

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 516**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01998646 .2**

96 Fecha de presentación: **29.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1346059**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **Internalización fotoquímica para suministrar moléculas en el citosol**

30 Prioridad:
29.11.2000 GB 0029134
01.12.2000 GB 0029404
15.06.2001 GB 0114695

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2012

73 Titular/es:
PCI Biotech AS
Strandveien 55
N-1366 Lysaker, NO

72 Inventor/es:
BERG, Kristian;
PRASMICKAITE, Lina;
HOEGSET, Anders y
SELBO, Pal Kristian

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 516 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

Internalización fotoquímica para suministrar moléculas en el citosol

Método

5 El presente invento se refiere a un método mejorado para introducir moléculas en el citosol de células usando un agente fotosensibilizador e irradiación de las células con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador.

10 La mayoría de las moléculas no penetra fácilmente en las membranas celulares. Los métodos para introducir moléculas en el citosol de células vivas son herramientas útiles para manipular y estudiar procesos biológicos. Entre los métodos más comúnmente usados hoy en día están la microinyección, la fusión mediada por fantasmas de glóbulos rojos y la fusión de liposomas, la lisis osmótica de pinosomas, la carga por raspado, la electroporación, el fosfato cálcico y la transfección mediada por virus. Estas técnicas son útiles para investigar células en cultivo aunque, en muchos casos, pueden ser poco prácticas, ineficaces o consumir mucho tiempo, o pueden provocar una muerte celular significativa. Por lo tanto, dichas técnicas no son óptimas para uso en investigación biológica ni médica ni en terapias en que se requiere que las células permanezcan viables y/o funcionales.

15 Es bien sabido que las porfirinas y muchos otros compuestos fotosensibilizadores pueden provocar efectos citotóxicos en células y tejidos. Estos efectos se basan en el hecho de que, tras la exposición a luz, el compuesto fotosensibilizador se puede volver tóxico o puede liberar sustancias tóxicas, tales como oxígeno singlete u otros radicales oxidantes, que son perjudiciales para el material celular o las biomoléculas, incluyendo las membranas de células y estructuras celulares, y dicho daño celular o membranal puede matar finalmente a las células. Estos efectos han sido utilizados en el tratamiento de diversas anormalidades o trastornos, incluyendo especialmente las enfermedades neoplásicas. El tratamiento es denominado "terapia fotodinámica" (PDT; del inglés, *photodynamic therapy*) e implica la administración de agentes fotosensibilizadores (fotoquimioterapéuticos) a la zona afectada del cuerpo, seguida de la exposición a luz activadora con objeto de activar los agentes fotosensibilizadores y convertirlos en una forma citotóxica, por lo que las células afectadas son matadas o su potencial proliferativo resulta disminuido. Se conocen agentes fotosensibilizadores que se localizan preferente o selectivamente en el sitio diana deseado, tal como, por ejemplo, un tumor u otra lesión.

Se conoce una diversidad de agentes fotosensibilizadores, incluyendo notablemente los psoralenos, las porfirinas, las clorinas y las ftalocianinas. Dichos fármacos se vuelven tóxicos cuando son expuestos a luz.

30 Los fármacos fotosensibilizadores pueden ejercer sus efectos mediante una diversidad de mecanismos, directa o indirectamente. De este modo, por ejemplo, ciertos fotosensibilizadores se vuelven directamente tóxicos cuando son activados por luz, mientras que otros actúan para generar especies tóxicas, tales como, por ejemplo, agentes oxidantes tales como oxígeno singlete y otros radicales libres derivados del oxígeno, que son sumamente destructivos para el material celular y para biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

35 Los fotosensibilizadores de porfirina actúan indirectamente por generación de especies oxigenadas tóxicas y son considerados como candidatos particularmente favorables para la PDT. Las porfirinas son precursores de la síntesis de hemo presentes en la naturaleza. En particular, se produce hemo cuando se incorpora hierro (Fe^{3+}) a la protoporfirina IX (PpIX) por la acción de la enzima ferroquelatasa. PpIX es un fotosensibilizador muy potente, mientras que el hemo no ejerce efecto fotosensibilizador alguno. Se conoce en la técnica y se describe en la bibliografía una diversidad de fotosensibilizadores basados en porfirina o relacionados con la porfirina.

40 El efecto citotóxico de la mayoría de los sensibilizadores usados en la PDT es mediado principalmente a través de la formación de oxígeno singlete, formado tras la exposición de los fotosensibilizadores a la luz. Este intermedio reactivo tiene un tiempo de vida muy corto en las células ($< 0,04 \mu\text{s}$). Por lo tanto, el efecto citotóxico primario de la PDT se ejecuta durante la exposición lumínica y muy próximo a los sitios de formación de $^1\text{O}_2$. El $^1\text{O}_2$ reacciona con proteínas (histidina, triptófano, metionina, cisteína, tirosina), DNA (guanina), ácidos grasos insaturados y colesterol y los oxida. Una de las ventajas de la PDT es que los tejidos no expuestos a la luz pueden quedar inafectados; es decir, que se puede obtener un efecto de PDT selectivo. Hay una amplia documentación relativa al uso de PDT para destruir poblaciones celulares indeseadas, tales como, por ejemplo, células neoplásicas. En la bibliografía de patentes se describen diversos compuestos fotodinámicos, solos o conjugados con agentes para transporte dirigido, tales como, por ejemplo, inmunoglobulinas dirigidas a determinantes de receptores de células neoplásicas, lo que hace que el complejo sea más celularmente específico. Ciertos compuestos fotoquímicos, tales como derivados de hematoporfirina, tienen además la capacidad inherente de localizarse en células malignas. Dichos métodos y compuestos se describen en la patente noruega nº 173319 y en las solicitudes de patente noruega números 900731, 176645, 176947, 180742, 176786, 301981, 300499 y 891491.

55 En el Documento WO 93/14142 se describe un sistema para distribución de fármacos que comprende un agente anticanceroso y un agente fotoactivable (es decir, un fotosensibilizador) fijados a vehículos copolímeros. Tras la administración, este complejo entra en el interior de la célula por pinocitosis o fagocitosis y se localiza dentro de los endosomas y lisosomas. En los lisosomas, se hidroliza el enlace entre el agente antineoplásico y el polímero y el

primero puede difundirse pasivamente en el citosol a través de la membrana lisosómica. La utilidad de este método está por ello limitada a pequeños compuestos moleculares que son capaces de difundirse a través de las membranas lisosómicas. Después de dejar un periodo de tiempo para la difusión, se aplica una fuente lumínica de longitud de onda y energía apropiadas para activar el compuesto fotoactivable. El efecto combinado del agente anticanceroso y el agente fotoactivable destruye la célula. Dichos métodos de PDT como los anteriormente descritos se dirigen por tanto a una destrucción de estructuras celulares que conduzca a la muerte celular.

Por otro lado, los Documentos WO 96/07432 y WO 00/54802 son relativos a métodos en que se usa el efecto fotodinámico como un mecanismo para introducir moléculas, para las que de otro modo la membrana resulta impermeable, en el citosol de una célula de una manera que no dé necesariamente lugar a una destrucción celular ni una muerte celular generalizadas. En este método, se aplican simultánea o sucesivamente la molécula que se va a internalizar y un compuesto fotosensibilizador a las células, tras lo cual el compuesto fotosensibilizador y la molécula son endocitados o, en otros casos, translocados a endosomas, lisosomas u otros compartimentos restringidos por membrana intracelular.

La molécula que se va a translocar a compartimentos intracelulares de las células y el compuesto fotosensibilizador son conjunta o sucesivamente aplicados a las células y son conjuntamente incorporados por las células a los mismos compartimentos intracelulares (es decir, son cotranslocados). La molécula que se va a internalizar en la célula es luego liberada por exposición de las células a luz de longitud de onda adecuada para activar el compuesto fotosensibilizador, lo que conduce a su vez a la rotura de las membranas de los compartimentos intracelulares y a la subsiguiente liberación de la molécula, que está localizada en el mismo compartimento que el agente fotosensibilizador, en el citosol. Este método fue denominado "internalización fotoquímica" o PCI (del inglés, *photochemical internalisation*). De este modo, en estos métodos, la operación final de exponer las células a luz da lugar a que la molécula en cuestión sea liberada del mismo compartimento intracelular que el del agente fotosensibilizador y llegue a estar presente en el citosol.

Se creía que, con objeto de que este método fuera eficaz, era esencial que tanto el compuesto fotosensibilizador como la molécula que iba a ser liberada en el citosol estuvieran presentes en los mismos compartimentos intracelulares cuando se llevara a cabo la irradiación.

Se ha hallado ahora sorprendentemente que se pueden introducir moléculas en el citosol de células mediante métodos de PCI similares pero en los que la exposición de las células a luz no es necesariamente la operación final y los métodos no dependen de que la molécula y el agente fotosensibilizador estén localizados en los mismos compartimentos intracelulares en el momento de la exposición lumínica. En tales métodos, el agente fotosensibilizador puede ser puesto en contacto con las células y ser activado por irradiación antes de que la molécula que se va a internalizar y, de este modo, distribuir en el citosol sea puesta en contacto con las células. De esta manera, a pesar del hecho de que la molécula que se va a internalizar y el agente fotosensibilizador no estén necesariamente localizados en los mismos compartimentos intracelulares en el momento de la exposición lumínica, la molécula entra en la célula y es distribuida en el citosol. Estos resultados son muy sorprendentes y dichos métodos presentan unas ventajas significativas con respecto a los métodos en que la irradiación lumínica es la operación final.

Por lo tanto, en su aspecto más general, el presente invento proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para introducir una molécula en el citosol de una célula, método que comprende poner dicha célula en contacto con un agente fotosensibilizador y poner dicha célula en contacto con la molécula que se va a introducir (molécula de transferencia) e irradiar dicha célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, en que dicha irradiación se lleva a cabo antes o en el momento de poner dicha célula en contacto con la molécula de transferencia, en que la molécula de transferencia no penetra fácilmente en membranas celulares, y/o en que uno del agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia, o ambos, están fijados a, asociados con, o conjugados con, una o más moléculas vehiculares, moléculas para transporte dirigido o vectores.

La irradiación se lleva a cabo antes de la incorporación celular de la molécula que se va a internalizar.

Como aquí se utiliza, "internalización" se refiere a la distribución citosólica de moléculas. En el caso presente, "internalización" incluye así la operación de liberación de moléculas de compartimentos unidos a membranas/intracelulares en el citosol de las células.

Como aquí se usa, "incorporación celular" o "translocación" se refiere a una de las operaciones de internalización en que moléculas externas con respecto a la membrana celular se introducen en la célula de modo que se encuentren interiormente con respecto a la membrana celular que se extiende exteriormente, por ejemplo, mediante endocitosis u otros mecanismos de incorporación apropiados, por ejemplo, en, o asociadas con, unos compartimentos restringidos por membranas intracelulares, tales como, por ejemplo, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, lisosomas, endosomas, etc.

De este modo, el presente invento proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para introducir una molécula en el citosol de una célula, como se describió anteriormente, en que dicha célula es puesta en contacto con la molécula de transferencia en el mismo momento o después de la irradiación.

Como se discute más adelante, el método se puede utilizar *in vivo*, y, en este aspecto, el presente invento proporciona el uso de una molécula de transferencia y un agente fotosensibilizador, en que el agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia son como aquí se definen, para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección, preferiblemente para terapia génica, estimular una respuesta inmune o tratar o prevenir un cáncer, en que dicho agente fotosensibilizador y, separadamente, dicha molécula de transferencia se van a poner en contacto con células o tejidos de un paciente y dichas células se van a irradiar con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, y la irradiación se va a llevar a cabo antes o en el mismo momento que la puesta en contacto de dicha célula con la molécula de transferencia, en que dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica.

El invento proporciona además el uso de una molécula de transferencia como la aquí definida para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección, preferiblemente para terapia génica, estimular una respuesta inmune o tratar o prevenir un cáncer, en que dicha enfermedad, trastorno o infección se va a tratar al poner en contacto células o tejidos de un paciente con dicho medicamento, y, separadamente, se va a poner un agente fotosensibilizador como el aquí definido en contacto con dichas células o tejidos de dicho paciente, y dichas células se van a irradiar con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, y la irradiación se va a llevar a cabo antes o en el mismo momento que la puesta en contacto de dicha célula con la molécula de transferencia, en que dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica.

El presente invento proporciona además una composición relativa a una molécula de transferencia y, separadamente, un agente fotosensibilizador como el aquí definido, como una composición combinada para uso separado o secuencial, como se describió anteriormente. En un aspecto más, el invento proporciona una molécula de transferencia como la aquí definida para un uso como el anteriormente descrito.

Preferiblemente, las células se ponen en contacto con las moléculas que se van a introducir o internalizar (a las que más adelante se hace referencia como moléculas de transferencia) en un punto temporal después de que haya tenido lugar la irradiación, o, en otras palabras, el tratamiento fotoquímico de las células, poniéndolas en contacto con un agente fotosensibilizador e irradiándolas luego, se efectúa antes de que se añadan las moléculas a las células. En esta realización, las moléculas que se van a introducir en el citosol pueden ser puestas en contacto con las células que han sido sometidas a tratamiento fotoquímico en cualquier punto temporal después de que haya tenido lugar el tratamiento con tal de que las moléculas de transferencia aún se puedan incorporar a las células. La ventana de tiempo en que las moléculas pueden ser puestas en contacto con las células y aún resultar incorporadas puede depender de diversos factores tales como, por ejemplo, el tipo celular, la molécula particular en cuestión, el agente fotosensibilizador particular utilizado y la duración del tratamiento lumínico. Esta ventana de tiempo puede ser determinada, si es necesario, para un conjunto particular de condiciones. Sin embargo, preferiblemente, la molécula que se va a transferir al citosol es expuesta a las células relativamente poco después del tratamiento fotoquímico, tal como, por ejemplo, en las 24 horas después del tratamiento fotoquímico y, más preferiblemente, en las primeras 10 horas después del tratamiento fotoquímico, por ejemplo, en las primeras 5 horas o, más preferiblemente, en la primera hora. Por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, la molécula de transferencia se puede administrar durante un cierto periodo de tiempo, por ejemplo, de 30 minutos a 24 horas, preferiblemente de 1 a 2 horas, comenzando la administración inmediatamente después o poco después de la irradiación; por ejemplo, si el final de la irradiación es considerado el punto de inicio, la molécula de transferencia se puede aplicar en el periodo de los 0 minutos a las 24 horas, por ejemplo, de las 0 a las 4 horas.

Se ha observado que la internalización en la célula es posible aun cuando la molécula de transferencia sea puesta en contacto con la célula un considerable tiempo después de la irradiación. De este modo, por ejemplo, la molécula de transferencia se puede aplicar más de una hora después de la irradiación, por ejemplo, más de 2, 4, 8, 10 o incluso 12 horas después de la irradiación.

Por lo tanto, en una realización preferida, se pone dicha célula en contacto con dicha molécula de transferencia de 0 a 4 horas después de la irradiación durante un periodo de 1 a 2 o 3 horas o más, por ejemplo, de al menos 0,5 a 3 horas. El momento en que se administra la molécula de transferencia variará dependiendo de si los métodos se llevan a cabo *in vitro* o *in vivo*. Para los métodos *in vitro*, en general, las moléculas de transferencia se pueden poner simultáneamente en contacto con todas las células diana, por ejemplo, si las células están creciendo en un cultivo *in vitro*, y, de este modo, es relativamente sencillo poner las moléculas en contacto con las células en un punto temporal apropiado. Sin embargo, *in vivo*, la operación de poner las células diana en contacto con las moléculas de transferencia es evidentemente más complicada y dependerá del modo de administración y de la localización de las células diana. Por ejemplo, cuando la molécula de transferencia se puede administrar directamente a las células diana, tal como, por ejemplo, por inyección local, la molécula de transferencia entrará entonces en contacto con las células diana (o al menos una proporción de ellas) de forma relativamente rápida, por ejemplo, en cuestión de minutos u horas después de la administración. Por otra parte, si las moléculas de transferencia se administran por inyección intravenosa a una diana distante, puede que estas moléculas tarden entonces mucho más en entrar en contacto con las células diana. Por ejemplo, pueden tardar en alcanzar las células diana de 24 a 96 horas después de la administración. Este "tiempo de viaje" habrá de ser tenido en cuenta a la hora de decidir el momento apropiado para administrar las moléculas de transferencia con respecto a la administración del agente fotosensibilizador y el momento de

la irradiación.

En una realización alternativa del invento, en lugar de que se ponga la molécula de transferencia en contacto con las células después de que haya tenido lugar la irradiación, se puede poner en contacto con las células en el mismo momento de la irradiación.

5 Como se mencionó anteriormente, la regulación temporal precisa de la adición de la molécula de transferencia y el agente fotosensibilizador y la regulación temporal de la irradiación para conseguir los efectos anteriormente descritos han de tener en cuenta diversos factores que incluyen las células que se van a tratar, los agentes y moléculas en uso y el ambiente de las células, particularmente con respecto de si está en cuestión un sistema *in vitro* o *in vivo*.
10 Teniendo en cuenta estas consideraciones, se pueden determinar fácilmente las regulaciones temporales apropiadas.

Métodos previamente descritos de internalización fotoquímica en que se añadían la molécula de transferencia y el agente fotosensibilizador a las células antes de la irradiación dependían de que las moléculas en cuestión estuvieran localizadas en los mismos compartimentos intracelulares antes de la exposición lumínica para que la lisis de estos compartimentos por la activación lumínica del agente fotosensibilizador diera lugar a la liberación tanto de la molécula como del agente fotosensibilizador en el citosol. En la Figura 7 se presenta un dibujo esquemático que muestra esto.

Evidentemente, en los métodos presentes, el agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia que se van a introducir en el citosol no están en los mismos compartimentos intracelulares en el momento de la exposición lumínica ya que la irradiación se lleva a cabo antes de la incorporación celular de la molécula de transferencia.

20 El mecanismo de acción de los métodos presentes es hasta ahora desconocido y, en realidad, el hecho de que este método funcione completamente es sorprendente. Aunque sin pretender un respaldo teórico, la razón para estos sorprendentes hallazgos puede ser que tiene lugar la fusión de vesículas fotoquímicamente dañadas con vesículas endocíticas recién formadas, lo que va luego seguido de la liberación de moléculas recién endocitadas en el citosol. En la Figura 7 se muestra un diagrama esquemático que ilustra esto. Alternativamente, el daño fotoquímico a enzimas lisosómicas o vesículas que contienen enzimas lisosómicas, tales como endosomas tardíos, puede reducir la velocidad de degradación intracelular de las moléculas que se van a internalizar. Esto puede ser debido a un transporte reducido a vesículas que contienen enzimas lisosómicas o a un transporte a vesículas endocíticas que contienen menor actividad hidrolítica. De esta manera, estas moléculas tendrán más tiempo para librarse de la compartimentación endocítica que cuando está activa la ruta de degradación lisosómica. Otra explicación alternativa podría ser que el tratamiento fotoquímico de las células condujera a un pequeño daño a la membrana plasmática de las células, lo que conduciría a una penetración aumentada de macromoléculas a través de la membrana celular. Sin embargo, experimentos llevados a cabo (véase el Ejemplo 7) sugieren que probablemente ésta no es la razón.

De esta forma, el presente invento se refiere a métodos para transportar o transfectar cualesquier moléculas al citosol de células vivas, sea *in vitro* (es decir, en cultivo) o sea *in vivo*, después de lo cual las moléculas estarán disponibles en el citosol.

Dichos métodos pueden ser utilizados no sólo para transferir moléculas (o partes o fragmentos de las mismas) al interior de una célula sino también, en ciertas circunstancias, para presentarlas o expresarlas en la superficie celular. De esta forma, después del transporte y la liberación de una molécula de transferencia en el citosol celular de acuerdo con los métodos del presente invento, si las células en cuestión son células especializadas, tales como, por ejemplo, células presentadoras de antígeno, la molécula o fragmento puede ser transportada a la superficie de la célula, pudiendo ser presentada en la cara externa de la célula, es decir, en la superficie celular. Dichos métodos tienen una utilidad particular en el campo de la vacunación, en el que se pueden introducir componentes de vacunas, es decir, antígenos o inmunógenos, en una célula para su presentación en la superficie de esa célula con objeto de provocar, facilitar o aumentar una respuesta inmune. En el Documento WO 00/54802 se describen detalles adicionales en cuanto a la utilidad de poder expresar moléculas en la superficie celular.

Las moléculas de transferencia que se pueden introducir en el citosol de células usando los métodos del presente invento incluyen moléculas que no penetran fácilmente en las membranas celulares. Además, el presente invento puede aumentar la distribución y actividad citosólicas de las moléculas que sólo son parcialmente capaces de penetrar en la membrana de las células o las membranas de las vesículas intracelulares. Las moléculas de transferencia pueden ser compuestos orgánicos, proteínas o fragmentos de proteínas tales como, por ejemplo, péptidos, anticuerpos o antígenos o fragmentos de los mismos. Otra clase de moléculas de transferencia para uso de acuerdo con el invento son fármacos citotóxicos tales como toxinas proteínicas y compuestos orgánicos citotóxicos tales como, por ejemplo, la bleomicina. Los ácidos nucleicos son aún otra clase de moléculas de transferencia apropiadas.

55 Los ácidos nucleicos se pueden usar en forma de genes que codifican, por ejemplo, proteínas terapéuticas, moléculas de RNA antisentido, ribozimas, aptámeros de RNA u oligonucleótidos que forman hélices triples. Alternativamente, se pueden emplear los ácidos nucleicos en forma de moléculas no codificadoras tales como, por ejemplo, moléculas antisentido de DNA o RNA sintéticas, ribozimas, aptámeros, oligonucleótidos que forman hélices triples, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs; del inglés, peptide nucleic acids), DNA "señuelo" para factores de transcripción y oligo-

nucleótidos quiméricos para la reparación de mutaciones específicas en el paciente. Cuando es apropiado, las moléculas de ácido nucleico pueden estar en forma de genes completos o fragmentos de ácido nucleico opcionalmente incorporados a una molécula o elemento vector, tal como, por ejemplo, un vector plasmídico o una partícula vírica o bacteriófago. La última forma tiene una aplicabilidad particular cuando la molécula de transferencia se va a utilizar en métodos de terapia génica.

El agente fotosensibilizador que se va a utilizar de acuerdo con el presente invento es convenientemente cualquiera de dichos agentes que se localizan en compartimentos intracelulares, particularmente endosomas o lisosomas. Se conoce en la técnica y se describe en la bibliografía, incluyendo en el Documento WO 96/07432, una diversidad de dichos agentes fotosensibilizadores. A este respecto, se puede hacer mención de ftalocianina de aluminio di- y tetra-sulfonada (por ejemplo, AlPcS_{2a}), tetrafenilporfinas sulfonadas (TPPS_n), azul Nilo, derivados de clorina e_6 , uroporfirina I, filoeitrina, hematoporfirina y azul de metileno, de los que se ha mostrado que se localizan en endosomas y lisosomas de células en cultivo. En la mayoría de los casos, esto se debe a la incorporación endocítica del fotosensibilizador. Por lo tanto, el agente fotosensibilizador es preferiblemente un agente que se incorpora a los compartimentos internos de lisosomas o endosomas. Sin embargo, también se pueden utilizar otros agentes fotosensibilizadores que se localizan en otros compartimentos intracelulares, tales como, por ejemplo, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. También es concebible que puedan estar actuando mecanismos cuando los efectos del tratamiento fotoquímico son sobre otros componentes de la célula (es decir, componentes distintos de compartimentos restringidos por membrana). De esta manera, por ejemplo, una posibilidad puede ser que el tratamiento fotoquímico destruya moléculas importantes para el transporte intracelular o la fusión de vesículas. Puede que dichas moléculas no estén necesariamente localizadas en compartimentos restringidos por membrana, pero, no obstante, el daño fotoquímico de dichas moléculas puede conducir a la internalización fotoquímica de las moléculas de transferencia mediante, por ejemplo, un mecanismo por el que los efectos fotoquímicos sobre dichas moléculas conducen a un transporte reducido de la molécula que se va a internalizar (es decir, la molécula de transferencia) hasta vesículas degradantes tales como lisosomas, por lo que la molécula que se va a internalizar puede escapar al citosol antes de ser degradada. Los ejemplos de dichas moléculas no necesariamente localizadas en compartimentos restringidos por membrana son diversas moléculas del sistema de transporte microtubular, como dineína y componentes de dinactina y, por ejemplo, rab5, rab7, factor sensible a N-etilmaleimida (NSF; del inglés, N-ethylmaleimide sensitive factor), proteína soluble de fijación a NSF (SNAP; del inglés, soluble NSF attachment protein), etc.

Las clases de agentes fotosensibilizadores adecuados que se pueden mencionar incluyen así porfirinas, ftalocianinas, purpurinas, clorinas, benzoporfirinas, naftalocianinas, colorantes catiónicos, tetraciclina y bases débiles lisosomotrópicas o derivados de las mismas (Berg et al., J. Photochemistry and Photobiology, 1997, 65, 403-409). Otros agentes fotosensibilizadores adecuados incluyen texafirinas, feoforbidos, porfíenos, bacterioclorinas, cetoclorinas, derivados de hematoporfirina, y derivados de los mismos, fotosensibilizadores endógenos inducidos por el ácido 5-aminolevulínico y derivados del mismo, y dímeros u otros productos de conjugación entre fotosensibilizadores.

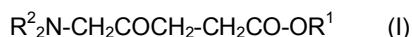
Preferiblemente, el fotosensibilizador está en forma libre, es decir, no está conjugado con ninguna otra macromolécula. Sin embargo, el fotosensibilizador puede estar alternativamente asociado con, fijado a, o conjugado con, un vehículo u otra molécula como la descrita más adelante, tal como, por ejemplo, fijado a un anticuerpo para transporte dirigido o copulado con un vehículo tal como polilisina.

Los agentes fotosensibilizadores preferidos incluyen TPPS_4 , TPPS_{2a} , AlPcS_{2a} y otros fotosensibilizadores anfipáticos. En un aspecto preferido, el presente invento proporciona métodos en que los agentes fotosensibilizadores que se pueden usar son compuestos que son el ácido 5-aminolevulínico o ésteres del ácido 5-aminolevulínico o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En dichos ésteres, el grupo 5-amino puede estar sustituido o no sustituido, siendo el último caso los ésteres de ALA.

Más particularmente, los ésteres de ALA para uso de acuerdo con el invento son ésteres de ácidos 5-aminolevulínicos con alcoholes opcionalmente sustituidos, es decir, ésteres de alquilo o ésteres de alquilo sustituido.

Convenientemente, los ésteres de ALA que se pueden usar son compuestos de fórmula I,



(en que R^1 puede representar alquilo opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo, alcoxilo, aciloxilo, alcoxicarboniloxilo, amino, arilo, oxo o fluoro y opcionalmente interrumpido por átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo; y R^2 , cada uno de los cuales puede ser igual o diferente, representa un átomo de hidrógeno o un grupo R^1) y sales de los mismos.

Los grupos alquílicos R^1 sustituidos pueden estar monosustituidos o polisustituidos. De este modo, los grupos R^1 adecuados incluyen, por ejemplo, alquilo no sustituido, alcóxialquilo, hidroxialcoxialquilo, polihidroxialquilo, hidroxipolialquilenoxialquilo y similares. Como aquí se usa, el término "acilo" incluye tanto grupos carboxilato como carbonato; así, los grupos alquilo sustituidos con aciloxilo incluyen, por ejemplo, alquilcarboniloxi-alquilo. En dichos grupos, los restos de alquileo tienen preferiblemente el contenido de átomos de carbono definido más adelante para los grupos alquilo. Los grupos arilo preferidos incluyen fenilo y compuestos heteroaromáticos monocíclicos de 5-7

miembros, especialmente fenilo, y dichos grupos pueden estar en sí opcionalmente sustituidos.

Los grupos R¹ de alquilo sustituido representativos incluyen los grupos alcoximetilo, alcoxiétilo, y alcoxipropilo o los grupos aciloximetilo, aciloxietilo y aciloxipropilo, por ejemplo, pivaloiloximetilo.

5 Los ésteres de ALA preferidos para uso como agentes fotosensibilizadores de acuerdo con el invento incluyen aquellos en que R¹ representa un grupo alquilo no sustituido y/o cada R² representa un átomo de hidrógeno.

10 Como aquí se usa, el término "alquilo" incluye cualquier grupo hidrocarbonado alifático saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada y cadena larga o corta. Los grupos alquilo insaturados pueden ser monoinsaturados o poliinsaturados e incluyen grupos tanto alqueno como alquino. Dichos grupos pueden contener hasta 40 átomos de carbono. Sin embargo, se prefieren los grupos alquilo que contienen hasta 10, por ejemplo 8, más preferiblemente hasta 6 y especialmente y preferiblemente hasta 4, átomos de carbono.

Se puede hacer una particular mención del éster metílico de ALA, el éster etílico de ALA, el éster propílico de ALA, el éster hexílico de ALA, el éster heptílico de ALA y el éster octílico de ALA, y sales de los mismos, que representan agentes fotosensibilizadores preferidos para uso de acuerdo con el invento.

15 Necesariamente, el agente fotosensibilizador es puesto en contacto con una célula antes de la irradiación. Sin embargo, a diferencia de la molécula de transferencia, este agente debería ser administrado suficientemente antes de la irradiación para que en la irradiación dicho agente se hubiera incorporado a un compartimento intracelular. De este modo, dicho agente se aplica convenientemente de 1 a 72 horas antes de la irradiación, por ejemplo, de 4 a 48, por ejemplo, de 4 a 24, horas antes de la irradiación. De nuevo, como se discutió anteriormente con respecto a la
20 operación de poner la molécula de transferencia en contacto con las células, la regulación temporal de la administración del agente fotosensibilizador para que alcance el contacto con la célula diana en relación con el momento de la irradiación dependerá del tiempo que tarde el agente fotosensibilizador en alcanzar las células diana y ser incorporado por ellas. Este tiempo puede variar dependiendo de si los métodos se llevan a cabo *in vitro* o *in vivo* y de si la administración se dirige al tejido diana o es en un sitio distal. En todos los casos, es importante que el agente fotosensibilizador haya sido incorporado por las células diana antes de que tenga lugar la irradiación. Dicho agente puede ser mantenido inmediatamente en contacto con dichas células hasta la irradiación, por ejemplo, durante 1 o 4 a
25 72 horas, preferiblemente 4 a 24 horas, por ejemplo, 12 a 20 horas, o puede ser retirado del contacto inmediatamente antes de la irradiación, por ejemplo, durante más de 5 minutos, por ejemplo, durante 10 minutos a 8 horas, por ejemplo, de 1 hora a 4 horas, en medio exento de agente.

30 Opcionalmente, uno o el otro del agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia que se van a introducir en las células, o ambos, se pueden fijar a, o asociar con, o conjugar con, una o más moléculas vehiculares, moléculas para transporte dirigido o vectores que pueden actuar para facilitar o aumentar la incorporación del agente fotosensibilizador o la molécula de transferencia o pueden actuar para dirigir o suministrar estos elementos a un tipo celular, tejido o compartimento intracelular particular. Los ejemplos de sistemas vehiculares incluyen polilisina u otros policationes, sulfato de dextrano, diferentes lípidos catiónicos, liposomas, partículas de LDL reconstituidas, liposomas
35 estéricamente estabilizados y partículas de adenovirus. En general, estos sistemas vehiculares pueden mejorar la farmacocinética y aumentar la incorporación celular de la molécula de transferencia y/o el agente fotosensibilizador y pueden además dirigir la molécula de transferencia y/o el agente fotosensibilizador a compartimentos intracelulares que son especialmente beneficiosos para obtener una internalización fotoquímica, pero no tienen generalmente la capacidad para el transporte dirigido de la molécula de transferencia y/o el agente fotosensibilizador a células (por ejemplo, células cancerosas) o tejidos específicos. Sin embargo, para conseguir dicho transporte dirigido específico o selectivo, las moléculas vehiculares, la molécula de transferencia y/o el fotosensibilizador se pueden asociar o conjugar con moléculas específicas para transporte dirigido que promoverán la incorporación celular específica de la molécula de transferencia a células o tejidos deseados. Dichas moléculas para transporte dirigido pueden también
40 dirigir la molécula de transferencia a compartimentos intracelulares que son especialmente beneficiosos para obtener una internalización fotoquímica.

Se pueden emplear muchas moléculas para transporte dirigido diferentes, como se describe en, por ejemplo, D. T. Curiel (1999), Ann. New York Acad. Sci. 886, 158-171; G. Bilbao et al. (1998) en Gene Therapy of Cancer (redactado por Walden et al., Plenum Press, New York); K. W. Peng y S. J. Russell (1999), Curr. Opin. Biotechnol. 10, 454-457; y T. J. Wickham (2000), Gene Ther. 7, 110-114.

50 Se puede asociar, unir o conjugar la molécula vehicular y/o la molécula para transporte dirigido con la molécula de transferencia o el agente fotosensibilizador, o con ambos, y se pueden utilizar los mismos o diferentes vehículos o moléculas para transporte dirigido. Si, por ejemplo, se usan partículas de adenovirus como vehículos, se pueden incorporar entonces las moléculas de transferencia a las partículas de adenovirus. Por ejemplo, si la molécula de transferencia en cuestión es una molécula de DNA que codifica una proteína o una molécula de RNA, se incorpora entonces el DNA al vector vírico y, después de la internalización fotoquímica, la molécula de DNA estará presente en la localización intracelular correcta para que pueda tener lugar la expresión de la molécula codificada.

La expresión de dichas moléculas puede ser controlada al diseñar el vector mediante métodos bien conocidos y documentados en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar elementos reguladores tales como, por ejemplo, promoto-

res tisularmente específicos o regulables para obtener una expresión específica o regulable para el tejido o la enfermedad. Por ejemplo, se puede usar el promotor de tirosinasa específica de melanoma, un promotor tisularmente específico. Promotores regulables tales como los promotores regulados por tetraciclina son bien conocidos. En I. R. Hart, 1996, *Semin. Oncol.* **23**, 154-158; D. E. Hallahan et al., 1995, *Nature Med.* **1**, 786-791; M. C. Luna et al., 2000, *Cancer Res.* **60**, 1637-1644; N. Miller y J. Whelan, 1997, *Hum. Gene Ther.*; T. J. Wickham, 2000, *Gene Ther.* **7**, 110-114; D. M. Nettelbeck y J. V. Muller, 2000, *Trends Genet.* **16**, 174-181; T. Clackson, 2000, *Gene Ther.* **7**, 120-125; S. Freundlieb et al., 1999, *J. Gene Med.* **1**, 4-12; M. A. Spear, 1998, *Anticancer Res.* **18**, 3223-31, D. M. Harvey y C. T. Caskey, 1998, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 512-518; B. M. Clary y H. K. Lyerly, 1998, *Surg. Oncol. Clin. North Am.* **7**, 565-574; M. C. Luna et al., *Cancer Res.* **60**, 1637-1644; y las referencias allí citadas, se pueden hallar más ejemplos de promotores específicos o regulados que se pueden emplear en el presente invento.

Como se mencionó anteriormente, se pueden usar simultáneamente más de un vehículo y/o molécula para transporte dirigido o vector. Por ejemplo, se pueden proporcionar vectores en un vehículo; por ejemplo, se pueden transportar vectores víricos, tales como adenovirus, en, por ejemplo, un liposoma o una estructura policatiónica.

Los vehículos y vectores preferidos para uso en el presente invento, particularmente para uso junto con la molécula de transferencia, incluyen adenovirus, policationes tales como polilisina (por ejemplo, poli-L-lisina o poli-D-lisina), polietilenimina o dendrímeros (por ejemplo, dendrímeros catiónicos tales como SuperFect®); lípidos catiónicos tales como DOTAP y Lipofectin; péptidos y vectores dirigidos tales como, por ejemplo, transferrina-polilisina y vectores adenovíricos dirigidos. En una realización particularmente preferida del invento, el vehículo es un adenovirus.

Dichas moléculas para transporte dirigido o vehículos como los anteriormente descritos pueden ser también utilizados para dirigir la molécula de transferencia a compartimentos intracelulares particulares especialmente beneficiosos para el empleo de la PCI, tales como, por ejemplo, lisosomas o endosomas.

El compartimento intracelular restringido por membrana puede ser cualquier compartimento que esté presente en una célula. Preferiblemente, el compartimento será una vesícula de membrana, especialmente un endosoma o un lisosoma. Sin embargo, el compartimento intracelular puede también incluir el aparato de Golgi o el retículo endoplásmico.

La operación de irradiación lumínica para activar el agente fotosensibilizador puede tener lugar de acuerdo con técnicas y procedimientos bien conocidos en este campo técnico. Por ejemplo, se pueden seleccionar la longitud de onda y la intensidad de la luz de acuerdo con el agente fotosensibilizador usado. Las fuentes lumínicas adecuadas son bien conocidas en la técnica. El tiempo durante el cual se exponen las células a la luz en los métodos del presente invento puede variar. Parece que la eficacia de la internalización de la molécula de transferencia en el citosol aumenta con una exposición aumentada a la luz. El periodo de tiempo preferido para la operación de irradiación depende del fotosensibilizador, la cantidad de fotosensibilizador acumulada en las células o tejidos diana y la superposición entre el espectro de absorción del fotosensibilizador y el espectro de emisión de la fuente lumínica. Generalmente, el periodo de tiempo para la operación de irradiación es del orden de minutos a varias horas, por ejemplo, preferiblemente hasta 60 minutos, por ejemplo, de 0,5 o 1 a 30 minutos, por ejemplo, de 0,5 a 3 minutos o de 1 a 5 minutos o de 1 a 10 minutos, por ejemplo, de 3 a 7 minutos, y preferiblemente de aproximadamente 3 minutos, por ejemplo, de 2,5 a 3,5 minutos. Las dosis lumínicas apropiadas pueden ser seleccionadas por una persona experta en la técnica y dependerán de nuevo del fotosensibilizador y de la cantidad de fotosensibilizador acumulada en las células o tejidos diana. Por ejemplo, las dosis lumínicas típicamente utilizadas para el tratamiento fotodinámico de cánceres con el fotosensibilizador Photofrin y el precursor de protoporfirina ácido 5-aminolevulínico están en el intervalo de 50-150 J/cm² con un intervalo de fluencia inferior a 200 mW/cm² con objeto de evitar una hipertermia. Las dosis lumínicas son normalmente menores cuando se usan fotosensibilizadores con mayores coeficientes de extinción en la zona roja del espectro visible. Sin embargo para el tratamiento de tejidos no cancerosos con menos fotosensibilizador acumulado, la cantidad total de luz necesaria puede ser sustancialmente mayor que para el tratamiento de cánceres.

Determinar las dosis apropiadas de moléculas diana para uso en los métodos del presente invento es una práctica rutinaria para una persona experta en la técnica. Cuando la molécula de transferencia es una proteína o un péptido, para aplicaciones *in vitro* las moléculas de transferencia se utilizarían generalmente en dosis inferiores a 5 mg/ml (por ejemplo, 0,1-5 mg/ml) y para aplicaciones *in vivo* las moléculas de transferencia se utilizarían generalmente en dosis inferiores a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,1-5 mg/kg). Cuando la molécula de transferencia es un ácido nucleico, para aplicaciones *in vitro* una dosis ejemplar de las moléculas de transferencia sería aproximadamente 0,1-50 µg de ácido nucleico por 10⁴ células y para aplicaciones *in vivo* sería aproximadamente 10⁻⁶-1 g de ácido nucleico por inyección en seres humanos. Cuando la molécula de transferencia está asociada con un vehículo de adenovirus, para aplicaciones *in vitro* una dosis ejemplar sería 1-1x10⁵ partículas víricas físicas, por ejemplo, 1x10³-1x10⁵ partículas por célula, y para aplicaciones *in vivo* la molécula que se va a introducir en asociación con el vehículo adenovírico puede estar presente en una concentración de 1x10⁻⁹ a 50%, tal como de 3x10⁻⁶ a 50%, por ejemplo, de 0,003 a 30%, por ejemplo, de 0,2 a 10% (peso/peso) de partículas víricas en la composición final para uso *in vivo*, en que peso/peso se refiere al peso del vehículo vírico además del de la molécula que se va a introducir con respecto al peso de la composición final. Si se utiliza en inyecciones de 1 ml, esto correspondería a una dosis de aproximadamente 10⁵ a 10¹⁵ partículas víricas físicas.

Los métodos del invento darán inevitablemente lugar a cierta muerte celular en virtud del tratamiento fotoquímico, es decir, por medio de la acción del agente fotosensibilizador. Sin embargo, esta muerte celular no importa y puede ser realmente ventajosa para muchas de las aplicaciones (por ejemplo, el tratamiento de un cáncer), y los métodos del invento pueden ser modificados para que la fracción o proporción de las células supervivientes sea regulada seleccionando la dosis lumínica en relación con la concentración del agente fotosensibilizador. De nuevo, dichas técnicas son conocidas en este campo técnico. Independientemente de la cantidad de muerte celular provocada por el tratamiento fotoquímico puro, es importante que la dosis lumínica sea regulada para que algunas de las células individuales en que se manifiesta el efecto de la PCI no resulten muertas por el tratamiento fotoquímico puro (aunque puedan ser posteriormente muertas a causa del efecto de la PCI).

En ciertas aplicaciones puede resultar apropiado conservar un número mayor de células viables después del tratamiento por PCI. Por ejemplo, en la vacunación y algunos métodos de terapia génica, es importante tener células viables que permitan, por ejemplo, presentación antigénica o expresión proteica. En tales aplicaciones, es apropiado que no resulte muerta una población o pluralidad de células, sustancialmente todas las células, ni una mayoría significativa (por ejemplo, al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 60, 70, 80 o 90% de las células). Por supuesto, esto no siempre es deseable, especialmente cuando se utiliza la PCI para introducir moléculas de transferencia citotóxicas y no resulta desventajoso que haya más muerte celular. Sin embargo, también se pueden alcanzar efectos citotóxicos utilizando, por ejemplo, una terapia génica mediante la cual se internaliza un gen terapéutico en células tumorales mediante el método del invento para que, por ejemplo, estas células produzcan sustancias inmunológicamente activas que provoquen la muerte inmunológica local de las células cancerosas restantes o provoquen una respuesta inmune sistémica hacia las células tumorales. En dichos casos, después del tratamiento por PCI se requiere evidentemente una proporción de células viables.

Las ventajas de los métodos presentes y la secuencia de operaciones de tratamiento, especialmente las realizaciones en que se añade la molécula de transferencia a las células después de la operación de irradiación lumínica, en comparación con los métodos previamente descritos son:

- a) el daño fotoquímico a la molécula de transferencia resulta disminuido;
- b) simplificación del tratamiento de lesiones internas por PCI en combinación con cirugía ya que el tratamiento fotoquímico puede ser llevado a cabo después de la exposición quirúrgica de la lesión, seguido, por ejemplo, de la inyección intratumoral u otra administración local de la molécula de transferencia;
- c) los métodos son más independientes de la regulación temporal exacta del tratamiento, es decir, de la regulación temporal de la adición de la molécula que va a ser incorporada por las células con respecto al punto temporal de la irradiación. Esto significa que hay "una ventana de tiempo" más grande para el tratamiento. Esto es importante ya que la incorporación de una molécula terapéutica puede variar ampliamente en diferentes situaciones clínicas y, además, es difícil estimar la incorporación para lesiones individuales en una situación clínica, lo que hace que, por lo tanto, una ventana de tiempo más grande sea sumamente ventajosa;
- d) tiene lugar una rápida translocación de la molécula de transferencia al citosol, por lo que disminuyen sustancialmente las posibilidades de degradación lisosómica de la molécula de transferencia.

Estas ventajas son además de las ventajas asociadas con los métodos de internalización de moléculas por PCI *per se*, es decir: 1) no hay restricción alguna en cuanto al tamaño de la molécula que se va a internalizar y distribuir al citosol con tal de que la molécula pueda ser endocitada por la célula diana; 2) los métodos no dependen de la proliferación celular; 3) los métodos son específicos del sitio ya que sólo resultan afectadas las zonas expuestas a la luz; 4) no es oncogénico.

Las operaciones de "poner en contacto" las células con un agente fotosensibilizador y con la molécula de transferencia pueden ser llevadas a cabo de cualquier modo conveniente o deseado. De esta manera, si la operación de puesta en contacto va a ser llevada a cabo *in vitro*, las células pueden ser convenientemente mantenidas en un medio acuoso tal como, por ejemplo, un medio para cultivo celular apropiado, y, en el punto temporal apropiado, se puede añadir simplemente el agente fotosensibilizador o la molécula de transferencia al medio bajo unas condiciones apropiadas, por ejemplo, en una concentración apropiada y durante un periodo de tiempo apropiado.

El agente fotosensibilizador es puesto en contacto con las células en una concentración apropiada y durante un periodo de tiempo apropiado, los cuales pueden ser fácilmente determinados por una persona experta usando técnicas rutinarias y dependerán del agente fotosensibilizador particular usado y el tipo celular. La concentración del agente fotosensibilizador debe ser tal que, una vez incorporado a la célula, por ejemplo, a, o asociado con, uno o más de sus compartimentos intracelulares, y activado por irradiación, se rompan una o más estructuras celulares, por ejemplo, se lisen o rompan uno o más compartimentos intracelulares. Por ejemplo, los agentes fotosensibilizadores usados en los presentes Ejemplos se pueden utilizar en una concentración de, por ejemplo, 10 a 50 µg/ml. Para uso *in vitro*, el intervalo puede ser mucho más amplio, tal como, por ejemplo, 0,05-500 µg/ml. Para tratamientos *in vivo* a seres humanos, el agente fotosensibilizador puede ser utilizado en el intervalo de 0,05-20 mg/kg de peso corporal cuando se administra sistémicamente o de 0,1-20% en un disolvente para aplicación tópica. En animales más pequeños, el intervalo de concentraciones puede ser diferente y puede ser consecuentemente ajustado.

El tiempo de incubación de las células con el agente fotosensibilizador (es decir, el tiempo de "contacto") puede variar de unos pocos minutos a varias horas, por ejemplo, incluso hasta 48 horas o más. El tiempo de incubación debería ser tal que el agente fotosensibilizador resultara incorporado por las células apropiadas.

- 5 La incubación de las células con el agente fotosensibilizador puede ir opcionalmente seguida de un periodo de incubación con medio exento de fotosensibilizador antes de que las células sean expuestas a la luz o se añada la molécula de transferencia.

10 La molécula de transferencia puede ser cualquier molécula como las anteriormente discutidas y es puesta en contacto con las células en una concentración apropiada y durante un periodo de tiempo apropiado. Sorprendentemente, se ha hallado que se puede iniciar el contacto incluso varias horas después de la irradiación. Se puede determinar una concentración apropiada dependiendo de la eficacia de la incorporación de la molécula en cuestión a las células en cuestión y de la concentración final que se desea alcanzar en las células. De este modo, el "tiempo de transfección" o "tiempo de incorporación celular", es decir, el tiempo durante el cual las moléculas están en contacto con las células, puede ser unos pocos minutos o hasta unas pocas horas; por ejemplo, se puede utilizar un tiempo de transfección de 10 minutos hasta 24 horas, por ejemplo, de 30 minutos hasta 10 horas o, por ejemplo, de 30 minutos hasta 2 horas o 6 horas. Un tiempo de transfección aumentado da normalmente lugar a una incorporación aumentada de la molécula en cuestión. Sin embargo, parece que los tiempos de incubación más cortos, por ejemplo, de 30 minutos a 1 hora, dan lugar a una especificidad mejorada de la incorporación de la molécula. Por lo tanto, al seleccionar un tiempo de transfección para cualquier método, se debe llegar a un equilibrio apropiado entre obtener una suficiente incorporación de la molécula y mantener una suficiente especificidad de incorporación.

20 *In vivo*, un método y un tiempo de incubación apropiados mediante los cuales se pongan en contacto las moléculas de transferencia y los agentes fotosensibilizadores con las células diana dependerán del modo de administración y del tipo de molécula de transferencia y de agentes fotosensibilizadores. Por ejemplo, si la molécula de transferencia se inyecta en un tumor que va a ser tratado, las células próximas al punto de inyección entrarán en contacto con, y, por lo tanto, tenderán a incorporar, la molécula de transferencia más rápidamente que las células situadas a una mayor distancia del punto de inyección, siendo probable que éstas entren en contacto con la molécula de transferencia en un punto temporal posterior y en menor concentración. Además, una molécula de transferencia administrada por inyección intravenosa puede tardar cierto tiempo en llegar a las células diana y, por lo tanto, puede durar más el tiempo posterior a la administración, por ejemplo, varios días, para que se acumule una cantidad suficiente u óptima de la molécula de transferencia en una célula o tejido diana. Por supuesto, se aplican las mismas consideraciones al tiempo de administración requerido para la incorporación del agente fotosensibilizador a las células. De este modo, es probable que el tiempo de administración requerido para células individuales *in vivo* varíe dependiendo de estos y otros parámetros.

35 No obstante, aunque la situación *in vivo* es más complicada que *in vitro*, el concepto subyacente del presente invento es aún el mismo, es decir, el momento en que las moléculas entran en contacto con las células diana debe ser tal que, antes de que tenga lugar la irradiación, una cantidad apropiada del agente fotosensibilizador debe haber sido incorporada por las células diana, y: o bien (i) la molécula de transferencia está siendo incorporada durante la irradiación, o bien (ii) después de la irradiación, la molécula de transferencia está en contacto con las células durante un periodo de tiempo suficiente para permitir su incorporación a las células.

40 El término "célula" se usa aquí para incluir todas las células eucarióticas (incluyendo células de insectos y células fúngicas). Las "células" representativas incluyen así todos los tipos de células de animales mamíferos y no mamíferos, células vegetales, células de insectos, células fúngicas y protozoos.

Los métodos del presente invento pueden ser utilizados *in vitro* o *in vivo*, sea por tratamiento *in situ* (por ejemplo, utilizando componentes para transporte dirigido) o sea por tratamiento *ex vivo* seguido de la administración de las células tratadas al organismo.

45 Los métodos del presente invento pueden ser usados, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer. Diversos fotosensibilizadores se acumulan preferentemente en tejidos neoplásicos, siendo normalmente la selectividad para un tumor con respecto al tejido circundante un factor de 2-3, pero, en ciertos casos, tales como para tejidos cerebrales, este factor puede ser mayor, es decir, de hasta 30. Alternativamente, se puede dirigir un agente fotosensibilizador particular a un tumor particular mediante los métodos anteriormente descritos. Además, moléculas que pueden ser de interés clínico para el tratamiento del cáncer pero están restringidas por falta de incorporación o poca incorporación al citosol pueden ser introducidas en el citosol y dirigidas a células específicas por medio del presente invento. Como se ejemplifica más adelante, la gelonina es un ejemplo de dicha molécula. Se pueden usar otras moléculas, solas o enlazadas con otras moléculas que dirigen la molécula que se va a internalizar a una célula particular (por ejemplo, anticuerpos, transferrina, fotosensibilizadores, y apoB sobre partículas de LDL reconstituidas). Las ventajas de dicho tratamiento de combinación serían: 1) un efecto citotóxico potenciado en capas más profundas de los tejidos tumorales ya que dosis bajas y subtóxicas de luz son suficientes para la rotura de lisosomas y endosomas; y 2) una especificidad potenciada del tratamiento ya que sólo se administra la PCI a la zona tumoral.

Los métodos del invento pueden ser también usados para tratar otros diversos trastornos, como viene dictado por la selección de la molécula que se va a introducir en la célula, tales como artritis reumatoide, arteriosclerosis y otras

enfermedades cardiovasculares, infecciones víricas y otras infecciones, psoriasis, queratosis actínica, cicatrización de heridas, cicatrización de fracturas, verrugas y trastornos genéticos heredados tales como fibrosis quística, síndrome de Gorlin y ataxia telangiectasia.

Los métodos del invento pueden ser también utilizados en terapia génica, es decir, la transferencia terapéutica de genes a células de un paciente. La terapia génica es prometedora como método para tratar muchas enfermedades, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, infecciones víricas, trastornos monogénicos tales como fibrosis quística y muchos otros estados tales como los anteriormente descritos. Hoy en día, un problema significativo en la terapia génica es la eficacia y la especificidad elevadas de la transferencia génica que debe tener lugar *in vivo*. En los métodos actuales se usan muchos vehículos o vectores diferentes para llevar a cabo la transferencia génica en terapia génica. Se pueden mencionar compuestos policationicos, lípidos catiónicos y sistemas víricos como ejemplos, pero hasta ahora la terapia génica *in vivo* ha tenido poco éxito. Entre los muchos inconvenientes conocidos de los métodos actuales están la baja estabilidad sérica del vector, la especificidad limitada en la distribución de genes, la baja eficacia en la distribución de genes, etc. Los métodos de PCI del presente invento proporcionan un medio para mejorar sustancialmente tanto la eficacia como la especificidad de muchos de los métodos de distribución génica actualmente empleados en terapia génica, al mejorar la fase de liberación endosómica, la cual puede ser limitante de la eficacia tanto para muchos vectores sintéticos de distribución génica como para diversos sistemas víricos. El tratamiento lumínico inherente al método de PCI también hace posible definir precisamente donde debe tener lugar en el organismo la transferencia génica potenciada, ya que el aumento de eficacia de la transferencia génica sólo tendrá lugar en zonas irradiadas. La transfección puede ser llevada a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* (administrándose células o tejidos al paciente cuando es apropiado). Preferiblemente, los vehículos y vectores adecuados para la transfección incluyen adenovirus, policationes tales como polilisina (por ejemplo, poli-D-lisina o poli-L-lisina), SuperFect®, polietilenimina o dendrímeros; lípidos catiónicos tales como DOTAP y Lipofectin y lípidos catiónicos formulados con un "lípidos auxiliar" tal como DOPE; péptidos, y vectores dirigidos tales como, por ejemplo, transferrina-polilisina y vectores adenovíricos dirigidos. En una realización preferida del invento, el vehículo usado para el gen terapéutico es un adenovirus.

Otro aspecto preferido del presente invento es utilizar sistemas vehiculares no víricos tales como, por ejemplo, polímeros catiónicos, incluyendo lípidos catiónicos y péptidos. Los polímeros típicos incluyen, por ejemplo, poliamina, poliaminoácidos que incluyen poliaminoácidos básicos, polímeros de azúcar catiónicos sintéticos y naturales, polímeros de metacrilato, dendrímeros, polialquileniminas y otros polímeros conocidos en la técnica por ser útiles en la distribución de fármacos, especialmente polímeros útiles en distribución génica. Los compuestos típicos, útiles de acuerdo con el presente invento, incluyen polilisina, poliarginina, poli(ácido L-glutámico), polivinilpiridina, quitosán, polietilenimina, poli[metacrilato de (2-dimetilamino)etilo], histonas, protamina, poli(L-ornitina), avideno, espermina, espermidina y cualquier derivado de los mismos. En un aspecto preferido del presente invento, los polímeros aquí descritos pueden ser combinados con otros polímeros o combinados con otros sistemas para distribución génica. Por ejemplo, R. I. Mahato et al. en *Advances in Genetics* (redactado por J. C. Hall et al.) (1999) 41, 95-156, describen un sistema no vírico para distribución génica, útil de acuerdo con el presente invento. M. C. Garnett en *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* (1999) 16, 147-207, K. A. Howard et al. en *Biochimica et Biophysica Acta* (2000) 1475, 245-255, H. K. Nguyen et al. en *Gene Therapy* (2000) 7, 126-138, A. Bragonzi et al. en *J. Controlled Release* (2000) 65, 187-202, S. C. DeSmedt et al. en *Pharmaceutical Research* (2000) 17, 113-126, y R. I. Mahato en *J. Drug Targeting* (1999) 7, 249-268, describen adicionalmente polímeros catiónicos.

Otro aspecto del presente invento implica el uso de liposomas u otras construcciones de base lipídica como sistemas vehiculares no víricos. Los liposomas pueden ser liposomas sensibles al pH o liposomas no sensibles al pH. Los liposomas sensibles al pH consisten en al menos un componente sensible al pH en la membrana del liposoma. Los compuestos típicos incluyen ácidos grasos tales como ácido oleico, palmitoilhomocisteína, colesterol, sal de hemisuccinato y morfina, y dioleilsuccinilglicerol. Además de los componentes sensibles al pH, los liposomas pueden consistir en dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) y/o otros fosfolípidos similares.

Los liposomas u otro sistema de base lipídica para distribución contienen preferiblemente al menos un lípido catiónico.

El sistema de base lipídica para distribución puede estar presente en diversos tipos de formulación acuosa. Para estas formulaciones, en la bibliografía se utilizan diversos términos y expresiones: liposomas multilaminares, liposomas unilaminares, liposomas sensibles al pH, nanoemulsiones, nanopartículas, proteoliposomas, virosomas, quimerasomas, coquelatos, Lipofectin® y Lipoplex. Las referencias al uso de lípidos catiónicos en transferencia génica incluyen P. L. Felgner et al. en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987), 84, 7413-7417, D. D. Lasic et al. en *Adv. Drug Del. Rev.* (1996), 20, 221-266, L. G. Barron et al. en *Gene Therapy* (1999), 6, 1179-1183, S. Kawakami et al. en *Pharmaceutical Research* (2000), 17, 306-313, N. S. Templeton et al. en *Molecular Biotechnology* (1999), 11, 175-180, Y. Zou et al. en *Cancer Gene Therapy* (2000), 7, 683-696, D. D. Stuart et al. en *Biochemistry et Biophysica Acta* (2000), 1463, 219-229, R. I. Mahato et al. en *Drug Deliv.* (1997), 4, 151, y R. J. Lee et al. en *Crit. Rev. Drug Carrier Syst.* (1997), 14, 173.

En, por ejemplo, los Documentos US 6.120.751, US 6.056.938, US 6.093.816, US 6.039.936, US 6.034.137, US 6.034.135, US 6.020.526, US 5.980.935, US 5.958.935, US 5.935.936, US 5.877.220, US 5.830.430, US 5.777.153, US 5.705.693, US 5.459.127, US 5.334.761, US 5.264.618 y las referencias en ellos citadas se describen lípidos

útiles de acuerdo con el presente invento.

Los ejemplos típicos de lípidos catiónicos incluyen cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOT-MA), bromuro de 1,2-dimiristil-oxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamino)propano (DOTAP), 3 β -(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil-colesterol (DC-Col), trifluoroacetato de 2,3-dioleil-oxi-N-(2-esperminacarboxilamido)etil-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), 3- β -(N⁴-espermina-carbamoil)-colesterol, 3- β -(N⁴-espermidina-carbamoil)-colesterol y dioctadecilamidoglicil-espermina (DOGS).

Como se describió anteriormente, en una de las realizaciones preferidas del invento el vehículo es lípidos catiónicos. Se ha comunicado previamente que el tratamiento fotoquímico ejerce un efecto inhibitor sobre la transfección mediada por lípidos catiónicos cuando se proporciona luz después de la molécula de transferencia [Prasmickaite et al. (2000), J. Gene Med. 6, en prensa]. Sin embargo, ahora se ha mostrado muy sorprendentemente que cuando se proporciona luz antes de la molécula de transferencia, la PCI puede ejercer un efecto estimulante sobre la transfección por lípidos catiónicos (véase el Ejemplo 9).

Además, otro aspecto del invento proporciona una composición que contiene una molécula de transferencia como la aquí definida y, separadamente, un agente fotosensibilizador como el aquí definido, como una composición combinada para uso separado o secuencial en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección, en que dicho agente fotosensibilizador y, separadamente, dicha molécula de transferencia se van a poner en contacto con células o tejidos de un paciente, y dichas células se van a irradiar con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, y la irradiación se va a llevar a cabo en un momento antes o en el mismo momento que la puesta en contacto de dicha célula con la molécula de transferencia, en que dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica. Opcionalmente, la molécula de transferencia y/o el agente fotosensibilizador de las composiciones se pueden asociar con moléculas vehiculares tales como las anteriormente descritas. Preferiblemente, las composiciones se usan para terapia del cáncer o terapia génica. Para terapia génica, una molécula vehicular preferida es un adenovirus. Otros vehículos preferidos son lípidos catiónicos.

Por lo tanto, en otro aspecto, el presente invento proporciona el uso de una molécula de transferencia y un agente fotosensibilizador, en que el agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia son como aquí se definen para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección, preferiblemente para terapia génica, estimular una respuesta inmune o tratar o prevenir un cáncer, en que dicho agente fotosensibilizador y, separadamente, dicha molécula de transferencia se van a poner en contacto con células o tejidos de un paciente, y dichas células se van a irradiar con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, y la irradiación se va a llevar a cabo en un momento antes o en el mismo momento que la puesta en contacto de dicha célula con la molécula de transferencia, en que dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica.

Como aquí se define, "tratamiento" se refiere a reducir, aliviar o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o infección que se está tratando, con respecto a los síntomas previos al tratamiento. "Prevención" se refiere a retrasar o prevenir el inicio de los síntomas de la enfermedad, trastorno o infección.

Como se mencionó previamente, dichos métodos también tienen aplicación en métodos de vacunación. En consecuencia, un aspecto más del invento proporciona un método *in vitro* para expresar o presentar una molécula antigénica (la molécula de transferencia) o parte de ella en la superficie de una célula, preferiblemente una célula presentadora de antígeno, en que dicho método comprende las operaciones anteriormente definidas. El correspondiente segundo uso médico es un aspecto más de este invento.

Como aquí se usa, "expresar" o "presentar" se refiere a la presencia de la molécula o parte de ella en la superficie de dicha célula para que al menos una porción de esa molécula quede expuesta y accesible al ambiente que rodea a esa célula. La expresión en la "superficie" puede ser llevada a cabo de modo que la molécula que se va a expresar esté en contacto con la membrana celular y/o con componentes que pueden estar presentes, o que se puede hacer que estén presentes, en esa membrana.

Preferiblemente, dicha presentación antigénica puede dar ventajosamente lugar a la estimulación de una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta inmune que confiera protección frente a la subsiguiente estimulación por un elemento que comprenda o contenga dicha molécula antigénica o parte de ella, y, consecuentemente, el invento encuentra una utilidad particular como un uso para vacunación. Por lo tanto, el presente invento proporciona preferiblemente un uso para vacunación que comprende el uso anteriormente descrito.

En este aspecto del invento, a la molécula de transferencia como aquí se define se hace referencia como "molécula antigénica". La molécula antigénica puede ser cualquier molécula, siendo esa molécula o una parte de ella capaz de estimular una respuesta inmune cuando se presenta al sistema inmune de un modo apropiado. Por lo tanto, la molécula antigénica será ventajosamente un antígeno de vacuna o componente de vacuna, tal como un elemento que contiene un polipéptido.

Muchos de dichos antígenos o componentes antigénicos de vacuna son conocidos en la técnica e incluyen toda clase de antígenos bacterianos o víricos o, en realidad, antígenos o componentes antigénicos de cualquier especie

patógena, incluyendo protozoos y organismos superiores. Además, aunque tradicionalmente los componentes antígenicos de vacunas han comprendido organismos completos (vivos, muertos o atenuados), es decir, vacunas de células completas, las vacunas de subunidades, es decir, las vacunas basadas en componentes antígenicos particulares de organismos, por ejemplo, proteínas o péptidos, o incluso hidratos de carbono, han sido ampliamente investigadas y presentadas en la bibliografía. Cualquiera de dichos componentes de vacuna basados en "subunidades" puede ser usado como la molécula antigénica del presente invento. Sin embargo, el invento encuentra una utilidad particular en el campo de las vacunas peptídicas. De este modo, una molécula antigénica preferida de acuerdo con el invento es un péptido (que se define aquí para incluir péptidos más cortos y más largos, es decir, péptidos, oligopéptidos y polipéptidos, y también moléculas proteínicas o fragmentos de las mismas, tales como, por ejemplo, péptidos de 5-500, por ejemplo, de 10 a 250, tal como de 15 a 75, o de 8 a 25, aminoácidos). Las partes de moléculas antigénicas que se presentan o expresan comprenden preferiblemente partes que son generadas mediante la maquinaria de la célula para procesamiento de antígenos. Sin embargo, las partes pueden ser generadas mediante otro medio, pudiéndose conseguir por medio de un apropiado diseño antigénico (por ejemplo, banda sensibles al pH) o a través de otro medio de procesamiento celular. Convenientemente, dichas partes tienen un tamaño suficiente para generar una respuesta inmune, tal como, por ejemplo, un tamaño superior a 5, por ejemplo, superior a 10 o 20, aminoácidos en el caso de péptidos.

Se ha propuesto un vasto número de candidatos a vacuna peptídica en la bibliografía, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades e infecciones víricas tales como gripe o infección por HIV/sida, parvovirus canino, virus de la leucemia bovina, hepatitis, etc. [véanse, por ejemplo, Phanuphak et al., *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 1997, 15 (1), 41-8; Naruse, *Hokkaido Igaku Zasshi* 1994, 69 (4), 811-20; Casal et al., *J. Virol.*, 1995, 69 (11), 7274-7; Belyakov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95 (4), 1709-14; Naruse et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91 (20), 9588-92; Kabeya et al., *Vaccine* 1996, 14 (12), 1118-22; Itoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83 (23), 9174-8. Similarmente, se pueden usar péptidos bacterianos, como en efecto se pueden usar antígenos peptídicos procedentes de otros organismos o especies.

Además de antígenos procedentes de organismos patógenos, se han propuesto también péptidos para uso como vacunas contra el cáncer u otras enfermedades tales como la esclerosis múltiple. Por ejemplo, péptidos de oncogenes mutantes siguen siendo muy prometedores como vacunas para el cáncer al actuar como antígenos en la estimulación de linfocitos T citotóxicos (Schirmacher, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1995, 121, 443-451; Curtis, *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, 1997, 17, 316-327). También se ha evaluado una vacuna peptídica sintética para el tratamiento del melanoma metastásico (Rosenberg et al., *Nat. Med.* 1998, 4 (3), 321-7). Wilson et al., *J. Neuroimmunol.* 1997, 76 (1-2), 15-28, han descrito una vacuna peptídica de receptor de células T para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Cualquiera de dichos componentes peptídicos de vacuna puede ser utilizado como molécula antigénica del invento, como en efecto puede serlo cualquiera de los péptidos descritos o propuestos como vacunas peptídicas en la bibliografía. De esta manera, el péptido puede ser sintético o aislado o, en otro caso, procedente de un organismo.

La célula que es sometida a los métodos, usos, etc. de este aspecto del invento puede ser cualquier célula que sea capaz de expresar, o presentar en su superficie, una molécula que es administrada o transportada a su citosol.

Puesto que la utilidad primaria de este aspecto del invento radica en presentación antigénica o vacunación, la célula es convenientemente una célula efectora inmune, es decir, una célula implicada en la respuesta inmune. Sin embargo, otras células también pueden presentar un antígeno al sistema inmune y caen también dentro del alcance de este aspecto del invento. De este modo, ventajosamente, las células de acuerdo con este aspecto son células presentadoras de antígeno. La célula presentadora de antígeno puede estar implicada en cualquier aspecto o "rama" de la respuesta inmune, incluyendo tanto la inmunidad humoral como la inmunidad mediada por células, tal como, por ejemplo, la estimulación de la producción de anticuerpos o la estimulación de células citotóxicas o asesinas, las cuales pueden reconocer y destruir (o, en cualquier caso, eliminar) células que expresan antígenos "extraños" en su superficie. La expresión "estimular una respuesta inmune" incluye así todos los tipos de respuestas inmunes y los mecanismos para estimularlas.

La estimulación de las células citotóxicas o las células productoras de anticuerpos requiere que las células presentadoras de antígeno presenten antígenos de una manera particular a la célula que se va a estimular, por ejemplo, la presentación del MHC de Clase I (por ejemplo, la activación de células T citotóxicas CD8⁺ requiere la presentación de antígenos por el MHC-1).

Las células presentadoras de antígeno son conocidas en la técnica y descritas en la bibliografía e incluyen, por ejemplo, linfocitos (tanto células T como B), células dendríticas, macrófagos, etc. Otras incluyen, por ejemplo, células cancerosas, tales como, por ejemplo, células de melanoma.

Para la presentación antigénica por una célula presentadora de antígeno a una célula T citotóxica (CTL; del inglés, *cytotoxic T lymphocyte*), es necesario que la molécula antigénica entre en el citosol de la célula presentadora de antígeno (Germain, *Cell*, 1994, 76, 287-299). El presente invento proporciona un medio eficaz de distribución de la molécula antigénica en el citosol.

Una vez liberada en el citosol celular mediante el proceso de internalización fotoquímica, la molécula antigénica

puede ser procesada por la maquinaria procesadora de antígenos de la célula y ser presentada en la superficie celular de un modo apropiado por, por ejemplo, el MHC de Clase I. Este procesamiento puede implicar una degradación del antígeno, por ejemplo, la degradación de un antígeno proteico o polipeptídico en péptidos, péptidos que se complejan luego con moléculas del MHC para su presentación. De esta manera, la molécula antigénica expresada o presentada en la superficie de la célula de acuerdo con el presente invento puede ser una parte o fragmento de la molécula antigénica que se incorpora a la célula.

Los antígenos pueden ser incorporados por las células presentadoras de antígeno mediante endocitosis y ser degradados hasta péptidos en las vesículas endocíticas. Estos péptidos pueden unirse a moléculas del MHC de Clase II en los endosomas y ser transportados a la superficie celular, donde el complejo de péptido-MHC de Clase II puede ser reconocido por células cooperadoras T CD4+ y provocar una respuesta inmune. Alternativamente, proteínas del citosol pueden ser degradadas en partes de las mismas, por ejemplo, mediante proteosomas, y ser transportadas al retículo endoplásmico por medio de un transportador asociado con la presentación de antígenos (TAP), donde los péptidos pueden unirse a moléculas del MHC de Clase I y ser transportados a la superficie celular, como se ilustra en la Figura 1 (Yewdell y Bennink, 1992, Adv. Immunol. 52: 1-123). Si el péptido es un antígeno de origen extraño, el complejo de péptido-MHC de Clase I será reconocido por células T citotóxicas (CTLs) CD8+. Las CTLs se unirán al complejo de péptido-MHC (HLA) de Clase I y, por ello, se activarán, comenzarán a proliferar y formarán un clon de CTLs. La célula diana y otras células diana con el mismo complejo de péptido-MHC de Clase I en su superficie pueden ser matadas por el clon de CTLs. Se puede establecer una inmunidad frente al antígeno extraño si se puede introducir una cantidad suficiente del antígeno en el citosol (Yewdell y Bennink, 1992, *supra*; Rock, 1996, Immunology Today 17: 131-137). Ésta es la base para el desarrollo de, *inter alia*, vacunas contra el cáncer. Uno de los mayores problemas prácticos es introducir cantidades suficientes de antígenos (o partes del antígeno) en el citosol. Esto puede ser resuelto de acuerdo con el presente invento mediante una PCI.

Las composiciones también pueden comprender una célula que contenga una molécula de transferencia que se haya internalizado en el citosol de dicha célula mediante un método del invento, para uso en terapia, particularmente terapia contra el cáncer, terapia génica y vacunación.

De este modo, se describe una célula o una población de células que contiene una molécula de transferencia que se ha internalizado en el citosol de dicha célula, célula que es obtenible mediante un método del presente invento.

Se describe el uso de dicha célula o población de células para la preparación de una composición o un medicamento para uso en terapia, preferiblemente terapia contra el cáncer, terapia génica o vacunación.

Se describe un método de tratamiento de un paciente, que comprende administrar células o composiciones del presente invento a dicho paciente, es decir, un método que comprende las operaciones de introducir una molécula en una célula del modo anteriormente descrito y administrar dicha célula así preparada a dicho paciente. Dichos métodos pueden ser utilizados para tratar el cáncer, en terapia génica o para vacunación.

In vivo, se puede usar cualquier modo de administración común o corriente en la técnica, tal como, por ejemplo, inyección, infusión, administración tópica, tanto a superficies corporales internas como externas, etc. Para uso *in vivo*, se puede usar el invento en relación con cualquier tejido que contenga células en las que se localicen el agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia, incluyendo localizaciones en fluidos corporales, así como tejidos sólidos. Se pueden tratar todos los tejidos con tal de que el fotosensibilizador sea incorporado por las células diana y se pueda suministrar apropiadamente la luz.

De este modo, las composiciones y medicamentos del invento se pueden formular de cualquier modo conveniente de acuerdo con técnicas y procedimientos conocidos en el campo farmacéutico usando, por ejemplo, uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Como aquí se hace referencia, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a ingredientes que son compatibles con otros ingredientes de la composición o medicamento así como fisiológicamente aceptables para el receptor. La naturaleza de la composición o medicamento y de los vehículos o materiales excipientes, las dosificaciones, etc. se pueden seleccionar de forma rutinaria de acuerdo con la elección y la vía deseada de administración, la finalidad del tratamiento, etc. Asimismo, las dosificaciones pueden ser determinadas de forma rutinaria y pueden depender de la naturaleza de la molécula, la finalidad del tratamiento, la edad del paciente, el modo de administración, etc. En relación con el agente fotosensibilizador, también se debería tener en cuenta la potencia/capacidad para romper membranas tras la irradiación.

El invento será ahora descrito con mayor detalle en los Ejemplos no restrictivos siguientes con referencia a los dibujos siguientes, en que:

La Figura 1 muestra la transfección, provocada por luz, de células THX con un complejo de pEGFP-N1/polilisina, en que las células son puestas en contacto con el complejo de pEGFP-N1/polilisina antes o después de que las células hayan sido expuestas a luz, como se indica en la Figura.

La Figura 2 muestra la transfección, provocada por luz, de células HCT-116 con un complejo de pEGFP-N1/polilisina, en que las células son puestas en contacto con el complejo de pEGFP-N1/polilisina antes o después de que las células hayan sido expuestas a luz, como se indica en la Figura.

La Figura 3 muestra el tratamiento, provocado por luz, de células THX con gelonina y, de este modo, una reducción de la síntesis de proteínas, en que las células son puestas en contacto con la molécula de gelonina antes o después de que las células hayan sido expuestas a luz, como se indica en la Figura.

5 La Figura 4 muestra el efecto, sobre la eficacia de la transfección de células THX provocada por luz, de la puesta en contacto de las células con el complejo de pEGFP-N1/polilisina inmediatamente después de la exposición a la luz y en puntos temporales posteriores después de la exposición a la luz.

La Figura 5 muestra el efecto sobre la eficacia de la transfección de células THX provocada por luz cuando las células son puestas en contacto con el complejo de pEGFP-N1/polilisina, en diversos puntos temporales antes y después de la exposición a la luz.

10 La Figura 6 muestra el efecto sobre la transfección de células THX provocada por luz cuando las células son puestas en contacto con el complejo de pEGFP-N1/polilisina durante diversos periodos de tiempo después de la exposición a la luz.

La Figura 7 muestra una representación esquemática de un modelo potencial mediante el cual puede funcionar el presente invento.

15 A. El fotosensibilizador S es endocitado (I) y va a parar a vesículas intracelulares (II). Estas vesículas se rompen tras la exposición a la luz (III).

B. Después del tratamiento fotoquímico, como se describe en A, las células son tratadas con una molécula M que es endocitada y va a parar a vesículas intracelulares. Estas vesículas se fusionarán con vesículas fotoquímicamente dañadas, y la molécula M se liberará en el citosol.

20 La Figura 8 muestra el efecto del tratamiento de las células a 0 °C con el complejo de pEGFP-N1/polilisina, sobre la transfección.

La Figura 9 muestra la transfección, provocada por luz, del complejo de pEGFP-N1/polilisina cuando se utiliza 3-THPP, que no se localiza esencialmente en vesículas endocíticas, como un agente fotosensibilizador.

25 La Figura 10 muestra el efecto de una combinación de fotosensibilizador y pretratamiento lumínico sobre la transfección de células con lípidos catiónicos.

La Figura 11 muestra el efecto del tratamiento fotoquímico sobre la transducción adenovírica de células THX.

30 La Figura 12 muestra el efecto del tratamiento fotoquímico sobre la localización intracelular de FITC-dextrano. Se incubaron células THX con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} durante 18 horas, seguidas de una incubación durante 4 horas en medio exento de AIPcS_{2a}. Las células fueron luego expuestas a luz durante 4 minutos (B, D) o mantenidas en la oscuridad (A, C) antes de una incubación de 3 horas con 5 mg/ml de FITC-dextrano. Micrografías de fluorescencia (A, B) y contraste de fase (C, D).

35 La Figura 13 muestra el efecto del tratamiento fotoquímico sobre la toxicidad de gelonina en células THX y HCT 116. Para la estrategia "luz antes", las células fueron primero incubadas con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} durante 18 horas y luego durante otras 4 horas en medio exento de AIPcS_{2a} antes de la exposición a la luz, como se indica en la figura. Después de la irradiación, se añadió 1 µg/ml de gelonina y se incubaron las células durante 18 horas. Para la estrategia "luz después", las células fueron conjuntamente incubadas con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} y 1 µg/ml de gelonina durante 18 horas antes de la exposición a la luz, como se indica en la figura. Las células testigo fueron tratadas sólo con 1 µg/ml de gelonina durante 18 horas y fueron expuestas a la luz; o sólo con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} durante 18 horas, cazadas 4 horas en medio exento de AIPcS_{2a} y expuestas a la luz. Se midió la incorporación de [³H]-leucina a las proteínas el día siguiente después del tratamiento lumínico y se expresó como síntesis proteica relativa. Los puntos de datos representan la media ± el error estándar (S.E.; del inglés, standard error) de triplicados.

40 La Figura 14 muestra el efecto del tratamiento fotoquímico sobre la expresión de β-galactosidasa en células THX infectadas con AdHCMV-lacZ. Para la estrategia "luz antes", células pretratadas con AIPcS_{2a} fueron incubadas durante otras 4 horas en medio exento de AIPcS_{2a} antes de una exposición lumínica durante 3 minutos. Después de la irradiación, las células fueron infectadas con AdHCMV-lacZ [con una multiplicidad de infección (MOI; del inglés, multiplicity of infection) de 1] durante 30 minutos a 37 °C. Luego se añadieron 2 ml de medio y se incubaron las células durante dos días antes del análisis de la expresión de β-galactosidasa. Para la estrategia "luz después", células tratadas con AIPcS_{2a} fueron incubadas en medio exento de AIPcS_{2a} durante 3 horas antes de una infección de 30 minutos con AdHCMV-lacZ. Después de la adición de 2 ml de medio de cultivo, las células fueron incubadas durante otros 30 minutos antes de una irradiación durante 3 minutos y, dos días más tarde, fueron analizadas en cuanto a la expresión de β-galactosidasa.

La Figura 15 muestra el efecto del tiempo de incubación sobre la eficacia de la transfección, provocada por luz, con pEGFP/polilisina en células THX y HCT 116. Células pretratadas con AIPcS_{2a} fueron lavadas e incubadas en medio exento de AIPcS_{2a} durante 4 horas antes de una exposición lumínica durante 3 minutos (células THX) o 7 minutos

(células HCT). Después de la irradiación, se añadió el complejo de pEGFP-N1/polilisina (5 µg/ml de plásmido) y se incubaron las células durante los diferentes periodos de tiempo indicados en la figura. Después de separar el complejo, se añadió medio fresco exento de complejo y se incubaron las células durante dos días antes del análisis de la expresión de EGFP.

5 La Figura 16 muestra el efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células THX mediada por poli-L-lisina usando TPPS_{2a} como fotosensibilizador, en comparación con la estrategia "luz después", usando diversos tiempos de irradiación. PLL-L: irradiación después del complejo de pEGFP-N1/PLL. L-PLL: irradiación antes del complejo de pEGFP-N1/PLL. Barras no sombreadas – sin luz; barras sombreadas – irradiación de 70 segundos; barras negras – irradiación de 100 segundos.

10 La Figura 17 muestra el efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células THX mediada por poli-L-lisina usando TPPS₄ como fotosensibilizador, en comparación con la estrategia "luz después", usando diversos tiempos de irradiación. PLL-L: irradiación después del complejo de pEGFP-N1/PLL. L-PLL: irradiación antes del complejo de pEGFP-N1/PLL. Barras no sombreadas – sin luz; barras horizontalmente sombreadas – irradiación de 50 segundos; barras verticalmente sombreadas – irradiación de 70 segundos; barras negras – irradiación de 100 segundos.

La Figura 18 muestra el efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células HCT 116 mediada por poli-L-lisina usando TPPS_{2a} como fotosensibilizador, en comparación con la estrategia "luz después", usando diversos tiempos de irradiación. PLL-L: irradiación después del complejo de pEGFP-N1/PLL. L-PLL: irradiación antes del complejo de pEGFP-N1/PLL. Barras no sombreadas – sin luz; barras sombreadas – irradiación de 70 segundos; barras negras – irradiación de 100 segundos.

La Figura 19 muestra el efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células HCT 116 mediada por poli-L-lisina usando TPPS₄ como fotosensibilizador. PLL-L: irradiación después del complejo de pEGFP-N1/PLL. L-PLL: irradiación antes del complejo de pEGFP-N1/PLL. Barras no sombreadas – sin luz; barras horizontalmente sombreadas – irradiación de 1,5 minutos; barras verticalmente sombreadas – irradiación de 2 minutos; barras negras – irradiación de 3 minutos.

La Figura 20 muestra el efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección mediada por DOTAP usando TPPS₄ como fotosensibilizador, en comparación con la estrategia "luz después", usando diversos tiempos de irradiación. DOTAP-L: irradiación después del complejo de pEGFP-N1/DOTAP. L-DOTAP: irradiación antes del complejo de pEGFP-N1/DOTAP. Barras no sombreadas – sin luz; barras sombreadas – irradiación de 70 segundos; barras negras – irradiación de 100 segundos.

La Figura 21 muestra el efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección mediada por SuperFect[®] usando TPPS_{2a} como fotosensibilizador, en que se usan diversos tiempos de irradiación y transfección y se varía la cantidad de DNA para transfección. ■ – transfección durante 1 hora con 0,75 µg de DNA; ▲ – transfección durante 4 horas con 0,75 µg de DNA; ○ – transfección durante 1 hora con 1,5 µg de DNA.

35 La Figura 22 muestra el efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transducción génica de células HCT 116, mediada por adenovirus, usando AIPcS_{2a} como fotosensibilizador, en que el virus se añade en diversos momentos. Se analizó por citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo, el porcentaje de células transducidas cuando se añadió el virus en diferentes puntos temporales. En la figura se indican los puntos temporales de adición de los complejos víricos. Los puntos temporales a la izquierda del eje Y representan el virus añadido antes de la irradiación, y los puntos temporales a la derecha representan la adición del virus después de la irradiación. ■ – irradiación de 1 minuto; □ – sin irradiación.

La Figura 23 muestra el efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células HCT 116 mediada por poli-D-lisina usando AIPcS_{2a} como fotosensibilizador, con tiempos de irradiación variables.

45 La Figura 24 muestra el efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la muerte celular por el agente citostático bleomicina usando TPPS_{2a} como fotosensibilizador, con cantidades variables de bleomicina, tiempos de irradiación y tiempos de transfección. ◇ – 5 TPPS⁻, 1 h = bleomicina 5 µM, sin TPPS_{2a}, 1 h de incubación; ◆ – 5 TPPS⁺, 1 h = bleomicina 5 µM, con TPPS_{2a}, 1 h de incubación; Δ – 25 TPPS⁻, 1 h = bleomicina 25 µM, sin TPPS_{2a}, 1 h de incubación; ▲ – 25 TPPS⁺, 1 h = bleomicina 25 µM, con TPPS_{2a}, 1 h de incubación; □ – 100 TPPS⁻, 1 h = bleomicina 100 µM, sin TPPS_{2a}, 1 h de incubación; ■ – 100 TPPS⁺, 1 h = bleomicina 100 µM, con TPPS_{2a}, 1 h de incubación; ○ – 100 TPPS⁻, 4 h = bleomicina 100 µM, sin TPPS_{2a}, 4 h de incubación; ● – 100 TPPS⁺, 4 h = bleomicina 100 µM, con TPPS_{2a}, 4 h de incubación.

La Figura 25 muestra el efecto de la PCI con gelonina para el tratamiento de tumores en un modelo de ratón *in vivo*. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes: (Δ) sólo gelonina; (■) un tratamiento con placebo por inyección de disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline), combinado con irradiación; (◇) sólo el tratamiento fotoquímico (es decir, AIPcS_{2a} + luz) pero sin gelonina; (●) tratamiento completo de PCI con gelonina (es decir, AIPcS_{2a} + gelonina + luz).

EJEMPLOS**Materiales y Métodos****Líneas celulares**

- 5 Se estableció la línea celular THX de melanoma humano a partir de tejido tumoral obtenido de un paciente tratado para melanoma maligno metastásico en el Norwegian Radium Hospital (Aamdal et al., 1986, Int. J. Cancer 37, 579) y se cultivó en medio RPMI 1640 (Gibco-BRL) complementado con FCS al 10% (Gibco-BRL) y glutamina 2 mM (Gibco-BRL). Se obtuvo la línea celular HCT 116 de carcinoma de colon humano del American Type Culture Collection (ATCC n° CCL-247) y se cultivó en medio RPMI 1640 complementado con suero de ternera fetal (FCS; del inglés, foetal calf serum) al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, y glutamina 2 mM (todos de Gibco BRL, Paisley, Reino Unido).

Irradiación

- 15 Se utilizaron dos diferentes fuentes de luz para el tratamiento de las células, consistentes ambas en una hilera de 4 tubos fluorescentes. Las células tratadas con TPPS₄, TPPS_{2a} y 3-THPP (Porphyrin Products, Logan, Utah, EE.UU.) fueron expuestas a luz azul (modelo 3026; Appl. Photophysics, Londres, Reino Unido) con una intensidad lumínica que alcanzaba a las células de 1,5 mW/cm², mientras que las células tratadas con AlPcS_{2a} (Porphyrin Products, Logan, Utah, EE.UU.) fueron expuestas a luz roja (Philips TL 20W/09) filtrada a través de un filtro Cinemoid 35 con una intensidad lumínica que alcanzaba a las células de 1,35 mW/cm².

Microscopía de fluorescencia

- 20 Las células fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia del modo descrito por K. Berg et al., Biochem. Biophys. Acta 1370: 317-324, 1998. Para el análisis de las moléculas marcadas con fluoresceína, el microscopio fue provisto de un filtro de excitación de 450-490 nm, un divisor dicróico de haz de 510 nm y un filtro de emisión de paso de banda de 510-540 nm.

Preparación de complejos de plásmido-pLys y tratamiento de las células

- 25 Se prepararon complejos de plásmido-pLys [relación de cargas de 1,7, como describen Berg et al. (1999), Cancer Res. 59: 1180-83] mezclando lentamente 5 µg de plásmido (pEGFP-N1; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California, EE.UU.) en 75 µl de HBS con 5,3 µg de pLys (peso molecular de 20.700; Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) en 75 µl de HBS. Las disoluciones fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiental, diluidas con medio de cultivo y añadidas a las células.

- 30 Las células THX fueron incubadas con 20 µg/ml de AlPcS_{2a} durante 18 horas a 37 °C, lavadas e incubadas en medio exento de sensibilizador durante 3 horas antes de la incubación con los complejos de plásmido-pLys durante 1 hora seguida de exposición a luz. Alternativamente, después de la incubación con AlPcS_{2a}, las células fueron lavadas e incubadas en medio exento de sensibilizador durante 4 horas antes de la exposición a luz seguida de una incubación de 1 hora con los complejos de plásmido-pLys. Antes de que se llevara a cabo el análisis de la expresión de GFP por citometría de flujo, las células fueron incubadas a 37 °C durante 2 días.

- 35 Las células HCT-116 fueron incubadas con 20 µg/ml de AlPcS_{2a} durante 18 horas, lavadas e incubadas durante 4 horas en ausencia de AlPcS_{2a} antes de la exposición lumínica. Las células fueron tratadas con complejo de pEGFP-N1/polilisina durante 4 horas inmediatamente antes o después de la exposición a la luz. Después de 2 días de incubación a 37 °C, se estudió la expresión de GFP por citometría de flujo.

Análisis por citometría de flujo

- 40 Las células fueron tratadas con tripsina, centrifugadas, resuspendidas en 400 µl de medio de cultivo y separadas por filtración a través de un filtro de nailon de 50 µm de malla. Las células fueron luego analizadas mediante un citómetro de flujo FACS-Calibur (Becton Dickinson). Se recogieron 10.000 subconjuntos de resultados para cada muestra. Se midió la fluorescencia de fluoresceína [por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP; del inglés, green fluorescent protein)] a través de un filtro de 510-530 nm después de la excitación con un láser de argón (200 mW) ajustado a 488 nm. Se midió la AlPcS_{2a} a través de un filtro de paso largo de 670 nm después de la excitación con un láser diódico (50 mW) ajustado a 635 nm. Los dobletes celulares y las células muertas fueron discriminados de las células viables individuales por acotamiento. Los datos fueron analizados con el software CELLQuest (Becton Dickinson).

Ejemplo 1**Transfección provocada por luz en función de la dosis lumínica**

- 50 Células THX fueron tratadas con 20 µg/ml de AlPcS_{2a} durante 18 horas, lavadas e incubadas en medio exento de sensibilizador durante 3 horas, lo que fue seguido de una incubación de 1 hora con 5 µg de complejo de pEGFP-N1/polilisina antes de una exposición lumínica durante 1, 2, 3 o 4 minutos. Alternativamente, después de la incuba-

ción con AIPcS_{2a}, las células fueron lavadas e incubadas durante 4 horas en medio exento de sensibilizador antes de un tratamiento lumínico durante 1, 2, 3 o 4 minutos, seguidos de 1 hora con complejo de pEGFP-N1/polilisina, como se indica en la Figura 1. Se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo 48 horas después de la exposición lumínica. La relación de cargas para el complejo de pEGFP-N1/polilisina fue 1,7.

- 5 Los resultados se muestran en la Figura 1, y se puede ver que la transfección de GFP es tan eficaz cuando el complejo de plásmido-pLys (es decir, pEGFP-N1/pLys) se añade a las células después de la exposición lumínica como cuando se añade antes. También se puede ver que con ambos tratamientos el porcentaje de células transfectadas depende del periodo de tiempo durante el cual las células están expuestas a la luz, alcanzando el porcentaje un máximo nivel a aproximadamente 2 minutos y nivelándose luego.

10 **Ejemplo 2**

Expresión de GFP en células HCT-116

- 15 Se incubaron células HCT-116 con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} durante 18 horas, seguidas de 4 horas en ausencia de AIPcS_{2a} antes de la exposición a la luz. Las células fueron tratadas con complejo de pEGFP-N1/polilisina durante 4 horas inmediatamente antes o después de la exposición a la luz, como se indica en la Figura 2. La expresión de GFP se midió por citometría de flujo 2 días después de la exposición lumínica.

- 20 Los resultados se muestran en la Figura 2, y se puede ver que, de un modo similar a la transfección de las células THX en el Ejemplo 1, la transfección de GFP es tan eficaz cuando el complejo de plásmido-pLys (es decir, pEGFP-N1/pLys) se añade a las células después de la exposición lumínica como cuando se añade antes. De nuevo, el porcentaje de células transfectadas varía dependiendo del periodo de tiempo durante el cual las células están expuestas a la luz.

Ejemplo 3

Efectos sinérgicos de la adición de gelonina antes y después del tratamiento fotoquímico

- 25 La gelonina es una toxina vegetal que inhibe eficazmente la síntesis proteica cuando está presente en el citosol de células. Se incubaron células THX con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} durante 18 horas, seguidas de 4 horas en medio exento de sensibilizador antes de la exposición a la luz. Las células fueron conjuntamente tratadas con AIPcS_{2a} y 1 µg/ml de gelonina, o se añadió gelonina (1 µg/ml) al medio inmediatamente después de una exposición lumínica durante 18 horas, después de lo cual fue separada del medio, como se indica en la Figura 3. Se midió la síntesis proteica 24 horas después de la exposición lumínica.

- 30 Los resultados se muestran en la Figura 3, y se puede ver que, aunque el propio tratamiento fotoquímico en ausencia de gelonina conduce a cierta reducción de la síntesis proteica, la presencia de gelonina antes o después del tratamiento fotoquímico provoca una inhibición significativamente mayor de la síntesis proteica. Estos datos muestran que la gelonina se internaliza en las células si se pone la gelonina en contacto con las células antes o después del tratamiento fotoquímico.

Ejemplo 4

- 35 Efecto del tiempo de caza sobre la transfección provocada por luz

- 40 Células THX fueron tratadas con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} durante 18 horas, lavadas e incubadas en medio exento de sensibilizador durante 4 horas antes de un tratamiento lumínico de 3 minutos. Las células fueron incubadas en medio de cultivo durante los tiempos indicados en la Figura 4 antes de un tratamiento con complejo de pEGFP-N1/polilisina (relación de cargas de 1,7) durante 1 hora. Se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo 48 horas después de la exposición lumínica.

Los resultados se muestran en la Figura 4, y se puede ver que, para los mejores resultados, la molécula que se va a internalizar debe ser expuesta a las células relativamente poco después del tratamiento fotoquímico ya que la transfección con pEGFP-N1 decae con una semivida de aproximadamente 5 horas después de la exposición lumínica.

Ejemplo 5

- 45 Eficacia de la transfección en función de un pulso de transfección, con respecto a la irradiación

- 50 Células THX fueron tratadas con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} durante 18 horas, lavadas e incubadas en medio exento de sensibilizador. Las células recibieron un pulso (0,5 o 1 hora; en la Figura 5, la anchura de la barra refleja el comienzo y el fin del tratamiento) de tratamiento con el complejo de pEGFP-N1/polilisina antes (valores de abscisas negativos) o después (valores de abscisas positivos) de una exposición lumínica de 3 minutos. Se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo 48 horas después de la exposición lumínica. Los datos de diversos experimentos han sido normalizados tomando como 100% la eficacia de transfección cuando ésta se lleva a cabo justo antes o justo después de la exposición lumínica.

Los resultados se muestran en la Figura 5, y se puede ver que, para la mejor eficacia de transfección, las células deben ser expuestas a las moléculas que se van a internalizar poco antes o después de la exposición a la luz.

Ejemplo 6

Transfección provocada por luz – dependencia del tiempo de incubación con el complejo de pEGFP-N1/polilisina

- 5 Células THX fueron tratadas con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} durante 18 horas, lavadas e incubadas en medio exento de sensibilizador durante 4 horas antes de la exposición a la luz, lo que fue seguido de una incubación con complejo de pEGFP-N1/polilisina (relación de cargas de 1,7) durante hasta 6 horas, como se ilustra en la Figura 6A. Se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo 48 horas después de la exposición lumínica. El número de células que expresan GFP después de dichos tratamientos se presenta en la Figura 6B, y la especificidad de los diferentes tratamientos se presenta en la Figura 6C.

Los resultados se muestran en la Figura 6, y se puede ver que, aunque el número de células transfectadas aumenta al aumentar el tiempo de incubación con el complejo de pEGFP-N1/polilisina (Figura 6B), la mayor especificidad de transfección tiene lugar después de los tiempos de incubación más cortos (Figura 6C).

Ejemplo 7

- 15 **Tratamiento con complejo de pEGFP-N1/polilisina a 0 °C**

Este experimento fue diseñado para probar si el tratamiento fotoquímico conducía a un daño menor a las membranas celulares, lo que significaría que el plásmido puesto en contacto con las células después del tratamiento lumínico podría filtrarse a través de la membrana plasmática.

- 20 Células THX fueron tratadas con 20 µg/ml de AIPcS_{2a} durante 18 horas, lavadas e incubadas en medio exento de sensibilizador durante 4 horas antes de la exposición lumínica, lo que fue inmediatamente seguido de una incubación de 45 minutos a 0 °C con complejo de pEGFP-N1/polilisina (relación de cargas de 1,7). Las células fueron luego A) tratadas con tripsina y sembradas antes de ser transferidas a 37 °C, o B) transferidas a 37 °C sin tratamiento con tripsina. Las células fueron expuestas a luz, como se indica en la Figura 8. Se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo 48 horas después de la exposición lumínica.

- 25 Después de la incubación de las células durante 45 minutos a 0 °C con complejo de pEGFP-N1/polilisina, el complejo se pegará a la superficie celular pero no será endocitado. Las células THX fueron luego incubadas en medio exento de plásmido a 37 °C (Figura 8B) o fueron tratadas con tripsina (Figura 8A) para separar el plásmido de la superficie y sembradas en nuevas placas a 37 °C. Estos experimentos indican que el complejo de plásmido/polilisina no se filtra a través de la membrana plasmática después del tratamiento fotoquímico.

- 30 **Ejemplo 8**

Combinación de 3-THPP y luz con un tratamiento con complejo de pEGFP-N1/polilisina

- 35 Células THX fueron tratadas con 0,25 µg/ml de 3-THPP durante 18 horas, lavadas e incubadas en medio exento de sensibilizador durante 4 horas antes de la exposición lumínica, lo que fue inmediatamente seguido de una incubación de 1 hora con complejo de pEGFP-N1/polilisina (relación de cargas de 1,7). Las células fueron expuestas a luz, como se indica en la Figura 9, y fueron analizadas en cuanto a la expresión de GFP por citometría de flujo 48 horas después de la exposición lumínica.

- 40 El 3-THPP es un fotosensibilizador cuya localización principal no es en endosomas ni lisosomas. Los resultados mostrados en la Figura 9 indican que el tratamiento de las células con 3-THPP antes de la irradiación sólo provoca un aumento menor de la expresión de GFP en comparación con los resultados mostrados en ejemplos previos en que se usa el agente fotosensibilizador AIPcS_{2a}. Esto indica que puede resultar ventajoso un agente fotosensibilizador que se localice en endosomas y lisosomas.

Ejemplo 9

La combinación de fotosensibilizador y tratamiento lumínico permite la transfección de células usando lípidos catiónicos

- 45 Se sembraron células HCT 116 en una placa de 12 pocillos, con una densidad de 75.000 células/pocillo, un día antes del experimento. Las células fueron incubadas con el fotosensibilizador AIPcS_{2a} (20 µg/ml) durante 18 horas, seguidas de una caza de 7 horas en medio exento de fotosensibilizador, y fueron expuestas a luz roja durante 7 minutos. Las células fueron luego incubadas con un complejo de DOTAP (El DOTAP fue obtenido de Boehringer) con el plásmido pEGFP-N1 (DOTAP/plásmido de 5:1, 1 µg/ml de pEGFP-N1) durante 3 horas, lavadas con el medio de cultivo e incubadas a 37° durante 21 horas antes de que se midiera la expresión de EGFP por citometría de flujo del modo descrito en Materiales y Métodos. Las células testigo no fueron expuestas a la luz; por lo demás, el tratamiento fue idéntico.

Los resultados se muestran en la Figura 10, y se puede ver que el tratamiento por PCI aumenta aproximadamente 4 veces la eficacia de transfección con el complejo de DOTAP/plásmido.

Ejemplo 10

Efecto de la PCI sobre la transducción adenoviral de células THX

5 Material

Se obtuvo fluoresceína-di-β-D-galactopiranosido (FDG) de Molecular Probes (F-1179). Se preparó una disolución madre 20 mM disolviendo el polvo en una mezcla 1:1 de DMSO/etanol. La mezcla se añadió gradualmente a un volumen apropiado de agua enfiada con hielo para preparar una disolución en H₂O/DMSO/etanol 8:1:1.

10 Se formó el virus recombinante AdCA17lacZ y se propagó en la línea celular humana 293, una línea celular de riñón embrionario transformada con Ad E1, mantenida en medio MEM F-11 complementado con FCS al 10%, 100 U/ml de penicilina (Gibco-BRL), 0,1 mg/ml de estreptomina (Gibco-BRL) y glutamina 2 mM.

Construcción del virus recombinante

15 Se obtuvo por recombinación homóloga el adenovirus recombinante AdCA17lacZ que codifica el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor de CMV humano, usando el sistema pJM17 en células 293 (Addison et al., 1997, J. Gen. Virol. 78, 1653-1661). Los vectores recombinantes fueron purificados por formación de placas de lisis, desarrollados hasta un título elevado en células 293 y purificados por formación de bandas en cloruro de cesio, de la manera previamente descrita (Hitt et al., 1995, Methods in Mol. Genetics, 7, 15-30).

Sensibilización de células

20 Las células THX (4 x 10⁵ células) fueron sembradas en placas de 6 cm y dejadas desarrollar durante la noche. En una confluencia de aproximadamente 60%, se cambió el medio de cultivo por 2 ml de medio de cultivo complementado con 20 µg/ml de AIPcS₂, y se pusieron de nuevo las placas en la incubadora durante 16-18 horas. Luego se separó por aspiración el medio que contenía el sensibilizador y se incubaron las células en un medio de cultivo ordinario al menos 4 horas antes del tratamiento lumínico y la infección vírica.

Infección de las células

25 Se usó tripsina-EDTA para separar las células de tres placas y se calculó el número medio de células en las placas mediante recuento en una cámara Bürcher. Se prepararon diluciones de adenovirus en PBS con CaCl₂ 0,68 mM y MgCl₂ 0,5 mM de acuerdo con el número de células a infectar. Normalmente, las células fueron infectadas con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 y 10.

30 Antes de que se añadiera el virus, las células fueron expuestas a luz roja (Philips TL 20W/09, filtrada a través de un filtro Cinemoid 35 con una intensidad lumínica que alcanzaba a las células de 1,35 mW/cm²) durante 3 minutos. Posteriormente, se separó el medio por aspiración y se añadieron 200 µl de suspensión vírica (o PBS con CaCl₂ 0,68 mM y MgCl₂ 0,5 mM en los casos de los testigos no tratados con el virus) a cada placa. Después de una incubación durante 30 minutos a 37 °C, se añadieron 5 ml de medio de cultivo ordinario y se dejó que las células se desarrollaran durante 48 horas.

35 Ensayo de β-galactosidasa

40 Las células fueron separadas mediante tripsina-EDTA y fueron resuspendidas en 5 ml de medio de cultivo. Después de una centrifugación durante 5 minutos a 1000 rpm, se separó el medio por aspiración, se resuspendieron los sedimentos celulares en 50 µl de medio de cultivo y se pusieron los tubos en un baño de agua a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 50 µl de una disolución 2 mM de FDG precalentada a 37 °C y se pusieron de nuevo los tubos en el baño de agua durante 1 minuto. Finalmente, se añadieron 900 µl de medio de cultivo y se incubaron los tubos sobre hielo durante 30-60 minutos antes de que se analizaran las muestras por citometría de flujo del modo anteriormente descrito.

45 Se trataron células THX con AIPcS_{2a} (indicado como PS en la Figura 11) y adenovirus (indicado como "virus" en la Figura 11) y se expusieron a 3 o 4 minutos de luz del modo descrito en Materiales y Métodos, y se midió su actividad β-galactosidasa (β-gal) por citometría de flujo. Se cuantificó la actividad β-gal total integrando las células positivas para β-gal y su actividad β-gal. Tanto el número de células positivas para β-gal como la actividad β-gal media resultaron aumentados mediante el tratamiento por PCI.

50 Los resultados muestran que tiene lugar una mínima infección de células THX cuando se incuban las células con virus solo o con virus y agente fotosensibilizador pero que el tratamiento fotoquímico, es decir, la adición de luz al agente fotosensibilizador, potencia significativamente la transducción de células (como se muestra por el aumento de actividad β-gal).

Ejemplo 11**Efecto del tratamiento fotoquímico sobre la localización intracelular de una molécula marcadora de endocitosis**

Se sembraron células THX en placas Falcon 3001 ($2,5 \times 10^4$ células por placa) y, al día siguiente, las células fueron tratadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de AIPcS_{2a} durante 18 horas, lavadas para retirar el AIPcS_{2a} e incubadas en medio exento de AIPcS_{2a} durante 4 horas. Las células fueron luego expuestas a luz durante 4 minutos antes de una incubación de 3 horas con 5 mg/ml del marcador endocítico FITC-dextrano. Las células no irradiadas fueron tratadas de un modo similar salvo en cuanto a la irradiación. Se observó la localización intracelular del FITC-dextrano en células no fijadas, con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan (Oberkochen, Alemania) usando un objetivo con un aumento de 63x, un filtro de excitación de paso de banda de 450-490 nm y un filtro de emisión de paso de banda de 510-540 nm. Se grabaron micrografías de fluorescencia por medio de una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD; del inglés, *charged-coupled device*) (Photometrics Inc., Tucson, Arizona, EE.UU.) enfriado.

Los resultados (Figura 12) muestran que la PCI con luz proporcionada antes que el marcador endocítico fluorescente FITC-dextrano desplaza la localización de este marcador de las vesículas endocíticas (las manchas vistas en la parte A para células no irradiadas) al citosol (la fluorescencia difusa vista en la parte B para células irradiadas). De este modo, cuando se proporciona el tratamiento lumínico antes que la macromolécula que se va a internalizar, la macromolécula se transloca muy rápidamente al citosol, disminuyendo sustancialmente las posibilidades de degradación lisosómica de la macromolécula.

Ejemplo 12**Efectos de los tratamientos fotoquímicos sobre la toxicidad de la gelonina en células THX y HCT 116**

La gelonina es una toxina vegetal que inhibe eficazmente la síntesis proteica cuando está presente en el citosol celular pero que no es capaz de alcanzar el citosol por sí misma, y, por lo tanto, es bastante atóxica para las células intactas. Para el tratamiento con gelonina, se sembraron 25×10^3 células por pocillo en placas de 24 pocillos (Nunc, Dinamarca). Al día siguiente, se añadieron 20 $\mu\text{g/ml}$ de AIPcS_{2a} y se incubaron las células durante 18 horas a 37 °C. Todos los procedimientos después de la adición de AIPcS_{2a} se llevaron a cabo bajo luz atenuada. Para la estrategia "luz antes", se separó el AIPcS_{2a} de las células por lavado y se incubaron las células en medio exento de AIPcS_{2a} durante 4 horas. Las células fueron luego expuestas a la luz (como se indica en las figuras) antes del tratamiento con 1 $\mu\text{g/ml}$ de gelonina durante 18 horas. Para la estrategia "luz después", las células fueron conjuntamente incubadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de AIPcS_{2a} y 1 $\mu\text{g/ml}$ de gelonina durante 18 horas y fueron lavadas antes de la exposición a la luz, como se indica en la figura. Las células no irradiadas fueron tratadas de un modo similar salvo en cuanto a la irradiación. Las células tratadas fueron lavadas una vez con medio de cultivo y, después de la adición de medio fresco, fueron incubadas a 37 °C antes del análisis ulterior. 24 horas después de la exposición lumínica, se examinó la inhibición de la síntesis proteica por incorporación de [³H]-leucina a proteína. La irradiación se llevó a cabo desde una bancada con cuatro tubos de luz (Philips TL 20W/09) y un filtro de paso largo con un corte a 550-600 nm. La intensidad de luz que llegaba a las células era 13,5 W/m².

El ejemplo muestra que, tanto en células THX (Figura 13A) como en células HCT 116 (Figura 13B), la estrategia "luz antes" funciona mejor que el método "luz después". Por lo tanto, para células THX con la mayor dosis lumínica, la inhibición de la síntesis proteica era aproximadamente tres veces más potente con "luz antes" que con "luz después". También se puede ver que, en ambas líneas celulares, la gelonina no ejercía por sí efecto tóxico alguno sin el tratamiento por PCI, lo que muestra la potencia y la especificidad que se pueden alcanzar en la inducción de los efectos de toxinas mediante el tratamiento fotoquímico.

Figura 13**Estimulación fotoquímica de transducción génica mediada por adenovirus**

Se sembraron 5×10^4 células THX por pocillo en placas de 6 pocillos. Al día siguiente, se añadieron 20 $\mu\text{g/ml}$ de AIPcS_{2a} y se incubaron las células durante 18 horas a 37 °C. Todos los procedimientos después de la adición de AIPcS_{2a} se llevaron a cabo bajo luz atenuada. Para la estrategia "luz antes", se separó el AIPcS_{2a} de las células por lavado y se incubaron las células en medio exento de AIPcS_{2a} durante 4 horas. Las células fueron luego expuestas a la luz durante 3 minutos antes del tratamiento con el vector adenovírico AdHCMV-lacZ (al que también se hace referencia como AdCA17lacZ en el Ejemplo 10) con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 durante 30 minutos. Este vector contiene un gen informador de β -galactosidasa cuya expresión puede ser analizada mediante citometría de flujo (véase más adelante).

Para la estrategia "luz después", las células tratadas con AIPcS_{2a} y lavadas fueron primero tratadas con el adenovirus en la misma concentración y durante el mismo tiempo que los anteriormente indicados, lavadas y, después de la adición de medio de cultivo fresco, expuestas a la luz. Las células no irradiadas fueron tratadas de un modo similar salvo en cuanto a la irradiación.

Las células tratadas fueron lavadas una vez con medio de cultivo y, después de la adición de medio fresco, fueron incubadas a 37 °C antes del análisis ulterior. Se analizó la expresión de β -galactosidasa por citometría de flujo dos

días después de la exposición lumínica. Los métodos detallados para la construcción del virus (al que se hace referencia como AdHCMV-lacZ o AdCA17lacZ), el tratamiento de las células, la irradiación y el análisis de la expresión de β -galactosidasa se describen en el Ejemplo 10.

- 5 Los resultados (Figura 14) muestran que el tratamiento fotoquímico usando el procedimiento "luz antes" (mostrado por las barras de la parte derecha de la Figura 14) aumenta aproximadamente 6 veces el porcentaje de células que expresan β -galactosidasa; de 2,5% a 15% bajo estas condiciones experimentales. También se puede ver que el efecto con el procedimiento "luz antes" era casi igual al que se obtuvo con el método "luz después" (mostrado mediante las barras de la parte izquierda de la Figura 14).

Ejemplo 14

10 Efecto del tiempo de incubación sobre la eficacia de la transfección provocada por luz

- Se sembraron 5×10^4 células THX o $7,5 \times 10^4$ células HCT 116 por pocillo en placas de 6 pocillos y 12 pocillos, respectivamente. Al día siguiente, se añadieron 20 $\mu\text{g/ml}$ de AIPcS_{2a} y se incubaron las células durante 18 horas a 37 °C. Todos los procedimientos después de la adición de AIPcS_{2a} se llevaron a cabo bajo luz atenuada. Se separó el AIPcS_{2a} de las células por lavado y se incubaron las células en medio exento de AIPcS_{2a} durante 4 horas. Las células fueron luego expuestas a la luz (3 minutos para las células THX o 7 minutos para las células HCT 116) antes del tratamiento con complejo de pEGFP-N1/polilisina (5 $\mu\text{g/ml}$ de pEGFP-N1) durante los tiempos indicados en la Figura 15. Las células no irradiadas fueron tratadas de un modo similar salvo en cuanto a la irradiación. Las células tratadas fueron lavadas una vez con medio de cultivo y, después de la adición de medio fresco, fueron incubadas a 37 °C durante 2 días antes del análisis de la expresión de EGP mediante citometría de flujo (véase Materiales y Métodos). La irradiación se llevó a cabo desde una bancada con cuatro tubos de luz (Philips TL 20W/09) y un filtro de paso largo con un corte a 550-600 nm. La intensidad de luz que llegaba a las células era 13,5 W/m². Se preparó el complejo de pEGFP-N1/polilisina (relación de cargas de 1,7) mezclando lentamente disoluciones de plásmido y polilisina preparadas separadamente: se diluyeron 5 μg de plásmido pEGFP-N1 en 75 μl de agua y se diluyeron 5,3 μg de polilisina en 75 μl de agua. Las disoluciones fueron mezcladas, incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiental, diluidas con medio de cultivo hasta 1 ml y añadidas a las células.

- Los resultados (Figura 15) muestran que, tanto en células THX como en células HCT 116, se puede provocar acusadamente una transfección por complejos de DNA/polilisina mediante el tratamiento fotoquímico "luz antes". Se puede ver que la estimulación de la transfección es ya eficaz después de tiempos de incubación cortos con DNA, al menos hasta 30 minutos de tiempo de incubación. La transfección provocada por luz aumenta con el tiempo de incubación; sin embargo, parece que se nivela después de aproximadamente 2 horas de incubación con DNA.

Ejemplo 15

Efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células THX mediada por polilisina usando TPPS_{2a} como fotosensibilizador

- 35 La tetrafenilporfina-disulfonato TPPS_{2a}, lote nº 04197, fue producida por Porphyrin Products (Utah, EE.UU.). Se disolvió la TPPS_{2a} en DMSO.

El plásmido pEGFP-N1 fue obtenido de Clontech Laboratories Inc. (California, EE.UU.; nº 6085-1 del catálogo). La partida utilizada (lote nº EGFP-N1-1002) fue producida por ELIM Biopharmaceuticals, Inc. (California, EE.UU.) y fue suministrada en una concentración de 5 mg/ml en agua estéril. Se preparó una disolución madre de 0,5 mg/ml en tampón de TE (Tris-HCl 1 mM, EDTA 1 mM) estéril, pH de 7,4, y se guardó a -20 °C.

- 40 Se cultivaron las células de melanoma humano THX en medio RPMI 1640 complementado con FCS (suero de ternera fetal) al 10%, penicilina/estreptomicina y L-glutamina. Bajo luz atenuada, se retiró el medio y se añadió medio que contenía 2 $\mu\text{g/ml}$ de TPPS_{2a}. Se incubaron las células (protegidas de la luz) a 37° durante 18 horas. Se lavaron las células tres veces con medio y, para las muestras PLL-L ("luz después"), se añadió 1 ml de medio que contenía un complejo de pEGFP-N1/poli-L-lisina. El complejo contenía 5 μg de pEGFP-N1 y tenía una relación de cargas de poli-L-lisina (PLL) a DNA de 1,7. Después de 4 horas de incubación adicional a 37 °C en la oscuridad, se retiró el medio y se lavaron una vez las células con medio. Se añadió 1 ml de medio y se expusieron las células a luz azul como se indica en la Figura 16 y se describe en Materiales y Métodos. Para las muestras L-PLL ("luz antes"), la primera incubación de 4 horas fue en medio sin complejo de pEGFP-N1/PLL, añadiéndose el complejo inmediatamente después de la irradiación y siendo separado después de otra incubación de 4 horas. Las células fueron incubadas durante 2 días (aún protegidas de la luz) antes del análisis de la expresión de EGFP por citometría de flujo. Para este análisis, las células fueron tratadas con tripsina (tripsina – EDTA, Sigma, Missouri, EE.UU.), resuspendidas en 400 μl de medio RPMI y separadas por filtración a través de un filtro de nailon de 50 μm de malla antes del análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, California, EE.UU.). Se midió la EGFP a través de un filtro de 510-540 nm después de una excitación a 488 nm. Se utilizó yoduro de propidio (1 $\mu\text{g/ml}$) para discriminar las células muertas de las células viables, y se llevó a cabo un procesamiento de pulsos para discriminar los dobletes celulares de las células individuales. Se recogieron 10.000 subconjuntos de resultados para cada muestra y se analizaron los datos con el software CELLQuest (Becton Dickinson, California, EE.UU.).

Resultados

Como se puede ver en la Figura 16, para la transfección de células THX mediada por poli-L-lisina, el planteamiento de "luz antes" de la adición de la molécula de transferencia funciona tan bien como el planteamiento de "luz después" cuando se utiliza el fotosensibilizador TPPS_{2a}.

5 **Ejemplo 16**

Efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células THX mediada por poli-L-lisina usando TPPS₄ como fotosensibilizador

Las células THX fueron cultivadas y tratadas del modo descrito en el Ejemplo 15 salvo por que se utilizó el fotosensibilizador TPPS₄ (75 µg/ml) en lugar de TPPS_{2a}.

10 *Resultados*

A partir de la Figura 17 es evidente que, para la transfección de células THX mediada por poli-L-lisina, el planteamiento de "luz antes" funciona ligeramente mejor que el planteamiento de "luz después" cuando se utiliza el fotosensibilizador TPPS₄, pero con ambos métodos se consigue la transfección.

Ejemplo 17

15 Efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células HCT 116 mediada por poli-L-lisina, usando TPPS_{2a} como fotosensibilizador

Las células HCT 116 fueron cultivadas y tratadas del modo descrito en el Ejemplo 15.

Resultados

20 A partir de la Figura 18 se puede ver que, para la transfección de células HCT 116 mediada por poli-L-lisina, el planteamiento de "luz antes" funciona tan bien como el planteamiento de "luz después" cuando se utiliza el fotosensibilizador TPPS_{2a}.

Ejemplo 18

Efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células HCT 116 mediada por poli-L-lisina, usando TPPS₄ como fotosensibilizador

25 Las células THX fueron cultivadas y tratadas del modo descrito en el Ejemplo 15 salvo por que se usó el fotosensibilizador TPPS₄ (75 µg/ml) en vez de TPPS_{2a}.

Resultados

La Figura 19 muestra que, para la transfección de células THX mediada por poli-L-lisina, el planteamiento de "luz antes" funciona tan bien como el planteamiento de "luz después" cuando se utiliza el fotosensibilizador TPPS₄.

30 **Ejemplo 19**

Efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección mediada por DOTAP usando TPPS₄ como fotosensibilizador

35 Se cultivaron células HCT 116 en medio RPMI 1640 complementado con FCS (suero de ternera fetal) al 10%, penicilina/estreptomicina y L-glutamina. Bajo luz atenuada, se retiró el medio y se añadió medio que contenía 75 µg/ml de TPPS₄. Se incubaron las células (protegidas de la luz) a 37° durante 18 horas. Se lavaron las células tres veces con medio y, para las muestras DOTAP-L ("luz después"), se añadió 1 ml de medio que contenía un complejo de 1 µg pEGFP-N1 y 5 µg de DOTAP. Después de 4 horas de incubación adicional a 37 °C en la oscuridad, se retiró el medio y se lavaron una vez las células con medio. Se añadió 1 ml de medio y se expusieron las células a luz azul como se indica en la Figura 20 y se describe en Materiales y Métodos. Para las muestras L-DOTAP ("luz antes"), la primera incubación de 4 horas fue en medio sin complejo de pEGFP-N1/DOTAP, añadiéndose el complejo inmediatamente después de la irradiación y siendo separado después de otra incubación de 4 horas. Las células fueron incubadas durante 1 día (aún protegidas de la luz) antes del análisis de la expresión de EGFP por citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 15.

Resultados

45 A partir de la Figura 20, se puede observar que, para la transfección de células HCT 116 mediada por el lípido catiónico DOTAP, el planteamiento de "luz antes" funciona sustancialmente mejor que el planteamiento de "luz después" cuando se usa el fotosensibilizador TPPS₄. Parece que el planteamiento de "luz antes" es especialmente ventajoso para la transfección mediada por lípidos catiónicos.

Ejemplo 20**Efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección mediada por SuperFect® usando TPPS_{2a} como fotosensibilizador**

Se obtuvo SuperFect® de QIAGEN AG.

5 Preparación de complejos de plásmido/SuperFect®

Se prepararon complejos de plásmido/SuperFect® del modo siguiente: (i) se diluyó pEGFP-N1 con medio RPMI 1640 (sin suero, proteínas ni antibióticos). (ii) Se añadió SuperFect® (2 µl por µg de DNA) a la disolución plasmídica y se mezclaron los contenidos mediante agitación con formación de remolinos durante 10 segundos. (iii) Se incubó la disolución durante 10-20 minutos a temperatura ambiental para permitir la formación del complejo. (iv) Se añadieron 400 µl de medio para cultivo celular (con suero y antibióticos) a los tubos que contenían los complejos de transfección, se mezclaron los contenidos haciendo subir y bajar el líquido dos veces por una pipeta y se transfirió inmediatamente el volumen total a las células.

Tratamiento de las células

Se sembraron células HCT 116 (75.000 células/pocillo, 1 ml/pocillo) en placas de 12 pocillos (Costar Corning, New York, EE.UU.) y se dejó que se fijaran durante seis horas. Se añadió 1 ml de medio con 0,7 µg/ml de TPPS_{2a} y se incubaron las células durante 18 horas (CO₂ al 5% en volumen/volumen, 37 °C). Las células fueron lavadas tres veces con medio y fueron incubadas durante 4 horas (37 °C, CO₂ al 5% en volumen/volumen) en medio que contenía suero. Las células fueron irradiadas por exposición a una hilera de cuatro tubos fluorescentes (Osram 18W/67), con la máxima fluencia cerca de 420 nm. Se añadieron los complejos de plásmido/SuperFect® inmediatamente después de la exposición lumínica y se incubaron las células con los complejos durante 1 o 4 horas. Las células fueron luego lavadas 4 veces en medio RPMI y, después de la adición de 1 ml de medio, fueron adicionalmente incubadas durante dos días. Luego se analizó la expresión de EGFP por citometría de flujo del modo descrito en el Ejemplo 15.

Resultados

Se puede ver (Figura 21) que la PCI mejora sustancialmente la transfección de SuperFect® bajo todas las condiciones examinadas. Por ejemplo, para 0,75 µg de DNA y un tiempo de transfección de 1 hora, se vio una mejora de 9 órdenes de magnitud, mientras que, para 0,75 µg de DNA y un tiempo de transfección de 4 horas, se observó una potenciación de 10 órdenes de magnitud.

Ejemplo 21**30 Efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transducción génica, mediada por adenovirus, de células HCT 116 usando TPPS_{2a} como fotosensibilizador**

Se cultivaron células HCT 116 en medio RPMI 1640 complementado con FCS (suero de ternera fetal) al 10%, penicilina/estreptomicina y L-glutamina. Bajo luz atenuada, se retiró el medio y se añadió medio que contenía 1 µg/ml de TPPS_{2a} a cada pocillo. Se incubaron las células (protegidas de la luz) a 37° durante 18 horas. Se lavaron las células tres veces con medio. Luego se infectaron las células con el adenovirus Ad-HCMV-LacZ en diferentes puntos temporales antes o después de la irradiación (que siempre fue 4 horas después de la separación del fotosensibilizador). Las células fueron adicionalmente incubadas durante 2 días (aún protegidas de la luz) antes del análisis de la actividad β-galactosidasa por citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 10 (Materiales y Métodos).

Resultados

La Figura 22 muestra el efecto de la regulación temporal del tratamiento lumínico con respecto a la distribución del virus, sobre el efecto de la PCI sobre la transducción génica mediada por adenovirus. Se puede ver que, para el planteamiento de "luz antes" (la parte derecha del eje Y), la irradiación para PCI es eficaz durante al menos 13 horas, por lo que el virus puede ser administrado hasta al menos 13 horas después de la irradiación manteniéndose aún los efectos positivos de la PCI sobre la transducción. Esto es muy importante desde un punto de vista clínico porque permite al clínico una gran flexibilidad a la hora de diseñar el tratamiento y coordinarlo con otros tratamientos que el paciente pudiera recibir, por ejemplo, con procedimientos quirúrgicos.

Ejemplo 22**Efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la transfección de células HCT 116 mediada por poli-D-lisina usando AIPcS_{2a} como fotosensibilizador**

Se cultivaron, trataron y analizaron células HCT 116 del modo descrito en el Ejemplo 15 salvo por que se usó poli-D-lisina en lugar de poli-L-lisina en la preparación del complejo con pEGFP-N1.

Resultados

A partir de la Figura 23, se puede observar que la PCI con el protocolo "luz antes" también funciona bien cuando se usa el polication poli-D-lisina como agente de transfección.

Ejemplo 23

Efecto de la estrategia de PCI "luz primero" sobre la muerte celular por el agente citostático bleomicina usando TPPS_{2a} como fotosensibilizador

La tetrafenilporfina-disulfonato TPPS_{2a}, lote nº 04197, fue producida por Porphyrin Products (Utah, EE.UU.). Se disolvió la TPPS_{2a} en DMSO.

En este estudio se usó la línea celular V-79 de fibroblastos de pulmón de hámster chino.

El MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] era de Sigma (Missouri, EE.UU.; nº M 2128 del catálogo) y se disolvió en PBS hasta una concentración de 5 mg/ml. La disolución fue esterilizada por filtración y fue almacenada a 4 °C.

La bleomicina (Asta Medica), 15 000 IE/KY, se obtuvo de la farmacia del Norwegian Radium Hospital. 1 IE corresponde a 1 mg de bleomicina. El polvo de bleomicina se disolvió en una disolución estéril de NaCl al 0,9% hasta una concentración final de 2 mM.

Cultivo celular

Las células V-79 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) complementado con suero de ternera fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y glutamina 2 mM (todos de Gibco BRL, Paisley, Escocia) a 37 °C y CO₂ al 5% en un ambiente húmedo.

Tratamiento de las células

Se sembraron las células (75.000 células/pocillo, 1 ml/pocillo) en placas de 12 pocillos (Costar Corning, New York, EE.UU.) y se dejó que se fijaran durante 6 horas. A algunos de los pocillos se añadió 1 ml de medio con 0,7 µg/ml de TPPS_{2a} (véase la Tabla 1), y se incubaron las células durante 18 horas (CO₂ al 5% en volumen/volumen, 37 °C). Se lavaron las células tres veces con medio. Luego se incubaron las células en medio que contenía suero durante 4 horas. Se retiró el medio, se añadió nuevo medio y se irradiaron las células por exposición a la luz de una caja que contenía una hilera de cuatro tubos fluorescentes (Osram 18W/67), con la máxima fluencia cerca de 420 nm.

Se añadieron inmediatamente diferentes dosis de bleomicina. Después de una incubación de 1 o 4 horas con bleomicina, se lavaron las células una vez con medio RPMI, se añadió 1 ml de medio y, después de 3 días de incubación, se midió la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT. Este método se basa en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT) soluble en agua hasta un producto de formazán morado e insoluble por las deshidrogenasas mitocondriales presentes en células vivas metabólicamente activas. Se añade 1 ml de medio que contiene 0,25 µg de MTT a las células, lo que va seguido de una incubación de 4 horas (37 °C, CO₂ al 5% en volumen/volumen). Los cristales de formazán resultantes son disueltos por adición de 200 µl de isopropanol (Sigma, Missouri, EE.UU.) por pocillo. La disolución es transferida a una placa de 96 pocillos, la cual es leída por un dispositivo Multiskan EX lector de microplacas (Labsystems, Finlandia) con un filtro de paso de banda de 570 nm. La supervivencia celular es calculada como porcentaje de las células testigo que no reciben tratamiento lumínico.

Resultados

La Figura 24 muestra que la PCI con el planteamiento de "luz antes" puede también aumentar el efecto biológico de un agente quimioterapéutico clínicamente aprobado de bajo peso molecular (bleomicina). De este modo, se puede ver que, para una dosis de bleomicina de 100 µM, se puede observar un aumento sustancial, provocado por la luz, de la citotoxicidad de la bleomicina (■ y ● en la Figura 24). La falta de efecto con la dosis más baja de bleomicina (◆ en la Figura 24) muestra que esta citotoxicidad aumentada no es un resultado del tratamiento fotoquímico *per se*, ya que esta serie de muestras recibió el mismo tratamiento fotoquímico que la serie de la bleomicina 100 µM sin observables efectos sobre la supervivencia celular provocados por la luz.

Ejemplo 24

PCI con gelonina para el tratamiento de tumores en un modelo de ratón *in vivo*

Animales

Se criaron hembras de ratón Balb/c desnudo (nu/nu) en el Animal Department del Institute for Cancer Research. Se mantuvieron los ratones bajo condiciones específicas exentas de patógenos. Se les administró agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos que atañían a los ratones fueron llevados a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de cuidados a animales del Norwegian Radium Hospital, bajo control por las directrices del National Ethical Committee sobre el bienestar de los animales. Los ratones tenían un peso medio de 20-25 g (5-8 semanas de edad) al comienzo de los experimentos, y se usaron al menos 5 ratones por grupo experimental. El

adenocarcinoma humano WiDr usado en el presente estudio fue propagado por trasplantes sucesivos a los ratones Balb/c (nu/nu). Se desmenuzaron los tumores hasta homogeneidad mediante un escalpelo y se inyectaron subcutáneamente 20 µl de la disolución en la cadera derecha de cada ratón. Se midió el tamaño tumoral dos o tres veces por semana midiendo dos diámetros perpendiculares. Se calculó el volumen tumoral utilizando la fórmula siguiente:

$$V = (W^2 \times L)/2$$

en la que W es la anchura y L la longitud, diámetros de los tumores medidos.

Tratamiento

Los ratones fueron aleatoriamente repartidos en los diferentes grupos mostrados en la Tabla 1 y la Figura 25. Se diluyó una disolución madre de AIPcS_{2a} hasta 1,25 mg/ml en PBS y se inyectó intraperitonealmente hasta una concentración final de 10 mg/kg cuando los tumores hubieron alcanzado un volumen de aproximadamente 100 mm³. 48 horas después de la inyección de AIPcS_{2a}, los tumores fueron expuestos a luz roja durante 16 minutos (véase más adelante). Inmediatamente después de la exposición lumínica, se inyectó intratumoralmente gelonina (una cantidad total de 50 µg en una disolución de 2 mg/ml; es decir, 25 µl). Después de la inyección de AIPcS_{2a}, los ratones fueron mantenidos en la oscuridad durante 1 semana.

Tratamiento lumínico

Se irradiaron los tumores con una lámpara halógena de 150 W (Xenophot HLX64640) filtrada con un filtro de paso largo de 580 nm y un filtro de paso corto de 700 nm, que emitía 150 mW/cm². Se cubrieron los animales con papel de aluminio salvo por encima de la zona del tumor, donde se había hecho en el papel un agujero con un diámetro 2 mm mayor que el diámetro del tumor. Se expusieron los tumores a 145 J/cm² de luz. Se midieron los volúmenes tumorales dos o tres veces por semana del modo anteriormente descrito. Se mataron los ratones cuando los tumores alcanzaron un diámetro de aproximadamente 20 mm. Se anotó la fracción de ratones exentos de tumor 30 días después de la irradiación (Tabla 1) y se registró el volumen tumoral medio en cada grupo de tratamiento (Figura 25).

Resultados

Tabla 1. Se trataron los ratones del modo anteriormente descrito y se registró la incidencia de tumores 30 días después de la irradiación.

Nº DE GRUPO	TRATAMIENTO	FRACCIÓN DE RATONES EXENTOS DE TUMOR 30 DÍAS DESPUÉS DE LA IRRADIACIÓN	% DE RATONES EXENTOS DE TUMOR 30 DÍAS DESPUÉS DE LA IRRADIACIÓN
1	No tratados	1/8	13
2	PBS + luz	0/7	0
3	Gelonina	0/8	0
4	Gelonina + "luz antes"	0/5	0
5	AIPcS _{2a}	0/10	0
6	AIPcS _{2a} + gelonina	0/7	0
7	AIPcS _{2a} + luz	2/11	18
8	AIPcS _{2a} + gelonina + "luz antes"	4/5	80

A partir de la Tabla 1, se puede ver que la PCI con gelonina usando el planteamiento de "luz antes" (grupo 8) curó al 80% (4 de 5) de los ratones de sus tumores. Por contraste, la gelonina sola no mostró efecto alguno, ni con (grupo 4) ni sin (grupo 3) el tratamiento lumínico adicional (sin AIPcS_{2a}). Tampoco la gelonina en combinación con AIPcS_{2a} sin tratamiento lumínico (grupo 6) mostró efecto alguno. Se vio un bajo índice de curación en los animales no tratados (grupo 1), probablemente debido a un tumor que desaparecía espontáneamente. También se pudo observar un bajo índice de curación en los animales que recibieron AIPcS_{2a} y tratamiento lumínico (grupo 7), debido a un efecto de la terapia fotodinámica (PDT) que era independiente de la presencia de gelonina. Sin embargo, este efecto de la PDT (18% de curación) era significativamente menor que el que se halló con el tratamiento de PCI con gelonina (80%, grupo 8). Puesto que la gelonina no ejercía por sí efecto alguno, el elevado índice de curación en el grupo de la PCI no puede ser explicado por un efecto aditivo de PDT y gelonina sino que debe serlo por un efecto sinérgico cuando el tratamiento por PCI extrae el potencial tóxico de la gelonina.

5

La Figura 25 muestra el efecto del tratamiento por PCI sobre el volumen tumoral medio en algunos de los grupos de tratamiento. Se puede ver que, en el grupo que sólo recibió gelonina (Δ), los tumores crecieron tan rápido como en los animales a los que se administró un tratamiento con placebo, por inyección de disolución salina tamponada con fosfato (PBS), combinado con irradiación (\blacksquare). En los animales que sólo recibieron el tratamiento fotoquímico pero no gelonina (\diamond), el crecimiento tumoral resultó retrasado pero los tumores comenzaron a crecer de nuevo aproximadamente 15 días después de la irradiación. Por contraste, en los animales que recibieron el tratamiento completo de PCI y gelonina (\bullet), no se pudo observar aumento alguno en el volumen tumoral medio ni siquiera 33 días después de la irradiación.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* o *ex vivo* para introducir una molécula en el citosol de una célula, método que comprende poner dicha célula en contacto con un agente fotosensibilizador que se localiza en endosomas, lisosomas, el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, poner dicha célula en contacto con la molécula que se va a introducir (molécula de transferencia) e irradiar dicha célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, en que dicha irradiación se lleva a cabo en un tiempo antes o al mismo tiempo que la puesta en contacto de dicha célula con la molécula de transferencia, en que (i) la molécula de transferencia no penetra fácilmente en las membranas celulares, y/o (ii) uno del agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia, o ambos, están fijados a, asociados con, o conjugados con, una o más moléculas vehiculares, moléculas para transporte dirigido o vectores.
2. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 1, en que la célula es puesta en contacto con la molécula de transferencia en un punto temporal después de que haya tenido lugar la irradiación.
3. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 2, en que la célula es puesta en contacto con dicha molécula de transferencia de 0 a 4 horas después de que haya tenido lugar la irradiación.
4. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 1, en que la célula es puesta en contacto con la molécula de transferencia en el mismo momento que la irradiación.
5. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en que la molécula de transferencia es puesta en contacto con dicha célula durante un periodo de 30 minutos a 6 horas.
6. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en que dicha molécula de transferencia es una proteína, péptido, anticuerpo o antígeno o fragmento del mismo.
7. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en que dicha molécula de transferencia, o una parte o fragmento de la misma, se presenta o expresa en la superficie celular.
8. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 8, en que dicha célula es una célula presentadora de antígeno.
9. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en que dicha molécula de transferencia es un fármaco citotóxico.
10. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en que dicha molécula de transferencia es una molécula de ácido nucleico.
11. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 10, en que dicha molécula de ácido nucleico está incorporada a una molécula vector.
12. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11, en que el agente fotosensibilizador es seleccionado del grupo que consiste en TPPS₄, TPPS_{2a}, AlPcS_{2a} y otros fotosensibilizadores anfipáticos.
13. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11, en que dichos agentes fotosensibilizadores son compuestos que son el ácido 5-aminolevulínico o ésteres del ácido 5-aminolevulínico o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
14. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13, en que dicho agente fotosensibilizador es puesto en contacto con dichas células durante un periodo de 4 a 24 horas antes de la irradiación.
15. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 14, en que dicho agente fotosensibilizador es puesto en contacto con dichas células durante un periodo de 4 a 24 horas inmediatamente antes de la irradiación.
16. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 15, en que dicho agente fotosensibilizador es retirado después del contacto con dicha célula durante un periodo de 1 a 4 horas antes de la irradiación.
17. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 16, en que el vehículo, la molécula para transporte dirigido o el vector al que, o con el que, se fija, asocia o conjuga la molécula de transferencia es un adenovirus, un polición, un lípido catiónico o un péptido o un vector dirigido.
18. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 17, en que dicha molécula de transferencia se fija a, o se asocia o conjuga con, un vector, y dicho vector se fija a, o se asocia o conjuga con, una molécula vehicular, una molécula para transporte dirigido o un vector.
19. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 11 a 18, en que dicho vector es un adenovirus.

20. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 17, en que dicho polícatión es poli-L-lisina, poli-D-lisina o SuperFect®.
21. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 17 o 18, en que dicho lípido catiónico es DOTAP.
- 5 22. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 19, en que dicha molécula vehicular es un liposoma o una construcción de base lipídica, que contiene preferiblemente al menos un lípido catiónico.
23. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8 o 10 a 22, en que al menos el 50% de dichas células en que se introduce dicha molécula no resultan muertas.
24. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 23, en que la operación de irradiación es de 1 a 10 minutos.
- 10 25. Uso de una molécula de transferencia y un agente fotosensibilizador, en que el agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia son como se definen en cualquier reivindicación precedente, para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección, preferiblemente para terapia génica, estimular una respuesta inmune o tratar o prevenir un cáncer, en que dicho agente fotosensibilizador y, separadamente, dicha molécula de transferencia se van a poner en contacto con células o tejidos de un
- 15 paciente y dichas células se van a irradiar con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, y la irradiación se va a llevar a cabo en un momento antes o en el mismo momento que la puesta en contacto de dicha célula con la molécula de transferencia, en que dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica.
- 20 26. Uso de una molécula de transferencia como se define en cualquier reivindicación precedente, para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección, preferiblemente para terapia génica, estimular una respuesta inmune o tratar o prevenir un cáncer, en que dicha enfermedad, trastorno o infección se va a tratar poniendo células o tejidos de un paciente en contacto con dicho medicamento, y, separadamente, un agente fotosensibilizador como el definido en cualquier reivindicación precedente se va a poner en contacto con dichas células o tejidos de dicho paciente, y dichas células se van a irradiar con luz de una
- 25 longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, y la irradiación se va a llevar a cabo en un momento antes o en el mismo momento que la puesta en contacto de dicha célula con la molécula de transferencia, en que dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica.
- 30 27. Una composición que contiene una molécula de transferencia y, separadamente, un agente fotosensibilizador, en que el agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia son como se definen en cualquier reivindicación precedente, como una composición combinada para uso separado o secuencial en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección, preferiblemente para terapia génica, estimular una respuesta inmune o tratar o prevenir un cáncer, en que dicho agente fotosensibilizador y, separadamente, dicha molécula de transferencia se van a poner en contacto con células o tejidos de un paciente y dichas células se van a irradiar con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, y la irradiación se va a llevar a cabo en un momento
- 35 antes o en el mismo momento que la puesta en contacto de dicha célula con la molécula de transferencia, en que dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica.
- 40 28. Una molécula de transferencia como la definida en cualquier reivindicación precedente, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección, preferiblemente para terapia génica, estimular una respuesta inmune o tratar o prevenir un cáncer, en que dicha enfermedad, trastorno o infección se va a tratar poniendo células o tejidos de un paciente en contacto con dicha molécula de transferencia, y, separadamente, un agente fotosensibilizador como el definido en cualquier reivindicación precedente se va a poner en contacto con dichas células o tejidos de dicho paciente, y dichas células se van a irradiar con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, y la irradiación se va a llevar a cabo en un momento antes o en el mismo momento que la puesta en contacto de dicha célula con la molécula de transferencia, en que dicha molécula de transferencia es una
- 45 molécula terapéutica.
29. Un uso, composición o molécula de transferencia como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 25 a 28, en que dicho método de incorporación celular se va a llevar a cabo del modo descrito en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, 14, 15, 16, 23 o 24.
- 50 30. Un uso, composición o molécula de transferencia como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 25 a 29 para vacunación, en que dicha molécula de transferencia es una molécula antigénica y dicha molécula de transferencia, o una parte o fragmento de la misma, se va a presentar o expresar en la superficie celular.

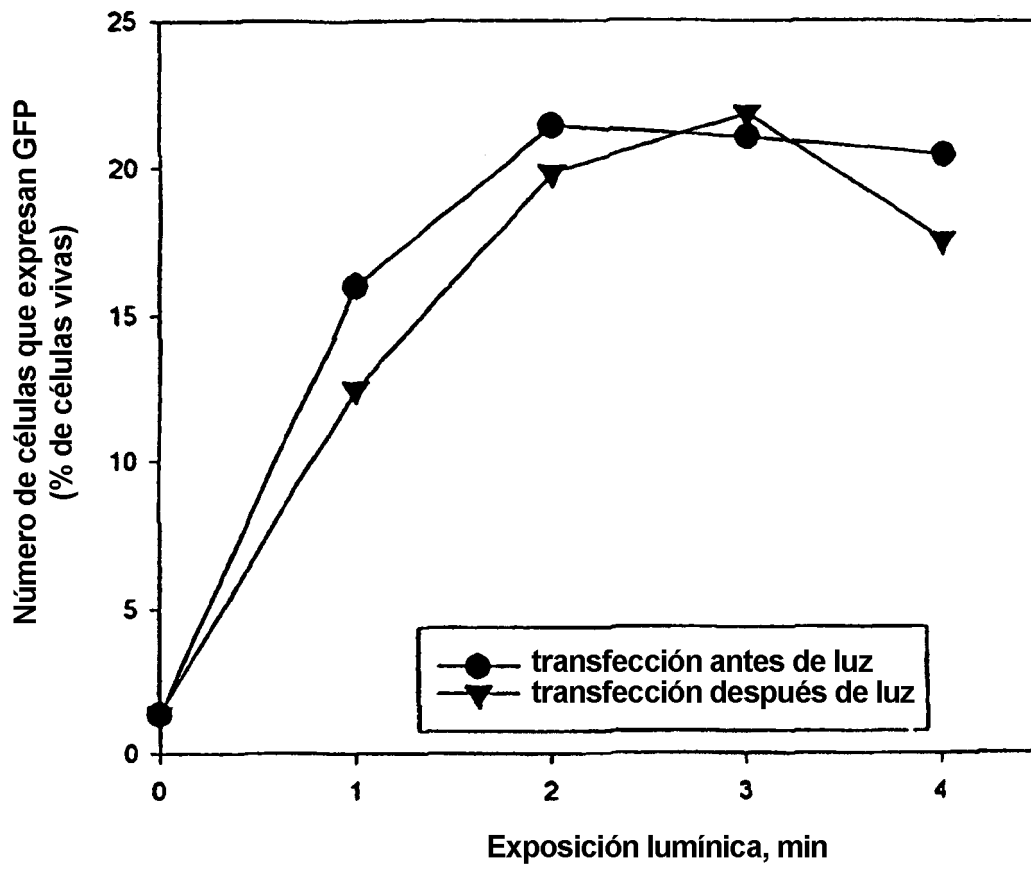


Figura 1

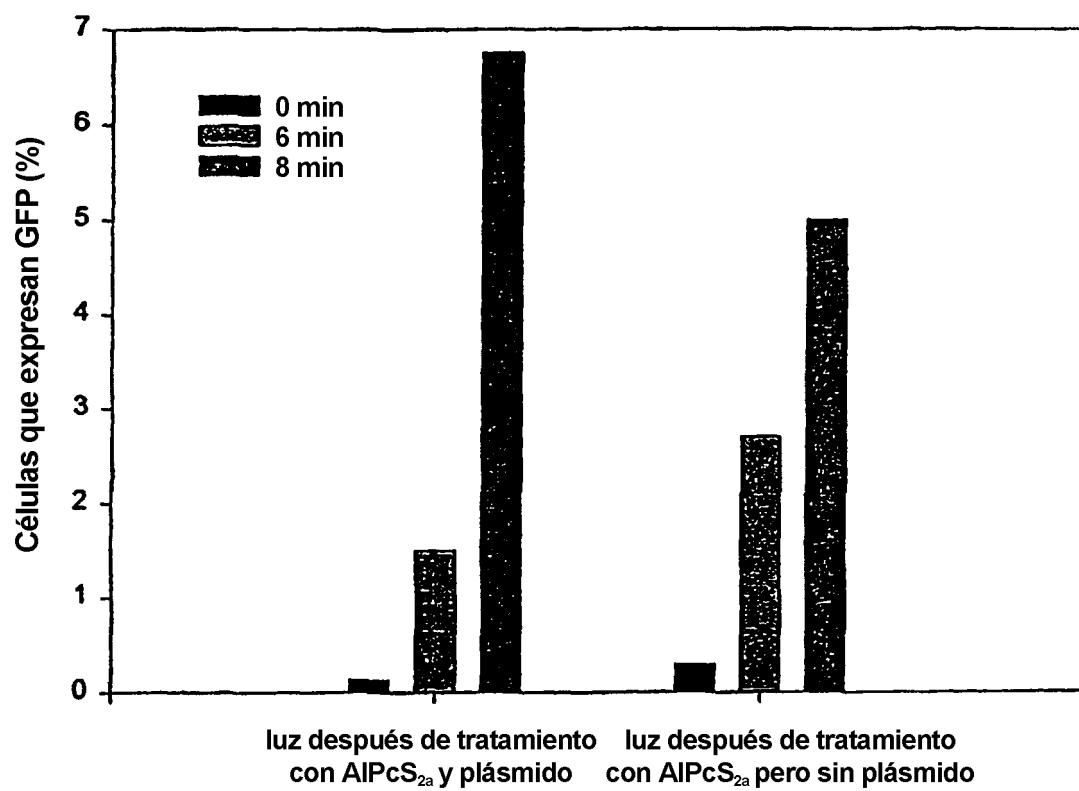
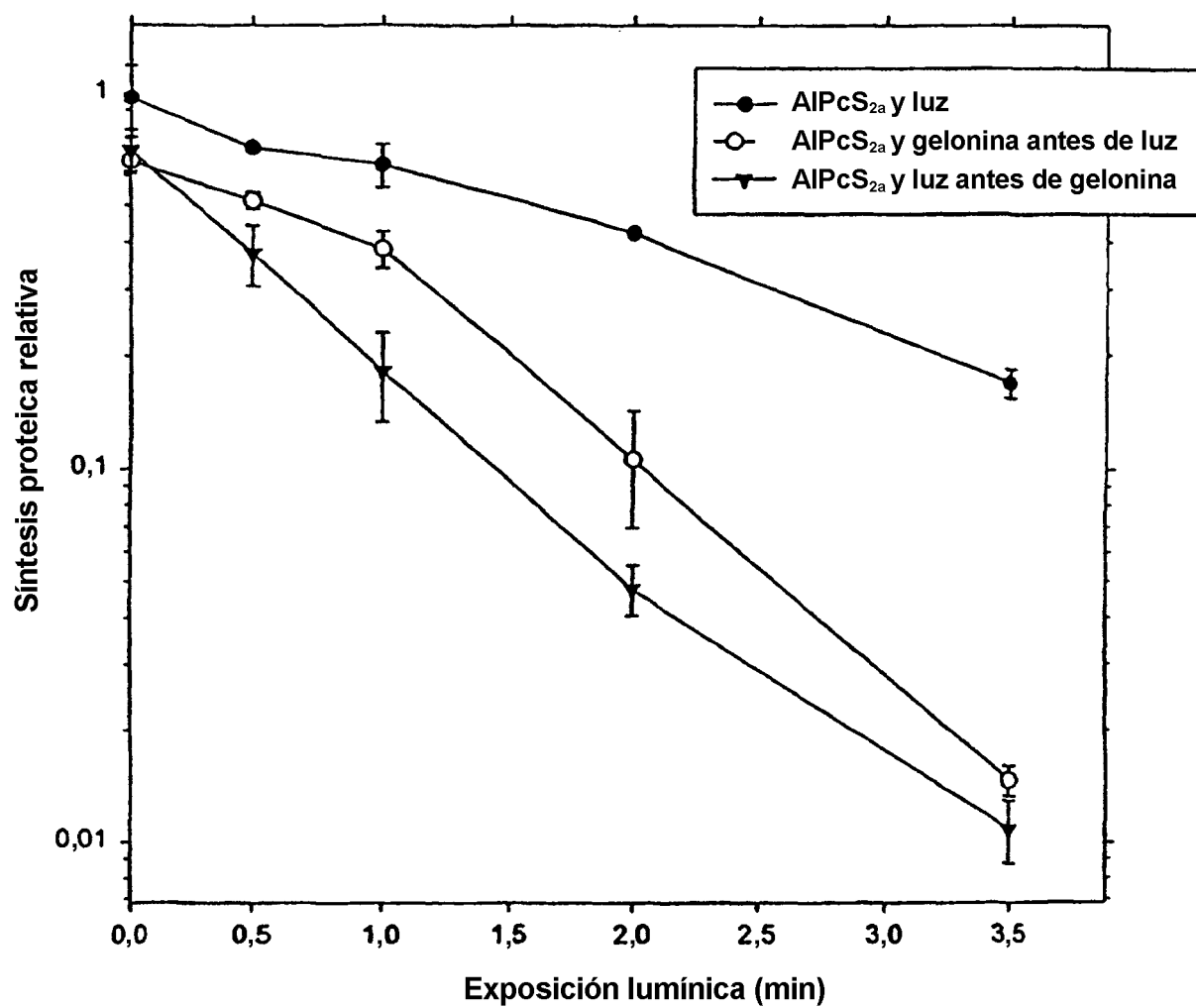


Figura 2

**Figura 3**

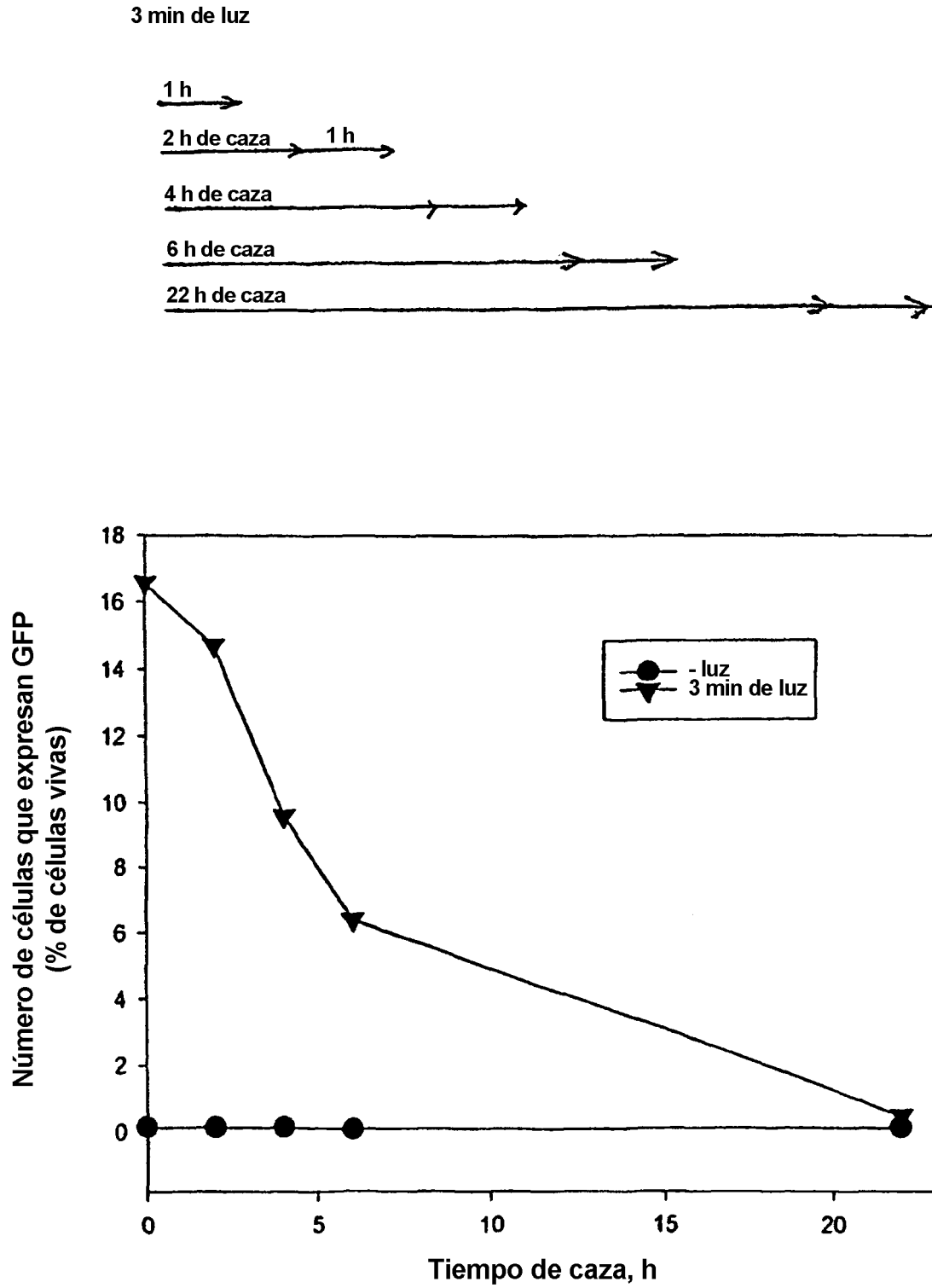
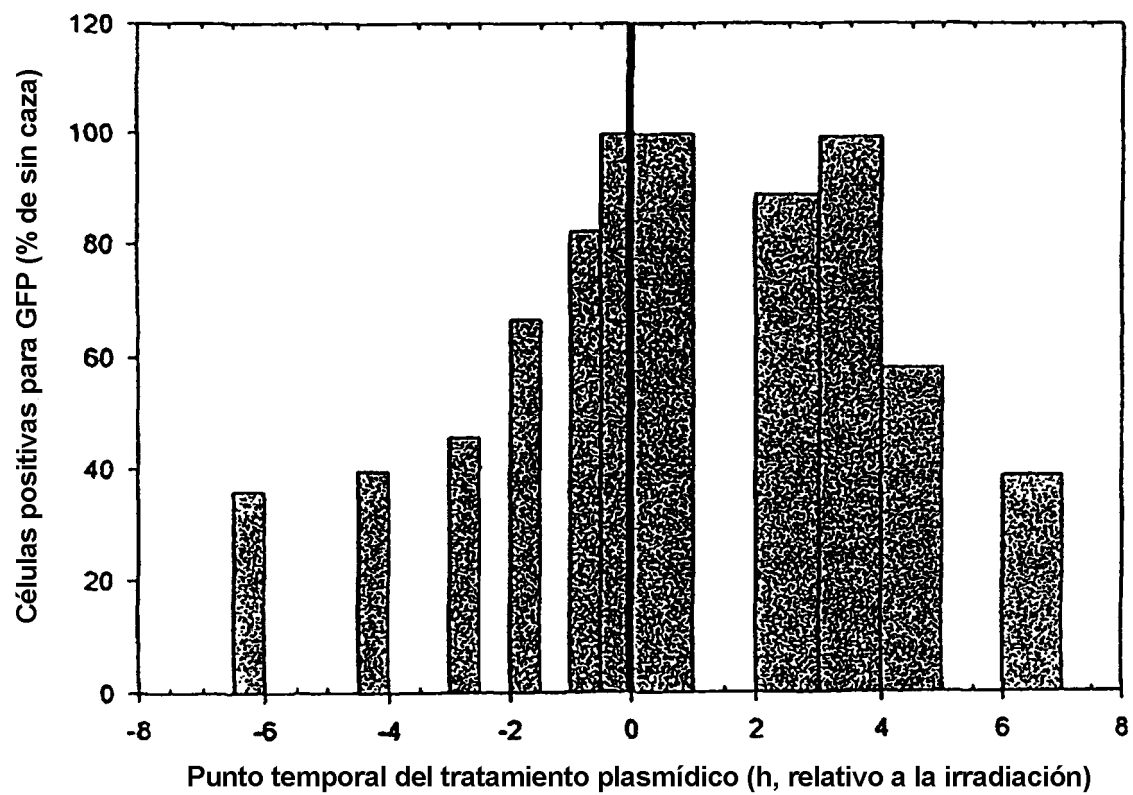
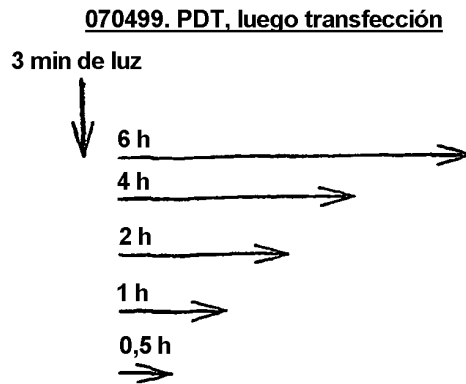


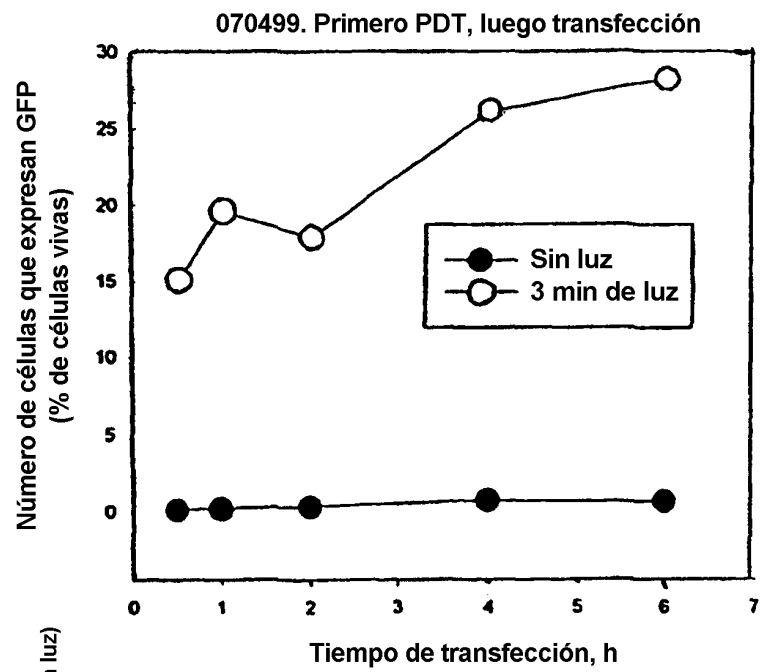
Figura 4

**Figura 5**

A



B



C

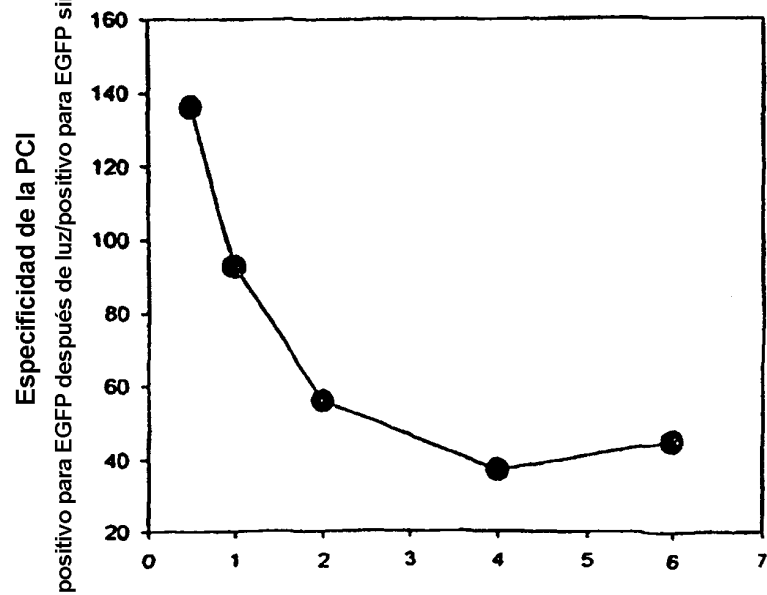


Figura 6

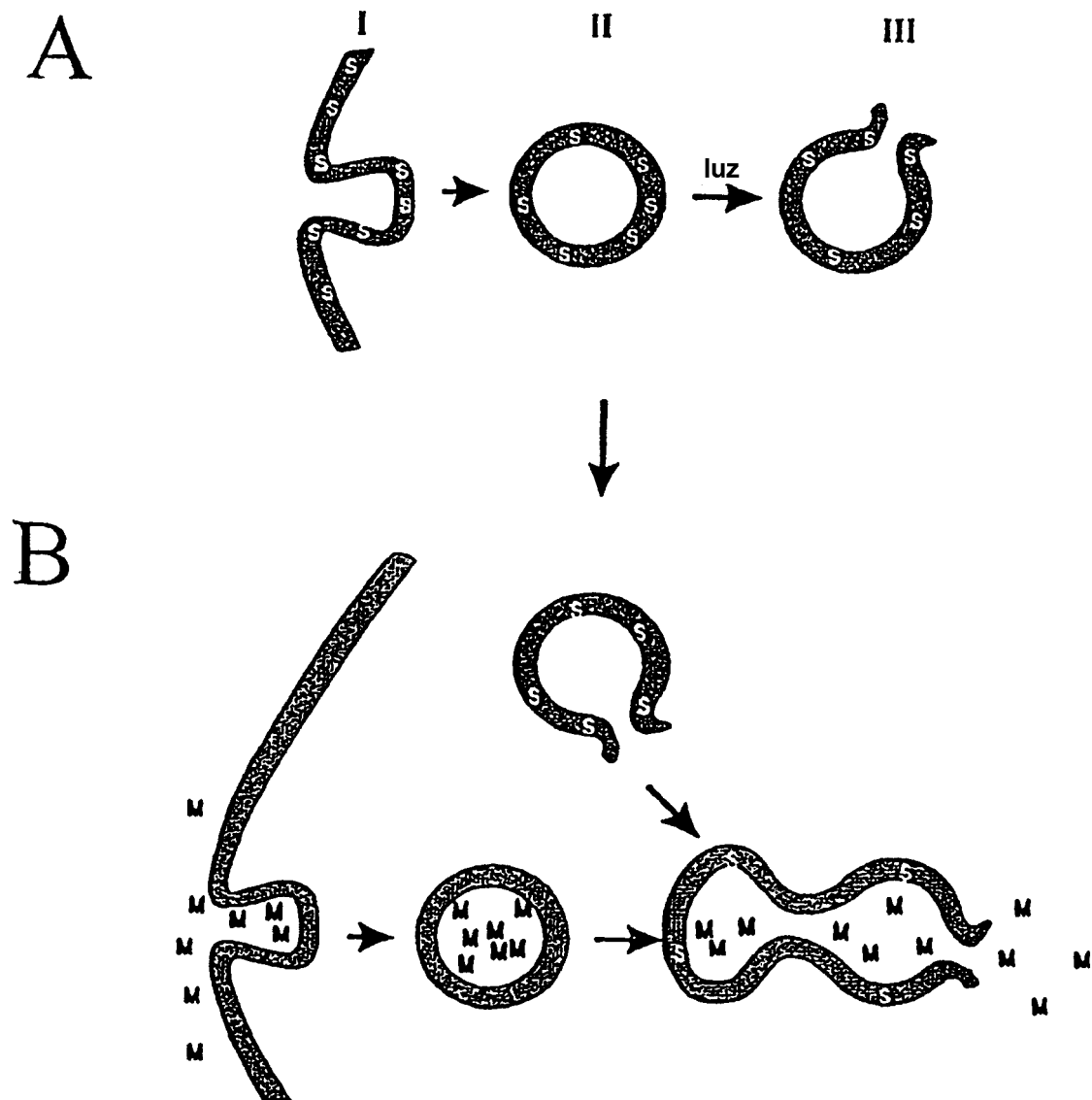


Figura 7

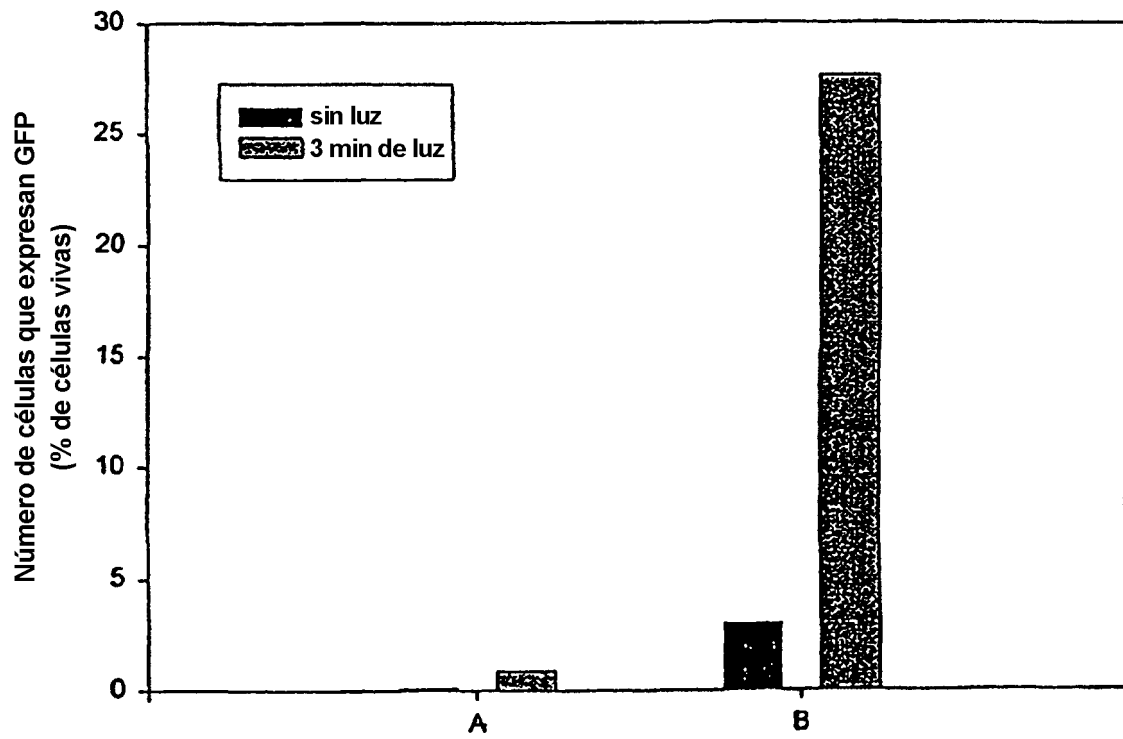


Figura 8

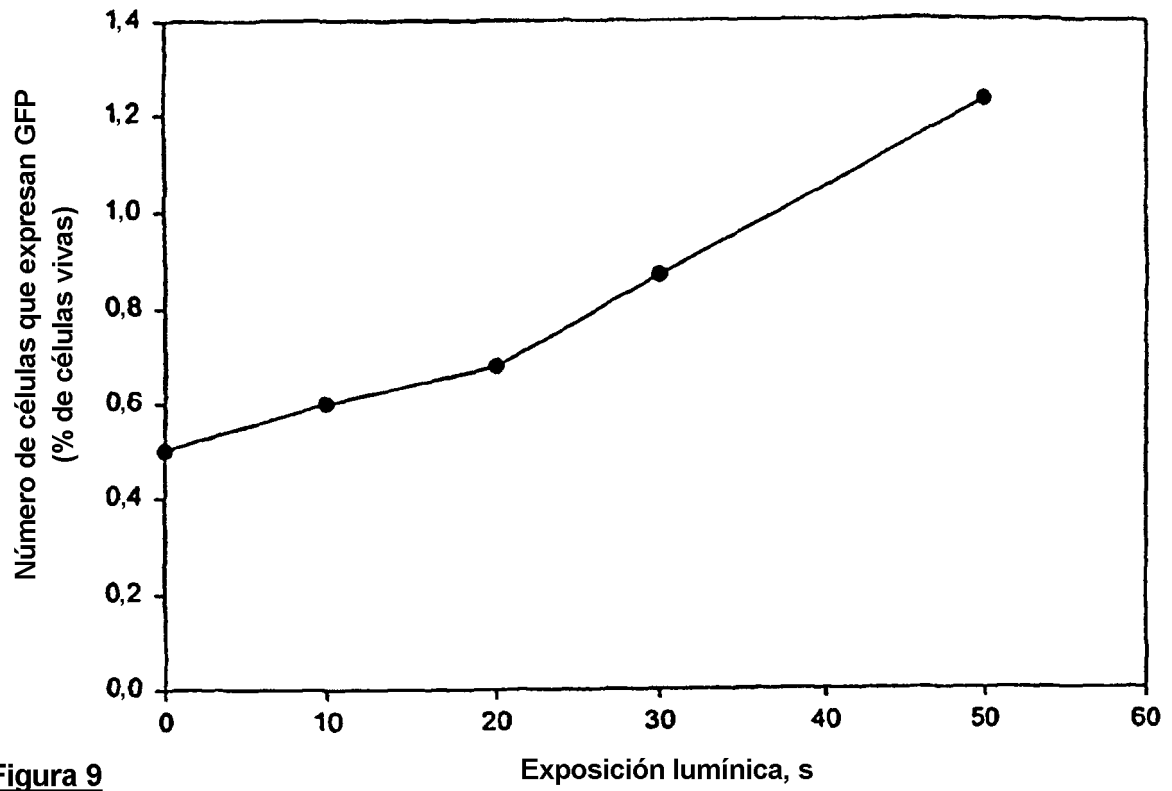


Figura 9

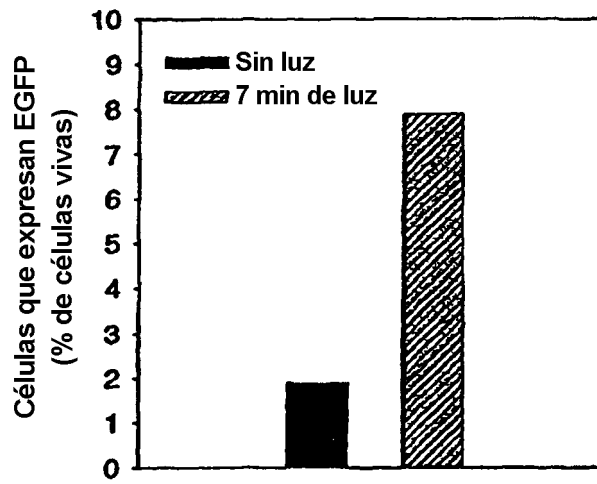


Figura 10

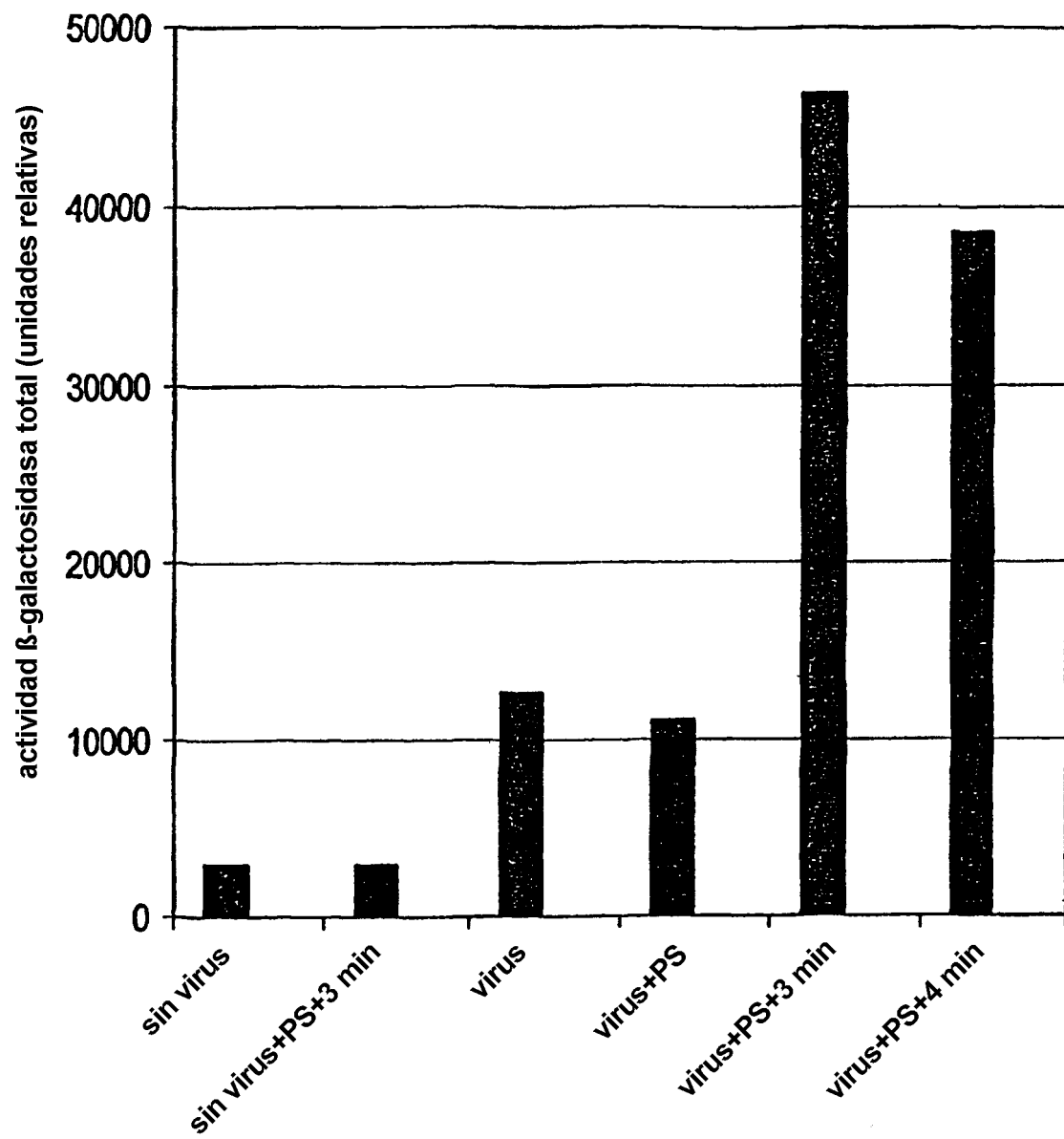


Figura 11

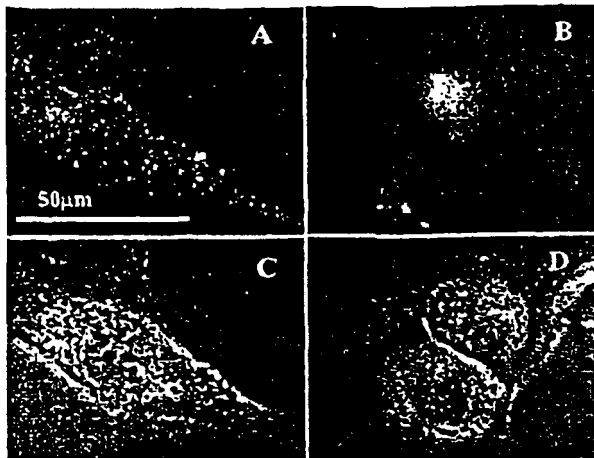


Figura 12

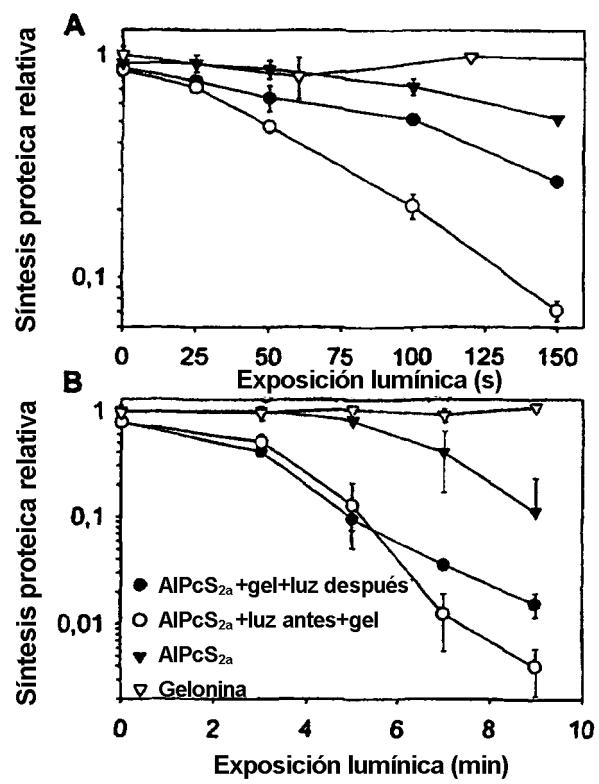


Figura 13

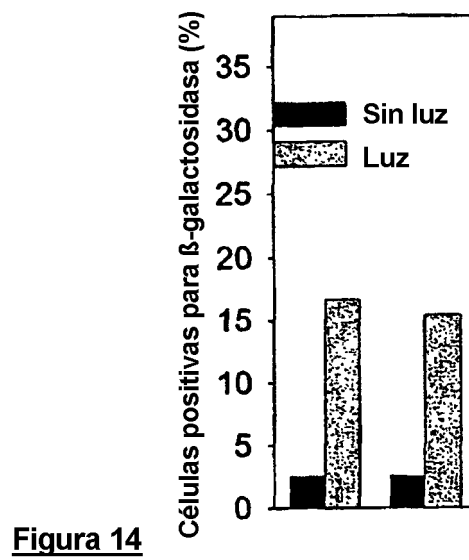


Figura 14

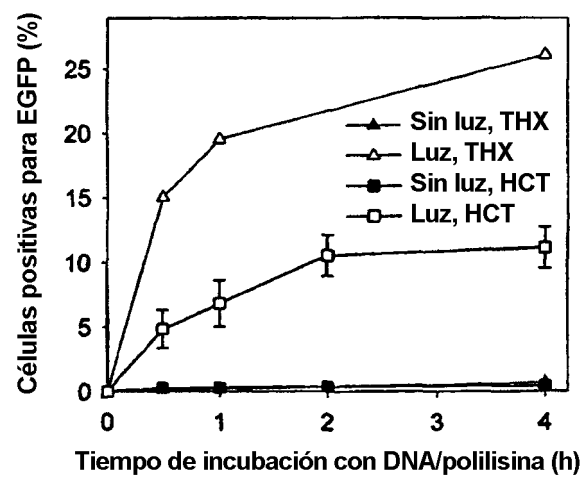


Figura 15

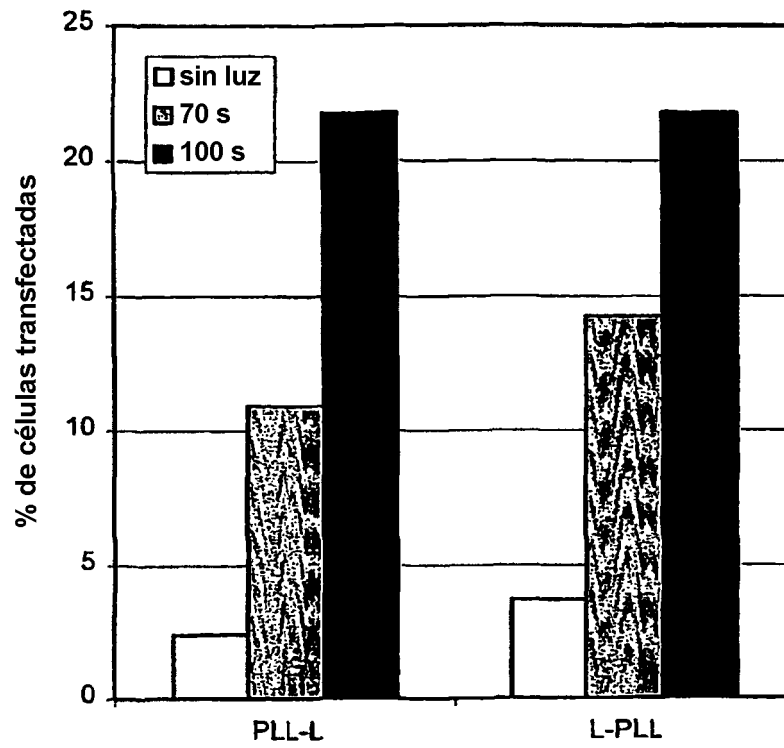


Figura 16

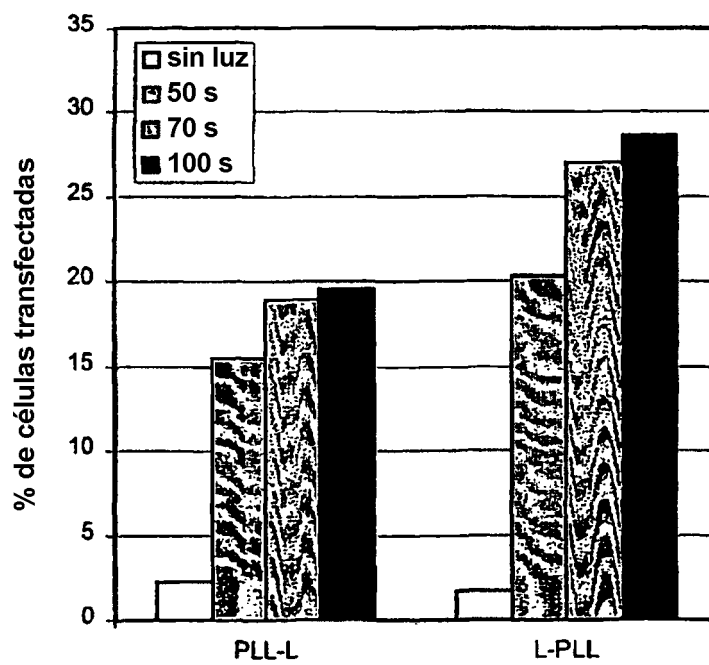


Figura 17

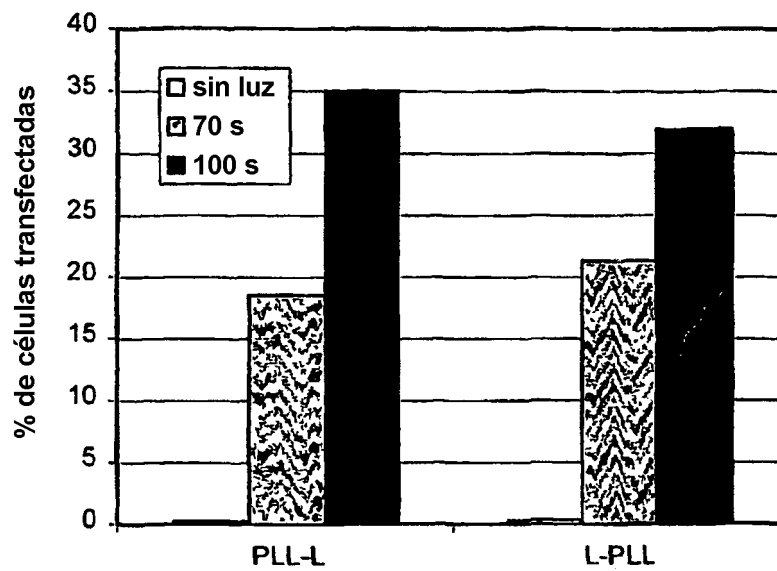


Figura 18

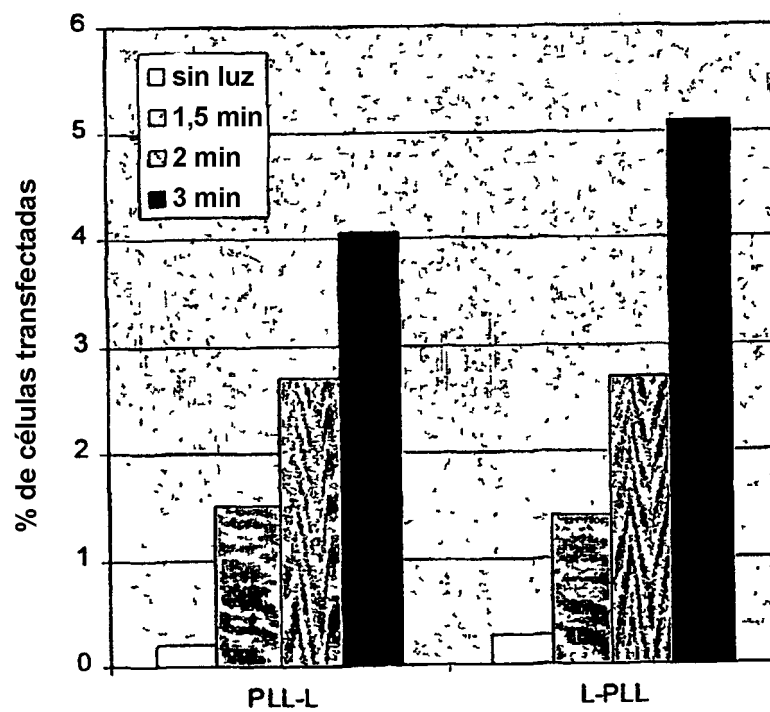


Figura 19

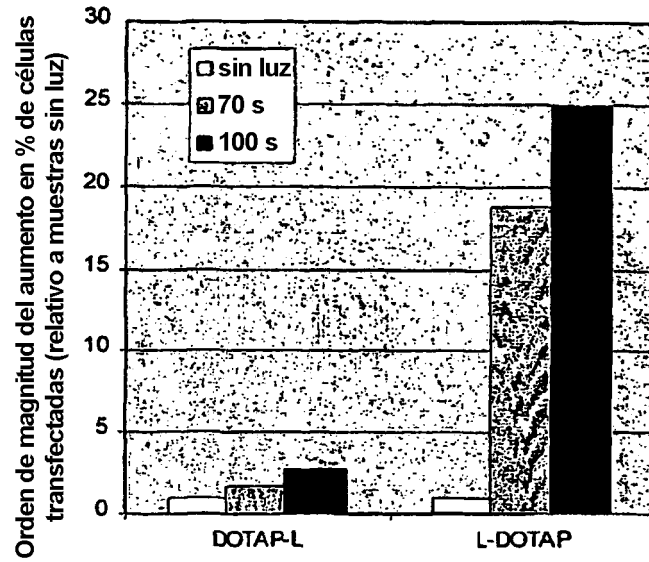


Figura 20

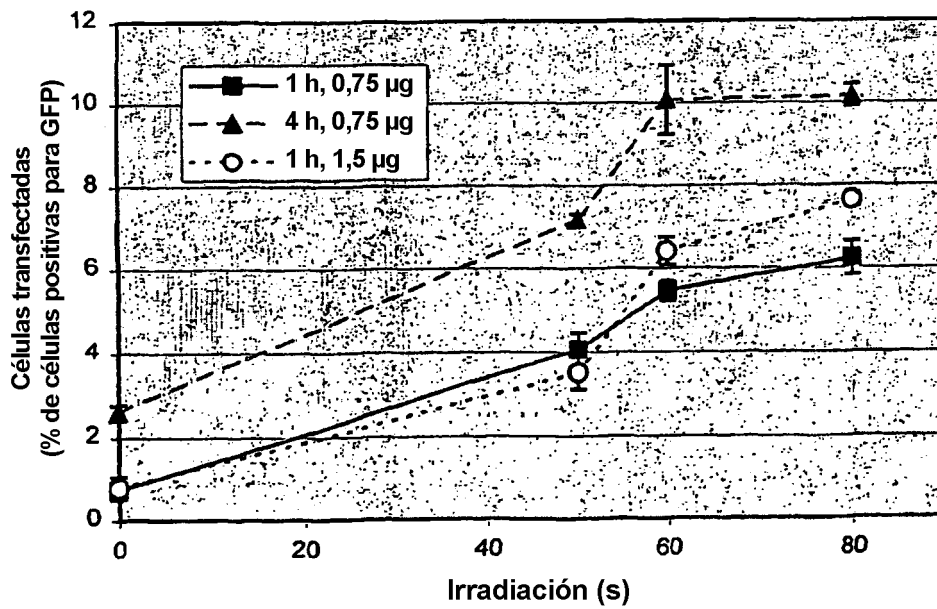


Figura 21

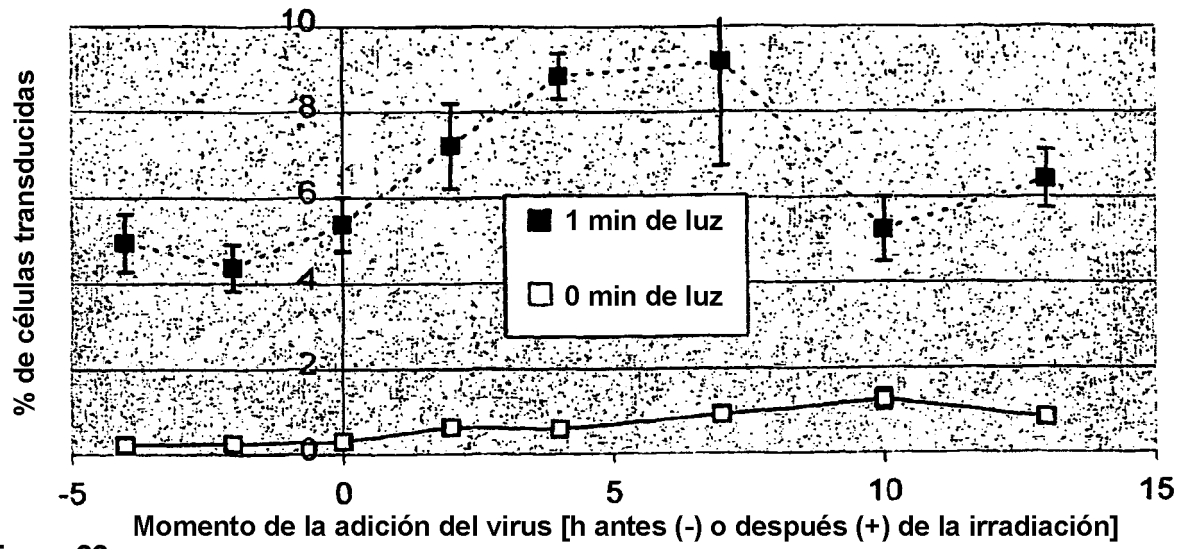


Figura 22

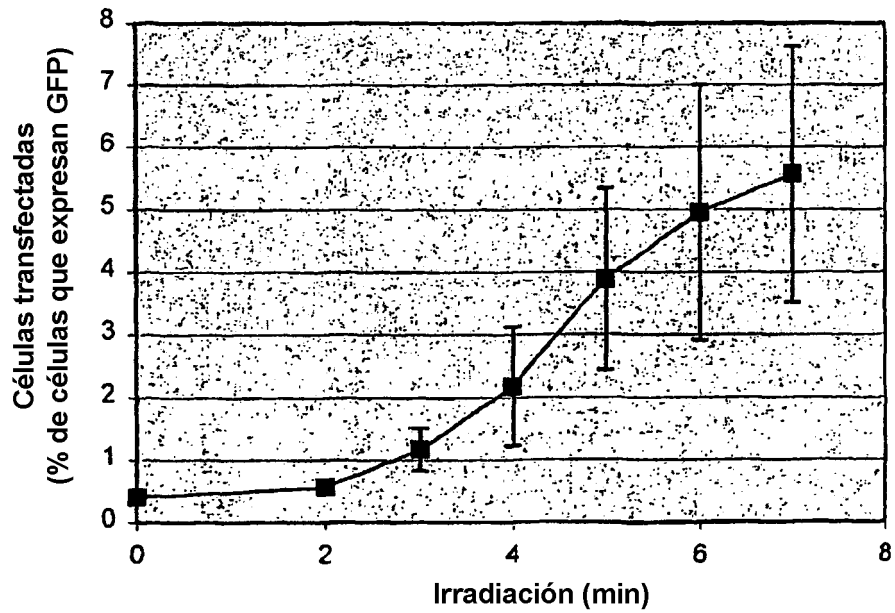


Figura 23

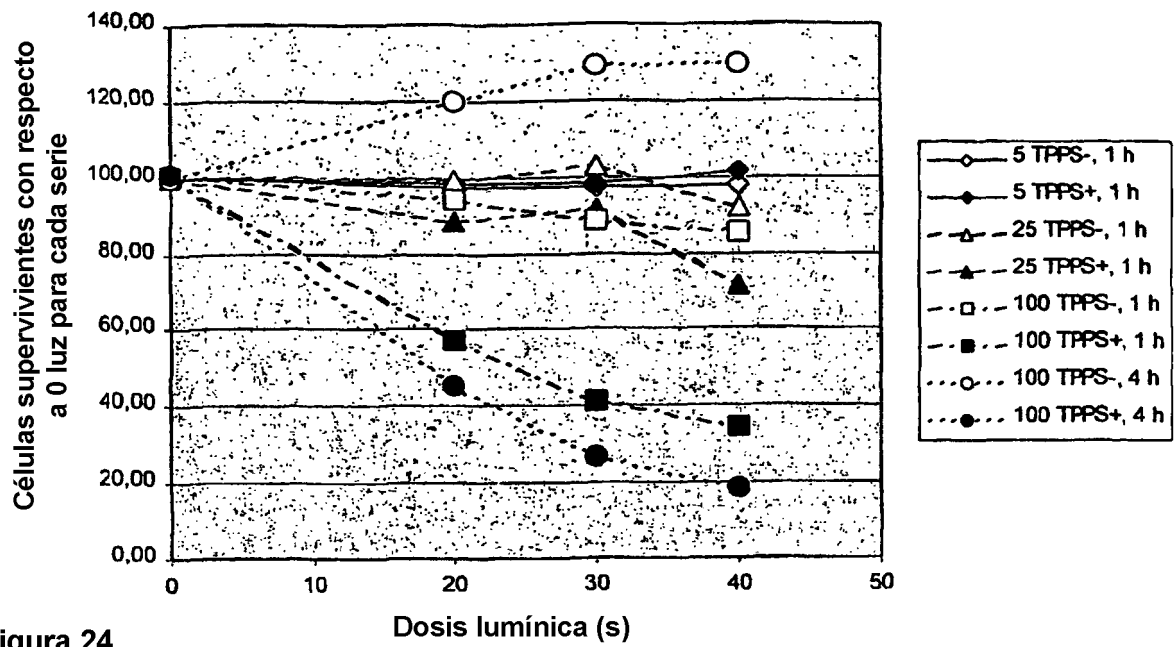


Figura 24

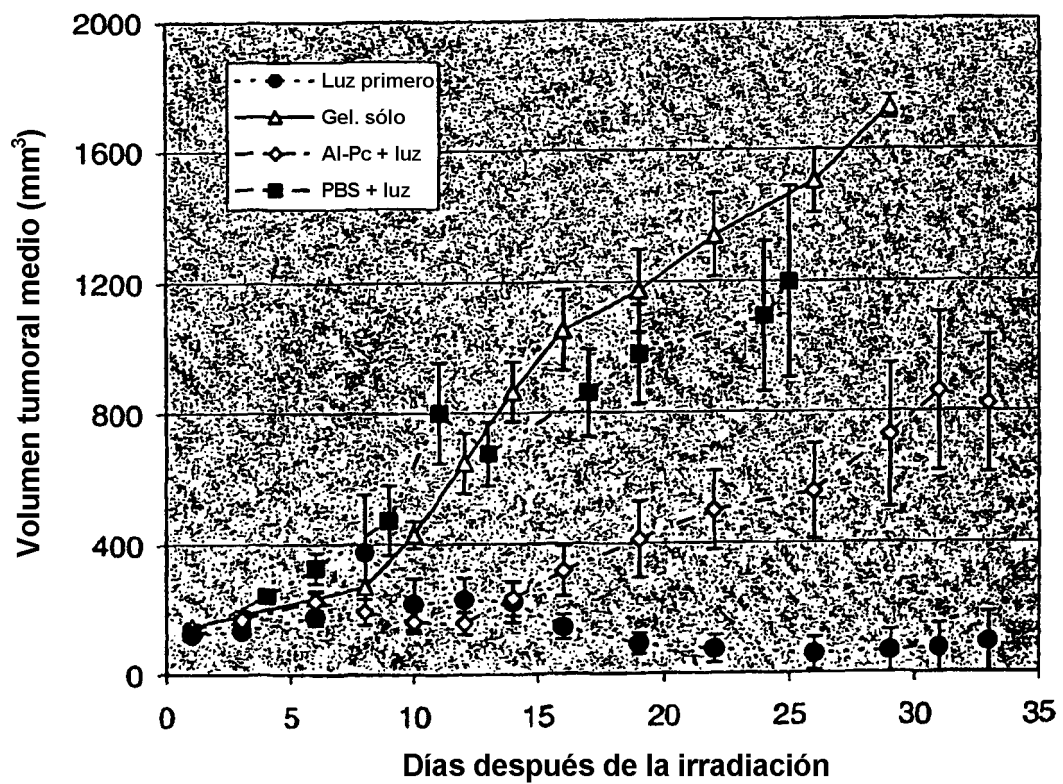


Figura 25