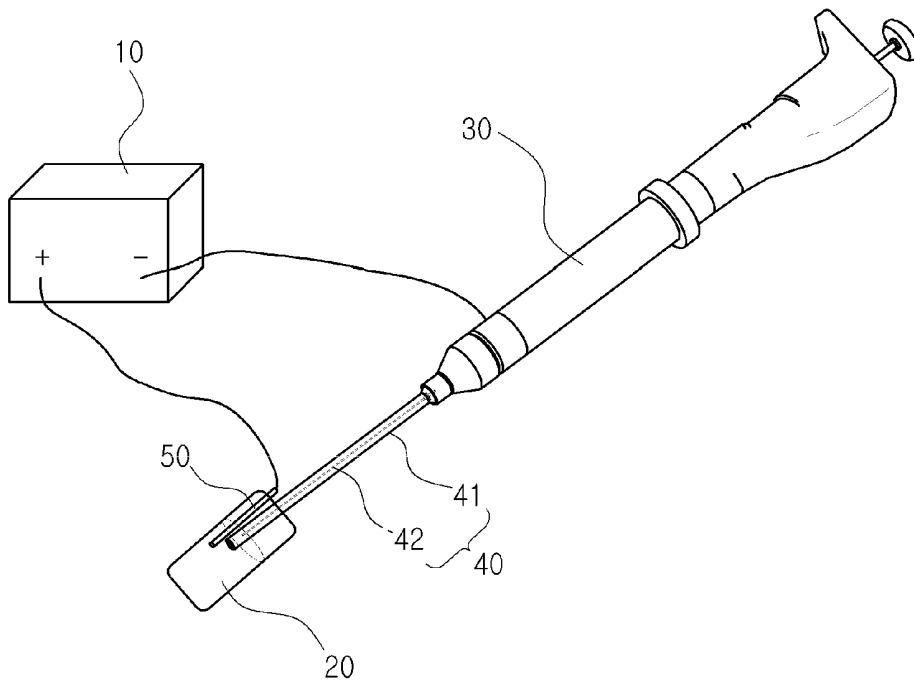


Figura 2

[Técnica anterior]

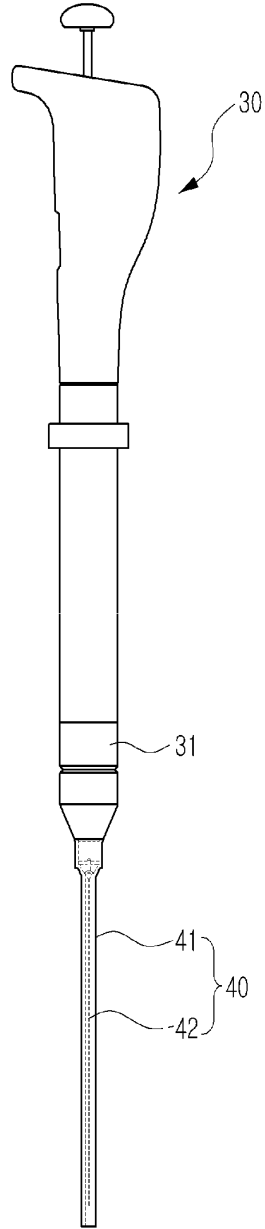


Figura 3

[Técnica anterior]

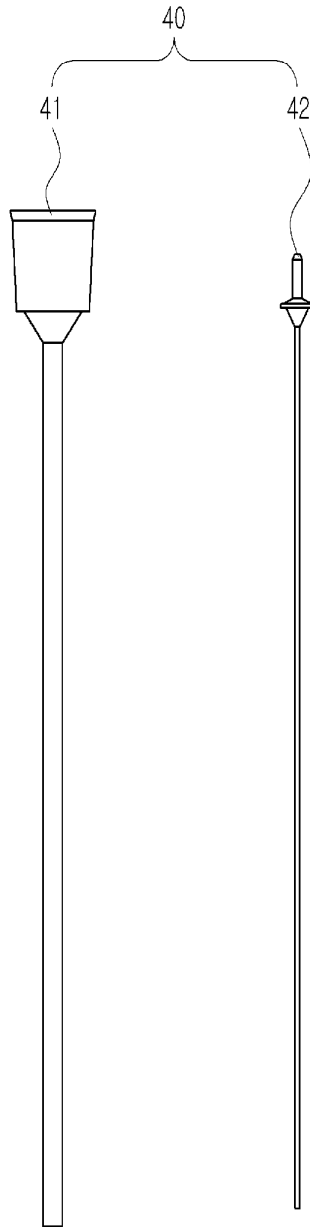


Figura 4

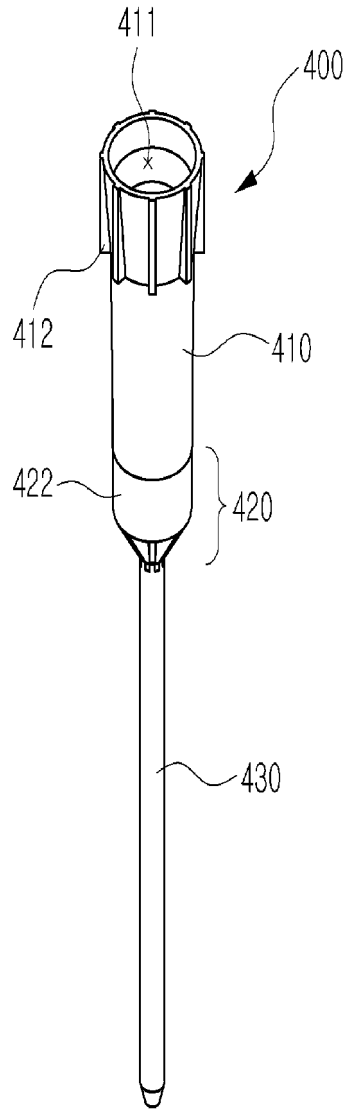


Figura 5

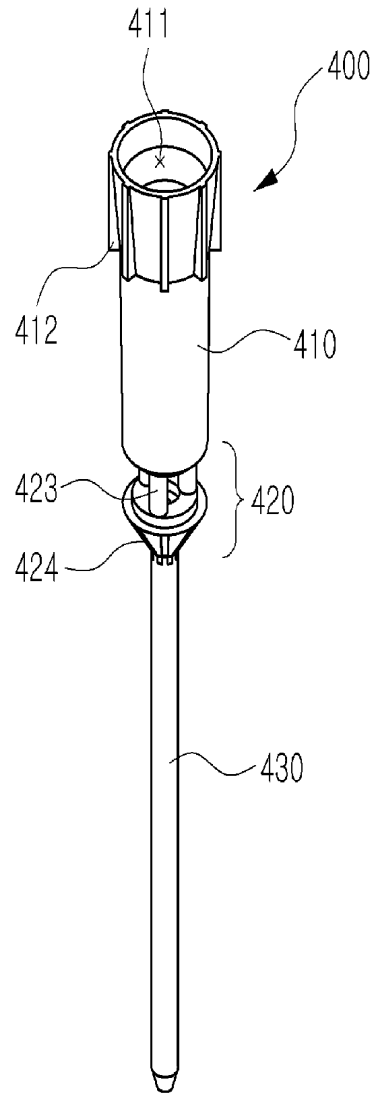


Figura 6

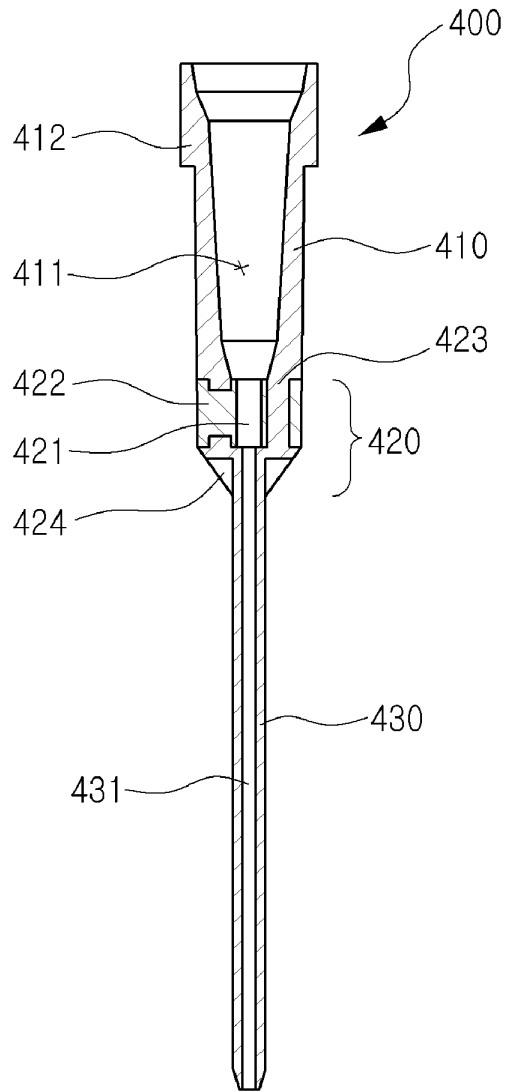


Figura 7

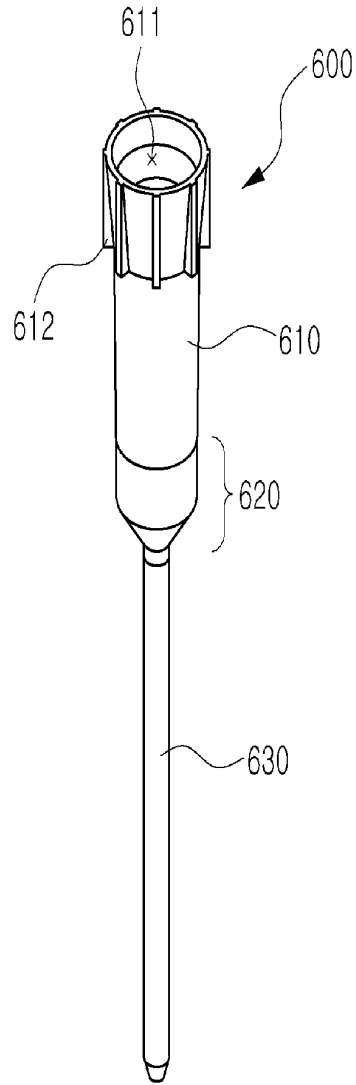


Figura 8

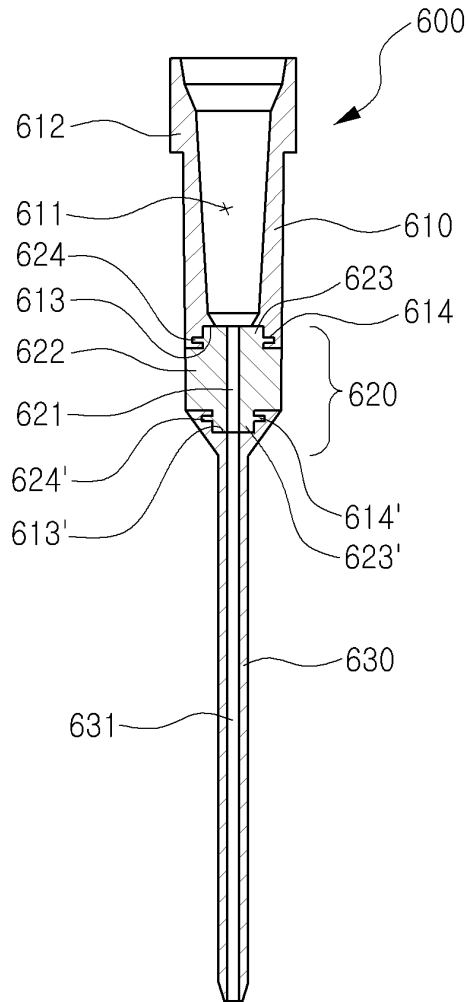


Figura 9

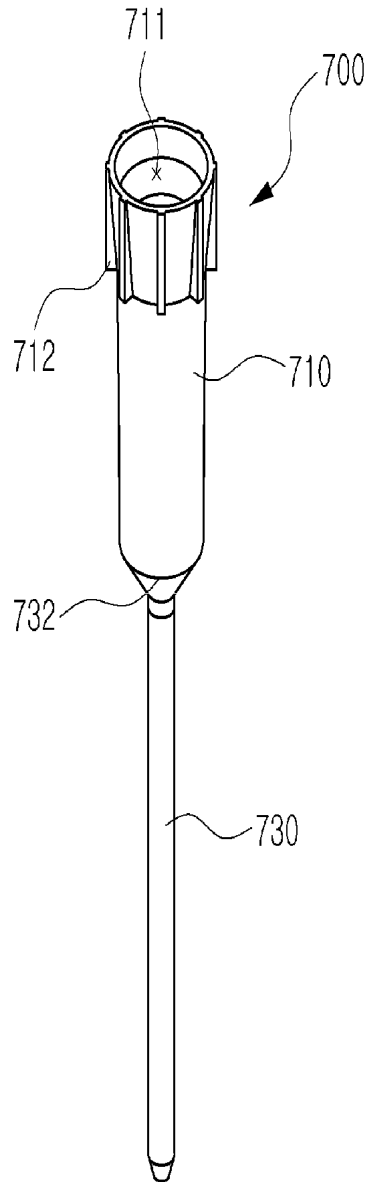


Figura 10

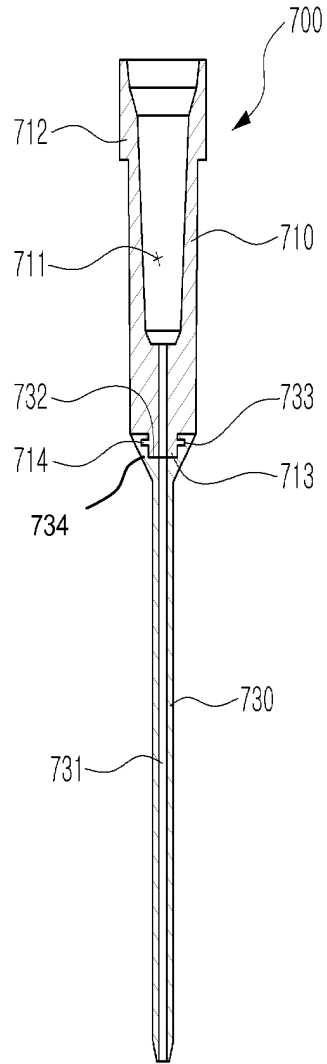


Figura 11

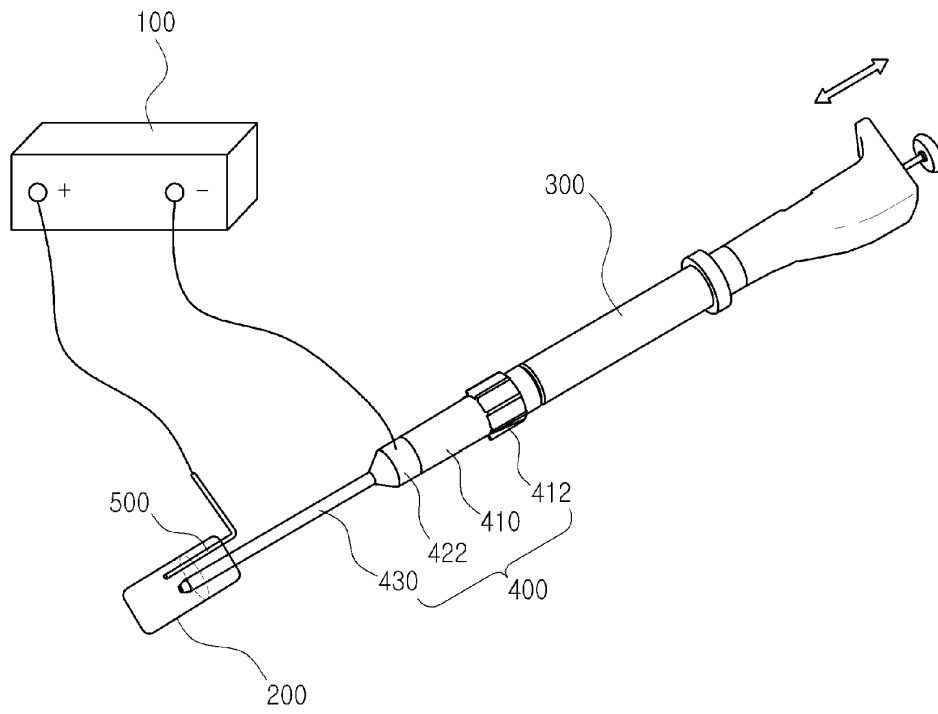


Figura 12