

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 638**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

**C12M 1/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2011 PCT/GB2011/000553**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011 WO2011124899**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2011 E 11719035 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2556149**

54 Título: **Poración celular**

30 Prioridad:

**09.04.2010 GB 201005926**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF ST  
ANDREWS-COLLEGE GATE (100.0%)  
North Street, St Andrews  
Fife KY16 9AJ, GB**

72 Inventor/es:

**GUNN-MOORE, FRANK;  
DHOLAKIA, KISHAN y  
ARITA, YOSHIHIKO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 609 638 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

Poración celular

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un sistema y un método para poración dirigida de membrana de células y tejidos biológicos en un área específica, y a la poración a gran escala de aquellas en una zona amplia con microburbujas excitadas por la descomposición inducida por láser de nanopartículas individuales ópticamente atrapadas.

10

## Antecedentes de la invención

Se conoce una serie de mecanismos para permitir la poración transitoria de células para la introducción de agentes terapéuticos. Recientemente, esto ha incluido un conjunto de métodos ópticos, que añaden el potencial de esterilidad, reconfiguración y selectividad de células individuales. Por ejemplo, se pueden usar pulsos láser de alta tasa de repetición (~ 80 MHz) de baja potencia promedio (<100 mW) para crear plasmas de baja densidad en un foco que reaccionan con la bicapa lipídica de la célula causando la generación de poros transitorios, véase Vogel, A., Linz, N., Freidank, S. y Paltauf, G., *Phys Rev Lett* 100 (3), 0.381.021-0381024 (2008). Son adecuados para la poración de la membrana de las células que alcanzan una alta eficiencia de transfección de hasta el 80 % con una viabilidad celular aceptable de ~ 80 %, como describen U. K. y Konig, K., *Nature* 418 (6895), 290–291 (2002) y Tsampoula, X. et al., *Appl Phys Lett* 91 (5), 053902 (2007). Sin embargo, este enfoque requiere el posicionamiento preciso del foco del láser sobre la membrana celular y no es adecuado para un sistema de transfección de alto rendimiento.

25 Las burbujas de cavitación también pueden desempeñar un papel importante en la formación de poros en la membrana plasmática. Se sabe que las burbujas acústicas osciladas por irradiación ultrasónica (insonación) pueden conducir a una mayor permeabilización de la membrana (sonoporación) de las células. Esto se describe en la materia, véase por ejemplo: Feril, L. B. et al., *Ultrasound Med Biol* 29 (2), 331–337 (2003); Miller, D. L. y Song, J. M., *Ultrasound Med Biol* 29 (6), 887–893 (2003); Honda, H., Kondo, T., Zhao, Q. L., Feril, L. B. y Kitagawa, H., *Ultrasound Med Biol* 30 (5), 683–692 (2004), y Prentice, P., Cuschierp, A., Dholakia, K., Prausnitz, M. y Campbell, P., *Nat Phys* 1 (2), 107–110 (2005). Cuando la cavitación se produce cerca de un límite rígido, tal como una membrana celular, las burbujas tienden a colapsar de manera asimétrica, a menudo formando chorros de líquido de alta velocidad dirigidos hacia la pared que pueden causar la poración de la membrana localizada, lo que permite la absorción de moléculas por estas células (Benjamin, T. B. y Ellis, A. T., *Philos Tr R Soc S–A* 260 (1110), 221–245 (1966)). Sin embargo, este enfoque a menudo activa múltiples burbujas de cavitación, que conducen a la captación molecular no uniforme y esporádica que carece de un control espacial refinado.

40 Las burbujas de cavitación pueden producirse mediante la descomposición óptica o la ablación de un medio de absorción (véase Barnes, P. A. y Rieckhof, K. E., *Appl Phys Lett* 13 (8), 282–284 (1968) y Bell, C. E. y Landt, J. A., *Appl Phys Lett* 10 (2), 46–48 (1967)). De los enfoques concebidos hasta la fecha, la permeabilización de la membrana de las células se ha logrado a costa de una cantidad significativa de la lisis celular debido al umbral relativamente alto de descomposición de las sustancias absorbentes utilizadas en este procedimiento, por ejemplo, agua (presente en el medio) o sílice (cubreobjetos de vidrio), lo que da como resultado una burbuja de cavitación mucho más grande (milímetros de diámetro) en comparación con el tamaño de la célula (decenas de micrómetros) véase Hellman, A. N., Rau, K. R., Yoon, H. H. y Venugopalan, V., *J Biophotonics* 1 (1), 24–35 (2008); Rau, K. R., Quinto–Su, P. A., Hellman, A. N. y Venugopalan, V., *Biophys J* 91 (1), 317–329 (2006), y Soughayer, J. S. et al., *Anal Chem* 72 (6), 1342–1347 (2000).

50 Umebayashi Yukihiro et al, "Elevation of plasma membrane permeability on laser irradiation of extracellular latex particles.", *Journal Of Biochemistry (Tokio)*, (200308), vol. 134, n.º 2, describe un sistema de combinación de láser-látex que permite que las moléculas impermeables a la membrana atraviesen las membranas celulares.

Yao Cuiping et al, "Influence of laser parameters on nanoparticle–induced membrane permeabilization", *Journal Of Biomedical Optics*, (200909), vol. 14, no. 5, describe la permeabilidad de la membrana por análisis por citometría de flujo con yoduro de propidio y dextrano isotiocianato de fluoresceína utilizando diferentes fuentes de láser.

Yao Cuiping et al, "Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles", *Journal of Biomedical Optics* 2005, (200511), vol. 10, n.º 6, describe una combinación de la irradiación con láser con nanopartículas, que cambia la permeabilidad de la membrana plasmática.

60

Cui–Ping Yao et al, "Laser–Based Gene Transfection and Gene Therapy", *IEEE Transactions On Nanobioscience*, (20080601), vol. 7, n.º 2, describe cuatro técnicas diferentes de transfección asistida por láser.

**Sumario de la invención**

Los aspectos de la invención están de acuerdo con las reivindicaciones independientes adjuntas. Algunas características preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

5 La presente invención se refiere a la poración dirigida de la membrana de células en una zona específica y la poración a gran escala de aquellas de una zona amplia con microburbujas excitadas por la descomposición inducida por láser de nanopartículas individuales ópticamente atrapadas. Poración de la membrana celular crea idealmente una abertura a través de la célula (por lo general, la abertura es temporal, y con el tiempo se cierra).

10 Cuando la luz, por ejemplo de un láser por conmutación Q que funciona con pulsos láser de nanosegundos, se enfoca sobre una sola nanopartícula individual ópticamente atrapada, se puede producir descomposición inducida por láser, lo que lleva a la formación de plasma y emisión de ondas de choque por su expansión, seguido de la vaporización de la nanopartícula o líquido (que rodea al medio acuoso). Este volumen de vapor constituye efectivamente una burbuja de cavitación, que se expande a medida que aumenta el volumen de la nanopartícula separada por ablación o líquido vaporizado. La expansión de la burbuja y su posterior colapso pueden acompañarse de la emisión de los transitorios acústicos y microchorros dependiendo de la posición de la burbuja de cavitación con respecto al sustrato. Estas propiedades fotomecánicas pueden conducir a la permeabilización de la membrana plasmática de las células.

20 La formación de chorro y la emisión de los transitorios acústicos sobre el colapso dependen del parámetro adimensional de separación,  $\gamma = Z_0/R_{max}$ , en la que  $Z_0$  es la distancia entre el centro de la burbuja/nanopartícula y la pared, y  $R_{max}$  es el radio máximo de la burbuja (Hentschel, W. y Lauterborn, W., Appl Sci Res 38, 225–230 (1982)). Cuando  $\gamma \leq 1$  (es decir, la pared de la burbuja está en contacto con el límite), la formación de chorro es predominante en comparación con la emisión acústica. Por otro lado, cuando  $\gamma \gg 1$ , (es decir, la burbuja está libre de distorsión), la energía de la burbuja se transforma de manera más eficiente en energía acústica. Por lo tanto, el chorro puede causar poración localizada de la membrana de múltiples células en una zona específica, mientras que los transitorios acústicos pueden producir poración de las células a gran escala en una zona amplia (cientos de micrómetros), ya que las ondas acústicas pueden propagarse una larga distancia (normalmente cientos de micrómetros) en el medio de muestra.

35 Es importante controlar el volumen/tamaño de la cavitación (determina la energía total de las burbujas disponible para el chorro y las energías acústicas), así como su posición axial desde el límite (determina la intensidad relativa entre el chorro y las emisiones acústicas). Las pinzas ópticas permiten el confinamiento y el posicionamiento de nanopartículas y nanopartículas en un lugar deseado dentro de la muestra. Con este enfoque, la energía umbral requerida para LIB es dependiente del material de nanopartículas y su tamaño y es libre del medio circundante. Por lo tanto, la técnica puede optimizar la energía de la burbuja y el parámetro de separación  $\gamma$ , que conducen a la permeabilización de la membrana de células de mamífero con retención de la viabilidad celular.

40 En resumen, el método de la invención tiene el potencial de aumentar la aplicabilidad de la transfección de células ópticamente controlada. La técnica sólo requiere una modesta energía de pulso de láser de nanosegundos, reduce la lisis celular y funciona de una manera espacialmente selectiva. Ofrece grandes ventajas debido a su simplicidad, menor coste y mayor fiabilidad en comparación con los métodos existentes.

45 El método de la invención puede implicar adicionalmente introducir, o permitir la introducción, un material en la célula porada. El material que se va a introducir puede ser un fluido.

50 Se pueden proporcionar múltiples nanopartículas y el método implica causar simultáneamente la degradación inducida por láser de las múltiples partículas.

Puede utilizarse un elemento óptico para generar múltiples haces de una única fuente de láser para atrapar las partículas múltiples.

55 Puede utilizarse un elemento óptico para generar múltiples haces de una única fuente de láser para producir descomposición inducida por láser de las partículas múltiples.

60 Puede utilizarse un elemento óptico para generar múltiples haces de una única fuente de láser para producir descomposición inducida por láser de las partículas múltiples. Puede utilizarse el mismo elemento óptico para generar múltiples haces de otra fuente de láser para producir descomposición inducida por láser de las partículas múltiples.

El elemento óptico puede un elemento óptico de difracción, por ejemplo, un modulador espacial de luz o un deflector acústico-óptico.

65 El método puede implicar la colocación de la partícula cerca de una superficie dura antes de causar descomposición inducida por láser.

La partícula puede tener una dimensión de 1 micrómetro; preferentemente menos de o igual a 500 nm. La partícula puede tener un tamaño que coincida con el tamaño del punto focal limitado de difracción del láser de descomposición.

- 5 La partícula puede estar hecha de cualquier material adecuado, por ejemplo un material seleccionado de: sílice; poliestireno; látex; oro; plata; carbón. La partícula puede tener la forma de una esfera o concha o varilla.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un sistema para poración de una o más células, que comprende medios para colocar una partícula cerca de la o de cada célula; y medios para provocar descomposición inducida por láser de la partícula para crear uno o más cavitaciones, en el que la cavitación o cavitaciones producen poración de la célula.

### Breve descripción de las figuras

- 15 A continuación se describirán diversos aspectos de la invención a modo de ejemplo únicamente y con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 muestra diversas etapas en la formación de una burbuja utilizando descomposición inducida por láser de una nanopartícula y el colapso de la burbuja para formar un chorro;

20 La figura 2 es una ilustración de una nanopartícula atrapada en el entorno de una célula que se va a porar usando descomposición inducida por láser de la nanopartícula;

La figura 3 es un diagrama esquemático de una disposición óptica para atrapar y causar descomposición inducida por láser de una nanopartícula;

La figura 4 muestra burbujas de gas residual mediante la descomposición inducida por láser de nanopartículas de 500 nm y 1 µm y la respuesta celular posterior;

25 La figura 5 muestra la inyección molecular de yoduro de propidio (PI) en células CHO-K1 mediante la descomposición inducida por láser de una nanopartícula 500 nm y ensayo de viabilidad celular usando calceína-AM (CAM);

La figura 6 muestra la optimización de la transfección de plásmidos que codifican Mito-DsRed en células CHO-K1 con dos parámetros diferentes, a saber, el tamaño de las nanopartículas varía de 400 nm a 2 µm y la ubicación axial entre 5 y 25 µm desde el sustrato;

30 La figura 7 muestra la inyección molecular de PI en células CHO-K1 en una zona amplia (> 250 µm de diámetro) por la descomposición inducida por láser de una nanopartícula de 500 nm;

La figura 8 muestra la transfección de plásmidos que codifican Mito-DsRed en células CHO-K1 en una zona amplia.

35 La figura 9 es un diagrama esquemático de una disposición óptica para atrapar y causar simultáneamente descomposición inducida por láser de múltiples nanopartículas, y

La figura 10 muestra los resultados de la nanocirugía simultánea dirigida a múltiples sitios las células CHO-K1 mediante la descomposición inducida por láser de tres nanopartículas de 500 nm ópticamente atrapadas en múltiples sitios utilizando un elemento óptico de difracción dinámica.

40

### Descripción de las figuras

La presente invención implica atrapamiento óptico de nanopartículas individuales utilizando láseres. Por ejemplo, se pueden usar pinzas ópticas para confinar y colocar micropartículas y nanopartículas en una localización deseada dentro de una muestra. Esto se realiza en el entorno de una célula que tiene que ser porada. Una vez localizada y atrapada en la posición apropiada, se expone a la partícula a radiación láser de un pulso de de nanosegundo para descomposición inducida por láser. Esta descomposición óptica produce, a su vez, la formación de una burbuja de cavitación que puede producir un flujo de chorro y/o transitorios acústicos para porar la célula de interés. Con este enfoque, la energía umbral requerida para la descomposición inducida por láser es dependiente del material de nanopartículas y su tamaño y es libre del medio circundante (normalmente agua o fluido basado en agua). Por lo tanto, esta técnica puede optimizar la cavitación y se puede utilizar para muchas aplicaciones, por ejemplo, la transfección de ADN plasmídico de células de mamíferos, con buena retención de la viabilidad celular.

50

55 En general, la descomposición óptica de una nanopartícula provoca la formación de una burbuja de cavitación, lo que da como resultado un chorro de fluido y/o transitorios acústicos tras el colapso. Sin embargo, mediante la variación de uno o más parámetros, se puede estimular la dominación de uno de ellos. Esto permite un grado de control sobre el proceso de poración.

60 La formación y la emisión del chorro de los transitorios acústicos dependen del parámetro adimensional de separación,  $\gamma$  entre la burbuja y la pared.

$$\gamma = Z_0/R_{\max},$$

65 en la que  $Z_0$  es la distancia entre el centro de la burbuja/nanopartícula y la pared y el  $R_{\max}$  es el radio máximo de la burbuja (Hentschel, W. y Lauterborn, W., Appl Sci Res 38, 225–230 (1982)). Cuando  $\gamma \leq 1$  (es decir, la pared de la

burbuja está en contacto con el límite), la formación de chorro es predominante en comparación con la emisión acústica. Por otro lado, cuando  $\gamma \gg 1$ , (es decir, la burbuja está libre de distorsión), la energía de la burbuja se transforma de manera más eficiente en energía acústica.

5 La figura 1 muestra tres etapas en la formación de una burbuja utilizando descomposición inducida por láser de una nanopartícula. En este caso, la nanopartícula está en un fluido, por ejemplo, agua, y se sitúa relativamente cerca de un sustrato duro ( $\gamma \sim 1$ ). Esta disposición tiene por objeto fomentar la formación de un chorro de fluido. La Figura 1 (a) muestra el inicio del proceso. En el presente documento, la nanopartícula se ha atrapado relativamente cerca del sustrato y ha sido expuesta a la luz láser para causar descomposición óptica. Esto hace que se forme plasma, que vaporiza la nanopartícula, así como su agua circundante y crea una burbuja de vapor que se expande rápidamente. Después de un periodo inicial de la expansión, la burbuja empieza a colapsar. Debido a que la burbuja está relativamente cerca del sustrato, su colapso es asimétrico, como se muestra en la Figura 1 (b). Esto hace que la burbuja se mueva hacia abajo hacia el sustrato. El colapso adicional da lugar a la formación de un flujo de chorro, que atraviesa el volumen de la burbuja, lo que conduce a una burbuja de forma de rosquilla o toroidal, como se muestra en la Figura 1 (c).

La figura 2 muestra un esquema de la descomposición inducida por láser de una nanopartícula individual ópticamente atrapada en la proximidad de una pluralidad de células. En este caso, una única nanopartícula está atrapada en una trampa óptica en la proximidad de una célula que se tiene que porar. Mediante la variación de la posición axial de la partícula atrapada, el parámetro de separación,  $\gamma$  se puede ajustar y, por tanto, el efecto del colapso de la cavitación puede controlarse. Como se ha indicado anteriormente, si la nanopartícula es atrapada cerca de la célula ( $\gamma \leq 1$ ), después en la descomposición inducida por láser, un chorro domina, permitiendo la poración de las células en una zona localizada. Si la nanopartícula es atrapada relativamente lejos de las células ( $\gamma \gg 1$ ), después sobre la descomposición inducida por láser, dominan los transitorios acústicos, lo que permite la poración de múltiples células en una zona amplia.

La energía necesaria (es decir, la energía umbral) para la descomposición inducida por láser o la cavitación depende de la sección transversal de la absorción del material de la nanopartícula. Mediante la introducción de nanopartículas, la energía requerida para la descomposición inducida por láser se puede reducir en comparación con las disposiciones de la técnica anterior, que se basan en la descomposición del medio en el que las células están presentes, normalmente agua. Los umbrales de descomposición para varios materiales se muestran en la figura 2. Mediante el uso de nanopartículas con umbrales de descomposición relativamente bajos (por ejemplo, menos de  $1 \text{ J/mm}^2$ ), La transferencia de la energía fotónica necesaria para causar la descomposición se reduce y, en consecuencia, se reduce el volumen/tamaño de la cavitación. El tamaño de las nanopartículas también puede afectar al volumen/tamaño de la cavitación, ya que el volumen de la nanopartícula vaporizada constituye efectivamente una burbuja de cavitación. Por lo tanto, el tamaño de la burbuja de cavitación se puede controlar mediante la selección del material y/o el tamaño de la nanopartícula.

Se han realizado varios experimentos para analizar la eficacia de la poración celular. La figura 3 muestra una puesta a punto experimental que tiene un láser para producir la descomposición inducida por láser de una nanopartícula y un láser para la formación de una trampa óptica para el posicionamiento de la nanopartícula. En particular, el sistema de la figura 3 tiene un láser de fibra CW de  $1070 \text{ nm}$  (IPG Laser GmbH, YLM-5-1070-LP: Potencia de  $\sim 100 \text{ mW}$ ) se enfocó mediante el objetivo de un microscopio (Nikon Ltd., E plan  $100\times$ ,  $1,25$  de apertura numérica (NA)/aceite) para atrapar ópticamente una nanopartícula de poliestireno (de  $400 \text{ nm}$  a  $2 \mu\text{m}$  de diámetro) dentro del medio tampón. La nanopartícula se manipuló hasta una ubicación predefinida entre  $0$  y  $25 \mu\text{m}$  por encima del plano de la monocapa celular. Las técnicas para el atrapamiento óptico y la manipulación de las partículas son bien conocidas y, por lo tanto, no se describirán en el presente documento con detalle. Una vez en posición, un láser de Nd:YAG por conmutación Q de frecuencia doble (Elforlight Ltd., SPOT: anchura del pulso de  $\sim 1 \text{ ns}$ , energía de  $\sim 1 \mu\text{J}$  y tasa de repetición de  $1 \text{ kHz}$ ) se alineó con el haz de atrapamiento y se enfocó a través del mismo objetivo sobre la nanopartícula atrapada durante  $40 \text{ ms}$  para efectuar la descomposición inducida por láser.

La figura 4 muestra la formación de burbujas de gas residual mediante la descomposición inducida por láser de nanopartículas de  $500 \text{ nm}$  y  $1 \mu\text{m}$  y la respuesta celular posterior; Las figuras 4 (a) y (d) muestran burbujas de gas residual formadas en el agua desionizada más de  $160 \text{ ms}$  después de descomposición inducida por láser. Las Figuras 4 (b) y (e) muestran los desplazamientos de las células por la descomposición inducida por láser en presencia de una monocapa de células CHO-K1. Las Figuras 4 (c) y (f) muestran cambios en la morfología celular,  $60$  segundos después de la descomposición inducida por láser. En las figuras, "x" indica la localización de descomposición inducida por láser.

En presencia de una monocapa de células CHO-K1, el área celular afectada por la descomposición inducida por láser de una nanopartícula de  $500 \text{ nm}$  fue menor de  $\sim 40 \mu\text{m}$  (Figura 4 (b)) que la de una nanopartícula de  $1 \mu\text{m}$ ,  $\sim 60 \mu\text{m}$  (la Figura 4 (e)) de diámetro. Un gran desplazamiento de las células de la descomposición inducida por láser de una nanopartícula de  $1 \mu\text{m}$  se indicó mediante una señal intensa (Figura 4 (e)), lo que da resultado tres o más células que sufren lisis (Figura 4 (f)) mientras que los cambios en la morfología celular con la descomposición inducida por láser de una nanopartícula de  $500 \text{ nm}$  se caracterizaron por la granulación y condensación del núcleo (Figura 4 (c)).

A partir de estos experimentos, se puede observar que los chorros cinéticos tienen el potencial de dañar la superficie, lo que conduce a la aparición de zonas libres circulares en los sustratos celulares cubiertos (Figura 4 (c), (f)). Las perturbaciones físicas en estas células pueden optimizarse con el material de nanopartículas, su tamaño, y su ubicación axial de la monocapa celular.

5 La Figura 5 muestra la inyección óptica de yoduro de propidio (PI) con la descomposición inducida por láser de una nanopartícula de 500 nm posicionada en un lugar axial de 10  $\mu\text{m}$  por encima de la monocapa de células y ensayo de viabilidad celular usando calceína-AM (CAM). Figura 5 (a) muestra una imagen de campo claro de las células inmediatamente después del experimento. Las figuras 5 (b) y (c) muestran imágenes de fluorescencia de PI y CAM, respectivamente. Las células que muestran la señal de PI y de CAM indican la inyección de PI con retención de la viabilidad celular.

15 La optimización de esta técnica para la transfección génica se estudió utilizando dos parámetros diferentes, a saber, el tamaño de las nanopartículas que varía desde 400 nm a 2  $\mu\text{m}$  y la ubicación axial entre 5 y 25  $\mu\text{m}$  de la monocapa celular. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 6 para la transfección de plásmidos que codifican Mito-DsRed en células CHO-K1.

20 La Figura 6 (a) muestra una imagen de campo claro de una monocapa de células, 48 horas después del experimento con la descomposición inducida por láser de una nanopartícula de 500 nm en una localización axial de 10  $\mu\text{m}$ . La correspondiente imagen de la fluorescencia (Figura 6 (b)) indica una colonia típica de las células transfectadas con el plásmido que expresa la proteína Mito-DsRed observada bajo un microscopio de fluorescencia. El número de células transfectadas fue, normalmente,  $\sim 3$  mediante la descomposición inducida por láser de una sola nanopartícula con los parámetros optimizados, que son 500 nm en tamaño de las nanopartículas y 10  $\mu\text{m}$  de ubicación axial (figura 6 (c), (d)). Las células de control fueron expuestas a láseres CW 1070 nm y de 532 nm nanosegundos láseres nm sin ninguna descomposición inducida por láser. Esto muestra claramente que estos dos parámetros pueden optimizar la eficiencia de la transfección.

30 La contribución de los transitorios acústicos excitados por el colapso de la burbuja esférica no se ha considerado. Los estudios preliminares han proporcionado pruebas del papel de los transitorios acústicos para los efectos celulares observados. La figura 7 muestra la inyección molecular de PI en múltiples células CHO-K1 en una zona amplia ( $> 250 \mu\text{m}$  de diámetro) por la descomposición inducida por láser de una nanopartícula de 500 nm; Las figuras 7 (a), (b), (d) y (e) muestran un gran número de células CHO-K1 ( $> 100$ ) a las que se ha inyectado PI. Los transitorios acústicos emitidos desde el colapso de la burbuja se consideran responsables de tal porción a gran escala. Las imágenes de fluorescencia de CAM indican que las células a las que se ha inyectado PI *permanecen* viables (Figura 7c).

40 La figura 8 muestra la transfección de plásmidos que codifican Mito-DsRed en células CHO-K1 en una zona amplia. La Figura 8 (a) muestra una imagen de campo claro de las células, 48 horas después de la descomposición inducida por láser de una nanopartícula de 500 nm. La Figura 8 (b) muestra la imagen de fluorescencia correspondiente de células transfectadas  $\sim 50$ .

45 Se demostró el éxito de la nanocirugía dirigida a múltiples sitios simultáneamente para las células o tejidos mediante la descomposición inducida por láser de nanopartículas individuales ópticamente atrapadas en múltiples sitios utilizando un elemento óptico de difracción dinámica se demostró utilizando moduladores ópticos espaciales (SLM) (Hamamatsu, LCOS-SLM X10468).

50 La figura 9 muestra un ejemplo de una disposición óptica adecuada para la porción simultánea de múltiples sitios. Esto tiene dos SLM cada uno para dividir las salidas desde el láser de atrapamiento y el láser de descomposición en múltiples haces, estando cada haz colocado y dispuesto para dirigirse a uno de una pluralidad de diferentes sitios. El mismo efecto se puede conseguir también con otros dispositivos ópticos, tales como un deflector acústico-óptico. Los láseres CW 1064 (para atrapamiento) y nanosegundo 532 nm (para la descomposición inducida por láser) fueron ambos multiplexados mediante SLM a tres puntos, formando cada uno un triángulo equilátero con lados de  $\sim 10 \mu\text{m}$ , proyectado sobre el mismo plano focal de un objetivo de inmersión en agua (Carl Zeiss Ltd, 63  $\times$ , 1.2NAW). Las tres nanopartículas atrapadas, cada una de 500 nm de diámetro, fueron dirigidas a la descomposición por el láser de nanosegundos multiplexado. Los resultados se muestran en la figura 10.

60 Las figuras 10 (a) y 10 (c) muestran tres nanopartículas de 500 nm atrapadas colocadas sobre un triángulo equilátero con lados de  $\sim 10 \mu\text{m}$  por encima de la monocapa de células antes de descomposición inducida por láser. La Figura 10 (b) muestra la morfología celular, 5 segundos después del experimento. Las figuras 10 (d) y (e) muestran imágenes con resolución temporal de la descomposición inducida por láser de estas tres nanopartículas atrapadas. Este resultado sugiere que la técnica tiene el potencial de permitir un sistema de cavitación completamente ópticamente controlado para la nanocirugía dirigida a múltiples sitios para células o tejidos en el futuro.

65 La presente invención usa descomposición inducida por láser de nanopartículas individuales ópticamente atrapadas para ganar control sobre la cavitación de las microburbujas para la inyección o transfección molecular con éxito. Las

burbujas de cavitación inducidas por láser, que causan la formación de un chorro hidrodinámico y/o los transitorios acústicos sobre el colapso, desempeñaron un papel importante en la poración de la membrana de las células. El chorro cinético puede causar poración localizada de la membrana de múltiples células en una zona específica, mientras que los transitorios acústicos pueden producir poración de estas células a gran escala en una zona amplia, ya que las ondas acústicas pueden propagarse una larga distancia (normalmente cientos de micrómetros) en el medio de muestra. El impacto físico a las células de dichas microburbujas que inducen permeabilización de la membrana de las células con la retención de la viabilidad celular se puede optimizar mediante los parámetros de descomposición inducida por láser, tal como el material de nanopartículas y su tamaño. Con chorros, se puede conseguir transfección de células múltiples en regiones específicas dirigidas. El número de células transfectadas fue, normalmente, ~ 3 mediante descomposición inducida por láser de una sola nanopartícula de 500 nm posicionada en un lugar axial de 10  $\mu\text{m}$  por encima de la monocapa de células. Con los transitorios acústicos, ~ 50 células en una zona amplia > 250  $\mu\text{m}$  de diámetro se transfectaron con éxito mediante la descomposición inducida por láser de una sola nanopartícula de 500 nm.

15 La invención proporciona una plataforma para la transfección específica de múltiples sitios de múltiples células o tejidos mediante el uso de descomposición inducida por láser en combinación con la ayuda de técnicas de atrapamiento óptico y de SLM. A diferencia de las técnicas de fotoporación que usan pulsos láser de femtosegundos, el posicionamiento preciso del foco del láser en la membrana celular es innecesario, sin embargo, permite la transfección dirigida de múltiples células en un área específica. La condición de descomposición inducida por láser adecuada para la transfección de alto rendimiento puede optimizarse con los parámetros de descomposición inducida por láser.

La presente invención tiene el potencial de aumentar la capacidad de transfección celular, evitando la lisis celular, con las consiguientes ventajas en su simplicidad, menor coste y mayor fiabilidad que los métodos existentes. También se puede lograr la transfección dirigida de múltiples células en una zona específica por los chorros hidrodinámicos o permite la transfección a gran escala de células en una amplia zona mediante los transitorios acústicos en función de la condición de descomposición inducida por láser. La consolidación del atrapamiento óptico y la descomposición inducida por láser permite un sistema de cavitación de las microburbujas ópticamente controlado totalmente para la nanocirugía dirigida simultánea y de múltiples sitios para las células o los tejidos cuando se acopla con un elemento óptico de difracción dinámica.

Un experto en la materia apreciará que son posibles variaciones de las disposiciones divulgadas sin apartarse de la invención. Por ejemplo, aunque la invención se describe con referencia a la poración celular, podría usarse para la poración de otro material o tejido biológico. De hecho, podría ser usado para la poración de un material no biológico, por ejemplo, cualquier material que tiene una membrana externa. En consecuencia, la descripción anterior de la realización específica se hace a modo de ejemplo solamente y no a efectos de limitación. Será evidente para el experto que se pueden realizar pequeñas modificaciones sin cambios significativos en el funcionamiento descrito.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la poración de una o más células, que comprende el posicionamiento de una partícula cerca de la célula o de cada célula utilizando atrapamiento óptico y causando descomposición inducida por láser de la partícula atrapada ópticamente para crear una o más cavitaciones, en donde la cavitación o cavitaciones causan la poración de la célula.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la partícula tiene una o más dimensiones en el intervalo nanométrico.
- 15 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la aplicación de pulsos de luz láser a la partícula atrapada para causar descomposición inducida por láser.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la poración de múltiples células utilizando la descomposición inducida por láser de una sola partícula y/o introduciendo, o permitiendo la introducción de, un material en la célula porada, opcionalmente en donde el material que se debe introducir es un fluido.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se proporcionan múltiples nanopartículas y el método implica simultáneamente causar la descomposición inducida por láser de las múltiples partículas, comprendiendo el método además opcionalmente el uso de un elemento óptico para generar múltiples haces de una fuente de un láser único para atrapar las múltiples partículas.
- 30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende el uso de un elemento óptico para generar múltiples haces de una única fuente de láser para causar descomposición inducida por láser de las múltiples partículas o que comprende el uso de un elemento óptico para generar múltiples haces de una única fuente de láser para causar descomposición inducida por láser de las múltiples partículas y el uso del mismo elemento óptico para generar múltiples haces de otra fuente de láser para causar descomposición inducida por láser de las partículas múltiples, opcionalmente en donde el elemento óptico es un elemento óptico de difracción, por ejemplo un modulador óptico espacial o un deflector acústico-óptico.
- 35 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende el posicionamiento de la partícula cerca de una superficie dura antes de causar descomposición inducida por láser.
- 40 8. Un sistema para la poración de una o más células, que comprende medios de atrapamiento óptico para colocar una partícula cerca de la célula o de cada célula y medios para producir descomposición inducida por láser de la partícula atrapada ópticamente para crear uno o más cavitaciones, en donde la cavitación o cavitaciones causan la poración de la célula.
- 45 9. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el medio para causar descomposición inducida por láser comprende un láser pulsado.
- 50 10. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9 que está adaptado para la poración de múltiples células usando la descomposición inducida por láser de una sola partícula.
- 55 11. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que se proporcionan múltiples nanopartículas y el medio para causar la descomposición inducida por láser se pueden ejecutar para causar de forma simultánea la descomposición de múltiples partículas, comprendiendo el sistema además opcionalmente un elemento óptico para generar múltiples haces de una fuente de láser única para atrapar las múltiples partículas.
- 60 12. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende un elemento óptico para generar múltiples haces de una única fuente de láser para causar descomposición inducida por láser de las múltiples partículas o que comprende un elemento óptico para generar múltiples haces de una única fuente de láser para causar descomposición inducida por láser de las múltiples partículas y para generar múltiples haces de otra fuente de láser para causar descomposición inducida por láser de las múltiples partículas, opcionalmente en donde el elemento óptico es un elemento óptico de difracción, por ejemplo un modulador óptico espacial o un deflector acústico-óptico.
- 65 13. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que los medios de atrapamiento óptico para posicionar la partícula están dispuestos para posicionarla cerca de una superficie dura antes de causar descomposición inducida por láser.
14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la partícula está hecha de un material seleccionado de: sílice; poliestireno; látex; oro; plata; carbono y/o en el que la partícula tiene la forma de una esfera o de concha o de varilla y/o en el que la partícula tiene una dimensión de 1 micrómetro; preferentemente menos de o igual a 500 nm para que coincida con el tamaño del punto focal de difracción limitada del láser de descomposición.



15. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en el que la partícula está hecha de un material seleccionado de: sílice; poliestireno; látex; oro; plata; carbono y/o en el que la partícula tiene la forma de una esfera o de concha o de varilla y/o en el que la partícula tiene una dimensión de 1 micrómetro; preferentemente menos de o igual a 500 nm para que coincida con el tamaño del punto focal de difracción limitada del láser de descomposición.
- 5

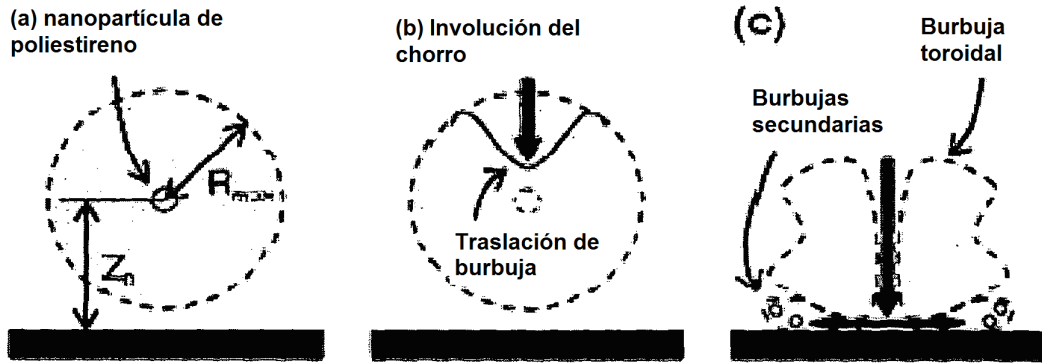


Figura 1

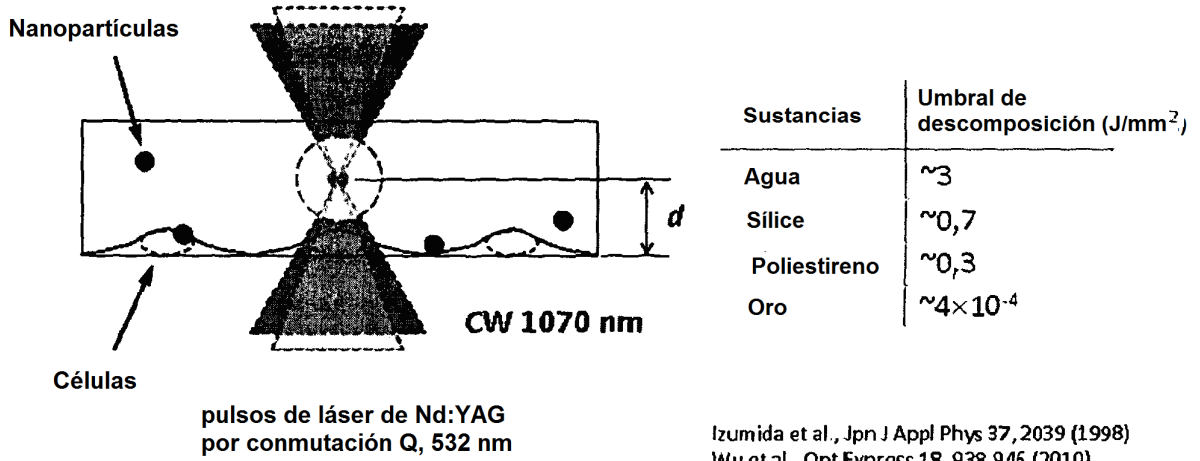


Figura 2

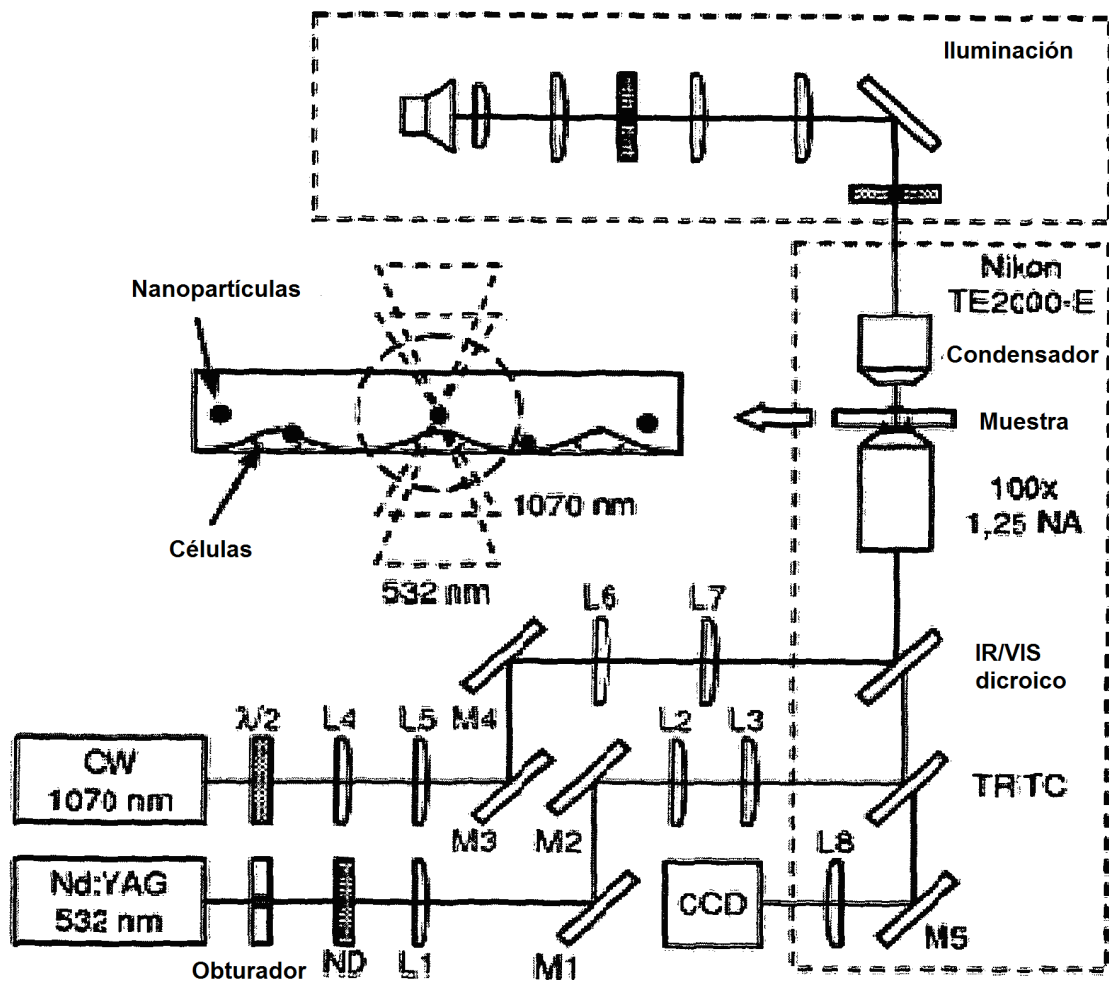


Figura 3

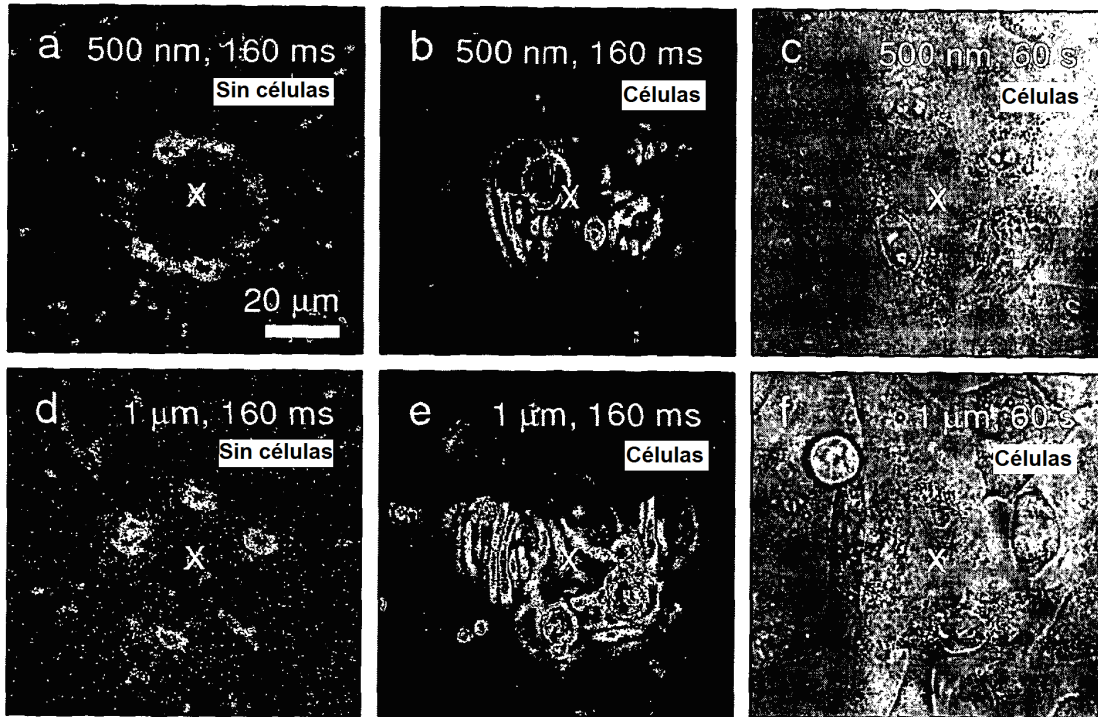


Figura 4

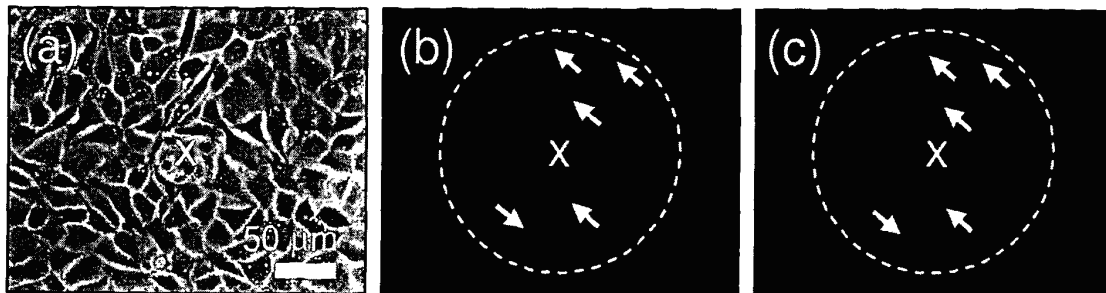


Figura 5

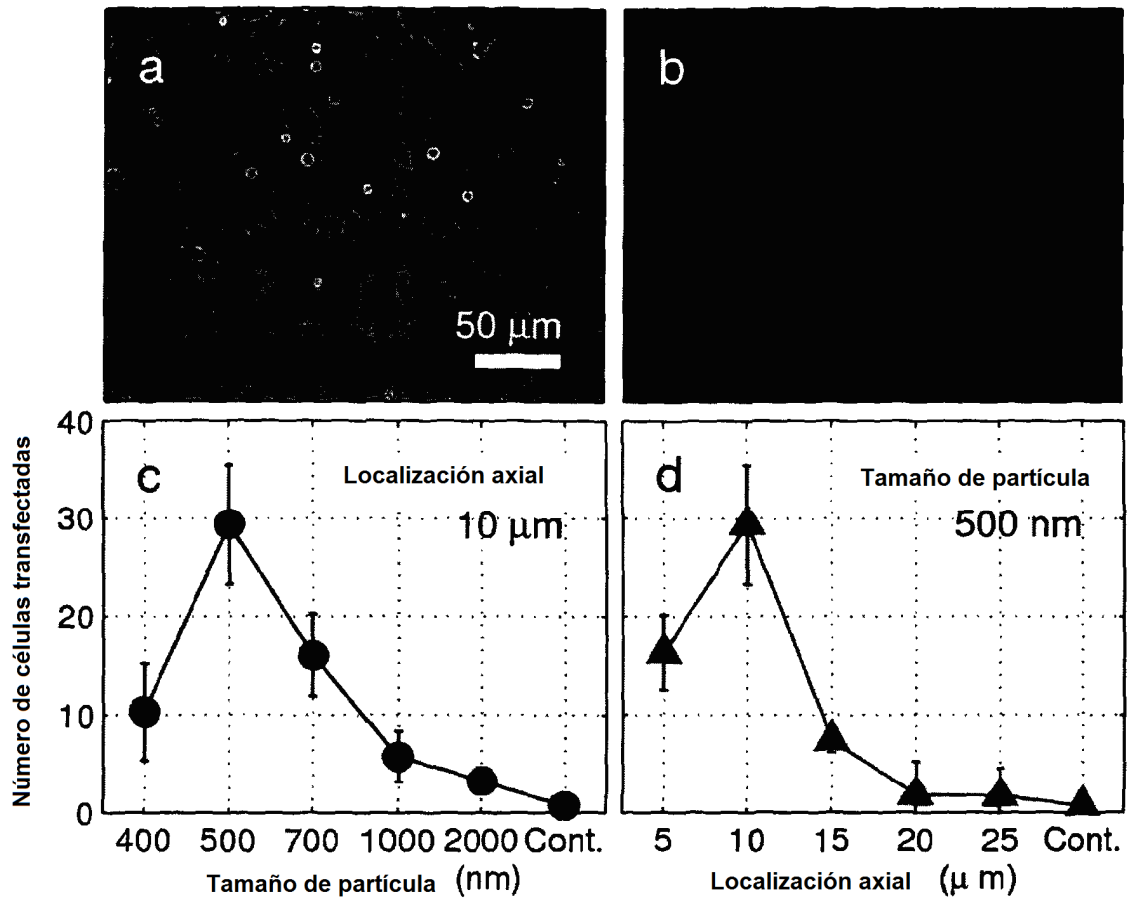


Figura 6

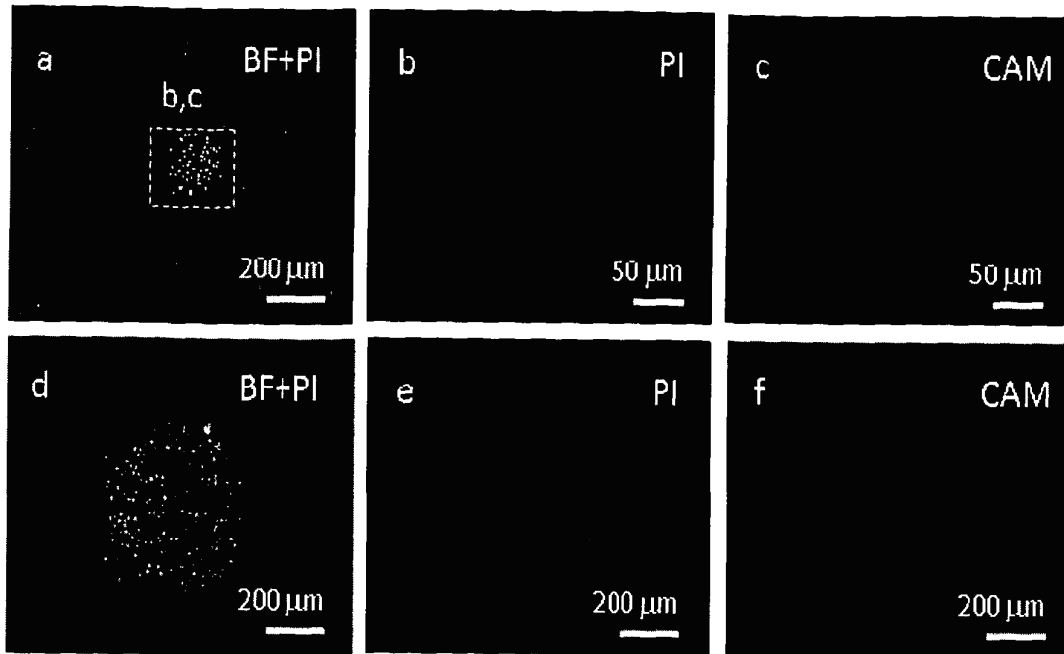


Figura 7

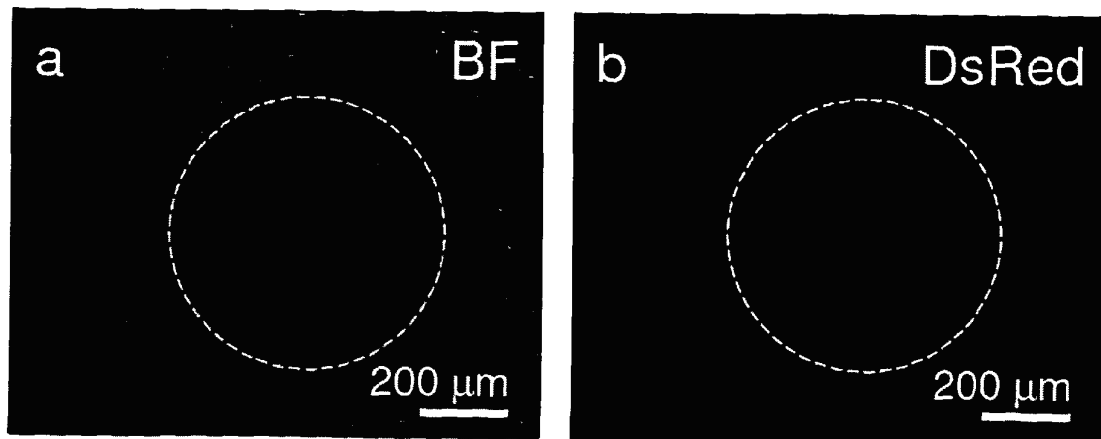


Figura 8

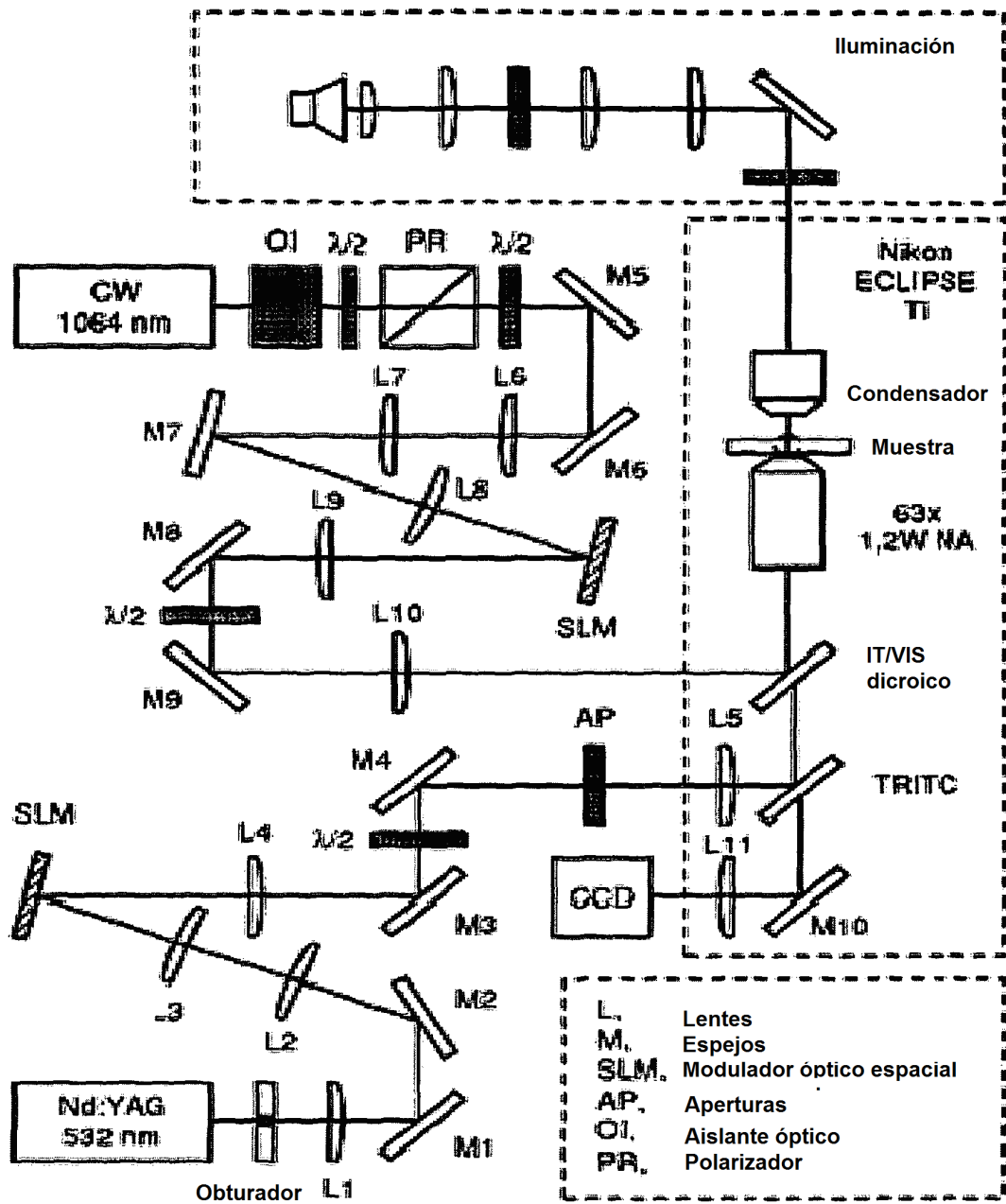


Figura 9

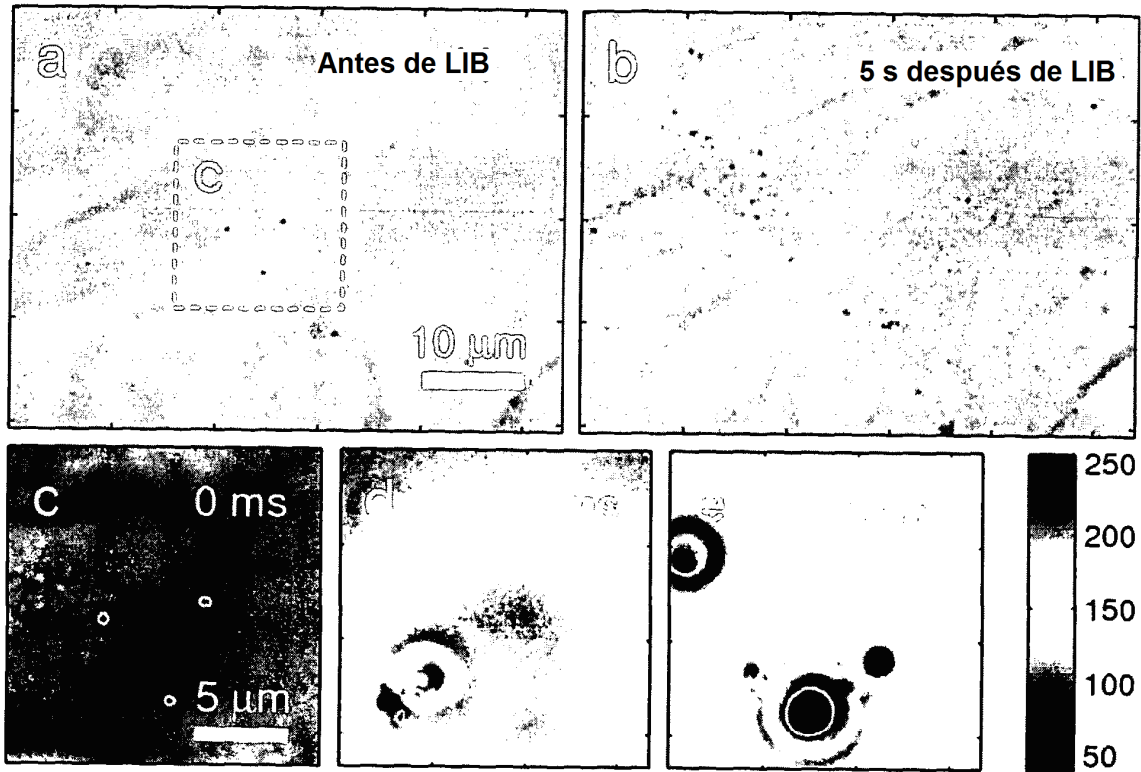


Figura 10