

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 828**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015 E 15202528 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3037518**

54 Título: **Dispositivo para colocar material en célula**

30 Prioridad:

28.12.2014 KR 20140191302

14.12.2015 KR 20150178130

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

02.03.2021

73 Titular/es:

**FEMTOBIOMED INC. (100.0%)
Sampyeong-dong, Pangyo Seven Venture Valley
2-danji, 1-301, 17 Pangyo-ro 228 beon-gil,
Bundang-gu
Seongnam-si, Gyeonggi-do 13487, KR**

72 Inventor/es:

LEE, SANGHYUN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 808 828 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

Dispositivo para colocar material en célula

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un dispositivo para colocar material en una célula a modificar. De manera más particular, la presente invención está dirigida a un dispositivo formado dentro de un material sólido y comprende, un primer paso por el que pasa la célula; un segundo paso por el que pasa el material y conectado al primer paso en una posición seleccionada aleatoriamente entre ambos extremos del primer paso; y un aparato que aplica diferencia de presión o diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso, y también está dirigido a un proceso para fabricar el dispositivo.

15 Antecedentes de la invención

Recientemente, varias investigaciones sobre nuevas tecnologías biomédicas han progresado activamente mediante la fusión de la biotecnología, tecnología electrónica y nanotecnología que también se han desarrollado notablemente últimamente.

20 Se han realizado numerosos intentos para utilizar las células del paciente manipuladas *in vitro* para tratamiento médico. Se han avanzado varios proyectos de I + D para desarrollar nuevos medicamentos para la próxima generación y verificar el objetivo del medicamento mediante la manipulación de células humanas.

25 Las tecnologías de manipulación celular se han centrado en el desarrollo de terapias celulares útiles. Particularmente, se han probado varios esfuerzos para la terapia celular que utiliza las células IPS (madre pluripotente inducida) inducidas por el factor Yamanaka.

30 Los factores Yamanaka se refieren a cuatro genes, Oct3/4, Sox2, cMyc y K1f4. La inserción de los cuatro genes en el cromosoma de una célula, usando el vector originado del virus, puede transformar la célula somática que ya terminó la diferenciación en células madre pluripotentes que pueden diferenciarse en varias células somáticas. La célula IPS ha sido evaluada como una tecnología innovadora que puede superar el problema de ética y el problema de productividad de la célula madre embrionaria, y también puede obviar las limitaciones en la capacidad de diferenciación de la célula madre adulta.

35 Sin embargo, la célula IPS causa un problema de seguridad en el vector derivado del virus insertado en una célula viva junto con los factores de Yamanaka. Además, en caso de trasplante de la célula o tejido diferenciado de las células IPS que contiene el vector derivado del virus en el cuerpo humano, puede haber otro problema que aumenta el riesgo de tumor.

40 Por lo tanto, nuevas tecnologías para la inyección de diversos materiales, tal como, ADN, RNA, polipéptido o nanopartícula, directamente en una célula sin usar el vehículo de entrega, se han requerido para desarrollar nuevas terapias celulares que puedan evitar el riesgo anterior causado por el uso del vector viral.

45 En las tecnologías convencionales de manipulación celular que no emplean ningún vehículo de entrega, el proceso típico es dañar la membrana de las células por la fuerza de corte mecánica, tratamiento químico o aplicando un campo eléctrico y luego permitir que el material, como los genes que existen en los fluidos extracelulares, fluya hacia la célula a través de los huecos dañados de la membrana, y esperar que la membrana celular dañada se recupere mediante la capacidad de autocuración de la célula.

50 Una variedad de técnicas de transfección celular, como el bombardeo de partículas, microinyección y electroporación, se han desarrollado. Excepto por la microinyección, estas técnicas se basan en procesos estocásticos en masa en los que las células se transfectan aleatoriamente por una gran cantidad de genes o polipéptidos.

55 La desventaja de la electroporación en masa convencional, el proceso más utilizado para la transfección de células, es que la dosis inyectada no puede controlarse.

60 Por lo tanto, la electroporación basada en microfluídica se ha convertido en una nueva tecnología para la transfección celular individual. La electroporación basada en microfluídica ofrece varias ventajas importantes sobre la electroporación en masa, incluyendo tensiones de baja poración, mejor eficiencia de transfección y una fuerte reducción de la mortalidad celular.

65 El documento WO2013059343 divulga un sistema microfluídico para causar perturbaciones en una membrana celular, incluyendo el sistema un canal microfluídico que define un lumen y está configurado de manera que una célula suspendida en un tampón pueda pasar a través de este, en donde el canal microfluídico incluye una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función del diámetro de la célula.

En 2011, una tecnología de electroporación de nanocanales que expone un área pequeña de una membrana celular colocada adyacente a un nanocanal a una intensidad de campo eléctrico local muy grande, fue divulgada al público (L. James Lee et al, "La electroporación de nanocanales proporciona cantidades precisas de biomoléculas en las células vivas", Nature Nanotechnology Vol. 6, noviembre de 2011, www.nature.com/naturenanotechnology publicado en línea el 16 de octubre de 2011).

El dispositivo de electroporación de nanocanales comprende dos microcanales conectados por un nanocanal. La célula que se va a transfectar se coloca en un microcanal para recostarse contra el nanocanal, y otro microcanal se llena con el agente a entregar. El diseño microcanal-nanocanal-microcanal permite la colocación precisa de células individuales. Se entrega uno o más pulsos de tensión que duran milisegundos entre los dos microcanales, causando transfección. El control de la dosis se logra ajustando la duración y el número de pulsos.

Por cierto, el dispositivo de electroporación de nanocanales divulgado en la técnica anterior previamente emplea una tapa de PDMS (polidimetilsiloxano) que cubre microcanales y nanocanales fabricados con resina polimérica mediante impresión y formados sobre el sustrato del chip.

Por lo tanto, el chip de electroporación de nanocanal descrito en el artículo de Nature

Nanotechnology, no puede evitar las grietas ocurridas entre la tapa de polidimetilsiloxano y la capa impresa de microcanales y nanocanales fabricados con resina polimérica, porque el sellado entre la tapa y la capa del canal cuyas propiedades mecánicas son diferentes entre sí, no puede ser absolutamente perfecto.

Además, dado que la estabilidad del tamaño de la tapa de polidimetilsiloxano y los microcanales y nanocanales fabricados con resina polimérica, es baja, el sellado entre la tapa y la capa de canales no puede ser perfecto. Por lo tanto, las grietas pueden ocurrir fácilmente entre la tapa y la capa de canales. Las grietas permiten la infiltración de la solución que causa la contaminación del chip de electroporación de nanocanales y también generan diversas aberraciones del campo eléctrico y la diferencia de presión aplicada para la transferencia de la célula entre los canales y para la inyección del agente de transfección en la célula.

Por lo tanto, desde hace mucho tiempo se ha previsto en este campo tecnológico una nueva tecnología que puede colocar diversos materiales cuantitativamente en una célula individual y puede controlar la cantidad de material sin dicha contaminación o aberración causada por la contaminación.

El inventor de la presente solicitud concibió el dispositivo para colocar material en una célula sin utilizar el vehículo de suministro, formado dentro de un material sólido sin ningún sellado para excluir la posibilidad de la aparición de la grieta intrínsecamente y, por lo tanto, puede obviar las desventajas de la técnica anterior, como la contaminación y la aberración causada por la grieta.

Por lo tanto, el objetivo principal de la presente invención es proporcionar un dispositivo para colocar material en una célula, formado dentro de un sólido y comprende: un primer paso por el cual pasa la célula; un segundo paso por el que pasa el material y conectado al primer paso en una posición seleccionada aleatoriamente entre ambos extremos del primer paso; y un aparato que aplica diferencia de presión o diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para formar un dispositivo para colocar material en una célula dentro de un sólido por irradiación de LASER, que comprende las etapas de: (i) formar un primer paso por el cual la célula pasa dentro de un sólido por irradiación de LASER; (ii) formar un segundo paso por el que pasa el material y conectar el segundo paso al primer paso en una posición seleccionada aleatoriamente entre ambos extremos del primer paso dentro de un sólido por irradiación de LASER; y (iii) instalar un aparato que aplica diferencia de presión o diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso.

Divulgación de la invención

El objetivo principal de la presente invención se puede lograr proporcionando un dispositivo para colocar material en una célula, formado dentro de un sólido y comprende un primer paso por el cual pasa la célula; un segundo paso por el que pasa el material y conectado al primer paso en una posición seleccionada aleatoriamente entre ambos extremos del primer paso; y un aparato que aplica diferencia de presión o diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso.

LASER significa Emisión de Radiación Estimulada por Amplificación de Luz y puede clasificarse en haces pulsados o continuos. El femto-láser es uno de los láseres de haz pulsado. Los parámetros principales de los láseres de haz pulsado son la tasa de repetición, longitud de onda, energía de pulso y ancho de pulso. Entre ellos, el ancho de pulso tiene láseres de haz pulsado bien caracterizados tales como láseres de nanosegundos (ns, 10^{-9}), láseres de picosegundo (ps, 10^{-12}) y láseres de femtosegundo (fs, 10^{-15}). Por tanto, los femto-láseres indican láseres de haz pulsado que tienen el ancho de pulso de 1-999 femtosegundo.

Un femtosegundo, que es una millonésima de nanosegundo, es de hecho un período de tiempo tremendamente corto. Las escalas temporales de los fenómenos en la naturaleza son mucho más lentas que los femtosegundos. Por lo tanto, los científicos podrían haber analizado fácilmente los fenómenos más rápidos de la naturaleza mediante la congelación en el tiempo. El primer femto-láser había sido inventado para visualizar la reacción electrónica en química. No solo los pulsos de femto-láser son ultrarrápidos, sino que la reacción de la materia luminosa en el régimen de femtosegundo se vuelve significativamente diferente debido a los fenómenos de fotones múltiples.

Las características especiales de los haces de femto-láser han permitido muchos procesos previamente imposibles. Uno es la ablación sin calor. El femto-láser no depende del calor para extirpar materia, pero elimina los electrones de valencia para ionizar materiales. Así pues, los materiales se pueden cortar sin los daños cercanos afectados por calor.

Y se descubrió que la ionización de fotones múltiples por pulsos de femto-láser es extremadamente determinista y puede localizarse en escala nanométrica, superando el límite de difracción de resolución en la interacción de la luz. En el régimen de femtosegundo, se demostró que incluso la luz visible puede lograr la ablación a escala nanométrica de materia.

Además, los pulsos de femto-láser también pueden extirpar materiales transparentes como el vidrio. Por lo tanto, se puede aplicar a diversas aplicaciones en dispositivos médicos. Teniendo en cuenta que las dificultades de proporcionar fuentes asequibles de luz de rayos X duros, el nanomecanizado 3D basado en femto-láser puede contribuir en gran medida en la nanociencia y la nanoingeniería, especialmente para aplicaciones biomédicas.

Los microcanales y los nanocanales del dispositivo de la presente invención, en el que fluye el fluido que contiene la célula, pueden formarse dentro de un material sólido, como el vidrio, por irradiación del femto-láser sobre el un material sólido.

La microfluídica que surgió en 2000 se ocupa principalmente del análisis y la manipulación de muestras biomédicas basadas en las redes de canales fluídicos a microescala. Los chips microfluídicos tienen redes fluidas complejas, donde se diseñan diversos tratamientos bioquímicos de superficie; se realizan manipulaciones electroquímicas; y el flujo impulsado por presión o electroosmótico se conduce para hacer circular el chip.

De esta forma, hay muchas normas que el chip microfluídico debe cumplir para las aplicaciones médicas. Y muchas de ellas se pueden cumplir idealmente con la incorporación de vidrio como material del chip microfluídico. Esto se debe a que el vidrio se ha usado y aprobado durante mucho tiempo en los campos médicos. Específicamente, el vidrio puede satisfacer la compatibilidad biológica, resistencia química, aislamiento eléctrico, estabilidad dimensional, fuerza estructural, hidrofilia y transparencia.

No obstante, la incorporación del vidrio como material de los chips microfluídicos tiene dificultades y limitaciones originadas por el proceso de grabado-unión, de modo que el grabado isotrópico del vidrio limita la resolución, relación de aspecto y forma de sección transversal de los canales. Además, la unión de vidrio a vidrio para completar la fabricación del chip microfluídico no solo es difícil y costosa, sino que también limita radicalmente la construcción de verdaderas estructuras tridimensionales, especialmente en nanoescalas. En su lugar, los procesos de moldeo de silicio PDMS se extendieron ampliamente debido al hecho de que es un proceso de unión al vidrio barato, fácil de replicar muchas veces y débil pero simple.

Si bien el moldeo PDMS es una excelente alternativa para fines de investigación, todavía está limitado para ser utilizado con fines médicos debido a la baja biocompatibilidad, mala resistencia química, inestabilidad dimensional, debilidad estructural y unión incompleta. La unión incompleta puede permitir fácilmente que la corriente y el fluido se filtren a lo largo de las interfaces de unión. Teniendo en cuenta que mejorar el rendimiento de la operación microfluídica depende de aumentar la prensa o los campos eléctricos, el moldeo PDMS sería incompatible con la operación microfluídica de grado médico en muchos casos.

Cuando las células se manipulan en chips microfluídicos, la presión y los potenciales eléctricos no deben limitarse para maximizar el rendimiento y la libertad operativa debido a la debilidad estructural y el problema de la unión incompleta. La resistencia estructural se puede superar adoptando sólidos rígidos y estables como material base con una transparencia aceptable como el vidrio, polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), y demás. Sin embargo, todavía se requiere mejorar significativamente el proceso de unión de grabado de vidrio para aprovechar las enormes ventajas del vidrio en las aplicaciones médicas de microfluidos.

En los procesos actuales de unión de grabado de vidrio, el vidrio de la tapa en el que se graban las redes de canales microfluídicos se adhiere al fondo plano aplicando calor o plasma en condiciones libres de polvo. Este proceso es excelente para producir en masa chips fluídicos de microescala bidimensionales. Sin embargo, la realización de verdaderas estructuras a nanoescala tridimensionales mediante el proceso de unión de grabado de vidrio está significativamente limitada por el grabado isotrópico y el requisito de la unión directa de vidrio a vidrio.

El procesamiento por láser es prometedor, donde se puede eliminar el proceso de unión. Adicionalmente, una investigación en la Univ. de Michigan, Estados Unidos descubrió que es posible un verdadero nanomecanizado

tridimensional de vidrio mediante la incorporación de pulsos láser de femtosegundo en 2004. Después de eso, se ha desarrollado el nanomecanizado de femtosegundos, realizando el procesamiento directo de verdaderas estructuras tridimensionales a nanoescala en una sola placa de vidrio sin unión.

5 En la mayoría de los casos, es mucho más conveniente y eficiente preparar canales bidimensionales a microescala basados en el proceso convencional de unión de grabado y procesar el resto de las estructuras tridimensionales y de nanoescala mediante el nanomecanizado de femto-láser. Esto se debe a que la eliminación del material del nanomecanizado de femto-láser es inevitablemente muy lenta y localizada, mientras que el proceso de grabado puede ser efectivo para el procesamiento de grandes áreas.

10 El dispositivo de la presente invención está formado dentro de un material sólido, tal como, vidrio, polímeros termoplásticos o polímeros termoestables, por ejemplo, policarbonato, acrílico, resina epoxi o poliimida. El material sólido se selecciona deseablemente de vidrio, polímeros termoplásticos o polímeros termoestables. La transparencia del material sólido, empleado para el dispositivo de la presente invención, es deseablemente superior al 5 %.

15 El primer paso, en el dispositivo de la presente invención, tiene una forma de tubo cónico interno cuyo diámetro interno se reduce gradualmente desde ambos extremos hasta la sección media. Por lo tanto, los diámetros internos de ambos extremos del primer paso son más grandes que los de la sección media del primer paso. De manera conveniente, los diámetros internos de ambos extremos del primer paso son 10 μm hasta 200 μm y los diámetros internos de la sección media del primer paso son 3 μm hasta 150 μm .

20 El dispositivo de la presente invención puede comprender uno o más del segundo paso en el que fluye el material a inyectar para poner varios materiales en una célula de una vez. El diámetro interno del segundo paso es deseablemente de 10 nm a 1000 nm.

25 Las células contenidas en el primer paso del presente dispositivo pueden moverse por diferencia de presión o por diferencia de potencial eléctrico entre ambos extremos del primer paso. La diferencia de potencial eléctrico entre ambos extremos del primer paso es deseablemente de 10 V a 1000 V, más deseablemente 15 V a 500 V, más deseablemente 20 V a 200 V.

30 Además, la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso es deseablemente de 0,5 V a 100 V, más deseablemente 0,8 V a 50 V, más deseablemente 1,0 V a 10 V.

35 Otro objetivo de la presente invención puede lograrse proporcionando un proceso para formar un dispositivo para colocar material en una célula dentro de un material sólido y comprende las etapas de: (i) formar un primer paso por el cual la célula pasa dentro de un sólido por irradiación de LASER; (ii) formar un segundo paso por el que pasa el material y conectar el segundo paso al primer paso en una posición seleccionada aleatoriamente entre ambos extremos del primer paso dentro de un sólido por irradiación de LASER; y (iii) instalar un aparato que aplica diferencia de presión o diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso.

40 El LASER irradiado sobre un material sólido en la presente invención para formar los microcanales y nanocanales dentro de un material sólido, deseablemente puede ser láser de pulso, más deseablemente femto-láser cuyo ancho de pulso es 10^{-15} segundos a 10^{-12} segundos.

45 El material sólido, empleado para la presente invención, es deseablemente un material rígido, tal como, vidrio, polímeros termoplásticos o polímeros termoestables, por ejemplo, policarbonato, acrílico, resina epoxi o poliimida. El material sólido de la presente invención se selecciona deseablemente de polímeros termoplásticos, polímeros termoestables o vidrio. La transparencia del material sólido, empleado para el dispositivo de la presente invención, es deseablemente superior al 5 % para el mecanizado de haz láser.

50 El primer paso del dispositivo de la presente invención se forma mediante la irradiación del láser de pulso en la forma del tubo cónico interno de modo que el diámetro interno se reduce gradualmente desde ambos extremos hasta la sección media. Por lo tanto, los diámetros internos de ambos extremos del primer paso son más grandes que los de la sección media del primer paso. De manera conveniente, los diámetros internos de ambos extremos del primer paso son 10 μm hasta 200 μm y los diámetros internos de la sección media del primer paso son 3 μm hasta 150 μm .

55 Los segundos pasos que pueden comprender uno o más dentro del dispositivo de la presente invención, también se forman dentro del sólido por la irradiación del láser de pulso. El diámetro interno del segundo paso es deseablemente de 10 nm a 1000 nm.

60 El flujo del fluido que contiene la célula puede controlarse efectivamente ajustando la diferencia de presión o la diferencia de potencial eléctrico aplicada en el primer paso del dispositivo de la presente invención durante la observación del movimiento de las células en el primer paso a través del microscopio.

65 Además, la cantidad de material a inyectar en una célula puede controlarse ajustando la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso de la presente invención. Además, la cantidad del material inyectado

en una célula puede calcularse i) midiendo la intensidad del fluorescente conjugado en el material inyectado en una célula o ii) por la corriente eléctrica medida al inyectar el material en una célula.

- 5 En lo sucesivo, la presente invención se describirá con mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos y figuras. Sin embargo, los ejemplos se dan solo para ilustración de la presente invención y no para limitar la presente invención dentro de los siguientes ejemplos.

Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 es un diagrama esquemático del dispositivo de la presente invención. La figura 1a muestra el dispositivo para inyectar material en una célula que tiene un paso de material (el segundo paso), y la figura 1b muestra el dispositivo de la presente invención que tiene tres segundos pasos.
- 15 La figura 2 es un diagrama esquemático del dispositivo de la presente invención.
- La figura 3 muestra una estructura tridimensional del primer paso y el segundo paso del dispositivo de la presente invención para inyectar material en una célula (figura 3a), y la figura 3b es un diagrama ampliado para la parte que conecta el primer paso y el segundo paso.
- 20 La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra el proceso para inyectar material en una célula, en los Ejemplos 2 a 5 de la presente invención.
- La figura 5 son las imágenes microscópicas para el dispositivo de la presente invención para inyectar material en una célula, preparada en el Ejemplo 1 de la presente invención.
- 25 La figura 6 es una fotografía del aspecto externo del dispositivo de la presente invención para colocar material en una célula.
- La figura 7 son las imágenes microscópicas que muestran el proceso de inyección de la proteína fluorescente roja en la célula epitelial basal alveolar humana A549 en el Ejemplo 2 de la presente invención.
- 30 La figura 8 son las fotografías que magnifican la parte celular en el proceso de inyectar la proteína fluorescente roja en la célula madre del cordón umbilical humano en el Ejemplo 3 de la presente invención.
- 35 La figura 9 muestra las fotografías del microscopio de fluorescencia de los procedimientos de inyección de RFP en la célula madre placentaria humana en el Ejemplo 4 de la presente invención.
- La figura 10 muestra las imágenes de la célula epitelial basal alveolar humana A549, después del lapso de 12 horas desde la inyección de ADN plasmídico (cy3) en el Ejemplo 5 de la presente invención.
- 40 La figura 11 muestra una vista en perspectiva desmontada de la máquina de haz láser empleada para el procesamiento del dispositivo de la presente invención, según el Ejemplo 1.

45 **Ejemplo 1: Proceso para formar los microcanales y nanocanales del dispositivo de la presente invención dentro de un vidrio sólido**

Los pulsos de femto-láser (Pharos, 4W, 190fs, frecuencia duplicada 510 nm, sistema láser de amplificación de pulso chirriado DPSS) se habían centrado en el sustrato de vidrio único a través de una lente objetivo (de 40x a 100x, N.A. de 0,5 - 1,3, Olympus y Zeiss), donde el foco puede moverse desde el exterior del sustrato hacia este. El sustrato de vidrio se había colocado en la nano-etapa lineal de 3 ejes (100x100x100 μm^3 , ± 1 nm, Mad City Labs, Inc., Madison, WI), mediante el cual el sustrato de vidrio se pudo controlar en tres dimensiones contra el foco con precisiones a nanoescala.

55 Como el foco de los pulsos de femto-láser había sido controlado para moverse desde la superficie del vidrio hacia este, el vidrio había sido retirado a lo largo de la ruta del foco. Las rutas del foco se habían escrito como código G para mecanizar automáticamente estructuras tridimensionales verdaderas directamente dentro del sustrato de vidrio. De esta forma, no se requirió unión de vidrio a vidrio.

60 Todo el proceso había sido monitoreado por una cámara CCD. Aunque el tamaño mínimo de la ablación de femto-láser de vidrio se encontró como 10 nm, la configuración del ejemplo había sido diseñada para tener un tamaño característico de alrededor de 200 nm, y el tamaño característico se podía controlar más grande o más pequeño que 200 nm ajustando los parámetros y componentes ópticos. El mecanizado de estructuras tridimensionales verdaderas había sido posible mediante el uso de material transparente como el vidrio.

65 **Ejemplo 2: Proceso de poner proteína de fluorescencia roja en células epiteliales basales alveolares humanas usando el dispositivo de la presente invención**

5 RFP (proteína de fluorescencia dsRoja, MBS5303720) se había preparado diluyendo para que fuera 1 mg/ml (disolvente: PBS, Hyclone, SH30028.02, pH 7,4). Unas células A549 (células epiteliales basales alveolares humanas) se habían subcultivado usando FBS DMEM al 10 % (glucosa alta) en una incubadora (humidificada al 5 % de CO², 37 °C).

10 Las células subcultivadas se habían separado usando TrypLE (gibco). Y la solución se había reemplazado por 1 mM de EDTA en solución D-PBS (gibco). Los residuos se filtraron con un filtro de células de 40 μm (BD), y luego las células habían sido tratadas con Calceína-AM en una incubadora (durante 15 minutos, a 37 °C). Después de reemplazar la solución por 1 mM de EDTA en D-PBS, se había preparado una solución de suspensión celular A549 de concentración de 2 x 10⁶ células/ml usando hemocitómetro.

15 La suspensión celular A549 y la RFP se habían empaquetado en jeringas de 1 ml, y cada una de ellas se había conectado con tubos de silicio a las entradas de los canales de carga celular y de carga de material. Y los otros lados de los canales de carga celular y de carga de material se habían conectado con tubos de silicio a las jeringas de 1 ml llenas de PBS.

20 Al controlar todas las jeringas, las células habían sido controladas para fluir hacia los canales de carga celular y cada una de ellas había sido colocada en el centro del canal de carga celular donde se cruzaban las rutas de inyección del material.

25 Después, se aplicaron potenciales eléctricos adecuados a ambos lados del canal de carga de material durante 3 segundos para hacer que el potencial eléctrico sea 1,76 V a lo largo de las rutas de inyección de material. El potencial eléctrico había sido medido por un osciloscopio (VDS3102, Owon) y un microscopio epifluorescente (TE2000-U, 41-17 Nikon) se había utilizado para controlar las células y el proceso de inyección de RFP.

Ejemplo 3: Proceso de poner proteína de fluorescencia roja en células madre mesenquimales de tejido de cordón umbilical humano usando el dispositivo de la presente invención

30 RFP (proteína de fluorescencia dsRoja, MBS5303720) se había preparado diluyendo para que fuera 1 mg/ml (disolvente: PBS, Hyclone, SH30028.02, pH 7,4). Las UC-MSc (células madre mesenquimales del tejido del cordón umbilical humano) habían sido tomadas del hospital CHA en Boondang, Corea del Sur. Las UC-MSc habían sido subcultivadas usando MEM-alpha (Gibco), 10 % de FBS (Hyclone), 25 ng/ml de FGF-4 (Peprotech), 1 ug/ml de heparina (Sigma) en una incubadora (humidificada al 5 % de CO², 37 °C).

35 Las células subcultivadas se habían separado usando TrypLE (gibco). Y la solución se había reemplazado por 1 mM de EDTA en solución D-PBS (gibco). Los residuos se filtraron con un filtro de células de 40 μm (BD), y luego las células habían sido tratadas con Calceína-AM en una incubadora (durante 15 minutos, a 37 °C). Después de reemplazar la solución por 1 mM de EDTA en D-PBS, una solución de suspensión UC-MSc de concentración de 2 x 10⁶ células/ml se había preparado usando hemocitómetro.

40 La suspensión de UC-MSc y la RFP se habían empaquetado en jeringas de 1 ml, y cada una de ellas se había conectado con tubos de silicio a las entradas de los canales de carga celular y de carga de material. Y los otros lados de los canales de carga celular y de carga de material se habían conectado con tubos de silicio a las jeringas de 1 ml llenas de PBS.

45 Al controlar todas las jeringas, las células habían sido controladas para fluir hacia los canales de carga celular y cada una de ellas había sido colocada en el centro del canal de carga celular donde se cruzaban las rutas de inyección del material.

50 Después, se aplicaron potenciales eléctricos adecuados a ambos lados del canal de carga de material durante 3 segundos para hacer que el potencial eléctrico fuera de 1,45 V a lo largo de las rutas de inyección de material. El potencial eléctrico había sido medido por un osciloscopio (VDS3102, Owon) y un microscopio epifluorescente (TE2000-U, 41-17 Nikon) se había utilizado para controlar las células y el proceso de inyección de RFP.

Ejemplo 4: Proceso de poner proteína de fluorescencia roja en células madre mesenquimales derivadas de placenta humana usando el dispositivo de la presente invención

60 RFP (proteína de fluorescencia dsRoja, MBS5303720) se había preparado diluyendo para que fuera 1 mg/ml (disolvente: PBS, Hyclone, SH30028.02, pH 7,4). Las PD-MSc (células madre mesenquimales derivadas de placenta humana) habían sido tomadas del hospital CHA en Boondang, Corea del Sur. Las PD-MSc habían sido subcultivadas usando MEM-alpha (Gibco), 10 % de FBS (Hyclone), 25 ng/ml de FGF-4 (Peprotech), 1 ug/ml de heparina (Sigma) en una incubadora (humidificada al 5 % de CO², 37 °C).

65 Las células subcultivadas se habían separado usando TrypLE (gibco). Y la solución se había reemplazado por 1 mM de EDTA en solución D-PBS (gibco). Los residuos se filtraron con un filtro de células de 40 μm (BD), y luego las células

habían sido tratadas con Calceína-AM en una incubadora (durante 15 minutos, a 37 °C). Después de reemplazar la solución por 1 mM de EDTA en D-PBS, Una solución de suspensión PD-MSC de concentración de 2×10^6 células/ml se había preparado usando hemocitómetro.

5 La suspensión de PD-MSC y la RFP se habían empaquetado en jeringas de 1 ml, y cada una de ellas se había conectado con tubos de silicio a las entradas de los canales de carga celular y de carga de material. Y los otros lados de los canales de carga celular y de carga de material se habían conectado con tubos de silicio a las jeringas de 1 ml llenas de PBS.

10 Al controlar todas las jeringas, las células habían sido controladas para fluir hacia los canales de carga celular, y cada una de ellas había sido colocada en el centro del canal de carga celular donde se cruzaban las rutas de inyección del material.

15 Después, se aplicaron potenciales eléctricos adecuados a ambos lados del canal de carga de material durante 5 segundos para hacer que el potencial eléctrico fuera de 0,87 V a lo largo de las rutas de inyección de material. El potencial eléctrico había sido medido por un osciloscopio (VDS3102, Owon) y un microscopio epifluorescente (TE2000-U, 41-17 Nikon) se había utilizado para controlar las células y el proceso de inyección de RFP.

20 **Ejemplo 5: Proceso de poner ADN plasmídico (cy3) en células epiteliales basales alveolares humanas usando el dispositivo de la presente invención**

ADN plasmídico (MIR7904, Mirus) se había preparado diluyendo para tener $10 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$. Unas células A549 (células epiteliales basales alveolares humanas) se habían subcultivado usando FBS DMEM al 10 % (glucosa alta) en una incubadora (humidificada al 5 % de CO_2 , 37 °C).

25 Las células subcultivadas se habían separado usando TrypLE (gibco). Y la solución se había reemplazado por 1 mM de EDTA en solución D-PBS (gibco). Los residuos se filtraron con un filtro de células de $40 \mu\text{m}$ (BD), y luego las células habían sido tratadas con Calceína-AM en una incubadora (durante 15 minutos, a 37 °C). Después de reemplazar la solución por 1 mM de EDTA en D-PBS, se había preparado una solución de suspensión celular A549 de concentración de 2×10^6 células/ml usando hemocitómetro.

30 La suspensión celular A549 y la RFP se habían empaquetado en jeringas de 1 ml, y cada una de ellas se había conectado con tubos de silicio a las entradas de los canales de carga celular y de carga de material. Y los otros lados de los canales de carga celular y de carga de material se habían conectado con tubos de silicio a las jeringas de 1 ml llenas de PBS.

35 Al controlar todas las jeringas, las células habían sido controladas para fluir hacia los canales de carga celular, y cada una de ellas había sido colocada en el centro del canal de carga celular donde se cruzaban las rutas de inyección del material.

40 Después, se aplicaron potenciales eléctricos adecuados a ambos lados del canal de carga de material durante 2 segundos para hacer que el potencial eléctrico fuera de 1,0 V a lo largo de las rutas de inyección de material. El potencial eléctrico había sido medido por un osciloscopio (VDS3102, Owon) y un microscopio epifluorescente (TE2000-U, 41-17 Nikon) se había utilizado para controlar las células y el proceso de inyección de RFP.

45 Después de la inyección de ADN plasmídico en células A549, las células cosechadas se distribuyeron en la placa de 96 pocillos con fluidos de cultivo de $200 \mu\text{l}$. Después de cultivarse durante 12 horas (humidificado al 5 % de CO_2 , 37 °C), la fluorescencia roja dentro de las células había sido inducida para confirmar que el ADN plasmídico se había expresado con éxito.

50 Para referencia a la figura 1, se muestran el dispositivo de la presente invención con un paso de material (el segundo paso, figura 1a) o con tres segundos pasos (el segundo paso, figura 1b).

55 En la figura 1, la célula (8) a inyectar con el material, se mueve a través del primer paso. La diferencia de potencial eléctrico ocurre entre el segundo paso (2) que inyecta el material y el primer paso por la energía externa (20). El material (2a) se inyecta en la célula (9) por la diferencia de potencial eléctrico entre la célula y el segundo paso cuando la célula (8) pasa por la sección central estrecha del primer paso. La célula que ha sido inyectada con material (11) se mueve al paso de extracción de célula (5) una tras otra.

60 En la figura 1b, se representa el dispositivo de la presente invención que inyecta seis (6) materiales empleando los seis (6) segundos pasos. Usando el dispositivo ilustrado en la figura 1b, es posible poner seis materiales en una célula a la vez.

65 En las figuras 1a y 1b, es posible controlar la cantidad de cada material a colocar en una célula individual ajustando la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso.

En la figura 2, están los canales de salida y entrada (4) de la solución que contiene la célula, los canales de salida (7) y entrada (6) de material, el paso (1) y el canal (5) que recuperan la célula que ha sido inyectada con material, el primer paso (1) que tiene una forma de sección media estrecha, y los dos segundos pasos (2,3) que están conectados a la sección media del primer paso (1).

5 Durante el paso de la célula a través de la porción estrecha de la sección media del primer paso (1), la célula se inserta y se mantiene en la pared interna de la sección central del primer paso. Por este contacto cercano entre la célula y la pared de la sección media del primer paso (1), se minimiza la caída de la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso (1) y el segundo paso (2, 3). La célula que se ha inyectado con el material se puede mover fácilmente a la porción ensanchada del otro lado del primer paso.

10 El segundo paso (2, 3) juega un papel como una aguja de inyección. Es decir, la carga centrada en el segundo paso (2a, 3a) mediante una energía eléctrica externa proporciona la función de perforar la membrana celular (o pared celular) de la célula individual que está en contacto cercano con el segundo paso (2a, 3a), y la fuerza impulsora para inyectar el material en la célula a través del poro formado por la perforación.

15 Aplicando diferencia de presión (por ejemplo, usando una bomba) o aplicando diferencia de potencial eléctrico (por ejemplo, usando el potencial eléctrico externo con corriente continua o corriente alterna) a los canales de entrada y salida (figura 2, 4) de la solución que contiene las células (8 de la figura 1a y figura 1b), la célula se mueve a través del primer paso (1). Después de la inyección de material en la célula, la célula se mueve al otro lado del primer paso (5 de las figuras 1a y 1b).

20 Los canales de entrada y salida (6, 7 de la figura 2) para el material a inyectar, toman y descargan el material por diferencia de presión o diferencia de potencial eléctrico entre el canal de entrada y el canal de salida. Además, mientras la célula individual está en contacto cercano con el segundo paso en la sección media estrecha del primer paso, se genera un microporo en la membrana celular (o pared celular) y luego el material se inyecta en la célula por la diferencia de potencial eléctrico.

25 Como se representa en la figura 3, los segundos pasos (2,3) están conectados a la sección media estrecha del primer paso (1).

30 La figura 4 ilustra un proceso de inyección de dos tipos de materiales en una sola célula. Los dos materiales se inyectan (11) en la célula atrapada en la sección media estrecha del primer paso (9) a través del cual se conectan los segundos pasos (10), y luego la célula inyectada con el material se recupera a través del canal de salida conectado al primer paso.

35 La imagen microscópica izquierda de la figura 5 muestra el canal de entrada y salida (5) de la solución que contiene la célula, los canales de entrada y salida (6, 7) de material que se inyectará en la célula, y el canal de salida (4) de recuperación de la célula en la que se inyectó el material.

40 Además de la imagen de la izquierda en la figura 5, la imagen derecha de la figura 5 muestra el primer paso (1) que tiene la sección media estrecha y conectada en ambos extremos al canal de entrada y salida (5) y al canal (4) de recuperación de la célula en la que el material ha sido inyectado. Las imágenes microscópicas de la figura 5 también muestran los dos segundos pasos (2, 3) formados dentro del vidrio y conectados a la sección media estrecha del primer paso.

45 La figura 6 es una fotografía del aspecto externo del dispositivo de la presente invención para colocar material en una célula.

50 La figura 7 muestra las fotografías del microscopio de fluorescencia de los procedimientos de inyección de la proteína de fluorescencia roja (RFP) en la célula epitelial basal alveolar humana A549 en el Ejemplo 2. La viveza de la célula epitelial basal alveolar humana después de la inyección con la proteína de fluorescencia roja, se confirmó mediante la prueba de determinar la fluorescencia verde de la célula epitelial basal alveolar humana tratada con Calceína AM (colorante fluorescente).

55 La figura 7a muestra que la célula A549 viva (fluorescencia verde) se localiza en la sección media del primer paso. La figura 7b muestra que cuando se aplica diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso, RFP que se ha movido a lo largo del segundo paso, comienza a inyectarse en la célula A549 (fluorescente roja). La figura 7c muestra el hecho de que RFP se está inyectando en la célula A549 (fluorescente roja) sin duda. La figura 7d muestra que la célula A549 (fluorescente verde) está viva después de la inyección de RFP. Las figuras 7e y 7f muestran que la RFP se ha inyectado con éxito en la célula A549 después de repetir dos veces el procedimiento anterior.

60 La figura 8 muestra las fotografías del microscopio de fluorescencia de los procedimientos para inyectar RFP en las células madre del cordón umbilical humano. Como se describe en la explicación anterior de la figura 7, la viveza de la célula madre umbilical humana se confirmó mediante el uso de Calceína AM.

5 La figura 8a muestra que la célula madre del cordón umbilical humano ubicada en la sección media del primer paso está viva mediante la fluorescencia verde (14). La figura 8b muestra que el segundo paso se almacena con RFP por medio de la fluorescencia roja (15), y que la inyección de RFP en la célula madre del cordón umbilical humano se prepara bien por medio de la fluorescencia verde. La figura 8c muestra que la inyección de RFP está comenzando tras la aplicación del campo eléctrico en los pasos mediante la aparición de la fluorescencia roja más brillante (16). La figura 8d muestra que la célula madre del cordón umbilical se está moviendo hacia el lado de salida del primer paso por medio de la fluorescencia roja (17). La figura 8f muestra que la célula madre del cordón umbilical se descarga totalmente del primer paso por medio de la fluorescencia roja (19).

10 La figura 9 muestra las fotografías del microscopio de fluorescencia de los procedimientos de inyección de RFP en la célula madre placentaria humana. Como se describe en la explicación anterior de la figura 7, la viveza de la célula madre umbilical humana se confirmó mediante el uso de Calceína AM.

15 La figura 10 muestra las imágenes de la célula epitelial basal alveolar humana A549 después del lapso de 12 horas desde la inyección del ADN plasmídico (cy3) descrito en el Ejemplo 5.

La figura 11 muestra una vista en perspectiva desmontada de la máquina de haz láser empleada para el procesamiento del dispositivo de la presente invención, descrito en el Ejemplo 1.

20 **Efectos ventajosos**

Como se ha explicado anteriormente, a través del dispositivo de la presente invención, diversos materiales como proteínas, genes, plásmidos, medicamentos, nanopartículas se pueden poner en células vivas. Particularmente, la cantidad de material que se coloca en una sola célula se puede controlar ajustando la diferencia de potencial eléctrico.

25 La cantidad de material inyectado en cada célula viva puede controlarse cuantitativamente. Por lo tanto, es posible que la presente invención se aplique para una gran variedad de manipulación celular y desarrollo de terapias celulares que incluyen células madre IPS.

30 Los ejemplos anteriores 1 a 5 y la descripción de las figuras 1 a 11 para las realizaciones preferidas deben tomarse como ilustrativos, en lugar de limitar la presente invención como se define por las reivindicaciones.

Como apreciarán fácilmente los expertos en la materia, se pueden utilizar numerosas variaciones y combinaciones de las características establecidas anteriormente, siempre que se incluyan dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

35

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para poner material en una célula, formado dentro de un sólido y comprende: un primer paso por el cual pasa la célula; un segundo paso por el que pasa el material y conectado al primer paso en una posición seleccionada aleatoriamente entre ambos extremos del primer paso; y un aparato que aplica diferencia de presión o diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso.
2. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dispositivo comprende uno o más del segundo paso.
3. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el diámetro de ambos extremos del primer paso es mayor que el diámetro de la sección media del primer paso.
4. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el diámetro interno de ambos extremos del primer paso es 10 μm hasta 200 μm .
5. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el diámetro interno de la sección media del primer paso es 3 μm hasta 150 μm .
6. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el diámetro interno del segundo paso es de 10 nm a 1000 nm.
7. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula se mueve por diferencia de presión o diferencia de potencial eléctrico entre los dos extremos del primer paso.
8. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso es de 0,5 V a 100 V.
9. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso es de 0,8 V a 50 V.
10. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso es de 1,0 V a 10 V.
11. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la transparencia del sólido es superior al 5 %.
12. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el sólido se selecciona del grupo que consiste en polímero termoplástico de vidrio y polímero termoestable.
13. Un proceso para formar un dispositivo dentro de un sólido para colocar material en una célula, que comprende:
 - (i) una etapa de formar un primer paso por el cual la célula pasa dentro de un sólido por irradiación de LASER;
 - (ii) una etapa de formar un segundo paso por el que pasa el material y conectado al primer paso en una posición seleccionada aleatoriamente entre ambos extremos del primer paso, dentro de un sólido por irradiación de LASER;
 - y
 - (iii) instalar un aparato que aplica diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso.
14. El proceso de la reivindicación 13, en donde el dispositivo comprende uno o más del segundo paso.
15. El proceso de la reivindicación 13, en donde el diámetro de ambos extremos del primer paso es mayor que el diámetro de la sección media del primer paso.
16. El proceso de la reivindicación 15, en donde el diámetro interno de ambos extremos del primer paso es 10 μm hasta 200 μm .
17. El proceso de la reivindicación 16, en donde el diámetro interno de la porción media del primer paso es 3 μm hasta 150 μm .
18. El proceso de la reivindicación 17, en donde el diámetro interno del segundo paso es de 10 nm a 1000 nm.
19. El proceso de la reivindicación 13, en donde la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso es de 0,5 V a 100 V.
20. El proceso de la reivindicación 19, en donde la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo paso es de 0,8 V a 50 V.
21. El proceso de la reivindicación 20, en donde la diferencia de potencial eléctrico entre el primer paso y el segundo

paso es de 1,0 V a 10 V.

22. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el LASER es láser de femtosegundo.

5 23. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la transparencia del sólido es superior al 5 %.

24. El proceso de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el sólido se selecciona del grupo que consiste en vidrio, polímero termoplástico y polímero termoestable.

Figura 1.

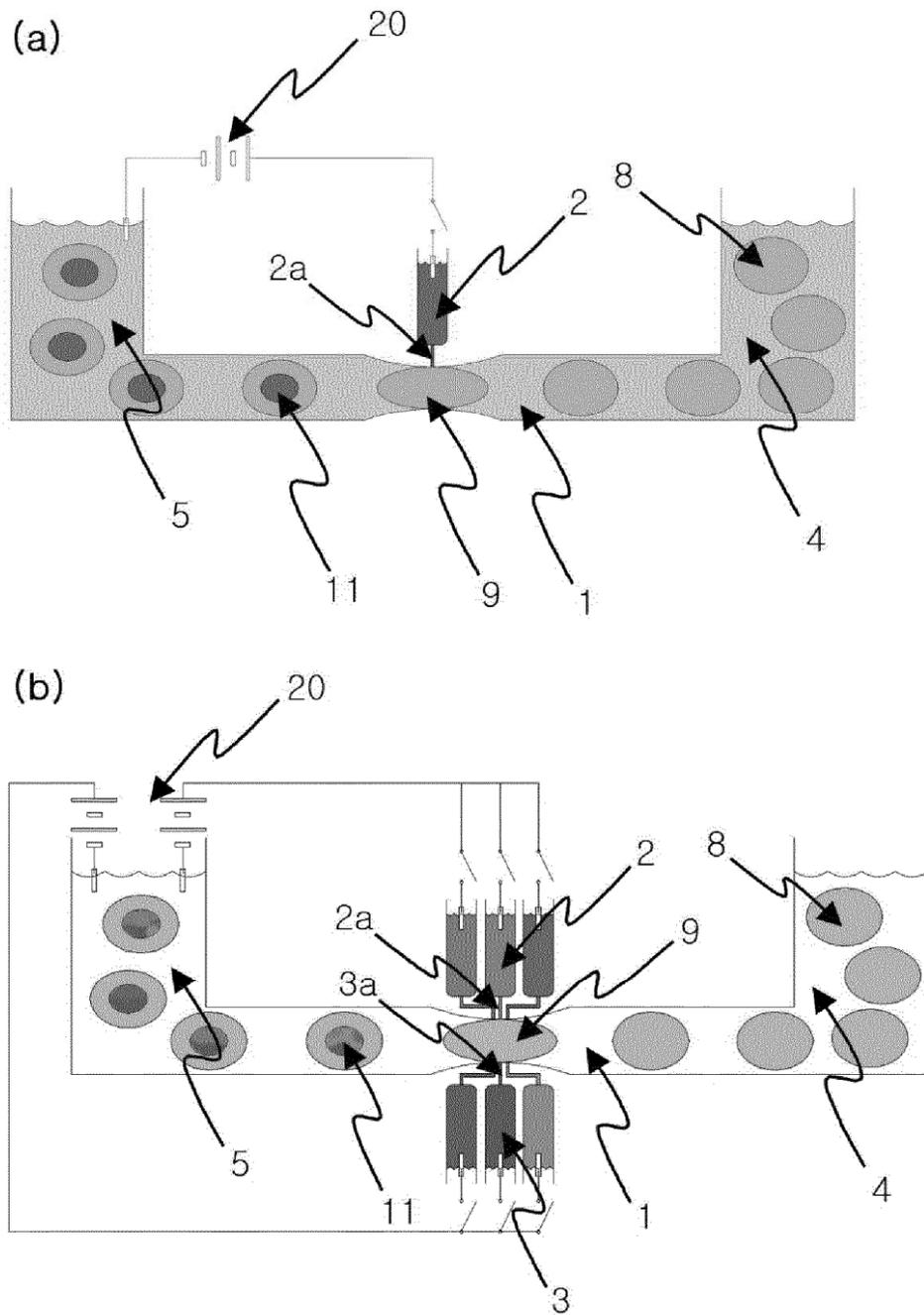


Figura 2

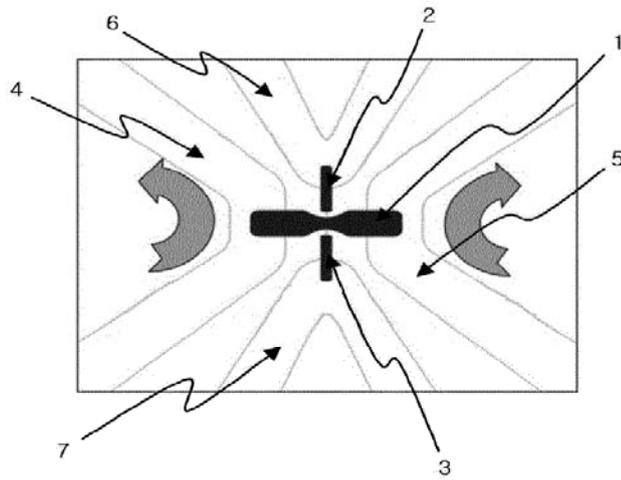


Figura 3

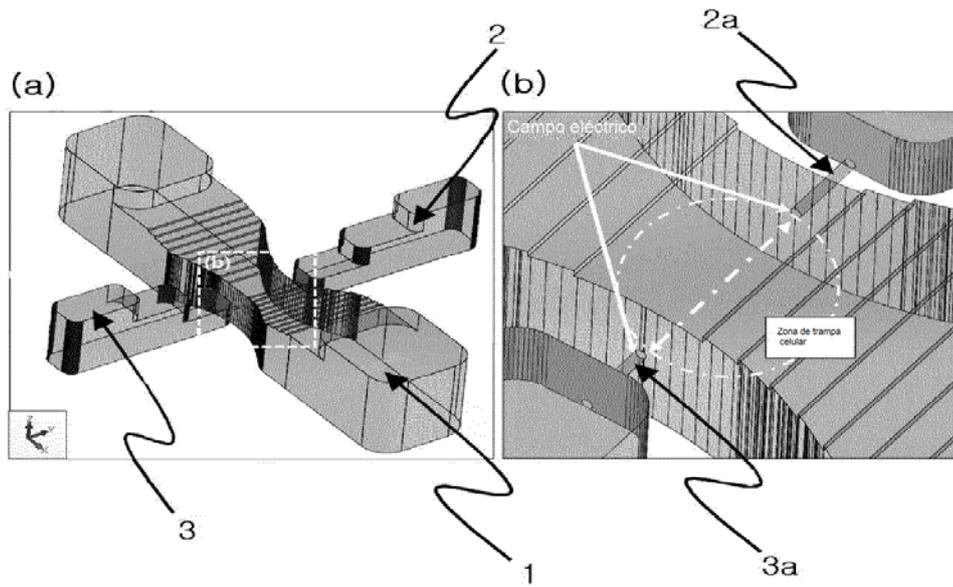


Figura 4.

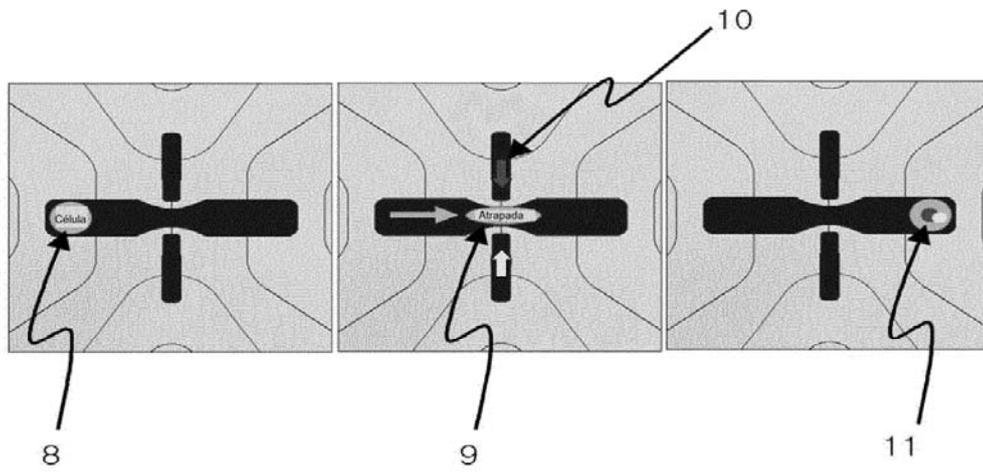


Figura 5.

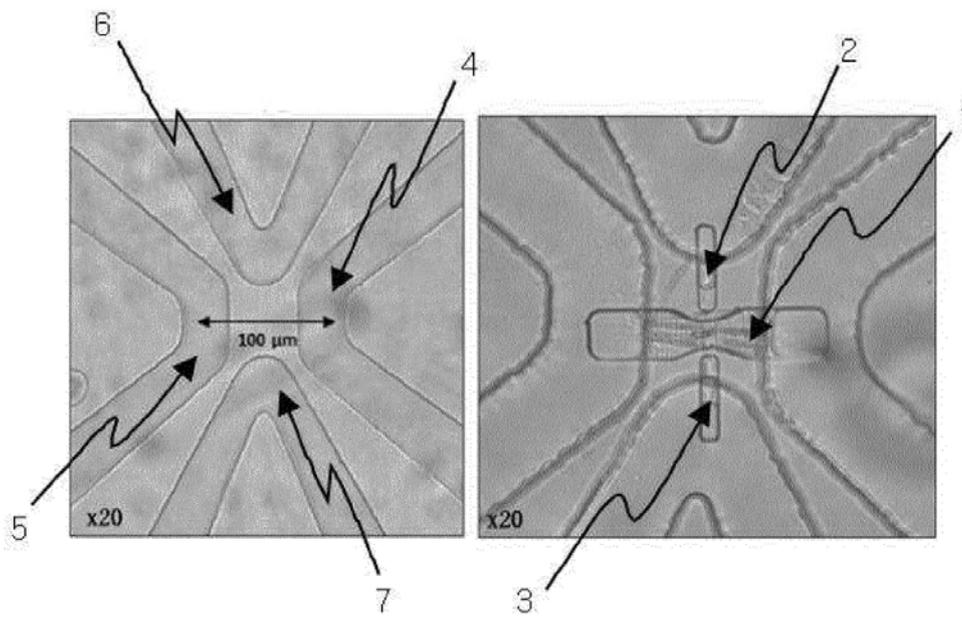


Figura 6.

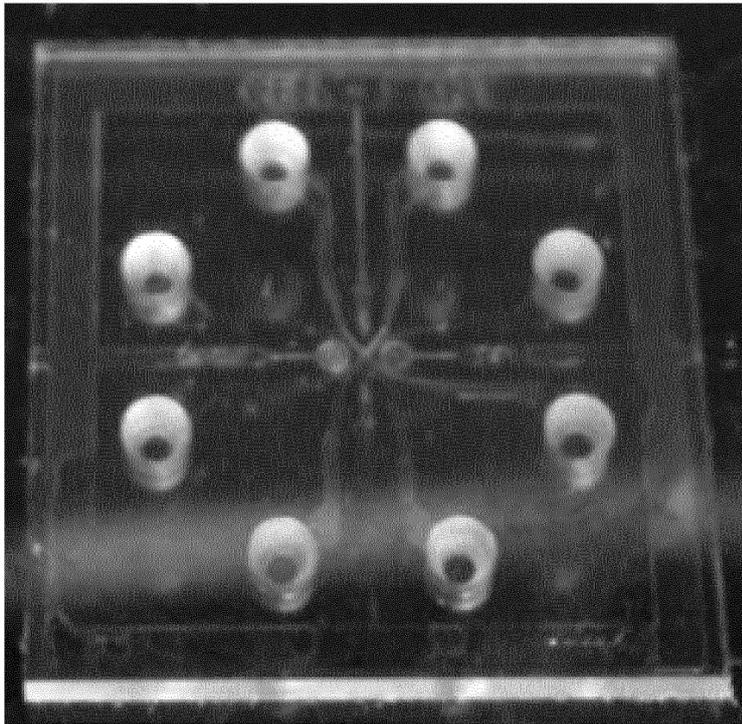


Figura 7.

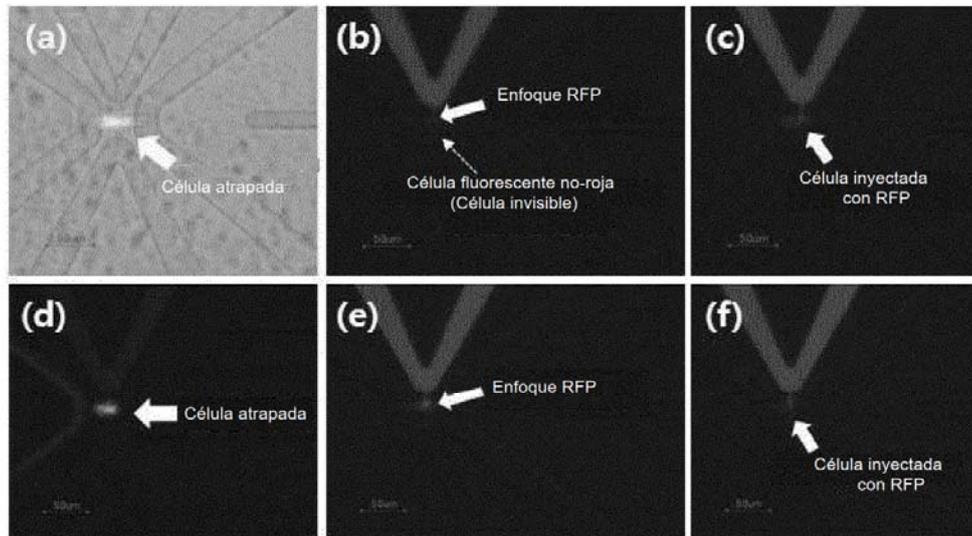


Figura 8.

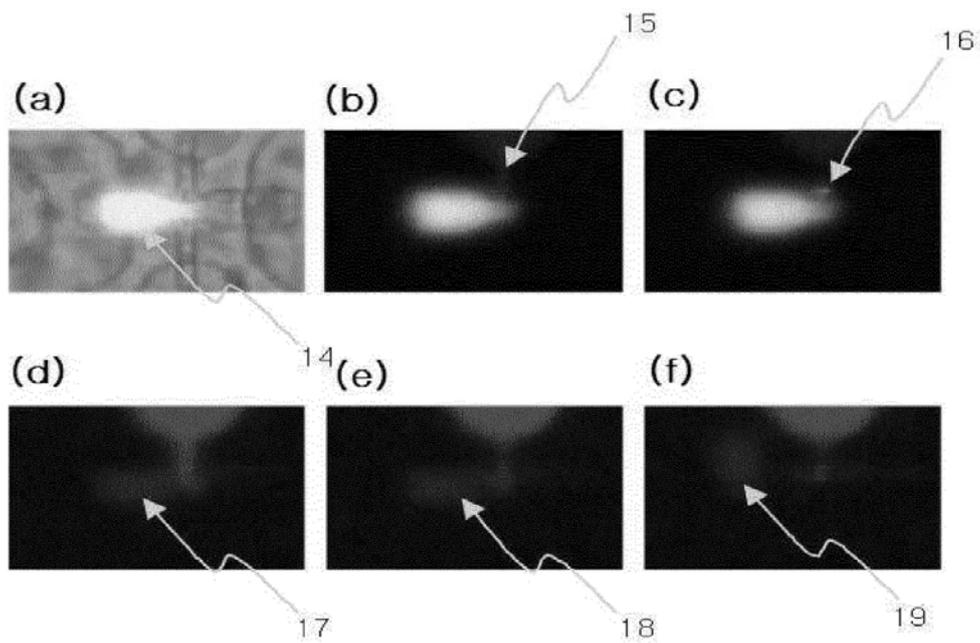


Figura 9.

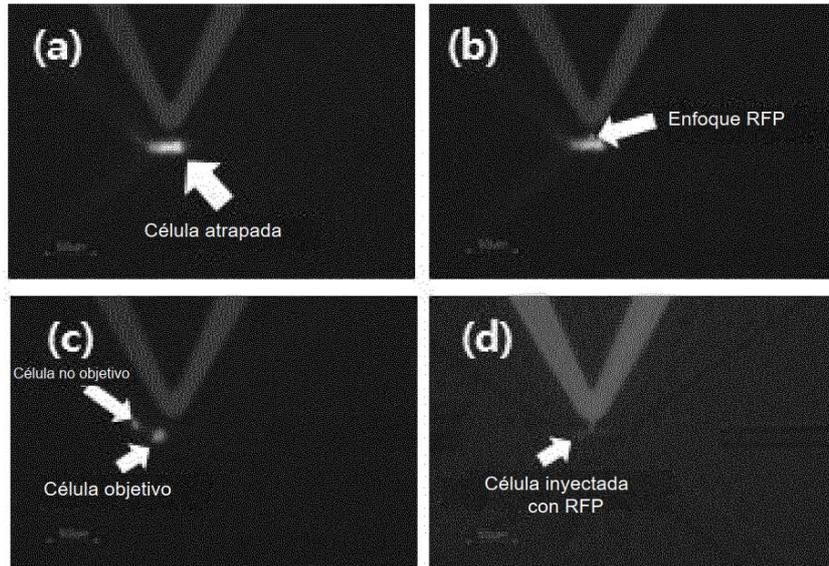


Figura 10.

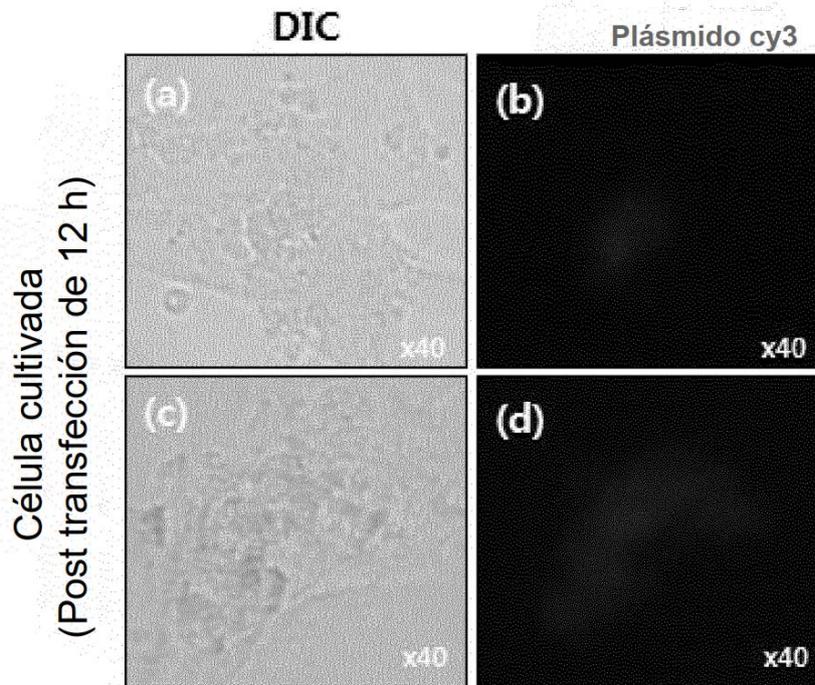


Figura 11.

