

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 017**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2016 PCT/US2016/050287**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17041050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2016 E 16766432 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2022 EP 3344747**

54 Título: **Suministro intracelular de biomoléculas mediado por una superficie con poros**

30 Prioridad:

04.09.2015 US 201562214820 P
03.05.2016 US 201662331363 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2022

73 Titular/es:

SQZ BIOTECHNOLOGIES COMPANY (100.0%)
200 Arsenal Yards Boulevard, Suite 215
Watertown, MA 02472, US

72 Inventor/es:

GILBERT, JONATHAN B.;
FREW, KIRUBEL;
BERNSTEIN, HOWARD y
SHAREI, ARMON R.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 930 017 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

Suministro intracelular de biomoléculas mediado por una superficie con poros

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad a la solicitud provisional de los Estados Unidos Núm. 62/214,820, presentada el 4 de septiembre de 2015 y la solicitud provisional de los Estados Unidos Núm. 62/331,363, presentada el 3 de mayo de 2016.

10 Campo de la invención

La presente descripción se refiere generalmente a métodos para suministrar un compuesto a una célula al pasar una suspensión de células a través de una superficie que contiene poros.

15 Antecedentes

El suministro intracelular es una etapa central en la investigación y el desarrollo de nuevos productos terapéuticos. Las tecnologías existentes destinadas al suministro intracelular de moléculas dependen de campos eléctricos, nanopartículas, o sustancias químicas que forman poros. Sin embargo, estos métodos sufren de numerosas complicaciones, que incluyen el suministro de moléculas no específicas, modificación o daño a las moléculas de carga útil, alta muerte celular, el uso de materiales que pueden no considerarse generalmente materiales seguros (GRAS), bajo rendimiento, e/o implementación difícil. En adición, estos métodos de suministro intracelular no son efectivos para suministrar moléculas a tipos de células sensibles, tales como células inmunitarias primarias y células madre. Por lo tanto, existe una necesidad no cubierta de técnicas de suministro intracelular que sean altamente efectivas para suministrar una gama de moléculas a una diversidad de tipos celulares. En adición, las técnicas que permiten un suministro intracelular rápido y de alto rendimiento pueden aplicarse de manera más efectiva a aplicaciones de cribado de fármacos, fabricación, y clínicas a gran escala. Las referencias que describen los métodos de uso de canales para suministrar compuestos a las células incluyen SHAREI y otros: "A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 110, núm. 6, 2013, páginas 2082-2087, SHAREI y otros: "Plasma membrane recovery kinetics of a microfluidic intracellular delivery platform", INTEGRATIVE BIOLOGY, vol. 6, núm. 4, 2014, páginas 470-475, documentos WO2013059343 y WO2015023982.

35 Breve resumen de la invención

Ciertos aspectos de la presente descripción incluyen un método para suministrar un compuesto a una célula, el método comprende pasar una suspensión celular a través de una superficie que contiene poros, en donde dichos poros deforman la célula y provocan de esta manera una perturbación de la célula de manera que el compuesto entra en la célula, en donde dicha suspensión celular se pone en contacto con el compuesto. En algunas modalidades, la superficie es una membrana. En algunas modalidades, la superficie es un filtro. En algunas modalidades, la superficie es un microtamiz. En algunas modalidades, la superficie es una superficie de trayectoria tortuosa. En algunas modalidades, la superficie comprende un material seleccionado de uno de policarbonato, polímero, silicio, vidrio, metal, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, nailon, poliéster, polietersulfona, politetrafluoretileno, y cerámica. En algunas modalidades, la entrada al poro es más ancha que el poro, más estrecha que el poro, o del mismo ancho que el poro. En algunas modalidades, la superficie se fabrica mediante el uso de un método seleccionado de uno de grabado, grabado en pista, litografía, ablación con láser, estampado, perforación de microagujeros, esponja polimérica, espumado directo, extrusión, y grabado en caliente.

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, el tamaño de los poros es una función del diámetro celular. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 99 % del diámetro celular. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de la superficie está en el intervalo de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 1 m. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros está en el intervalo de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 300 μm . En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 35 μm . En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente 0,4 μm , aproximadamente 4 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 8 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 12 μm , o aproximadamente 14 μm . En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente 200 μm . En algunas modalidades, los poros son heterogéneos en tamaño. En algunas modalidades, los tamaños de los poros heterogéneos varían de 10-20 %. En algunas modalidades, los poros son homogéneos en tamaño.

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, los poros tienen ángulos de entrada y salida idénticos. En algunas modalidades, los poros tienen diferentes ángulos de entrada y salida. En algunas modalidades, la forma de sección transversal de los poros se selecciona de una de circular, redonda,

cuadrada, estrella, triángulo, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal, y octagonal. En algunas modalidades, la forma en sección transversal en la entrada al poro es diferente de la forma en sección transversal en la salida del poro (por ejemplo, circular en la entrada y cuadrada en la salida). En algunas modalidades, la forma en sección transversal de los poros se selecciona de cilíndrica o cónica. En algunas modalidades, el borde de los poros es liso.

5 En algunas modalidades, el borde de los poros es afilado. En algunas modalidades, el pasaje de los poros es recto. En algunas modalidades, el pasaje de los poros es curvo. En algunas modalidades, los poros comprenden aproximadamente el 10-80 % del área superficial total. En algunas modalidades, la superficie comprende de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{30}$ poros en total. En algunas modalidades, la superficie comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$ poros por mm^2 de área superficial. En algunas

10 modalidades, los poros se distribuyen en paralelo. En algunas modalidades, las superficies con poros se apilan una encima de la otra. En algunas modalidades, múltiples superficies se distribuyen en serie. En algunas modalidades, la distribución de poros es ordenada. En algunas modalidades, la distribución de poros es aleatoria. En algunas modalidades, el grosor de la superficie es uniforme. En algunas modalidades, el grosor de la superficie es variable. En algunas modalidades, la superficie es de aproximadamente $0,01 \mu\text{m}$ a aproximadamente 5 m de grosor. En algunas modalidades, la superficie es de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ de grosor. En algunas modalidades, la superficie tiene un grosor de $<1 \mu\text{m}$.

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, la superficie se recubre con un material. En algunas modalidades, el material es teflón. En algunas modalidades, el material comprende un recubrimiento adhesivo que se une a las células. En algunas modalidades, el material comprende un surfactante. En algunas modalidades, el material comprende un anticoagulante. En algunas modalidades, el material comprende una proteína. En algunas modalidades, el material comprende moléculas de adhesión. En algunas modalidades, el material comprende anticuerpos. En algunas modalidades, el material comprende factores que modulan la función celular. En algunas modalidades, el material comprende ácidos nucleicos. En algunas modalidades, el material comprende lípidos. En algunas modalidades, el material comprende carbohidratos. En algunas modalidades, el material comprende un complejo. En algunas modalidades, el complejo es un complejo lípido-carbohidrato. En algunas modalidades, el material comprende proteínas de transmembrana. En algunas modalidades, el material se une covalentemente a la superficie. En algunas modalidades, el material se une no covalentemente a la superficie. En algunas modalidades, la superficie es hidrófila. En algunas modalidades, la superficie es hidrófoba. En algunas modalidades, la superficie es cargada.

20

25

30

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, la suspensión celular comprende células de mamíferos. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende una población celular mixta. En algunas modalidades, la suspensión celular es sangre completa. En algunas modalidades, la suspensión celular es linfa. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende células mononucleares de sangre periférica. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende una población celular purificada. En algunas modalidades, la célula es una célula inmunitaria, una célula de línea celular, una célula madre, una célula tumoral, un fibroblasto, una célula de la piel, una neurona, un eritrocito o una plaqueta. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es un linfocito, linfocito T, linfocito B, célula dendrítica, monocito, macrófago, eosinófilo, basófilo, célula NK, célula NKT, mastocito, o neutrófilo. En algunas modalidades, la célula es una célula de ratón, perro, gato, caballo, rata, cabra, o conejo. En algunas modalidades, la célula es una célula humana.

35

40

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, el compuesto comprende un ácido nucleico. En algunas modalidades, el compuesto comprende un ácido nucleico que codifica ADN, ADN recombinante, ADNc, ADN genómico, ARN, ARNip, ARNm, miARN, ARNinc, ARNt, ARNhc, o ARNm autoamplificante. En algunas modalidades, el compuesto es un ácido nucleico peptídico. En algunas modalidades, el compuesto comprende un transposón. En algunas modalidades, el compuesto es un plásmido. En algunas modalidades, el compuesto comprende un complejo ácido nucleico-proteína. En algunas modalidades, el compuesto comprende una proteína Cas9 y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto comprende ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto comprende una proteína o péptido. En algunas modalidades, el compuesto comprende una nucleasa, proteína TALEN, nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, recombinasa CRE, recombinasa FLP, recombinasa R, integrasa, o transposasa. En algunas modalidades, el compuesto es un anticuerpo. En algunas modalidades, el compuesto es un factor de transcripción. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula pequeña. En algunas modalidades, el compuesto es una nanopartícula. En algunas modalidades, el compuesto es un receptor de antígeno quimérico. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula etiquetada con fluorescencia. En algunas modalidades, el compuesto es un liposoma. En algunas modalidades, el compuesto es un virus.

45

50

55

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, dicha suspensión celular se pone en contacto con el compuesto antes, simultáneamente, o después de pasar a través del poro. En algunas modalidades, el compuesto que se suministra se recubre en la superficie. En algunas modalidades, el método se realiza entre $0 \text{ }^\circ\text{C}$ - $45 \text{ }^\circ\text{C}$. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión positiva o presión negativa. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión constante o presión variable. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de una jeringa. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de una bomba. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de un vacío. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión capilar. En

60

65

- algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión hidrostática. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión arterial. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante fuerza g. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión que está en el intervalo de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 500 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 2 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 2,5 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 3 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 5 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 10 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 20 psi. En algunas modalidades, el flujo de fluido dirige las células a través de los poros. En algunas modalidades, el flujo de fluido es un flujo turbulento antes de que las células pasen a través del poro. En algunas modalidades, el flujo de fluido a través del poro es un flujo laminar. En algunas modalidades, el flujo de fluido es un flujo turbulento después de que las células pasan a través del poro. En algunas modalidades, las células pasan a través de los poros a una velocidad celular uniforme. En algunas modalidades, las células pasan a través de los poros a una velocidad celular fluctuante. En algunas modalidades, las células pasan a través de los poros a una velocidad que está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 20 m/s. En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de un módulo más grande. En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de una jeringa.
- En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, la suspensión celular comprende una solución acuosa. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende medio de cultivo celular, PBS, sales, azúcares, factores de crecimiento, productos derivados de animales, materiales de relleno, surfactantes, lubricantes, vitaminas, proteínas, quelantes, y/o un agente que afecta a la polimerización de la actina. En algunas modalidades, el agente que afecta a la polimerización de la actina es Latrunculina A, citocalasina, y/o Colchicina. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular es DMEM, OptiMEM, IMDM, RPMI, o X-VIVO. En algunas modalidades, la viscosidad de la suspensión celular está en el intervalo de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa.s a aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}$ Pa.s. En algunas modalidades, el método comprende, además, la etapa de pasar la célula a través de un campo eléctrico generado por al menos un electrodo cerca de la superficie.
- Determinados aspectos de la presente descripción incluyen un dispositivo para suministrar un compuesto a una célula, que comprende una superficie que contiene poros, en donde dichos poros se configuran de manera que una célula suspendida en una solución puede pasar a través, en donde dichos poros deforman la célula y provocan de esta manera una perturbación de la célula de manera que el compuesto entra en la célula. En algunas modalidades, la superficie es una membrana. En algunas modalidades, la superficie es un filtro. En algunas modalidades, la superficie es una superficie de trayectoria tortuosa. En algunas modalidades, la superficie comprende un material seleccionado de uno de policarbonato, polímero, silicio, vidrio, metal, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, nailon, poliéster, polietersulfona, politetrafluoretileno, y cerámica. En algunas modalidades, la entrada al poro es más ancha que el poro, más estrecha que el poro, o del mismo ancho que el poro. En algunas modalidades, la superficie se fabrica mediante el uso de un método seleccionado de uno de grabado, grabado en pista, litografía, ablación con láser, estampado, perforación de microagujeros, esponja polimérica, espumado directo, extrusión, y grabado en caliente.
- En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, el tamaño de los poros es una función del diámetro celular. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 99 % del diámetro celular. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de la superficie está en el intervalo de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 1 m. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal del poro está en el intervalo de aproximadamente $0,01 \mu\text{m}$ -aproximadamente $300 \mu\text{m}$. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros está en el intervalo de aproximadamente $0,01$ a aproximadamente $35 \mu\text{m}$. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente $0,4 \mu\text{m}$, aproximadamente $4 \mu\text{m}$, aproximadamente $5 \mu\text{m}$, aproximadamente $8 \mu\text{m}$, aproximadamente $10 \mu\text{m}$, aproximadamente $12 \mu\text{m}$, o aproximadamente $14 \mu\text{m}$. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente $200 \mu\text{m}$. En algunas modalidades, los poros son heterogéneos en tamaño. En algunas modalidades, los tamaños de los poros heterogéneos varían de 10-20 %. En algunas modalidades, los poros son homogéneos en tamaño.
- En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, los poros tienen ángulos de entrada y salida idénticos. En algunas modalidades, los poros tienen diferentes ángulos de entrada y salida. En algunas modalidades, la forma de sección transversal de los poros se selecciona de una de circular, redonda, cuadrada, estrella, triángulo, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal, y octagonal. En algunas modalidades, la forma en sección transversal de los poros se selecciona de cilíndrica o cónica. En algunas modalidades, el borde de los poros es liso. En algunas modalidades, el borde de los poros es afilado. En algunas modalidades, el pasaje de los poros es recto. En algunas modalidades, el pasaje de los poros es curvo. En algunas modalidades, los poros comprenden aproximadamente el 10-80 % del área superficial total. En algunas modalidades, la superficie comprende de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{30}$ poros en total. En algunas modalidades, la superficie comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$ poros por mm^2 de área superficial. En

5 algunas modalidades, los poros se distribuyen en paralelo. En algunas modalidades, las superficies con poros se apilan una encima de la otra. En algunas modalidades, múltiples superficies se distribuyen en serie. En algunas modalidades, la distribución de poros es ordenada. En algunas modalidades, la distribución de poros es aleatoria. En algunas modalidades, el grosor de la superficie es uniforme. En algunas modalidades, el grosor de la superficie es variable. En algunas modalidades, la superficie es de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 5 m de grosor. En algunas modalidades, la superficie es de aproximadamente 10 μm de grosor.

10 En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, la superficie se recubre con un material. En algunas modalidades, el material es teflón. En algunas modalidades, el material comprende un recubrimiento adhesivo que se une a las células. En algunas modalidades, el material comprende un surfactante. En algunas modalidades, el material comprende un anticoagulante. En algunas modalidades, el material comprende una proteína. En algunas modalidades, el material comprende moléculas de adhesión. En algunas modalidades, el material comprende anticuerpos. En algunas modalidades, el material comprende factores que modulan la función celular. En algunas modalidades, el material comprende ácidos nucleicos. En algunas modalidades, el material comprende lípidos. En algunas modalidades, el material comprende carbohidratos. En algunas modalidades, el material comprende un complejo. En algunas modalidades, el complejo es un complejo lípido-carbohidrato. En algunas modalidades, el material comprende proteínas de membrana. En algunas modalidades, el material se une covalentemente a la superficie. En algunas modalidades, el material se une no covalentemente a la superficie. En algunas modalidades, la superficie es hidrófila. En algunas modalidades, la superficie es hidrófoba. En algunas modalidades, la superficie es cargada.

25 En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, la suspensión celular comprende células de mamíferos. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende una población celular mixta. En algunas modalidades, la suspensión celular es sangre completa. En algunas modalidades, la suspensión celular es linfa. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende células mononucleares de sangre periférica. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende una población celular purificada. En algunas modalidades, la célula es una célula inmunitaria, una célula de línea celular, una célula madre, una célula tumoral, un fibroblasto, una célula de la piel, una neurona, o un eritrocito. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es un linfocito, linfocito T, linfocito B, célula dendrítica, monocito, macrófago, eosinófilo, basófilo, célula NK, célula NKT, mastocito, o neutrófilo. En algunas modalidades, la célula es una célula de ratón, perro, gato, caballo, rata, cabra, o conejo. En algunas modalidades, la célula es una célula humana.

35 En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, el compuesto comprende un ácido nucleico. En algunas modalidades, el compuesto comprende un ácido nucleico que codifica ADN, ADN recombinante, ADNc, ADN genómico, ARN, ARNip, ARNm, miARN, ARNinc, ARNt, ARNh, o ARNm autoamplificante. En algunas modalidades, el compuesto es un ácido nucleico peptídico. En algunas modalidades, el compuesto comprende un transposón. En algunas modalidades, el compuesto es un plásmido. En algunas modalidades, el compuesto comprende un complejo ácido nucleico-proteína. En algunas modalidades, el compuesto comprende una proteína Cas9 y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto comprende ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto comprende una proteína o péptido. En algunas modalidades, el compuesto comprende una nucleasa, proteína TALEN, nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, recombinasa CRE, recombinasa FLP, recombinasa R, integrasa, o transposasa. En algunas modalidades, el compuesto es un anticuerpo. En algunas modalidades, el compuesto es un factor de transcripción. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula pequeña. En algunas modalidades, el compuesto es una nanopartícula. En algunas modalidades, el compuesto es un receptor de antígeno quimérico. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula etiquetada con fluorescencia. En algunas modalidades, el compuesto es un liposoma. En algunas modalidades, el compuesto es un virus.

50 En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, dicha suspensión celular se pone en contacto con el compuesto antes, simultáneamente, o después de pasar a través del poro. En algunas modalidades, el compuesto que se suministra se recubre en la superficie. En algunas modalidades, el dispositivo está entre 0 °C-45 °C. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión positiva o presión negativa. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión constante o presión variable. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de una jeringa. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de una bomba. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de un vacío. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión capilar. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión arterial. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante fuerza g. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión que está en el intervalo de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 500 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 2 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 2,5 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 3 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 5 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 10 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 20 psi. En algunas modalidades, el flujo de fluido dirige las células a través de los poros. En algunas modalidades, el flujo de

5 fluido es un flujo turbulento antes de que las células pasen a través del poro. En algunas modalidades, el flujo de fluido a través del poro es un flujo laminar. En algunas modalidades, el flujo de fluido es un flujo turbulento después de que las células pasan a través del poro. En algunas modalidades, las células pasan a través de los poros a una velocidad celular uniforme. En algunas modalidades, las células pasan a través de los poros a una velocidad celular fluctuante. En algunas modalidades, las células pasan a través de los poros a una velocidad que está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 20 m/s. En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de un módulo más grande. En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de una jeringa.

10 En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, la suspensión celular comprende una solución acuosa. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende medio de cultivo celular, PBS, sales, azúcares, factores de crecimiento, productos derivados de animales, materiales de relleno, surfactantes, lubricantes, vitaminas, proteínas, quelantes, y/o un agente que afecta a la polimerización de la actina. En algunas modalidades, el agente que afecta a la polimerización de la actina es Latrunculina A, citocalasina, y/o Colchicina. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular es DMEM, OptiMEM, IMDM, RPMI, o X-VIVO. En algunas modalidades, la viscosidad de la suspensión celular está en el intervalo de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa.s a aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}$ Pa.s. En algunas modalidades, el dispositivo comprende múltiples superficies. En algunas modalidades, la superficie es una Transwell. En algunas modalidades, al menos un electrodo está cerca de la superficie para generar un campo eléctrico.

20 Determinados aspectos de la presente descripción incluyen una célula que comprende una perturbación, en donde la célula se produce al pasar la célula a través de una superficie que contiene poros, en donde los poros deforman la célula y provocan de esta manera la perturbación de manera que un compuesto es capaz de entrar en la célula. En algunas modalidades, la superficie es una membrana. En algunas modalidades, la superficie es un filtro. En algunas modalidades, la superficie es una superficie de trayectoria tortuosa. En algunas modalidades, la superficie comprende un material seleccionado de uno de policarbonato, polímero, silicio, vidrio, metal, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, nailon, poliéster, polietersulfona, politetrafluoretileno, y cerámica. En algunas modalidades, la entrada al poro es más ancha que el poro, más estrecha que el poro, o del mismo ancho que el poro. En algunas modalidades, la superficie se fabrica mediante el uso de un método seleccionado de uno de grabado, grabado en pista, litografía, ablación con láser, estampado, perforación de microagujeros, esponja polimérica, espumado directo, extrusión, y grabado en caliente.

35 En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, el tamaño de los poros es una función del diámetro celular. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 99 % del diámetro celular. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de la superficie está en el intervalo de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 1 m. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros está en el intervalo de aproximadamente 0,01 μ m a aproximadamente 300 μ m. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 35 μ m. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente 0,4 μ m, aproximadamente 4 μ m, aproximadamente 5 μ m, aproximadamente 8 μ m, aproximadamente 10 μ m, aproximadamente 12 μ m, o aproximadamente 14 μ m. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente 200 μ m. En algunas modalidades, los poros son heterogéneos en tamaño. En algunas modalidades, los tamaños de los poros heterogéneos varían de 10-20 %. En algunas modalidades, los poros son homogéneos en tamaño.

45 En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, los poros tienen ángulos de entrada y salida idénticos. En algunas modalidades, los poros tienen diferentes ángulos de entrada y salida. En algunas modalidades, la forma de sección transversal de los poros se selecciona de una de circular, redonda, cuadrada, estrella, triángulo, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal, y octagonal. En algunas modalidades, la forma en sección transversal de los poros se selecciona de cilíndrica o cónica. En algunas modalidades, el borde de los poros es liso. En algunas modalidades, el borde de los poros es afilado. En algunas modalidades, el pasaje de los poros es recto. En algunas modalidades, el pasaje de los poros es curvo. En algunas modalidades, los poros comprenden aproximadamente el 10-80 % del área superficial total. En algunas modalidades, la superficie comprende de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{30}$ poros en total. En algunas modalidades, la superficie comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$ poros por mm^2 de área superficial. En algunas modalidades, los poros se distribuyen en paralelo. En algunas modalidades, las superficies con poros se apilan una encima de la otra. En algunas modalidades, múltiples superficies se distribuyen en serie. En algunas modalidades, la distribución de poros es ordenada. En algunas modalidades, la distribución de poros es aleatoria. En algunas modalidades, el grosor de la superficie es uniforme. En algunas modalidades, el grosor de la superficie es variable. En algunas modalidades, la superficie es de aproximadamente 0,01 μ m a aproximadamente 5 m de grosor. En algunas modalidades, la superficie es de aproximadamente 10 μ m de grosor.

65 En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, la superficie se recubre con un material. En algunas modalidades, el material es teflón. En algunas modalidades, el material comprende un recubrimiento adhesivo que se une a las células. En algunas modalidades, el material comprende un surfactante. En algunas modalidades, el material comprende un anticoagulante. En algunas modalidades, el material comprende

una proteína. En algunas modalidades, el material comprende moléculas de adhesión. En algunas modalidades, el material comprende anticuerpos. En algunas modalidades, el material comprende factores que modulan la función celular. En algunas modalidades, el material comprende ácidos nucleicos. En algunas modalidades, el material comprende lípidos. En algunas modalidades, el material comprende carbohidratos. En algunas modalidades, el material comprende un complejo. En algunas modalidades, el complejo es un complejo lípido-carbohidrato. En algunas modalidades, el material comprende proteínas de transmembrana. En algunas modalidades, el material se une covalentemente a la superficie. En algunas modalidades, el material se une no covalentemente a la superficie. En algunas modalidades, la superficie es hidrófila. En algunas modalidades, la superficie es hidrófoba. En algunas modalidades, la superficie es cargada.

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, la célula es una célula de mamífero. En algunas modalidades, la célula es una célula inmunitaria, una célula de línea celular, una célula madre, una célula tumoral, un fibroblasto, una célula de la piel, una neurona, o un eritrocito. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es un linfocito, linfocito T, linfocito B, célula dendrítica, monocito, macrófago, eosinófilo, basófilo, célula NK, célula NKT, mastocito, o neutrófilo. En algunas modalidades, la célula es una célula de ratón, perro, gato, caballo, rata, cabra, o conejo. En algunas modalidades, la célula es una célula humana.

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, el compuesto comprende un ácido nucleico. En algunas modalidades, el compuesto comprende un ácido nucleico que codifica ADN, ADN recombinante, ADNc, ADN genómico, ARN, ARNip, ARNm, miARN, ARNlnc, ARNt, ARNhc, o ARNm autoamplificante. En algunas modalidades, el compuesto es un ácido nucleico peptídico. En algunas modalidades, el compuesto comprende un transposón. En algunas modalidades, el compuesto es un plásmido. En algunas modalidades, el compuesto comprende un complejo ácido nucleico-proteína. En algunas modalidades, el compuesto comprende una proteína Cas y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto comprende un ácido nucleico que codifica una proteína Cas y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto comprende una proteína Cas9 y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto comprende un ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto comprende una proteína o péptido. En algunas modalidades, el compuesto comprende una nucleasa, proteína TALEN, nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, recombinasa CRE, recombinasa FLP, recombinasa R, integrasa, o transposasa. En algunas modalidades, el compuesto es un anticuerpo. En algunas modalidades, el compuesto es un factor de transcripción. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula pequeña. En algunas modalidades, el compuesto es una nanopartícula. En algunas modalidades, el compuesto es un receptor de antígeno quimérico. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula etiquetada con fluorescencia. En algunas modalidades, el compuesto es un liposoma. En algunas modalidades, el compuesto es un virus. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende una célula que comprende una pared celular. En algunas modalidades, la célula es una célula de planta, levadura, hongo, alga, o bacteria.

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, dicha célula se pone en contacto con el compuesto antes, simultáneamente, o después de pasar a través del poro. En algunas modalidades, el compuesto que se suministra se recubre en la superficie. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro a entre 0 °C-45 °C. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro mediante presión positiva o presión negativa. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro mediante presión constante o presión variable. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de una jeringa. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de una bomba. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de un vacío. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro mediante presión capilar. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro mediante presión arterial. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro mediante fuerza g. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro bajo una presión que está en el intervalo de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 500 psi. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro bajo una presión de aproximadamente 2 psi. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro bajo una presión de aproximadamente 2,5 psi. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro bajo una presión de aproximadamente 3 psi. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro bajo una presión de aproximadamente 5 psi. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro bajo una presión de aproximadamente 10 psi. En algunas modalidades, la célula se pasa a través del poro bajo una presión de aproximadamente 20 psi. En algunas modalidades, el flujo de fluido dirige la célula a través del poro. En algunas modalidades, el flujo de fluido es un flujo turbulento antes de que la célula pase a través del poro. En algunas modalidades, el flujo de fluido a través del poro es un flujo laminar. En algunas modalidades, el flujo de fluido es un flujo turbulento después de que la célula pasa a través del poro. En algunas modalidades, la célula pasa a través del poro a una velocidad que está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 20 m/s. En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de un módulo más grande. En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de una jeringa.

En algunas modalidades que pueden combinarse con las modalidades anteriores, la célula está en una suspensión celular que comprende una solución acuosa. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende medio de cultivo celular, PBS, sales, azúcares, factores de crecimiento, productos derivados de animales, materiales de relleno, surfactantes, lubricantes, vitaminas, proteínas, quelantes, y/o un agente que afecta a la polimerización de la actina. En algunas modalidades, el agente que afecta a la polimerización de la actina es Latrunculina A, citocalasina,

y/o Colchicina. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular es DMEM, OptiMEM, IMDM, RPMI, o X-VIVO. En algunas modalidades, la célula se pasó, además, a través de un campo eléctrico generado por al menos un electrodo cerca de la superficie.

5 Breve descripción de las figuras

Los siguientes dibujos forman parte de la presente descripción y se incluyen para demostrar, además, determinados aspectos de la presente descripción. La descripción puede entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de modalidades específicas presentadas en la presente descripción.

La Figura 1A muestra una foto de un filtro de policarbonato ilustrativo para su uso en los ejemplos descritos. La Figura 1B muestra fotos de poros de filtro de policarbonato ilustrativos.

15 Las Figuras 2A-G muestran gráficos de FACS ilustrativos que demuestran el suministro de partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue y 10 kDa Alexa 488 a células HeLa (2×10^6 células/mL) a baja presión (5 psi, 10 psi, o 20 psi) a través de poros de filtros de tamaño 8 μm , 10 μm , 12 μm , o 14 μm .

20 Las Figuras 2A-C representan las células que pasaron a través de poros de filtros de tamaño 14 μm (Figura 2A), 12 μm (Figura 2B), y 10 μm (Figura 2C) a una presión de 5 psi. Las Figuras 2E y 2G representan las células que pasan a través de los poros del filtro de 12 μm bajo una presión de 10 psi (Figura 2E) y 20 psi (Figura 2G). Las Figuras 2D y 2F representan los gráficos del control de endocitosis (Figura 2D) y control negativo (Figura 2F).

25 Las Figuras 3A y 3B muestran gráficos de FACS que demuestran el suministro de partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue y 10 kDa Alexa 488 a linfocitos T humanos recién aislados (4×10^6 células/mL), con presión aplicada manualmente a través de una jeringa (Figura 3A) o bajo una presión constante de 5 psi (Figura 3B) a través de poros de filtros de 5 μm . Se indica la frecuencia de viabilidad celular.

30 La Figura 4 muestra la eficiencia del suministro y viabilidad celular después del suministro de partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue a células HeLa mediado por filtros comerciales (COTS) o filtros de jeringa personalizados.

35 Las Figuras 5A y 5B muestran los gráficos representativos del histograma de citometría de flujo que muestran los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) para COTS (Figura 5A) o el suministro mediado por filtro de jeringa personalizado (Figura 5B) de partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue a células HeLa a 3 psi. La Figura 5C muestra los valores promedio de intensidad de fluorescencia media relativa (rMFI) para COTS o el suministro mediado por filtro de jeringa personalizado de partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue a células HeLa a 2 psi y 3 psi.

40 La Figura 6 muestra la eficiencia de suministro, viabilidad celular y valores de rMFI después del suministro de partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue y ARNm de EGFP a células HeLa mediado por los filtros COTS a 2 psi, 2,5 psi, y 3 psi.

45 Las Figuras 7A y 7B muestran gráficos de histogramas de citometría de flujo ilustrativos que representan la fluorescencia después del suministro mediado por constricción (SQZ) del anticuerpo IgG (Figura 7A) y partículas de dextrano (Figura 7B) a RBC humanos en comparación con los controles de endocitosis.

50 La Figura 8A muestra la eficiencia de suministro después del suministro mediado por constricción del anticuerpo IgG y partículas de dextrano a RBC humanos. La Figura 8B muestra la viabilidad celular estimada después del suministro mediado por constricción del anticuerpo IgG y las partículas de dextrano a RBC humanos.

55 La Figura 9A muestra gráficos de histograma de citometría de flujo ilustrativos que representan la fluorescencia después del suministro mediado por constricción del anticuerpo IgG a RBC de ratón. La Figura 9B muestra la viabilidad celular estimada después del suministro mediado por constricción del anticuerpo IgG a RBC de ratón. La Figura 9C muestra la eficiencia de suministro después del suministro mediado por constricción del anticuerpo IgG a RBC de ratón.

60 Las Figuras 10A-I muestran gráficos de FACS ilustrativos que demuestran el suministro de partículas de dextrano a RBC de ratón por debajo de 2 psi (Figura 10D), 4 psi (Figura 10E), 6 psi (Figura 10F), 10 psi (Figura 10G), 20 psi (Figura 10H), o mediante el uso de presión manual por jeringa (Figura 10I) en comparación con la endocitosis (Figura 10A), control negativo (Figura 10B), y control sin material (Figura 10C).

65 La Figura 11A muestra la viabilidad celular estimada después del suministro mediado por constricción de partículas de dextrano a RBC de ratón. La Figura 11B muestra la eficiencia de suministro después del suministro mediado por constricción de las partículas de dextrano o el anticuerpo IgG a RBC de ratón. La Figura 11C muestra la media geométrica de fluorescencia después del suministro mediado por constricción de anticuerpos IgG o partículas de dextrano a RBC de ratón.

La Figura 12A muestra gráficos de histograma de citometría de flujo ilustrativos que representan la fluorescencia después del suministro mediado por constricción de partículas de dextrano a RBC de ratón. La Figura 12B muestra la viabilidad celular estimada después del suministro mediado por constricción de partículas de dextrano a RBC de ratón. La Figura 12C muestra la eficiencia de suministro después del suministro mediado por constricción de partículas de dextrano a RBC de ratón. La Figura 12D muestra la media geométrica de fluorescencia después del suministro mediado por constricción de partículas de dextrano a RBC de ratón.

La Figura 13A muestra la viabilidad celular después del suministro mediado por microtamiz de partículas de dextrano a células HeLa. La Figura 13B muestra la eficiencia de suministro después del suministro mediado por microtamiz de partículas de dextrano a células HeLa. Las Figuras 13C y Figura 13D muestran gráficos de histograma de citometría de flujo ilustrativos que representan la fluorescencia después del suministro mediado por constricción de partículas de dextrano a células HeLa mediante el uso de un microtamiz AQUAMARIJN (Figura 13C) o un microtamiz STERLITECH™ (Figura 13D).

La Figura 14A muestra la viabilidad celular y la eficiencia de suministro después del suministro mediado por microtamiz de partículas de dextrano a linfocitos T. La Figura 14B muestra gráficos de histograma de citometría de flujo ilustrativos que representan la fluorescencia después del suministro mediado por constricción de partículas de dextrano a linfocitos T mediante el uso de un microtamiz AQUAMARIJN.

Descripción detallada

Determinados aspectos de las descripciones descritas en la presente descripción se basan en el sorprendente descubrimiento de que el suministro intracelular de compuestos puede lograrse al pasar una suspensión celular a través de una superficie que contiene poros. Determinados aspectos de la presente descripción se refieren a métodos para suministrar un compuesto a una célula, los métodos incluyen pasar una suspensión celular a través de una superficie que contiene poros, en donde dichos poros deforman la célula y provocan de esta manera una perturbación de la célula de manera que el compuesto entra en la célula, en donde dicha suspensión celular se pone en contacto con el compuesto. Determinados aspectos de la presente descripción se refieren a un dispositivo para suministrar un compuesto dentro de una célula, dicho dispositivo incluye una superficie que contiene poros, en donde dichos poros se configuran de manera que una célula suspendida en una solución puede pasar a través de estos, en donde dichos poros deforman la célula y provocan de esta manera una perturbación de la célula de manera que el compuesto entra en la célula. En algunas modalidades, la superficie es un filtro. En algunas modalidades, la superficie es una membrana. En algunas modalidades, la superficie es un microtamiz.

I. Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en la presente descripción se entienden generalmente bien y se emplean comúnmente mediante el uso de metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook y otros, 4^{ta} ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (DOI: 10.1002/0471142727); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual* (E. A. Greenfield, eds., 2013); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6^{ta} ed., J. Wiley and Sons, 2010); *Oligonucleotides and Analogues* (F. Eckstein, ed., 1992); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Handbook* (J.E. Celis, ed., Academic Press, 2005); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, Springer, 2013); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P., Calos, ed., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis y otros, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (DOI: 10.1002/0471142735); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y otros, eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Janeway's Immunobiology* (K. Murphy y C. Weaver, Garland Science, 2016); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: Un enfoque práctico* (P. Shepherd y C. Dean, ed., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* (G.C. Howard y M.R. Kaser, ed., CRC Press, 2013); *The Antibodies Vol. 1-7* (M. Zanetti y J. D. Capra, ed., Harwood Academic Publishers, 1995-2007); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita y otros, ed., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Definiciones

A los efectos de interpretar esta descripción, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En caso de que cualquier definición establecida más abajo entre en conflicto con cualquier documento, prevalecerá la definición establecida.

Como se usa en la presente descripción, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluye referencias plurales a menos que se indique de cualquier otra manera.

Se entiende que los aspectos y modalidades de la descripción descrita en la presente descripción incluyen “que comprende”, “que consiste” y “que consiste esencialmente en” aspectos y modalidades.

5 Para todas las composiciones descritas en la presente descripción, y todos los métodos que usan una composición descrita en la presente descripción, las composiciones pueden comprender los componentes o etapas enumerados, o pueden “consistir esencialmente en” los componentes o etapas enumerados. Cuando una composición se describe como “que consiste esencialmente en” los componentes enumerados, la composición contiene los componentes enumerados, y puede contener otros componentes que no afectan sustancialmente a los métodos descritos, pero no contiene ningún otro componente que afecte sustancialmente a los métodos descritos que no sean los componentes enumerados expresamente; o si la composición contiene componentes adicionales distintos de los enumerados que afectan sustancialmente a los métodos descritos, la composición no contiene una concentración o cantidad suficiente de los componentes adicionales para afectar sustancialmente a los métodos descritos. Cuando un método se describe como “que consiste esencialmente en” las etapas enumeradas, el método contiene las etapas enumeradas, y puede contener otras etapas que no afectan sustancialmente a los métodos descritos, pero el método no contiene ninguna otra etapa que afecte sustancialmente a los métodos descritos aparte de las etapas enumeradas expresamente. Como un ejemplo específico no limitante, cuando una composición se describe como ‘que consiste esencialmente en’ un componente, la composición puede contener adicionalmente cualquier cantidad de portadores, vehículos, o diluyentes farmacéuticamente aceptables y otros componentes tales que no afectan sustancialmente a los métodos descritos.

20 El término “aproximadamente” como se usa en la presente descripción se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo conocido fácilmente por el experto en este campo técnico. La referencia a “aproximadamente” un valor o parámetro en la presente descripción incluye (y describe) modalidades que se dirigen a ese valor o parámetro en sí mismo.

25 El término “poro” como se usa en la presente descripción se refiere a una abertura, que incluye, sin limitación, un agujero, desgarro, cavidad, abertura, rotura, espacio, o perforación dentro de un material. En algunos ejemplos, (donde se indica) el término se refiere a un poro dentro de una superficie de la presente descripción. En otros ejemplos, (donde se indique) un poro puede referirse a un poro en una membrana celular.

30 El término “membrana” como se usa en la presente descripción se refiere a una barrera selectiva o lámina que contiene poros. El término incluye una estructura tipo lámina flexible que actúa como límite o recubrimiento. En algunos ejemplos, el término se refiere a una superficie o filtro que contiene poros. Este término es distinto del término “membrana celular”.

35 El término “filtro” como se usa en la presente descripción se refiere a un artículo poroso que permite el paso selectivo a través de los poros. En algunos ejemplos, el término se refiere a una superficie o membrana que contiene poros.

40 El término “heterogéneo” como se usa en la presente descripción se refiere a algo que se mezcla o no es uniforme en estructura o composición. En algunos ejemplos, el término se refiere a los poros que tienen diferentes tamaños, formas o distribuciones dentro de una superficie dada.

45 El término “homogéneo” como se usa en la presente descripción se refiere a algo que es consistente o uniforme en estructura o composición en todo. En algunos ejemplos, el término se refiere a los poros que tienen tamaños, formas, o distribución consistentes dentro de una superficie dada.

50 El término “heterólogo” como se usa en la presente descripción se refiere a una molécula que se deriva de un organismo diferente. En algunos ejemplos, el término se refiere a un ácido nucleico o proteína que normalmente no se encuentra o expresa dentro del organismo dado.

55 El término “homólogo” como se usa en la presente descripción se refiere a una molécula que se deriva del mismo organismo. En algunos ejemplos, el término se refiere a un ácido nucleico o proteína que normalmente se encuentra o se expresa dentro del organismo dado.

60 El término “polinucleótido” o “ácido nucleico” como se usa en la presente descripción se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye, pero sin limitarse a, ADN o ARN de una sola hebra, de doble hebra o de múltiples hebras, ADN genómico, ADNc, híbridos ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas químicamente o bioquímicamente, no naturales, o derivadas. La cadena principal del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfatos (como puede encontrarse típicamente en ARN o ADN), o grupos azúcar o fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, la cadena principal del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamidatos y, por lo tanto, puede ser un fosforamidato de oligodesoxinucleósido (P-NH₂) o un oligómero de fosforamidato-fosfodiéster mezclado. En adición, un polinucleótido de doble hebra puede obtenerse del producto de polinucleótido de una sola hebra de síntesis química ya sea mediante la síntesis de la cadena complementaria e hibridamiento de las cadenas

en condiciones apropiadas, o mediante la síntesis de la cadena complementaria de novo mediante el uso de una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Tales polímeros de residuos de aminoácidos pueden contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, pero sin limitarse a, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros, y multímeros de residuos de aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de estas se abarcan en la definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones, y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa, siempre y cuando la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de la mutagénesis dirigida a sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de los hospedadores que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

Para cualquiera de las características estructurales y funcionales descritas en la presente descripción, los métodos para determinar estas características se conocen en la técnica.

III. Superficie que tiene poros

En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a métodos para suministrar un compuesto en una célula que comprende las etapas de pasar una suspensión celular a través de una superficie que contiene poros, en donde los poros deforman la célula, provocan una perturbación de la célula, y entran en contacto con la suspensión celular con el compuesto; por ejemplo, antes, durante o después de que las células en la suspensión pasen a través de los poros, en donde el compuesto entra en la célula. Las superficies como se describen en la presente descripción pueden fabricarse de cualquiera de un número de materiales y tomar cualquiera de un número de formas. En algunas modalidades, la superficie es una membrana. En algunas modalidades, la superficie es un filtro. Los filtros y las membranas se usan normalmente para separar un material de una solución, y de esta manera se obtiene un retentado. En modalidades donde la superficie es un filtro o una membrana, el filtro o membrana se usa alternativamente para suministrar un compuesto a una célula al pasar una suspensión celular a través del filtro o de los poros de la membrana, lo que provoca así una perturbación de la célula de manera que un compuesto entra en la célula. En algunas modalidades, la superficie es un filtro de policarbonato STERLITECH™ (PCT8013100). En algunas modalidades, el filtro es un filtro de flujo tangencial. En algunas modalidades, la superficie es una esponja o matriz similar a una esponja. En algunas modalidades, la superficie es una matriz. En algunas modalidades, la superficie es un microtamiz. En algunas modalidades, la superficie no es una red.

En algunas modalidades, la superficie es una superficie de trayectoria tortuosa. En algunas modalidades, la superficie de trayectoria tortuosa comprende acetato de celulosa. En algunas modalidades, la superficie comprende un material seleccionado de, sin limitación, polímeros sintéticos o naturales, policarbonato, silicio, vidrio, metal, aleación, nitrato de celulosa, plata, acetato de celulosa, nailon, poliéster, poliétersulfona, poliacrilonitrilo (PAN), polipropileno, PVDF, politetrafluoretileno, éster de celulosa mixta, porcelana, grafito, y cerámica.

La superficie de la presente descripción puede fabricarse mediante el uso de cualquier técnica conocida en la técnica, que incluye, sin limitación, grabado, grabado en pista, litografía, ablación con láser, moldeo por inyección, estampado, perforación de microagujeros, esponja polimérica, espumado directo, extrusión, y grabado en caliente. El grabado implica el proceso de usar una sustancia química, tal como un ácido fuerte, para cortar en una superficie metálica en un patrón deseado. Las membranas grabadas en pista se forman mediante el bombardeo de una película sólida con partículas que forman pistas de material dañado a través de la película. Después la película se somete a un agente químico que graba selectivamente las pistas dañadas para crear perforaciones a través de la película. Los anchos de sección transversal de los poros pueden controlarse mediante el tiempo de incubación del grabador sobre la película. La litografía puede incluir microlitografía, nanolitografía, y litografía por rayos x. En la litografía, un aparato litográfico aplica un patrón deseado sobre una porción diana del sustrato. Por ejemplo, en la litografía por rayos x, los rayos x se usan para transferir un patrón de una máscara a una fotorresistencia química sensible a la luz en el sustrato deseado. En la fotolitografía, la luz se usa para transferir el patrón deseado de una fotomáscara a una fotorresistencia sensible a la luz en el sustrato. La aplicación química subsecuente se usa para grabar el patrón en el material de sustrato debajo de la fotorresistencia. La ablación con láser es el proceso de eliminar material de una superficie sólida mediante la irradiación con un haz de láser, mientras que el moldeo por inyección implica inyectar un material en un molde deseado, donde después se enfría y se endurece en la estructura deseada. Los métodos de estampado y de perforación de microagujeros utilizan herramientas para cortar o imprimir las formas deseadas en el material del sustrato. Para producir membranas de filtro de cerámica, el método de la esponja polimérica implica saturar una esponja polimérica con una suspensión de cerámica, que después se quema para dejar una cerámica porosa. En el método de espumado directo, una mezcla química que contiene el componente de cerámica deseado y materiales orgánicos se trata para desarrollar un gas. Después se producen burbujas en el material, lo que provoca que se forme espuma. El material cerámico poroso resultante se seca y se coce. Para producir un panel o estructura celular, se usa un método de formación de plástico llamado extrusión, donde se fuerza a pasar una mezcla de polvo de cerámica más aditivos a través de una matriz conformada. El

grabado en caliente implica el estampado de un patrón en un polímero ablandado al elevar la temperatura del polímero justo por encima de su temperatura de transición vítrea.

5 En algunas modalidades, la superficie es una membrana de nanoestructura. En algunas modalidades, el cambio de fase se usa para producir membranas nanoestructuradas. Los métodos de cambio de fase incluyen, sin limitación, la precipitación de la fase de vapor, inversión de fase seca húmeda, y separación de fase inducida térmicamente. En la precipitación del método de fase de vapor, una solución de polímero fundido compuesta de polímero y solvente se introduce en un entorno de vapor no solvente saturado con vapor de solvente. El vapor de solvente saturado suprime la evaporación del solvente de la película. Las moléculas no solventes se difunden subsecuentemente en la
10 película, lo que conduce al ajuste del polímero. En el método de inversión de la fase seca húmeda, se prepara una solución de polímero compuesta de polímero y solvente. La solución se funde en una superficie adecuada y después de la evaporación parcial del solvente, la película fundida se sumerge en una gelatina. Después, el no solvente se difunde en la película de solución de polímero a través de la capa sólida fina mientras que el solvente difunde hacia afuera, y crea una membrana porosa. En el método de separación de fase inducido térmicamente, un polímero se mezcla con un solvente a alta temperatura y la solución de polímero se funde en una película. Cuando la solución se enfría, entra en un área inmiscible debido a la pérdida de solvencia.

20 En algunas modalidades, la superficie es un copolímero de bloque. Los copolímeros de bloque se componen de dos o más bloques de diferentes monómeros polimerizados unidos por enlaces covalentes. Los componentes de copolímero de bloque pueden separarse en microfase para formar nanoestructuras periódicas. En este proceso, debido a la incompatibilidad entre los bloques, los copolímeros de bloques se someten a la separación de fases, y crean estructuras de tamaño nanométrico.

25 En algunas modalidades, la superficie es un microtamiz. En algunos ejemplos, los microtamices se usan en técnicas de separación celular, aislamiento de CTC o emulsión de gotas. En algunas modalidades, los poros de un microtamiz se generan por fotolitografía en un sustrato de cerámica con un soporte de silicio. En algunas modalidades, el microtamiz se fabrica de policarbonato. Los microtamices pueden estar disponibles de Aquamarijn o Sterlitech. En algunas modalidades, el microtamiz tiene un tamaño de los poros que está en el intervalo de aproximadamente 4 μm a aproximadamente 10 μm . En algunas modalidades, el microtamiz tiene una porosidad mayor que aproximadamente cualquiera de 5 %, 8 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o mayor que aproximadamente 50 %.

35 La superficie descrita en la presente descripción puede tener cualquier forma conocida en la técnica; por ejemplo, una forma 3-dimensional. La forma 2-dimensional de la superficie puede ser, sin limitación, circular, elíptica, redonda, cuadrada, en forma de estrella, triangular, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal, u octogonal. En algunas modalidades, la superficie es de forma redonda. En algunas modalidades, la forma superficial 3-dimensional es cilíndrica, cónica, o cuboidal.

40 Los términos “tamaño de los poros” y “ancho de sección transversal del poro” se usan indistintamente, y como se usa en la presente descripción se refieren al ancho de sección transversal más pequeño a través del poro. En algunas modalidades, el poro es circular o aproximadamente circular y el tamaño de los poros o el ancho de la sección transversal del poro. En algunas modalidades, el poro es de forma poligonal (por ejemplo, cuadrado, rectangular, pentagonal, hexagonal, etc.) y el tamaño de los poros o el ancho de la sección transversal del poro es el ancho más pequeño del polígono. Un experto en la técnica entendería que un poro triangular puede no tener un
45 ancho, sino que se describe en términos de bases y alturas. En algunas modalidades, el tamaño de los poros o el ancho de la sección transversal de poro de un poro triangular es la altura más pequeña del triángulo (distancia más pequeña entre una base y su ángulo opuesto).

50 La superficie puede tener varios anchos y grosores de sección transversal. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal superficial está entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 3 m o cualquier ancho de la sección transversal o intervalo de anchos de la sección transversal entre ellos. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal superficial está entre cualquiera de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 750 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 500 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 250 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 100 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm, de
55 aproximadamente 1 mm a aproximadamente 25 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm, o de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 2,5 mm. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal superficial está entre cualquiera de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 1 m, de aproximadamente 10 mm a aproximadamente 1 m, de aproximadamente 25 mm a aproximadamente 1 m, de aproximadamente 50 mm a aproximadamente 1 m, de aproximadamente 100 mm a
60 aproximadamente 1 m, de aproximadamente 250 mm a aproximadamente 1 m, de aproximadamente 500 mm a aproximadamente 1 m, o de aproximadamente 750 mm a aproximadamente 1 m.

65 En algunas modalidades, la superficie tiene un grosor definido. En algunas modalidades, el grosor de la superficie es uniforme. En algunas modalidades, el grosor de la superficie es variable.

Por ejemplo, en algunas modalidades, porciones de la superficie son más gruesas o más delgadas que otras

5 porciones de la superficie. En algunas modalidades, el grosor de la superficie varía en aproximadamente 1-90 % o cualquier porcentaje o intervalo de porcentajes entre ellos. En algunas modalidades, el grosor de la superficie varía en uno cualquiera de aproximadamente 1 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 80 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 70 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 %, o de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 %. En algunas modalidades, el grosor de la superficie varía en uno cualquiera de aproximadamente 5 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 %, o de aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, la superficie está de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 5 mm de grosor o cualquier grosor o intervalo de grosores entre ellos. En algunas modalidades, la superficie es de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 2,5 mm, de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 1 mm, de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 750 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 500 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 250 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 100 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 90 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 80 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 70 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 60 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 50 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 40 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 30 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 20 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 10 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 5 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 1 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 0,5 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 0,1 μm , o de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 0,05 μm de grosor. En algunas modalidades, la superficie es de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 0,05 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 30 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 40 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 60 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 70 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 80 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 90 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 250 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 500 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 750 μm a aproximadamente 5 mm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm, o de aproximadamente 2,5 mm a aproximadamente 5 mm de grosor. En algunas modalidades, la superficie es de aproximadamente 10 μm de grosor.

40 En algunas modalidades, el régimen de flujo a través de la superficie es de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s o cualquier velocidad o intervalo de velocidades entre ellas. En algunas modalidades, el régimen de flujo es de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 75 L/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 50 L/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 25 L/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 10 L/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 7,5 L/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 5,0 L/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 2,5 L/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 1 L/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 0,1 L/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 75 mL/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 50 mL/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 25 mL/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 10 mL/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 1 mL/cm²/s, de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 0,1 mL/cm²/s, o de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 0,01 mL/cm²/s. En algunas modalidades, el régimen de flujo es de aproximadamente 0,001 mL/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 0,01 mL/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 0,1 mL/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 1 mL/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 10 mL/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 50 mL/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 0,1 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 0,5 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 1 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 2,5 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 5 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 7,5 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 10 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 25 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, de aproximadamente 50 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s, o de aproximadamente 75 L/cm²/s a aproximadamente 100 L/cm²/s.

65 El ancho en sección transversal de los poros se relaciona con el tipo de célula a tratar. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es una función del diámetro de la célula a tratar. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es tal que una célula se perturba al pasar a través del poro. En algunas modalidades, el tamaño de los poros

es menor que el diámetro de la célula. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es de aproximadamente 20-99 % del diámetro de la célula. En algunas modalidades, el tamaño de los poros es aproximadamente uno cualquiera de aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 99 % del diámetro de la célula o cualquier valor entre ellos. El tamaño óptimo de los poros puede variar en función de la aplicación y/o el tipo de célula. Muchas células tienen entre aproximadamente 5-15 μm de diámetro, por ejemplo, las células dendríticas tienen 7-8 μm de diámetro. Por ejemplo, el ancho en sección transversal del poro es menor que aproximadamente cualquiera de 4,5, 5, 5,5, 6, o 6,5 μm para el procesamiento de células individuales. En otro ejemplo, el ancho en sección transversal de los poros para el procesamiento de óvulos humanos está entre aproximadamente 6,2 μm y aproximadamente 8,4 μm , aunque son posibles poros más grandes y más pequeños (el diámetro de un óvulo humano es de aproximadamente 120 μm). En algunas modalidades, los conglomerados de células (por ejemplo, embriones) se procesan mediante el uso de un ancho de sección transversal de poro de entre aproximadamente 12 μm y aproximadamente 17 μm , dado que el conglomerado de células no se interrumpe al pasar a través del poro. En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros está en el intervalo de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 300 μm o cualquier tamaño o intervalo de tamaños entre ellos. En algunas modalidades, el tamaño de la sección transversal del poro está en el intervalo de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 250 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 200 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 150 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 100 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 50 μm , o de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 25 μm . En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal del poro está en el intervalo de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 300 μm , de aproximadamente 25 μm a aproximadamente 300 μm , de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 300 μm , de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 300 μm , de aproximadamente 150 μm a aproximadamente 300 μm , de aproximadamente 200 μm a aproximadamente 300 μm o de aproximadamente 250 μm a aproximadamente 300 μm . En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 35 μm . En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros es de o menos de aproximadamente 0,4 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 12 μm , o aproximadamente 14 μm . En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros es al menos aproximadamente 1 μm , 2 μm , 3 μm , 4 μm , o 5 μm . En algunas modalidades, el ancho de la sección transversal de los poros es de o menos de aproximadamente 200 μm . En algunas modalidades, los poros son heterogéneos en el ancho de sección transversal u homogéneos en el ancho de sección transversal a través de una superficie dada. En algunas modalidades, los anchos heterogéneos de la sección transversal de los poros varían de 10-20 % o cualquier porcentaje o intervalo de porcentajes entre ellos. En algunas modalidades, el poro deforma la célula a aproximadamente uno cualquiera de aproximadamente 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 99 % del diámetro de la célula o cualquier valor entre ellos. En algunas modalidades, el tamaño de la célula es el tamaño de la célula en suspensión.

En algunas modalidades, el área de sección transversal de los poros es una función del área de sección transversal de la célula. En algunas modalidades, la forma bidimensional del poro es circular, elíptica, cuadrada, rectangular, en forma de estrella, triangular, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal, u octogonal y el área de sección transversal de los poros es una función del área de sección transversal de la célula. En algunas modalidades, el área de sección transversal de los poros es de al menos aproximadamente 1 μm^2 , 4 μm^2 , 9 μm^2 , 16 μm^2 , 25 μm^2 , 50 μm^2 , 100 μm^2 , 150 μm^2 , 200 μm^2 , 250 μm^2 500 μm^2 o 1000 μm^2 . En algunas modalidades, los poros son heterogéneos en el área de sección transversal u homogéneos en el área de sección transversal a través de una superficie dada. En algunas modalidades, el área de sección transversal heterogénea de los poros varía 10-20 % o cualquier porcentaje o intervalo de porcentajes entre ellos. En algunas modalidades, el poro deforma la célula a aproximadamente uno cualquiera de aproximadamente 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 99 % del área de sección transversal de la célula o cualquier valor entre ellos. En algunas modalidades, el tamaño de la célula es el tamaño de la célula en suspensión.

Las entradas y salidas del pasaje de los poros pueden tener una variedad de ángulos. El ángulo del poro puede seleccionarse para minimizar la obstrucción del poro mientras las células pasan a través de este. Por ejemplo, el ángulo de la porción de entrada o salida puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 90 grados. En algunas modalidades, los poros tienen ángulos de entrada y salida idénticos. En algunas modalidades, los poros tienen diferentes ángulos de entrada y salida. En algunas modalidades, el borde de los poros es liso, por ejemplo, redondo o curvado. Un borde de poro liso tiene una superficie continua, plana, y uniforme sin topetones, crestas, o partes irregulares. En algunas modalidades, el borde de los poros es afilado. Un borde de poro afilado tiene un borde fino que es puntiagudo o está en un ángulo agudo. En algunas modalidades, el pasaje de los poros es recto. Un pasaje de poros recto no contiene curvas, dobleces, ángulos, u otras irregularidades. En algunas modalidades, el pasaje de los poros es curvo. Un pasaje de poros curvo se dobla o se desvía de una línea recta. En algunas modalidades, el pasaje de los poros tiene múltiples curvas, por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más curvas.

Los poros pueden tener cualquier forma conocida en la técnica, que incluye una forma 2-dimensional o 3-dimensional. La forma de los poros (por ejemplo, la forma de sección transversal) puede ser, sin limitación, circular, elíptica, redonda, rectangular, cuadrada, en forma de estrella, triangular, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal, y octagonal. En algunas modalidades, la sección transversal de los poros es de forma redonda. En algunas modalidades, la forma 3-dimensional del poro es cilíndrica o cónica. En algunas modalidades, el poro tiene

una forma en ranuras de entrada y salida. En algunas modalidades, la forma de los poros es homogénea (es decir, consistente o regular) entre los poros dentro de una superficie dada. En algunas modalidades, la forma de los poros es heterogénea (es decir, mixta o variada) entre los poros dentro de una superficie dada.

5 Las superficies descritas en la presente descripción pueden tener un intervalo de números de poros en total. En algunas modalidades, los poros abarcan aproximadamente el 10-80 % del área superficial total. En algunas modalidades, la superficie contiene de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{30}$ poros en total o cualquier número o intervalo de números entre ellos. Por ejemplo, la superficie puede contener al menos aproximadamente cualquiera de $1,0 \times 10^3$, $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^9$, $1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^{15}$,
10 $1,0 \times 10^{20}$, $1,0 \times 10^{25}$, $1,0 \times 10^{30}$, o más poros en total. En algunas modalidades, la superficie comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$ poros por mm^2 de área superficial. Por ejemplo, la superficie puede contener de aproximadamente $1,0 \times 10^2$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^7$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{10}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{12}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$ poros por mm^2 área superficial. En algunas modalidades, la superficie puede contener de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$, de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^{12}$, de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^{10}$, de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^7$, de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^5$, de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^3$, o de aproximadamente 10 a aproximadamente $1,0 \times 10^2$ poros por mm^2 de área superficial. En algunas modalidades, una superficie con un radio de 13 mm comprende aproximadamente $6,0 \times 10^5$ poros.

Los poros pueden distribuirse de numerosas maneras dentro de una superficie dada. En algunas modalidades, los poros se distribuyen en paralelo dentro de una superficie dada. En algunas modalidades, las superficies con poros se apilan una encima de la otra. En un ejemplo de este tipo, los poros se distribuyen lado a lado en la misma dirección y se separan por la misma distancia dentro de una superficie dada. En algunas modalidades, la distribución de poros es ordenada u homogénea. En un ejemplo de este tipo, los poros se distribuyen en un patrón regular y sistemático o se separan por la misma distancia dentro de una superficie dada. En algunas modalidades, la distribución de poros es aleatoria o heterogénea. En un ejemplo de este tipo, los poros se distribuyen en un patrón irregular y desordenado o se separan por distancias diferentes dentro de una superficie dada. En algunas modalidades, los poros en la superficie se disponen en un patrón irregular. En algunas modalidades, los poros en la superficie son heterogéneos en tamaño. En algunas modalidades, los poros en la superficie tienen una forma heterogénea. En algunas modalidades, los poros en la superficie se disponen en un patrón irregular y son heterogéneos en tamaño. En algunas modalidades, los poros en la superficie se disponen en un patrón irregular y son heterogéneos en forma. En algunas modalidades, los poros en la superficie son heterogéneos en tamaño y heterogéneos en forma. En algunas modalidades, los poros en la superficie se disponen en un patrón irregular, son heterogéneos en tamaño y son heterogéneos en forma.

En algunas modalidades, múltiples superficies se distribuyen en serie. Las múltiples superficies pueden ser homogéneas o heterogéneas en tamaño de superficie, forma, y/o rugosidad. Las múltiples superficies pueden contener, además, poros con forma, número, y/o tamaño de los poros homogéneos o heterogéneos, lo que permite de esta manera el suministro simultáneo de una gama de compuestos en diferentes tipos de células. En algunas modalidades, las múltiples superficies se apilan. En algunas modalidades, la suspensión celular pasa a través de múltiples superficies.

En algunas modalidades, un poro individual tiene una dimensión de ancho uniforme (es decir, ancho constante a lo largo de la longitud del pasaje de los poros). En algunas modalidades, un poro individual tiene un ancho variable (es decir, aumenta o disminuye el ancho a lo largo de la longitud del pasaje de los poros). En algunas modalidades, los poros dentro de una superficie dada tienen las mismas profundidades de poros individuales. En algunas modalidades, los poros dentro de una superficie dada tienen diferentes profundidades de poros individuales. En algunas modalidades, los poros están inmediatamente adyacentes entre sí. En algunas modalidades, los poros se separan entre sí por una distancia. En algunas modalidades, los poros se separan entre sí por una distancia de aproximadamente $0,001 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm o cualquier distancia o intervalo de distancias entre ellos. Por ejemplo, los poros pueden separarse entre sí por una distancia de entre una cualquiera de aproximadamente $0,001 \mu\text{m}$ a 30 mm , de aproximadamente $0,01 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $0,05 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $0,1 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $5 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $50 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $100 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $250 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente $500 \mu\text{m}$ a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 30 mm , de aproximadamente 10 mm a aproximadamente 30 mm , o de aproximadamente 20 mm a aproximadamente 30 mm . En algunas modalidades, los poros pueden separarse entre sí por una distancia de entre una cualquiera de aproximadamente $0,001 \mu\text{m}$ a $0,01 \mu\text{m}$, de aproximadamente $0,001 \mu\text{m}$ a aproximadamente $0,05 \mu\text{m}$, de aproximadamente $0,001 \mu\text{m}$ a aproximadamente $0,1 \mu\text{m}$, de aproximadamente $0,001 \mu\text{m}$ a aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$, de aproximadamente $0,001 \mu\text{m}$ a aproximadamente $1 \mu\text{m}$, de aproximadamente $0,001 \mu\text{m}$ a aproximadamente $5 \mu\text{m}$, de aproximadamente $0,001 \mu\text{m}$ a aproximadamente $10 \mu\text{m}$, de aproximadamente $0,001$

µm a aproximadamente 50 µm, de aproximadamente 0,001 µm a aproximadamente 100 µm, de aproximadamente 0,001 µm a aproximadamente 250 µm, de aproximadamente 0,001 µm a aproximadamente 500 µm, de aproximadamente 0,001 µm a aproximadamente 1 mm, de aproximadamente 0,001 µm a aproximadamente 10 mm, o de aproximadamente 0,001 µm a aproximadamente 20 mm.

5 En algunas modalidades, la superficie se recubre con un material. El material puede seleccionarse de cualquier material conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, teflón, un recubrimiento adhesivo, surfactantes, anticoagulantes tales como heparina, EDTA, citrato, y oxalato, proteínas, moléculas de adhesión, anticuerpos, factores que modulan la función celular, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, complejos tales como complejos
10 lípido-carbohidrato, o proteínas de transmembrana. En algunas modalidades, la superficie se recubre con polivinilpirrolidona. En algunas modalidades, el material se une covalentemente a la superficie. En algunas modalidades, el material se une no covalentemente a la superficie. En algunas modalidades, las moléculas superficiales se liberan en las células que pasan a través de los poros.

15 En algunas modalidades, la superficie tiene propiedades químicas modificadas. En algunas modalidades, la superficie es hidrófila. En algunas modalidades, la superficie es hidrófoba. En algunas modalidades, la superficie es cargada. En algunas modalidades, la superficie está cargada positiva y/o negativamente. En algunas modalidades, la superficie puede cargarse positivamente en algunas regiones y cargarse negativamente en otras regiones. En algunas modalidades, la superficie tiene una carga positiva o negativa general. En algunas modalidades, la
20 superficie puede ser cualquiera de lisa, electropulida, áspera, o tratada con plasma. En algunas modalidades, la superficie comprende un zwitterión o un compuesto dipolar.

IV. Suspensiones celulares

25 En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a pasar una suspensión celular a través de una superficie que contiene poros. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende células animales. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende células de rana, pollo, insecto, o nematodos. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende células de mamíferos. En algunas modalidades, la célula es una célula de ratón, perro, gato, caballo, rata, cabra o conejo. En algunas modalidades, la célula es una célula humana.

30 En algunas modalidades, la suspensión celular comprende una célula que comprende una pared celular. En algunas modalidades, la célula es una célula de planta, levadura, hongo, alga, o bacteria. En algunas modalidades, la célula es una célula vegetal. En algunas modalidades, la célula vegetal es una célula vegetal de cultivo, modelo, ornamental, vegetal, leguminosa, conífera, o de hierba. En algunas modalidades, la célula es una célula de levadura.
35 En algunas modalidades, la célula de levadura es una célula de *Candida* o *Saccharomyces*. En algunas modalidades, la célula es una célula fúngica. En algunas modalidades, la célula fúngica es una célula de *Aspergillus* o *Penicillium*. En algunas modalidades, la célula es una célula de alga. En algunas modalidades, la célula de alga es una célula de *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, o *Clorella*. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende células bacterianas. En algunas modalidades, la célula bacteriana es una célula bacteriana grampositiva. Las bacterias grampositivas tienen una pared celular que comprende una capa gruesa de peptidoglicano. En algunas
40 modalidades, la célula bacteriana es una célula bacteriana gramnegativa. Las bacterias gramnegativas tienen una pared celular que comprende una capa delgada de peptidoglicano entre una membrana celular citoplasmática interna y una membrana externa. En algunas modalidades, la célula bacteriana es una célula *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, o *Salmonella*.

45 La suspensión celular puede ser una población mixta o purificada de células. En algunas modalidades, la suspensión celular es una población celular mixta, tal como sangre completa, linfa, y/o células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunas modalidades, la suspensión celular es una población celular purificada. En algunas modalidades, la célula es una célula primaria o una célula de línea celular. En algunas modalidades, la célula es una célula sanguínea. En algunas modalidades, la célula sanguínea es una célula inmunitaria. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es un linfocito T, linfocito B, célula asesina natural (NK), célula dendrítica (DC), célula NKT, mastocitos, monocitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, o célula dendrítica DC2.4. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es un linfocito T humano primario. En algunas modalidades, las células de la sangre son un glóbulo rojo. En algunas
55 modalidades, la célula es una célula cancerosa. En algunas modalidades, la célula cancerosa es una célula de la línea celular cancerosa, tal como una célula de HeLa. En algunas modalidades, la célula cancerosa es una célula tumoral. En algunas modalidades, la célula cancerosa es una célula tumoral circulante (CTC). En algunas modalidades, la célula es una célula madre. Las células madre ilustrativas incluyen, sin limitación, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre embrionarias (ESC), células madre hepáticas, células madre cardíacas, células madre neurales, y células madre hematopoyéticas. En algunas modalidades, la célula es una célula fibroblástica, tal como un fibroblasto primario o un fibroblasto de prepucio humano de recién nacido (célula de Nuff). En algunas modalidades, la célula es una célula de línea celular inmortalizada, tal como una célula de HEK293 o una célula de CHO. En algunas modalidades, la célula es una célula de la piel. En algunas modalidades, la célula es una célula reproductora tal como un ovocito, óvulo, o cigoto. En algunas modalidades, la célula es una neurona.
60 En algunas modalidades, la célula es un conglomerado de células, tal como un embrión, dado que el conglomerado de células no se interrumpe al pasar a través del poro.

La composición de la suspensión celular (por ejemplo, osmolaridad, concentración de sal, contenido de suero, concentración de células, pH, etc.) puede afectar el suministro del compuesto. En algunas modalidades, la suspensión comprende sangre completa. Alternativamente, la suspensión celular es una mezcla de células en una solución salina fisiológica o un medio fisiológico que no sea sangre. En algunas modalidades, la suspensión celular comprende una solución acuosa. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende medio de cultivo celular, PBS, sales, azúcares, factores de crecimiento, productos derivados de animales, materiales de relleno, surfactantes, lubricantes, vitaminas, proteínas, quelantes, y/o un agente que afecta a la polimerización de la actina. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular es DMEM, OptiMEM, IMDM, RPMI, o X-VIVO. Adicionalmente, el tampón de solución puede incluir uno o más lubricantes (plurónicos u otros surfactantes) que pueden diseñarse para reducir o eliminar la obstrucción de la superficie y mejorar la viabilidad celular. Los surfactantes ilustrativos incluyen, sin limitación, poloxámero, polisorbatos, azúcares tales como manitol, suero derivado de animales, y proteína de albúmina.

En algunas configuraciones con ciertos tipos de células, las células pueden incubarse en una o más soluciones que ayudan en el suministro del compuesto al interior de la célula. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende un agente que afecta a la polimerización de la actina. En algunas modalidades, el agente que afecta a la polimerización de la actina es Latrunculina A, Citocalasina, y/o Colchicina. Por ejemplo, las células pueden incubarse en una solución de despolimerización tal como Lantrunculina A (0,1 µg/mL) durante 1 hora antes del suministro para despolimerizar el citoesqueleto de actina. Como ejemplo adicional, las células pueden incubarse en Colchicina (Sigma) a 10 µM durante 2 horas antes del suministro para despolimerizar la red de microtúbulos.

La viscosidad de la suspensión celular también puede afectar a los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la viscosidad de la suspensión celular varía de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa's a aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}$ Pa's o cualquier valor o intervalo de valores entre ellos. En algunas modalidades, la viscosidad está en el intervalo entre uno cualquiera de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa's a aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}$ Pa's, de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa's a aproximadamente $3,0 \times 10^{-3}$ Pa's, de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa's a aproximadamente $2,0 \times 10^{-3}$ Pa's, o de aproximadamente $8,9 \times 10^{-3}$ Pa's a aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ Pa's. En algunas modalidades, la viscosidad está en el intervalo entre cualquiera de aproximadamente 0,89 cP a aproximadamente 4,0 cP, de aproximadamente 0,89 cP a aproximadamente 3,0 cP, de aproximadamente 0,89 cP a aproximadamente 2,0 cP, o de aproximadamente 0,89 cP a aproximadamente 1,0 cP. En algunas modalidades, se observa un efecto de adelgazamiento por cizallamiento, en el que la viscosidad de la suspensión celular disminuye bajo condiciones de deformación por cizallamiento. La viscosidad puede medirse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, viscosímetros, tales como un viscosímetro capilar de vidrio, o reómetros. Un viscosímetro mide la viscosidad bajo una condición de flujo, mientras que un reómetro se usa para medir las viscosidades que varían con las condiciones de flujo. En algunas modalidades, la viscosidad se mide para una solución de adelgazamiento por cizallamiento tal como sangre. En algunas modalidades, la viscosidad se mide entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 45 °C. Por ejemplo, la viscosidad se mide a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C), temperatura fisiológica (por ejemplo, aproximadamente 37 °C), temperatura más alta que la fisiológica (por ejemplo, mayor que de aproximadamente 37 °C a 45 °C o más), temperatura reducida (por ejemplo, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 4 °C), o temperaturas entre estas temperaturas ilustrativas.

V. Compuestos a suministrar

En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a métodos para suministrar un compuesto a una célula. En algunas modalidades, el compuesto es un compuesto único. En algunas modalidades, el compuesto es una mezcla de compuestos. En algunas modalidades, el compuesto comprende un ácido nucleico. En algunas modalidades, el compuesto es un ácido nucleico. Los ácidos nucleicos ilustrativos incluyen, sin limitación, ácidos nucleicos recombinantes, ADN, ADN recombinante, ADNc, ADN genómico, ARN, ARNip, ARNm, ARNaa, miARN, ARNinc, ARNt, ARNhc, ARNm autoamplificante, y ácidos nucleicos peptídicos. En algunas modalidades, el ácido nucleico es homólogo a un ácido nucleico en la célula. En algunas modalidades, el ácido nucleico es heterólogo a un ácido nucleico en la célula. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende un transposón, y opcionalmente una secuencia que codifica una transposasa. En algunas modalidades, el compuesto es un plásmido. En algunas modalidades, el ácido nucleico es un ácido nucleico terapéutico. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica un polipéptido terapéutico. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica un informador o un marcador seleccionable. Los marcadores ilustrativos incluyen, sin limitación, proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), auceorina, beta-galactosidasa, uroporfirinógeno (urogen) III metiltransferasa (UMT), y luciferasa. Los marcadores seleccionables ilustrativos incluyen, sin limitación, Blastidina, G418/Geneticina, Higromicina B, Puromicina, Zeocina, Adenina fosforibosiltransferasa, y timidina cinasa.

En algunas modalidades, el compuesto comprende un complejo proteína-ácido nucleico. En algunas modalidades, el compuesto es un complejo proteína-ácido nucleico. En algunas modalidades, los complejos proteína-ácido nucleico, tales como las repeticiones palindrómicas cortas espaciadas regularmente agrupadas (CRISPR)-Cas9, se usan en aplicaciones de edición del genoma. Estos complejos contienen dominios de unión de ADN específicos de secuencia en combinación con nucleasas de escisión de ADN no específicas. Estos complejos permiten la edición dirigida del genoma, lo que incluye adicionar, interrumpir, o cambiar la secuencia de un gen específico. En algunas

modalidades, una CRISPR desactivada se usa para bloquear o inducir la transcripción de un gen diana. En algunas modalidades, el compuesto contiene una proteína Cas9 y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto incluye un ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 y un ARN guía o ADN donante. En algunas modalidades, el compuesto incluye una proteína transposasa y un ácido nucleico que comprende un transposón.

5 En algunas modalidades, el compuesto comprende una proteína o polipéptido. En algunas modalidades, el compuesto es una proteína o polipéptido. En algunas modalidades, la proteína o polipéptido es una proteína terapéutica, anticuerpo, proteína de fusión, antígeno, proteína sintética, marcador informador, o marcador seleccionable. En algunas modalidades, la proteína es una proteína editora de genes o nucleasa tal como una
 10 nucleasa de dedos de zinc (ZFN), nucleasa efectora similar a activador de transcripción (TALEN), meganucleasa, recombinasa CRE, recombinasa FLP, recombinasa R, integrasa, o transposasa. En algunas modalidades, las proteínas de fusión pueden incluir, sin limitación, fármacos de proteínas quiméricas tales como conjugados de fármacos de anticuerpos o proteínas de fusión recombinantes tales como proteínas marcadas con GST o estreptavidina. En algunas modalidades, el compuesto es un factor de transcripción. Los factores de transcripción
 15 ilustrativos incluyen, sin limitación, Oct5, Sox2, c-Myc, Klf-4, T-bet, GATA3, FoxP3, y RORyt.

En algunas modalidades, el compuesto comprende un antígeno. En algunas modalidades, el compuesto es un antígeno. Un antígeno es una sustancia que estimula una respuesta inmunitaria específica, tal como una respuesta inmunitaria celular o mediada por anticuerpos. Los antígenos se unen a los receptores expresados por las células inmunitarias, tales como los receptores de linfocitos T (TCR), que son específicos de un antígeno particular. La unión a los receptores de antígenos desencadena subsecuentemente vías de señalización intracelulares que conducen a vías efectoras inmunitarias aguas abajo, tales como activación celular, producción de citocinas, migración celular, secreción de factores citotóxicos, y producción de anticuerpos. En algunas modalidades, los antígenos se derivan de fuentes extrañas, tales como bacterias, hongos, virus, o alérgenos. En algunas modalidades, los antígenos se
 20 derivan de fuentes internas, tales como células cancerosas o autoproteínas (es decir, autoantígenos). Los autoantígenos son antígenos presentes en las células propias de un organismo. Los autoantígenos normalmente no estimulan una respuesta inmunitaria, pero pueden en el contexto de enfermedades autoinmunitarias, tales como la diabetes tipo I o la artritis reumatoide. En algunas modalidades, el antígeno es un neoantígeno. Los neoantígenos son antígenos que están ausentes en el genoma humano normal, pero que se crean dentro de las células oncogénicas como resultado de modificaciones de ADN específicas del tumor que dan como resultado la formación de nuevas secuencias de proteínas.

En algunas modalidades, la proteína o polipéptido es un marcador seleccionable o informador. Los marcadores ilustrativos incluyen, sin limitación, proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), acuorina, beta-galactosidasa, uroporfirinógeno (urogen) III metiltransferasa (UMT), y luciferasa. Los marcadores seleccionables ilustrativos incluyen, sin limitación, Blastidina, G418/Geneticina, Higromicina B, Puomicina, Zeocina, Adenina fosforibosiltransferasa, y timidina cinasa.

En algunas modalidades, el compuesto comprende un anticuerpo. En algunas modalidades, el compuesto es un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos para su uso en la presente descripción incluyen, sin limitación, anticuerpos humanos o humanizados, variantes de anticuerpos, anticuerpos marcados, fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab o F(ab)₂, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de simple cadena, anticuerpos multispecíficos, proteínas de fusión de anticuerpos, e inmunoadhesinas. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo conocido en la técnica, que incluyen IgA, IgG, IgE, IgD, o IgM.

En algunas modalidades, el compuesto comprende una molécula pequeña. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula pequeña. Las moléculas pequeñas ilustrativas incluyen, sin limitación, marcadores fluorescentes, colorantes, agentes farmacéuticos, metabolitos, adyuvantes, o radionucleótidos. En algunas modalidades, el agente farmacéutico es un fármaco terapéutico y/o agente citotóxico. En algunas modalidades, el adyuvante incluye, sin limitación, CpG, oligodesoxinucleótido, R848, lipopolisacárido (LPS), rhlL-2, anti-CD40 o CD40L, IL-12, dinucleótidos cíclicos, y estimulador de los agonistas de los genes de interferón (STING).

En algunas modalidades, el compuesto comprende una nanopartícula. Los ejemplos de nanopartículas incluyen nanopartículas de oro, puntos cuánticos, nanotubos de carbono, nanoconchas, dendrímeros, y liposomas. En algunas modalidades, la nanopartícula contiene una molécula terapéutica. En algunas modalidades, la nanopartícula contiene un ácido nucleico, tal como ARNm. En algunas modalidades, la nanopartícula contiene un marcador, tal como un marcador fluorescente o radiactivo.

En algunas modalidades, el compuesto comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas modalidades, el compuesto es un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas modalidades, el CAR es una fusión de un dominio de reconocimiento extracelular (por ejemplo, un dominio de unión al antígeno), un dominio transmembrana, y uno o más dominios de señalización intracelular. Tras el acoplamiento del antígeno, la porción de señalización intracelular del CAR puede iniciar una respuesta relacionada con la activación en una célula inmunitaria, tal es la liberación de citocinas o moléculas citolíticas. En algunas modalidades, el CAR es un receptor quimérico de antígenos de linfocitos T. En algunas modalidades, el CAR contiene un dominio de unión al antígeno

específico de un antígeno tumoral. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno CAR es un fragmento variable de anticuerpo de cadena única (scFv).

5 En algunas modalidades, el compuesto comprende una molécula marcada con fluorescencia. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula marcada con fluorescencia, tal como una molécula marcada con un fluorocromo tal como azul pacífico, Alexa 288, Cy5, o azul en cascada. En algunas modalidades, el compuesto es un radionucleótido, partícula de dextrano, microesfera magnética, o colorante impermeable. En algunas modalidades, el compuesto es una partícula de dextrano de 3 kDa marcada con PacBlue. En algunas modalidades, el compuesto es una partícula de dextrano de 10 kDa marcada con Alexa488. En algunas modalidades, el compuesto es una proteína etiquetada con fluoróforo de molécula pequeña. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula pequeña etiquetada con Alexa647.

15 En algunas modalidades, el compuesto comprende un virus o una partícula similar a un virus. En algunas modalidades, el compuesto es un virus o una partícula similar a un virus. En algunas modalidades, el virus es un retrovirus. En algunas modalidades, el virus es un virus terapéutico. En algunas modalidades, el virus es un virus oncolítico. En algunas modalidades, el virus o la partícula similar a un virus contiene ácido nucleico que codifica una molécula terapéutica, tal como un polipéptido terapéutico.

20 En algunas modalidades, el compuesto a suministrar se purifica. En algunas modalidades, el compuesto es al menos aproximadamente 60 % en peso (peso en seco) el compuesto de interés. En algunas modalidades, el compuesto purificado es al menos aproximadamente 75 %, 90 %, o 99 % el compuesto de interés. En algunas modalidades, el compuesto purificado es al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 98 %, 99 %, o 100 % (p/p) el compuesto de interés. La pureza se determina mediante cualquier método conocido, que incluye, sin limitación, cromatografía de columna, cromatografía de capa fina, análisis de HPLC, NMR, espectrometría de masas, o SDS-PAGE. El ADN o ARN purificado se define como ADN o ARN que está libre de ácidos nucleicos exógenos, carbohidratos, y lípidos.

VI. Perturbaciones celulares

30 En determinados aspectos, la presente descripción se refiere a pasar una suspensión celular a través de una superficie que contiene poros, en donde los poros deforman la célula, y provocan una perturbación de la célula. La deformación puede ser provocada por, por ejemplo, la presión inducida por la deformación mecánica y/o las fuerzas de cizallamiento. La perturbación en la célula es una ruptura en la célula que permite que el material del exterior de la célula se mueva hacia dentro de la célula (por ejemplo, un agujero, desgarro, cavidad, abertura, poro, rotura, espacio, perforación). En algunas modalidades, la perturbación es una perturbación dentro de la membrana celular. En algunas modalidades, la perturbación es transitoria. En algunas modalidades, la perturbación celular dura de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a aproximadamente 2 horas, o cualquier tiempo o intervalo de tiempo entre ellos. En algunas modalidades, la perturbación celular dura de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora. En algunas modalidades, la perturbación celular dura entre uno cualquiera de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$, o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ segundos. En alguna modalidad, la perturbación celular dura por uno cualquiera de aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$ segundos. Las perturbaciones celulares (por ejemplo, poros o agujeros) creadas por los métodos descritos en la presente descripción no se forman como resultado del ensamblaje de subunidades de proteínas para formar una estructura de poro multimérica tal como la creada por el complemento o hemolisinas bacterianas.

55 A medida que la célula pasa a través del poro de la superficie, la deformación produce temporalmente una lesión a la membrana celular que provoca la difusión pasiva del material a través de la perturbación. En algunas modalidades, la célula solo se deforma durante un breve período de tiempo, en el orden de 100 μ s para minimizar la posibilidad de activar las vías apoptóticas a través de mecanismos de señalización celular, aunque son posibles otras duraciones (por ejemplo, que están en el intervalo de nanosegundos a horas). En algunas modalidades, la célula se deforma durante de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a aproximadamente 2 horas, o cualquier tiempo o intervalo de tiempo entre ellos. En algunas modalidades, la célula se deforma durante de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora. En algunas modalidades, la célula se deforma entre uno cualquiera de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$,

o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ segundos. En alguna modalidad, la célula se deforma por uno cualquiera de aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$ segundos. En algunas modalidades, deformar la célula incluye deformar la célula durante un tiempo que está en el intervalo de, sin limitación, de aproximadamente 1 μ s a aproximadamente 750 ms, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 μ s, 10 μ s, 50 μ s, 100 μ s, 500 μ s, o 750 μ s.

En algunas modalidades, el paso del compuesto hacia dentro de la célula ocurre simultáneamente con el pase de la célula a través del poro y/o la perturbación de la célula. En algunas modalidades, el paso del compuesto hacia dentro de la célula ocurre después de que la célula pasa a través del poro. En algunas modalidades, el paso del compuesto hacia dentro de la célula ocurre en el orden de los minutos después de que la célula pasa a través del poro de la superficie. En algunas modalidades, el paso del compuesto hacia dentro de la célula ocurre de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 30 minutos después de que la célula pasa a través del poro. Por ejemplo, el paso del compuesto hacia dentro de la célula ocurre de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos después de que la célula pasa a través del poro. En algunas modalidades, el paso del compuesto hacia dentro de la célula ocurre de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 5 minutos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 50 segundos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 10 segundos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 0,1 segundo después de pasar a través del poro. En algunas modalidades, el paso del compuesto hacia dentro de la célula ocurre de aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$ segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 50 segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos después de que la célula pasa a través del poro. En algunas modalidades, una perturbación en la célula después de que pasa a través de los poros se corrige dentro del orden de aproximadamente cinco minutos después de que la célula pasa a través del poro.

En algunas modalidades, la viabilidad celular después de pasar a través de un poro de la superficie es de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 %. En algunas modalidades, la viabilidad celular después de pasar a través de los poros es de al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 %. En algunas modalidades, la viabilidad celular se mide de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 10 días después de que la célula pasa a través del poro. Por ejemplo, la viabilidad celular se mide de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas después de que la célula pasa a través del poro. En algunas modalidades, la viabilidad celular se mide de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 30 segundos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 0,1 segundo después de que la célula pasa a través del poro. En algunas modalidades, la viabilidad celular se mide de aproximadamente 1,5 horas a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 2 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 horas después de que la célula pasa a través del poro. En algunas modalidades, la viabilidad celular se mide de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 5 horas, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 10 días después de que la célula pasa a través del poro.

VII. Parámetros de suministro

En ciertos aspectos, la presente descripción se refiere a métodos para suministrar un compuesto a una célula que incluye las etapas de pasar una suspensión celular a través de una superficie que contiene poros, en donde los poros deforman la célula, provocan una perturbación de la célula, y ponen en contacto la suspensión celular con el compuesto. La suspensión celular puede ponerse en contacto con el compuesto antes, simultáneamente, o después de pasar a través del poro. Las células pueden pasar a través de los poros suspendidas en una solución que incluye el compuesto a suministrar, aunque el compuesto puede adicionarse a la suspensión celular después de que las células pasan a través de los poros. En algunas modalidades, el compuesto que se suministra se recubre en la superficie.

Varios parámetros pueden influir en el suministro del compuesto a la célula. Por ejemplo, las dimensiones del poro,

el ángulo de entrada del poro, las propiedades superficiales de los poros (por ejemplo, rugosidad, modificación química, hidrófilo, hidrófobo, etc.), los regímenes de flujo de operación (por ejemplo, el tiempo de tránsito de la célula por el poro), la concentración celular, la concentración del compuesto en la suspensión celular, y la cantidad de tiempo que la célula se recupera o incuba después de pasar por los poros puede afectar el pase del compuesto suministrado hacia dentro de la célula. Los parámetros adicionales que influyen en el suministro del compuesto en la célula pueden incluir la velocidad de la célula en el poro, la velocidad de cizallamiento en el poro, el componente de velocidad que es perpendicular a la velocidad de flujo, y el tiempo en el poro. Tales parámetros pueden diseñarse para controlar el suministro del compuesto. En algunas modalidades, la concentración celular está en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 10^{12} células/mL o cualquier concentración o intervalo de concentraciones entre ellas. Por ejemplo, la concentración celular está en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 10^{10} células/mL, de aproximadamente 10 a aproximadamente 10^8 células/mL, de aproximadamente 10 a aproximadamente 10^6 células/mL, de aproximadamente 10 a aproximadamente 10^4 células/mL, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 10^2 células/mL. En algunas modalidades, la concentración celular está en el intervalo de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^{12} células/mL, de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{12} células/mL, de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} células/mL, de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} células/mL, o de aproximadamente 10^{10} a aproximadamente 10^{12} células/mL. Las concentraciones del compuesto a suministrar pueden estar en el intervalo de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 1 g/mL o cualquier concentración o intervalo de concentraciones entre ellas. Por ejemplo, la concentración del compuesto puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 500 mg/mL, de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 250 mg/mL, de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 1 mg/mL, de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 500 μ g/mL, de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 250 μ g/mL, de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 1 μ g/mL, de aproximadamente 10ng/mL a aproximadamente 500 ng/mL, de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 250 ng/mL, o de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL. En algunas modalidades, la concentración del compuesto puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 1 g/mL, de aproximadamente 250 ng/mL a aproximadamente 1 g/mL, de aproximadamente 500 ng/mL a aproximadamente 1 g/mL, de aproximadamente 1 μ g/mL a aproximadamente 1 mg/mL, de aproximadamente 250 μ g/mL a aproximadamente 1 g/mL, de aproximadamente 500 μ g/mL a aproximadamente 1 g/mL, de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 1 g/mL, de aproximadamente 250 mg/mL a aproximadamente 1 g/mL, de aproximadamente 500 mg/mL a aproximadamente 1 g/mL, o de aproximadamente 750 mg/mL a aproximadamente 1 g/mL. Las concentraciones del compuesto a suministrar pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 2 M. Por ejemplo, la concentración del compuesto puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 500 μ M, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 250 μ M, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 μ M, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 500 nM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 250 nM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 nM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 10 nM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 5 nM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 nM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 750 pM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 500 pM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 250 pM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 pM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 50 pM, de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 25 pM, o aproximadamente 1 pM a aproximadamente 10 pM. En algunas modalidades, la concentración del compuesto puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 pM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 10 pM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 25 pM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 50 pM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 250 pM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 500 pM a aproximadamente 2M, de aproximadamente 750 pM a aproximadamente 2M, de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 2M, de aproximadamente 10n M a aproximadamente 2M, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 2M, de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 2M, de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 2M, de aproximadamente 500 μ M a aproximadamente 2M, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2M, o de aproximadamente 500mM a aproximadamente 2M.

La temperatura usada en los métodos de la presente descripción puede ajustarse para afectar el suministro del compuesto y la viabilidad celular. En algunas modalidades, el método se realiza entre aproximadamente -5 °C y aproximadamente 45 °C. Por ejemplo, los métodos pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C), temperatura fisiológica (por ejemplo, aproximadamente 37 °C), temperatura más alta que la fisiológica (por ejemplo, mayor que de aproximadamente 37 °C a 45 °C o más), o temperatura reducida (por ejemplo, de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 4 °C), o temperaturas entre estas temperaturas ilustrativas.

Pueden utilizarse varios métodos para conducir las células a través de los poros. Por ejemplo, una bomba puede aplicar presión en el lado de entrada (por ejemplo, un cilindro de gas, o un compresor), una bomba de vacío puede aplicar un vacío en el lado de salida, la acción capilar puede aplicarse a través de un tubo, y/o el sistema puede alimentarse por gravedad. También pueden usarse sistemas de flujo basados en desplazamiento (por ejemplo, bomba de jeringa, bomba peristáltica, jeringa o pipeta manual, pistones, etc.). En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión positiva o presión negativa. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión constante o presión variable. En algunas modalidades, se aplica

presión mediante el uso de una jeringa. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de una bomba. En algunas modalidades, la bomba es una bomba peristáltica. En algunas modalidades, se aplica presión mediante el uso de un vacío. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión capilar. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante presión arterial. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros mediante fuerza g. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo un diferencial de presión que está en el intervalo de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 500 psi o cualquier presión o intervalo de presiones entre ellas. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo un diferencial de presión que está en el intervalo de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 500 psi, de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 400 psi, de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 300 psi, de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 200 psi, de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 100 psi, de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 50 psi, de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 25 psi, de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 10 psi, de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 5 psi, o de aproximadamente 0,05 psi a aproximadamente 1 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo un diferencial de presión de al menos o menos de aproximadamente 5 psi, aproximadamente 10 psi, o aproximadamente 20 psi. En algunas modalidades, las células se pasan a través de los poros bajo un diferencial de presión de al menos o menos de aproximadamente 2 psi, aproximadamente 2,5 psi, o aproximadamente 3 psi.

En algunas modalidades, el flujo de fluido dirige las células a través de los poros. En algunas modalidades, el flujo de fluido es un flujo turbulento antes de que las células pasen a través del poro. El flujo turbulento es un flujo de fluido en el que la velocidad en un punto dado varía erráticamente en magnitud y dirección. En algunas modalidades, el flujo de fluido a través del poro es un flujo laminar. El flujo laminar implica un flujo ininterrumpido en un fluido cerca de un límite sólido en el que la dirección del flujo en cada punto permanece constante. En algunas modalidades, el flujo de fluido es un flujo turbulento después de que las células pasan a través del poro.

La velocidad a la que las células pasan a través de los poros puede variar. En algunas modalidades, las células pasan a través de los poros a una velocidad celular uniforme. En algunas modalidades, las células pasan a través de los poros a una velocidad celular fluctuante. Las células pasan a través de los poros a una velocidad de al menos aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 5 m/s, o cualquier velocidad o intervalo de velocidades entre ellas. En algunas modalidades las células pasan a través de los poros a un intervalo de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 5 m/s, de aproximadamente 1 mm/s a aproximadamente 5 m/s, o de aproximadamente 1 m/s a aproximadamente 5 m/s. En algunas modalidades las células pasan a través de los poros a un intervalo de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 4 m/s, de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 3 m/s, de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 2 m/s, de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 1 m/s, de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 750 mm/s, de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 500 mm/s, de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 250/s, o de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 1 mm/s. En algunas modalidades, las células pueden pasar a través de los poros a una velocidad mayor que aproximadamente 5 m/s. El procesamiento celular puede variar de entre menos de aproximadamente 1 célula/segundo por poro a más de aproximadamente 10^{20} células/segundo por poro. En algunas modalidades, la superficie permite un procesamiento celular de alto rendimiento, en el orden de miles de millones de células por segundo o minuto.

En algunas modalidades, las células pasan los poros en una dirección. En algunas modalidades, las células pasan a través de los poros en más de una dirección; por ejemplo, las células pueden forzarse a través del poro en una dirección y después a través del poro en otra dirección; por ejemplo, al extraer las células a través del poro mediante el uso de una jeringa y después expulsarlas a través de los poros. En algunas modalidades, las células se pasan a través de la superficie con poros más de una vez.

En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de un módulo más grande. En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de una jeringa, tal como una jeringa de plástico o vidrio. En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de un sujetador de filtros de plástico. En algunas modalidades, la superficie se contiene dentro de una punta de pipeta.

VIII. Aplicaciones

En algunas modalidades, un compuesto o mezcla de compuestos se suministra a una célula para producir un efecto deseado. En algunas modalidades, un antígeno y/o molécula inmunoestimuladora se suministra a una célula para producir células presentadoras de antígenos profesionales, por ejemplo, células dendríticas, con niveles de actividad mejorados en comparación con los métodos convencionales de estimulación. En algunas modalidades, se suministra una mezcla de antígenos a una célula. En algunas modalidades, una célula dendrítica, linfocito T, o linfocito B se pasa a través de la superficie que contiene poros y entra en contacto con una solución que comprende un antígeno diana. Las células pueden entrar en contacto con el antígeno antes, durante, y/o después de pasar a través de la superficie que contiene los poros. En algunas modalidades, el antígeno diana es un antígeno de células cancerosas o una mezcla de antígenos de células cancerosas. En algunas modalidades, el antígeno es un antígeno de una enfermedad infecciosa. En algunas modalidades, el antígeno es un antígeno de una autoproteína. Por ejemplo, el antígeno suministrado puede ser una proteína comúnmente expresada que se conoce que se asocia con

una enfermedad particular o un antígeno específico del paciente obtenido a partir de una biopsia. En algunas modalidades, las células presentadoras de antígenos producidas por el método descrito en la presente descripción contribuyen al aumento de los niveles de inmunidad mediados por linfocitos T y B contra un antígeno diana. Tal método podría emplearse por lo tanto como un medio para activar el sistema inmunitario en respuesta al cáncer o a infecciones o en el desarrollo de vacunas. Una modalidad del objeto actual incluye un sistema en el que las células dendríticas, linfocitos T o linfocitos B, aislados de la sangre de un paciente, se tratan mediante los métodos de la presente descripción, ex vivo, para activarlos contra un antígeno particular y después se reintroducen en el torrente sanguíneo del paciente. En algunas modalidades, los antígenos cancerígenos son de un paciente con un cáncer de la sangre, tal como linfoma de linfocitos B, o con un cáncer tal como melanoma o cáncer de páncreas. En algunas modalidades, los antígenos cancerígenos se suministran directamente al citoplasma de DC, y explotan de esta manera la vía de presentación de antígeno MHC-I e inducen una respuesta citotóxica de linfocitos T (CTL) en el paciente. Estos linfocitos T activados buscan y destruyen las células cancerosas que expresan el antígeno diana. En algunas modalidades, el método puede implementarse en un laboratorio hospitalario típico con un técnico mínimamente entrenado. En algunas modalidades, puede usarse un sistema de tratamiento operado por el paciente. En algunas modalidades, el método se implementa mediante el uso de un sistema de tratamiento sanguíneo en línea, en el que la sangre se desvía directamente de un paciente, pasa a través de la superficie que contiene los poros, lo que resulta en el suministro de compuestos a las células sanguíneas, y se transfunde directamente de nuevo al paciente después del tratamiento.

Los métodos de la presente descripción pueden ser útiles en aplicaciones de terapia génica. En algunas modalidades, los métodos de la presente descripción se usan para corregir una enfermedad genética, reemplazar un producto génico deficiente, o para proporcionar un ácido nucleico terapéutico. En algunas modalidades, la terapia génica implica suministrar un ácido nucleico a una célula que codifica un gen funcional, terapéutico para reemplazar un gen mutado. El gen es cualquier gen que se reconozca como útil. Los ejemplos representativos incluyen genes de origen mamífero que codifican, por ejemplo, proteínas o ARN útiles; proteínas virales tales como la timidina cinasa de herpes y la toxina de cólera bacteriana para la terapia citotóxica. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se suministran a las células. Los ácidos nucleicos pueden suministrarse en células difíciles de suministrar tales como células madre, primarias, e inmunitarias. El ácido nucleico puede incluir ácidos nucleicos pequeños o ácidos nucleicos muy grandes, tales como plásmidos o cromosomas. El suministro cuantitativo a las células de una cantidad conocida de una construcción génica para estudiar el nivel de expresión de un gen de interés y su sensibilidad a la concentración también puede lograrse fácilmente. En algunas modalidades, el suministro de cantidades conocidas de secuencias de ADN junto con una cantidad conocida de enzimas que mejoran la recombinación del ADN puede usarse para lograr un suministro estable, recombinación homóloga y mutagénesis específica del sitio más eficientes.

Los métodos y dispositivos descritos en la presente descripción también pueden ser útiles para el suministro cuantitativo de ARN para estudios de ARN más eficientes y concluyentes. Algunas modalidades incluyen el suministro de ARN de interferencia pequeño (ARNip) al citoplasma de una célula. En algunas modalidades, el ARN puede suministrarse en una célula para el silenciamiento de ARN sin la necesidad de liposomas. Las cantidades conocidas de moléculas de ARN junto con las cantidades conocidas de moléculas dicer pueden suministrarse para lograr niveles de ARN eficientes, estandarizados en múltiples líneas celulares en diferentes condiciones. En algunas modalidades, el ARNm puede suministrarse a las células para estudiar aspectos de la expresión génica regulados a nivel postranscripcional. En algunas modalidades, cantidades conocidas de ARN marcado que se suministran a una célula pueden usarse para estudiar la vida media de los ARN en las células. En algunas modalidades, el ARN autoamplificante (ARNaa) se suministra a una célula. Los ARNaa expresan una proteína de interés mediante la replicación de sus secuencias citoplasmáticamente sin integrarse en el genoma del hospedero. En algunas modalidades, los ARNaa suministrados codifican antígeno(s) de interés. En algunas modalidades, los ARNaa se usan para modificar continuamente la función celular, por ejemplo a través de la expresión de proteínas inhibitoras, estimuladoras, o antiapoptóticas.

Para fines de cribado, imágenes, o diagnóstico, el método de la presente descripción puede usarse para marcar células. En algunas modalidades, las cantidades conocidas de proteínas etiquetadas pueden suministrarse para estudiar las interacciones proteína-proteína en el entorno celular. Puede lograrse el suministro de anticuerpos marcados en células vivas para inmunotinción e inmunotransferencia Western basada en fluorescencia. Un método para marcar una célula se lleva a cabo al pasar una célula a través de la superficie que contiene poros y poner en contacto la célula con una solución que comprende un marcador detectable. En algunas modalidades, el marcador detectable comprende una molécula fluorescente, un radionúclido, puntos cuánticos, nanopartículas de oro, o microesferas magnéticas. En algunas modalidades, los nanomateriales modificados genéticamente se suministran para aplicaciones de imágenes de células vivas. En algunas modalidades, el compuesto es una molécula pequeña etiquetada con una etiqueta fluorescente para su uso en ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Los ensayos FRET pueden usarse para medir las interacciones de proteínas para aplicaciones de descubrimiento de fármacos.

En algunas modalidades, la diferenciación celular dirigida se logra mediante la introducción de proteínas, ARNm, ADN y/o factores de crecimiento para inducir la reprogramación celular y producir iPSC, líneas de células madre transgénicas, u organismos transgénicos. Los métodos descritos en la presente descripción, por ejemplo, el paso de

células madre o células progenitoras tales como células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a través de una superficie que contiene poros pueden usarse para suministrar factores de diferenciación en tales células. En algunas modalidades, después de la captación de los factores introducidos, las células proceden a una vía de diferenciación dictada por el factor introducido.

5 En algunas modalidades, los azúcares se suministran a las células para mejorar la crioconservación de las células, tales como ovocitos.

IX. Modalidades adicionales

10 Cualquiera de los métodos descritos anteriormente se llevan a cabo in vitro, ex vivo, o in vivo. Para aplicaciones in vivo, el dispositivo puede implantarse en una cavidad vascular, por ejemplo, una endoprótesis en línea en una arteria o vena. En algunas modalidades, los métodos se usan como parte de un sistema de cabecera para el tratamiento ex vivo de las células del paciente y la reintroducción inmediata de las células al paciente.

15 En otras modalidades, se usa un tratamiento de combinación, por ejemplo, los métodos descritos en la presente descripción seguidos o precedidos por electroporación (un tipo de transfección osmótica en la que se usa una corriente eléctrica para producir agujeros temporales en las membranas celulares, lo que permite la entrada de ácidos nucleicos o macromoléculas). En algunas modalidades, la célula se pasa a través de un campo eléctrico generado por al menos un electrodo cerca de la superficie. En algunas modalidades, los electrodos se localizan en un lado de la superficie. En algunas modalidades, los electrodos se localizan en ambos lados de la superficie. En algunas modalidades, el campo eléctrico está de aproximadamente 0,1 kV/m a aproximadamente 100MV/m, o cualquier número o intervalo de números entre ellos. En algunas modalidades, se usa un circuito integrado para proporcionar una señal eléctrica para accionar los electrodos. En algunas modalidades, las células se exponen al campo eléctrico por un ancho de pulso de aproximadamente 1 ns a aproximadamente 1 s y un período de aproximadamente 100 ns a aproximadamente 10 s o cualquier tiempo o intervalo de tiempo entre ellos.

20 También pueden implementarse varias técnicas de ensayo de pretratamiento y posclasificación, lo que permite el desarrollo de ensayos continuos de alto rendimiento para la detección de fármacos y el diagnóstico. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción pueden implementarse en serie con un módulo de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Esto puede permitir el suministro y clasificación de las células deseadas en el mismo sistema, en tiempo real. Por ejemplo, los métodos y dispositivos descritos en la presente descripción también pueden incluir módulos de sensor y/o clasificadores (por ejemplo, ópticos, eléctricos, y magnéticos). En algunas modalidades, los filtros o clasificadores de tamaño se colocan aguas arriba de la superficie para separar las células antes de que pasen a través de la superficie. Por ejemplo, la superficie como se describió en la presente descripción puede estar en línea con un dispositivo de leucoforesis que separa los glóbulos blancos de una muestra de sangre. En una modalidad adicional, las superficies descritas en la presente descripción pueden incorporarse dentro de manipuladores de líquido o pipetas. En algunas modalidades, la superficie se implementa en un formato de biorreactor para el cultivo de células y/o la fabricación de biomoléculas. Las células modificadas por los métodos de la presente descripción pueden usarse en la bioproducción de fármacos u otras moléculas terapéuticas.

25 En algunas modalidades, la superficie tiene forma de un tubo a través del cual fluye una suspensión celular. En algunas modalidades, la superficie con forma de tubo contiene un gradiente de tamaños de los poros a lo largo de su longitud, lo que permite el suministro selectivo a diferentes tipos de células a medida que la suspensión celular fluye a través de ella.

30 Algunos aspectos de la presente descripción implican una célula que comprende una perturbación, en donde la célula se produce al pasar la célula a través de una superficie que contiene poros, en donde los poros deforman la célula y provocan de esta manera la perturbación de manera que un compuesto es capaz de entrar en la célula. En algunas modalidades, la célula se pasa a través de un campo eléctrico generado por al menos un electrodo cerca de la superficie.

X. Dispositivos y kits

35 Algunos aspectos de la presente descripción implican un dispositivo para suministrar un compuesto dentro de una célula, que incluye una superficie que contiene poros, en donde dichos poros se configuran de manera que una célula suspendida en una solución puede pasar a través de estos, en donde dichos poros deforman la célula y provocan de esta manera una perturbación de la célula de manera que el compuesto entra a la célula. El dispositivo puede incluir cualquier modalidad descrita para los métodos descritos anteriormente, que incluye una superficie que tiene poros, suspensiones celulares, perturbaciones celulares, parámetros de suministro, y/o aplicaciones, etc. En algunas modalidades, al menos un electrodo está cerca de la superficie para generar un campo eléctrico.

40 En algunas modalidades, el dispositivo es un TRANSWELL™, o soporte permeable. En algunas modalidades, el TRANSWELL™ puede usarse en aplicaciones de cribado de alto rendimiento. Por ejemplo, un sistema de filtro TRANSWELL™ de múltiples pocillos puede usarse para cribar diferentes compuestos de fármacos candidatos para

un criterio de valoración funcional o terapéutico particular. En algunas modalidades, cada pocillo contiene un compuesto diferente que se va a probar. Las células pasan a través de los poros del filtro TRANSWELL™, adquieren perturbaciones celulares, y subsecuentemente entran en la solución basolateral que contiene el compuesto o mezcla de compuestos que van a suministrarse. Estos métodos pueden implementarse como un método de alto rendimiento para cribar compuestos terapéuticos potenciales para identificar tratamientos nuevos o comprender mecanismos de enfermedades. Por ejemplo, un formato TRANSWELL™ de 96 pocillos puede usarse para realizar un cribado de alto rendimiento mediante los métodos de la presente descripción.

En algunas modalidades, el dispositivo contiene múltiples superficies en serie. Las múltiples superficies pueden ser homogéneas o heterogéneas en tamaño, forma, y dimensiones de los poros y/o número, lo que permite de esta manera el suministro simultáneo de una gama de compuestos a diferentes tipos de células.

También se proporcionan kits o artículos de fabricación para su uso en los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, los kits comprenden las composiciones descritas en la presente descripción (por ejemplo, una superficie que contiene poros, suspensión celular, y/o compuestos a suministrar) en un empaque adecuado. Los materiales de empaque adecuados se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, viales (tales como viales sellados), recipientes, ampollas, botellas, frascos, embalajes flexibles (por ejemplo, bolsas de Mylar o de plástico selladas), y similares. Estos artículos de fabricación pueden esterilizarse y/o sellarse.

La presente descripción también proporciona kits que comprenden componentes de los métodos descritos en la presente descripción y pueden comprender, además, instrucción o instrucciones para realizar dichos métodos. Los kits descritos en la presente descripción pueden incluir, además, otros materiales, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones para realizar cualquier método descrito en la presente descripción.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan con el propósito de ilustrar varias modalidades de la descripción y no pretenden limitar la presente descripción de ninguna manera. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente descripción se adapta bien para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como también esos objetos, fines y ventajas inherentes a la presente descripción.

Ejemplo 1: Suministro de partículas de dextrano a células HeLa

Introducción

Para evaluar el suministro de moléculas mediadas por filtro a las células, células HeLa mezcladas con partículas de dextrano fluorescentes se pasaron a través de filtros que contenían poros de tamaños definidos, y el suministro de partículas intracelulares se evaluó mediante análisis por FACS.

Materiales y métodos

Los filtros de membrana de policarbonato se obtuvieron de STERLITECH™ (PCT8013100). Estos filtros de policarbonato se generan mediante la exposición de la película de carbonato a partículas cargadas en un reactor nuclear para crear poros de tamaño de los poros relativamente uniforme pero de distribución aleatoria. El diámetro de los poros resultantes estuvo en el intervalo de 0,010 µm a 35 µm. Los poros del filtro tenían aproximadamente 10 µm de grosor. Las imágenes ilustrativas del filtro de policarbonato y los poros del filtro se muestran en las Figuras 1A y 1B. Los filtros con tamaños de los poros de 8 µm, 10 µm, 12 µm, y 14 µm se usaron en los estudios descritos en la presente descripción. Los materiales adicionales usados en los experimentos de suministro por filtro se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1: Materiales de suministro por filtro

Material	Fuente
Paño sujetador de filtros de plástico (cierres luer):	P/N - 4317
Jeringa (cierres luer)	Grainger: 19G342
Medio OptiMEM	Life Technologies
PBS	Life Technologies
Dextrano 3 kDa-PacBlue	Life Technologies
Dextrano 10 kDa-Alexa 488	Life Technologies
Fórceps	NA

Las células HeLa se suspendieron en medio optiMEM a 4×10^6 células/mL. Se tomaron por pipeta 100 µL de las células para su uso como controles negativos. El filtro de membrana de policarbonato se resuspendió en PBS mediante el uso de fórceps para humedecer el filtro de membrana. El sujetador de filtros de plástico se descapsuló,

el filtro se colocó en la superficie interior con la cara brillante orientada hacia arriba, y el sujetador de filtros se volvió a tapar. Se adicionaron 200 µL de células mezcladas con partículas de dextrano en el sujetador de filtros. El dextrano se resuspendió a 0,2 mg/mL en 5 mL de células a 4×10^6 células/mL. Para el suministro a presión constante, se usó un sistema de suministro de gas nitrógeno ajustado al regulador de presión. El flujo del filtro se recolectó en una placa de 24 pocillos o un tubo de FACS. Antes del análisis por FACS, todas las muestras se centrifugaron y se lavaron tres veces a 400 rcf durante 4 minutos a 4 °C para eliminar el dextrano extracelular. Para prepararse para el análisis de FACS, se realizaron las siguientes etapas. En primer lugar, se preparó el tampón de FACS (PBS + concentración final: FBS al 1 % + EDTA 2 nM) y se adicionó yoduro de propidio (dilución 1:100) inmediatamente antes del uso. Se adicionaron 400 µL de tampón de FACS por tubo y se resuspendieron las células. Las tensiones de los canales de fluorescencia, de dispersión lateral y de dispersión frontal de la citometría de flujo se ajustaron para visualizar todos los eventos celulares y se registraron 10 000 eventos/muestra. Las células mezcladas con partículas de dextrano, pero no pasadas a través de los filtros, se usaron como un control del suministro de partículas a través de la endocitosis. Estas células tuvieron contacto con el colorante pero no se pasaron a través de los filtros. Todas las demás etapas fueron las mismas para los controles de endocitosis. Las muestras de control negativo no tenían contacto con el colorante, pero se sometieron a las mismas etapas que las muestras experimentales.

Resultados

20 Eficiencia de suministro de partículas de dextrano a células HeLa a través de poros de filtro de tamaño 8 µm, 10 µm, 12 µm, y 14 µm.

25 Las células HeLa mezcladas con partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue y 10 kDa Alexa 488 se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 8 µm, 10 µm, 12 µm, y 14 µm a baja presión (5 psi, 10 psi, o 20 psi). Los gráficos de citometría de flujo ilustrativos que representan las células después del suministro se muestran en las Figuras 2A-G. Las Figuras 2A-C representan las células que pasaron a través de poros de filtro de tamaño 14 µm (Figura 2A), 12 µm (Figura 2B), y 10 µm (Figura 2C) por debajo de 5 psi. Las Figuras 2E y 2G representan las células que pasan a través de los poros del filtro de 12 µm por debajo de 10 psi (Figura 2E) y 20 psi (Figura 2G). Las Figuras 2D y 2F representan los gráficos del control de endocitosis (Figura 2D) y control negativo (Figura 2F). Las células que contienen tanto las partículas de dextrano de 3 kDa como de 10 kDa después del suministro por filtro se indican mediante tinción celular doble positiva para PacBlue y Alexa 488 (cuadrante Q2). La eficiencia de suministro, como se indica por el porcentaje de células positivas tanto para las partículas de dextrano de 3 kDa como de 10 kDa después del suministro por filtro, se muestra en la Tabla 2 más abajo. La eficiencia del suministro de las partículas de dextrano varió de manera predecible con las variaciones de presión y de tamaño de los poros, con el suministro más alto (86 %) observado para los poros de 8 µm a 5 psi.

Tabla 2: Eficiencia de suministro a células HeLa

% de suministro	Poros de 8 µm	Poros de 10 µm	Poros de 12 µm	Poros de 14 µm
5 psi	86	34	26	10
10 psi	48	56	29	-
20 psi	74	65	58	-
Endocitosis	5	2	2	2
Control negativo	0	0	0	0

50 La viabilidad celular se midió después del suministro por filtro. La viabilidad celular, como se indica por el porcentaje de células vivas después del suministro por filtro, se muestra en la Tabla 3 más abajo. La viabilidad celular para las células que pasan a través de los filtros disminuyó con el aumento de la presión aplicada, con 5 psi que produjo la viabilidad celular más alta para cada tamaño de los poros. La viabilidad celular disminuyó en las células que pasaron a través de los filtros en comparación con el control de endocitosis. La viabilidad celular varió de forma predecible con las variaciones de presión y de tamaño de los poros.

Tabla 3: Viabilidad de células HeLa después del tratamiento

% de viabilidad	Poros de 8 µm	Poros de 10 µm	Poros de 12 µm	Poros de 14 µm
5 psi	47	74	95	78
10 psi	34	64	92	-
20 psi	12	59	88	-
Endocitosis	95	92	95	92
Control negativo	93	92	97	90

65 Ejemplo 2: Suministro de partículas de dextrano a linfocitos T humanos a través de poros de filtro de tamaño 5 µm.

Introducción

Para evaluar el suministro de moléculas mediadas por filtro en células inmunitarias primarias, los linfocitos T humanos primarios mezclados con partículas de dextrano fluorescentes se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 5 μm y el suministro de partículas intracelulares se determinó mediante análisis por FACS. Se comparó el

5 suministro de partículas de dextrano mediadas por filtro a linfocitos T humanos primarios bajo presión manual por jeringa o presión constante.

Materiales y métodos

10 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron primero a partir de sangre humana fresca mediante la separación por ficoll. A continuación, los linfocitos T se separaron de las PBMC mediante selección negativa mediante el uso de una columna magnética. Los linfocitos T se suspendieron en medio optiMEM a 4×10^6 células/mL. Se tomaron por pipeta 100 μL de las células para su uso como controles negativos. El filtro de membrana de policarbonato se resuspendió en PBS mediante el uso de fórceps para humedecer el filtro de

15 membrana. El sujetador de filtros de plástico se descapsuló, el filtro se colocó en la superficie interior con la cara brillante orientada hacia arriba, y el sujetador de filtros se volvió a tapar. Se adicionaron 200 μL de células mezcladas con partículas de dextrano en el sujetador de filtros. El dextrano se resuspendió a 0,2 mg/mL en 5 mL de células a 4×10^6 células/mL. Para el suministro a presión constante, se usó un sistema de suministro de gas nitrógeno ajustado al regulador de presión. El flujo del filtro se recolectó en una placa de 24 pocillos o un tubo de FACS. Antes del análisis por FACS, todas las muestras se centrifugaron y se lavaron tres veces a 400 rcf durante 4 minutos a 4

20 $^{\circ}\text{C}$ para eliminar el dextrano extracelular. Para prepararse para el análisis de FACS, se realizaron las siguientes etapas. En primer lugar, se preparó el tampón de FACS (PBS + concentración final: FBS al 1 % + EDTA 2 nM) y se adicionó yoduro de propidio (dilución 1:100) inmediatamente antes del uso. Se adicionaron 400 μL de tampón de FACS por tubo y se resuspendieron las células. Las tensiones de los canales de fluorescencia, de dispersión lateral y de dispersión frontal de la citometría de flujo se ajustaron para visualizar todos los eventos celulares y se registraron 10 000 eventos/muestra. Las células mezcladas con partículas de dextrano, pero no pasadas a través de

25 los filtros, se usaron como un control del suministro de partículas a través de la endocitosis. Estas células tuvieron contacto con el colorante pero no se pasaron a través de los filtros. Todas las demás etapas fueron las mismas para los controles de endocitosis. Las muestras de control negativo no tenían contacto con el colorante, pero se sometieron a las mismas etapas que las muestras experimentales.

30

Resultados

Los linfocitos T humanos primarios mezclados con partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue y de 10 kDa Alexa 488 se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 5 μm bajo presión manual de jeringa o bajo una presión constante de 5 psi. El 8,60 % de las células que pasaron bajo presión manual de jeringa (Figura 3A) y el 18,9 % de las células que pasaron bajo una presión constante de 5 psi (Figura 3B) contenían tanto las partículas de dextrano de 3 kDa como las de 10 kDa después del suministro por filtro, como se indica por la doble tinción celular positiva para PacBlue y Alexa 488 (cuadrante Q2). El 85,4 % de las células que pasaron por la presión manual de jeringa (Figura

35 3A) y el 83,1 % de las células que pasaron bajo una presión constante de 5 psi (Figura 3B) fueron viables después del suministro.

40

Ejemplo 3: Suministro de partículas de dextrano a células HeLa a 2 psi y 3 psi

Introducción

Para evaluar el suministro de moléculas mediadas por filtro a las células, células HeLa mezcladas con partículas de dextrano fluorescentes se pasaron a través de filtros que contenían poros de tamaños definidos, y el suministro de partículas intracelulares se evaluó mediante análisis por FACS.

50

Materiales y métodos

Se obtuvieron filtros de membrana de policarbonato de STERLITECH™. Los filtros con tamaños de los poros de 10 μm se usaron en los estudios descritos en la presente descripción. Las células HeLa se suspendieron en medios OptiMEM a $2,5 \times 10^6$ células/mL y se adicionaron partículas de dextrano de 3 kDa a una concentración final de 0,1 mg/mL. Los filtros de membrana y los sujetadores de filtros de plástico se prepararon como se describió en el

55 Ejemplo 1. Se adicionaron 200 μL de células mezcladas con partículas de dextrano al sujetador de filtros. Para el suministro a presión constante, se usó un sistema de suministro de gas nitrógeno ajustado al regulador de presión. El flujo del filtro se recolectó en una placa de 24 pocillos o un tubo de FACS. Antes del análisis por FACS, todas las muestras se centrifugaron y se lavaron tres veces a 400 fuerza centrífuga relativa (rcf) durante 4 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ para eliminar el dextrano extracelular. Para prepararse para el análisis de FACS, se realizaron las siguientes etapas. En primer lugar, se preparó el tampón de FACS (PBS + concentración final: FBS al 1 % + EDTA 2 nM) y se adicionó yoduro de propidio (dilución 1:100) inmediatamente antes del uso. Se adicionaron 400 μL de tampón de FACS por tubo y se resuspendieron las células. Las tensiones de los canales de fluorescencia, de dispersión lateral y de dispersión frontal de la citometría de flujo se ajustaron para visualizar todos los eventos celulares y se registraron 10 000 eventos/muestra. Las células mezcladas con partículas de dextrano, pero no pasadas a través

60

65

de los filtros, se usaron como un control del suministro de partículas a través de la endocitosis. Estas células tuvieron contacto con el colorante pero no se pasaron a través de los filtros. Todas las demás etapas fueron las mismas para los controles de endocitosis. Las muestras de control negativo no tenían contacto con el colorante, pero se sometieron a las mismas etapas que las muestras experimentales. Se usaron tres filtros a cada presión (2 psi y 3 psi), con tres muestras que se procesaron a través de cada filtro para cada experimento. El experimento se repitió durante tres días separados, lo que dio como resultado un total de 27 ejecuciones a cada presión.

Resultados

10 Eficiencia de suministro de partículas de dextrano a células HeLa a través de poros de filtro de tamaño 10 µm a 2 psi y 3 psi.

15 Células HeLa mezcladas con partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 10 µm a 2 psi y 3 psi. La eficiencia del suministro, como se indica por el porcentaje de células positivas para partículas de dextrano de 3 kDa, la viabilidad celular, como se indica por el porcentaje de células vivas después del suministro del filtro, y la intensidad de fluorescencia media relativa (rMFI) a través de la citometría de flujo se muestran en la Tabla 4 (2 psi) y la Tabla 5 (3 psi) más abajo. Los valores de eficiencia de suministro, viabilidad, y rMFI fueron repetibles y significativos en todos los experimentos. A 2 psi, la viabilidad celular y la eficiencia de suministro fueron de aproximadamente el 80 %. A 3 psi, la viabilidad celular fue de aproximadamente 60-70 %, mientras que la eficiencia de suministro fue de aproximadamente 90 %,

25 Tabla 4: Suministro mediado por filtro a células HeLa a 2 psi

2 psi	% de viabilidad	% de suministro	rMFI
Promedio	82,8	79,1	16,6
Desviación estándar	4,7	7,7	5,5
% de C.V.	5,7	9,7	32,9

30 Tabla 5: Suministro mediado por filtro a células HeLa a 3 psi

3 psi	% de viabilidad	% de suministro	rMFI
Promedio	64,8	90,1	21,5
Desviación estándar	5,9	3,2	4,7
% de C.V.	9,0	3,6	21,7

35 Ejemplo 4: Suministro de partículas de dextrano a células HeLa mediadas por filtros de jeringa comerciales o personalizados

Introducción

45 Para evaluar el suministro de moléculas mediadas por filtro en las células, se pasaron células HeLa mezcladas con partículas de dextrano fluorescentes a través de filtros de jeringa comerciales o personalizados, y el suministro de partículas intracelulares se evaluó mediante análisis por FACS.

50 Materiales y métodos

Los filtros de membrana de policarbonato de tamaño de los poros de 10 µm con una combinación de sujetador y filtro comercial (filtros COTS) se obtuvieron de STERLITECH™. También se usaron filtros de jeringa personalizados con poros de 10 µm.

55 Las células HeLa se suspendieron en medio OptiMEM a 3x10⁶ células/mL, y se adicionaron partículas de dextrano de 3 kDa a una concentración final de 0,1 mg/mL. Los filtros de membrana y los sujetadores de filtros de plástico se prepararon como se describió en el Ejemplo 1. Se adicionaron 200 µL de células mezcladas con partículas de dextrano al sujetador de filtros. Para el suministro a presión constante, se usó un sistema de suministro de gas nitrógeno ajustado al regulador de presión. El flujo del filtro se recolectó en una placa de 24 pocillos o un tubo de FACS. Antes del análisis por FACS, todas las muestras se centrifugaron y se lavaron tres veces a 400 rcf durante 4 minutos a 4 °C para eliminar el dextrano extracelular. Para prepararse para el análisis de FACS, se realizaron las siguientes etapas. En primer lugar, se preparó el tampón de FACS (PBS + concentración final: FBS al 1 % + EDTA 2 nM) y se adicionó yoduro de propidio (dilución 1:100) inmediatamente antes del uso. Se adicionaron 400 µL de tampón de FACS por tubo y se resuspendieron las células. Las tensiones de los canales de fluorescencia, de dispersión lateral y de dispersión frontal de la citometría de flujo se ajustaron para visualizar todos los eventos

celulares y se registraron 10 000 eventos/muestra. Las células mezcladas con partículas de dextrano, pero no pasadas a través de los filtros, se usaron como un control del suministro de partículas a través de la endocitosis. Estas células tuvieron contacto con el colorante pero no se pasaron a través de los filtros. Todas las demás etapas fueron las mismas para los controles de endocitosis. Las muestras de control negativo no tenían contacto con el colorante, pero se sometieron a las mismas etapas que las muestras experimentales. Se usó un filtro a cada presión (2 psi y 3 psi), con tres muestras que se procesaron a través de cada filtro para cada experimento. El experimento se repitió durante dos días separados, lo que dio como resultado un total de 6 ejecuciones a cada presión.

Resultados

Eficiencia de suministro de partículas de dextrano a células HeLa a través de filtros comerciales o personalizados.

Células HeLa mezcladas con partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 10 μm a 2 psi y 3 psi. Se compararon los resultados del filtro COTS y del filtro personalizado. La eficiencia del suministro, como se indica por el porcentaje de células positivas para las partículas de dextrano de 3 kDa, y la viabilidad celular, como se indica por el porcentaje de células vivas después del suministro del filtro, se muestran en la Figura. 4. Los gráficos de histogramas de citometría de flujo representativos que demuestran valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) para tres ejecuciones a 3 psi se muestran en la Figura 5A (filtro COTS) y la Figura 5B (filtro de jeringa personalizado). Los valores promedio de intensidad de fluorescencia media relativa (rMFI) a lo largo de las ejecuciones se muestran en la Figura 5C. La eliminación del inserto de malla durante los experimentos realizados en el segundo día no afectó a la eficiencia de suministro ni a la viabilidad celular. No se observó ningún beneficio como resultado de la reducción del volumen muerto al usar los filtros personalizados en comparación con los filtros COTS. En general, los filtros COTS y los filtros de jeringa personalizados dieron como resultado una viabilidad celular y una eficiencia de suministro comparables. Los experimentos posteriores se realizaron con el uso de filtros COTS.

Ejemplo 5: Suministro mediado por filtro de ARNm de EGFP a células HeLa

Introducción

Para evaluar la funcionalidad de las células después del suministro de moléculas mediado por filtro, se pasaron células HeLa mezcladas con partículas de dextrano fluorescentes y ARNm de EGFP a través de un filtro COTS de tamaño de poro de 10 μm , y el suministro de partículas intracelular y la expresión de ARNm se evaluaron mediante análisis por FACS.

Materiales y métodos

Se obtuvieron filtros de membrana de policarbonato de tamaños de los poros de 10 μm con una combinación de filtro comercial listo para usar (COTS) y sujetador de STERLITECH™. Las células HeLa se suspendieron en medio OptiMEM a 2×10^6 células/mL, se adicionaron partículas de dextrano de 3 kDa a una concentración final de 0,1 mg/mL, y se adicionó ARNm que codifica EGFP a una concentración final de 0,1 mg/mL. Los filtros de membrana y los sujetadores de filtros de plástico se prepararon como se describió en el Ejemplo 1. Se adicionaron 200 μL de células mezcladas con partículas de dextrano en el sujetador de filtros y se pasaron a través del filtro a 2 psi, 2,5 psi, o 3 psi. Para el suministro a presión constante, se usó un sistema de suministro de gas nitrógeno ajustado al regulador de presión. El flujo continuo se recolectó en una placa de 24 pocillos o un tubo de FACS.

Antes del análisis por FACS, todas las muestras se centrifugaron y se lavaron tres veces a 400 rcf durante 4 minutos a 4 °C para eliminar el dextrano extracelular. Para prepararse para el análisis de FACS, se realizaron las siguientes etapas. En primer lugar, se preparó el tampón de FACS (PBS + concentración final: FBS al 1 % + EDTA 2 nM) y se adicionó yoduro de propidio (dilución 1:100) inmediatamente antes del uso. Se adicionaron 400 μL de tampón de FACS por tubo y se resuspendieron las células. Las tensiones de los canales de fluorescencia, de dispersión lateral y de dispersión frontal de la citometría de flujo se ajustaron para visualizar todos los eventos celulares y se registraron 10 000 eventos/muestra. Las células mezcladas con partículas de dextrano o ARNm de EGFP, pero no pasadas a través de los filtros, se usaron como controles para el suministro a través de la endocitosis. Estas células tenían contacto con el colorante o el ARNm de EGFP pero no se pasaron a través de los filtros. Todas las demás etapas fueron las mismas para los controles de endocitosis. Las muestras de control negativo no tenían contacto con el colorante o el ARNm de EGFP, pero se sometieron a las mismas etapas que las muestras experimentales. Se analizaron cuatro muestras a través de un filtro a cada presión (2 psi, 2,5 psi, o 3 psi).

Resultados

Las células HeLa mezcladas con partículas de dextrano de 3 kDa PacBlue y ARNm de EGFP se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 10 μm a 2 psi, 2,5 psi, o 3 psi. La eficiencia de suministro, como se indica por el porcentaje de células positivas para partículas de dextrano de 3 kDa o el porcentaje de células que expresan GFP, la viabilidad celular, como se indica por el porcentaje de células vivas después del suministro del filtro, y la intensidad de fluorescencia media relativa (rMFI) a través de la citometría de flujo se muestran en la Figura 6 y las Tablas 6-8 más

abajo. Se observó una eficiencia de suministro y viabilidad celular comparables a 2,5 psi y 3 psi, con un suministro más alto observado en comparación con 2 psi. Las células retuvieron la funcionalidad 24 horas después del suministro conjunto de partículas de dextrano y ARNm de EGFP, como se indica por la viabilidad sostenida y expresión de GFP.

Tabla 6: Suministro mediado por filtro de partículas de dextrano de 3 kDa y ARNm de EGFP a células HeLa a 2 psi

2 psi	% de viabilidad	% suministro de 3 kDa	rMFI de 3 kDa	Expresión de GFP	rMFI de GFP
Promedio	88,8	80,2	11,5	63,9	21,4
Desviación estándar	3,4	4,3	1,6	5,3	3,9
% de C.V.	3,9	5,4	14,1	8,3	18,2

Tabla 7: Suministro mediado por filtro de partículas de dextrano de 3 kDa y ARNm de EGFP a células HeLa a 2,5 psi

2 psi	% de viabilidad	% suministro de 3 kDa	rMFI de 3 kDa	Expresión de GFP	rMFI de GFP
Promedio	80,6	85,3	12,8	71,4	21,0
Desviación estándar	4,8	2,1	0,5	1,9	1,5
% de C.V.	6,0	2,5	4,2	2,6	7,3

Tabla 8: Suministro mediado por filtro de partículas de dextrano de 3 kDa y ARNm de EGFP a células HeLa a 3 psi

2 psi	% de viabilidad	% suministro de 3 kDa	rMFI de 3 kDa	Expresión de GFP	rMFI de GFP
Promedio	69,8	85,1	12,8	72,1	20,5
Desviación estándar	6,3	1,6	0,6	3,0	1,9
% de C.V.	9,0	1,9	4,6	4,1	9,1

Ejemplo 6: Suministro mediado por constricción de dextrano y anticuerpo IgG a RBC

Introducción

Para evaluar el suministro de moléculas mediadas por filtro a células anucleadas, RBC humanos mezclados con anticuerpos IgG o partículas de dextrano fluorescentes se pasaron a través de filtros de jeringa que contenían poros de tamaños definidos, y el suministro de partículas intracelulares se evaluó mediante análisis por FACS.

Materiales y métodos

Se obtuvieron filtros de membrana de policarbonato de tamaño de los poros de 2 μ m de diámetro con una combinación de filtro comercial y sujetador (filtros COTS) de STERLITECH™. Los RBC humanos se separaron de la sangre completa o del collar de leucorreducción mediante el uso de un método de separación por gradiente de Ficoll y se resuspendieron a la concentración deseada (50-500 M/mL) en Optimem. El filtro de membrana de policarbonato se resuspendió en Optimem mediante el uso de fórceps para humedecer el filtro de membrana. El sujetador de filtros de plástico se descapsuló, el filtro se colocó en la superficie interior con la cara brillante orientada hacia arriba, y el sujetador de filtros se volvió a tapar. Las partículas de dextrano y el anticuerpo IgG se suspendieron a 0,1 mg/mL. Se adicionó 1 mL de células mezcladas con partículas de dextrano o anticuerpo IgG al sujetador de filtros a temperatura ambiente. Se usó manualmente la jeringa para hacer pasar las células a través del filtro. El flujo del filtro se recolectó en un tubo Falcon de 15 mL o un tubo de FACS. Antes del análisis por FACS, todas las muestras se centrifugaron y se lavaron tres veces a 400 rcf durante 4 minutos a 4 °C para eliminar el dextrano extracelular. Para prepararse para el análisis de FACS, se realizaron las siguientes etapas. Se preparó el tampón de FACS (PBS + concentración final: FBS al 1 % + EDTA 2 mM) y se adicionaron 400 μ L de tampón de FACS por tubo y se resuspendieron las células. Se ajustaron las tensiones de los canales de fluorescencia, de dispersión lateral y de dispersión frontal de la citometría de flujo para visualizar todos los eventos celulares y se registraron $\geq 10\ 000$ eventos/muestra. Las células mezcladas con partículas de dextrano o anticuerpo IgG, pero no pasadas a través de los filtros, se usaron como un control del suministro por endocitosis. Estas células tuvieron contacto con el colorante pero no se pasaron a través de los filtros. Todas las demás etapas fueron las mismas para los controles de endocitosis.

Resultados

Los eritrocitos mezclados con partículas de dextrano de 10 kDa Alexa Fluor® 647 o anticuerpo IgG de 150 kDa conjugado con Alexa Fluor® 647 se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 2 µm. Los gráficos de histograma de citometría de flujo ilustrativos que representan la fluorescencia después del suministro mediado por constricción (SQZ) frente al control de endocitosis se muestran en las Figuras. 7A y B. La eficiencia de suministro, como se indica por el porcentaje de células positivas para las partículas de dextrano del suministro posfiltro de anticuerpos IgG, se muestra en la Figura 8A. La eficiencia de suministro del anticuerpo IgG fue del 88,6 %, y la eficiencia de suministro de las partículas de dextrano fue del 95,6 % después del suministro por filtro.

La viabilidad celular se midió después del suministro por filtro. La viabilidad celular estimada, como se indica por el porcentaje de células presentes dentro del suministro posfiltro de la puerta FSC y SSC, se muestra en la Figura 8B. La viabilidad estimada de las células a las que se suministró el anticuerpo IgG fue del 68,8 %, y la viabilidad estimada de las células a las que se suministraron partículas de dextrano fue del 63,3 % después de suministro por filtro.

Se logró el suministro mediado por constricción de partículas de dextrano y anticuerpos IgG en RBC humanos.

Ejemplo 7: Suministro mediado por constricción de dextrano y anticuerpo IgG a RBC de ratón

Introducción

Para evaluar el suministro de moléculas mediadas por filtro en células anucleadas, los RBC de ratón mezclados con anticuerpo IgG o partículas de dextrano fluorescentes se pasaron a través de filtros de jeringa que contenían poros de tamaños definidos, y el suministro de partículas intracelulares se evaluó mediante análisis por FACS.

Materiales y métodos

Se obtuvieron filtros de membrana de policarbonato de tamaño de los poros de 1 µm y 2 µm de diámetro con una combinación de filtro comercial y sujetador (filtros COTS) de STERLITECH™. La sangre completa se centrifugó y las células se resuspendieron a la concentración deseada (100-500 M/mL) en Optimem. El filtro de membrana de policarbonato se resuspendió en Optimem mediante el uso de fórceps para humedecer el filtro de membrana. El sujetador de filtros de plástico se descapsuló, el filtro se colocó en la superficie interior con la cara brillante orientada hacia arriba, y el sujetador de filtros se volvió a tapar. Las partículas de dextrano y el anticuerpo IgG se suspendieron a 0,1 mg/mL. Se adicionó 1 mL de células mezcladas con partículas de dextrano o anticuerpo IgG al sujetador de filtros a temperatura ambiente. Se usó manualmente la jeringa para hacer pasar las células a través del filtro. Alternativamente, se usa un sistema de presión controlada para accionar 200 µL de células mezcladas con partículas de dextrano o anticuerpo IgG a través del filtro. El flujo del filtro se recolectó en un tubo Falcon de 15 mL o en un tubo de FACS. Antes del análisis por FACS, todas las muestras se centrifugaron y se lavaron tres veces a 1000 rfc durante 10 minutos a 24 °C para eliminar la dextrano extracelular. Para prepararse para el análisis de FACS, se realizaron las siguientes etapas. Se preparó el tampón de FACS (PBS + concentración final: FBS al 1 % + EDTA 2 mM) y se adicionaron 400 µL de tampón de FACS por tubo y se resuspendieron las células. Se ajustaron las tensiones de los canales de fluorescencia, de dispersión lateral y de dispersión frontal de la citometría de flujo para visualizar todos los eventos celulares y se registraron ≥ 10 000 eventos/muestra. Las células mezcladas con partículas de dextrano o anticuerpo IgG, pero no pasadas a través de los filtros, se usaron como un control del suministro por endocitosis. Estas células tuvieron contacto con el colorante pero no se pasaron a través de los filtros. Todas las demás etapas fueron las mismas para los controles de endocitosis. Las muestras NC (sin contacto) no tenían contacto con el colorante pero se sometieron a las mismas etapas que las muestras experimentales pero no se pasaron a través de los filtros.

Resultados

Los RBC de ratón mezclados con el anticuerpo IgG (150 kDa) se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 1 µm y 2 µm mediante el uso de presión manual por jeringa. Los gráficos de histograma de citometría de flujo ilustrativos que representan la fluorescencia después del suministro mediado por constricción (SQZ) en comparación con los controles de endocitosis (Endo), negativo (NC), y sin material se muestran en la Figura 9A. El control 'sin material' no tenía contacto con el anticuerpo IgG, pero se sometió a las mismas etapas que las muestras experimentales y se pasó a través del filtro.

La viabilidad celular se midió después del suministro por filtro. La viabilidad celular estimada, como se indica por el porcentaje de células presentes dentro de la puerta FSC y SSC después del suministro por filtro del anticuerpo IgG mediante el uso de presión manual por jeringa, se muestra en la Figura. 9B. La eficiencia de suministro del anticuerpo IgG, como se indica por el porcentaje de células positivas para el anticuerpo IgG después del suministro por filtro mediante el uso de presión manual por jeringa, se muestra en la Figura 9C.

Los RBC mezclados con partículas de dextrano de 70 kDa Alexa Fluor® 488 o anticuerpo IgG (150 kDa) se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 2 µm mediante el uso de un sistema de presión controlada bajo 2 psi, 4 psi, 6

psi, 10 psi, 20 psi, o mediante el uso de presión manual por jeringa. Los gráficos de histograma de citometría de flujo ilustrativos que representan la fluorescencia después del suministro mediado por constricción (SQZ) frente a los controles de endocitosis (Endo), negativo (NC), y sin material se muestran en las Figuras 10A-I. La viabilidad celular se midió después del suministro por filtro. La viabilidad celular estimada, como se indica por el porcentaje de células presentes dentro de la puerta FSC y SSC después del suministro por filtro de las partículas de dextrano se muestra en la Figura 11A. La eficiencia de suministro, como se indica por el porcentaje de células positivas después del suministro por filtro para partículas de dextrano o anticuerpos IgG se muestra en la Figura 11B. La media geométrica de fluorescencia después del suministro por filtro de partículas de dextrano o anticuerpo IgG se muestra en la Figura 11C.

Los RBC mezclados con partículas de dextrano de 70 kDa Alexa Fluor® 488 se pasaron a través de poros de filtro de tamaño 2 µm mediante el uso de un sistema de presión controlada bajo 10 psi, 12 psi, 14 psi, 16 psi, o 18 psi. Los gráficos de histograma de citometría de flujo ilustrativos que representan la fluorescencia después del suministro mediado por constricción (SQZ) en comparación frente a los controles de endocitosis (Endo), y negativo (NC) se muestran en la Figura 12A. La viabilidad celular se midió después del suministro por filtro. La viabilidad celular estimada, como se indica por el porcentaje de células presentes dentro de la puerta FSC y SSC después del suministro por filtro de las partículas de dextrano se muestra en la Figura 12B. La eficiencia de suministro, como se indica por el porcentaje de células positivas después del suministro por filtro para partículas de dextrano se muestra en la Figura 12C. La media geométrica de fluorescencia después del suministro por filtro de partículas de dextrano se muestra en la Figura 12D.

Se logró el suministro mediado por constricción de partículas de dextrano y anticuerpos IgG en RBC de ratón.

Ejemplo 8. Suministro por microtamiz a células HeLa y linfocitos T

Con el fin de evaluar el suministro de moléculas mediado por microtamiz, se mezclaron células HeLa o linfocitos T con partículas fluorescentes de dextrano y se pasaron a través de un microtamiz, y el suministro de partículas intracelular se evaluó mediante análisis por FACS.

Materiales y métodos

Se usaron microtamices de policarbonato de tamaños de los poros de 10 µm de STERLITECH™ (porosidad 8 %) o microtamices de silicio/cerámica de tamaños de los poros de 10 µm de AQUAMARIJN (porosidad 36,3 %) para las células HeLa. Las células HeLa se suspendieron en medios OptiMEM a 5×10^6 células/mL, y se adicionaron partículas de dextrano de 3 kDa a una concentración final de 1mg/mL. Se adicionaron 200 µL de células mezcladas con partículas de dextrano al microtamiz y se pasaron a través del microtamiz a 3-7 psi a temperatura ambiente. El recobrado fue a 37 °C.

Los linfocitos T vírgenes se suspendieron en medio OptiMEM a 10×10^6 células/mL, y se adicionaron partículas de dextrano de 3 kDa a una concentración final de 1 mg/mL. 200 µL de células mezcladas con partículas de dextrano se pasaron a través de un filtro de 4 µm o un microtamiz de 4 µm a 6-8 psi en hielo. El recobrado fue a temperatura ambiente.

Antes del análisis por FACS, todas las muestras se centrifugaron y se lavaron tres veces a 400 rcf durante 4 minutos a 4 °C para eliminar el dextrano extracelular. Para prepararse para el análisis de FACS, se realizaron las siguientes etapas. En primer lugar, se preparó el tampón de FACS (PBS + concentración final: FBS al 1 % + EDTA 2 nM) y se adicionó yoduro de propidio (dilución 1:100) inmediatamente antes del uso. Se adicionaron 400 µL de tampón de FACS por tubo y se resuspendieron las células. Las tensiones de los canales de fluorescencia, de dispersión lateral y de dispersión frontal de la citometría de flujo se ajustaron para visualizar todos los eventos celulares y se registraron 10 000 eventos/muestra. Las células mezcladas con partículas de dextrano, pero no pasadas a través de los filtros, se usaron como controles para el suministro por endocitosis. Estas células tenían contacto con el colorante o el ARNm de EGFP pero no se pasaron a través de los filtros. Todas las demás etapas fueron las mismas para los controles de endocitosis. Las muestras de control negativo no tenían contacto con el colorante o el ARNm de EGFP, pero se sometieron a las mismas etapas que las muestras experimentales.

Resultados

Los resultados del suministro mediado por microtamiz de dextrano a células HeLa se muestran en las Figuras 13A-13D. La viabilidad celular se muestra en la Figura 13A y el suministro de dextrano se muestra en la Figura 13B para microtamices STERLITECH™ y AQUAMARIJN. Los histogramas representativos para los microtamices AQUAMARIJN y STERLITECH™ se muestran en las Figuras 13C y 13D, respectivamente.

Los resultados del suministro mediado por microtamiz de dextrano a linfocitos T se muestran en las Figuras 14A y 14B. La viabilidad celular y el suministro de dextrano se muestran en la Figura 14A para microtamices AQUAMARIJN. Los histogramas de citometría de flujo representativos para los microtamices AQUAMARIJN se muestran en la Figura 14B. Los resultados fueron comparables al suministro mediado por filtro.

Los resultados muestran un buen suministro y una pérdida mínima de viabilidad después del suministro por microtamiz de dextrano a células HeLa y linfocitos T.

- 5 Todas las composiciones y/o métodos descritos y reivindicados en la presente descripción pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción.

10 Aunque las composiciones y métodos de esta descripción se describieron en términos de modalidades, será evidentes para aquellos expertos en la técnica que las variaciones pueden aplicarse a las composiciones y/o métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en la presente descripción sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la descripción. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que se relacionan tanto química como fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes descritos en la presente descripción mientras que se lograrían los mismos o similares resultados.

REIVINDICACIONES

1. Un método para suministrar un compuesto a una célula, el método comprende pasar una suspensión celular a través de una superficie que contiene poros, en donde dichos poros deforman la célula y provocan de esta manera una perturbación de la célula de manera que el compuesto entra en la célula, en donde dicha suspensión celular se pone en contacto con el compuesto, en donde, además, la suspensión celular comprende:
- 5 (i) una población de células mixtas, en donde la suspensión celular es sangre completa, linfa o comprende células mononucleares de sangre periférica; o
- 10 (ii) una población de células primarias purificadas, en donde la célula primaria es una célula inmunitaria, una célula madre, una célula tumoral, un fibroblasto, una célula de la piel, una neurona, o un eritrocito; además, en donde la superficie es una membrana y/o un filtro.
2. El método de la reivindicación 1, donde la suspensión celular comprende células mononucleares de sangre periférica.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde la suspensión celular comprende una población de células primarias purificadas en donde la célula primaria es un eritrocito.
4. El método de la reivindicación 1 en donde la población de células primarias purificadas comprende una célula inmunitaria seleccionada de un linfocito T, un linfocito B, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, un eosinófilo, un basófilo, una célula NK, una célula NKT, un mastocito o un neutrófilo.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:
- 25 (i) la superficie comprende policarbonato;
- (ii) la superficie se fabrica mediante el uso de grabado;
- (iii) el ancho de la sección transversal de los poros está en el intervalo de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 35 μm ; o
- (iv) la superficie es de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 5 mm de grosor.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la superficie se recubre con un material.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el compuesto:
- 35 (i) comprende un ácido nucleico;
- (ii) comprende un complejo ácido nucleico-polipéptido;
- (iii) comprende ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 y un ARN guía o ADN donante;
- (iv) comprende una proteína o péptido
- (v) es una molécula pequeña;
- (vi) es una nanopartícula;
- 40 (vii) es un receptor de antígeno quimérico;
- (viii) es un liposoma; o
- (ix) es una molécula etiquetada con fluorescencia.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha suspensión celular se pone en contacto con el compuesto antes, simultáneamente, o después de pasar a través del poro y/o las células se pasan a través de los poros por presión constante o presión variable.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, en donde las células se pasan a través de los poros bajo una presión de aproximadamente 2 psi, o aproximadamente 2,5 psi, o aproximadamente 3 psi, o aproximadamente 5 psi, o aproximadamente 10 psi o aproximadamente 20 psi.
- 50 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde las células pasan a través de los poros a una velocidad celular uniforme, o una velocidad celular fluctuante; en donde las células pasan a través de los poros a una velocidad que está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mm/s a aproximadamente 20 m/s.
- 55 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la superficie se contiene dentro de un módulo más grande.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la viscosidad de la suspensión celular está en el intervalo de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa.s a aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}$ Pa.s y/o en donde la concentración celular está en el intervalo de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} células/mL.
- 60 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el método comprende, además, la etapa de pasar la célula a través de un campo eléctrico generado por al menos un electrodo cerca de la superficie.

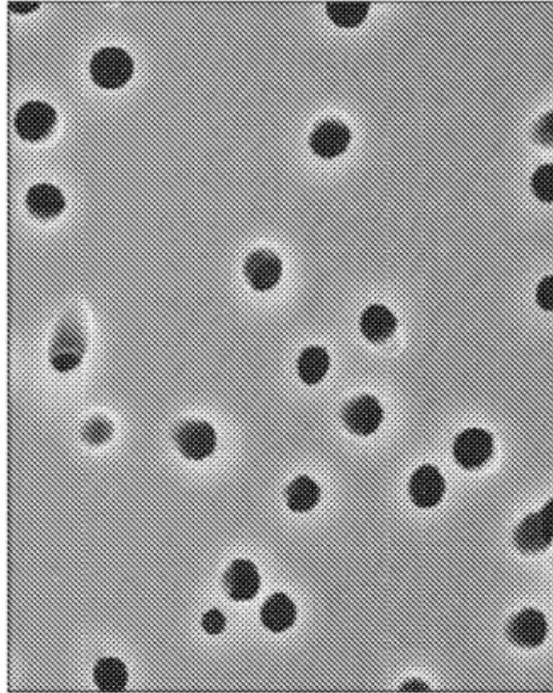


Figura 1B

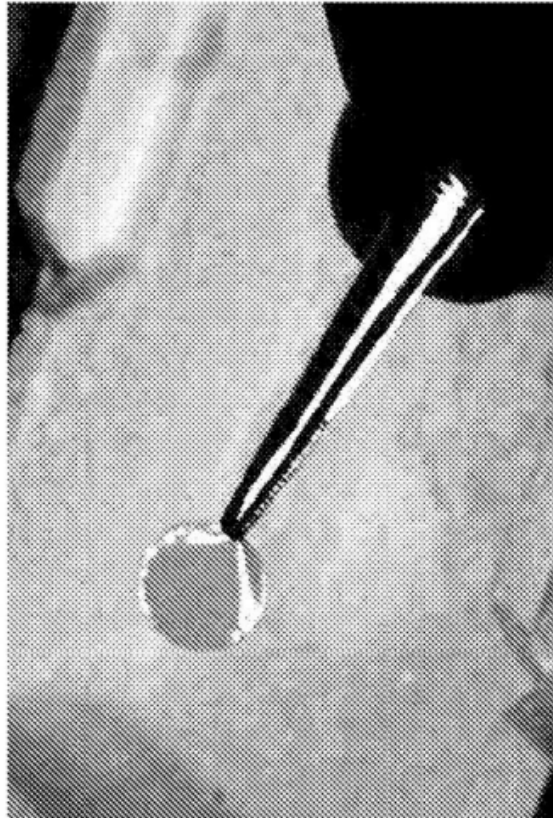
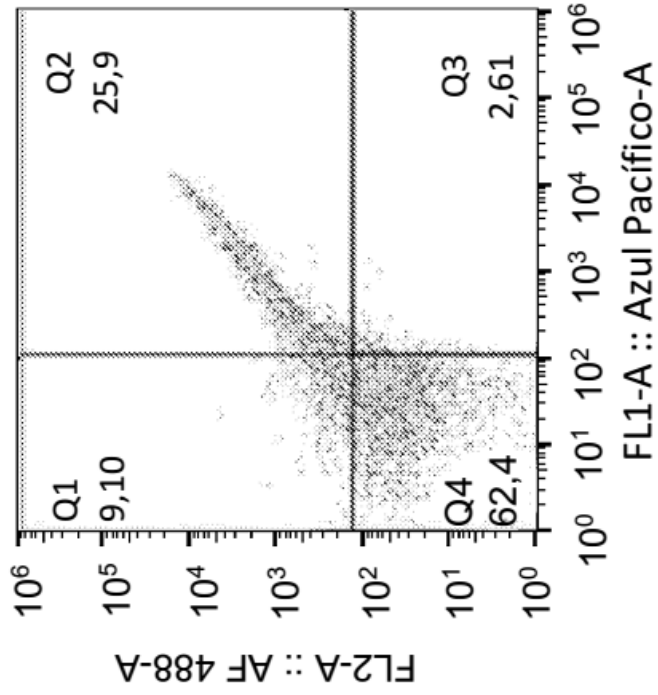


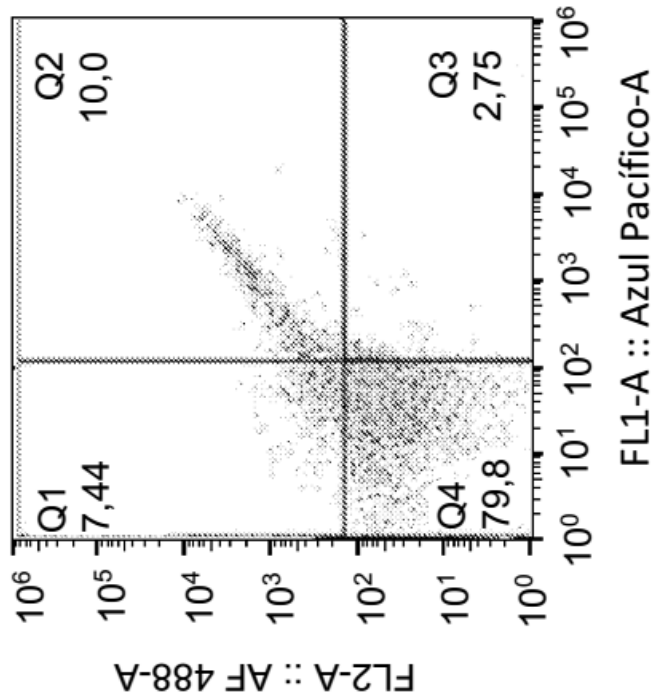
Figura 1A

Figura 2B



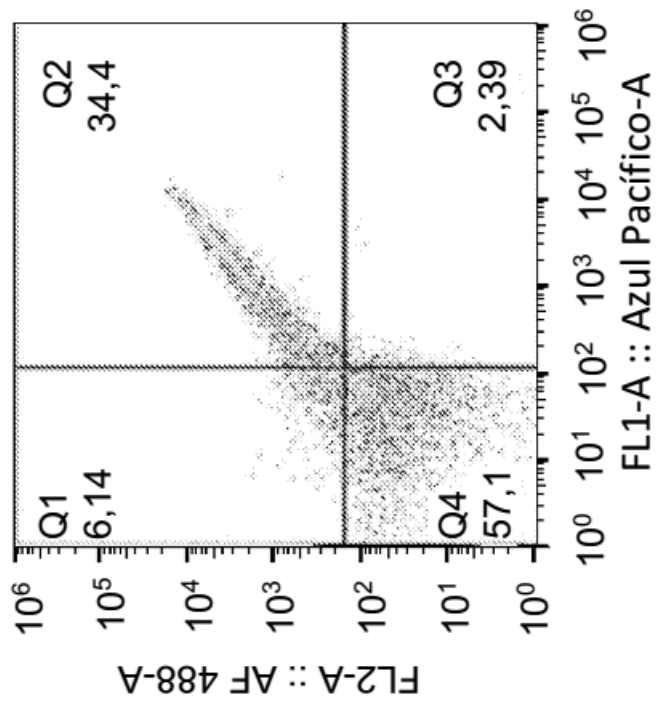
Fuente de datos de 12 µm 5 psi - 1.fcs
Células vivas
6865

Figura 2A



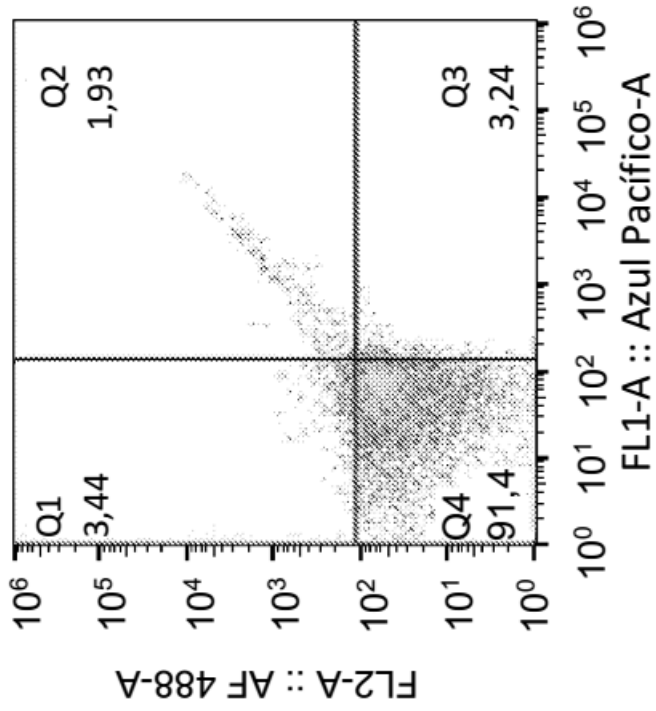
Fuente de datos de 14 µm 5 psi - 1.fcs
Células vivas
6428

Figura 2C



Fuente de datos de 10 µm 5 psi - 1.fcs
Células vivas
8309

Figura 2D



Endo_Fuente de datos - 1.fcs
Células vivas
9156

Figura 2E

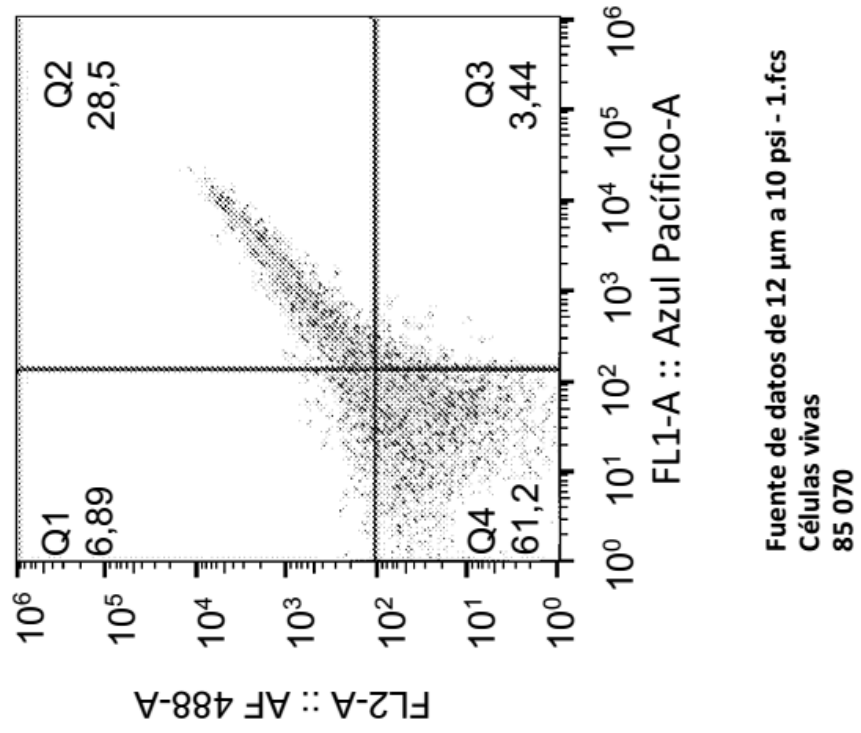


Figura 2F

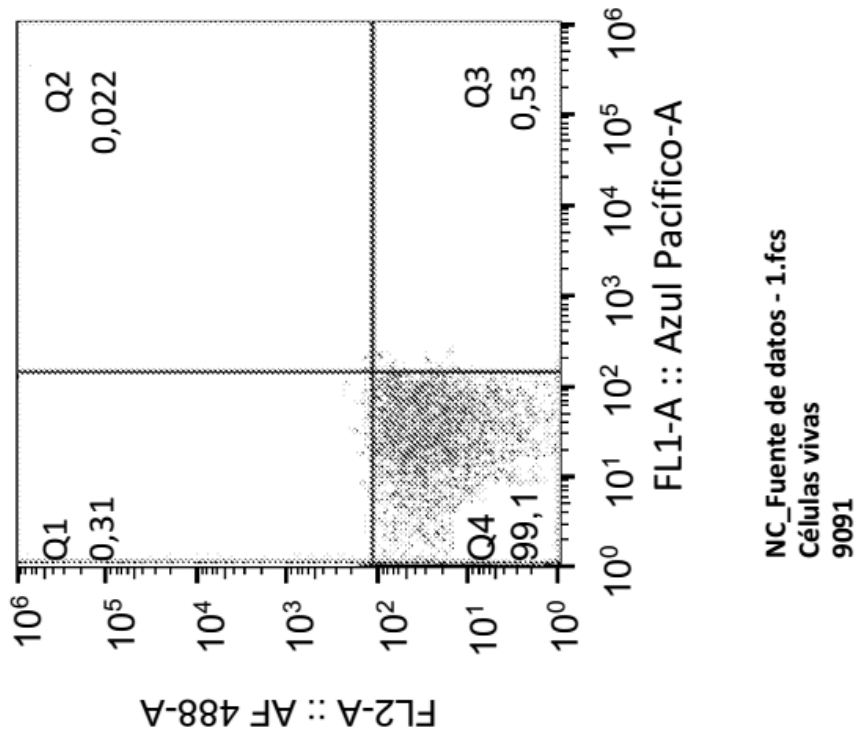
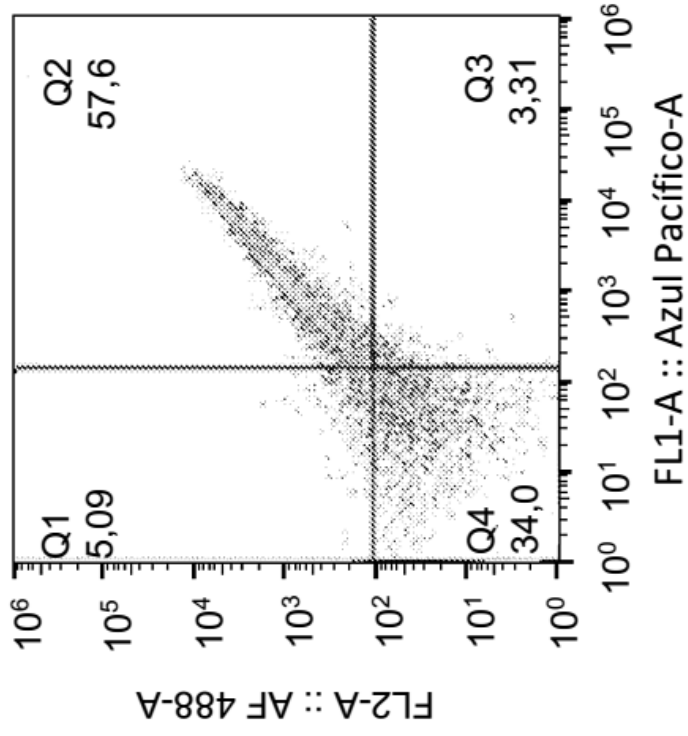
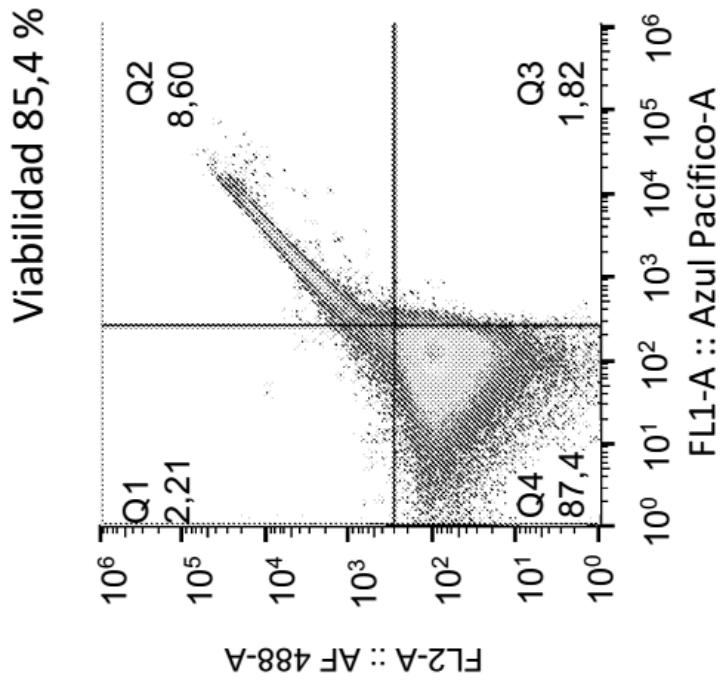


Figura 2G



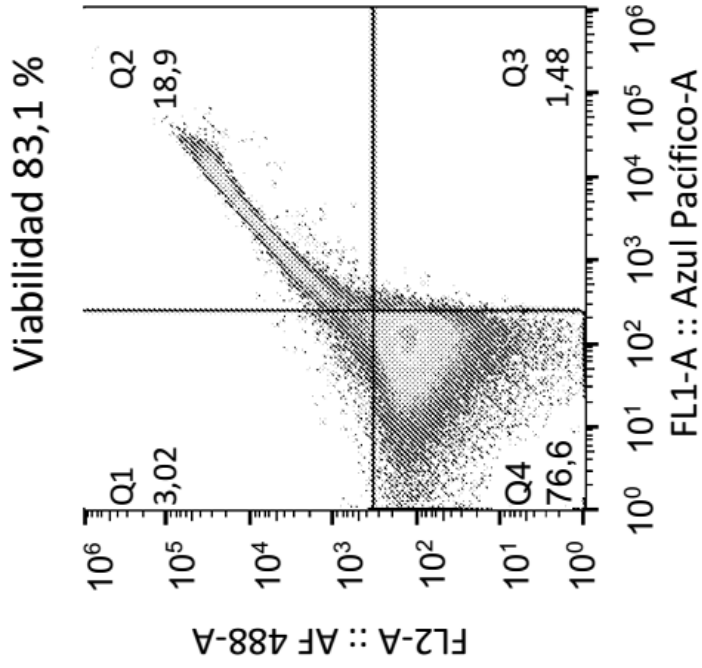
Fuente de datos de 12 µm 20 psi - 1.fcs
Células vivas
8034

Figura 3A



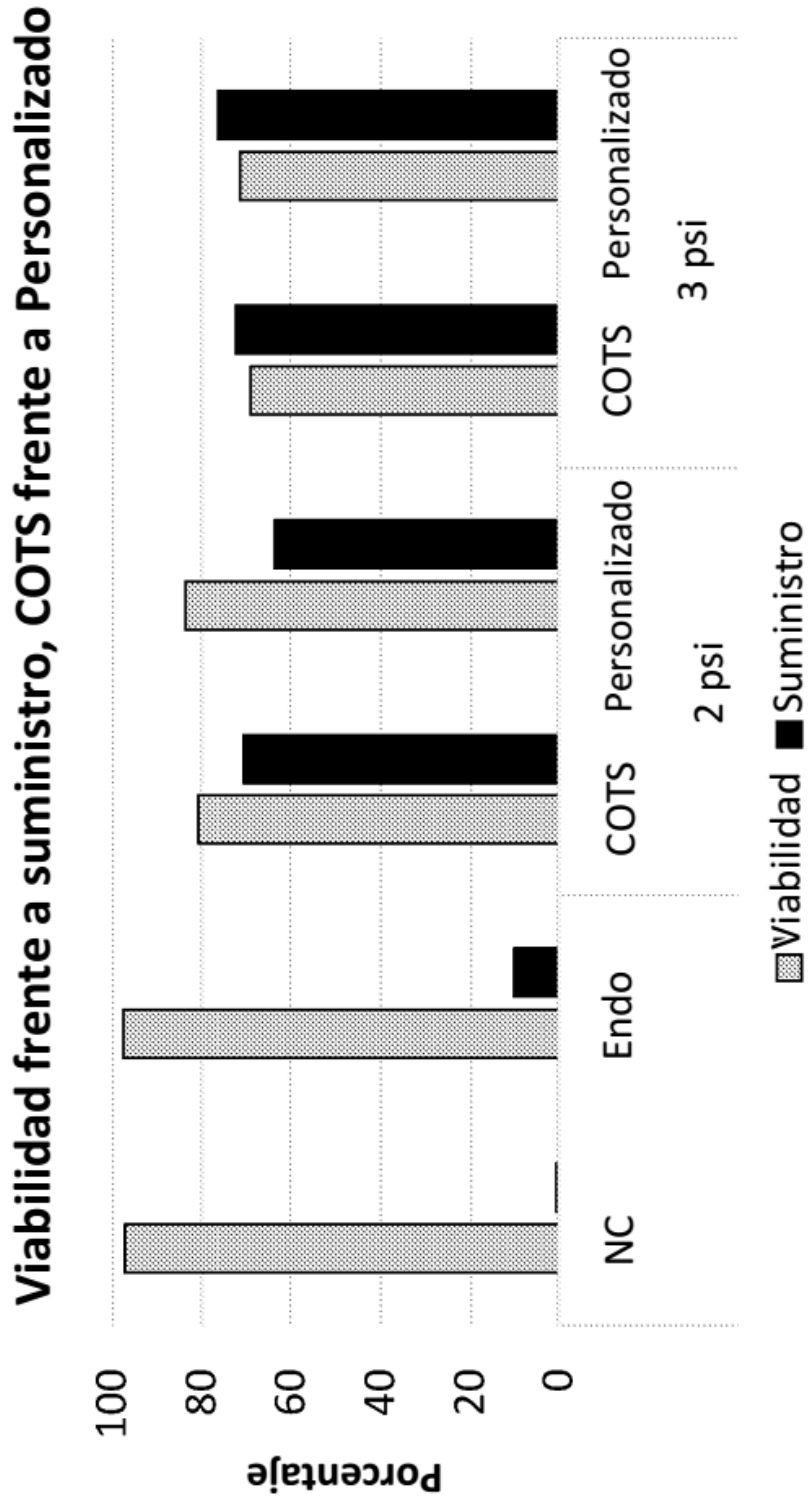
Jeringa 5 μ m_Fuente de datos - 1.fcs
Células vivas
85198

Figura 3B



Presión constante filtro de 5 μ m_Fuente de datos - 1.fcs
Células vivas
82988

Figura 4



Nombre de la muestra	Frecuencia de parental	Media: VL 1-A
3-3.fcs	69,7	6812
3-2.fcs	68,0	7018
3-1.fcs	69,4	6833
Endo.fcs	97,6	497

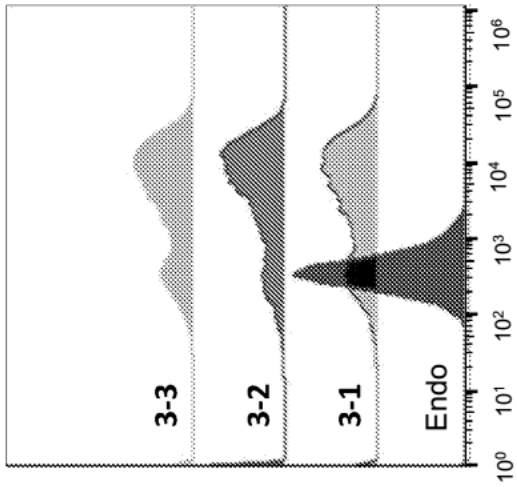
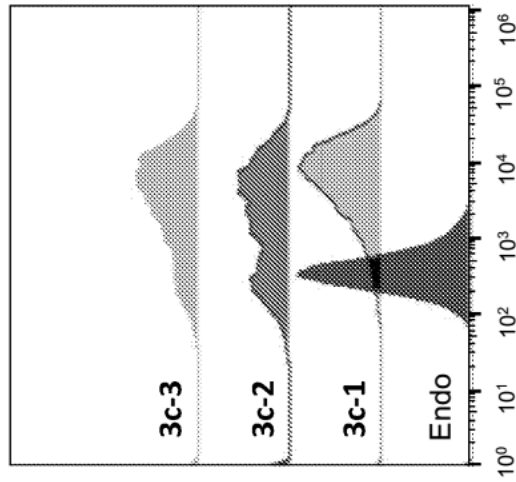


Figura 5A

VL1-A:: 3kDa-Cas Azul-A

Nombre de la muestra	Frecuencia de parental	Media: VL 1-A
3c-3.fcs	70,1	5335
3c-2.fcs	69,4	4092
3c-1.fcs	74,8	7807
Endo.fcs	97,6	497



VL1-A :: 3kDa-Cas Azul-A

Figura 5B

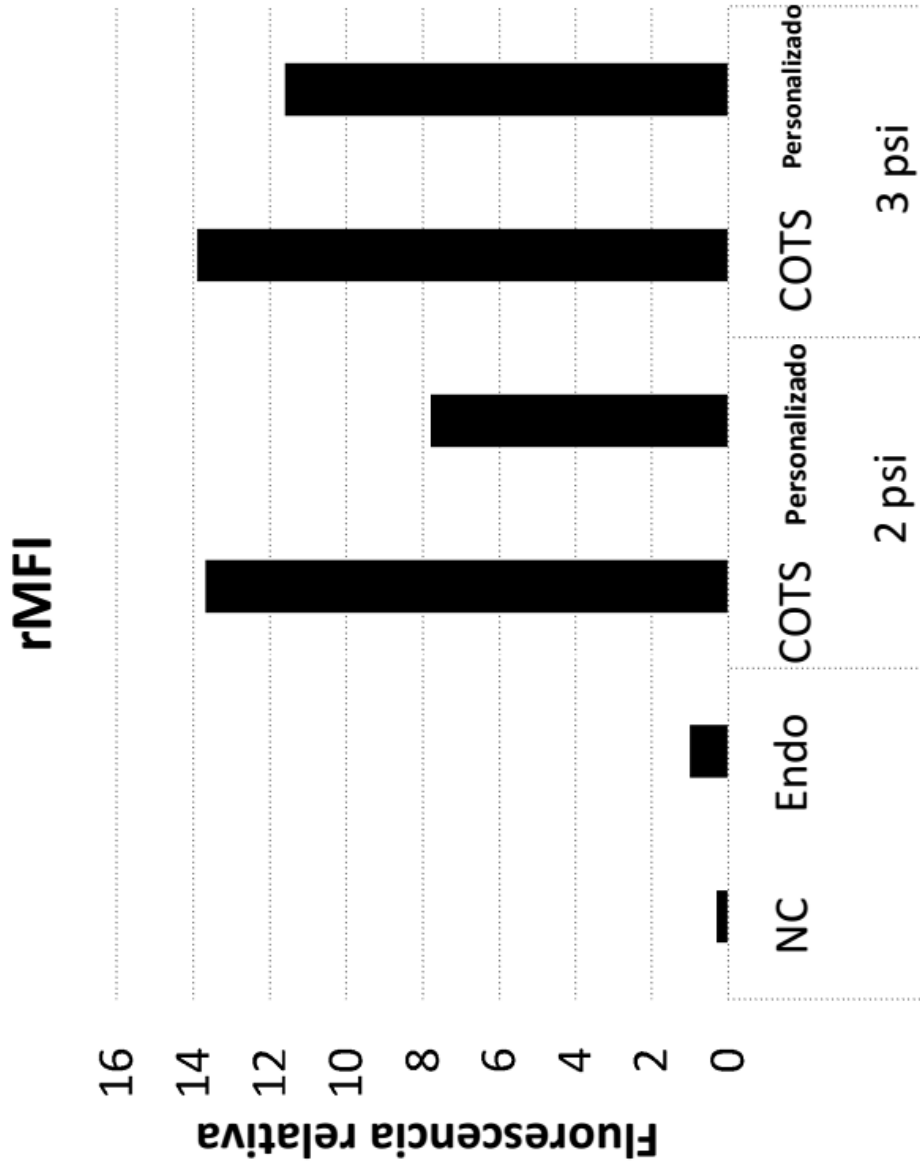


Figura 5C

Figura 6

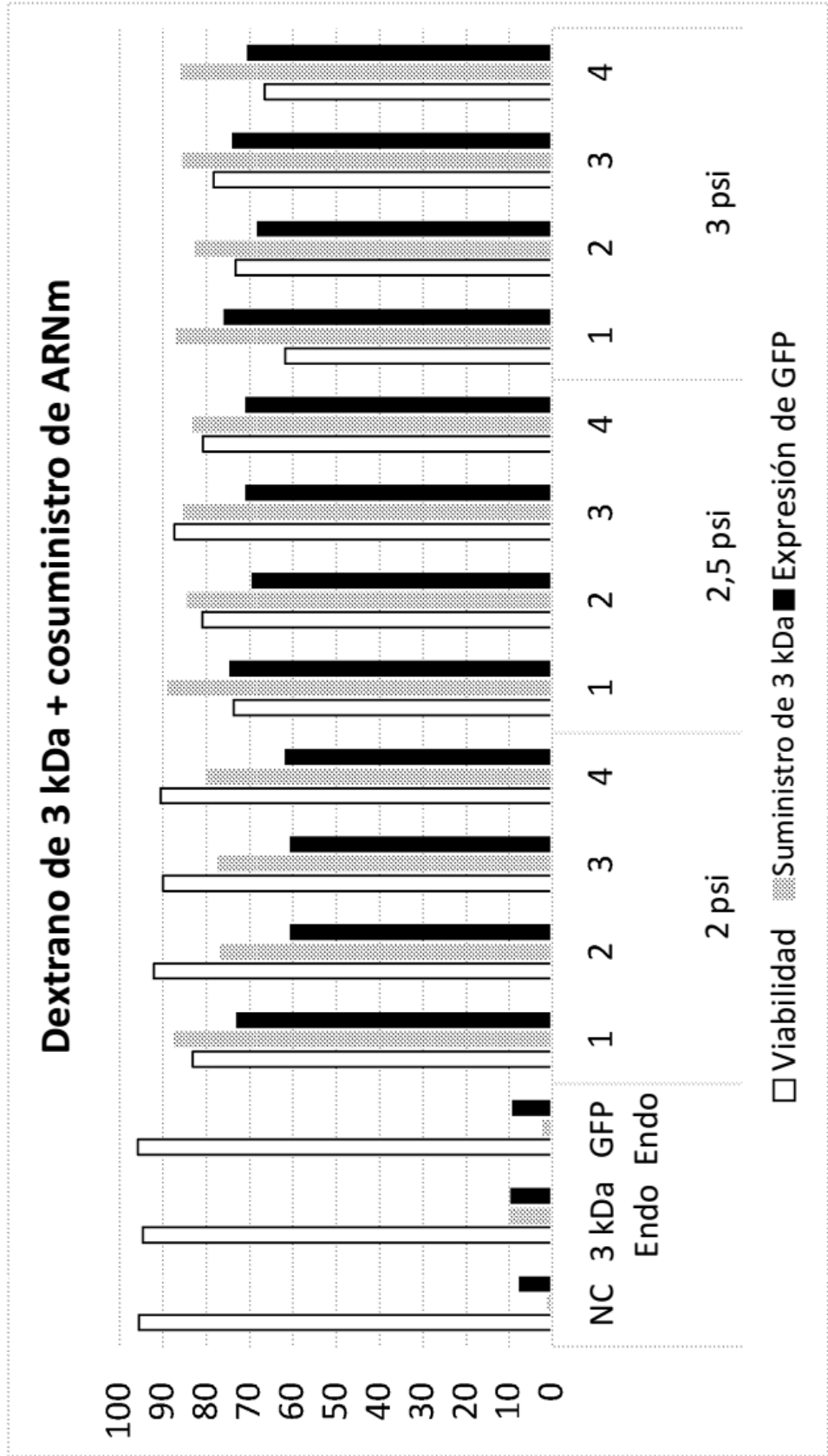


Figura 7B

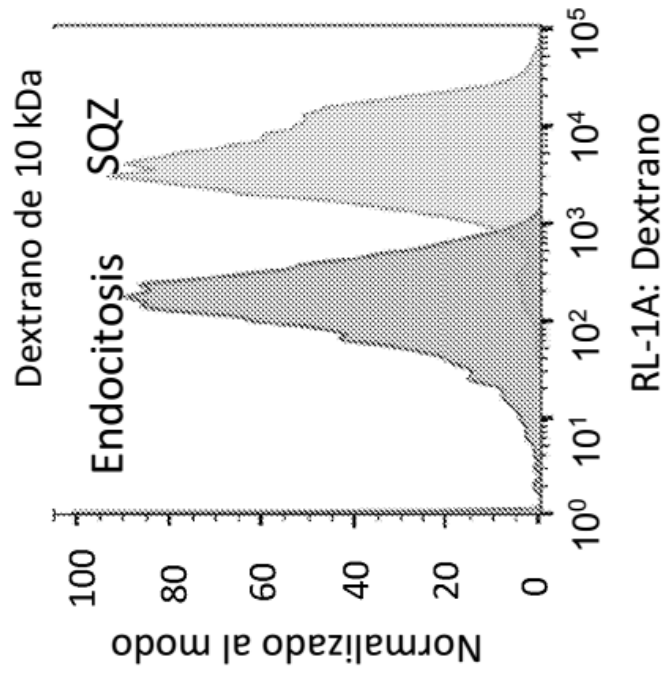


Figura 7A

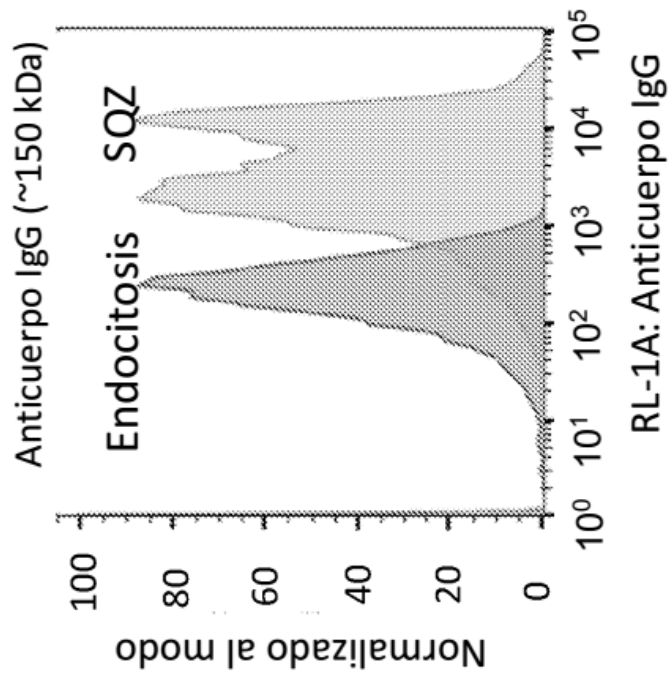


Figura 8B

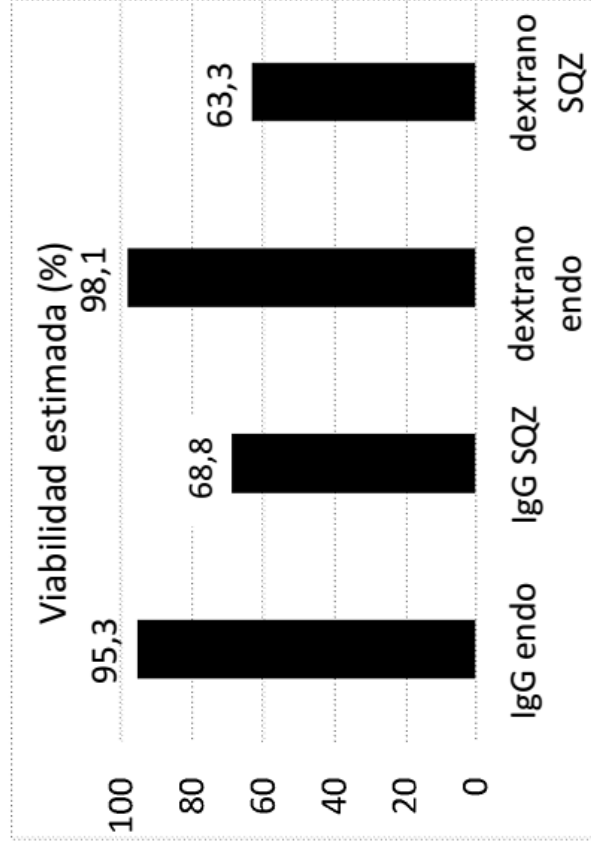
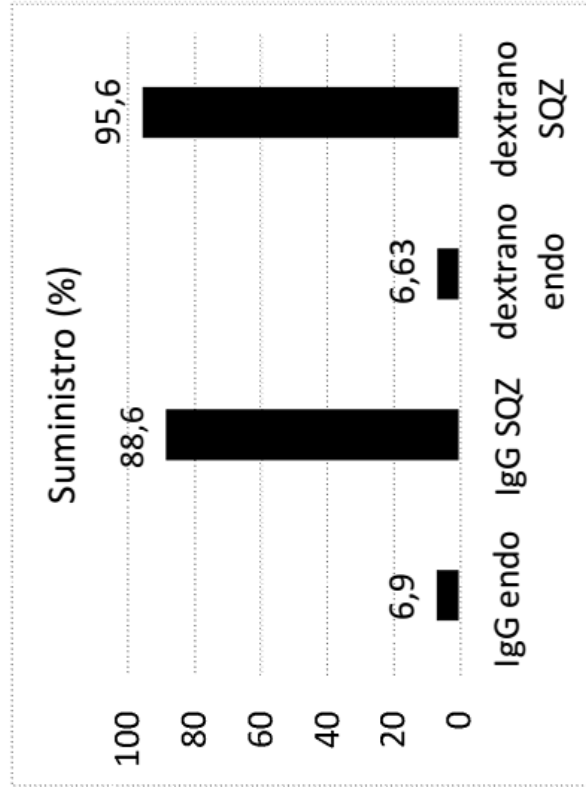
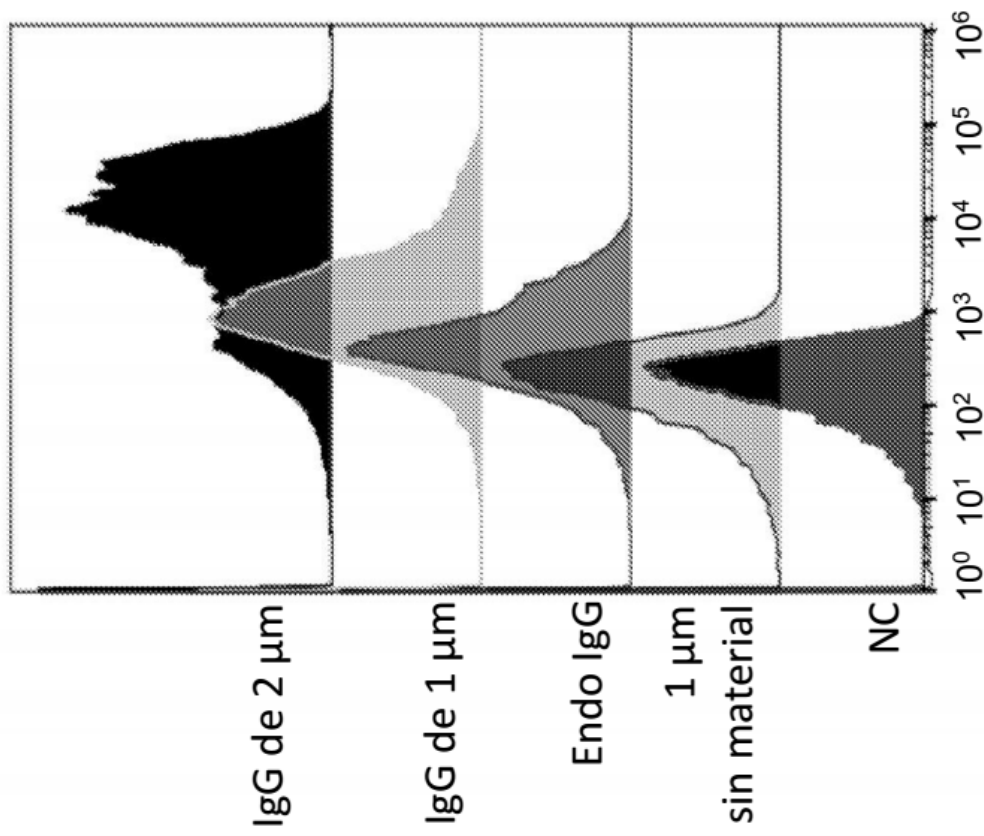


Figura 8A





RL-1A: Anticuerpo IgG

Figura 9A

Figura 9C

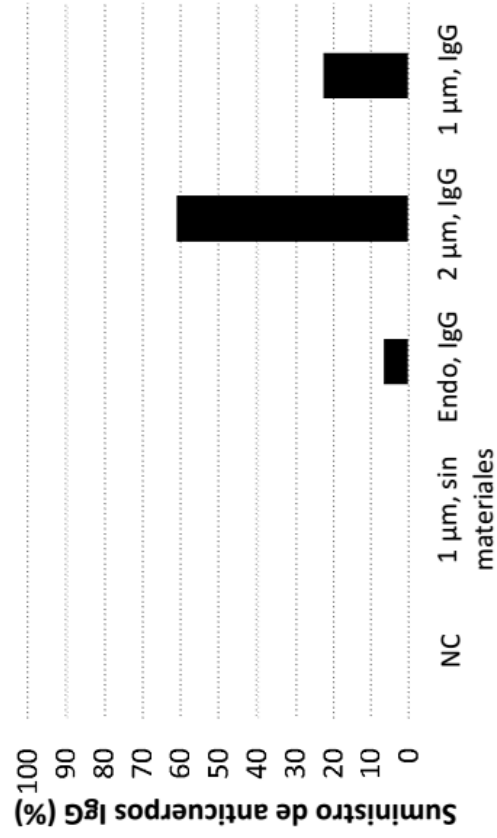
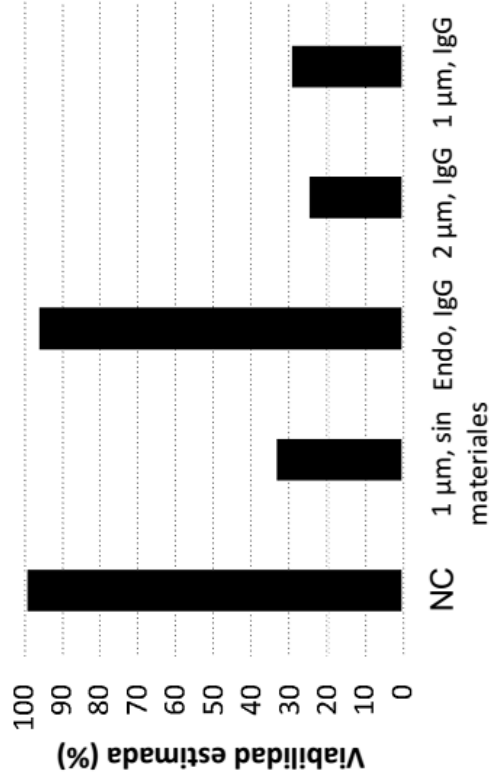


Figura 9B



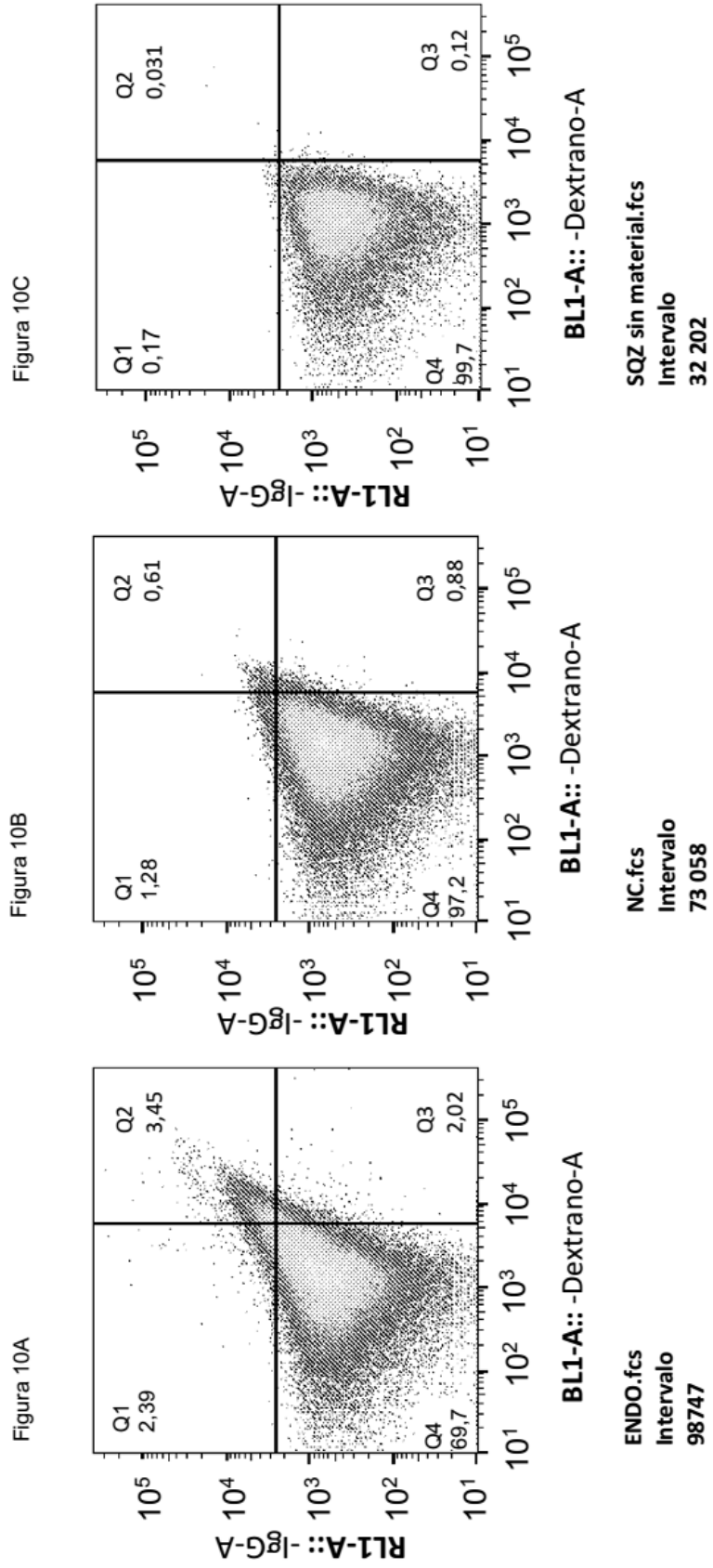
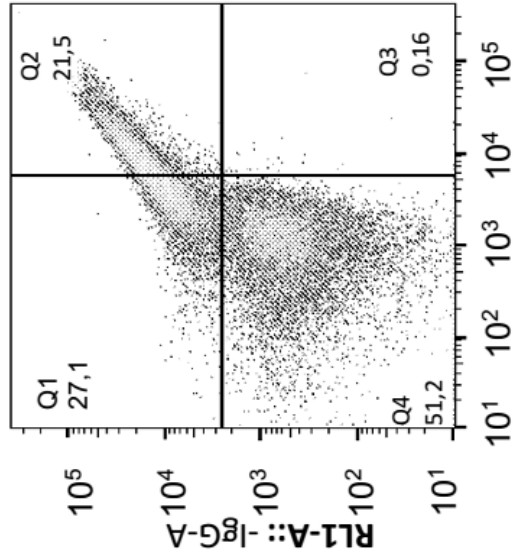
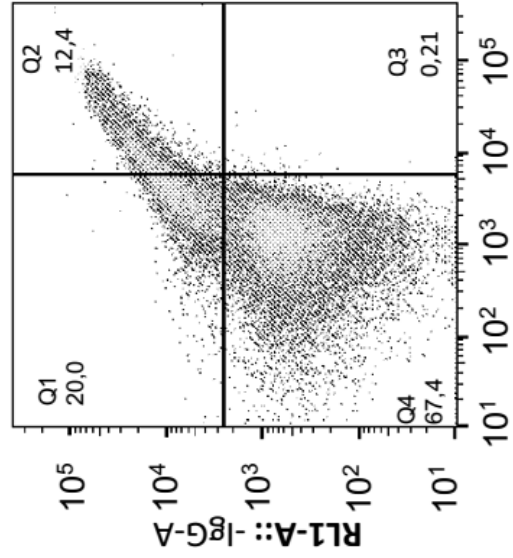


Figura 10F



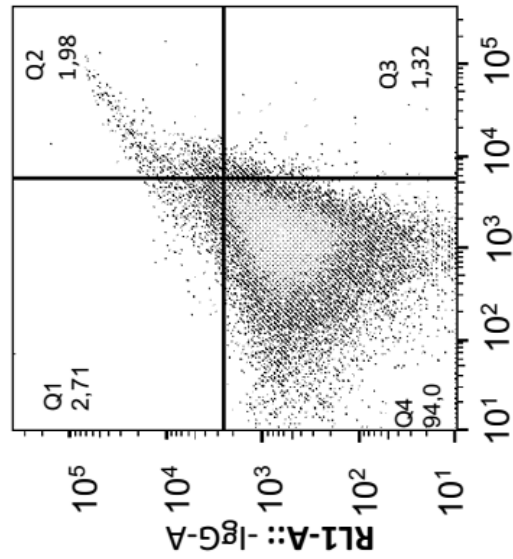
SQZ 6psi.fcs
Intervalo
28 090

Figura 10E



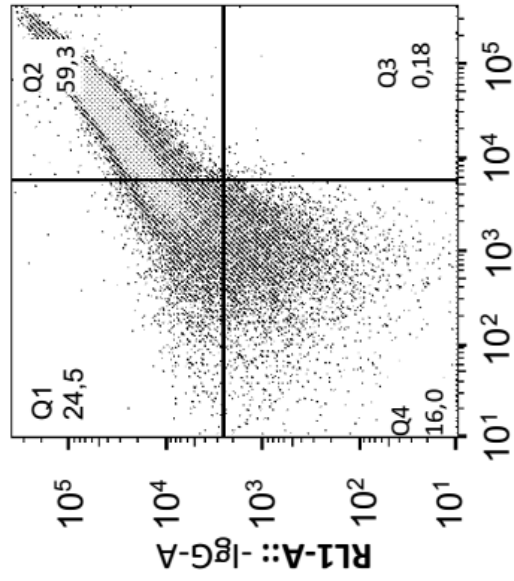
SQZ 4 psi.fcs
Intervalo
30 448

Figura 10D



SQZ 2psi.fcs
Intervalo
35 780

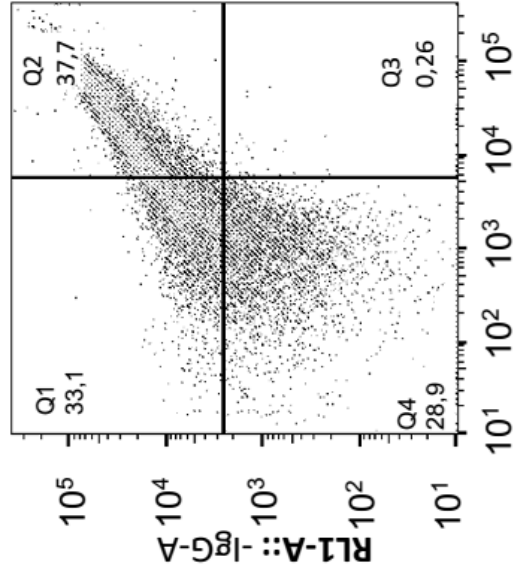
Figura 10I



BL1-A:: -Dextrano-A

Manual rápido SQZ1.fcs
Intervalo
39 819

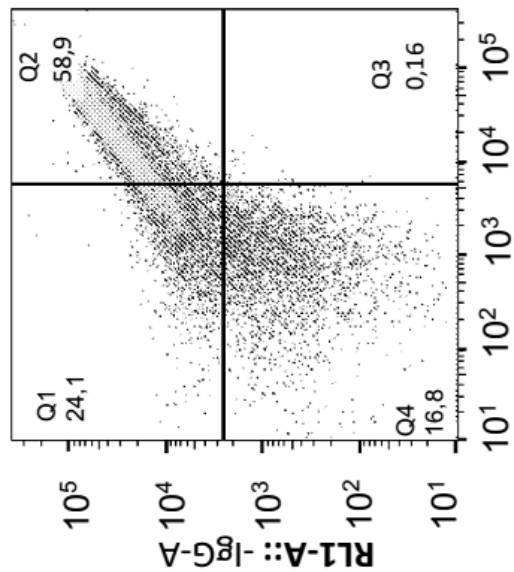
Figura 10H



BL1-A:: -Dextrano-A

SQZ 20 psi.fcs
Intervalo
16 741

Figura 10G



BL1-A:: -Dextrano-A

SQZ 10psi.fcs
Intervalo
21 440

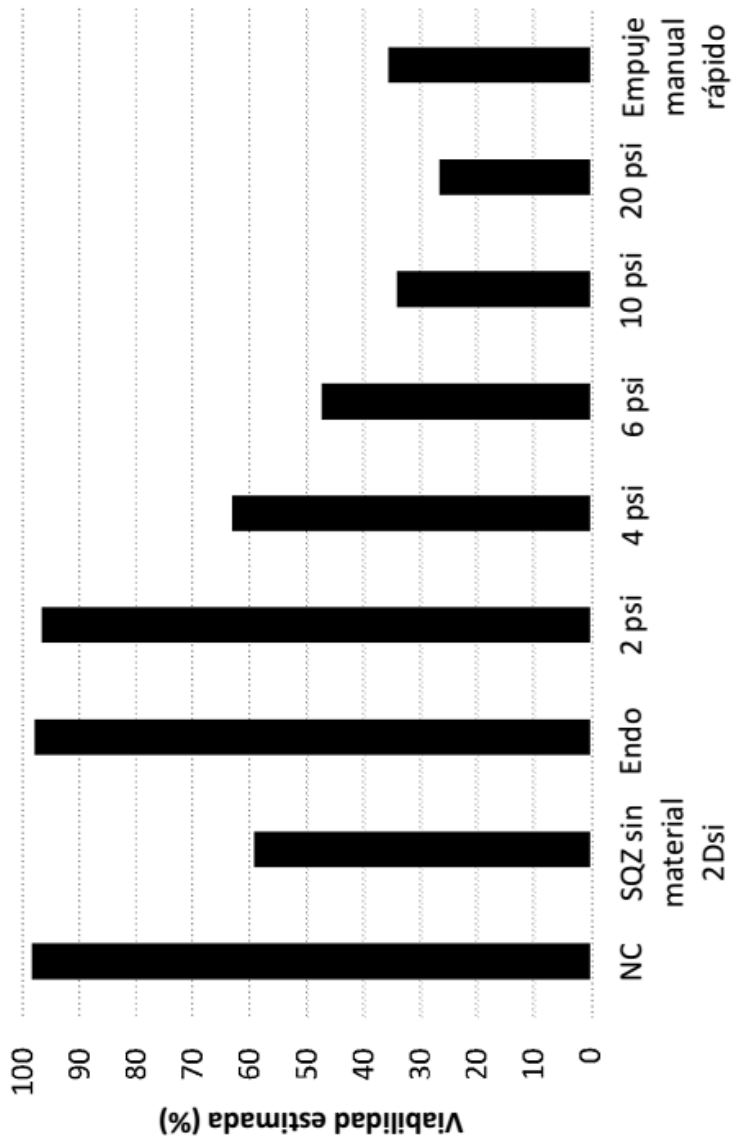


Figura 11A

Figura 11C

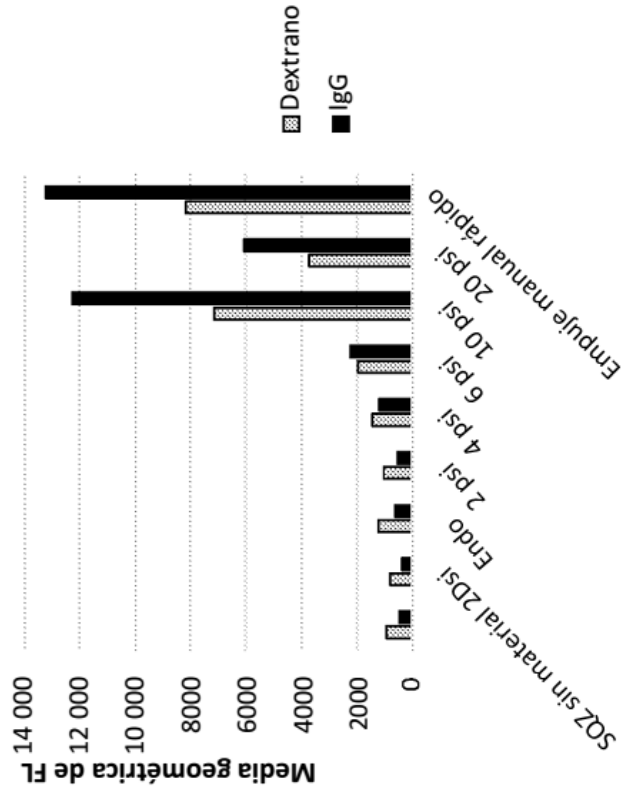


Figura 11B

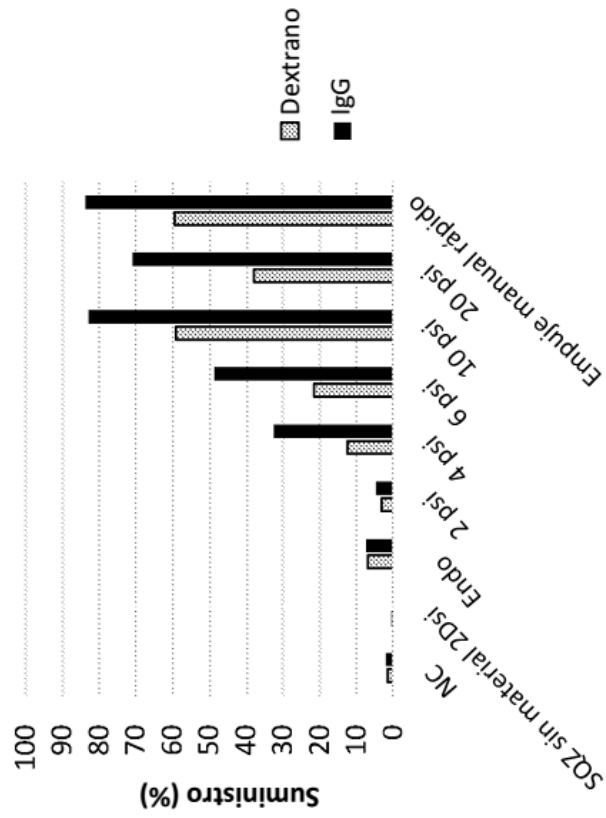
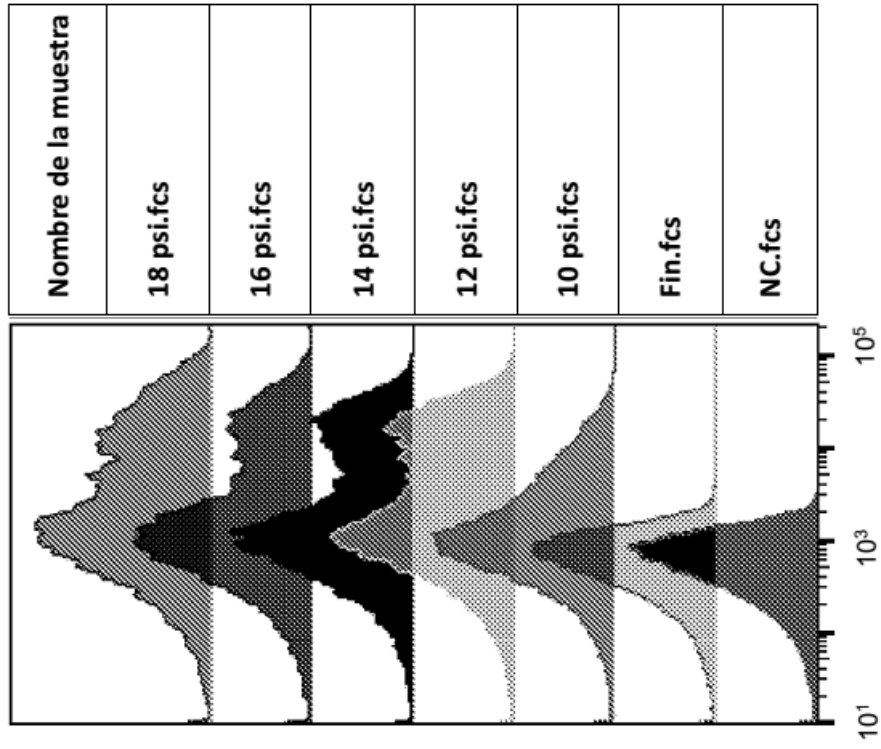


Figura 12A



BLL-A:: -70 kDa dextrano-A

Figura 12B

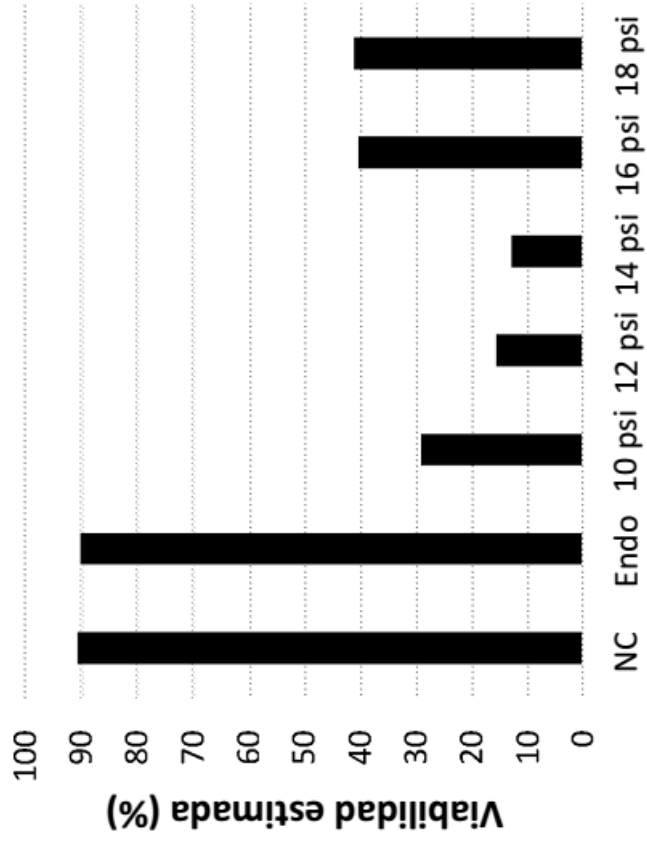


Figura 12D

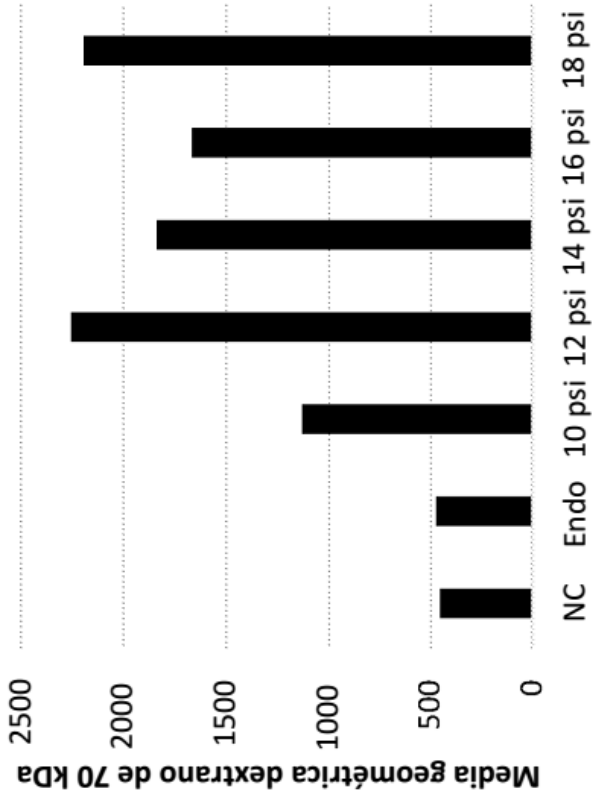


Figura 12C

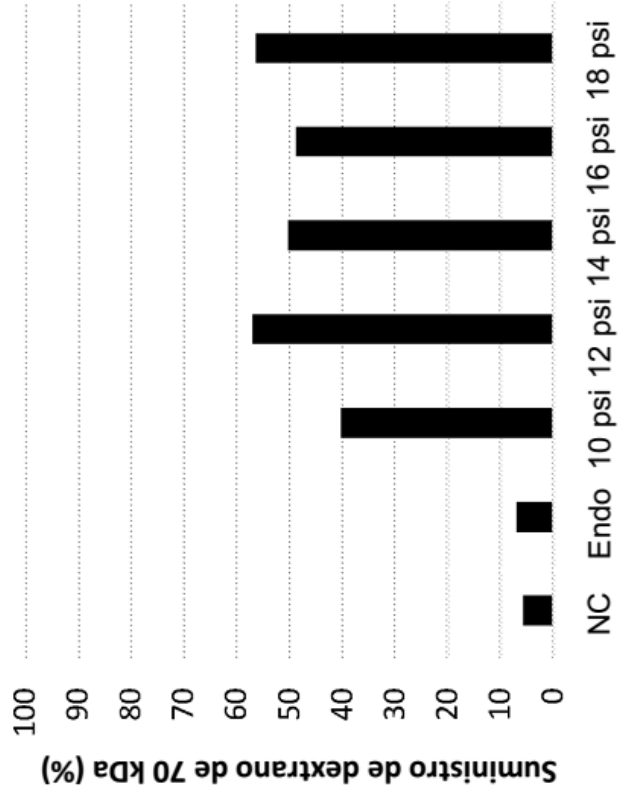


Figura 13A

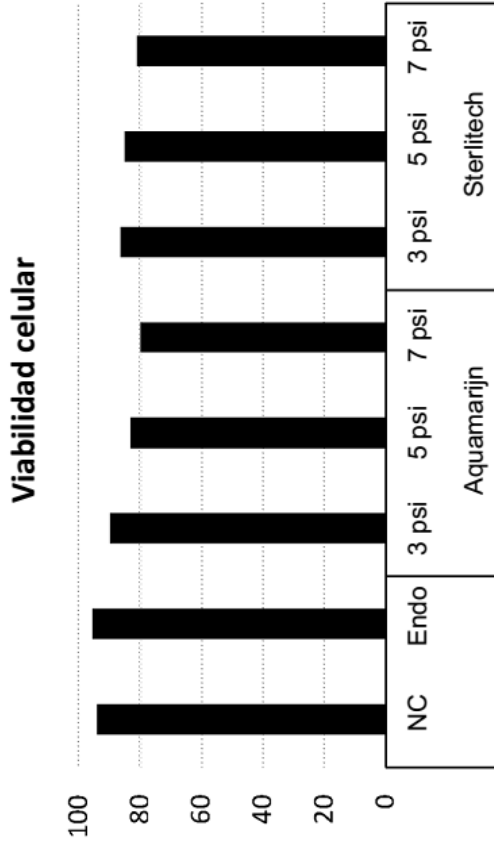
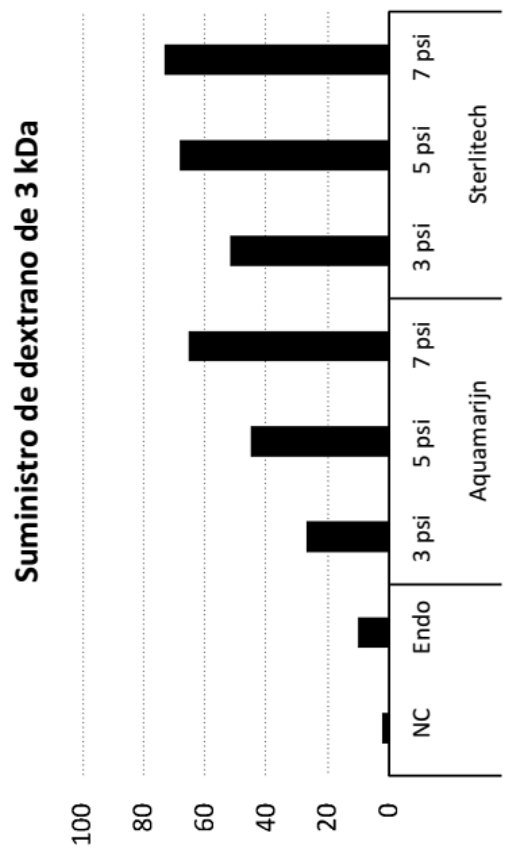
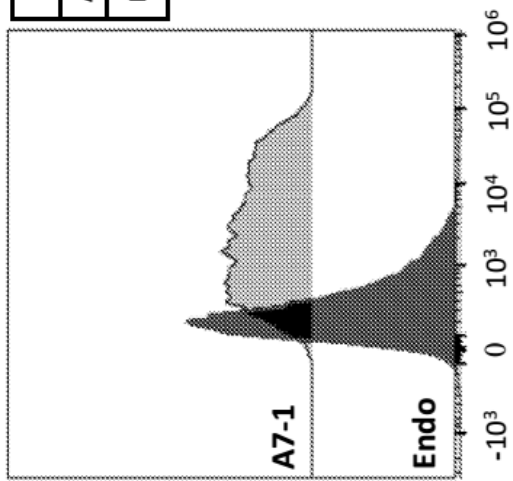


Figura 13B

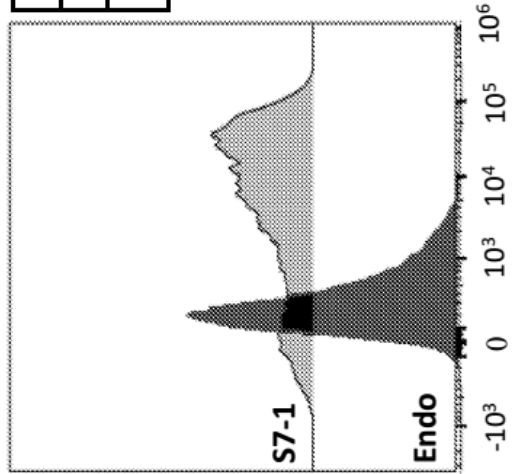


Nombre de la muestra	Frecuencia de parental
A7_1.fcs	78,8
Endo.fcs	95,4



VL1-A :: 3 kDa Dextrano-Cas Azul-A

Nombre de la muestra	Frecuencia de parental
S7_1.fcs	80,1
Endo.fcs	95,4



VL1-A :: 3 kDa Dextrano-Cas Azul-A

Figura 13C

Figura 13D

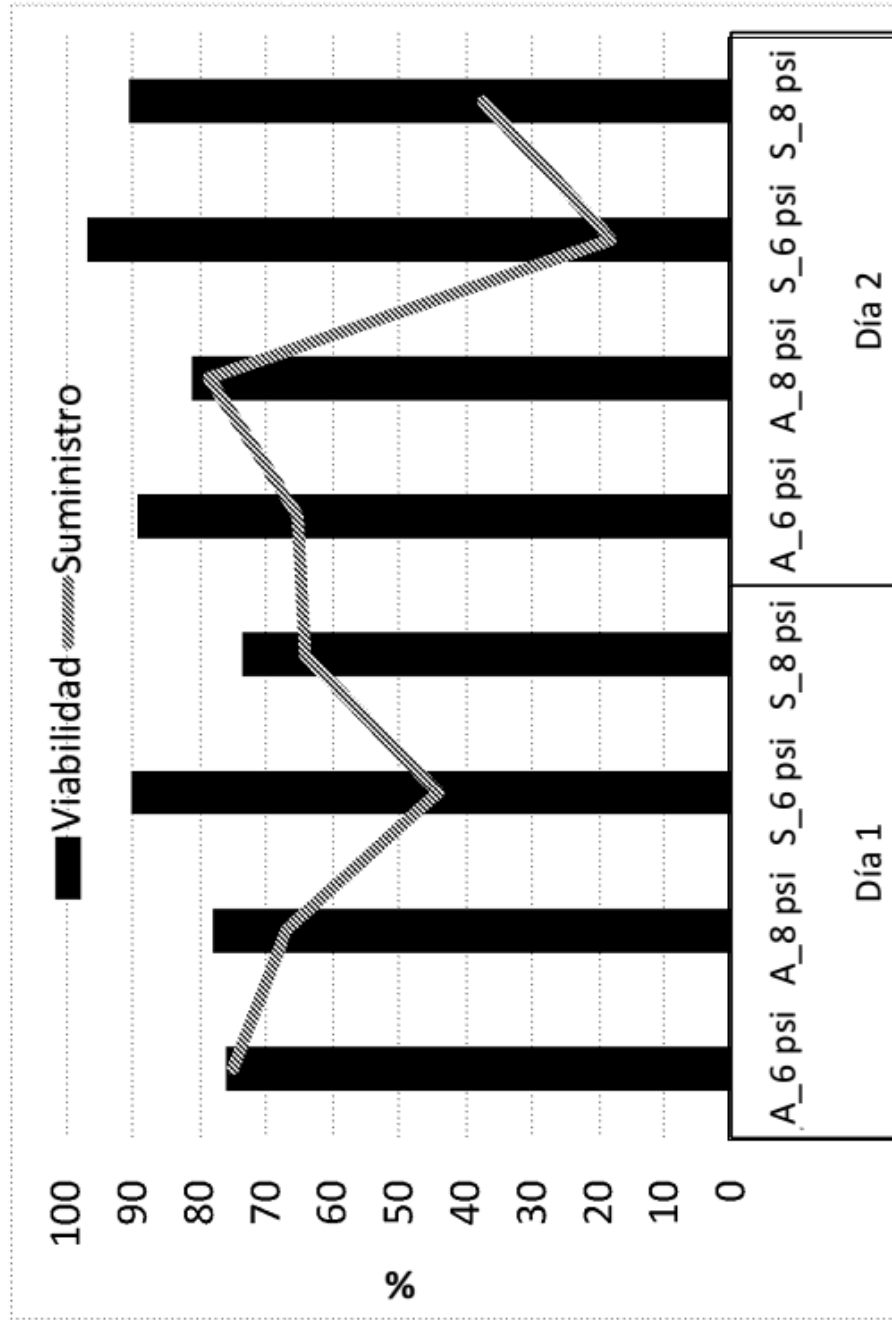
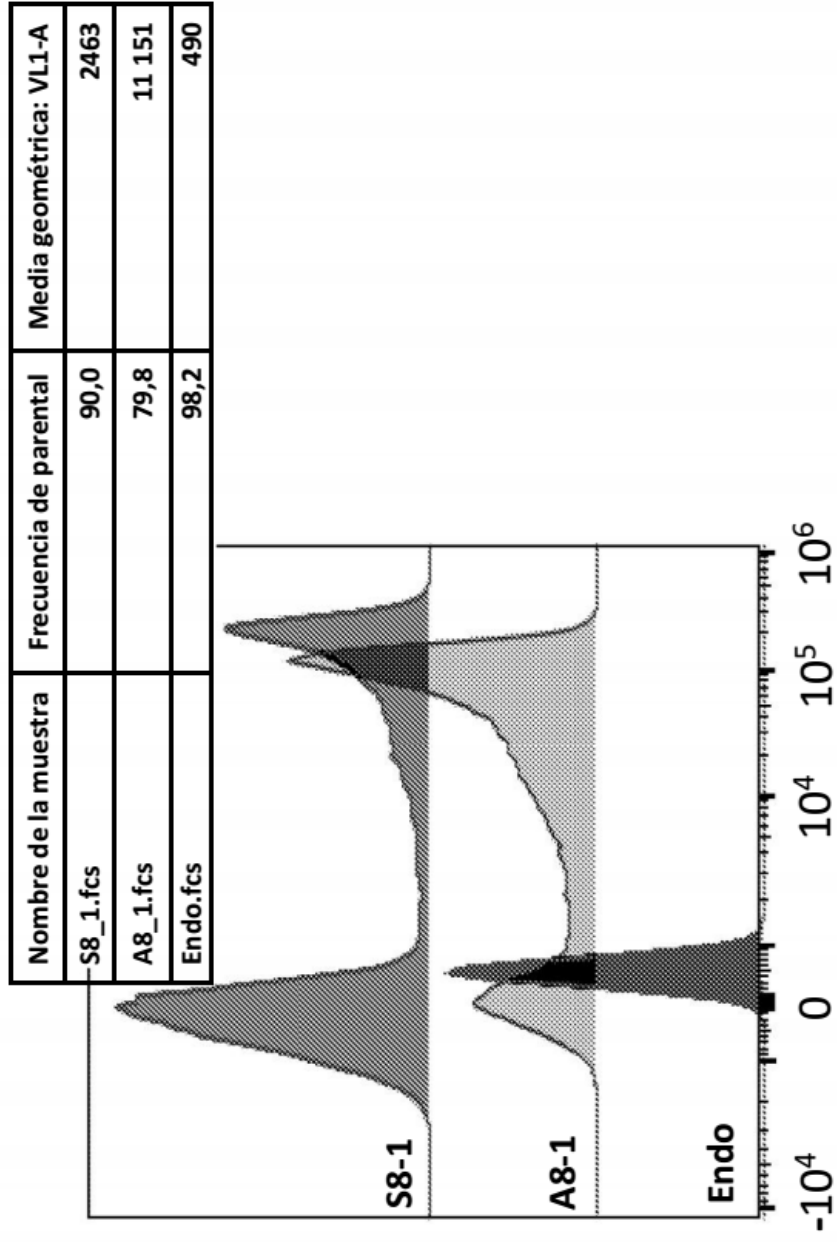


Figura 14A

Figura 14B



VL1-A :: 3 kDa Dextrano-Cas Azul-A