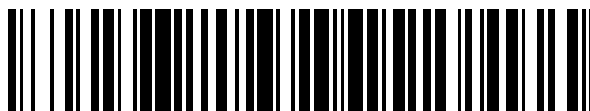


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 600**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/87** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/16** (2006.01)

**C12N 13/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2006 E 13156520 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2602326**

54 Título: **Métodos para transfectar ácidos nucleicos en células vivas**

30 Prioridad:

**13.12.2005 US 749941 P**

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

**05.02.2019**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF  
PENNSYLVANIA (100.0%)  
3160 Chestnut Street, Suite 200  
Philadelphia, PA 19104 , US**

72 Inventor/es:

**EBERWINE, JAMES;  
HAYDON, PHILIP, G.;  
SUL, JAI-YOON;  
TAKANO, HAJIME;  
WU, KITTY CHIA-WEN y  
ZENG, FANYI**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 698 600 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

Métodos para transfectar ácidos nucleicos en células vivas

## 5 Antecedentes de la invención

Una grave desventaja de las estrategias de terapia génica actuales y los métodos convencionales de introducción de macromoléculas, en particular ácidos nucleicos, en células es la incapacidad de las combinaciones de vector y sistema de entrega para entregar eficazmente ácidos nucleicos al interior de las células de una población diana. Los métodos para introducir macromoléculas, en particular ácido nucleico, en una célula individual o un grupo de células son diversos. Los métodos usados habitualmente incluyen tratamientos químicos, transfección mediada por liposoma, microinyección, electroporación y bombardeo de partículas. Sin embargo, estas técnicas pueden requerir mucho tiempo y presentan bajos rendimientos o escasa supervivencia celular, y no todos los tipos celulares pueden tratarse mediante estos métodos de introducción de macromoléculas en una célula.

Se conocen muchas composiciones y métodos para entregar un ácido nucleico a un tejido o célula de animal. Dichas composiciones incluyen ácidos nucleicos “desnudos” (es decir, sin formar complejos), ácidos nucleicos que forman complejos con moléculas catiónicas tales como polilisina o lípidos que forman liposomas, y vectores de virus. Los ácidos nucleicos desnudos pueden captarse por diversas células de animales, pero se someten a nucleolisis, tanto dentro como fuera de las células que los captan. Para superar la nucleolisis se usan análogos de ácido nucleico que son relativamente resistentes a la nucleolisis, incluyendo análogos de ácido nucleico fosforotioato. Sin embargo, cuando se desea la incorporación del ácido nucleico en el genoma de la célula diana, el uso de análogos de ácido nucleico es de uso limitado.

También se han descrito numerosos vectores que comprenden un ácido nucleico que forma complejo con un compuesto para mejorar la estabilidad o la captación del ácido nucleico por una célula diana. Dichos compuestos incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, policationes tales como dietilaminoetil-dextrano, polilisina o Polybrene, y lípidos que forman liposomas tales como bromuro de didocilmetilamonio y Lipofectamine®. Sin embargo, las transfecciones tradicionales con un vector de ADN que forma complejo con otra composición limitan gravemente la capacidad para controlar la cantidad de transcripción de ARNm o expresión de proteína, dando como resultado niveles no naturales de expresión de proteína que no pueden controlarse de otro modo.

Los vectores de virus se consideran generalmente los vectores de ácido nucleico más eficaces. Con frecuencia se usan vectores de virus defectuosos para la replicación recombinantes, para transducir (es decir, infectar) células de animales. Dichos vectores han incluido vectores de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y vectores de herpesvirus. Aunque son altamente eficaces para la transferencia génica, una desventaja principal asociada con el uso de vectores de virus es la incapacidad de muchos vectores de virus para infectar a células que no se dividen, limitando los tipos de célula que pueden transfectarse. Además, si no se desea la integración de un ácido nucleico en el genoma, no se recomiendan determinados virus, tales como vectores de retrovirus. Además, con frecuencia hay un límite de tamaño para la longitud del gen o ADNc que puede introducirse en un vector. Además, los vectores génicos de virus no permiten una regulación apropiada de la expresión génica a lo largo del tiempo en células transfectadas.

A pesar del desarrollo y el perfeccionamiento de las técnicas comentadas anteriormente, sigue existiendo una necesidad en la técnica de métodos y composiciones que puedan usarse para potenciar la entrega de un ácido nucleico a una célula deseada que va a transfectarse con el ácido nucleico. Además, las técnicas comentadas anteriormente están limitadas a entregar uno o tan solo unos pocos ácidos nucleicos para estudiar la expresión de estos números limitados de ácidos nucleicos sobre un fenotipo celular. La presente invención proporciona un método novedoso para entregar ácidos nucleicos a una célula, y para determinar el efecto de la expresión de ácido nucleico multigénico en una célula.

El documento EP 1 391 503 A1 desvela un método para reprogramar una célula receptora que comprende las etapas de (i) poner en contacto la célula receptora con un citoplasma de una célula donante de un anfibio o de un pez óseo y (ii) detectar la expresión de marcadores embrionarios en la célula receptora. El documento EP 1083 232 A1 desvela un método para transferir ARNm dentro de células, caracterizado porque el ARNm se transfiere en forma de un complejo formado entre el ARNm y un péptido o proteína catiónica. BOCZKOWSKI *et al.* (*AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH*, (2000), vol. 60, páginas 1028 -1034) describe la transfección de células dendríticas con ARNm aislado de células tumorales. El documento WO 2007/047766 A2 desvela un método para rejuvenecer células somáticas en células ESL pluripotentes mediante transfección de ARNm de ESC, que comprende la etapa de extraer ARNm de células madre embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés), exponer células somáticas a liposomas que encapsulan el ARNm extraído y seleccionar colonias celulares con una morfología de células madre, en las que las células somáticas se diferencian de las células pluripotentes. El documento EP 1 270 732 A1 proporciona un método para la entrega de genes en células eucarióticas por electroporación, preferentemente en células hematopoyéticas humanas, en particular células dendríticas. El documento WO 02/090555 A1 desvela un método de inserción de ARN en células, en el que las células se transfectan con ARN usando electroporación para conseguir una alta eficacia de transfección. FISHER *et al.*

(*BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY*, (1997), vol. 321, n.º 1, páginas 49-58) desvela que el dominio transmembrana de la toxina diftérica mejora la transferencia de genes conjugados moleculares. MALONE *et al.* (PNAS (1989), vol. 86, n.º 16, páginas 6077-6081) se refiere a la transfección de ARN mediada por liposomas catiónicos. KALADY *et al.* (*JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH*, (2004), vol. 116, n.º 1, páginas 24-31) enseña que la entrega secuencial de estímulos de maduración aumenta la producción de IL-12 de células dendríticas humanas y potencia la inmunogenia específica de antígeno tumoral. El documento WO 99/14346 A2 enseña nuevos métodos para la estabilización del ARNm; estas alteraciones aumentan la estabilidad del ARNm y permiten su uso en la terapia de ARN codificante para expresar de manera transitoria proteínas en una célula. SMITS *et al.* (*LEUKEMIA* (2004), vol. 18, n.º 11, páginas 1898-1902) desvela una técnica para la transferencia de genes basada en ARN para células madre adultas y linfocitos T. NAIR *et al.* (*NATURE BIOTECHNOLOGY* (1998), vol. 16, n.º 4, páginas 364-369) enseña la inducción de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno carcinoembrionario primario (CEA, por sus siglas en inglés) *in vitro* usando células dendríticas humanas transfectadas con ARN. ELANGO *et al.* (*BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, (2005), vol. 330, n.º 3, páginas 958-966) desvela una transfección optimizada de ARNm transcrito a partir de un vector que contiene una cola Ad(A/T)100. SAWAI KEISUKE *et al.* (*MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM*, (1998), vol. 64, n.º 1, páginas 44-51) desvela un nuevo método de transfección de ARNm específico de la célula. Boczkowski, D. *et al.* (*J. Exp. Med.* 184: 465-472 (1996)) desvela la pulsación de células dendríticas con ARN derivado de tumor como un posible método para inducir LTC e inmunidad tumoral. El documento WO 03/079883 desvela un tratamiento con láser de femtosegundos controlado para la alteración y diagnóstico no invasivos de tejidos y la transducción de ADN plasmídico en células de tejido muscular.

### Breve resumen de la invención

La presente invención es útil en un método de transferencia de un fenotipo multigénico a una célula, comprendiendo el método irradiar dicha célula con un láser, en el que se baña dicha célula en un medio fluido que comprende dos o más ácidos nucleicos aislados, en el que el láser crea un poro en una membrana celular de la célula y los ácidos nucleicos entran en la célula, y en el que los ácidos nucleicos son expresados por la célula, transfiriendo de este modo un fenotipo multigénico a una célula. Los métodos inventivos se describen adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas.

En una realización, la célula es una célula eucariota.

En otra realización, la célula eucariota es una célula no de mamífero.

En otra realización más, la célula es una célula vegetal.

En aún otra realización, la célula es un protozoo.

En una realización, los ácidos nucleicos se aíslan a partir de una célula, en la que los ácidos nucleicos aislados se preparan mediante aislamiento de ARNm total a partir de una célula, transcripción *in vitro* o síntesis química.

En otra realización más, los ácidos nucleicos codifican dos o más polipéptidos diferentes.

En particular, la invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* de transferencia de un fenotipo multigénico de una célula donante a una célula receptora mediante la transfección de una célula receptora con el ARNm total de una célula donante, en el que la célula donante es de la misma especie que la célula receptora, en el que el fenotipo de la célula donante es diferente del fenotipo de la célula receptora, en el que los ARNm ingresan a la célula receptora, en el que los ARNm son funcionales en la célula receptora y en el que los ARNm inician un cambio en la morfología y la fisiología en la célula receptora y en el que el cambio produce un fenotipo que es indicativo de la célula donante.

En una realización, la célula receptora es una célula eucariota.

En otra realización, la célula receptora es una célula de mamífero.

En otra realización, la célula receptora se selecciona entre el grupo que consiste en una célula epitelial, una neurona, un fibroblasto, un fibroblasto embrionario, un queratinocito, una célula madre de adulto, una célula madre embrionaria, un astrocito y un cardiomiocito.

En otra realización, el método comprende adicionalmente transfectar la célula receptora con al menos un ADN de la célula donante.

En otra realización, el método comprende adicionalmente transfectar la célula receptora con al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en ARNip, microARN, ARNhn y ARNt.

En una realización, el ARNm total es expresado por la célula receptora.

En una realización, el ARNm total se aísla de una célula donante.

En otra realización, la célula donante se selecciona entre el grupo que consiste en: un astrocito, un cardiomiocito, un cardiomiocito neonatal, una célula madre embrionaria y una neurona.

La presente divulgación también abarca un método de transfección local de una célula, comprendiendo el método irradiar la célula con un láser, en el que la célula está en un medio fluido que comprende un ácido nucleico, en el que el láser crea un poro en la membrana celular de la célula y el ácido nucleico entra en la célula, transfectando de este modo localmente la célula.

En un aspecto de la divulgación, la célula comprende una prolongación celular.

En otro aspecto de la divulgación, la prolongación celular es una dendrita.

En un aspecto de la divulgación, el láser es un láser de titanio-zafiro.

Aún en otro aspecto, el medio fluido es un líquido.

En otro aspecto, el ácido nucleico es un ARN.

En otro aspecto, el ARN se selecciona entre el grupo que consiste en ARNm, ARNip, microARN, ARNnh, ARNt y combinaciones de los mismos.

En un aspecto, la célula es una célula individual.

La presente divulgación también incluye un kit para transferir un fenotipo multigénico a una célula, comprendiendo el kit una mezcla de ARNm aislado a partir de una célula, en el que la mezcla de ARNm comprende uno o más ARNm aislados que codifican dos o más polipéptidos, y un material de instrucciones para el uso del mismo.

También se proporciona un kit para transferir un fenotipo multigénico a una célula, comprendiendo el kit una mezcla de ácidos nucleicos, en el que la mezcla es un ácido nucleico convertidor del fenotipo y un material de instrucciones para el uso del mismo.

### Breve descripción de los dibujos

Con los fines de ilustrar la invención, se representan en los dibujos determinadas realizaciones de la invención.

Las figuras 1A y 1B son imágenes esquemáticas de un láser que induce un pequeño orificio transitorio en una membrana celular de una neurona a través del cual se introduce ácido nucleico en la célula y se traduce en una proteína. Las imágenes representan realizaciones no limitantes en las que el ácido nucleico es ARNm. La figura 1A representa la neurona receptora bañada en una solución que comprende ARNm. La figura 1B representa la célula receptora bañada en una ubicación diferenciada (zona con puntos negros) sobre su superficie con una solución que contiene ARNm. La célula se somete a fotoporación con un láser dentro de los puntos diferenciados. La expresión de ARNm se indica en ambas figuras mediante una zona de color negro sólido.

La figura 2 es un cronograma a modo de ejemplo para una realización de la invención. El cronograma representa el tratamiento de células receptoras (por ejemplo, neuronas) antes, durante y después de la fototransfección con un ARNm obtenido a partir de células donantes (por ejemplo, células de la glía). También se muestran posibles ensayos para evaluar el efecto de la expresión de ARNm de la glía en dichas neuronas fototransfectadas.

Las figuras 3A a 3D son imágenes de una neurona de hipocampo de rata representativa antes y 2 semanas después de la fototransfección. La figura 3A representa una neurona con extensas prolongaciones neuronales antes de la fototransfección. El soma se indica mediante la flecha. Las figuras 3B-3D son imágenes de una neurona 2 semanas después de la fototransfección con ARNm de astrocitos de rata. La figura 3B es una imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés) que representa la retracción de prolongaciones neuronales en la célula sometida a fototransfección. El soma se indica mediante la flecha. La figura 3C es una imagen de la célula sometida a fototransfección en la figura 3B teñida con DAPI, que indica la ubicación del núcleo celular. El núcleo se indica mediante la flecha. La figura 3D es una imagen que representa la inmunorreactividad de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de la neurona sometida a fototransfección en la figura 3B. El soma se indica mediante la flecha. Se detectó GFAP en células fijadas mediante incubación con anticuerpo de ratón anti-GFAP y después con anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Cy3 para detectar GFAP.

Las figuras 4A y 4B son imágenes de una neurona de hipocampo de rata representativa antes y 3 semanas después de la fototransfección. La figura 4A representa una neurona de hipocampo de rata antes de la fototransfección. La figura 4B representa la misma neurona 3 semanas después de la fototransfección con ARNm de astrocitos de rata. La imagen representa la inmunorreactividad de GFAP de la célula sometida a fototransfección, ubicada dentro del

recuadro en líneas discontinuas. Se incubaron células fijadas con anticuerpo de ratón anti-GFAP y después con anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Alexa 546-fluoresceína para detectar GFAP.

Las figuras 5A y 5B son imágenes de dos neuronas de hipocampo de rata sometidas a fototransfección representativas 8 semanas después de la fototransfección con ARNm de astrocitos de rata. La figura 5A es una imagen de DIC de las dos células (indicadas mediante flechas), que representa la retracción de las prolongaciones neuronales. La figura 5B representa la inmunorreactividad de GFAP de las mismas dos células sometidas a fototransfección (indicadas mediante flechas). Se incubaron células fijadas con anticuerpo de ratón anti-GFAP y después con anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Alexa 546-fluoresceína.

Las figuras 6A a 6E son una serie de imágenes de microscopía confocal representativas de células neuronales y un gráfico de datos de imágenes de calcio para dos de las células. Se captaron imágenes cada 3 segundos. La figura 6A representa dos células (rodeadas con círculos en líneas discontinuas blancas y marcadas como Célula 1 y Célula 2), cargadas con un indicador de calcio. Esta imagen es representativa de la señal de nivel inicial para cada célula. La figura 6B muestra la respuesta de las mismas dos células a la estimulación con glutamato (100  $\mu$ M). La figura 6C representa la respuesta de las mismas dos células a la estimulación con potasio (50 mM). La figura 6D representa la recuperación celular de la señal de nivel inicial después de haber eliminado el potasio mediante lavado de las células. La figura 6E es un gráfico de los datos de imágenes de señalización de calcio. Se mide la señalización como el cambio en la fluorescencia fraccional ( $\Delta F/F_0$ ) en función del tiempo.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención abarca métodos de transferencia de mezclas de ácidos nucleicos en una célula de manera que los ácidos nucleicos se expresen en la célula, dando como resultado un efecto multigénico en la célula. Específicamente, la presente invención comprende métodos para transferir un fenotipo multigénico a una célula mediante la introducción de una mezcla de ácidos nucleicos, tales como ARN y/o ADN, en una célula para producir un fenotipo multigénico en la célula como se detalla en las reivindicaciones. Los ácidos nucleicos pueden incluir, sin limitación, ARNm, ARNip, microARN, ARNt, ARNhn, ARN total, ADN y similares, de manera que la introducción de estos ácidos nucleicos en una célula y la posterior expresión de estos ácidos nucleicos da como resultado un fenotipo combinado debido a la expresión múltiple de estos ácidos nucleicos y sus interacciones entre sí. A diferencia de los sistemas de expresión conocidos en la técnica, en los que se expresa uno o solo unos pocos ácidos nucleicos, los métodos de la presente invención permiten la expresión de múltiples ácidos nucleicos de manera esencialmente simultánea, dando como resultado un sistema de expresión que imita estrechamente la interacción de diversos ácidos nucleicos y sus productos de expresión en un entorno natural. Por tanto, la presente invención permite la introducción de una mezcla compleja de ácidos nucleicos en una célula para producir un efecto multigénico, iluminando de este modo el fenotipo de una célula, tejido o animal en el que diversos ácidos nucleicos y las proteínas expresadas a partir de los mismos interaccionan, compiten y de otro modo, producen un fenotipo.

Los métodos de la presente invención se logran transfectando ácidos nucleicos en células vivas. Específicamente, la presente invención incluye métodos para inducir un efecto multigénico en una célula usando una poración asistida por láser de membranas de células vivas acoplada con una aplicación en baño de ARNm con el fin de transfectar una mezcla de ácidos nucleicos en una célula viva. Además, el presente método no solo permite una transfección de una célula altamente específica de la ubicación, sino que además no es perjudicial para la viabilidad o la función celular.

La presente invención permite la transfección de ácidos nucleicos, preferiblemente ARNm o ADN, en una célula con un control preciso de la cantidad de ácidos nucleicos que entran en la célula, permitiendo por tanto al experto en la materia imitar el nivel de expresión de ácido nucleico en una célula en condiciones deseadas, como se desvela en otra parte en el presente documento. Es decir, la presente invención permite al experto en la materia controlar con precisión el nivel de ácido nucleico transfectado en una célula modulando la concentración de ácido nucleico en el entorno extracelular de la célula. Además, puede modularse la cantidad precisa de ácido nucleico transfectado en una célula mediante la regulación de la intensidad del láser, el tamaño y el número de poros, y la duración de la apertura de membrana.

Además, la presente invención permite la transfección de ácido nucleico en un proceso específico de una célula para determinar la capacidad de ese proceso para transcribir y/o traducir un ácido nucleico, así como para determinar el efecto que la expresión de una proteína tiene sobre el resto de la célula. El ácido nucleico introducido puede codificar un único producto o puede comprender una mezcla de ácidos nucleicos que codifican dos o más productos y, preferentemente, dos o más polipéptidos. Las células y sus prolongaciones contempladas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las microvellosidades de las células epiteliales adsorbentes, cilios de células epiteliales ciliadas, los estereocilios de las células capilares, las prolongaciones celulares que unen los osteoblastos, los axones de las neuronas y las dendritas de neuronas. Se conocen en la técnica otras células que contienen prolongaciones.

Los métodos de la presente invención no se limitan a células, sino que pueden incluir además cortes vivos de tejido y animales vivos, preferentemente mamíferos, como se desvela en otra parte en el presente documento. Los

métodos de la presente invención pueden comprender además otras células que no son de mamífero, células eucariotas y células procariotas, tales como células bacterianas, células de levadura, células vegetales, protozoos, células de insectos, células fúngicas, incluyendo hongos filamentosos y no filamentosos, y similares.

## 5 Definiciones

Como se usan en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene los significados asociados al mismo en esta sección.

10 Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

15 Como se usa en el presente documento, un “fenotipo de destino” se refiere a un fenotipo de interés que se induce en una célula receptora mediante la introducción en la misma de una mezcla de ácidos nucleicos. El fenotipo de interés puede ser cualquier fenotipo. Por ejemplo, un fenotipo de destino puede ser un cambio morfológico, tal como la retracción de prolongaciones neuronales en una célula receptora que es una neurona. Un fenotipo de destino puede ser un cambio fisiológico, tal como la presencia de canales de calcio dependientes del voltaje en una célula receptora que es una célula de la astroglia. Un fenotipo de destino puede comprender más de un cambio fenotípico y puede incluso provocar que la célula adopte características de un tipo de tejido diferente de su tipo de tejido original.

25 La frase “ácido nucleico convertidor del fenotipo” se refiere en el presente documento a una mezcla de ácidos nucleicos que puede establecer un fenotipo de destino en una célula receptora. Ácido nucleico convertidor del fenotipo no se limita al contenido empírico de ARN en una célula donante, sino que más bien abarca la abundancia relativa de cada ARN con respecto a cada uno en una población de ARN de manera que la población de ARN es necesaria y suficiente para inducir un fenotipo de destino en una célula receptora.

30 Una “enfermedad” es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis, y en el que, si la enfermedad no se mejora, entonces la salud del animal continúa deteriorándose. En cambio, un “trastorno” en un animal es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no provoca necesariamente una reducción adicional en el estado de salud del animal.

35 Se usa un “medio fluido” o “medios fluidos” en el presente documento para hacer referencia a una forma de materia, tal como aire, líquido, sólido o plasma, preferentemente líquido, que puede fluir.

Una “célula aislada” se refiere a una célula que se ha separado de otros componentes y/o células que acompañan de manera natural a la célula aislada en un tejido o un mamífero.

40 Según se aplica a una proteína, un “fragmento” de un polipéptido, proteína o un antígeno, tiene aproximadamente 6 aminoácidos de longitud. Más preferentemente, el fragmento de una proteína tiene aproximadamente 8 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 10, aún más preferentemente al menos aproximadamente 15, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 20, aún más preferentemente al menos aproximadamente 30, de manera incluso más preferible aproximadamente 40, y más preferentemente al menos aproximadamente 50, más preferentemente al menos aproximadamente 60, aún más preferentemente al menos aproximadamente 70, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 80, y más preferentemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, aminoácidos de longitud, y todos y cada uno de los números enteros entre medias.

50 Un “ADN genómico” es una cadena de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga a un gen según existe en el huésped natural. A modo de ejemplo, un fragmento de un cromosoma es un ADN genómico.

55 Como se usa en el presente documento, un “ácido nucleico inhibidor” se refiere a un ARNip, un microARN, un ácido nucleico antisentido o una ribozima.

Como se usa en el presente documento, “transfectar localmente” un ácido nucleico se refiere a introducir un ácido nucleico en una región de citoplasma que no es la totalidad del citoplasma de una célula, que opcionalmente comprende una prolongación celular.

60 Como se usa en el presente documento, “crear un poro” o “crea un poro” se refiere a crear un orificio en una superficie a través del cual pueden pasar compuestos.

65 “Homólogo” como se usa en el presente documento, se refiere a la similitud de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de subunidad en ambas de las

dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas completamente o al 100 % en esa posición. La homología en porcentaje entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias de compuesto son homólogas entonces las dos secuencias son idénticas al 50 %, si el 90 % de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten una homología del 90 %. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 5'ATTGCC3' y 5'TATGGC3' comparten una homología del 50 %.

Además, cuando se usan los términos “homología” o “identidad” en el presente documento para hacer referencia a los ácidos nucleicos y a las proteínas, debe interpretarse que se aplican a la homología o identidad a niveles tanto de ácido nucleico como de secuencia de aminoácidos.

La expresión “fenotipo multigénico” se usa en el presente documento para hacer referencia a un fenotipo en una célula, tejido o animal que está mediado por la expresión o falta de expresión de dos o más ácidos nucleicos que codifican una proteína, en el que los ácidos nucleicos se proporcionan de manera exógena a la célula, tejido o animal.

“Polinucleótido recombinante” se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están unidas entre sí de manera natural. Puede incluirse un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado en un vector adecuado, y puede usarse el vector para transformar una célula huésped adecuada.

Un polinucleótido recombinante puede servir para una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión a ribosoma, etc.).

Una célula huésped que comprende un polinucleótido recombinante se denomina como una “célula huésped recombinante”. Un gen que se expresa en una célula huésped recombinante, comprendiendo el gen un polinucleótido recombinante, produce un “polipéptido recombinante”.

Un “polipéptido recombinante” es uno que se produce con la expresión de un polinucleótido recombinante.

“Polipéptido” se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácido, variantes estructurales que se producen de manera natural relacionadas y análogos sintéticos que no se producen de manera natural de los mismos unidos mediante enlaces peptídicos, variantes estructurales que se producen de manera natural relacionadas y análogos sintéticos que no se producen de manera natural de los mismos. Pueden sintetizarse polipéptidos sintéticos, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptido automatizado.

El término “proteína” se refiere normalmente a polipéptidos grandes.

El término “péptido” se refiere normalmente a polipéptidos cortos.

En el presente documento se usa la notación convencional para representar secuencias de polipéptido: el extremo izquierdo de una secuencia de polipéptido es el extremo amino-terminal; el extremo derecho de una secuencia de polipéptido es el extremo carboxilo-terminal.

Se usa “fototransfección” en el presente documento para hacer referencia a un procedimiento mediante el cual se crea un orificio en una barrera, tal como una membrana celular, usando una fuente de fotones, tal como un láser, y se insertan dos o más ácidos nucleicos, en el que los ácidos nucleicos codifican polipéptidos diferentes, en una célula a través del orificio en la membrana celular.

Por polipéptido “marcador” quiere decirse cualquier proteína que, cuando se une mediante un enlace peptídico a una proteína de interés, puede usarse para localizar la proteína, para purificarla a partir de un extracto celular, para inmovilizarla para su uso en ensayos de unión o para estudiar de otro modo sus propiedades biológicas y/o su función.

Se entiende que en el presente documento se incluyen todos y cada uno de los números enteros completos o parciales entre cualquier intervalo expuesto en el presente documento.

Descripción

La presente invención proporciona métodos de introducción de mezclas de ácidos nucleicos en una célula receptora para producir un efecto multigénico en la célula receptora. La presente invención comprende transfectar preferentemente ARNm, localmente en una célula receptora. La célula receptora puede ser cualquier tipo de célula. Una célula receptora puede ser una célula eucariota o una célula procariota. Cuando la célula es una célula eucariota, la célula es preferentemente una célula de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, célula de ser humano, primate no humano, ratón, conejo, rata, cabra, cobaya, caballo y similares. Una célula eucariota no de mamífero incluye una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto, una célula protozoaria y una célula fúngica, incluyendo hongos filamentosos y no filamentosos. Cuando la célula es una célula procariota, la célula es una célula bacteriana. Preferentemente, la célula receptora es una célula específica de tejido, más preferentemente una célula específica de tejido de mamífero y todavía más preferentemente, una célula específica de tejido de ser humano. Los ejemplos no limitantes de células adecuadas como células receptoras incluyen células epiteliales, neuronas, fibroblastos, fibroblastos embrionarios, queratinocitos, células madre de adulto, células madre embrionarias y cardiomiocitos. En realizaciones de la invención referidas a la conversión de fenotipo, se prefieren células fenotípicamente maleables. Las células fenotípicamente maleables son células cuyo fenotipo es susceptible de cambiar en las condiciones del método de la invención. Los ejemplos no limitantes de células fenotípicamente maleables incluyen neuronas, fibroblastos, fibroblastos embrionarios, células madre de adulto y células madre embrionarias. Preferentemente, la célula es una neurona, y comprende una prolongación celular tal como una dendrita, y el ácido nucleico es ARN, incluso más preferentemente, ARNm. Incluso más preferentemente, el ácido nucleico comprende una mezcla compleja de ARNm, incluyendo ARNm que codifican dos o más proteínas diferentes.

Como se desvela en otra parte en el presente documento, la presente invención comprende un método para transferir un fenotipo multigénico a una célula receptora. Preferentemente, el fenotipo multigénico se transfiere aislando dos o más ácidos nucleicos a partir de una primera célula, y transfectando una segunda célula con esos dos o más ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los dos o más ácidos nucleicos codifican polipéptidos diferentes. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos son ARN no codificantes u otros ácidos nucleicos no codificantes. Aún en otras realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden una mezcla de ácidos nucleicos codificantes y no codificantes. Aún en otras realizaciones, ácido nucleico de una primera célula receptora se transfiere posteriormente a una segunda célula receptora. La presente invención puede comprender además sintetizar químicamente dos o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos diferentes. En otra parte en el presente documento se desvelan métodos para sintetizar químicamente un ácido nucleico y pueden incluir la transcripción *in vitro*.

En el método de la invención, el ácido nucleico se transfiere a una célula para iniciar la conversión del fenotipo en la célula receptora. Como se usa en el presente documento, la conversión del fenotipo comprende un cambio en al menos uno de entre la expresión génica, la expresión de proteínas, marcadores inmunológicos, la morfología, la fisiología, la síntesis de bioproductos (por ejemplo, dopamina) y la composición de lípidos de membrana. Preferentemente, el cambio produce un fenotipo asociado o indicativo de la célula a partir de la cual se obtiene el ARN o ADN transfectado. Preferentemente, la conversión del fenotipo en la célula receptora comprende dos o más cambios. Más preferentemente, la conversión del fenotipo comprende tres o más cambios. En una realización, la conversión del fenotipo comprende un cambio en la fisiología. En otra realización, la conversión del fenotipo comprende un cambio en la morfología y un cambio en la fisiología de la célula receptora.

La conversión del fenotipo en la célula receptora se mantiene estable durante largos períodos de tiempo. En una realización, la conversión del fenotipo es estable durante al menos aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días o más. En una realización, la conversión del fenotipo es estable durante al menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más. En otra realización, la conversión del fenotipo es estable durante al menos aproximadamente 1 mes, 2 meses, 3 meses o más. En realizaciones preferidas, la conversión del fenotipo es estable durante la vida útil de la célula receptora o la vida útil de un cultivo derivado de la célula receptora.

La presente invención no se limita a transferir un fenotipo multigénico con solo dos ácidos nucleicos que codifican polipéptidos diferentes. La presente invención puede comprender además transferir un fenotipo multigénico usando 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 40 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, o la totalidad del ARN o ARNm de una célula, tejido o animal en el que el ARN o ARNm codifica polipéptidos diferentes.

La presente invención puede comprender además transfectar localmente una célula que comprende una prolongación celular. Una prolongación celular de este tipo incluye, pero no se limita a, una dendrita, un axón, una microvellosidad, un cilio, un estercilio, una prolongación, una prolongación astrocítica, y similares. Como se demuestra en el presente documento, este método permite ventajosamente la introducción de una cantidad deseada de ácido nucleico en uno o más sitios locales, permitiendo la producción controlada y localizada de proteína en cantidades fisiológicas, dando como resultado un efecto multigénico en una célula. Este método permite por tanto la localización específica de ácido nucleico aplicado de manera exógena, preferentemente ARNm, sin recurrir a cortar la prolongación celular de la célula a la que está unida (Kacharmina, *et al.*, 2000, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*,



97:11545-11550). Además, el presente método permite la expresión de una mezcla de ácidos nucleicos, dando por tanto como resultado la expresión de múltiples proteínas y un fenotipo multigénico en la célula.

La presente invención describe además métodos para fototransfectar un corte vivo de tejido. En la técnica se conocen métodos para mantener las prolongaciones celulares en las células que comprenden un corte vivo de tejido. Como ejemplo no limitante, pueden refrigerarse cortes vivos y someterse a perfusión con fluidos naturales o artificiales, tales como líquido cefalorraquídeo artificial, líquido del sistema nervioso central artificial y tampones que se desvelan en otra parte en el presente documento. Se describen métodos para la manipulación de cultivos de cortes vivos, por ejemplo, en Roelandse, *et al.* (2004, *J. Neuroscience*, 24: 7843-7847); y Chen, *et al.* (2005, *Magn. Reson. Med.* 53: 69-75).

Son posibles métodos para fototransfectar un animal vivo, preferentemente un mamífero, usando los métodos que se describen en el presente documento combinados con métodos de cirugía en animales y seres humanos conocidos en la técnica. Los procedimientos quirúrgicos a modo de ejemplo incluyen cateterización cardíaca, angioplastia, artroscopia, laparoscopia, resección tumoral, implantación quirúrgica de un implante terapéutico y similares. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, ratones, conejos, ratas, cabras, cobayas, seres humanos y similares.

Como ejemplo predictivo, se aplica un láser a un tejido en un animal vivo para fototransfectar el tejido en el animal vivo con uno o más ácidos nucleicos. Se introduce el ácido nucleico en el animal usando métodos que se desvelan en otra parte en el presente documento, tales como a través de un microscopio o una fibra óptica o endoscopia. La expresión de un polipéptido fototransfectado usando los métodos que se desvelan en el presente documento se controla usando métodos de detección de la expresión de proteínas conocidos en la técnica, tales como inmunotransferencias Western, inmunocitoquímica, detección de proteínas *in situ* y similares. En la técnica se conocen bien métodos para usar un láser para manipular tejidos de animales y se describen, por ejemplo, en Dang, *et al.* (2005, *Exp Dermatol.*, 14: 876-882).

Los métodos que se desvelan en el presente documento comprenden introducir un ácido nucleico, preferentemente un ARN y más preferentemente ARNm, ARNip, microARN, ARNnh, ARNt, ARN no codificantes y combinaciones de los mismos, incluyendo, pero sin limitarse a, ARN total, en una célula que comprende opcionalmente una prolongación celular, preferentemente una neurona que comprende una dendrita, y fototransfectar la célula en uno o más sitios en la membrana celular. La célula es preferentemente un cultivo celular primario o está en cultivo de cortes. La célula que comprende opcionalmente una prolongación celular puede someterse a fototransfección en cualquier sitio. Preferentemente, el sitio está en una prolongación celular, tal como una dendrita, o el cuerpo celular, tal como el soma. El ácido nucleico puede proporcionarse a la célula que comprende una prolongación celular mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, y se proporciona preferentemente por medio de un baño de ácido nucleico que comprende una mezcla de ácidos nucleicos, desvelado en otra parte en el presente documento. Un baño de ácido nucleico es una solución que comprende un ácido nucleico de interés en la que se baña una célula. En una realización, la aplicación de baño de la célula comprende rodear la célula con una solución que comprende ácido nucleico, bañando de este modo toda la célula. Después, se irradia la célula con un láser en uno o más sitios ubicados en cualquier parte en la célula. Véase la figura 1A. Una aplicación de baño comprende bañar una parte o partes diferenciadas de una célula viva, por ejemplo, aplicando una solución que comprende ácido nucleico a una ubicación diferenciada sobre la superficie de la célula. Después, se irradia la célula una o más veces dentro de la ubicación o ubicaciones diferenciadas que se bañaron. Véase la figura 1B. El baño en ubicaciones diferenciadas es ventajoso porque crea un mayor gradiente de concentración de ARNm, lo que permite que los ARNm se difundan más eficazmente a través de los orificios mediante la creación temporal de poros en la célula sometida a poración. También se requieren menos ARNm (por ejemplo, 0,3 µg) que para la aplicación de baño (por ejemplo, 20 µg). En cualquier caso, la solución se tampona de manera apropiada y tiene un pH apropiado para mantener la integridad estructural de la célula que va a someterse a fototransfección.

Un ácido nucleico de interés adecuado para su uso en el método de la invención puede ser de cualquier tamaño. Por ejemplo, se han fototransfectado satisfactoriamente un ácido nucleico de aproximadamente 800 nucleótidos y un ácido nucleico de aproximadamente 3000 nucleótidos en células que comprenden una prolongación celular usando el procedimiento de la invención. Sin embargo, los métodos de la presente invención no se limitan a un ácido nucleico, preferentemente un ARN, de los tamaños que se desvelan en el presente documento. La presente invención comprende fototransfectar un ácido nucleico de aproximadamente 30 bases, de manera incluso más preferible aproximadamente 50 bases, de manera aún más preferible aproximadamente 75 bases, de manera incluso más preferible aproximadamente 100 bases, de manera aún más preferible aproximadamente 150 bases, de manera incluso más preferible aproximadamente 200 bases, de manera aún más preferible aproximadamente 300 bases, de manera incluso más preferible aproximadamente 500 bases, de manera aún más preferible aproximadamente 750 bases, de manera incluso más preferible aproximadamente 1000 bases, de manera aún más preferible aproximadamente 1500 bases, de manera incluso más preferible aproximadamente 2000 bases, de manera aún más preferible aproximadamente 2500 bases, de manera incluso más preferible aproximadamente 3000 bases, de longitud. Incluso más preferentemente, la presente invención comprende transfectar, preferentemente mediante fototransfección, una mezcla de ARN que codifican proteínas diferentes y de pesos

moleculares diferentes.

La presente invención es útil para transfectar ácidos nucleicos homogéneos o heterogéneos en una célula. Específicamente, los métodos que se desvelan en el presente documento pueden usarse para transfectar ARN, ADN o ambos en una célula en cantidades fisiológicamente relevantes. Además, la presente invención puede usarse para introducir una mezcla de ARN que codifican proteínas diferentes, una mezcla de ADN que codifican proteínas diferentes, o una mezcla tanto de ARN como de ADN en una célula con el fin de determinar los efectos multigénicos y las interacciones de diversos ácidos nucleicos. Las mezclas también pueden comprender ácidos nucleicos no codificantes.

Como ejemplo, puede obtenerse un perfil de expresión de ácido nucleico de una célula en un estado fisiológico deseado (por ejemplo durante la diferenciación, en una patología, tras tratamiento con un compuesto farmacéutico, toxina u otro compuesto) y un perfil de expresión de ácido nucleico de una célula en otro estado fisiológico (por ejemplo el mismo tipo de célula antes o después de la diferenciación, no en una patología, o antes de tratamiento con un compuesto farmacéutico, toxina u otro compuesto) usando técnicas para el aislamiento de ARN conocidas en la técnica y que se desvelan en otra parte en el presente documento. Pueden generarse los clones de ADNc de estos ARN, reflejando las abundancias de ARN alteradas de los diferentes estados fisiológicos, o puede transfectarse el ARN en una célula sin realizar en primer lugar la transcripción inversa del ARN al ADNc. Estos ARN pueden mezclarse según las mismas razones y abundancias indicadas por los perfiles de expresión de ácido nucleico de las células en estados fisiológicos diferentes. Después, se transfectan estas mezclas de ácidos nucleicos en una célula usando los métodos de fototransfección que se desvelan en el presente documento. Los métodos de la presente invención permiten la transfección local de una célula, y por tanto puede transfectarse localmente la mezcla de ácidos nucleicos en una parte específica de una célula, tal como el soma, una prolongación astrocítica, una dendrita, u otra prolongación celular, o puede transfectarse generalmente la mezcla de ácidos nucleicos en una célula mediante fototransfección de cualquier parte de la célula. Usando los métodos de la presente invención, y las mezclas fisiológicamente relevantes de ácidos nucleicos que se describen en el presente documento, una vez expresada la mezcla de ácidos nucleicos en una célula, puede replicarse el fenotipo del estado fisiológico en una célula o una prolongación celular, permitiendo por tanto al experto en la materia observar la transferencia de fenotipo en una célula o prolongación celular.

Puede obtenerse ácido nucleico a partir de cualquier célula de interés en cualquier estado fisiológico. La célula donante puede ser cualquier tipo de célula. Una célula donante puede ser una célula eucariota o una célula procariota. Cuando la célula es una célula eucariota, la célula es preferentemente una célula de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, una célula de ser humano, primate no humano, ratón, conejo, rata, cabra, cobaya, caballo y similares. Una célula eucariota no de mamífero incluye una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto, una célula protozoaria y una célula fúngica, incluyendo hongos filamentosos y no filamentosos. Cuando la célula es una célula procariota, la célula es una célula bacteriana. Los ejemplos no limitantes de células a partir de las cuales puede obtenerse ácido nucleico incluyen astrocitos, cardiomiocitos, cardiomiocitos neonatales, células madre embrionarias y neuronas. Puede fototransfectarse ARN de cualquier célula donante de interés en cualquier célula receptora en el método de la invención. Preferentemente, las células donantes son de la misma especie que las células receptoras. Las células donantes pueden ser del mismo individuo que la célula receptora, o de un individuo diferente. Las células donantes pueden originarse de la misma capa germinal (por ejemplo, ectodermo) que la célula receptora (por ejemplo, ambas surgen de la capa germinal del ectodermo), o de una capa germinal diferente (por ejemplo, una célula surge del ectodermo y la otra surge de la capa germinal del endodermo). Las células donantes pueden ser el mismo tipo de célula que la célula receptora, pero en un estadio diferente de diferenciación, expuestas a un compuesto terapéutico candidato, expuestas a una toxina o a un patógeno, con enfermedad. Aún en otras realizaciones, una célula donante puede ser una célula receptora. Por ejemplo, se transfiere ácido nucleico de una célula donante en una primera célula receptora. Posteriormente se transfiere ácido nucleico de la primera célula receptora en una segunda célula receptora. En un aspecto, las células receptoras primera y segunda están en estados fisiológicos diferentes. En otro aspecto, las células receptoras primera y segunda son el mismo tipo de célula. Como se describe en otra parte en el presente documento, puede usarse ARN obtenido a partir de una célula para transfectar una célula, o puede usarse como molde para crear ADNc. El ADNc puede usarse en métodos de transcripción *in vitro* para amplificar parte o la totalidad del ARN, que después se usa en el método de la invención.

Como ejemplo, puede aislarse el ARN total de una célula madre neuronal u otra célula neuronal progenitora a partir de una célula de este tipo usando técnicas conocidas en la técnica y que se desvelan en otra parte en el presente documento. Después, puede procesarse el ARN total usando diversos métodos conocidos en la técnica para aislar ARNm, tal como aislamiento de ARNm usando ácidos nucleicos de poli-dT complementarios, que pueden conjugarse a perlas o a una columna. Después, se transfecta el ARNm en una célula receptora usando los métodos que se desvelan en el presente documento. Después, la célula receptora expresa la mezcla de ARNm aislado a partir de la célula madre neuronal y replica el efecto multigénico de la traducción y regulación génicas diferenciales características de una célula madre neuronal en desarrollo. Sin embargo, la presente invención no se limita a células madre neuronales y puede usarse para determinar el fenotipo multigénico transferido de cualquier tipo de célula en desarrollo o desarrollada, siempre que se aislen el ARN total y ARNm a partir de la célula.

Como ejemplo alternativo, puede aislarse el ARN total a partir de una célula tratada con un compuesto, tal como un fármaco, un péptido, una citocina, un anticuerpo, un mitógeno, una toxina u otros compuestos conocidos en la técnica, usando los métodos que se desvelan en el presente documento y conocidos en la técnica. Después, puede transfectarse el ARNm de esa célula en otro tipo de célula usando los métodos que se desvelan en el presente documento, transfiriendo así el fenotipo multigénico de la célula tratada con un compuesto a otra célula, permitiendo por tanto la determinación rápida y específica de ese compuesto en otro tipo de célula.

En otra realización de la presente invención, puede aislarse el ARN total de una célula enferma, tal como una célula tumoral, una célula que aloja un patógeno intracelular, una célula de un paciente con una enfermedad autoinmunitaria, y similares, a partir de la célula enferma. El ARNm de esa célula puede aislarse usando, por ejemplo, técnicas de aislamiento de poli-dT. El ARNm de la célula enferma se transfecta en otra célula usando los métodos de la presente invención, transfiriendo así el fenotipo multigénico de la célula enferma a otra célula, proporcionando una imagen más precisa del papel que desempeñan ácidos nucleicos que interaccionan y sus proteínas codificadas en el fenotipo de una célula.

La presente invención puede comprender además el uso de un ácido nucleico de una célula o una población de células de tipos homogéneos o heterogéneos. La presente invención puede comprender además el uso de un ácido nucleico, preferentemente ARNm, definido por el perfil de expresión de una célula según se determina usando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, un perfil de matriz génica, ARN total, ARNm total y similares. Se usa un perfil de expresión para determinar las abundancias relativas de ARNm en una célula. Después, se usa el perfil de expresión como molde para determinar las abundancias relativas de ARNm en el estado fisiológico de la célula de la que se realizó el perfil de expresión. Una población de ARNm con la misma abundancia relativa que en la célula para la que se ha obtenido el perfil de expresión se produce usando los métodos que se desvelan en otra parte en el presente documento, incluyendo aislamiento de ARNm, transcripción *in vitro* o síntesis química. Después, se fototransfecta el ARNm en la célula usando los métodos que se describen en otra parte en el presente documento, transfiriendo de este modo el fenotipo de la célula de la que se realizó el perfil de expresión a otra célula, tejido o animal.

En otra realización, la población de ARNm que refleja la abundancia relativa de una célula en un estado fisiológico particular comprende además ARNm que codifica uno o más polipéptidos que facilitan la conversión de fenotipo. Por ejemplo, puede complementarse el ARNm obtenido de una célula neuronal con ARNm que codifica proteínas que estimulan la exocitosis y después se fototransfecta en una célula receptora no neuronal.

La presente invención describe además la fototransfección secuencial de una célula. La fototransfección secuencial se usa en el presente documento para hacer referencia a un procedimiento en el que se fototransfecta una célula en un primer punto temporal, y después se fototransfecta en un segundo punto temporal o un punto temporal posterior. Como ejemplo, puede fototransfectarse una célula en el día 1, cuyo resultado es que se introducen uno o más ácidos nucleicos en la célula. Estos ácidos nucleicos pueden expresarse por los complejos de traducción celular o permanecer silenciosos, o pueden inhibirse usando un ácido nucleico inhibidor como se desvela en otra parte en el presente documento. En el día 2, puede fototransfectarse de nuevo la misma célula, transfectando uno o más de los ácidos nucleicos iguales o distintos en la misma célula. Sin embargo, la presente invención no se limita a la fototransfección separada por un día. La fototransfección secuencial puede producirse con minutos, horas, días, semanas o meses entre un primer punto temporal y un segundo punto temporal, siempre que la fototransfección se produzca en la misma célula. Por tanto, los métodos de fototransfección secuencial de la presente invención solo se limitan por la vida de la célula.

Los métodos de fototransfección secuencial de la presente solicitud son útiles, entre otras cosas, para analizar la expresión génica temporal en una célula, analizar los efectos multigénicos de una prolongación de desarrollo extendida y determinar la relación del genotipo con el fenotipo a lo largo del transcurso de la esperanza de vida de una célula. La fototransfección secuencial usando los mismos ácidos nucleicos también aumenta la robustez de la expresión de los ácidos nucleicos fototransfectados.

La divulgación no se limita al ARNm, puede comprender además someter a transcripción inversa ARNm para dar ADNc, después transfectar el ADNc en una célula.

La presente invención no se limita al uso de ARN y ARNm. Puede usarse una mezcla de ADN y ARN en los métodos de la presente invención para determinar los efectos de la expresión génica transitoria (ARN) así como prolongada (integración de ADN en el genoma) en una célula.

Cuando se fototransfecta una mezcla de ácidos nucleicos, tal como una mezcla de ARN, en una célula, pueden fototransfectarse subpoblaciones de esa mezcla en una célula para determinar el conjunto principal de ARN responsables para un fenotipo dado. Como ejemplo no limitante, cuando se aísla el ARN total a partir de una célula en un determinado estado fisiológico y se aísla ARNm a partir de esa población de ARN total, pueden transfectarse subpoblaciones específicas del ARNm aislado en una célula para establecer los ARNm principales responsables de ese fenotipo. La presente realización también puede realizarse con ADNc producido a partir de ARNm. Pueden identificarse poblaciones específicas de ARNm usando datos de homología de secuencia u otros rasgos

característicos conocidos en la técnica y disponibles de diversas bases de datos, tales como GenBank® (United States Department of Health and Human Services, Bethesda MD).

Como alternativa, puede aislarse el ARNm de una célula y transfectarse en una célula usando los métodos de la presente invención, y puede transfectarse un ARNip, microARN, ácido nucleico antisentido o ribozima (denominados colectivamente ácido nucleico inhibidor) junto con el ARNm, dando como resultado el silenciamiento y/o la inhibición de un ARNm. El silenciamiento de un ARNm permite a un experto en la materia identificar, por ejemplo, el o los ARNm principales responsables de un fenotipo multigénico. Además, la presente invención permite la replicación de un fenotipo en otra célula sin la etapa de determinar el perfil de expresión del ácido nucleico de una célula en un estado fisiológico. Puede aislarse el ácido nucleico, preferentemente ARN, de una célula en un estado fisiológico específico, tal como un determinado estado diferencial o patología. Usando los métodos de la presente invención, puede transfectarse el ARN, o un ADNc del ARN, en una célula con el fin de analizar el fenotipo en la célula transfectada una vez expresado el ácido nucleico. El ácido nucleico, preferentemente ARN, puede ser el ARN total de una célula, o una subpoblación del ARN, tal como ARNm.

Para evaluar el efecto de la expresión de los ácidos nucleicos transfectados, pueden examinarse células transfectadas según el método de la invención usando métodos conocidos en la técnica. Pueden realizarse evaluaciones, por ejemplo, de cambios fenotípicos, expresión de ARNm, expresión de proteína y ensayos funcionales. Los ejemplos de dichos análisis incluyen, pero no se limitan a, morfología celular, presencia y ausencia de marcadores inmunológicos, RT-PCR, obtención del perfil de expresión, mediciones de abundancia de ARNm, análisis de inmunocitoquímica (ICC, por sus siglas en inglés) para proteínas específicas, viabilidad celular y actividades específicas de la célula, tales como división-mitosis celular y electrofisiología.

En algunas realizaciones, el presente método comprende además inhibir factores de transcripción en la célula transfectada, evitando así la competición entre la expresión de ARNm endógenos y exógenos y las proteínas codificadas por los mismos. Un factor de transcripción puede inhibirse usando un ácido nucleico inhibidor o compuestos que inhiben factores de transcripción, tales como una proteasa, o SP100030 (Huang *et al.*, 2001, Br. J. Pharmacol., 134: 1029-1036). Otros agentes útiles para inhibir la transcripción en una célula receptora incluyen, pero no se limitan a,  $\alpha$ -amanitina, tricotatrina A (TSA; un inhibidor de histona desacetilasa), despolimerizador de tubulina y despolimerizador de actina. Preferentemente, se pone en contacto una célula receptora con uno o más agentes de inhibición de la transcripción antes de la transfección. Preferentemente, se pone en contacto la célula durante entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 80 horas, preferentemente entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 60 horas y más preferentemente, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 48 horas, antes de la transfección. En un ejemplo no limitante, se pone en contacto una neurona de hipocampo de rata con TSA y  $\alpha$ -amanitina a una concentración final de 100 nM y 100 microgramos por ml en un medio de células neuronales, respectivamente. Después, se irradia la neurona entre aproximadamente 24 y aproximadamente 55 horas después. En algunas realizaciones de la invención que incluyen la fototransfección secuencial de una célula receptora, preferentemente no se pone en contacto la célula receptora con un inhibidor de la transcripción tras la primera fototransfección.

La figura 2 representa un ejemplo de un cronograma para la fototransfección de una célula receptora, por ejemplo, una neurona, con ARNm de una célula receptora, por ejemplo, una célula de la glía. El cronograma representa un periodo de tratamiento con inhibidor de la transcripción, un periodo de recuperación celular de fototransfección y un periodo de remodelación y rediferenciación celular. Se indican posibles cambios en los medios, incluyendo transferencia de un medio específico de célula receptora a un medio específico de célula donante. Dichos cambios de medios son útiles, por ejemplo, para soportar la conversión de fenotipo. En el recuadro en la parte superior derecha se indican ensayos que pueden usarse para caracterizar la remodelación y rediferenciación de la célula receptora fototransfectada.

El presente método también puede usarse para la transfección específica y local de un ácido nucleico inhibidor, tal como un ARNip, ácido nucleico antisentido o un microARN (miARN), usando los métodos de la presente invención. Usando la invención que se desvela en el presente documento, el experto en la materia puede inhibir específicamente un ácido nuclear celular, especialmente aquellos en prolongaciones celulares. Además, como se desvela en otra parte en el presente documento, puede usarse un ácido nucleico inhibidor para identificar el o los ácidos nucleicos principales implicados en un fenotipo multigénico.

La presente invención comprende insertar un ácido nucleico en una célula. Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a una diversidad de ácidos nucleicos, incluyendo diversas especies de ARN (ARNm, ARNip, microARN, ARNnh, ARNt, ARN total, combinaciones de los mismos y similares) así como a ADN. En la técnica se conocen bien métodos para aislar ARN a partir de una célula, sintetizar un polinucleótido corto, construir un vector que comprende un inserto de ADN y otros métodos de obtención de un ácido nucleico para fototransfectarlo en una célula, e incluyen, por ejemplo, aislamiento de ARN, síntesis de ADNc, transcripción *in vitro* y similares.

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención ya sean de ARN, ADNc, ADN genómico o un híbrido de las diversas combinaciones, pueden aislarse a partir de las fuentes naturales o pueden sintetizarse *in vitro*. En general se describen técnicas para la manipulación de ácido nucleico en Sambrook *et al.* (2001, *Molecular Cloning*:

A *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y en Ausubel *et al.* (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York). Los ácidos nucleicos adecuados para su uso en el presente método también incluyen análogos de ácido nucleico. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, pero no se limitan a, fosforotioato, fosfotriéster, fosfonato de metilo, enlaces entre azúcares de cicloalquilo o alquilo de cadena corta, o enlaces entre azúcares ("estructura principal") heterocíclicos o heteroatómicos de cadena corta. Además, también pueden usarse ácidos nucleicos que tienen estructuras principales de morfolino (patente estadounidense n.º 5.034.506) o estructuras principales de poliamida (Nielsen *et al.*, 1991, *Science* 254: 1497).

Los métodos de la presente invención pueden comprender el uso de una diversidad de ácidos nucleicos, incluyendo ADN, ARN, un ADNc obtenido mediante transcripción inversa a partir de un ARNm, un ARN transcrito a partir de ese ADNc, un ADN amplificado a partir del ADNc, un ARN transcrito a partir del ADN amplificado, y similares. La presente invención comprende además usar moléculas de ARN y ADN monocatenarias y bicatenarias. Puede usarse cualquier secuencia codificante de interés en los métodos de introducción y traducción de un ácido nucleico en una célula o en una prolongación celular, tal como una dendrita. Un experto en la materia entenderá, cuando se le proporcione la presente divulgación, que puede afectarse a una multitud de propiedades de una prolongación celular, y por asociación, de la célula unida, mediante los métodos de la presente invención. Por ejemplo, para estudios de remodelación de dendritas, cualquier secuencia codificante para una proteína implicada en el crecimiento, la homeostasis o la remodelación de una dendrita es útil en los métodos de la invención. Los ejemplos no limitantes de dichas proteínas incluyen: caderina, neurexina, sinaptofisina, tubulina, proteínas asociadas a microtúbulos y actina.

En una realización de la presente invención, el ácido nucleico fototransfectado en una célula es la totalidad o una parte del ARNm total aislado a partir de una muestra biológica. La expresión "muestra biológica", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra obtenida a partir de un organismo o de componentes (por ejemplo, órganos, tejidos o células) de un organismo. La muestra puede ser de cualquier tejido o fluido biológico. El ácido nucleico (ya sea ADN genómico o ARNm) puede aislarse a partir de la muestra según cualquiera de varios métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Un experto apreciará que cuando deben detectarse alteraciones en el número de copias de un gen, preferentemente se aísla ADN genómico. A la inversa, cuando deben detectarse los niveles de expresión de un gen o de unos genes, preferentemente se aísla ARN (ARNm).

Los expertos en la técnica conocen bien métodos de aislamiento de ARNm total. Por ejemplo, se describen en detalle métodos de aislamiento y purificación de ácidos nucleicos en el capítulo 3 de *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation*, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993) y en el capítulo 3 de *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation*, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)).

Preferentemente, el ácido nucleico total se aísla a partir de una muestra dada usando, por ejemplo, un método de extracción con guanidinio-fenol-cloroformo ácido y se aísla ARNm de poliA<sup>+</sup> mediante cromatografía en columna de oligo-dT o usando perlas magnéticas de (dT)n. Productos disponibles comercialmente, tales como TRIZOL y MICRO-FASTTRACK (Invitrogen™, Carlsbad, CA), son útiles en la extracción de ácido nucleico a partir de una muestra biológica.

El ARNm puede transfectarse de manera local directamente en una célula o una prolongación celular, o puede someterse el ARNm de la muestra a transcripción inversa con una transcriptasa inversa y un promotor que comprende un oligo-dT y una secuencia que codifica el promotor del fago T7 para proporcionar un molde de ADN monocatenario. La segunda cadena de ADN se polimeriza usando una ADN polimerasa. Tras la síntesis de ADNc bicatenario, se añade ARN polimerasa de T7 y se transcribe ARN a partir del molde de ADNc. Rondas sucesivas de transcripción a partir de cada molde de ADNc individual dan como resultado ARN amplificado. Los expertos en la técnica conocen bien métodos de polimerización *in vitro* (véase, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente; Van Gelder, *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1663-1667). Además, Eberwine *et al.* (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3010-3014) proporcionan un protocolo que usa dos rondas de amplificación mediante transcripción *in vitro* para obtener una amplificación de más de 10<sup>6</sup> veces del material de partida original.

La presente invención comprende además el uso de transcripción *in vitro* para la fototransfección en una célula o prolongación celular. La transcripción *in vitro* comprende la producción de ARNbc transcribiendo un segmento de ácido nucleico (ADN) en ambas direcciones. Por ejemplo, el kit de transcripción de RNAi HiScribe™ (New England Biolabs, Ipswich, MA) proporciona un vector y un método para producir un ARNbc para un segmento de ácido nucleico que se clona en el vector en una posición flanqueada en cada lado por un promotor de T7. Se generan moldes separados para la transcripción de T7 de las dos cadenas complementarias para el ARNbc. Se transcriben los moldes *in vitro* mediante la adición de ARN polimerasa de T7 y se produce ARNbc. También pueden usarse métodos similares usando PCR y/u otras ARN polimerasas (por ejemplo, de polimerasa T3 o SP6) y se conocen en la técnica.

La presente invención comprende además el uso de ácidos nucleicos sintetizados químicamente para su uso en la fototransfección. Pueden sintetizarse químicamente oligonucleótidos para su uso como sondas según el método de

triéster de fosforoamidita en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage, (1981, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859-1862) usando un sintetizador automatizado, tal como se describe en Needham-VanDevanter, *et al.* (1984, *Nucleic Acids Res.*, 12: 6159-6168). La purificación de oligonucleótidos se realiza o bien mediante electroforesis en gel de acrilamida nativo o bien mediante HPLC de intercambio aniónico tal como se describe en Pearson (1983, *J. Chrom.*, 255:137-149). La secuencia de los oligonucleótidos sintéticos puede verificarse usando el método de degradación química de Maxam (1980, en Grossman y Moldave, eds., *Methods in Enzymology*, Academic Press, Nueva York, 65:499-560).

La presente divulgación puede comprender además el uso de ADN en un procedimiento para transfectar localmente una célula o una prolongación celular mediante fototransfección. El ADN puede contenerse en un vector, tal como los que se describen en el presente documento.

La divulgación incluye un ADN aislado que codifica una proteína operativamente unida a un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora/reguladora de manera que el ácido nucleico puede preferentemente dirigir la expresión de la proteína codificada por el ácido nucleico. Por tanto, la invención abarca vectores de expresión y métodos para la introducción de ADN exógeno en células con expresión concomitante del ADN exógeno en las células tales como las descritas, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y en Ausubel *et al.* (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

La expresión de una proteína en una célula o una prolongación celular sometida a fototransfección como se desvela en el presente documento puede lograrse generando un plásmido u otro tipo de vector que comprende el ácido nucleico deseado operativamente unido a una secuencia promotora/reguladora que sirve para impulsar la expresión de la proteína, con o sin un marcador, en células en las que se introduce el vector. Hay muchas secuencias promotoras/reguladoras útiles para impulsar la expresión constitutiva de un gen disponibles en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la secuencia potenciadora de promotor temprano inmediato de citomegalovirus, el promotor temprano del SV40, así como el promotor del virus del sarcoma de Rous, y similares. Además, puede lograrse la expresión inducible y específica del tejido del ácido nucleico que codifica una proteína colocando el ácido nucleico que codifica una proteína bajo el control de una secuencia promotora/reguladora inducible o específica del tejido. Los ejemplos de secuencias promotoras/reguladoras específicas del tejido o inducibles que son útiles para este propósito incluyen, pero no se limitan al promotor inducible de LTR del MMTV, y el potenciador/promotor tardío del SV40. Además, en la invención también se contemplan promotores que se conocen bien en la técnica que se inducen en respuesta a agentes de inducción tales como metales, glucocorticoides y similares. Por tanto, se apreciará que la invención incluye el uso de cualquier secuencia promotora/reguladora, que o bien se conoce o bien no se conoce, y que puede impulsar la expresión de la proteína deseada unida operativamente a la misma.

La selección de cualquier vector de plásmido particular u otro vector de ADN no es un factor limitante y en la técnica se conoce bien una amplia abundancia de vectores. Además, queda dentro de la experiencia del experto elegir secuencias promotoras/reguladoras particulares y unir operativamente esas secuencias promotoras/reguladoras a una secuencia de ADN que codifica un polipéptido deseado. Dicha tecnología se conoce bien en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y en Ausubel *et al.* (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

Los ácidos nucleicos que codifican una proteína pueden clonarse en diversos vectores de plásmido. Sin embargo, la presente divulgación no debe interpretarse como limitada a plásmidos o a cualquier vector particular. En vez de eso, debe interpretarse que la presente divulgación abarca una amplia abundancia de vectores que están disponibles fácilmente y/o se conocen bien en la técnica.

La presente divulgación comprende además transfectar localmente un ácido nucleico inhibidor, tal como un ácido nucleico antisentido, un ARNip o un microARN mediante fototransfección en una célula. Un polinucleótido de ARNip es una molécula de ácido nucleico de ARN que interfiere con la actividad de ARN que generalmente se considera que se produce mediante un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional. Un polinucleótido de ARNip comprende preferentemente un ARN bicatenario (ARNbc), pero no se pretende que se limite de ese modo y puede comprender un ARN monocatenario (véase, por ejemplo, Martínez *et al.*, 2002, *Cell* 110:563-74). El polinucleótido de ARNip incluido en la invención puede comprender otros polímeros de nucleótidos monocatenarios o bicatenarios, que se producen de manera natural, recombinantes o sintéticos (ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una combinación de ambos) y/o análogos de nucleótidos tal como se proporciona en el presente documento (por ejemplo, un oligonucleótido o polinucleótido o similar, normalmente con un enlace fosfodiéster de 5' a 3'). En consecuencia, se apreciará que determinadas secuencias a modo de ejemplo que se desvelan en el presente documento como secuencias de ADN que pueden dirigir la transcripción de los polinucleótidos de ARNip también se pretende que describan las secuencias de ARN correspondientes y sus complementos, dados los principios bien establecidos de apareamiento de bases de nucleótidos complementarios.

Un ARNip puede transcribirse usando como molde un ADN (genómico, ADNc o sintético) que contiene un promotor para un promotor de ARN polimerasa. Por ejemplo, el promotor puede ser el promotor de U6 o el promotor de ARN

polimerasa III de H1. Como alternativa, el ARNip puede ser una molécula de ARN derivada sintéticamente. En determinadas realizaciones, el polinucleótido de ARNip puede tener extremos romos. En determinadas otras realizaciones, al menos una cadena del polinucleótido de ARNip tiene al menos uno, y preferentemente dos nucleótidos que forman una "proyección" (es decir, que no realizan un apareamiento de bases con una base complementaria en la cadena opuesta) en el extremo 3' de cualquier cadena del polinucleótido de ARNip. En una realización preferida de la invención, cada cadena del dúplex de polinucleótido de ARNip tiene una proyección de dos nucleótidos en el extremo 3'. La proyección de dos nucleótidos es preferentemente un dinucleótido de timidina (TT) pero también puede comprender otras bases, por ejemplo, un dinucleótido de TC o un dinucleótido de TG, o cualquier otro dinucleótido. El dinucleótido de proyección también puede ser complementario a los dos nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia del polinucleótido que se selecciona como diana para la interferencia. Para un análisis de los extremos 3' de polinucleótidos de ARNip véase, por ejemplo, el documento WO 01/75164.

Los polinucleótidos de ARNip preferidos comprenden polinucleótidos bicatenarios de aproximadamente 18-30 pares de bases de nucleótidos, preferentemente aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26 o aproximadamente 27 pares de bases, y en otras realizaciones preferidas aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22 o aproximadamente 23 pares de bases o aproximadamente 27 pares de bases. El polinucleótido de ARNip útil en la presente invención también puede comprender una secuencia de polinucleótido que muestra variabilidad que se diferencia (por ejemplo, mediante sustitución de nucleótido, incluyendo transición o transversión) en uno, dos, tres o cuatro nucleótidos de una secuencia particular. Estas diferencias pueden producirse en cualquiera de las posiciones de nucleótido de una secuencia de polinucleótido de ARNip particular, dependiendo de la longitud de la molécula, si está situada en una cadena sentido o en una antisentido del polinucleótido bicatenario. La diferencia de nucleótidos puede encontrarse en una cadena de un polinucleótido bicatenario, en el que el nucleótido complementario con el que el nucleótido sustituto formaría normalmente un apareamiento de bases mediante puente de hidrógeno puede no estar sustituido de manera correspondiente. En realizaciones preferidas, los polinucleótidos de ARNip son homogéneos con respecto a una secuencia de nucleótidos específica.

Los polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de ARNip de la presente invención pueden estar derivados de, en determinadas realizaciones, de un polinucleótido monocatenario que comprende un fragmento de oligonucleótido monocatenario (por ejemplo, de aproximadamente 18-30 nucleótidos) y su complemento inverso, normalmente separado por una secuencia espaciadora. Según determinadas realizaciones de este tipo, la escisión del espaciador proporciona el fragmento de oligonucleótido monocatenario y su complemento inverso, de modo que pueden aparearse para formar, opcionalmente con etapas de procesamiento adicionales que pueden dar como resultado la adición o eliminación de uno, dos, tres o más nucleótidos del extremo 3' y/o del extremo 5' de cualquiera o ambas cadenas, el polinucleótido de ARNip bicatenario de la presente invención. En determinadas realizaciones el espaciador tiene una longitud que permite que el fragmento y su complemento inverso se apareen y formen una estructura bicatenaria (por ejemplo, como un polinucleótido en horquilla) antes de la escisión del espaciador, y opcionalmente, etapas de procesamiento posteriores que pueden dar como resultado la adición o eliminación de uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos del extremo 3' y/o del extremo 5' de cualquiera o ambas cadenas. Por tanto, una secuencia espaciadora puede ser cualquier secuencia de polinucleótido tal como se proporciona en el presente documento que está situada entre dos regiones de secuencias de polinucleótido complementarias que, cuando se aparean para formar un ácido nucleico bicatenario, da como resultado un polinucleótido de ARNip.

El presente método comprende además métodos para introducir un ácido nucleico en una célula. El método comprende fototransfectar una célula en presencia de un ácido nucleico, preferentemente ARN y/o ADN, en el que el ácido nucleico está en un medio fluido que permite la transferencia del ácido nucleico desde un lado de la membrana celular hasta el otro lado de la membrana celular a través de un orificio en la membrana celular. El medio fluido puede comprender cualquier medio que tiene la capacidad de tamponamiento y el pH para soportar la viabilidad de una célula y la estabilidad de una molécula de ácido nucleico. Los medios contemplados incluyen, pero no se limitan a, solución salina tamponada con fosfato, Tris, medios de cultivo celular de Tris-EDTA (TE), otros tampones y medios acuosos, y similares.

El número de moléculas de ácido nucleico que entran en la célula se ve influido por la concentración de ácido nucleico en el baño de ácido nucleico, el tamaño de la molécula de ácido nucleico y la intensidad del láser, por ejemplo, la duración de cada pulso de láser y el número de pulsos de láser entregados. Basándose en el contenido del presente documento, el experto en la materia puede ajustar fácilmente los parámetros del procedimiento de fototransfección para controlar el número aproximado de moléculas nucleicas que entran en la neurona por pulso.

En una realización, se rodea una célula por un baño de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico, preferentemente una molécula de ARN, a de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 µg/ml, más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 µg/ml, y todavía más preferentemente a de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 µg/ml en el baño. Preferentemente el baño está en un recipiente que es permeable mediante un láser y no altera el haz, incluso más preferentemente, el baño es un vidrio ópticamente transparente con un grosor de aproximadamente 0,1 mm.

En otra realización, se baña una célula en ubicaciones diferenciadas sobre la superficie celular con una solución que comprende una molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, usando una pipeta de fijación, micropipeta u otro aplicador, se aplica una solución que comprende ácido nucleico a una ubicación diferenciada sobre la superficie de una célula. La solución puede aplicarse a más de una ubicación sobre una célula. Después, se irradia la célula usando un láser en uno o más sitios dentro de una ubicación diferenciada. El ácido nucleico en la solución está presente a de aproximadamente 1 nanogramo por microlitro (ng/μl) a aproximadamente 2 microgramos/microlitro (μg/μl), preferentemente de aproximadamente 50 ng/μl a aproximadamente 1 (μg/μl) y más preferentemente de aproximadamente 100 ng/μl a aproximadamente 500 ng/μl.

La presente invención describe además el uso de otros métodos para introducir un ácido nucleico en una célula, tejido o animal mediante fototransfección. Los métodos incluidos en la presente invención incluyen, por ejemplo, perfusión, tratamiento con Picospritzer, microinyección y similares. Los métodos para la perfusión incluyen, pero no se limitan a, usar una bomba para mover un medio fluido que comprende un ácido nucleico, preferentemente ARN, incluso más preferentemente ARNm, a una célula, tejido o animal. El medio fluido usado en los métodos de perfusión puede incluir los que se desvelan en otra parte en el presente documento, tales como disoluciones tamponadas que soportan y mantienen la estabilidad de un ácido nucleico y una célula, tejido o animal. En una realización de la presente invención, el medio fluido puede incluir un medio, tal como medio basal de Eagle (BME), medio BGJb, medio BMOC-3 de Brinster, medio CMRL, medio independiente de CO<sub>2</sub>, medios de Eagle modificados por Dulbecco (D-MEM), mezclas de nutrientes F-10, mezclas de nutrientes F-12, medios esenciales mínimos de Glasgow, medios de cultivo de células de insectos de Grace, MEM mejorado, medios de insectos IPL-41, medios de Dulbecco modificados por Iscove, medios L-15 de Leibovitz, medios 5A de McCoy (modificado), medio MCDB 131, medios 199, medio NCTC-109, medio esencial mínimo (MEM), medio de Eagle modificado (MEM), medios de suero reducido Opti-MEM® I, medios RPMI 1640, medios de *Drosophila* de Schneider, medios MB 752/1 de Waymouth, medios E de Williams, líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF), solución de Ringer y similares. La presente invención puede comprender además el uso de disoluciones de sal tamponadas, incluyendo, pero sin limitarse a, solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS), solución salina equilibrada de Earle, solución salina equilibrada de Hanks, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y similares.

La presente divulgación describe además usar un instrumento Picospritzer junto con la fototransfección para introducir un ácido nucleico en una célula, órgano o tejido. El instrumento Picospritzer comprende el uso de pulsos eléctricos con un dispositivo de presión para entregar un compuesto, tal como un ácido nucleico, a una célula, tejido o animal. En la técnica se conocen métodos para el instrumento Picospritzer y se describen, por ejemplo, en Herberholz, *et al.*, 2002, *J. Neuroscience*, 22: 9078-9085). Hay aparatos Picospritzer disponibles, por ejemplo, de World Precision Instruments (Sarasota, FL).

En otro aspecto, la transfección de células con ácidos nucleicos que codifican dos o más polipéptidos diferentes se realiza mediante microinyección. En estas realizaciones, la célula receptora es preferentemente una célula somática, preferentemente una célula somática diferenciada.

La presente divulgación comprende irradiar una célula con un láser para fototransfectar y transfectar localmente la célula. Cuando el láser entra en contacto con la membrana celular, o la pared celular en el caso de las células vegetales, células fúngicas y otras células que comprende una pared celular, se perfora la membrana plasmática o la pared celular, permitiendo la difusión de moléculas foráneas, tales como ARN y/o ADN, para entrar en la célula. La fluidez de las membranas celulares de mamíferos facilita el posterior cierre de la perforación. Los láseres compatibles con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, láseres de ión de argón de onda continua que funcionan a 488 nm (Schneckenburger, *et al.*, 2002, *J. Biomed. Opt.*, 7: 410-416; Palumbo *et al.*, 1996, *J. Photochem. Fotobiol. B-Biol.*, 36: 41-46), láseres de Nd:YAG pulsados y con conversión ascendente de frecuencia que funcionan a 355 nm (Shirahata, *et al.*, 2001, *J. Invest. Med.*, 49: 184-190), 532 nm (Souhayer, *et al.*, 2000, *Anal. Chem.*, 72: 1342-1347) y 1064 nm (Mohanty, *et al.*, 2003, *Biotechnol. Lett.* 25: 895-899), y láseres de titanio-zafiro de femtosegundos (Tirlapur, *et al.*, 2002, *Plant J.* 31: 365-374; Tirlapur, *et al.*, 2002, *Nature* 418: 290-291; Zeira, *et al.*, 2003, *Mol. Therapy* 8: 342-350). Preferentemente, se usa un láser de titanio-zafiro a 405 nm (PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania) para fototransfectar una célula. Sin embargo, la presente divulgación no se limita al láser de titanio-zafiro, sino que incluye cualquier láser con la capacidad de entregar un volumen focal localizado de aproximadamente 10<sup>-19</sup> m<sup>3</sup>.

El control del haz de láser incidente se alcanza usando diversos aparatos para controlar el enfoque y la potencia del láser, así como para apuntar el láser. Se consigue enfocar el láser haciendo pasar el láser incidente a través de una lente, tal como una lente de microscopio, colocada entre el láser y la célula. La potencia del láser se controla modulando la tensión y la corriente que llega al láser y mediante el uso de filtros de densidad neutra o células Pockels. La exposición de las células al láser se controla mediante un obturador, tal como un obturador de cámara de reflejo de lente individual (SLR, por sus siglas en inglés) y/o con células de Pockels controladas electrónicamente.

Se logra apuntar el láser mediante una lente de microscopio y con espejos dieléctricos y de dirección y AOD (deflector acústico-óptico, por sus siglas en inglés) entre la fuente de láser y una célula. Un microscopio útil en la práctica de la presente invención incluye, pero no se limita a, un microscopio confocal, un microscopio de fluorescencia de excitación por múltiples fotones, un microscopio óptico y similares. El presente método comprende



además apuntar el láser usando una fibra óptica para transmitir el láser a una zona distante o de difícil acceso. Como ejemplo no limitante, se usa una fibra óptica para fototransfectar células intestinales, neurales o cardiorácicas en un animal vivo. Además, la presente invención comprende fototransfectar una célula o una población de células usando múltiples fibras ópticas en un animal. En la técnica se conocen bien las fibras ópticas y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 3.711.262, 6.973.245.

Un haz de láser con menos de un milivatio de potencia durante decenas de milisegundos es suficiente para crear un poro en una célula (Paterson, *et al.*, 2005, *Optics Express*, 13: 595-600). Preferentemente, el láser tiene una densidad de potencia de aproximadamente  $1200 \text{ MWm}^{-2}$  y una potencia total de aproximadamente 30-55 mW en la apertura posterior de la lente. Además, con el fin de proporcionar un área superficial máxima para la transfección, el haz de láser debe ser altamente circular ( $dx = dy$ ) con un diámetro de haz de aproximadamente 2 mm.

La emisión de potencia inicial del láser se atenúa mediante el uso de diversos filtros, tales como un filtro de densidad neutra (ND, por sus siglas en inglés) para reducir la potencia hasta el intervalo de milivatios requerido para la fototransfección sin efectos patológicos relacionados sobre la célula diana. El haz puede expandirse mediante el uso de un telescopio en el que  $f = 100 \text{ mm}$ , y dirigirse en un microscopio, tal como un microscopio óptico o un microscopio de inmersión en aceite con un objetivo de X100 (N.A. = 1,25). Un obturador SLR entre la fuente de láser y el microscopio permite el control del tiempo de exposición. Un tiempo de exposición de aproximadamente 40 ms es suficiente para crear un poro en una célula sin daño relacionado, pero este parámetro puede alterarse para aumentar o disminuir el tiempo de exposición.

Las células diana en un baño de ácido nucleico se colocan y se enfocan manipulando la plataforma del microscopio y/o usando espejos dieléctricos y de dirección y AOD, de modo que se centra el haz sobre la membrana celular y no hacia el núcleo de la célula. Cuando se crea un poro en una prolongación celular, tal como una dendrita, se enfoca el haz directamente sobre la prolongación celular.

Se irradia la célula o la prolongación celular con un láser según los parámetros que se desvelan en el presente documento. En un aspecto, se transfectan las células con un ácido nucleico que comprende un marcador que indica una transfección satisfactoria. Dichos marcadores se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, resistencia a antibióticos y proteínas fluorescentes. Puede realizarse un seguimiento de la creación satisfactoria de un poro mediante la adición de una molécula detectable en la solución de ácido nucleico. Dichas moléculas se conocen bien en la técnica. Preferentemente, la molécula no es tóxica para la célula receptora. Los ejemplos no limitantes incluyen amarillo Lucifer y éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína. Se incuban las células según las condiciones de incubación antes de la irradiación con el láser. Se analiza la expresión del ácido nucleico transfectado localmente según la presencia y actividad de un marcador o el fenotipo de la célula.

#### Kits

La presente divulgación describe diversos kits que comprenden un compuesto, incluyendo un ácido nucleico, para su uso en los métodos de fototransfección de la presente solicitud. Los kits pueden comprender además un aplicador, y materiales de instrucciones que describen el uso de un ácido nucleico para realizar los métodos de la invención. Aunque a continuación se describen kits de modelo, el contenido de otros kits útiles resultará evidente para el experto en la materia a la luz de la presente divulgación.

En un aspecto, la divulgación describe un kit para fototransfectar una célula, tejido, tal como un corte vivo, o un animal, preferentemente un mamífero. El kit comprende un recipiente que comprende un ácido nucleico, preferentemente ARNm, que cuando se expresa confiere un fenotipo específico a la célula, tejido o animal sometido a fototransfección. Es decir, el kit comprende una mezcla de ARNm o ácidos nucleicos derivados a partir de ARNm tal como se describe en otra parte en el presente documento que confiere un fenotipo específico a una célula. Dichos fenotipos incluyen los que se desvelan en otra parte en el presente documento, tales como un fenotipo canceroso, el fenotipo de un estado de desarrollo específico, el fenotipo de un estadio específico inducido mediante la administración de un fármaco, y similares. Como ejemplo, el ARNm aislado a partir de una célula madre puede incluirse en el kit de la presente divulgación, y después puede fototransfectarse en una célula para conferir un fenotipo de célula madre a la célula sometida a fototransfección. Como otro ejemplo, puede fototransfectarse el ARNm a partir de una célula no cancerosa en una célula cancerosa para conferir un fenotipo no canceroso a esa célula.

En otro aspecto, un kit comprende un recipiente que comprende una mezcla de ARN esencialmente en la misma abundancia relativa a la encontrada en una célula particular en un estado fisiológico particular, en el que los ARN pueden convertir fenotípicamente una célula cuando se introducen en la misma. Aún en otra, un kit comprende un recipiente que comprende una mezcla de ácidos nucleicos en el que la mezcla es convertidora del fenotipo. En otro aspecto, el kit comprende un recipiente que comprende una mezcla de ARN que comprende dos o más ARN que codifican dos o más polipéptidos diferentes y en el que los dos o más ARN están en la misma abundancia relativa que la encontrada en una célula. El ARN en cualquiera de los kits puede obtenerse mediante aislamiento de ARNm, síntesis química y/o transcripción *in vitro*. Sin embargo, los presentes ejemplos no se limitan a células, y también pueden incluir ARNm a partir de un tejido, tal como un corte vivo, o un animal, preferentemente un mamífero.

Adicionalmente, el kit comprende un aplicador y un material de instrucciones para el uso del kit. Estas instrucciones presentan una realización de la divulgación proporcionada en el presente documento.

## Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos experimentales.

### Ejemplo experimental 1: Neuronas sometidas a fototransfección con ARNm de astrocitos

Ahora se describen los materiales y métodos usados en el experimento presentado en el ejemplo experimental a continuación.

*Preparación de células receptoras:* Se cultivaron neuronas de hipocampo de rata en condiciones de cultivo convencionales con cubreobjetos en rejilla. Se trataron las neuronas con  $\alpha$ -amanitina a 100 ng/ml y TSA a 100 nM durante 48 horas antes de la fototransfección. Después, se incubaron estos cubreobjetos con células receptoras tratadas con inhibidor en solución de hipocampo normal (NHS) que contenía 100 ng/ml de  $\alpha$ -amanitina, 5 antibióticos (penicilina-estreptomicina, gentamicina, neomicina y kanamicina) y FUNGIZONE (anfotericina B; E.R. Squibb & Sons, Princeton, NJ) durante el procedimiento de fototransfección.

*Preparación de ARNm de donante:* Se cultivaron astrocitos de rata en DMEM/FBS al 10 % en un matraz usando un protocolo convencional. Se agitó el matraz durante la noche para garantizar la pureza de la población de astrocitos. Después, se extrajo ARN total usando TRIZOL y según las recomendaciones del fabricante, seguido por extracción de ARNm usando el kit MICROFASTTRACK 2.0. Se disolvió el ARNm en un tampón de elución (Tris-Cl 10 mM en agua DEPC) a una concentración final de 100 ng/ $\mu$ l a aproximadamente 300 ng/ $\mu$ l y se congeló a -80°C para su uso futuro como ARNm de donante.

*Fototransfección:* Se obtuvieron imágenes de células receptoras en NHS (complementado con  $\alpha$ -amanitina, antibióticos y FUNGIZONE) con una lente sumergida en agua de 40X y se barrieron con láser Chameleon. Se delineó la zona que iba a transfectarse en cada célula en una imagen de la célula en el monitor. Una aplicación local de aproximadamente 100~300 ng/ $\mu$ l de ARNm a partir de astrocitos de rata directamente sobre el cuerpo de la célula usando una micropipeta y se crearon poros secuencialmente en 16 (4X4) puntos dentro de la zona delineada usando un láser de Ti-zafiro (Mai-Tai™, Newport Corporation, Spectra-Physics Laser division, Mountain View, CA) durante 5 milisegundos por punto a una potencia de láser de 35 mW (en la apertura posterior de la lente). Se aplicaron de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 microlitros de solución de ARNm a cada neurona. La solución de ARNm también contenía amarillo Lucifer para realizar un seguimiento de la correcta aspiración de la solución de ARNm pulverizada sobre la célula que iba a transfectarse.

*Tras la fototransfección:* Después de la fototransfección con ARNm de donante, se incubaron las células receptoras en medio específico de células receptoras con 25 ng/ml de  $\alpha$ -amanitina (así como antibióticos y FUNGIZONE como anteriormente) durante 6 horas antes de sustituirlo por medio específico de células receptoras que contenía antibióticos y FUNGIZONE pero sin  $\alpha$ -amanitina. Posteriormente, se cultivaron las células sometidas a fototransfección con cubreobjetos en los medios específicos de células donantes apropiados tras la retirada de  $\alpha$ -amanitina. Posteriormente se cambiaron los medios de cultivo dos veces por semana.

*Obtención de imágenes y tinción:* Se obtuvieron imágenes de las células receptoras antes de la fototransfección y periódicamente tras la fototransfección. Se tiñeron las células con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para detectar los núcleos. Se tomaron imágenes de contraste de interferencia diferencial (DIC) para evaluar la morfología de las células sometidas a fototransfección. Para la detección inmunohistoquímica de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), se fijaron las células mediante exposición a paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos. Después, se incubó la muestra con anticuerpo de ratón (1:400) frente a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) durante la noche a 4°C, seguido por incubación con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con fluoróforo (1:1500) durante 45 minutos a temperatura ambiente.

*Fisiología (obtención de imágenes de calcio):* Se cargaron células sometidas a fototransfección con un indicador de calcio fluorescente que penetra en la célula (fluo-4 AM) y se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal. En primer lugar, se estimularon las células con glutamato 100  $\mu$ M. Después se lavaron las células y se dejó que se recuperaran (retorno de la señal al nivel inicial). Después, se estimularon las células con potasio 50 mM. Se lavaron de nuevo las células y se controlaron para evaluar si la señal volvía al nivel inicial.

Ahora se describen y se comentan los resultados de los experimentos.

Dos semanas tras la fototransfección de ARNm de astrocitos en neuronas del hipocampo, los cambios morfológicos eran claramente evidentes. En particular, se observó la retracción de prolongaciones neuronales en células sometidas a fototransfección. Véanse las figuras 3A, 3B y 3C.

Además, se realizó la tinción inmunohistoquímica para detectar la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). La GFAP es una proteína expresada específicamente en células de la glía; no se expresa en neuronas de hipocampo. La vida media *in vivo* del ARNm de GFAP es de aproximadamente 5 horas y la vida media *in vivo* de la proteína GFAP es de aproximadamente 18 horas. Por tanto, dos semanas tras la fototransfección, no se esperaría que estuviera presente ARNm de GFAP derivado de células de la glía y ninguna proteína GFAP expresada a partir del mismo en la célula sometida a fototransfección. Notablemente, se detectó GFAP en células sometidas a fototransfección (figura 3D). También se detectó GFAP tanto a 3 semanas (figuras 4A y 4B) como a 8 semanas (figuras 5A y 5B) tras la fototransfección de ARNm de la glía en neuronas de hipocampo. También se mantuvo la retracción de prolongaciones neuronales a las 8 semanas tras la fototransfección (figura 5A). Por tanto, estos datos indican que estaba expresándose el gen de GFAP endógeno en la neurona sometida a fototransfección. Por tanto, estos datos sugieren que la fototransfección de ARNm total de la glía da como resultado la activación de la expresión a largo plazo de genes subyacentes al fenotipo de células de la glía. Estos indicadores de conversión del fenotipo permanecieron en células sometidas a fototransfección durante más de 3 meses.

Se realizaron experimentos de obtención de imágenes de calcio para evaluar la captación de calcio en función de la estimulación con glutamato y la estimulación con potasio. Tanto los astrocitos como las neuronas tienen receptores de glutamato. La activación de los receptores de glutamato mediante la presencia de glutamato conduce a un aumento en el calcio citosólico. Sin embargo, solo las neuronas tienen canales de calcio dependientes de voltaje (es decir, excitabilidad eléctrica). Cuando se hiperpolariza apropiadamente el potencial de membrana de una neurona mediante estimulación eléctrica o una alta concentración de potasio, se obtiene como resultado un flujo entrante de calcio al citosol. Por tanto, puede usarse esta diferencia en la captación de calcio para distinguir fisiológicamente entre células de la astroglia y células neuronales.

La figura 6A muestra dos células cargadas con un indicador de calcio fluorescente a las 3 semanas tras la fototransfección, y es una imagen representativa de la señal de nivel inicial para las dos células. La célula 1 es una célula de control. La célula 2 se transfectó con ARNm de astrocitos. La estimulación de las células con glutamato dio como resultado la captación de calcio en ambas células (figura 6B). El aumento en el gráfico de la figura 6E a aproximadamente 35 segundos es la respuesta a la estimulación con glutamato. La figura 6B es una imagen representativa de las células durante el aumento inducido por glutamato. Tras lavar las células y permitir que se recuperaran, la estimulación con un alto contenido de potasio indujo un aumento máximo y rápido (comenzando a aproximadamente 270 segundos) de la captación de calcio en la célula 1. La estimulación con alto contenido de potasio dio como resultado un aumento de calcio retrasado y limitado en la célula 2. Véanse las figuras 6C y 6E. Tras eliminarse el potasio mediante lavado, ambas células volvieron a la señal de nivel inicial (figura 6D), indicando que las estimulaciones no eran tóxicas para las células.

El aumento de la captación de calcio observado en la célula 1 se espera si una célula tiene un fenotipo neuronal. El resultado en la célula 2 contrasta notablemente. La captación de calcio retrasada y limitada en la célula 2 indica la reducción del número o la ausencia de canales de calcio dependientes de voltaje. Por tanto, estos datos demuestran que las células transfectadas presentan, de hecho, receptores de glutamato funcionales (figura 6B), sin embargo, una característica importante del fenotipo neuronal ha cambiado en la célula 2: la pérdida de canales de calcio dependientes de voltaje (figura 6C y 6E).

Estos datos indican que un fenotipo multigénico en un primer tipo de célula puede inducirse en un segundo tipo de célula mediante fototransfección de ARNm de la primera célula a la segunda célula según la invención. La conversión de fenotipo es estable durante meses, lo que indica que el perfil de expresión génica en la célula receptora se convierte de manera estable en el perfil de expresión de la célula donante de ARNm y se mantiene.

#### **Ejemplo experimental 2: Neuronas sometidas a fototransfección con ARNm de cardiomiocitos neonatales**

Se prepararon neuronas de hipocampo de rata como células receptoras tal como se describió en el ejemplo experimental 1. Se obtuvo ARNm a partir de cardiomiocitos neonatales de rata esencialmente tal como se describió anteriormente. Se fototransfectaron neuronas tal como se describió en el ejemplo experimental 1. Seis (6) horas tras la fototransfección, se retiraron las neuronas sometidas a fototransfección de medio neural basal/B27 a DMEM/FBS al 10 %, un medio adecuado para el cultivo de cardiomiocitos. Siete (7) días tras la fototransfección, se transfirieron las neuronas sometidas a fototransfección a medio DMEM/FBS al 10 %/complementado con G5.

#### **Ejemplo experimental 3: Fibroblastos sometidos a fototransfección con ARNm de células ES positivas para nestina**

Se prepararon fibroblastos de ratón como células receptoras esencialmente tal como se describió en el ejemplo experimental 1. Se preparó ARNm a partir de células madre embrionarias de ratón positivas para nestina esencialmente tal como se describió en el ejemplo experimental 1. Se fototransfectaron fibroblastos tal como se describió en el ejemplo experimental 1, sin embargo, se crearon poros en 64 (8X8) puntos a 55 mW cada uno. Veinticuatro (24) horas tras la fototransfección, se movieron los fibroblastos sometidos a fototransfección de medio DMEM (sin piruvato de sodio)/FBS al 10 % a medio DMEM/F12/complementado con N2/ácido ascórbico, que es adecuado para cultivar células ES.

**Ejemplo experimental 4: Fibroblastos sometidos a fototransfección con ARNm de astrocitos**

- 5 Se prepararon fibroblastos de ratón como células receptoras esencialmente tal como se describió en el ejemplo experimental 1. Se preparó ARNm a partir de astrocitos de ratón esencialmente tal como se describió en el ejemplo experimental 1. Se fototransfectaron fibroblastos tal como se describió en el ejemplo experimental 1, sin embargo, se crearon poros en 64 (8X8) puntos a 55 mW cada uno. Seis (6) horas tras la fototransfección, se movieron fibroblastos sometidos a fototransfección de medio DMEM (sin piruvato de sodio)/FBS al 10 % a medio DMEM/FBS al 10 %.
- 10 Se pretende que las reivindicaciones adjuntas se interpreten como que incluyen todas las realizaciones y variaciones equivalentes.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vivo* o *ex vivo* de transferencia de un fenotipo multigénico de una célula donante a una célula receptora mediante: la transfección de una célula receptora con el ARNm total de una célula donante, en el que la  
5 célula donante es de la misma especie que la célula receptora, en el que el fenotipo de la célula donante es diferente del fenotipo de la célula receptora, en el que los ARNm entran en la célula receptora, en el que los ARNm son funcionales en la célula receptora y en el que los ARNm inician un cambio en la morfología y la fisiología en la célula receptora, y en el que el cambio produce un fenotipo que es indicativo de la célula donante.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la célula receptora es una célula eucariota.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la célula receptora es una célula de mamífero.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la célula receptora se selecciona entre el grupo que consiste en una  
15 célula epitelial, una neurona, un fibroblasto, un fibroblasto embrionario, un queratinocito, una célula madre de adulto, una célula madre embrionaria, un astrocito y un cardiomiocito.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende adicionalmente transfectar la célula receptora con al menos un ADN de la célula donante.  
20
6. El método de la reivindicación 5, en el que el método comprende adicionalmente transfectar la célula receptora con al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ARNip, microARN, ARNhn y ARNt.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el ARNm total es expresado por la célula receptora.  
25
8. El método de la reivindicación 1, en el que el ARNm total se aísla de una célula donante.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la célula donante se selecciona entre el grupo que consiste en: un  
30 astrocito, un cardiomiocito, un cardiomiocito neonatal, una célula madre embrionaria y una neurona.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el ARNm total se prepara mediante un método seleccionado entre el grupo que consiste en: el aislamiento de una célula donante, la transcripción *in vitro* o la síntesis química.
11. El método de la reivindicación 10, en el que el ARNm total se transcribe *in vitro*.  
35
12. El método *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por transfectar secuencialmente la célula receptora con ARNm total de una célula donante en un primer punto temporal y después transfectar la célula en un segundo punto temporal o un punto temporal posterior.

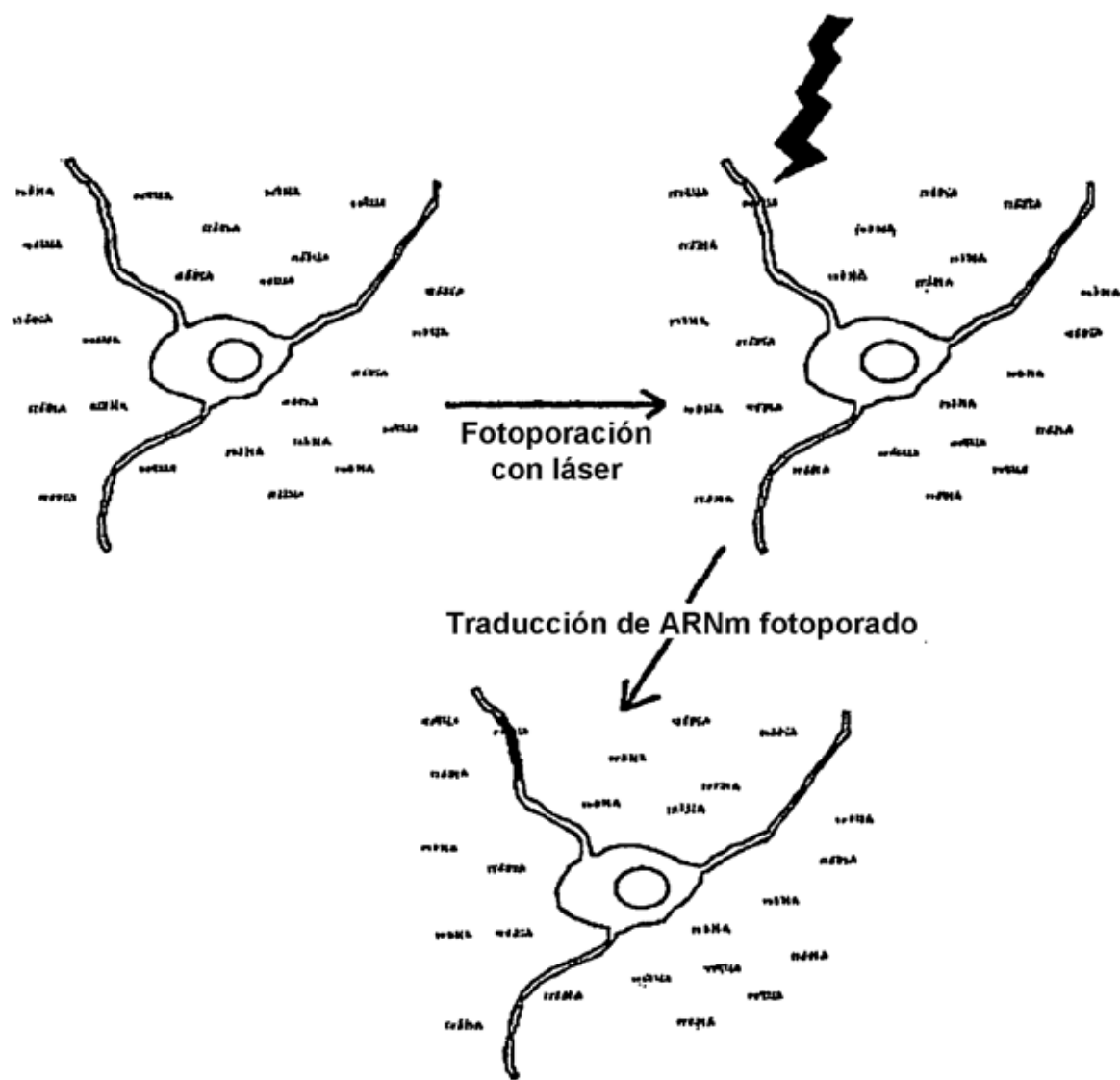


FIG. 1A

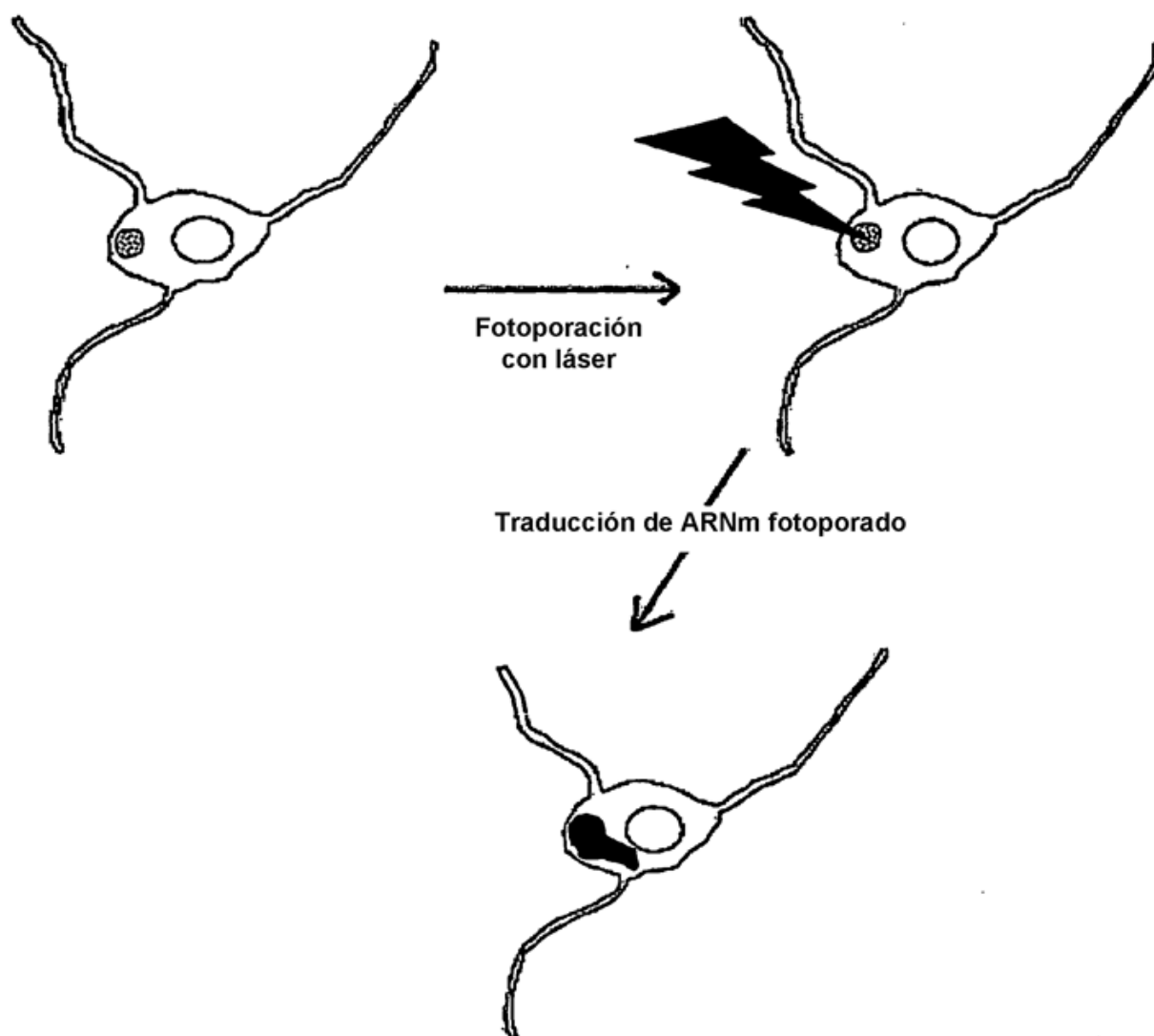


FIG. 1B

Fig. 2

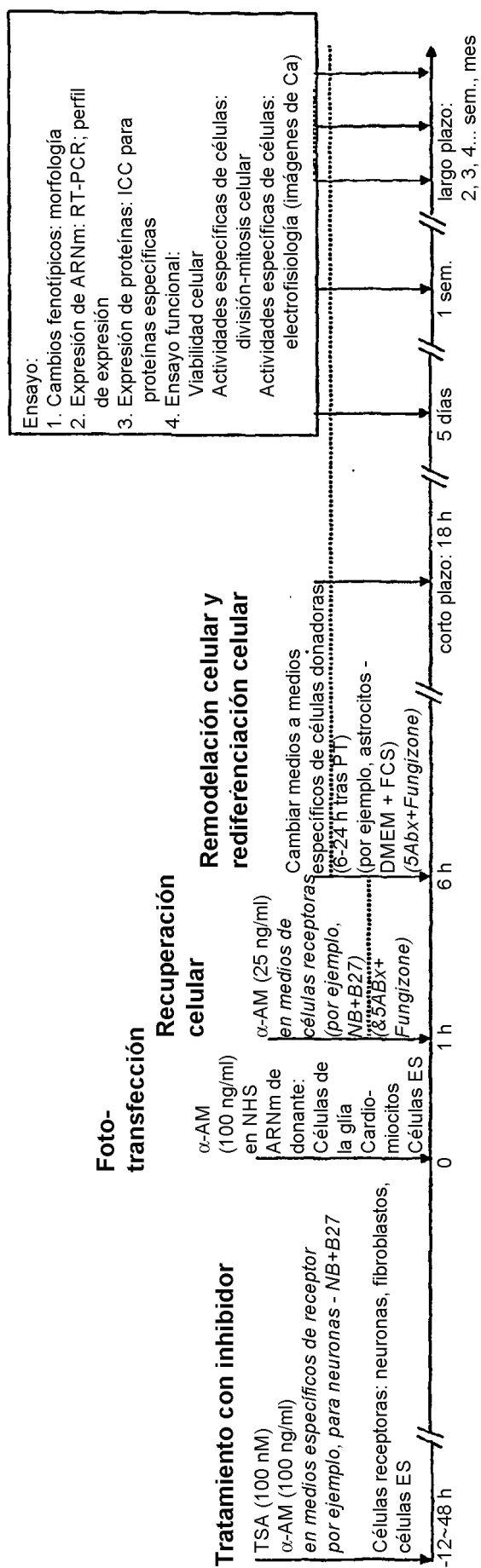




Fig. 3A



Fig. 3B



Fig. 3C

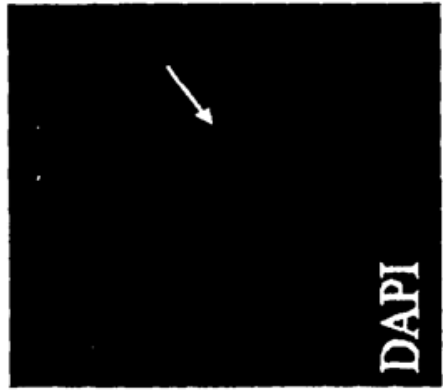


Fig. 3D

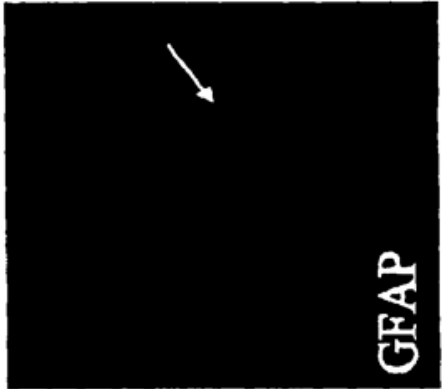


Fig. 4B

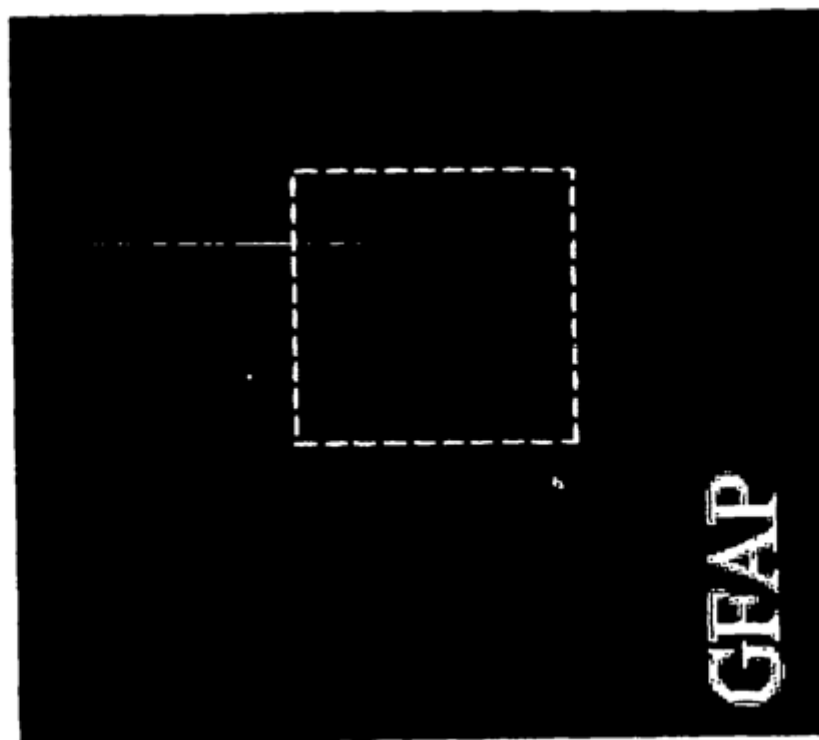


Fig. 4A

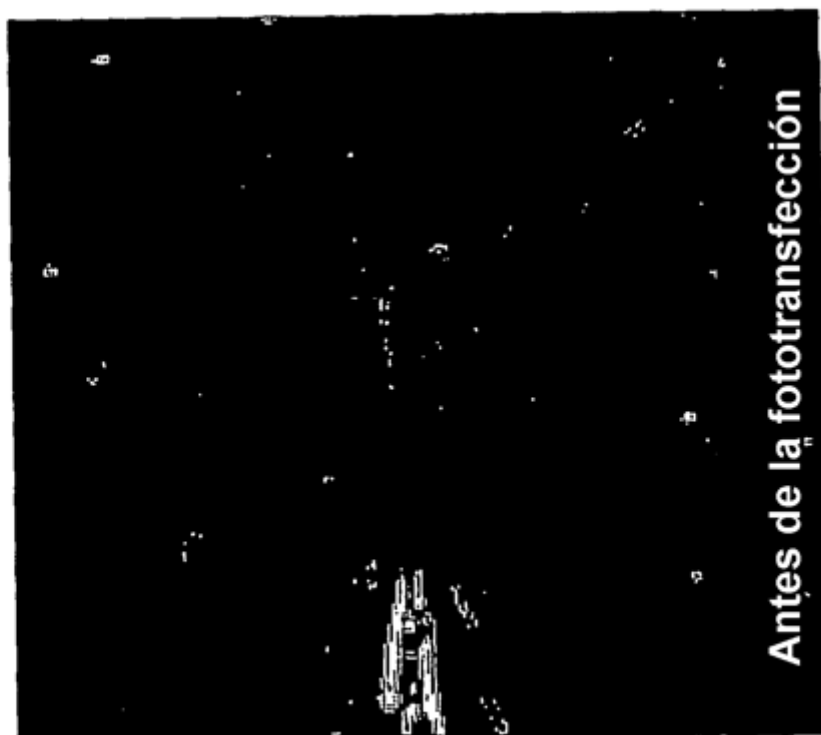


Fig. 5B

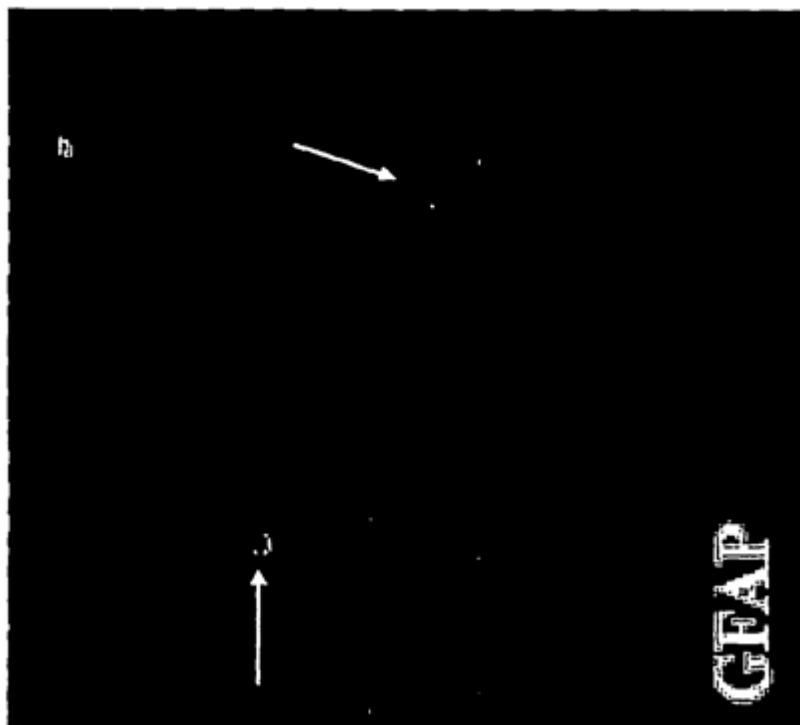


Fig. 5A



Figs. 6A-6E

