

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 579**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/87** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 15/861** (2006.01)

**A61K 41/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2001 E 01998645 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1339862**

54 Título: **Internalización fotoquímica para el suministro de moléculas mediado por virus en el citosol**

30 Prioridad:

**29.11.2000 GB 0029142**

**01.12.2000 GB 0029405**

**15.06.2001 GB 0114696**

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

**04.03.2014**

73 Titular/es:

**PCI BIOTECH AS (100.0%)**

**HOFFSVEIEN 48**

**0377 OSLO, NO**

72 Inventor/es:

**HOGSET, ANDERS;**

**BERG, KRISTIAN;**

**MÆLANDSMO, GUNNHILD MARI;**

**ENGESÆTER, BIRGIT OVSTEBØ y**

**PRASMICKAITE, LINA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 445 579 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 el suministro de moléculas mediado por virus en el citosol

**Método**

5 La presente invención se refiere a un método de introducción de moléculas en células usando un agente fotosensibilizador e irradiación de células con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, en donde la molécula que se va a introducir está asociada con un vehículo vírico y en particular un vehículo adenovírico. La presente invención se refiere además al uso de este método en la terapia génica.

10 Se reconoce que la terapia génica, es decir la modificación genética de las células de un paciente con el fin de combatir una enfermedad, tiene un gran potencial terapéutico para tratar una variedad de enfermedades, tales como el cáncer, enfermedades infecciosas incluyendo infecciones víricas y bacterianas, enfermedades cardiovasculares, trastornos hereditarios tales como fibrosis quística, trastornos del sistema inmunitario y otras muchas afecciones. Sin embargo, el desarrollo clínico de la terapia génica todavía se enfrenta a muchos desafíos no resueltos, de los cuales uno de los más importantes es encontrar métodos para el suministro eficaz y específico de genes terapéuticos a las células diana in vivo (Verma & Somia, 1997, *Nature*, vol. 389, 239-242 y Anderson, 1998, *Nature* vol. 392, 25-30).

15 La terapia génica puede implicar muchos posibles procedimientos diferentes y puede implicar la transferencia de genes o segmentos de genes humanos clonados, genes o segmentos de genes humanos de doble cadena, genes de otros genomas y organismos, oligonucleótidos y diferentes genes artificiales o fragmentos de los mismos tales como genes de sentido contrario.

20 En los métodos actuales se han sugerido muchos vehículos o vectores diferentes para usar para lograr la transferencia en la terapia génica. Como ejemplos, se pueden mencionar compuestos policationicos, lípidos catiónicos y sistemas víricos, 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 en el suero del vector, especificidad limitada en el suministro génico, baja eficacia en el suministro génico etc. El uso de vehículos víricos se ha hecho con precaución particular debido a la introducción de elementos víricos en hospedantes que pueden causar efectos adversos tales como inflamación, que no están compensados por la transferencia potenciada comparada con otros métodos.

30 La mayoría de las moléculas no penetran fácilmente las membranas celulares. Los métodos para introducir moléculas en el citosol de células vivas son conocidos en la técnica y son herramientas útiles para manipular y estudiar procesos biológicos. Entre los métodos usados más habitualmente están la microinyección, fusión mediada por fantasmas de eritrocitos y fusión de liposomas, lisis osmótica de pinosomas, raspado de la membrana celular, electroporación, fosfato de calcio y transfección mediada por virus. Estas técnicas son útiles para manipular células en cultivo, aunque en muchos casos pueden ser impracticables, requerir mucho tiempo, ineficaces o pueden inducir muerte celular significativa. Por lo tanto, dichas técnicas no son óptimas para usar en investigación biológica o médica, o en terapias, donde a menudo no son suficientemente eficaces, pueden tener efectos tóxicos intolerables o pueden no ser aplicables por razones técnicas.

35 Es bien conocido que las porfirinas y muchos otros compuestos fotosensibilizadores pueden inducir efectos citotóxicos en células y tejidos. Estos efectos se basan en el hecho de que tras exposición a la luz, el compuesto fotosensibilizador puede convertirse en tóxico o puede liberar sustancias tóxicas tales como oxígeno singlete u otras especies oxidantes que dañan el material celular o biomoléculas, incluyendo las membranas celulares y estructuras celulares, y dicho daño celular o de membrana finalmente puede matar a las células. Estos efectos se han usado en el tratamiento de diferentes anomalías o trastornos, incluyendo en especial enfermedades neoplásicas. El tratamiento se llama terapia fotodinámica (PDT) e implica la administración de agentes fotosensibilizadores (fotoquimioterapéuticos) a la zona afectada del cuerpo, seguido de la exposición a luz fotoactivante con el fin de activar agentes fotosensibilizadores y convertirlos en la forma citotóxica, de modo que las células afectadas mueren o disminuye su potencial proliferativo. Se conocen agentes fotosensibilizadores que localizarán de forma preferencial o selectiva el sitio diana deseado, p. ej., en un tumor u otra lesión.

40 Se conocen una variedad de agentes fotosensibilizadores, incluyendo en particular psoralenos, porfirinas, clorinas y ftalocianinas. Dichos fármacos se vuelven tóxicos cuando se exponen a la luz.

50 Los fotosensibilizadores porfirínicos actúan indirectamente por generación de especies de oxígeno tóxicas, y se consideran candidatos particularmente favorables para PDT. Las porfirinas son precursores naturales en la síntesis del grupo hemo. En particular, el grupo hemo se produce cuando se incorpora hierro ( $Fe^{3+}$ ) en la protoporfirina IX (PpIX) por acción de la enzima ferroquelatasa. La PpIX es un fotosensibilizador muy potente, mientras que el grupo hemo no tiene efecto fotosensibilizador. Se conocen una variedad de fotosensibilizadores basados en porfirina o relacionados con porfirina en la técnica y están descritos en la bibliografía.

55 El efecto citotóxico es mediado principalmente por la formación de oxígeno singlete. Este producto intermedio reactivo tiene un tiempo de vida muy corto en las células ( $<0,04 \mu s$ ). Por lo tanto, el efecto citotóxico principal de PDT se produce durante la exposición a la luz y muy cerca de los sitios de formación de  $^1O_2$ . El  $^1O_2$  reacciona y

oxida proteínas (histidina, triptófano, metionina, cisteína, tirosina), ADN (guanina), ácidos grasos insaturados y colesterol. Una ventaja de la PDT es que los tejidos no expuestos a la luz se pueden dejar sin afectar, es decir, que se puede obtener un efecto de PDT selectivo. Hay una amplia documentación en relación con el uso de la PDT para destruir poblaciones celulares no deseadas, por ejemplo células neoplásicas. La bibliografía de patentes describe una serie de compuestos fotodinámicos, solos o conjugados con agentes directores, p. ej., inmunoglobulinas dirigidas a determinados receptores de células neoplásicas, que hacen al complejo más específicos de la célula. Algunos compuestos fotoquímicos, tales como los derivados de hematoporfirina, tienen además una capacidad inherente para localizar células malignas. Dichos métodos y compuestos se describen en la patente noruega n° 173319 y en las solicitudes de patente noruegas n° 900731, 176645, 176947, 180742, 176786, 301981, 300499 y 891491. Dichos métodos de PDT dependen, por lo tanto, de la destrucción de estructuras celulares que conducen a la muerte celular.

Por otra parte, el documento WO 96/07432 o la solicitud de patente en tramitación junto con la presente WO 00/54802, se refieren a métodos que usan el efecto fotodinámico como mecanismo para introducir moléculas de otra forma impermeables a través de la membrana al citosol de una célula de una forma que no produce necesariamente la destrucción celular extendida o muerte celular. En estos métodos, se aplican la molécula que se va a internalizar y un compuesto fotosensibilizador de forma simultánea o secuencial a las células, después de lo cual el compuesto fotosensibilizador y la molécula son endocitados o translocados de otra forma dentro de los endosomas, liposomas u otros compartimentos intracelulares restringidos con membrana.

La molécula que se va a translocar y el compuesto fotosensibilizador se aplican a las células juntos o de forma secuencial (preferiblemente por separado y de forma secuencial) y son absorbidos por la célula juntos en los mismos compartimentos intracelulares (es decir, son cotranslocados). La molécula que se va a internalizar dentro de la célula después es liberada por exposición de las células a la luz de longitudes de onda adecuadas para activar el compuesto fotosensibilizador, que a su vez conduce a la alteración de las membranas de los compartimentos celulares y la posterior liberación de la molécula, que se encuentra en el mismo compartimento que el agente fotosensibilizador, en el citosol. Este método se denominó "internalización fotoquímica" o PCI. Por lo tanto, en estos métodos, la etapa final de exposición de las células a la luz da como resultado que la molécula en cuestión sea liberada del mismo compartimento intracelular que el agente fotosensibilizador y estén presentes en el citosol.

Se creyó que con el fin de que esta técnica fuera eficaz, era esencial que tanto el compuesto fotosensibilizador como la molécula que se iba a liberar en el citosol estuvieran presentes en los mismos compartimentos intracelulares cuando se llevara a cabo la irradiación. Sin embargo, desde entonces se ha encontrado que las moléculas se pueden introducir en el citosol de células por métodos similares a la PCI pero donde la exposición de las células a la luz no es necesariamente la etapa final y los métodos no dependen de que la molécula de transferencia y el agente fotosensibilizador estén ubicados en los mismos compartimentos intracelulares en el momento de exposición a la luz. En dichos métodos, el agente fotosensibilizador se puede poner en contacto con las células y activar por irradiación antes de que la molécula que se va a internalizar y así liberar al citosol se ponga en contacto con las células. Por lo tanto, a pesar del hecho de que la molécula que se va a internalizar y el agente fotosensibilizador no están necesariamente ubicados en los mismos compartimentos intracelulares en el momento de exposición a la luz, la molécula todavía entra en la célula y es liberada al citosol. Estos resultados se describen con detalle en la solicitud de patente internacional en tramitación junto con la presente (presentada el 29 de noviembre de 2001 en nombre de la Norwegian Radium Hospital Research Foundation, titulada "Método").

Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso de técnicas de PCI en combinación con vectores víricos puede mejorar sustancialmente el suministro de genes mediado por virus en una célula. Puesto que los tratamientos fotoquímicos se usan en clínica (Dougherty et al, 1998, *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 90, 889-905), y en general son muy específicos y tienen pocos efectos secundarios, la tecnología descrita tiene un claro potencial para mejorar tanto la eficacia como la especificidad de la terapia génica in vivo.

Por lo tanto, la presente invención describe un método para introducir una molécula en una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un agente fotosensibilizador, poner en contacto dicha célula con la molécula que se va a introducir que está asociada con un vehículo vírico, e irradiar dicha célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador.

Estas etapas se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado con la condición de que el resultado final sea la absorción celular del vehículo vírico y por consiguiente la molécula que se va a introducir en la célula y la internalización de esta molécula. No se requieren otras moléculas excepto el vehículo vírico y el agente fotosensibilizador para llevar a cabo la invención.

El término "células" se usa en la presente memoria para incluir todas las células eucariotas, incluyendo células de insecto y células fúngicas e incluyendo células somáticas y germinales. Las "células" representativas incluyen, por lo tanto, todos los tipos de células de animales mamíferos y no mamíferos, células de plantas, células de insectos, células fúngicas, protozoos y protoplastos, y preferiblemente células de mamífero tales como células humanas, de ratón, rata, gato, perro, oveja, caballo, vaca o cabra.

"Internalización" como se usa en la presente memoria, se refiere al suministro de las moléculas que se van a

introducir en las células (a veces denominadas en la presente memoria "moléculas de transferencia"), con o sin el vehículo vírico todavía unido, al citosol. Por lo tanto, en el presente caso, "internalización" incluye la etapa de liberar la molécula que se va a introducir, opcionalmente asociada con todo o parte de su vehículo vírico, de los compartimentos intracelulares/unidos a membrana al citosol, y posteriormente se puede transferir al núcleo. Una vez internalizada, se considera que la molécula se ha "introducido" en la célula de acuerdo con el método de la invención.

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

Como se usa en la presente memoria, "absorción celular" o "translocación" se refiere a una de las etapas de internalización en la que las moléculas o entidades externas a la membrana celular son absorbidas en la célula de modo que se encuentran en el interior de la membrana celular situada en el exterior, p. ej., por endocitosis u otros mecanismos de absorción adecuados, por ejemplo en o asociado con un compartimento intracelular restringido con membrana, por ejemplo el retículo endoplásmico, cuerpo de Golgi, lisosomas, endosomas, etc.

Las "moléculas" adecuadas para introducir en la célula pueden ser cualquiera que se pueda asociar con vehículos víricos, vectores víricos o partículas víricas y a veces se denominan en la presente memoria como "moléculas de transferencia". Dichas moléculas son en general moléculas de ácido nucleico y pueden comprender un gen de longitud entera que se va a introducir en la célula o un fragmento funcional del mismo o pueden ser, por ejemplo, una secuencia de ADNc que contiene la secuencia codificante completa de un gen o un fragmento funcional del mismo. Alternativamente, dichas moléculas de ácido nucleico pueden codificar moléculas de ARN de sentido contrario, ribozimas, aptámeros, oligonucleótidos u oligonucleótidos formadores de triple hélice, o comprender ADN "señuelo" para factores de transcripción etc. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico tienen de 10 a 30.000 bases de longitud, p. ej. 20-10.000 bases de longitud.

"Asociado con" como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula que está incorporada a o conectada de alguna forma con un vehículo vírico, vector vírico o partícula vírica, p. ej., incorporada dentro del genoma de dicha molécula vírica o separada de dicho genoma, pero transportada dentro de la partícula vírica. En general, las moléculas que se van a introducir en las células serán empaquetadas o incorporadas dentro de las partículas víricas, es decir, encapsuladas o incorporadas dentro de un recubrimiento vírico o cápside. Preferiblemente, la molécula que se va a transportar es un polinucleótido y preferiblemente se inserta dentro de una construcción vírica que contiene determinados elementos derivados de virus necesarios para permitir que la construcción quede empaquetada dentro del vehículo vírico. La molécula que se va a transportar se puede, por ejemplo, clonar en un sitio de clonación en el genoma de transportador vírico. Alternativamente, 2 o más moléculas separadas que contribuyen a estas características se pueden usar como se describe en lo sucesivo. Dichas partículas víricas se pueden seleccionar de modo que sean capaces o no de infectar células espontáneamente y, si pueden infectar células espontáneamente, una vez que han sido internalizadas dentro de la célula se pueden seleccionar de modo que puedan o no aprovechar la maquinaria celular endógena con el fin de reproducirse y ensamblar nuevos paquetes de virus para ser secretados de la célula. Sin embargo, en general, cuando se usa para terapia génica u otras aplicaciones in vivo, por razones de seguridad los vectores víricos normalmente están desactivados de modo que pueden infectar células del hospedante pero no pueden reproducirse, ensamblar nuevos viriones e infectar nuevas células, es decir, se hacen incompetentes para la reproducción. Dicha desactivación se puede llevar a cabo por cualquier medio adecuado, pero se hace de forma conveniente eliminando algunos de los genes víricos necesarios para la reproducción vírica y opcionalmente insertando los genes terapéuticos que se van a transferir en su sitio. Sin embargo, la tecnología descrita en esta solicitud también se puede usar con virus competentes para la reproducción o de reproducción restringida, tales como p. ej., el virus ONYX-15 (Khuri F.R. et al., (2000),) o adenovirus de reproducción restringida que codifican la timidina quinasa del virus del Herpes simplex, tal como describen Wildner y colaboradores (Wildner O. et al., (1999) Gene Ther. 6, 57-62; Wildner O. et al., (1999), Cancer Res. 59, 410-413), o p. ej., retrovirus que se reproducen como describe D. Klatzman (presentación oral y resumen en el 8th Meeting of the European Society of Gene Therapy, Stockholm 7-10 October 2000).

La entidad molecular entera que se va a introducir en la célula, es decir, el vehículo vírico que incorpora o encapsula la molécula que se va a introducir, se denomina a veces en la presente memoria "partícula de transferencia".

En general, el ácido nucleico que se va a introducir en la célula por los métodos de la presente invención, es parte de una construcción basada en virus, p. ej. un plásmido basado en virus que contiene determinados elementos derivados de virus necesarios para permitir que la construcción sea empaquetada dentro del vehículo vírico/cápside vírica/vector vírico. Sin embargo, alternativamente, el ácido nucleico que se va a introducir puede formar parte de una molécula, p. ej. un plásmido y puede estar presente una segunda molécula que contiene las secuencias necesarias para el desarrollo del vehículo vírico que contiene la primera molécula. Además, si la acción del ácido nucleico dentro de la célula depende de la expresión de la proteína codificada así o la producción de ARN del mismo, el ácido nucleico se flanquea de forma conveniente por secuencias reguladoras adecuadas (p. ej. promotores) para asegurar un nivel alto de expresión en la célula diana particular. Dichos elementos reguladores pueden derivar de virus (p. ej., el promotor CMV del citomegalovirus) o cualquier otro organismo adecuado y el

diseño de construcciones víricas adecuadas para permitir una buena expresión de la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico es bien conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar promotores específicos de tejido o regulables para obtener la expresión específica de tejido o enfermedad o regulable. Por ejemplo, se puede usar el promotor específico de tejido promotor de tirosina específico de melanoma. Los promotores regulables tales como los promotores regulados por tetraciclina son bien conocidos. Se pueden encontrar más ejemplos de promotores específicos o regulados que se pueden usar en la presente invención en Hart, I.R. (*Semin. Oncol.*, 1996, 23, 154-158), Miller and Whelan (*Hum. Gene Therapy*, 1997), Nettelbeck and Muller (*Trends Genet.*, 2000, 16, 174-181) y Spear (*Anticancer Res.*, 1998, 18, 3223-3231) y referencias en los mismos.

La molécula "vehículo vírico" con la que se asocia la molécula de transferencia, puede ser cualquier sistema vírico con la condición de que los vehículos víricos de este sistema sean capaces de asociarse con, incorporar o encapsular las moléculas que se van a introducir en las células. Por lo tanto, en general, las moléculas de transferencia son empaquetadas dentro de una partícula vírica o cápside de virus y las expresiones "partícula vírica", "cápside de virus" y "vector vírico" también se usan en la presente memoria para indicar "vehículo vírico". Las expresiones como se usan en la presente memoria no incluyen plásmidos basados en virus o ADN, aunque dicho plásmido se puede usar para crear el vehículo vírico.

Los ejemplos de sistemas víricos adecuados para usar en la presente invención son adenovirus y virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus, virus del Herpes, bacteriófagos, virus influenza, virus Sendai, virus Vaccinia, y baculovirus, preferiblemente adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus y bacteriófagos. El adenovirus es un sistema de virus preferido para usar en los métodos de la presente invención. Para usar según la invención, los vehículos víricos en general forman formas modificadas de los virus naturales para añadir propiedades deseadas y minimizar la posible patogenicidad u otros efectos secundarios indeseados. Por lo tanto, los vehículos víricos representan variantes de virus usados rutinariamente para la terapia génica y son bien conocidos en la materia, pero retienen componentes esenciales e identificables de los virus fuente.

Como se usa en la presente memoria, "agente fotosensibilizador" se refiere a un agente que es fotosensible y que, al aplicar luz fotoactivante, se convierte en una forma citotóxica o da lugar a una especie citotóxica. El agente fotosensibilizador que se va a usar de acuerdo con la presente invención (que es distinto y preferiblemente diferente de la molécula de transferencia) es de forma conveniente cualquier agente que se encuentre en compartimentos intracelulares, en particular endosomas o lisosomas. Se conoce una variedad de dichos agentes fotosensibilizadores en la técnica y están descritos en la bibliografía, incluyendo en el documento WO96/07432. Respecto a esto, se pueden mencionar ftalocianinas de aluminio di y tetrasulfonadas (p. ej. AIPcS<sub>2a</sub>), tetrafenilporfinas sulfonadas (TPPS<sub>n</sub>), azul de Nilo, derivados de clorina e<sup>6</sup>, uroporfirina I, filioeritrina, hematoporfirina y azul de metileno, que se ha mostrado que se encuentran en endosomas y lisosomas de células en cultivo. Esta ubicación en la mayoría de los casos se debe a la actividad endocítica. Por lo tanto, el agente fotosensibilizador preferiblemente es un agente que es absorbido en los compartimentos internos de lisosomas o endosomas. Sin embargo, también se pueden usar otros agentes fotosensibilizadores que se encuentran en otros compartimentos celulares, por ejemplo, el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi. También es posible que puedan estar trabajando mecanismos donde los efectos del tratamiento fotoquímico estén en otros componentes de la célula (es decir, componentes distintos de los compartimentos restringidos con membrana). Así pues, por ejemplo, una posibilidad puede ser que el tratamiento fotoquímico destruya moléculas importantes para el transporte intracelular o la fusión de vesículas. Dichas moléculas pueden no encontrarse necesariamente en compartimientos restringidos con membrana.

Por lo tanto, las clases de agentes fotosensibilizadores que se pueden mencionar incluyen profirinas, psorlanos, ftalocianinas, purpurinas, clorinas, benzoporfirinas, naftalocianinas, colorantes catiónicos, tetraciclinas y bases débiles lisosomotrópicas o derivados o precursores de los mismos (Berg et al., *J. Photochemistry and Photobiology*, 1997, 65, 403-409). Otros agentes fotosensibilizadores adecuados incluyen texafirinas, feofórbidos, porfírenos, bacterioclorinas, cetoclorinas, derivado de hematoporfirina, y derivados de los mismos, fotosensibilizadores endógenos inducidos por ácido 5-aminolevulínico y derivados de los mismos, dímeros y otros conjugados entre fotosensibilizadores.

Preferiblemente, el fotosensibilizador está en forma libre, es decir, no está conjugado con ninguna otra macromolécula. En especial, preferiblemente el agente fotosensibilizador está separado del vehículo vírico, es decir es una entidad discreta. Sin embargo, alternativamente, el fotosensibilizador puede estar asociado con, o unido a, o conjugado con, un vehículo u otra molécula como se describe en lo sucesivo, p. ej. unido a un anticuerpo director o acoplado a un vehículo tal como polilisina. Alternativamente, en determinadas circunstancias, el agente fotosensibilizador se puede estar unido a, asociado con o conjugado con, el vehículo vírico o una parte del mismo (p. ej. la membrana lipídica que rodea, p. ej. un retrovirus), directamente.

Los agentes fotosensibilizadores preferidos incluyen TPPS<sub>4</sub>, TPPS<sub>2a</sub>, AIPcS<sub>2a</sub> y otros fotosensibilizadores anfífilos.

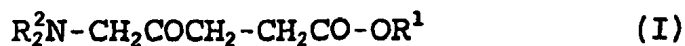
En un aspecto preferido, la presente invención proporciona métodos en los que los agentes fotosensibilizadores son compuestos que son el ácido 5-aminolevulínico o ésteres del ácido 5-aminolevulínico o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

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

ALA.

Más en particular, los ésteres de ALA para usar de acuerdo con la invención son ésteres de ácidos 5-aminolevulínicos opcionalmente sustituidos con alcanoles, es decir, ésteres de alquilo o ésteres de alquilo sustituidos.

- 5 De forma conveniente, los ésteres ALA que se pueden usar son compuestos de fórmula I,



(en donde, R<sup>1</sup> puede representar alquilo opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo, alcoxi, aciloxi, alcoxycarbonilo, amino, arilo, oxo o fluoro, y opcionalmente interrumpido por átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo; y R<sup>2</sup>, cada uno de los cuales pueden ser iguales o diferentes, representa un átomo de hidrógeno o un grupo R<sup>1</sup>) y sales de los mismos.

Los grupos R<sup>1</sup> sustituidos con alquilo pueden estar mono o polisustituidos. Por lo tanto, los grupos R<sup>1</sup> adecuados incluyen, por ejemplo, alquilo no sustituido, alcoxialquilo, hidroxialcoxialquilo, polihidroxialquilo, hidroxipolialquilenoxialquilo y similares. El término "acilo" como se usa en la presente memoria incluye tanto grupos carboxilato como carbonato, por lo tanto los grupos aciloxi sustituidos con alquilo incluyen, por ejemplo, alquilcarboniloxialquilo. En dichos grupos, cualquier resto alquilenilo preferiblemente tiene un contenido de átomos de carbono definido para los grupos alquilo siguientes. Los grupos arilo preferidos incluyen fenilo y grupos heteroaromáticos monocíclicos de 5-7 miembros, en especial fenilo y dichos grupos pueden estar ellos mismos opcionalmente sustituidos.

Los grupos R<sup>1</sup> sustituidos con alquilo representativos incluyen grupos alcoximetilo, alcoxietilo y alcoxipropilo o grupos aciloximetilo, aciloxietilo y aciloxipropilo p. ej., pivaloiloximetilo.

Los ésteres ALA preferidos para usar como agentes fotosensibilizadores según la invención, incluyen aquellos en donde R<sup>1</sup> representa un grupo alquilo no sustituido y/o cada R<sup>2</sup> representa un átomo de hidrógeno.

Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" incluye cualquier grupo hidrocarbonado de cadena larga o corta, de cadena lineal o ramificada, alifático, saturado o insaturado. Los grupos alquilo insaturados pueden ser mono o poliinsaturados e incluyen tanto grupos alquenoilo como alquinoilo. Dichos grupos pueden contener hasta 40 átomos de carbono. Sin embargo, son preferidos los grupos alquilo que contienen hasta 10, p. ej., 8, más preferiblemente hasta 6, y en especial preferiblemente hasta 4 átomos de carbono.

Se pueden mencionar en particular éster metílico de ALA, éster etílico de ALA, éster propílico de ALA, éster hexílico de ALA, éster heptílico de ALA y éster octílico de ALA y sales de los mismos, que representan agentes fotosensibilizadores preferidos para usar según la invención.

Los métodos de la presente invención se pueden usar in vitro o in vivo, por tratamiento sistemático o local in situ, o por tratamiento ex vivo seguido de administración de las células tratadas al cuerpo.

Para llevar a cabo el método de la invención, la etapa de "poner en contacto" las células con un agente fotosensibilizador y por separado con el vehículo vírico se puede llevar a cabo de cualquier forma conveniente o deseada. Por lo tanto, si la etapa de poner en contacto se va a llevar a cabo in vitro, las células se pueden mantener de forma conveniente en un medio acuoso tal como, por ejemplo, medio de cultivo celular adecuado, y en el punto de tiempo adecuado, se puede añadir simplemente el agente fotosensibilizador o vehículo vírico al medio en las condiciones adecuadas, por ejemplo, en una concentración adecuada y durante un periodo de tiempo adecuado.

El agente fotosensibilizador se pone en contacto con las células en una concentración adecuada y durante un periodo de tiempo adecuado que lo puede determinar fácilmente el experto en la técnica usando técnicas rutinarias, y dependerá del agente fotosensibilizador particular y del tipo de célula. La concentración del agente fotosensibilizador debe ser tal que una vez absorbido en la célula (p. ej., dentro de, o asociado con, uno o más de sus compartimentos intracelulares) y activado por irradiación, se alteran una o más estructuras celulares, p. ej. uno o más compartimentos celulares son lisados o alterados. Por ejemplo, los agentes fotosensibilizadores usados en los ejemplos de la presente memoria se pueden usar en una concentración, por ejemplo de 10 a 50 µg/ml. En general, para uso in vitro el intervalo puede ser mucho mayor, p. ej., 0,05-500 µg/ml. Para los tratamientos humanos in vivo, el agente fotosensibilizador se puede usar en el intervalo de 0,05-20 mg/kg de peso corporal cuando se administra de forma sistémica o 0,1-2% en un disolvente para aplicación tópica. En animales más pequeños, el intervalo de concentración puede ser diferente y se puede ajustar en consecuencia.

El tiempo de incubación de las células con el agente fotosensibilizador (es decir, el tiempo de "contacto") puede variar de unos minutos a varias horas, p. ej., incluso hasta 48 h o más largo. El tiempo de incubación debe ser tal que el agente fotosensibilizador sea absorbido por las células adecuadas.

A la incubación de las células con el agente fotosensibilizador le puede seguir opcionalmente un periodo de incubación con medio exento de fotosensibilizador antes de exponer las células a la luz o añadir la molécula de transferencia.

5 La molécula de transferencia puede ser cualquier molécula de ácido nucleico como se ha discutido antes y se pone en contacto con las células en asociación con un vehículo vírico en una concentración/dosificación adecuada y durante un periodo de tiempo adecuado. Una concentración adecuada del vehículo vírico se puede determinar dependiendo de la eficacia de la absorción del vehículo en cuestión en las células en cuestión y la concentración final que se desea lograr en las células. Una de las ventajas sorprendentes del uso de la PCI junto con un vehículo vírico es que se pueden usar dosis menores de partículas víricas para obtener la misma eficacia de transfección, p. ej., hasta 20 veces menos partículas víricas. Las dosis adecuadas de vehículos víricos que se van a usar dependerán por supuesto del tipo de virus usado, y para las aplicaciones in vivo, del modo de administración, el tipo de enfermedad que se va a tratar, si se usan o no ligandos directores (véase más adelante), etc. Típicamente, para inyección intratumoral de un vector adenovírico no replicativo, se inyectarán de  $10^3$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de placa (ufp, partículas infecciosas) por inyección. Esto normalmente correspondería a aproximadamente  $10^5$  a  $10^{15}$  partículas físicas de virus, puesto que en una preparación de virus "habitual" solo aproximadamente 1% de las partículas físicas víricas dan lugar a infección. Para las dosis de virus competentes en la reproducción pueden ser eficaces dosis incluso menores que las dadas antes, p. ej. tan bajas como  $10^3$  partículas, p. ej. se pueden usar de  $10^3$  a  $10^6$ ,  $10^{10}$  ó  $10^{15}$  partículas. Por otra parte, cuando se usa la administración sistémica puede ser necesario aumentar la dosis.

20 Una ventaja adicional que se ha observado es que se puede lograr una eficacia muy mejorada de la transfección, siendo transfectadas incluso hasta 100% de todas las células en el experimento. Usando métodos conocidos, dichos niveles no eran posibles previamente o eran necesarias dosis de virus prohibitivamente altas. Por lo tanto, preferiblemente, los métodos de la invención logran la transfección de más de 50%, en especial preferiblemente más de 75, 85 o 90% de las células totales.

25 Por lo tanto el "tiempo de transfección" o "tiempo de absorción celular" para los vehículos víricos, es decir, el tiempo de contacto de los vehículos con la célula, puede ser unos minutos o hasta unas horas, por ejemplo, se puede usar un tiempo de transfección desde 10 min hasta 10 ó 24 h, por ejemplo de 15 min hasta 10 h o por ejemplo de 15 ó 30 min hasta 2, 3, 4 ó 6 h. Un tiempo de transfección mayor puede dar como resultado una absorción mayor del vehículo en cuestión.

30 Los vehículos víricos se pueden aplicar antes, después o simultáneamente con irradiación. Cuando se aplican después de irradiación, los vehículos víricos se pueden aplicar, por ejemplo, de 0 a 4 o de 0 a 24 h después de irradiación, p. ej. más de 1, 2, 4, 8, 10 o incluso 12 h después de irradiación. Opcionalmente, después del contacto con el vehículo vírico, la célula se puede transfectar a medio exento de vehículo, p. ej. antes de irradiación, p. ej. durante más de 5 min, tal como durante 15 min a 2 h, p. ej., durante 30 min. Cuando se aplica antes de irradiación, esto puede ser, por ejemplo, en las 12 h antes de irradiación, p. ej. de 15 min a 2 h antes de irradiación, opcionalmente con un intervalo en medio exento del vehículo vírico.

40 Se observará que el tiempo permitido para la transfección a través del contacto del vehículo vírico con la célula es difícil de controlar en aplicaciones in vivo. Sin embargo, el tiempo de contacto se puede controlar mediante las etapas de contacto y lavado adecuadas cuando se llevan a cabo ex vivo, in vitro o para algunos tipos de administración local.

45 El agente fotosensibilizador y el vehículo vírico asociado con la molécula que se va a introducir se puede añadir por separado o junto con las células antes del tratamiento con luz/irradiación como se ha descrito en los documentos WO96/07432, WO00/54802, y en la solicitud de patente en tramitación junto con la presente (solicitud de patente internacional presentada el 29 de noviembre de 2001 en nombre de The Norwegian Radium Hospital Research Foundation, titulada "Método"), o se puede añadir primero el agente fotosensibilizador a las células, seguido de la etapa de irradiación y después la adición del vehículo vírico como se ha descrito en la solicitud de patente en tramitación con la presente adjunta. En este último método, preferiblemente la irradiación se lleva a cabo antes de la absorción celular de la molécula de transferencia (aquí el vehículo vírico), en especial preferiblemente la molécula de transferencia se pone en contacto con la célula después de irradiación, p. ej., de 0 a 4 h después de irradiación. Alternativamente, la célula se pone en contacto con la molécula de transferencia sustancialmente al mismo tiempo que la irradiación.

55 En otras palabras, la etapa de irradiación se puede llevar a cabo antes de la absorción celular de los vehículos víricos en cualquier compartimento intracelular o después de dicha absorción celular, con la condición de que el agente fotosensibilizador haya sido absorbido en los compartimentos intracelulares antes de la irradiación. Si tanto el agente fotosensibilizador como el vehículo vírico han sido absorbidos en los compartimentos intracelulares de la célula en el momento de la exposición a la luz, entonces, el vehículo vírico y el agente fotosensibilizador pueden estar ubicados en el mismo o en diferentes compartimentos intracelulares en el momento de la exposición a la luz. Se describen detalles adicionales del momento de la adición de los diferentes componentes a las células en los documentos de la técnica anterior WO96/07432 y WO00/54802 anteriores o la solicitud de patente en tramitación junto con la presente.

En cualquier caso, la ventana de tiempo en la que los vehículos víricos se pueden poner en contacto con las células y todavía ser absorbidos e internalizados por las células, puede depender de una variedad de factores tales como, por ejemplo, el tipo de célula, el vehículo particular en cuestión, el agente fotosensibilizador particular usado, y la duración del tratamiento con luz. Esta ventana de tiempo, si es necesario se puede determinar para un conjunto particular de condiciones y estará dentro de los límites del experto en la técnica.

El momento en el que el vehículo vírico se administra variará dependiendo de si los métodos se llevan a cabo in vitro o in vivo. Para métodos in vitro, los vehículos víricos en general se pueden poner en contacto con todas las células diana simultáneamente, es decir, el tiempo de administración coincide con el tiempo de contacto, p. ej., si las células se cultivan en un cultivo in vitro, y por lo tanto es relativamente fácil poner en contacto los vehículos con las células en un tiempo adecuado. Sin embargo, in vivo la etapa de poner en contacto las células diana con los vehículos víricos es claramente más complicada y dependerá del modo de administración, el tipo de vehículo vírico y la ubicación de las células diana. Por ejemplo, cuando los vehículos víricos se pueden administrar directamente a las células diana, p. ej., por inyección, entonces los vehículos víricos se pondrán en contacto con las células diana (o al menos una proporción de las mismas) de forma relativamente rápida, p. ej., en cuestión de minutos u horas después de administración.

Si, por otra parte, los vehículos víricos se administran por inyección intravenosa para una diana distante, entonces estos vehículos pueden tardar mucho más en ponerse en contacto con las células diana. Por ejemplo, pueden tardar de 24 a 96 h después de administración en llegar a las células diana. Habrá que tener en cuenta este "tiempo de viaje" para decidir el tiempo adecuado en el que administrar los vehículos víricos con respecto a la administración del agente fotosensibilizador y el tiempo de irradiación. Se aplican las mismas consideraciones, por supuesto, al tiempo en el que se administra el agente fotosensibilizador. Sin embargo, en cambio para la molécula de transferencia es importante que este agente sea administrado suficientemente antes de la irradiación, de modo que en la irradiación dicho agente haya sido absorbido en un compartimento intracelular. Por lo tanto, de modo conveniente dicho agente se aplica de 1 a 72 h antes de irradiación, p. ej., de 4 a 72 h, tal como de 4 a 48 ó de 4 a 24 h antes de irradiación. Otra vez, como se ha discutido antes en relación con la etapa de poner en contacto los vehículos víricos (y por lo tanto las moléculas de transferencia) con las células, el tiempo de administración del agente fotosensibilizador en relación con el tiempo de irradiación dependerá del tiempo que tarde un agente fotosensibilizador en alcanzar las células diana y ser absorbido por las mismas. 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 está en un sitio alejado. En todos los casos, es importante que el agente fotosensibilizador haya sido absorbido por las células diana antes de que se produzca la irradiación. Dicho agente se puede mantener en contacto con dichas células inmediatamente hasta la irradiación, p. ej., durante 1 ó 4 a 72 h, preferiblemente de 4 a 24 h, p. ej., de 12 a 20 h, o se puede retirar del contacto inmediatamente antes de la irradiación, p. ej., durante más de 5 min, p. ej., durante 10 min a 8 h, p. ej., de 1 a 4 ó 6 h en medio exento de agente y/o medio que contiene la molécula de transferencia.

Por lo tanto, aunque la situación in vivo es más complicada que in vitro, el concepto subyacente de la presente invención sigue siendo el mismo, es decir, que los tiempos de administración deben ser tales que antes de que se produzca la irradiación una cantidad adecuada del agente fotosensibilizador se ha puesto en contacto y ha sido absorbido por las células diana y: (i) antes o durante la irradiación, la molécula de transferencia (y su vehículo vírico) ha sido absorbida por las células o será absorbida después de contacto suficiente con las células diana, en el mismo o en diferentes compartimentos intracelulares que el agente fotosensibilizador, o (ii) después de irradiación, la molécula de transferencia y su vehículo vírico asociado están en contacto con las células durante un periodo de tiempo suficiente para permitir su absorción en las células.

Opcionalmente, el agente fotosensibilizador se puede unir a, asociar con o conjugar con una o más moléculas vehículo, moléculas directoras o vectores directores que pueden actuar para facilitar o aumentar la absorción del agente fotosensibilizador, o pueden actuar para dirigir o suministrar estas entidades a un tipo particular de célula, tejido o compartimento intracelular. Los ejemplos de sistemas vehículo incluyen polilisina (p. ej., poli-L-lisina o poli-D-lisina), polietilenimina o dendrímeros (p. ej., dendrímeros catiónicos tales como SuperFect<sup>®</sup>) u otros policationes, sulfato de dextrano, diferentes lípidos catiónicos tales como DOTAP o lipofección o lípidos catiónicos formulados con un "lípidos cooperador" tal como DOPE, liposomas, partículas LDL reconstituidas, liposomas esteríicamente estabilizados o diferentes partículas derivadas de sistemas víricos tales como por ejemplo adenovirus, lentivirus y otros retrovirus, virus adenoasociados, bacteriófagos, etc. Estos sistemas vehículo en general pueden mejorar la farmacocinética y aumentar la absorción celular del agente fotosensibilizador y también pueden dirigir el agente fotosensibilizador a compartimentos intracelulares que son especialmente beneficiosos para obtener internalización fotoquímica, pero que en general no tienen la capacidad de dirigir el agente fotosensibilizador a células específicas (p. ej. células de cáncer) o tejidos.

Los vehículos víricos también se pueden unir a, asociar con o conjugar con una o más de dichas moléculas vehículo, moléculas directoras o vectores directores. Alternativamente, algunas modificaciones de superficie de la partícula de vehículo vírico pueden ser ventajosas para usar en la presente invención. Los potenciales beneficios que vienen del uso de dichos vehículos y/o modificaciones de superficie son: (i) mejora de la farmacocinética y biodistribución del vector vírico, normalmente aumentando el tiempo de circulación; (ii) camuflaje de la capacidad del virus para unirse a su receptor normal para permitir redirigir el virus a otros receptores (y así a tejidos que normalmente no son



infectados por el virus); (iii) proporcionar una carga superficial positiva en el vector vírico de modo que se unirá a e infectará una variedad más amplia de células que mediante su mecanismo de infección natural; (iv) “esconder” el virus del sistema inmunitario.

5 Preferiblemente, el vehículo vírico se une a, asocia con o conjuga con una molécula vehículo, preferiblemente un vehículo que comprende policonjugados (p. ej., polilisina o SuperFect<sup>®</sup>) o lípidos catiónicos.

Los ejemplos de vehículos que se pueden usar en relación con esto son policonjugados (Lanuti M. et al. (1999), *Gene Ther.* 6, 1600-1610; Arcasoy S.M. et al. (1997), *Gene Ther.* 4, 32-8; Dodds E. et al. (1999), *J. Neurochem.* 72, 2105-2122) y lípidos catiónicos (Clark P.R. et al. (1999) *Cancer Gene Ther.* 6, 437-446). Los ejemplos de modificaciones de superficie que se pueden usar en relación con esto son: polietilenglicol (Croyle M.A. et al. (2000) *Hum. Gene Ther.* 11, 1713-1722) y polímeros basados en poli-[N-(2-hidroxiopropil)-metacrilamida] (Seymour, L. et al. (2000) *J. Gene Med. Suppl.* to Vol 2(5), p. 52).

15 Para lograr la dirección específica o selectiva de las moléculas de vehículo vírico (y por lo tanto la molécula de transferencia) y/o el fotosensibilizador a tipos de células o tejidos particulares, estas entidades se pueden asociar con o conjugar con moléculas directoras específicas que promoverán la absorción celular específica de la molécula de transferencia en las células o tejidos deseados. Dichas moléculas directoras también pueden dirigir la molécula de transferencia y/o el fotosensibilizador a compartimentos intracelulares que son especialmente beneficiosos para obtener la internalización fotoquímica.

Se pueden usar muchas moléculas directoras diferentes, p. ej. como describen Curiel, D.T. (1999), *Ann. New York Acad. Sci.* 886, 158-171; Bilbao, G. et al. (1998), en *Gene Therapy of Cancer* (Walden et al., eds., Plenum Press, New York), Peng K.W. and Russell S.J. (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 454-457; Wickham T.J. (2000), *Gene Ther.* 7, 110-114.

Además, es importante indicar que en lugar de tener que unirlos a vehículos específicos, en la técnica se sabe que algunos agentes fotosensibilizadores que son adecuados para usar en los métodos de la presente invención muestran una ubicación preferencial inherente en determinados sitios de tejidos. Por ejemplo, algunos agentes fotosensibilizadores, tales como los derivados de hematoporfirina se sabe que se encuentran con preferencia o selectivamente en tejidos tumorales u otras lesiones. Se describen algunos ejemplos en Boyle and Dolphin (*Photochem. Photobiol.* 64: 469-485 (1996)). Dichas ubicaciones preferidas se pueden aprovechar en los métodos de la presente invención.

Las moléculas directoras se pueden asociar, unir o conjugar con el vehículo vírico, con el agente fotosensibilizador o ambos, y se puede usar el mismo o diferente vehículo o moléculas directoras.

Dichas moléculas o vehículos directores como se han descrito anteriormente, también se pueden usar para dirigir el vehículo vírico o el agente fotosensibilizador a compartimentos intracelulares particulares para usar PCI, por ejemplo lisosomas o endosomas.

Se cree que la molécula de transferencia permanece inicialmente en asociación con el vehículo vírico en el citosol de las células una vez que se ha producido la etapa de irradiación que libera las partículas de transferencia de los compartimentos intracelulares. Una vez que las partículas de transferencia han sido internalizadas en el citosol de las células, los sucesos que ocurran dependerán del sistema de vehículo vírico elegido. Por ejemplo, en el caso de adenovirus, normalmente las partículas de adenovirus (asociadas con la molécula de transferencia) migran al núcleo, después de lo cual el ADN vírico (y por lo tanto la molécula de transferencia de ácido nucleico) entra en el núcleo de la célula. En cualquier caso, cuando la molécula de transferencia de ácido nucleico se incorpora en una partícula o vehículo vírico, después de internalización fotoquímica y posiblemente posteriores sucesos dependiendo del vehículo vírico, la molécula de ácido nucleico estará presente en la ubicación intracelular correcta de modo que se puede producir el procesamiento intracelular adecuado para permitir que la molécula de transferencia introducida realice su función deseada. Por ejemplo, si la molécula de transferencia codifica una proteína deseada, entonces son necesarias etapas de procesamiento que conducen a la expresión de esta proteína. Si la molécula de transferencia es una molécula de ADN que codifica una molécula de ARN de sentido contrario, entonces son necesarias etapas de procesamiento que conduzcan a la transcripción del ARN a partir del ARN, etc.

La etapa de irradiación con luz para activar el agente fotosensibilizador puede tener lugar de acuerdo con técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la longitud de onda y la intensidad de la luz se pueden seleccionar de acuerdo con el agente fotosensibilizador usado, preferiblemente con un nivel de dosis de 40 a 200 J/cm<sup>2</sup>, p. ej. 100 J/cm<sup>2</sup>, y a una longitud de onda de 300-800 nm, p. ej. 500-700 nm. Las fuentes de luz adecuadas son bien conocidas en la técnica. El tiempo durante el cual las células son expuestas a la luz y las dosis de luz usadas en los métodos de la presente invención, pueden variar. En general, los tiempos y dosis de irradiación adecuados los puede seleccionar el experto en la técnica para permitir la alteración de compartimentos intracelulares que contienen el fotosensibilizador y la posterior absorción y/o liberación de las partículas de transferencia al citosol. La eficacia de la internalización de la partícula de transferencia al citosol parece que aumenta con la mayor exposición a la luz. Un periodo de tiempo preferido para la etapa de irradiación depende del fotosensibilizador, la cantidad de fotosensibilizador acumulada en las células o tejido diana y el solapamiento entre el

espectro de absorción del fotosensibilizador y el espectro de emisión de la fuente de luz. En general, el periodo de tiempo para la etapa de irradiación es del orden de minutos a varias horas, p. ej. preferiblemente hasta 60 min, p. ej. de 0,5 ó 1 a 30 min, por ejemplo hasta 10 ó 15 min, p. ej., de 0,5 a 3 min o de 3 a 10 min y preferiblemente aproximadamente 7 min, p. ej. de 6 a 8 min. Las dosis de luz adecuadas las puede seleccionar un experto en la técnica, y de nuevo dependerán del fotosensibilizador y la cantidad de fotosensibilizador acumulada en las células o tejidos diana. Por ejemplo, las dosis de luz típicamente usadas para el tratamiento fotodinámico del cáncer con el fotosensibilizador fotofrina y el precursor de protoporfirina el ácido 5-aminolevulínico están en el intervalo de 50-150 J/cm<sup>2</sup>, con un intervalo de flujo de menos de 200 mW/cm<sup>2</sup> con el fin de evitar la hipertermia. Las dosis de luz normalmente son menores cuando se usan fotosensibilizadores con coeficientes de extinción mayores 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.

Los métodos de la invención inevitablemente darán lugar a la muerte de algunas células en virtud del tratamiento fotoquímico, es decir, por la acción del agente fotosensibilizador. Sin embargo, esta muerte de células no tendrá importancia y de hecho puede ser ventajosa para muchas de las aplicaciones, p. ej. el tratamiento del cáncer, y en algunos casos puede potenciar el efecto terapéutico estimulando una respuesta inmunitaria local. Sin embargo, los métodos de la invención se pueden modificar de modo que la fracción o proporción de las células que sobreviven sea regulada seleccionando la dosis de luz en relación con la concentración del agente fotosensibilizador. De nuevo, dichas técnicas se conocen en la técnica. Independientemente de la cantidad de muerte celular inducida por el tratamiento fotoquímico puro, es importante que la dosis de luz sea regulada de modo que algunas de las células individuales en donde se pone de manifiesto el efecto de PCI no mueran por el tratamiento fotoquímico puro (aunque pueden morir posteriormente debido al efecto de PCI).

En algunas aplicaciones puede ser adecuado retener un número mayor de células viables después del tratamiento de PCI. Por ejemplo, en algunos métodos de terapia génica, la cantidad de células viables que permiten la expresión de la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico transferida es importante. En dichas aplicaciones es adecuado que no muera una población o pluralidad de células, sustancialmente todas las células, o una mayoría importante (p. ej. al menos 50%, más preferiblemente al menos 60, 70, 80 o 90% de las células). Esto, por supuesto, no siempre es deseable en especial cuando se usa la PCI para introducir moléculas de transferencia citotóxicas y la posterior muerte celular no es desventajosa. Sin embargo, los efectos citotóxicos también se pueden lograr usando, por ejemplo, terapia génica en la que se internaliza un gen terapéutico en células tumorales por el método de la invención p. ej. de modo que estas células producirán sustancias inmunológicamente activas que inducirán muerte inmunológica local del resto de las células cancerosas o inducirán una respuesta inmunitaria sistémica a las células tumorales. En dichos casos, claramente después del tratamiento de PCI, es necesaria una proporción de células viables.

Las ventajas asociadas con los métodos de PCI de internalización de moléculas de transferencia en asociación con vehículos víricos son 1) no hay restricción en el tamaño de la molécula que se va a introducir en una célula con la condición de que la molécula se pueda incorporar en un vehículo vírico y su vehículo vírico pueda ser absorbido por la célula diana; 2) los métodos son específicos de sitio en cuando que solo las zonas expuestas a la luz son afectadas; 3) la internalización de vehículos víricos es más eficaz que la infección vírica convencional en términos de la proporción de células en las que se introduce la molécula de transferencia y/o el nivel de expresión de la molécula de transferencia; 4) son necesarias dosis y títulos de virus menores debido a la mayor eficacia de la internalización; 5) no son oncogénicos.

Las realizaciones en donde la molécula de transferencia (y su vehículo vírico) se añade a las células después de la etapa de irradiación con luz, tienen las ventajas adicionales de que

a) disminuye el daño fotoquímico a la molécula de transferencia y su vehículo vírico;

b) se puede llevar a cabo la simplificación del tratamiento de PCI de lesiones internas en combinación con cirugía, puesto que el tratamiento fotoquímico se puede llevar a cabo después de exposición quirúrgica de la lesión, seguido p. ej. de inyección intratumoral u otra administración local del vehículo vírico (y su molécula de transferencia asociada);

c) los métodos son más independientes del momento exacto del tratamiento, es decir, el momento de la adición de la molécula que va a ser absorbida por las células con respecto al momento de la iluminación. Esto significa que hay una "ventana de tiempo" mayor para el tratamiento. Esto es importante puesto que la absorción de una molécula terapéutica puede variar ampliamente en diferentes situaciones clínicas y además, la absorción es difícil de calcular para lesiones individuales en una situación clínica, haciendo, por lo tanto, que una ventana de tiempo mayor sea extremadamente ventajosa;

d) la translocación rápida de la molécula de transferencia al citosol se produce así disminuyendo sustancialmente las posibilidades de degradación lisosomal de la molécula de transferencia.

Los métodos de la presente invención se pueden usar para introducir moléculas en células como una alternativa a las técnicas anteriores de fusión de liposomas, transfección con fosfato de calcio, etc. como se ha discutido

anteriormente.

En una realización preferida de la invención, se introducen moléculas en las células con el propósito de terapia génica.

5 La terapia génica puede tener lugar por una serie de estrategias, la más adecuada de las cuales la puede seleccionar un experto en la técnica, dependiendo de la patogénesis particular de una enfermedad.

10 Un procedimiento implica la muerte dirigida de células específicas. Este procedimiento es popular en terapias del cáncer e implica genes que se dirigen a células diana y después son expresados de modo que producen la muerte celular. Dicha muerte celular puede tener lugar por un mecanismo directo, p. ej. si los genes que se introducen codifican una toxina letal o codifican un profármaco que confiere susceptibilidad a las células para la destrucción por un fármaco administrado posteriormente. Alternativamente, la destrucción celular puede ser indirecta, p. ej. usando genes inmunoestimuladores como los genes introducidos, con el fin de provocar o potenciar una respuesta inmunitaria contra la célula diana, o usando genes que codifican una proteína que produce la muerte celular por interacción con una molécula añadida de forma exógena (p. ej., un gen que codifica una enzima que activa un profármaco tal como HSV-tk que activa GCV). Los genes suicidas adecuados, genes que codifican profármacos y genes inmunoestimuladores son bien conocidos y están documentados en la técnica.

15 Un procedimiento adicional implica la inhibición dirigida de la expresión génica. El experto en la técnica conoce una variedad de técnicas diferentes para bloquear específicamente la expresión de un gen a nivel del ADN, ARN o proteína, y se puede usar cualquiera de estas junto con los métodos de la presente invención, que se pueden usar para introducir las herramientas moleculares adecuadas para bloquear la expresión génica en las células. Por lo tanto, en aspectos preferidos de la invención, la molécula que se va a introducir es una secuencia de ADN que comprende o es capaz de transcribir o expresar un producto funcional que inhibirá la expresión génica al mismo nivel en las células diana, p. ej., que comprende, expresa o transcribe moléculas de sentido contrario, ribozimas o anticuerpos intracelulares.

20 Otro procedimiento implica la terapia de aumento génico, cuando una enfermedad es causada por pérdida de la función de un gen, y las enfermedades se pueden curar por introducción de copias extra del gen normal en células adecuadas de un paciente. Por lo tanto, en una característica preferida adicional de la invención, la molécula que se va a introducir es un gen o una parte del mismo capaz de expresar un producto funcional para compensar una deficiencia en un paciente.

25 Un procedimiento adicional más es el de una corrección de mutación dirigida, donde la introducción de un ácido nucleico en las células adecuadas de un paciente conduce a la corrección directa de una mutación que causa enfermedad, en el ADN del paciente. Los métodos para hacer esto son bien conocidos y están descritos en la técnica.

30 Después de la transferencia de ácidos nucleicos/genes a las células según los métodos de la presente invención, los genes/ácidos nucleicos insertados se pueden integrar en los cromosomas de la célula hospedante o permanecer como elementos genéticos extracromosómicos (es decir permanecer episomales). Se pueden elegir y diseñar vectores adecuados para inducir cualquiera de estas posibilidades.

35 La ventaja de la integración del gen introducido en un cromosoma es que el gen se puede perpetuar por replicación cromosómica después de división celular. Puesto que las células progenie también contienen los genes introducidos, se puede obtener la expresión estable a largo plazo del gen introducido. Como resultado, la terapia génica usando este procedimiento puede proporcionar la posibilidad de una cura para algunos trastornos. Por ejemplo, en los tejidos compuestos de células que se dividen activamente, el objetivo puede ser dirigirse a los citoblastos (una población minoritaria de células precursoras indiferenciadas que dan lugar a células diferenciadas maduras del tejido). Sin embargo, la integración cromosómica tiene sus desventajas, que están bien descritas e incluyen, p. ej., el peligro del desarrollo de cáncer, por ejemplo, debido a un suceso de integración accidental que conduce a la activación de un oncogén.

40 La terapia génica ex vivo, en la que se retiran las células diana de un paciente, se manipulan in vitro y después se reintroducen en un paciente, ofrece la oportunidad de seleccionar células donde la integración ha tenido éxito. Por ejemplo, por amplificación de las células in vitro y después comprobación en los fenotipos de cualquier prueba evidente de transformación neoplásica, antes de volver a transferir las células al paciente. Por lo tanto, la terapia ex vivo puede ser preferida cuando se desea la integración cromosómica.

45 Alternativamente, el sistema de vector que incorpora el gen/ácido nucleico que se va a introducir se puede diseñar para introducir genes en las células donde permanecen como elementos extracromosómicos y pueden ser expresados con niveles altos. Si las células se dividen activamente, el gen introducido puede no dividirse por igual en las células hijas y así la expresión a largo plazo puede ser un problema. Como resultado, pueden ser necesarios tratamientos repetidos que impliquen la transferencia génica para realizar una cura para un trastorno genético. Sin embargo, la posibilidad de realizar tratamientos repetidos en relación con esto es mucho mayor con los presentes métodos de transferencia basados en PCI que permiten la transferencia de genes dirigida de eficacia más alta (véase más adelante). Además, en algunos casos puede no haber necesidad de expresión estable a largo plazo. Por

ejemplo, las terapias génicas para el cáncer a menudo implican la transferencia y expresión de genes a células cancerosas con vistas a matar las células. En dichos métodos, una vez que se ha eliminado el tumor maligno, no es probable que se necesite el gen terapéutico.

5 Como se ha mencionado antes, los sistemas víricos adecuados para usar en la presente invención son adenovirus y virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus, virus del Herpes, virus Sendai, bacteriófagos, virus Vaccinia, y baculovirus.

10 Los retrovirus tienen la propiedad ventajosa de poder integrarse en el ADN cromosómico pero infectar solamente células que se dividen activamente. El ADN integrado se puede propagar de forma estable, ofreciendo la posibilidad de una cura permanente para una enfermedad. La propiedad de estos de infectar solo células que se dividen activamente, aunque es desventajoso para el tratamiento de muchas enfermedades, sin embargo, es beneficioso para la terapia génica para cánceres de tejidos que normalmente tienen células que no se dividen de modo que las células cancerosas que se dividen activamente pueden ser infectadas y destruidas selectivamente sin riesgo importante para las células que no se dividen del tejido normal.

15 Los virus adenoasociados requieren la coinfección con un virus cooperador tal como adenovirus o HSV para la infección productiva, es decir, la infección que da como resultado la producción de viriones progenie. Sin embargo, en ausencia de virus cooperadores todavía puede tener lugar la integración cromosómica del ADN. Por lo tanto, el tipo adecuado de vector vírico adenoasociado se puede seleccionar dependiendo de la aplicación interesada.

20 Por otra parte, los adenovirus infectan también células que no se dividen. La entrada en las células se produce por endocitosis mediada por receptor, pero aunque el ácido nucleico insertado migra al núcleo no parece que se integre y así la expresión de los genes insertados solo se puede sostener a lo largo de periodos cortos. Los vectores adenovíricos se pueden producir con títulos muy altos y típicamente aceptan tamaños de insertos de hasta 7-8 kb, pero desarrollos recientes en la tecnología de vectores adenovíricos permiten el uso de tamaños de insertos de hasta aproximadamente 30 kb en vectores especialmente diseñados (Kochanek (1999), *Hum. Gene Ther.* 10, 2451-2459). Debido a su capacidad para infectar muchos tipos de células diferentes, los adenovirus han encontrado aplicaciones extendidas, y son vectores populares para usar en las estrategias de terapia génica in vivo. De hecho, los adenovirus son los vehículos víricos preferidos para usar en los métodos de la presente invención.

25 Sin embargo, aunque los adenovirus están entre los vectores más eficaces para el suministro génico in vivo, su uso es complicado por varios problemas graves, p. ej., reacciones inmunológicas a los virus, expresión génica transitoria y mala distribución tisular que conduce a una baja eficacia de transducción en los tejidos diana. Además, la capacidad para restringir la expresión de los genes terapéuticos suministrados por adenovirus a las células diana es difícil, pero puede ser muy importante para evitar efectos secundarios adversos, por ejemplo debido a la expresión de un producto génico tóxico (p. ej., indicado para destruir células cancerosas) en células normales en el cuerpo, p. ej., en órganos vitales tales como el hígado. Otros vehículos víricos para usar en terapia génica tienen inconvenientes similares.

35 El uso de la internalización fotoquímica en conjunto con los métodos de la presente invención puede mejorar varios de estos problemas. Primero, el uso de la PCI puede aumentar sustancialmente el nivel y la extensión de la expresión transgénica en tejidos diana (es decir, puede conducir a un número mayor de células que expresan niveles más altos del transgén). Además, se ha mostrado que la PCI aumenta la eficacia de la infección vírica de modo que es necesaria una dosis vírica significativamente menor para producir la misma cantidad de transducción génica observada en ausencia de PCI. Esta eficacia de la infección vírica potenciada por PCI con menores valores de multiplicidad de la infección (MDI) debería permitir la transducción vírica en zonas de tejidos que tienen penetración baja de virus, permitiendo de esta forma la transducción en regiones que reciben demasiadas pocas partículas de virus para ser transducidos eficazmente con la infección convencional. Puesto que se espera que con la administración local la concentración de virus en tejidos disminuya rápidamente con el aumento de la distancia desde el punto de aplicación, esto es una mejora muy importante de la tecnología de la infección vírica.

40 Una ventaja adicional de la mayor eficacia inducida por la PCI de la infección vírica es que se puede usar una dosis menor de virus mientras que se mantiene la eficacia de la transducción, reduciendo así los problemas inmunológicos asociados con la terapia génica mediada por adenovirus y otros virus. Finalmente, el tratamiento fotoquímico se puede usar para aumentar la especificidad de la infección de células diana. Esto se debe a que, primero, solo las zonas iluminadas son sometidas a la PCI y segundo porque algunos fotosensibilizadores se acumulan de forma inherente con preferencia en zonas enfermas. La capacidad para dirigir la actividad de un gen terapéutico a un sitio de la enfermedad simplemente emitiendo luz en la zona enferma es un aspecto muy favorable de la presente invención, que en gran medida hace posible evitar efectos secundarios no deseados debidos a la expresión del gen terapéutico en sitios "equivocados" en el cuerpo. La capacidad de la PCI para permitir el uso de dosis menores del agente terapéutico génico también contribuirá a menos efectos secundarios. Se espera que la especificidad que se puede obtener haga factible la administración sistémica de adenovirus y otros vehículos víricos. Además, como se ha discutido anteriormente, la PCI también se puede combinar con vectores dirigidos, mejorando potencialmente más la especificidad del suministro génico.

Como se ha discutido en las aplicaciones previas de la PCI, se cree que el efecto potenciador de la transfección de

la PCI en complejos de plásmido/polilisina y el efecto potenciador en el suministro de otras moléculas tales como proteínas, se debe a una rotura inducida por la luz de vesículas endocíticas, y sin querer estar ligado por la teoría, parece razonable que pudiera estar implicado el mismo mecanismo en la estimulación de la transducción génica mediada por adenovirus. Sin embargo, a diferencia de los complejos de plásmido/polilisina y otras moléculas tales como proteínas, se cree que el escape de los adenovirus de los endosomas es un proceso eficaz, donde se ha descrito que más de 40% de las partículas víricas unidas a células llegan al núcleo de la célula (Greber, U.F. et al. (1993), *Cell* 75, 477-486; Leopold, P.L. et al. (1998), *Hum. Gene Ther.* 9, 367-378). Por lo tanto, a partir de lo que se describe en la bibliografía se esperaría que la PCI pudiera aumentar la eficacia de la transducción génica con adenovirus como máximo 2,5 veces, si la PCI fuera capaz de inducir el transporte nuclear de todas las partículas víricas unidas a células. Por lo tanto, era extremadamente sorprendente que se pudiera observar potenciación inducida por la PCI de la transducción génica de más de 20 veces, y hasta el momento los autores de la invención no tienen una buena explicación para este efecto inesperadamente grande. Una posibilidad es que las partículas víricas sometidas a PCI pueden tener una "eficacia de transducción inherente" mayor que los virus en la infección normal, p. ej., debido a un mecanismo diferente de liberación de los endosomas. También es posible que la liberación de los endosomas de adenovirus en la infección normal sea menos eficaz con las MDI (multiplicidad de infección) bajas donde la PCI tiene el mejor efecto. También es posible que el tratamiento fotoquímico pueda afectar a otros procedimientos tales como la absorción de virus, transporte o transcripción nuclear del transgén.

En un aspecto adicional la presente invención describe composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de transferencia asociada con un vehículo vírico y un agente fotosensibilizador, preferiblemente para usar en terapia. Opcionalmente, el agente fotosensibilizador en las composiciones también puede estar asociado con moléculas de vehículo vírico u otras moléculas de vehículo no vírico tal como las descritas anteriormente. Preferiblemente, el vehículo vírico está él mismo unido a, asociado con o conjugado con una o más moléculas vehículo (preferiblemente policationes o lípidos catiónicos), moléculas directoras o vectores directores. Opcionalmente, uno de o tanto el vehículo vírico como el agente fotosensibilizador pueden estar asociados con las mismas o diferentes moléculas directoras como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, las composiciones son para usar en terapia génica. Para la terapia génica una molécula de vehículo vírico preferida es un adenovirus o un vehículo vírico derivado del mismo. Las afecciones, enfermedades e infecciones que son particularmente adecuadas para la terapia génica incluyen tumores cancerosos, p. ej., carcinomas de células basales, displasia u otros tumores, artritis reumatoide, arterosclerosis, infecciones víricas y otras, psoriasis, queratosis solar, curación de heridas, curación de fracturas, verrugas y trastornos genéticos hereditarios tales como fibrosis quística, síndrome de Gorlin, ataxia-telangiectasia y trastornos metabólicos.

Los genes preferidos para usar como moléculas de transferencia para la terapia génica son genes que codifican enzimas activadoras de profármacos tales como la timidina quinasa del Herpes Simplex o la citosina desaminasa; toxinas proteicas tales como la toxina diftérica o gelonina, proteínas inductoras de apoptosis tales como p53 o apopoptina; factores inmunoestimuladores tales como interleuquinas (preferidas IL-2, IL-12, IL-18), factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , quimioquinas; antígenos específicos de tumores, tales como proteínas ras mutadas o Mart-1; inhibidores inmunitarios/inflamación tales como interleuquina-10, antagonista del receptor de IL-1 o receptor de TNF soluble; inhibidores de la angiogénesis tales como endostatina; proteínas que inducen la formación de vasos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular; proteínas iniciadoras de la coagulación tales como el factor tisular; anticuerpos intracelulares; inmunotoxinas recombinantes; ribozimas o moléculas de ARN de sentido contrario, etc.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención describe el uso de una molécula de transferencia asociada con un vehículo vírico y un agente fotosensibilizador como se describe en la presente memoria, para preparar un medicamento para usar en terapia, preferiblemente terapia génica. Para dichos usos, el agente fotosensibilizador y la molécula de transferencia asociada a virus se ponen en contacto con células o tejidos de un paciente sea juntos o por separado, seleccionando los tiempos de administración adecuados y dichas células son irradiadas como se ha descrito anteriormente, con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador.

También se describen métodos de tratamiento y preferiblemente métodos de terapia génica que comprenden los métodos de la invención. Por lo tanto, la invención describe un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección en un paciente por terapia génica, que comprende introducir una molécula de transferencia en una o más células in vitro, in vivo o ex vivo según el método descrito en lo que antecede, y cuando sea necesario (es decir, cuando la transfección se lleva a cabo in vitro o ex vivo) administrar dichas células a dicho paciente.

Como se define en la presente memoria, "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 antes de tratamiento. "Prevención" se refiere a retrasar o prevenir el inicio de los síntomas de la enfermedad, trastorno o infección.

Las composiciones de la presente invención también pueden comprender una célula o una población de células que contienen una molécula de transferencia que se ha introducido en dicha célula por los métodos de la invención, preferiblemente para usar en terapia, en particular terapia génica.

Por lo tanto, un aspecto adicional más de la invención describe una célula o una población de células que contienen

una molécula de transferencia que se ha introducido en dicha célula, cuya célula se puede obtener por el método de la presente invención.

Un aspecto adicional más de la invención describe el uso de dicha célula o población de células para preparar una composición o un medicamento para usar en terapia, en particular terapia génica.

5 La invención describe además un método de tratamiento de un paciente que comprende administrar a dicho paciente células o composiciones de la presente invención. Preferiblemente, dichos métodos se usan en terapia génica, es decir, un método que comprende las etapas de introducir una molécula en una célula como se ha descrito en lo que antecede y administrar dicha célula así preparada a dicho paciente.

10 In vivo se puede usar cualquier modo de administración de los vehículos víricos, agentes fotosensibilizadores, células que contienen moléculas de transferencia, composiciones etc., comunes o convencionales en la técnica, p. ej., inyección intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratumoral o intravenosa, infusión, inhalación o administración tópica, en superficies del cuerpo tanto internas como externas, etc. Para el uso in vivo, la invención se puede usar en relación con cualquier tejido que contenga las células que el agente fotosensibilizador y el vehículo vírico localizarán, incluyendo ubicaciones en fluidos corporales, así como tejidos sólidos. Se pueden tratar todos los tejidos con la condición de que el fotosensibilizador sea absorbido por las células diana y la luz pueda ser  
15 suministrada de forma adecuada. Con respecto al suministro de luz, esto claramente no plantea un problema para superficies externas del cuerpo humano o animal. Para las superficies internas, se pueden usar técnicas tales como, por ejemplo, el uso de dispositivos de fibra óptica para iluminar eficazmente muchas superficies internas. Además, el tratamiento se puede hacer en combinación con cirugía que expondrá superficies que necesitan ser tratadas.

20 Por lo tanto, las composiciones de la invención se pueden formular de cualquier forma conveniente de acuerdo con técnicas y procedimientos conocidos en la técnica farmacéutica, p. ej., usando uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables (es decir, compatibles con otros ingredientes en la composición, así como fisiológicamente aceptables para el receptor. La naturaleza de la composición y los materiales vehículos o excipientes, dosificaciones etc., se pueden seleccionar de forma rutinaria según la elección y la vía de  
25 administración deseada, propósito del tratamiento, etc. Las composiciones de la invención también pueden contener otros agentes adecuados. Por ejemplo, para algunas aplicaciones terapéuticas y algunas vías de administración puede ser beneficioso usar, por ejemplo, agentes que puedan aumentar la penetración tisular del vehículo vírico, p. ej., proteasas (Kuriyama, N. et al., 2000, *Hum. Gene Ther.* 11: 2219-2230).

30 Las composiciones se pueden administrar por vía tópica (p. ej., por suministro intestinal, bucal, sublingual, gingival, palatal, nasal, pulmonar, vaginal, rectal u ocular), oral o parenteral. Se prefieren las composiciones tópicas, e incluyen geles, cremas, pomadas, pulverizadores, lociones, bálsamos, barras, jabones, polvos, comprimidos, películas, pesarios, aerosoles, gotas, soluciones y cualquier de las otras formas farmacéuticas convencionales en la técnica.

35 Las pomadas, geles y cremas se pueden formular, por ejemplo, con una base acuosa o aceitosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones se pueden formular con una base acuosa u aceitosa y, en general, también contendrán uno o más agentes emulsionantes, dispersantes, de suspensión, espesantes o colorantes. Los polvos se pueden formar con la ayuda de cualquier base de polvo adecuada. Las gotas y soluciones se pueden formular con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, solubilizantes o de suspensión. Los pulverizadores de aerosol son suministrados de forma conveniente a partir de  
40 envases presurizados, con el uso de un propulsor adecuado.

Alternativamente, las composiciones se pueden proporcionar en una forma adaptada para la administración oral o parenteral. Por lo tanto, formas farmacéuticas alternativas incluyen comprimidos sencillos o recubiertos, cápsulas, suspensiones y soluciones que contienen el componente activo opcionalmente junto con uno o más vehículos y/o  
45 diluyentes inertes convencionales, p. ej., con almidón de maíz, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, estearato magnésico, polivinilpirrolidona, ácido cítrico, ácido tartárico, agua, agua/etanol, agua/glicerol, agua/sorbitol, agua/polietilenglicol, propilenglicol, alcohol estearílico, carboximetilcelulosa o sustancias grasas tales como grasa dura o mezclas adecuadas de los mismos.

50 Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes de sabor, potenciadores de la adsorción, p. ej., agentes de penetración de superficie como se mencionan más adelante, y similares. Las composiciones de la invención se pueden formular de modo que se proporcione la liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de administración al paciente usando procedimientos bien conocidos en la técnica. También se pueden usar agentes solubilizantes y/o estabilizantes, p. ej., ciclodextrinas (CD),  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  HP  $\beta$ -ciclodextrina.

55 Igualmente las dosificaciones se pueden determinar de forma rutinaria y pueden depender de la naturaleza de la molécula, el propósito de tratamiento, edad del paciente, modo de administración etc. En relación con el agente fotosensibilizador, también hay que tener en cuenta la potencia/capacidad de alteración de membranas por irradiación. Sin embargo, en general, para el uso in vitro, es adecuado un intervalo de concentración para el

fotosensibilizador, p. ej., de 0,05-500 µg/ml. Para tratamientos humanos in vivo, el agente fotosensibilizador se puede usar en un intervalo de 0,05-20 mg/kg de peso corporal cuando se administra sistémicamente, o 0,1-20% en un disolvente para aplicación tópica. En animales más pequeños, el intervalo de concentración puede ser diferente y se puede ajustar en consecuencia.

- 5 La molécula que se va a introducir en asociación con el vehículo vírico puede estar presente en una concentración de  $1 \times 10^{-9}$  a 50% tal como de  $3 \times 10^{-6}$  a 50%, p. ej., de 0,003 a 30%, p. ej., de 0,2 a 10% (p/p) de partículas víricas en la composición final para usar in vivo, en la que p/p se refiere al peso del vehículo vírico además de la molécula que se va a introducir con respecto al peso de la composición final. Si se usa en inyecciones de 1 ml, esto  
 10 correspondería a una dosis de aproximadamente  $10^5$  a  $10^{15}$  partículas víricas físicas. Para el uso in vitro, se puede usar entre  $1-1 \times 10^5$  partículas víricas, p. ej.  $1 \times 10^3-1 \times 10^5$ .

La invención ahora se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los siguientes dibujos en los que:

- 15 La figura 1 muestra la tinción con X-gal de células WiDr transducidas por tratamiento fotoquímico. Las células se trataron con AIPcS<sub>2a</sub> (S), se infectaron con AdHCMV-lacZ (Ad) con MDI 5 y se sometieron a tratamiento con luz como se indica en la figura. Después de 2 días de incubación para permitir la expresión del gen de β-galactosidasa transducido, las células se tiñeron con X-gal y se analizaron por microscopía como se describe. Las células se trataron como sigue: A. Sin tratamiento. B. Solo adenovirus. C. AIPcS<sub>2a</sub> + 8 min de luz. D. AIPcS<sub>2a</sub> + Adenovirus + 8 min de luz.

- 20 La figura 2 muestra el análisis por citometría de flujo de la transducción potenciada por fotoquímica en células HCT 116 (panel A y WiDr (panel B). Las células se trataron con AIPcS<sub>2a</sub> (S), se infectaron con AdHCMV-lacZ (Ad) con MDI 5 y se iluminaron como se describe. Dos días después, las células se cargaron con di-β-D-galactopiranosido de fluoresceína y se analizaron por citometría de flujo. La figura 2A muestra un gráfico de puntos del análisis de citometría de flujo de células HCT 116. Las células en el lado derecho de la línea vertical se consideraron positivas para la transducción de adenovirus puesto que prácticamente no había células en esta zona ni para las células no  
 25 tratadas (panel superior) ni para las células que recibían solo AIPcS<sub>2a</sub> y luz (panel inferior). En cada panel se indican los diferentes tratamientos. La figura 2B muestra la eficacia de la transducción en función de la dosis de luz para células WiDr. Las células positivas para la β-galactosidasa se definieron como se describe bajo la figura 2A ((□) S-, Ad+; (▲) S+, Ad-; (●) S+, Ad+) y se puntuó la intensidad media de la fluorescencia ((○) S+, Ad+). Las barras representan el error típico de la media (ETM) de 2 a 5 experimentos diferentes.

- 30 La figura 3 muestra la transducción potenciada por la PCI de células WiDr con diferentes dosis de virus. Las células se infectaron con AdHCMV-lacZ con diferentes MDI y se sometieron a tratamiento fotoquímico como se ha descrito. La figura 3A muestra la fluorescencia media de la población total de células. Los tratamientos eran los siguientes: Barras no sombreadas: solo AIPcS<sub>2a</sub>; rayado diagonal: MDI=1; gris: MDI=5; rayado horizontal: MDI=20; negro; MDI=50. Las barras de error son el ETM de 3 experimentos. La figura 3B muestra el número de veces de aumento  
 35 de la actividad de la β-galactosidasa en la población total de células. Los símbolos son los mismos que en la figura 3A. Las barras de error son el error típico de 3 ó 4 experimentos.

La figura 4 muestra el efecto del tratamiento fotoquímico en la transducción de adenovirus en células THX.

- 40 La figura 5 muestra el efecto del tratamiento fotoquímico en la expresión de la β-galactosidasa en células THX infectadas con AdHCMV-lacZ. Para la estrategia de "luz antes", células previamente tratadas con AIPcS<sub>2a</sub> se incubaron durante otras 4 h en medio exento de AIPcS<sub>2a</sub> antes de la exposición a la luz durante 3 min. Después de iluminación, las células se infectaron con AdHCMV-lacZ (con MDI 1) durante 30 min a 37°C. Después se añadieron 2 ml de medio y las células se incubaron durante 2 días antes del análisis de la expresión de la β-galactosidasa. Para la estrategia de "luz después", células tratadas con AIPcS<sub>2a</sub> se incubaron en medio exento de AIPcS<sub>2a</sub> durante 3 h  
 45 antes de una infección de 30 min con AdHCMV-lacZ. Después de la adición de 2 ml de medio de cultivo, las células se incubaron durante otros 30 min antes de iluminación durante 3 min, y 2 días después se analizó la expresión de β-galactosidasa.

- 50 La figura 6 muestra el aumento de producción de β-galactosidasa como resultado de la transducción mediada por PCI con un adenovirus que codifica la β-galactosidasa con tiempos de irradiación crecientes. El tratamiento (+, - indican con o sin) y las dosis de luz (duración de la irradiación) para las diferentes muestras se indican en la figura. Adv: adenovirus AdHCMV-lacZ. S: el fotosensibilizador AIPcS<sub>2a</sub>.

La figura 7 muestra el efecto de la PCI en la transducción de células WiDr con diferentes multiplicidades de infección. □ - sin irradiación, ■ - 90 s de irradiación.

- 55 La figura 8 muestra el efecto de la PCI en la transducción de adenovirus de células A549. El tratamiento (+, - indica con o sin) y dosis de luz (en min) para las diferentes muestras se indican en la figura. A: adenovirus AdHCMV-lacZ. S: el fotosensibilizador AIPcS<sub>2a</sub>.

La figura 9 muestra el efecto de la PCI en la transducción de las líneas celulares HeLa y FmexIII. Barras sin sombreado - sin irradiación, barras negras - 90 min de irradiación.

La figura 10 muestra el efecto de la PCI en la transducción de células WiDr con adenovirus asociado con un vehículo de poli-L-lisina. Ad: Adenovirus AdHCMV-LacZ. PLL: Poli-L-Lisina. 5 PLL/Ad significa que el complejo como media contiene 5 moléculas de PLL por partícula vírica. o - Ad MDI 5, ■ - 5 PLL/Ad, ● - 500 PLL/Ad, □ - 250 PLL/Ad, ▲ - 50 PLL/Ad.

5 La figura 11 muestra el efecto de la PCI en la transducción de adenovirus de una línea celular de fibroblastos de piel humana usando poli-L-lisina como vehículo para el virus con tiempos de irradiación variables. □ - MDI 5: adenovirus AdHCMV-LacZ que no forma complejo. ■ - MDI 5/PLL: AdHCMV-LacZ que forma complejo con 250 moléculas de PLL por partícula vírica.

10 La figura 12 muestra el efecto de la PCI en la transducción de adenovirus usando el dendrímero policatiónico SuperFect® con un vehículo vírico en diferentes concentraciones. Barras no sombreadas - sin irradiación, barras sólidas - 90 segundos de irradiación.

La figura 13 muestra el efecto de los diferentes programas de iluminación y administración de adenovirus. Los tiempos a la izquierda del eje Y representan virus añadidos antes de la irradiación, los tiempos a la derecha representan la adición de virus después de irradiación. ■ - 1 min irradiación; □ - sin irradiación.

15 La figura 14 muestra la potenciación por PCI del efecto terapéutico génico en un vector adenovírico que codifica la timidina quinasa del virus Herpes Simplex después de diferentes tiempos de irradiación. La destrucción celular se llevó a cabo mediante ganciclovir después de la transducción génica inducida por PCI con un vector adenovírico que codifica HSV-tk. AI: AIPcS<sub>2a</sub>; AdV-TK: Adenovirus que codifica HSV-tk; GCV: ganciclovir. ◆ - solo AI; □ - AI + AdV-TK; Δ - AL + GCV 10 µg/ml (A), 25 µg/ml (B) o 100 µg/ml (C); ■ - AL + AdV-TK + GCV 10 µg/ml (A), 25 µg/ml (B) o 100 µg/ml (C).

### Ejemplo 1

En experimentos iniciales, se trataron células de adenocarcinoma WiDr humanas con el fotosensibilizador AIPcS<sub>2a</sub> (ftalocianina de aluminio con 2 grupos sulfonato en anillos adyacentes) se infectaron con el adenovirus AdHCMV-LacZ que contenía el gen indicador de la β-galactosidasa y se sometió a tratamiento con luz como se ha descrito en el protocolo experimental. Las células se tiñeron para la actividad de la β-galactosidasa, y la microscopía mostró que una fracción sustancial de las células tratadas con luz expresaban el transgén (figura 1D), mientras que solo se detectaron algunas células positivas entre las células infectadas por adenovirus no iluminadas (figura 1B). Se vieron células no positivas en muestras no tratadas (figura 1A) o en muestras que recibieron AIPcS<sub>2a</sub> y luz, pero no adenovirus (figura 1C), por lo tanto, el aumento de expresión de β-galactosidasa inducido por luz observado se originaba del transgén suministrado con adenovirus, y no del gen endógeno de la β-galactosidasa.

### Ejemplo 2

Para el análisis cuantitativo se usó la citometría de flujo, usando el sustrato di-β-D-galactopiranosido de fluoresceína que hace fluorescentes a las células que expresan β-galactosidasa. Como se puede ver en la figura 2A, el tratamiento fotoquímico aumentaba sustancialmente la actividad de la β-galactosidasa en células HCT 116 infectadas con adenovirus. Por lo tanto, el porcentaje de células positivas para la β-galactosidasa aumentó de 6,3±0,1% (desviación típica, n=3) en células infectadas de forma normal (Ad+, S-, 0 min de luz) a 88±17% (n=3) en células que recibían el tratamiento óptimo (Ad+, S+, 8 min de luz). Igualmente, para las mismas muestras la intensidad media de la fluorescencia aumentó de 52±11% (n=3) a 632 ±163% (n=3) unidades relativas de fluorescencia (URF). El tratamiento fotoquímico también aumentó ligeramente la fluorescencia media en células no infectadas (figura 2A, paneles superior e inferior) de 6 a 12 URF. Sin embargo, debido a los niveles muy bajos de fluorescencia y células positivas (0,4% en la muestra Ad-, S+, 8 min) esto no generó dificultades en la interpretación de los resultados para las células infectadas con virus.

En células de carcinoma de colon WiDr se observaron aumentos en la transducción génica dependientes de la luz incluso mayores (figura 2B). Por lo tanto, se encontró como máximo un aumento de 22 veces en el porcentaje de células positivas para la β-galactosidasa y un aumento de 44 veces de la intensidad media de la fluorescencia cuando se compararon las células infectadas con virus iluminadas con las células no iluminadas. El tratamiento fotoquímico solo (figura 2B, Ad-, S+, ▲) no cambió significativamente el porcentaje de células positivas, ni tampoco lo hizo la iluminación sola (figura 2B, Ad+, S-, □).

Los resultados de la citometría de flujo se confirmaron usando el kit de ensayo de gen indicador de β-gal quimioluminiscente (Roche, nº de catálogo 1758241) en extractos de células WiDr, que mostraban un aumento de 30 veces en la actividad de la β-galactosidasa como resultado del tratamiento fotoquímico (no se muestra).

### Ejemplo 3

A continuación los autores de la invención estudiaron el efecto de la dosis de virus en la eficacia de la transducción potenciada por fotoquímica. Como es evidente en la figura 3, el tratamiento fotoquímico aumentó la transducción con todas las dosis de virus ensayadas. Sin embargo, el efecto era más pronunciado con la dosis de virus menor (MDI (multiplicidad de infección) 1 y 5) donde se observaron aumentos en la fluorescencia media de entre 15 y 35 veces,



comparado con aumentos de aproximadamente 10 y 5 veces con MDI de 20 y 50, respectivamente (figura 3B). También se puede observar (figura 3A) que la fluorescencia media obtenida con la dosis de luz óptima (7 min) con MDI 5 es aproximadamente el doble que el nivel observado sin tratamiento de luz con MDI 50. Igualmente, el nivel logrado con el tratamiento con luz con MDI 1 es aproximadamente el mismo que para MDI 20 sin tratamiento de luz. Por lo tanto, con un tratamiento fotoquímico óptimo, una dosis de virus 20 veces menor es suficiente para dar el mismo nivel de transducción de genes que para la infección sin tratamiento fotoquímico.

El porcentaje de células positivas para la  $\beta$ -galactosidasa obtenido con MDI 50 en este experimento era  $90 \pm 3\%$  ( $n=3$ ) comparado con  $13\% \pm 4$  ( $n=3$ ) para las células no iluminadas. Junto con los resultados para las células HCT 116 presentados antes, esto indica que con el adenovirus la PCI puede transducir la población total de células.

## 10 Protocolos experimentales

### Células y adenovirus

Las células de carcinoma de colon humano HCT 116 y WiDr se obtuvieron de la American Type Culture Collection (nº en ATCC CCL-247 y CCL-218, respectivamente). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía suero de ternero fetal al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml y glutamina 2 mM (todos Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

El adenovirus recombinante AdHCMV-lacZ que codifica el gen *lacZ* de *E. coli* controlado por el promotor de citomegalovirus humano se obtuvo por recombinación homóloga usando el sistema pJM17 en células 293 (Addison et al., 1997, *J. Gen. Virol.* 78: 1653-61). Los vectores recombinantes se purificaron en placa, se multiplicaron hasta títulos altos en células 293 y se purificaron por gradiente de CsCl (Hitt et al., 1995, *Methods Mol. Genet.* 7:13-30). La disolución de virus se diluyó en PBS que contenía CaCl<sub>2</sub> 0,68 mM y MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM a las MDI usadas en los diferentes experimentos.

### Tratamiento fotoquímico

Se sembraron 50.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos (Costar) y se incubaron durante la noche a 37°C. Se añadió 1 ml de medio que contenía AlPcS<sub>2a</sub> 20 mg/ml (Phorphyrin Products, Logan, UT), las células se incubaron durante 18 h a 37°C, se lavaron 3 veces con medio y se incubaron durante otras 3 h a 37°C. El medio se separó y se añadieron 200  $\mu$ l de AdHCMV-lacZ. Después de incubación durante 30 min a 37°C, se añadieron 2 ml de medio y las células se incubaron durante 30 min antes de exposición a luz roja (Phillips TL 20 W/09, filtrada a través de un filtro Cinemoid 35, llegando a las células una intensidad de luz de 13,5 W/m<sup>2</sup>). Antes de analizar la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, las células se incubaron a 37°C durante 2 días.

## 30 Tinción con X-gal de las células

Para la tinción con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) el medio se descartó, se añadió 1 ml de disolución de fijación (glutaraldehído al 0,05% en PBS) y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. La disolución de fijación se descartó y las células se lavaron 3 veces en PBS a temperatura ambiente (el segundo lavado fue durante 10 min, el primer y tercer lavados se realizaron rápidamente). Se añadió 1 ml de disolución de X-gal (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, X-gal 1 mg/ml) y las células se incubaron durante 4 h durante la noche a 37°C y se observaron por microscopía (aumentos 100 X) usando un microscopio Axiovert S100 (Zeiss) con una cámara MC100 Spot (Zeiss).

### Análisis por citometría de flujo

Las células se tripsinizaron, centrifugaron, se volvieron a suspender en 25 ml de medio y se incubaron durante 5 min a 37°C. Se añadieron 25 ml de di- $\beta$ -D-galactopiranosido de fluoresceína (Molecular Probes, Eugene, OR), y las células se incubaron durante 1 min a 37°C antes de diluirlas por adición de 450 ml de medio de crecimiento enfriado con hielo. Las muestras se mantuvieron sobre hielo durante 30-60 min, se filtraron a través de un filtro de nailon de malla de 50  $\mu$ m y se analizaron en un citómetro de flujo-FACS Calibur (Becton Dickinson). Para cada muestra se recogieron 10.000 sucesos. La fluorescencia de la fluoresceína se midió a través de un filtro de 510-530 nm después de excitación con un láser de argón (15 mW, 488 nm). Las células muertas se discriminaron de las células viables individuales activando la dispersión frontal frente a dispersión lateral. Los datos se analizaron con el software CELLQuest (Becton Dickinson).

## Ejemplo 4

Efecto de la PCI en la transducción de adenovirus de células THX

## 50 Material

El di- $\beta$ -D-galactopiranosido de fluoresceína se adquirió en Molecular Probes (F-1179). Se preparó una disolución madre 20 mM disolviendo el polvo en una mezcla de DMSO/etanol. La mezcla se añadió gradualmente a un volumen adecuado de agua helada para hacer una disolución de H<sub>2</sub>O/DMSO/etanol 8:1:1.

El virus recombinante AdCA17lacZ se formó 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%, penicilina 100 U/ml (Gibco-BRL), estreptomycinina 0,1 mg/ml (Gibco-BRL) y glutamina 2 mM.

#### Construcción de virus recombinante

5 El adenovirus recombinante AdCA17lacZ que codifica el gen *lacZ* de *E. coli* controlado por el promotor de CMV humano se obtuvo por recombinación homóloga usando el sistema pJM17 en células 293 (Addison et al., 1997, *J. Gen. Virol.* 78: 1653-61). Los vectores recombinantes se purificaron en placa, se multiplicaron hasta título alto en células 293 y se purificaron por gradiente de cloruro de cesio como se ha descrito previamente (Hitt et al., 1995, *Methods Mol. Genet.* 7:13-30).

#### 10 Sensibilización de las células

Las células THX ( $4 \times 10^5$  células) se sembraron en placas de 6 cm y se dejaron crecer durante la noche. A aproximadamente 60% de confluencia el medio de crecimiento se intercambiò por 2 ml de medio de crecimiento complementado con AIPcS<sub>2a</sub> 20 µg/ml, y las placas se volvieron a poner en el incubador durante 16-18 h. El medio que contenía el sensibilizador después se separó por succión, y las células se incubaron en medio de crecimiento normal al menos 4 h antes del tratamiento con luz y la infección con virus.

#### 15 Infección de las células

Se usó tripsina-EDTA para desprender las células de las 3 placas y se calculó el número medio de células en las placas mediante el contador de cámara Bürcher. Se prepararon diluciones de adenovirus en PBS con CaCl<sub>2</sub> 0,68 mM y MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM según el número de células a infectar. Normalmente las células se infectaron a una MDI (multiplicidad de infección) de 1 y 10.

25 Antes de añadir los virus, las células se expusieron a luz roja (Phillips TL 20 W/09, filtrada a través de un filtro Cinemoid 35, llegando a las células una intensidad de luz de  $1,35 \text{ mW/cm}^2$ ) durante 3 min. Posteriormente, el medio se separó por succión y se añadieron a cada placa 200 µl de suspensión de virus (o PBS con CaCl<sub>2</sub> 0,68 mM y MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM en el caso de los controles no tratados con virus). Después de incubación durante 30 min a 37°C, se añadieron 5 ml de medio de crecimiento y las células se dejaron crecer durante 48 h.

#### Ensayo de la β-galactosidasa

Las células se desprendieron mediante tripsina-EDTA y se volvieron a suspender en 5 ml de medio de crecimiento. Después de centrifugar durante 5 min a 1000 rpm, el medio se separó por aspiración, los sedimentos celulares se volvieron a suspender en 50 µl de medio de crecimiento y los tubos se pusieron en un baño de agua a 37°C durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 50 µl de disolución de FDG 2 mM previamente calentada a 37°C y los tubos se volvieron a poner en el baño de agua durante 1 min. Finalmente, se añadieron 900 µl de medio de crecimiento y los tubos se incubaron sobre hielo durante 30-60 min antes de analizar las muestras por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

35 Las células THX se trataron con AIPcS<sub>2a</sub> (indicado como PS en la figura 4) y adenovirus (indicado como "virus" en la figura 4) y se expusieron a 3 ó 4 min de luz como se ha descrito en Material y Métodos y se midió la actividad de la β-galactosidasa (β-gal) por citometría de flujo. La actividad total de la β-gal se cuantificó integrando las células positivas para β-gal y su actividad de β-gal. Tanto el número de células positivas para β-gal como la actividad media de β-gal aumentaron por el tratamiento de PCI.

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

### Ejemplo 5

#### Estimulación fotoquímica de la transducción génica mediada por adenovirus

45 Se sembraron  $5 \times 10^4$  células THX por pocillo en placas de 6 pocillos. Al día siguiente se añadió AIPcS<sub>2a</sub> 20 µg/ml, y las células se incubaron durante 18 h a 37°C. Todos los procedimientos después de la adición de AIPcS<sub>2a</sub> se llevaron a cabo sometidos a luz. Para la estrategia de "luz antes", las células se lavaron del AIPcS<sub>2a</sub> y se incubaron en medio exento de AIPcS<sub>2a</sub> durante 4 h. Después las células se expusieron a la luz durante 3 min antes del tratamiento con el vector adenovirico AdHCMV-lacZ (también denominado en el ejemplo 4 AdCA17lacZ) a una multiplicidad de infección (MDI) de 1 durante 30 min. Este vector contiene un gen indicador de β-galactosidasa cuya expresión se puede analizar por citometría de flujo (véase más adelante).

50 Para la estrategia de "luz después", las células tratadas con AIPcS<sub>2a</sub> y lavadas se trataron primero con adenovirus con la misma concentración y durante el mismo tiempo indicados antes, se lavaron y después de adición del medio de cultivo de nueva aportación se expusieron a la luz. Las células no iluminadas se trataron de una forma similar

excepto por la iluminación.

Las células tratadas se lavaron una vez con medio de cultivo y después de añadir medio de nueva aportación se incubaron a 37°C antes del posterior análisis. La expresión de la β-galactosidasa se analizó por citometría de flujo 2 días después de exposición a la luz. Los métodos detallados para la construcción del virus (que se denomina AdHCMV-lacZ o AdCA17lacZ), el tratamiento de las células, la iluminación y el análisis de la expresión de la β-galactosidasa se describen en el ejemplo 4.

Los resultados (figura 5) muestran que el tratamiento fotoquímico usando el procedimiento de "luz antes" (mostrado por las barras en el lado derecho de la figura 5) aumenta el porcentaje de células que expresan β-galactosidasa aproximadamente 6 veces; de 2,5% a 15% en estas condiciones experimentales. También se puede ver que el efecto con el procedimiento de "luz antes" era casi igual a lo que se obtenía con el método de "luz después" (mostrado por las barras en el lado izquierdo de la figura 5).

### Ejemplo 6

Aumento de la producción de β-galactosidasa como resultado de la transducción mediada por PCI con un adenovirus que codifica la β-galactosidasa

Las células se cultivaron, incubaron con AIPcS<sub>2a</sub>, infectaron con el virus AdHCMV-lacZ y se iluminaron como se ha descrito en "Protocolos experimentales" en el ejemplo 3. Para medir la producción de la proteína β-galactosidasa se usó un kit de ensayo de gen indicador de β-gal quimioluminiscente (Roche, nº de catálogo 1 758 241) según el protocolo del fabricante. Brevemente, las células se lavaron 3 veces con PBS previamente enfriado y se añadió 1 ml de reactivo de lisis a cada pocillo. Después de incubación durante 30 min a temperatura ambiente, el extracto celular se transfirió a un tubo Eppendorf, se centrifugó a 4°C durante 2 min a velocidad máxima y se transfirieron 50 µl del extracto celular (líquido sobrenadante) a un pocillo de placa de microvaloración. Se añadieron 100 µl de reactivo de sustrato, la placa de microvaloración se cubrió mediante una lámina y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min a 1 h con balanceo suave. Después de incubación, la placa de microvaloración se puso en un luminómetro (Victor2 Wallac 1420 Multilabel Counter) y se inyectaron automáticamente 50 µl de disolución de inicio. Después de un retraso de 1 s, se integró la producción de luz en 5 s. La cantidad de β-galactosidasa se calculó a partir de una curva patrón de muestras que contenían cantidades conocidas de β-galactosidasa.

#### Resultados

La figura 6 muestra el aumento de producción de la proteína β-galactosidasa que se puede obtener después de transducción de adenovirus inducida por PCI de células de carcinoma de colon humano WiDr.

Por lo tanto, a partir de la figura 6 se puede ver que con la dosis de luz máxima, se puede observar un aumento de aproximadamente 25 veces en la producción de la proteína β-galactosidasa en las células transducidas, que se corresponde bien con lo obtenido por análisis de citometría de flujo (p. ej. ejemplos 2 y 3).

### Ejemplo 7

Efecto de la PCI en la transducción de células WiDr con diferentes multiplicidades de infección

Se cultivaron células WiDr en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 10% (suero de ternero fetal), penicilina/estreptomina y L-glutamina. Sometido a luz, se separó el medio y se añadió medio que contenía AIPcS<sub>2a</sub> 1 µg/ml. Las células (protegidas de la luz) se incubaron a 37°C durante 18 h. Las células se lavaron 3 veces con medio y se incubaron durante otras 3 h. Se separó el medio en las placas de 6 pocillos, se añadieron 200 µl de disolución de adenovirus AdHCMV-lacZ a cada pocillo y las células se incubaron durante 30 min a 37°C (protegidas de la luz). Se separó la disolución de virus y las células se lavaron una vez con medio. Se añadieron 2 ml de medio y las células se incubaron durante 30 min a 37°C (protegidas de la luz). Algunas de las células se expusieron a 90 s de luz azul llegando una intensidad de luz a las células de 11 mW/cm<sup>2</sup>. Las células se incubaron durante 2 días (todavía protegidas de la luz) antes del análisis de la actividad de la β-galactosidasa por citometría de flujo como se ha descrito en "Protocolos experimentales" en el ejemplo 3.

#### Resultados

La figura 7 muestra que usando la PCI se puede lograr 100% de células transducidas incluso en los casos en los que esto no es posible con la infección convencional usando dosis de virus razonables. Por lo tanto, la figura 7 muestra que con células WiDr y una dosis de virus de MDI 100, con PCI se logra 100% de transducción, mientras que se obtiene menos de 30% de transducción con infección convencional. Igualmente, con MDI 50, se logró >90% de transducción después de PCI, mientras que sin PCI se obtuvo <20% de transducción.

### Ejemplo 8

Efecto de la PCI en la transducción de adenovirus de células A549

Se cultivaron células A549 en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 10% (suero de ternero fetal),

penicilina/estreptomicina y L-glutamina. Sometido a luz, se separó el medio y se añadió medio que contenía AIPcS<sub>2a</sub> 20 µg/ml. Las células (protegidas de la luz) se incubaron a 37°C durante 18 h. Las células se lavaron 3 veces con medio y se incubaron durante otras 3 h. Se separó el medio, se añadieron 200 µl de disolución de adenovirus AdHCMV-lacZ (dando una MDI de 5) a cada pocillo y las células se incubaron durante 30 min a 37°C (protegidas de la luz). Se separó la disolución de virus y las células se lavaron una vez con medio. Se añadieron 2 ml de medio y las células se incubaron durante 30 min a 37°C (protegidas de la luz). Algunas de las células se expusieron a luz roja como se ha descrito en "Protocolos experimentales" en el ejemplo 3. Las células se incubaron durante 2 días (todavía protegidas de la luz) antes del análisis de la actividad de la β-galactosidasa por citometría de flujo como se ha descrito en "Protocolos experimentales" en el ejemplo 3.

## 10 Resultados

La figura 8 muestra que la PCI puede potenciar sustancialmente la transducción génica mediada por adenovirus de células de cáncer de pulmón humanas A549. Por lo tanto, comparado con la "infección normal" (la muestra A+ S- con 0 min de luz), la PCI con 6 min de tiempo de iluminación aumentó el número de células transducidas en aproximadamente 11 veces, de aproximadamente 3% a aproximadamente 33 de células positivas.

## 15 Ejemplo 9

Efecto de la PCI en la transducción de líneas celulares HeLa y FmexIII

Las células HeLa se obtuvieron de la American Type Culture Collection, y las células de melanoma humano FmexIII se establecieron en el Norwegian Radium Hospital. Las células se cultivaron, se incubaron con el fotosensibilizador TPPS<sub>2a</sub> (1 µg/ml), se infectaron con el adenovirus AdHCMV-lacZ, se iluminaron y se analizaron como se ha descrito en el ejemplo 7.

## Resultados

La figura 9 muestra que la PCI aumenta la transducción también en las líneas celulares HeLa y FmexIII.

## Ejemplo 10

Efecto de la PCI en la transducción con adenovirus asociado con un vehículo de poli-L-lisina

Se cultivaron e incubaron células WiDr con el fotosensibilizador AIPcS<sub>2a</sub> (1 µg/ml), como se ha descrito en el ejemplo 7. La poli-L-lisina (PLL, PM 20700) era de Sigma. La concentración de las partículas víricas en la preparación de virus se determinó por medición de A<sub>260</sub> según Mittereder et al. (*J. Virol.* 1996 11:7498-7509).

Se hicieron los siguientes complejos de adenovirus/PLL:

**5PLL/Ad:** 5 moléculas de PLL por partícula vírica.

**30 500PLL/Ad:** 500 moléculas de PLL por partícula vírica.

**250PLL/Ad:** 250 moléculas de PLL por partícula vírica.

**50PLL/Ad:** 50 moléculas de PLL por partícula vírica.

Se añadió una dilución de PLL a una dilución de partículas víricas. Las muestras se mezclaron con cuidado por inversión o aspiración suave con el extremo de la pipeta, y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente.

Se separó el medio de las placas de 6 pocillos y se añadieron 200 µl de la disolución de adenovirus o la disolución de PLL/Ad a cada pocillo a una MDI de 5. Las células se incubaron durante 30 min a 37°C (protegidas de la luz). A las placas no infectadas con el adenovirus se añadieron 200 µl de PBS solo. Se separó la disolución de 200 µl y las células se lavaron una vez con medio. Se añadieron 2 ml de medio y las células se incubaron durante 30 min a 37°C (protegidas de la luz), antes de exponerlas a luz azul como se ha descrito en el ejemplo 7. Las células se incubaron durante 2 días (todavía protegidas de la luz) antes del análisis de la actividad de la β-galactosidasa por citometría de flujo como se ha descrito en "Protocolos experimentales" en el ejemplo 3.

## Resultados

La figura 10 muestra que la PCI funciona bien en el caso en que el adenovirus se ha asociado con el vehículo poli-L-lisina (PLL). Como puede verse en la figura 10, la infección sin PCI (es decir, las dosis de luz de 0 min) dio transducción muy baja (<5%) tanto con como sin PLL como vehículo. Es evidente que la iluminación de las células induce un aumento dependiente de la dosis de luz de la transducción tanto con como sin PLL, debido a los efectos de la PCI. Mientras que la eficacia de transducción más alta obtenida sin PLL (O en la figura 10) era 37%, se podía obtener 87% de células positivas con la combinación de PCI y PLL (●), lo que representa un aumento > 20 veces en el porcentaje de células transducidas comparado con lo que se lograba en las mismas condiciones sin PCI, y un aumento de 100 veces comparado con la infección normal (0 min de luz sin PLL). Por lo tanto, la PCI puede

aumentar sustancialmente la eficacia de la transducción con adenovirus recubierto con PLL, y usando esta combinación se puede lograr una transducción mucho mayor que para la combinación de PCI con adenovirus sin recubrimiento.

### Ejemplo 11

5 Efecto de la PCI en la transducción de adenovirus de una línea celular de fibroblastos de piel humana usando poli-L-lisina como vehículo para el virus

Se cultivaron células de fibroblastos de piel humana HF-16 y se trataron con el fotosensibilizador AIPcS<sub>2a</sub> como se ha descrito en el ejemplo 7. Se hizo un complejo de PLL y virus (250 moléculas de PLL por partícula vírica) como se ha descrito en el ejemplo 10, y las células se infectaron a una MDI de 5, se iluminaron y se analizaron como se ha descrito en el ejemplo 10.

#### Resultados

La figura 11 muestra el efecto de usar PCI en combinación con un vehículo PLL en la transducción de una línea celular de fibroblastos de piel humana (HF-16). Se sabe que las células fibroblastos son muy resistentes a la transducción de adenovirus y como puede verse en la figura 11, la transducción "normal" (□, 0 s de luz sin PLL) de estas células es muy baja y es potenciada solo en un grado pequeño con la PCI. Cuando se usa PLL como vehículo, la eficacia de la transducción sin tratamiento de luz aumenta ligeramente, pero puede verse que la PCI en este caso potencia sustancialmente la transducción, con un aumento inducido por la luz de 7,5% a 44,5% de células transducidas que se observa en las condiciones óptimas. Por lo tanto, la combinación del uso de un vehículo con la tecnología de la PCI puede dar una transducción eficaz de las células que de otra manera son muy resistentes a la transducción.

### Ejemplo 12

Efecto de la PCI en la transducción de adenovirus usando el dendrímero policatiónico SuperFect como vehículo vírico

Se cultivaron e incubaron células WiDr con el fotosensibilizador AIPcS<sub>2a</sub> (1 µg/ml), como se ha descrito en el ejemplo 7. SuperFect<sup>®</sup> se adquirió en QIAGEN (3 mg/ml). El adenovirus usado era AdHCMV-lacZ.

Se hicieron complejos de adenovirus/SuperFect<sup>®</sup> con diferentes concentraciones de SuperFect<sup>®</sup> añadiendo diferentes cantidades de SuperFect<sup>®</sup> a la disolución de adenovirus e incubando durante 30 min a temperatura ambiente.

Se separó el medio de las placas de 6 pocillos y se añadieron 200 µl de los complejos de Adenovirus/SuperFect<sup>®</sup> con una dosis de adenovirus de MDI de 5. Las células se incubaron durante 30 min a 37°C (protegidas de la luz). Se separó la disolución de 200 µl y las células se lavaron una vez con medio. Se añadieron 2 ml de medio y las células se incubaron durante 30 min a 37°C (protegidas de la luz), antes de exponerlas a luz azul como se ha descrito en el ejemplo 7. Las células se incubaron durante 2 días (todavía protegidas de la luz) antes del análisis de la actividad de la β-galactosidasa por citometría de flujo como se ha descrito en "Protocolos experimentales".

#### Resultados

En el ejemplo 12 los autores de la invención demuestran que la PCI es eficaz también con vehículos víricos distintos de la PLL. Por lo tanto, como se muestra en la figura 12, cuando se usa el policatión dendrímero SuperFect<sup>®</sup> como vehículo, la PCI puede aumentar sustancialmente la transducción génica mediada por adenovirus cuando el vehículo se usa con concentraciones inferiores a 50 µg/ml. Como máximo, la PCI, con SuperFect<sup>®</sup>, podía aumentar el porcentaje de células transducidas casi 50 veces el valor obtenido con la infección "normal" (es decir, sin PCI y sin SuperFect<sup>®</sup>), mientras que la PCI sin SuperFect<sup>®</sup> dio un aumento máximo de 12 veces y SuperFect<sup>®</sup> solo un aumento de 12 veces.

### Ejemplo 13

Diferentes programas de tiempo para la iluminación y la administración de adenovirus

45 Células HCT 116 se cultivaron y trataron con el fotosensibilizador AIPcS<sub>2a</sub> como se ha descrito en el ejemplo 7. Las células se infectaron con el adenovirus Ad-HCMV-LacZ (MDI 5) durante 30 min en diferentes tiempos antes y después de la iluminación (que era siempre 4 h después de la separación del fotosensibilizador). Las células se incubaron durante 2 días más (todavía protegidas de la luz) antes del análisis de la actividad de la β-galactosidasa por citometría de flujo como se ha descrito en "Protocolos experimentales".

#### Resultados

La figura 13 muestra el efecto del momento del tratamiento con luz con respecto al suministro del virus en el efecto de la PCI en la transducción génica mediada por adenovirus. Se puede ver (figura 13) que la iluminación por PCI es

eficaz durante un intervalo de tiempo largo tanto cuando el virus se suministra antes como cuando se suministra después de iluminación. Por lo tanto, hay una ventana de tiempo de al menos 17 h (desde los virus dados 4 h antes de iluminación a los virus dados 13 h después de iluminación) en la que se puede administrar el virus y se puede llevar a cabo la iluminación y donde todavía se mantiene el efecto positivo de la PCI en la transducción. Esto es muy importante desde un punto de vista clínico, porque le da al médico una gran flexibilidad en el diseño del tratamiento y la coordinación con otros tratamiento que pueda recibir el paciente, p. ej., procedimientos quirúrgicos.

#### Ejemplo 14

Potenciación por la PCI del efecto terapéutico génico en un vector adenovirico que codifica la timidina quinasa del virus Herpes Simplex.

10 Se infectaron células de adenocarcinoma HCT 116 con un vector de terapia génica de adenovirus que codifica el gen HSV-tk (AdV-TK) y se sometieron a tratamiento por PCI. Las condiciones para la infección eran como se han descrito en "Protocolos experimentales" (MDI=5). 2 días después de infección se añadieron diferentes concentraciones de ganciclovir (GCV), y las células se incubaron durante 3 días más antes del análisis de la supervivencia celular por el método de MTT. Este método se basa en la reducción de una sal de tetrazolio soluble en agua (MTT) a un producto de formazán insoluble púrpura por la deshidrogenasa mitocondrial presente en células vivas metabólicamente activas. Se añade 1 ml de medio que contiene 0,25 µg de MTT a las células, seguido de 4 h de incubación (37°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>). Los cristales de formazán resultantes se disuelven por adición de 200 µl de isopropanol (Sigma, MO, EE.UU.) por pocillo. La disolución se transfiere a una placa de 96 pocillos que se lee en un lector de microplaca Multiskan EX (Labsystems, Finlandia) con un filtro de paso de banda de 570 nm.

#### 20 Resultados

Como se puede ver en la figura 14, se podía observar un aumento dependiente de la luz del efecto tóxico de GCV para 3 dosis diferentes de GCV en células que recibían el fotosensibilizador AIPcS<sub>2a</sub>, AdV-TK y GCV. En comparación, no se vio dicho efecto en las células de control que recibían solo el tratamiento con fotosensibilizador, en las células que recibían fotosensibilizador + GCV o en las células que recibían fotosensibilizador + AdV-TK pero no GCV. Esto muestra que el aumento inducido por la luz en la muerte de células mediada por GCV se debe al mayor suministro del gen TK inducido por el tratamiento con PCI, que conduce a una mayor activación del profármaco GCV. La combinación gen HSV-tk /GCV se usa ampliamente en protocolos clínicos de terapia génica para el cáncer y por lo tanto, este ejemplo muestra que la PCI se puede usar para aumentar los efectos de destrucción celular deseados de un gen que se usa en la terapia génica para el cáncer. Por lo tanto, este ejemplo muestra que el efecto potenciador del suministro génico de la PCI no se limita a genes indicadores, sino que también se puede usar para genes que codifican proteínas que pueden producir un efecto terapéutico en células de cáncer.

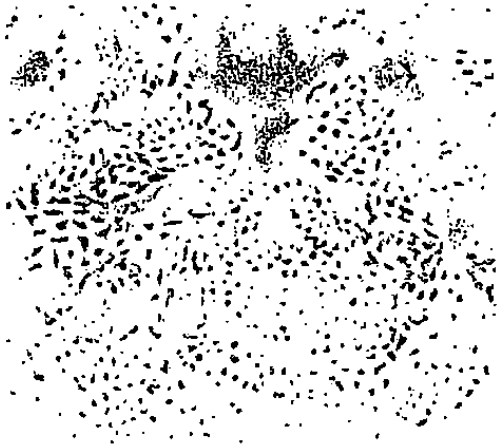
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método in vitro o ex vivo para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un agente fotosensibilizador, poner en contacto dicha célula con la molécula que se va a introducir (molécula de transferencia) que está incorporada en o conectada con un vehículo vírico, e irradiar dicha célula con luz a una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, en donde dicho vehículo vírico es un adenovirus o un virus adenoasociado y dicho agente fotosensibilizador se ubica en endosomas, lisosomas, el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde dicha célula es de mamífero.
- 10 3. Un método según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha molécula de transferencia es una molécula de ácido nucleico que comprende un gen de longitud completa o ADNc u otro ADN que lo codifica, o un fragmento funcional de los mismos.
- 15 4. Un método según la reivindicación 3, en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una enzima activadora de profármaco, una toxina proteica, una proteína inductora de apoptosis, un factor inmunoestimulador, un antígeno específico de tumor, un inhibidor inmunitario/inflamatorio, un inhibidor de angiogénesis, una proteína que induce la formación de vasos, una proteína de inicio de la coagulación, un anticuerpo intracelular o una inmunotoxina recombinante.
- 20 5. Un método según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha molécula de transferencia es una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARN de sentido contrario, un ribozima, un aptámero, un oligonucleótido o un oligonucleótido que forma triple hélice.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde dicha molécula de ácido nucleico tienen de 20 a 10.000 bases de longitud.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la molécula de transferencia es un polinucleótido y se inserta en una construcción vírica que contiene elementos derivados de virus necesarios para permitir que la construcción quede empaquetada dentro del vehículo vírico.
- 25 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho vehículo vírico es un adenovirus.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el agente fotosensibilizador está separado del vehículo vírico.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el agente fotosensibilizador y el vehículo vírico se ponen en contacto con dicha célula de forma secuencial.
- 30 11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el agente fotosensibilizador se selecciona del grupo que consiste en TPPS<sub>2a</sub>, AIPcS<sub>2a</sub> y otros fotosensibilizadores anfífilos.
12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dichos agentes fotosensibilizadores son compuestos que son el ácido 5-aminolevulínico o ésteres de ácidos 5-aminolevulínicos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 35 13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicho agente fotosensibilizador se pone en contacto con dichas células durante 4 a 24 h antes de irradiación.
14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde uno de o tanto el agente fotosensibilizador como el vehículo vírico están unidos a, asociados con o conjugados con una o mas moléculas vehículo, moléculas o vectores directores.
- 40 15. Un método según la reivindicación 14, en donde dicho vehículo vírico está unido a, asociado con o conjugado con una molécula vehículo.
16. Un método según la reivindicación 14 ó 15, en donde dicha molécula vehículo comprende un policatión o lípido catiónico.
17. Un método según la reivindicación 16, en donde dicho policatión es poli-L-lisina, poli-D-lisina o SuperFect®.
- 45 18. Un método según la reivindicación 16, en donde dicho lípido catiónico es DOTAP.
19. Un método según las reivindicaciones 15 ó 16, en donde dicha molécula vehículo es un liposoma o construcción basada en lípido, que contiene preferiblemente al menos un lípido catiónico.
20. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde al menos 50% de dichas células en las que se introduce dicha molécula no son destruidas.

21. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de transferencia incorporada en o conectada con un vehículo vírico y un agente fotosensibilizador, en donde dicha molécula de transferencia, vehículo vírico y agente fotosensibilizador se definen como en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 5 22. Una composición según la reivindicación 21, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección, en donde dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica.
23. Una composición según la reivindicación 22, para usar en terapia génica.
24. Uso de una molécula de transferencia incorporada en o conectada con un vehículo vírico y un agente fotosensibilizador para preparar un medicamento para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección, en donde dicho vehículo vírico es un adenovirus o virus adenoasociado y dicho agente fotosensibilizador se ubica en endosomas, lisosomas, el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi, en donde dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica y en donde dicha molécula de transferencia o dicho vehículo vírico o dicho agente fotosensibilizador es una molécula de transferencia o un vehículo vírico o un agente fotosensibilizador como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 12 ó 14 a 19.
- 10 25. El uso según la reivindicación 24, para usar en terapia génica.
- 15 26. Un uso según la reivindicación 25 o una composición según la reivindicación 23, donde dicha terapia génica se logra mediante la destrucción dirigida de células específicas, inhibición dirigida de expresión génica, terapia de aumento o corrección de mutación por la introducción de un gen o una parte del mismo, capaz de expresar un producto funcional para compensar una deficiencia en un paciente, en donde hay que administrar in vivo preferiblemente de  $10^3$  a  $10^{15}$  partículas víricas.
- 20 27. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 o una composición según la reivindicación 22 ó 23, en donde dicha enfermedad, trastorno o infección es cáncer, artritis reumatoide, arterosclerosis, infecciones víricas u otras, psoriasis, queratosis solar, una herida, una fractura, una verruga o un trastorno genético hereditario.
- 25 28. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en donde dicha molécula de transferencia incorporada en o conectada con un vehículo vírico y dicho agente fotosensibilizador son para la administración separada.
- 30 29. Una molécula de transferencia incorporada en o conectada con un vehículo vírico y un agente fotosensibilizador para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección, en donde dicho vehículo vírico es un adenovirus o virus adenoasociado y dicho agente fotosensibilizador se encuentra en endosomas, lisosomas, el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi, en donde dicha molécula de transferencia es una molécula terapéutica y en donde dicha molécula de transferencia o dicho vehículo vírico o dicho agente fotosensibilizador es una molécula de transferencia o un vehículo vírico o un agente fotosensibilizador como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 12 ó 14 a 19.
- 35 30. Una molécula de transferencia incorporada en o conectada con un vehículo vírico y un agente fotosensibilizador según la reivindicación 29, para usar en terapia génica.
- 40 31. Una molécula de transferencia incorporada en o conectada con un vehículo vírico y un agente fotosensibilizador según la reivindicación 29 ó 30, en donde dicha molécula de transferencia y agente fotosensibilizador son para usar juntos o por separado.
- 45 32. Una molécula de transferencia incorporada en o conectada con un vehículo vírico y un agente fotosensibilizador según la reivindicación 30, en donde dicha terapia génica se logra mediante la destrucción dirigida de células específicas, inhibición dirigida de expresión génica, terapia de aumento o corrección de mutación por la introducción de un gen o una parte del mismo, capaz de expresar un producto funcional para compensar una deficiencia en un paciente, en donde hay que administrar in vivo preferiblemente de  $10^3$  a  $10^{15}$  partículas víricas.
33. Una molécula de transferencia incorporada en o conectada con un vehículo vírico y un agente fotosensibilizador según la reivindicación 29 o reivindicación 30, en donde dicha enfermedad, trastorno o infección es cáncer, artritis reumatoide, arterosclerosis, una infección vírica u otras, psoriasis, queratosis solar, una herida, una fractura, una verruga o un trastorno genético hereditario.



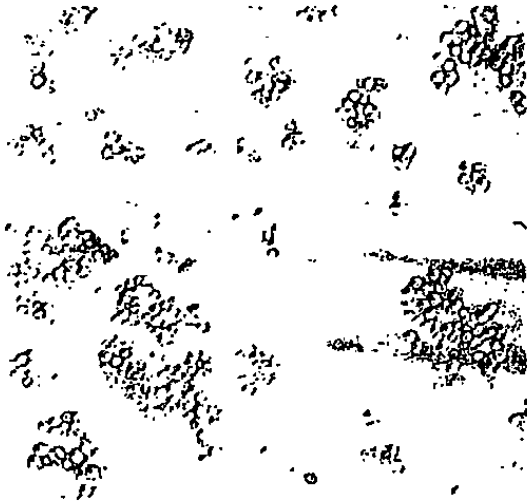
**S-, Ad-, sin luz**



**S-, Ad+, sin luz**



**S+, Ad-, 8 min**



**S+, Ad+, 8 min**

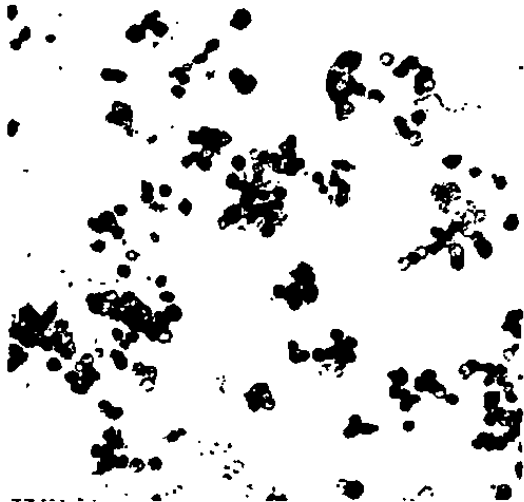


Figura 1

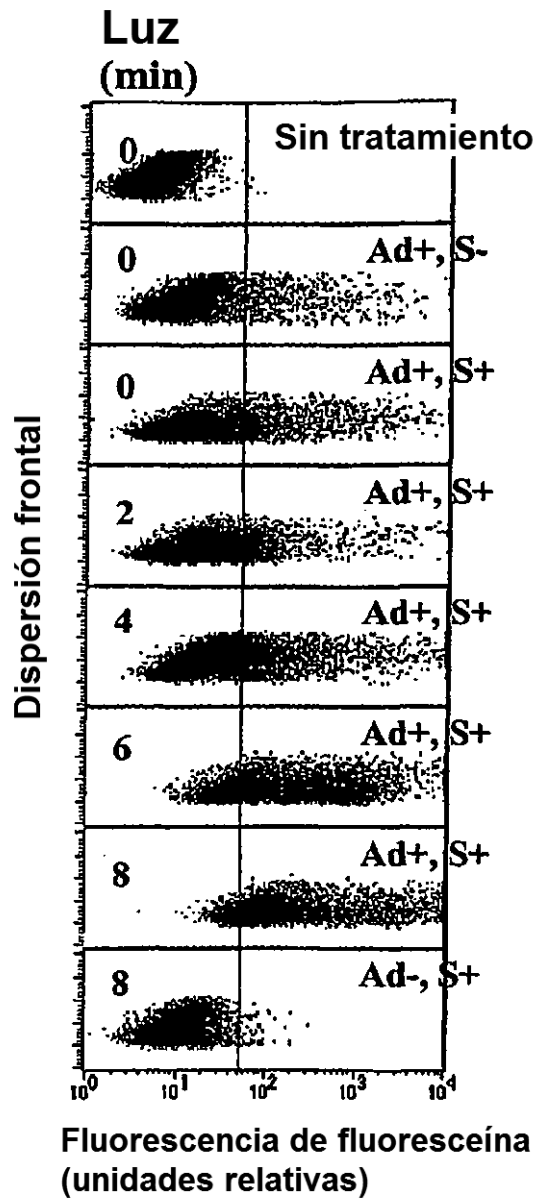


Figura 2A

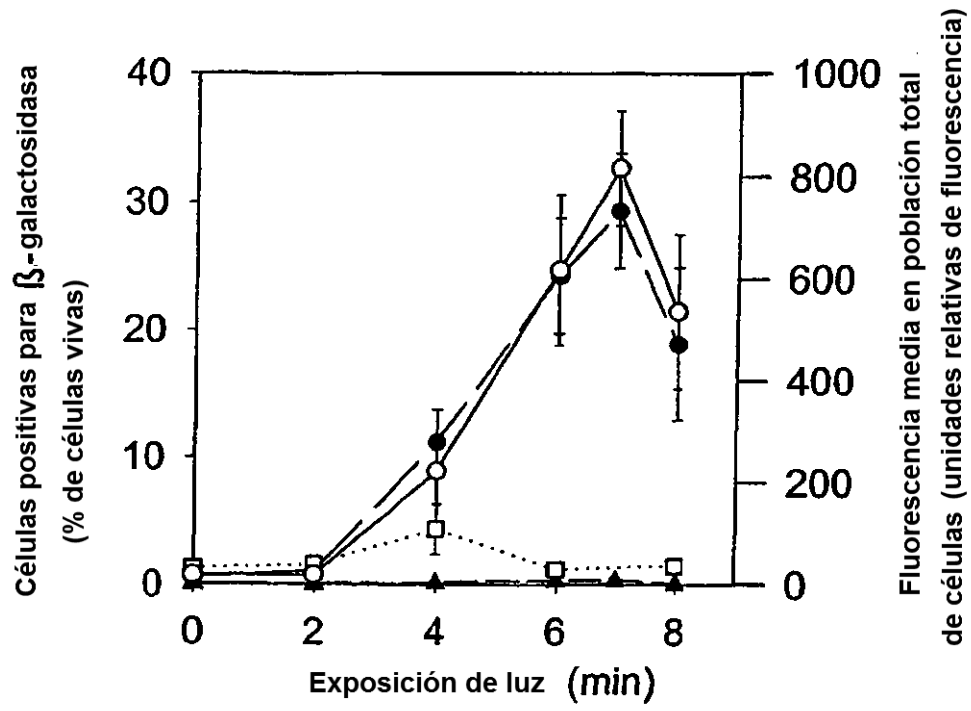


Figura 2B

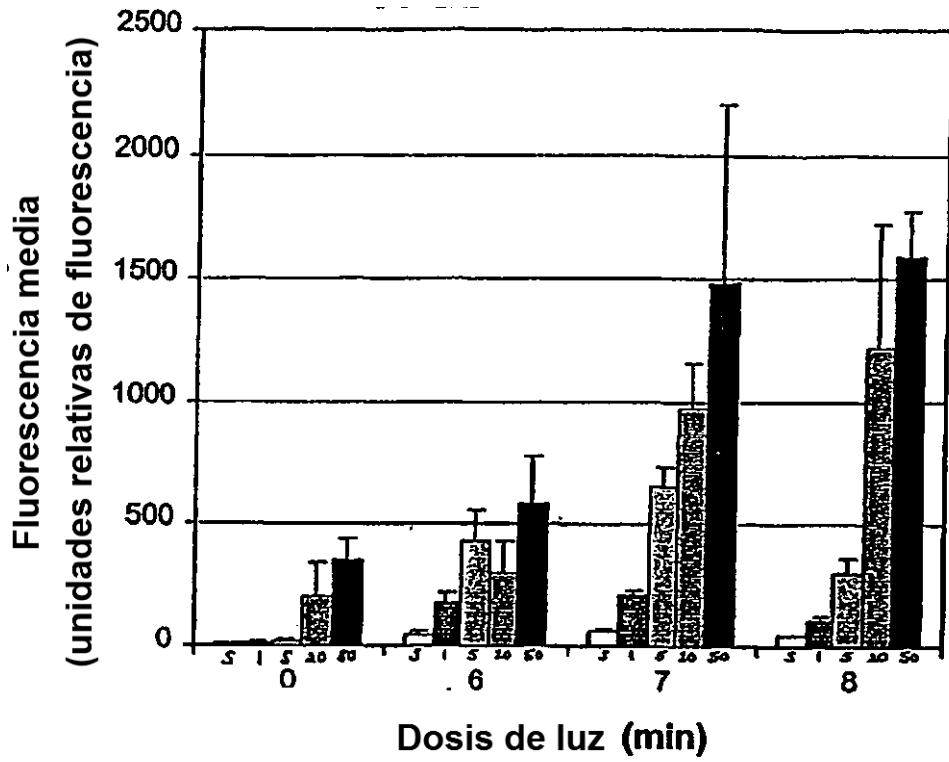


Figura 3A

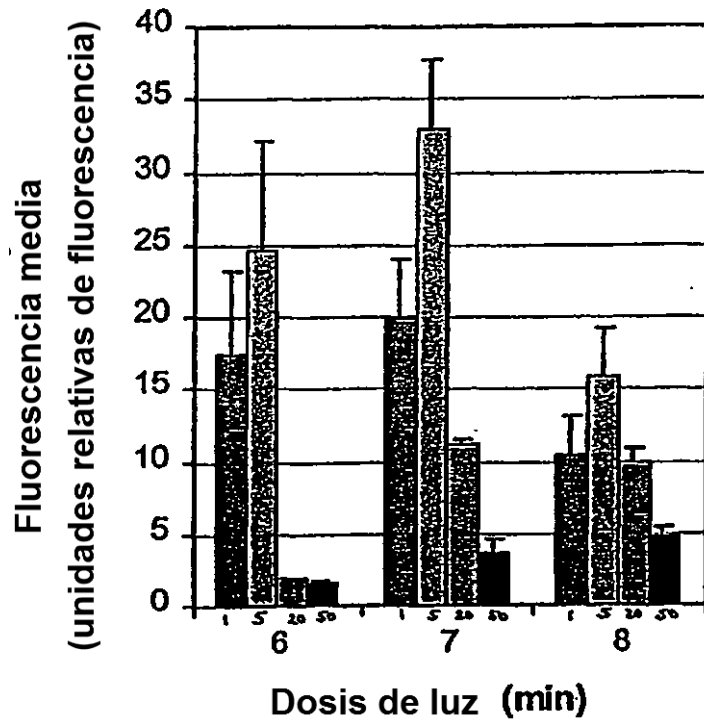


Figura 3B

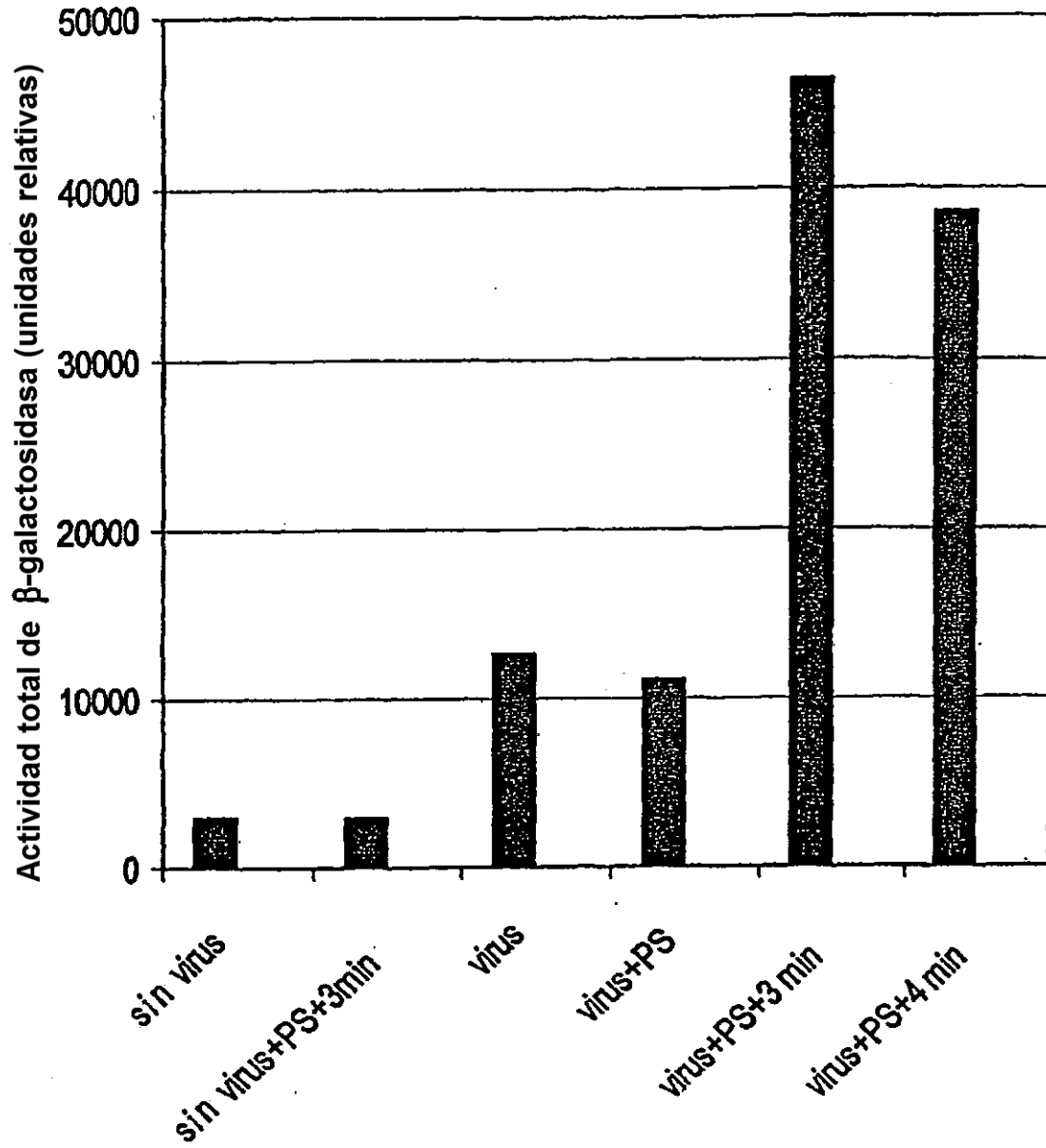


Figura 4

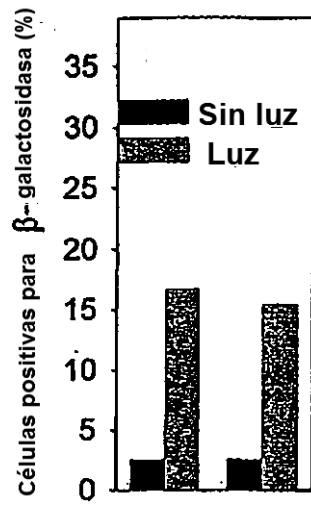


Figura 5

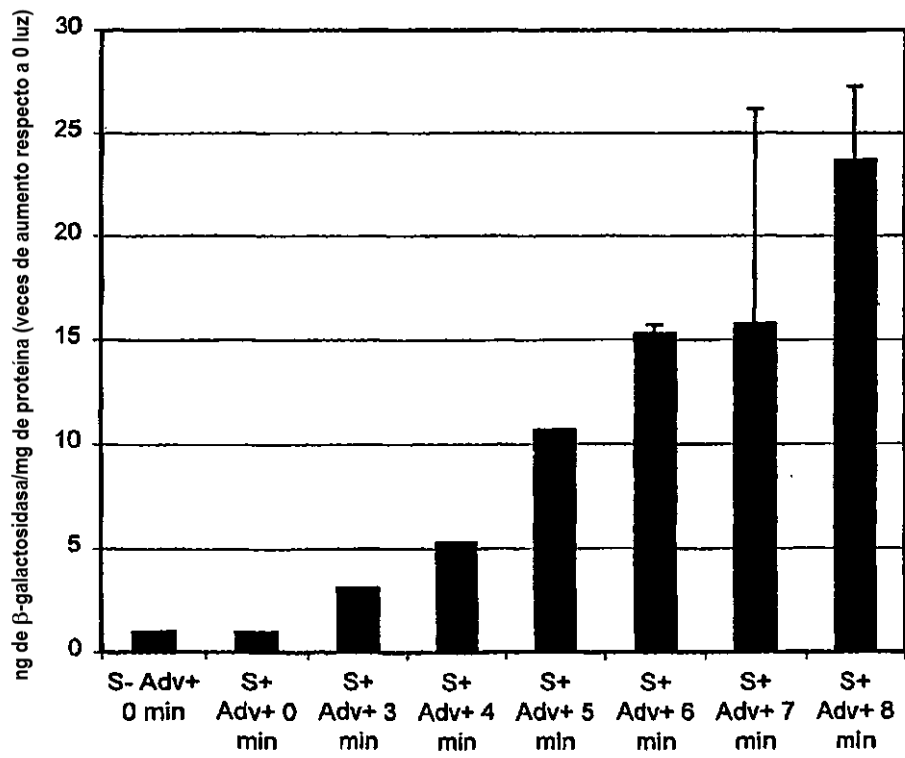


Figura 6

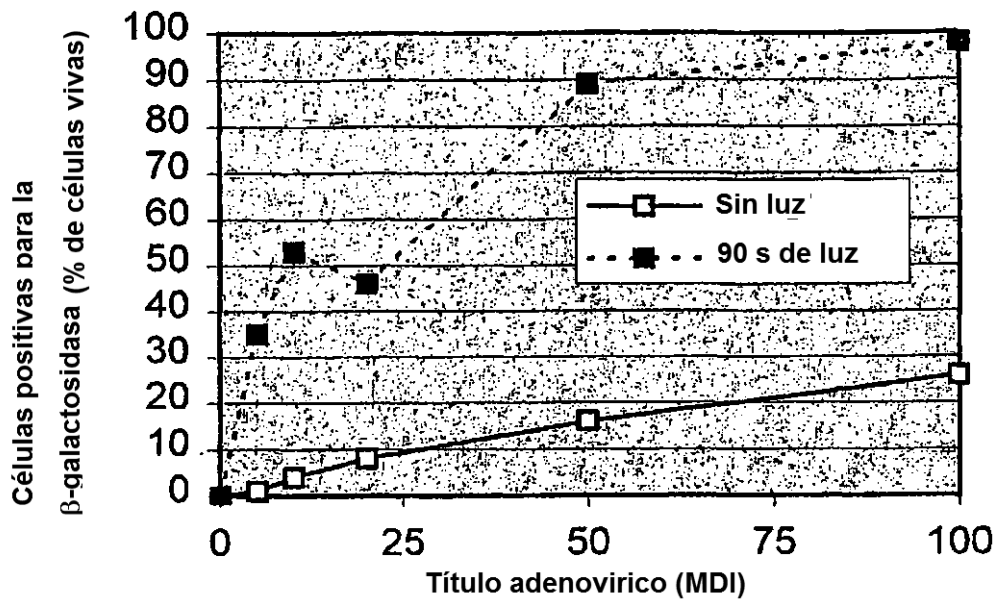


Figura 7

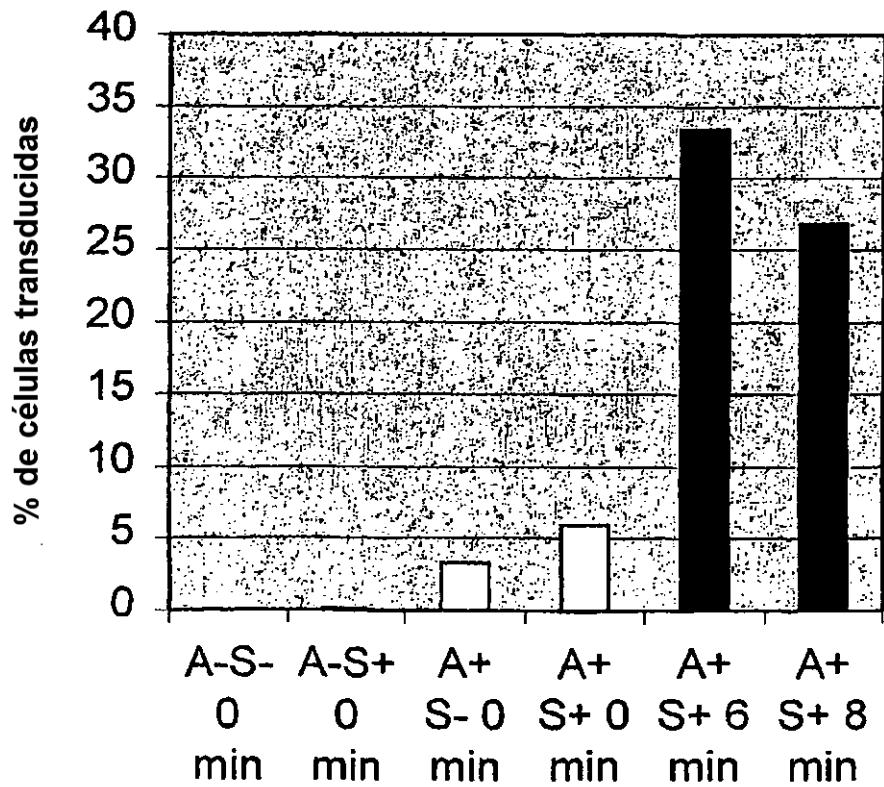


Figura 8

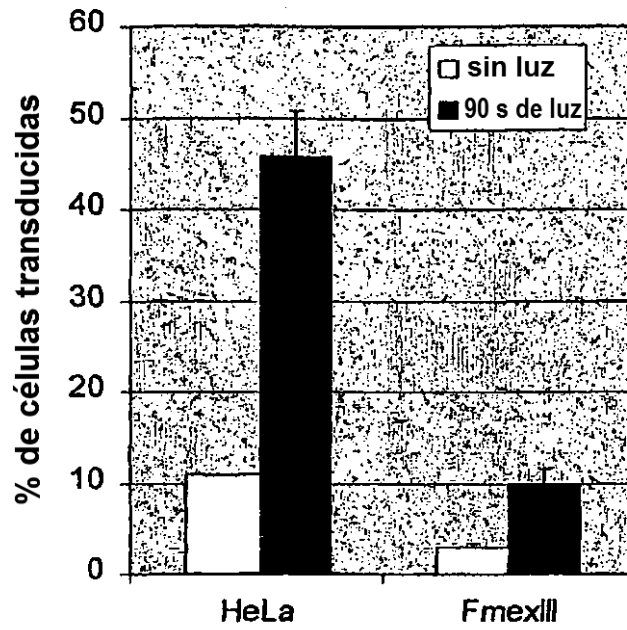


Figura 9

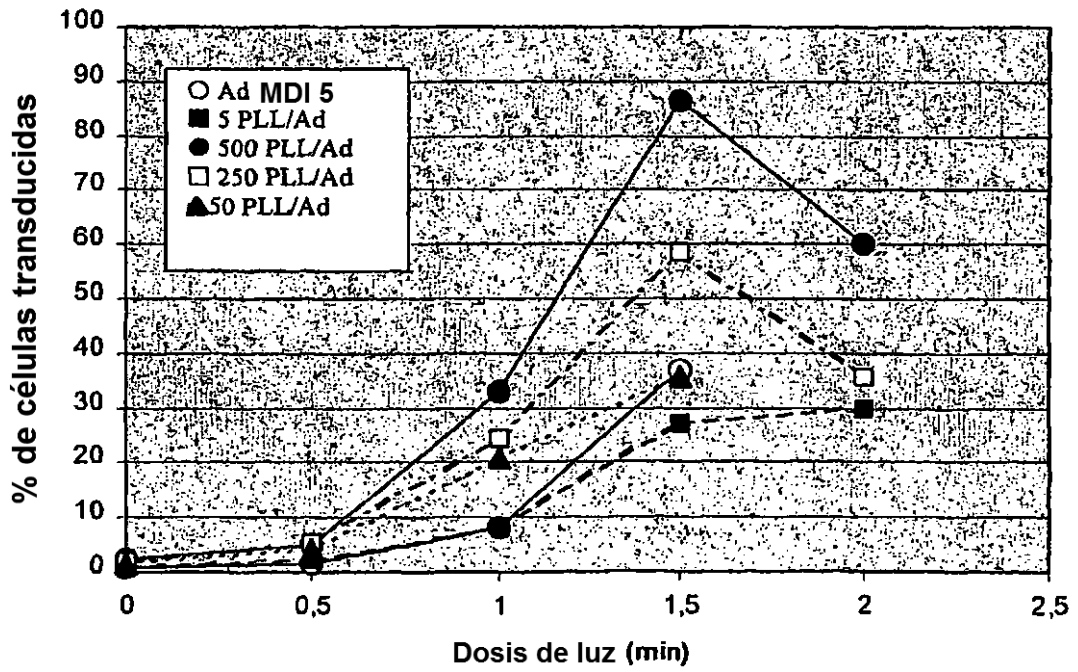


Figura 10



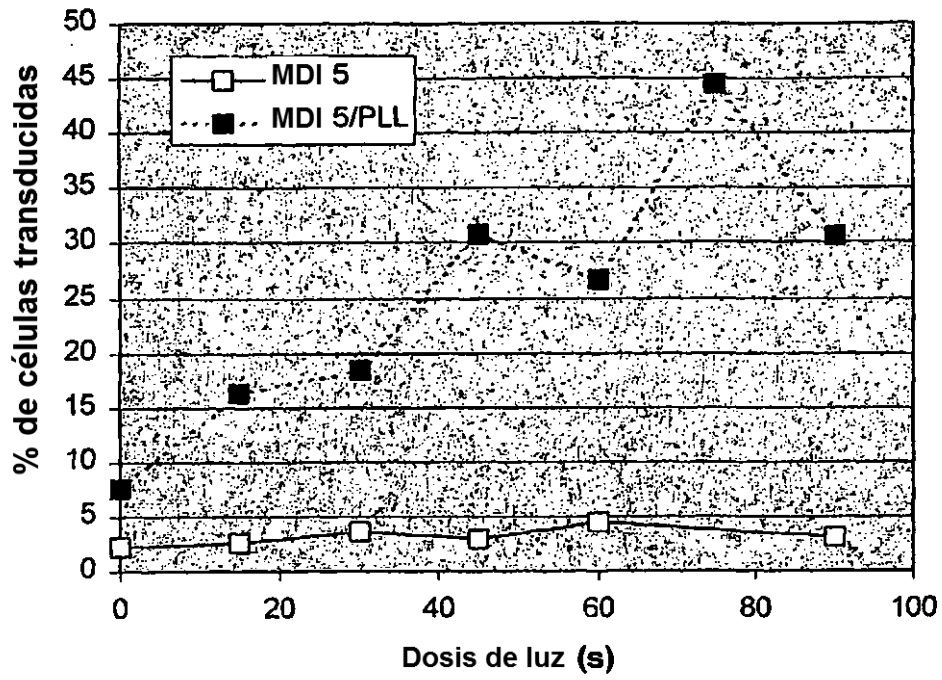


Figura 11

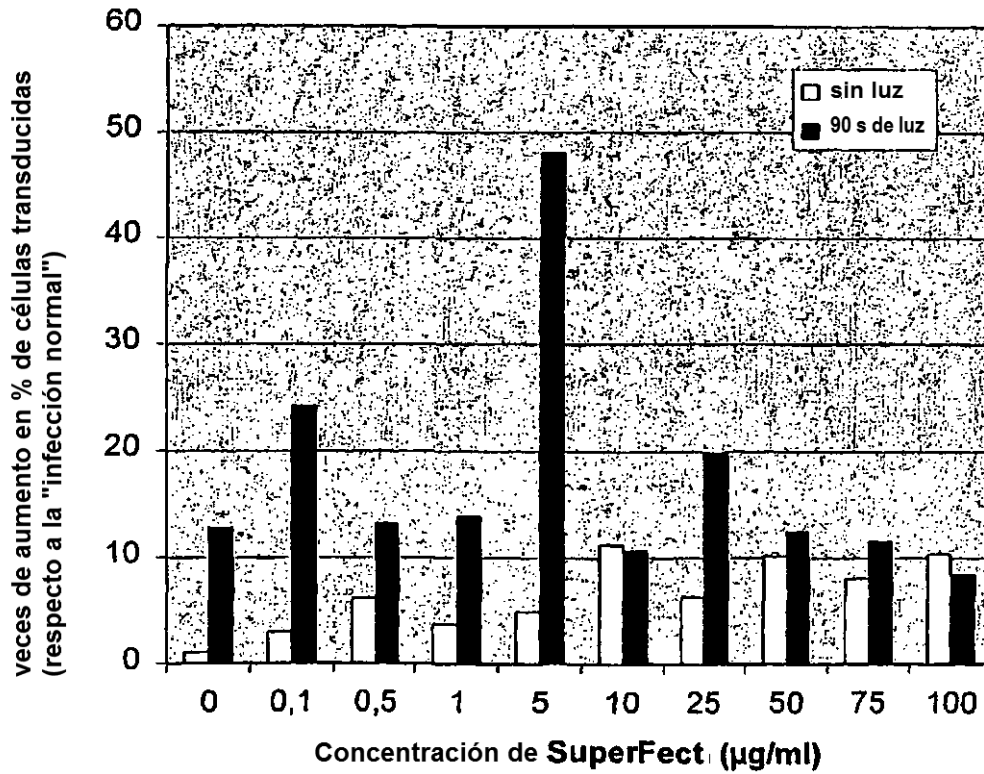


Figura 12

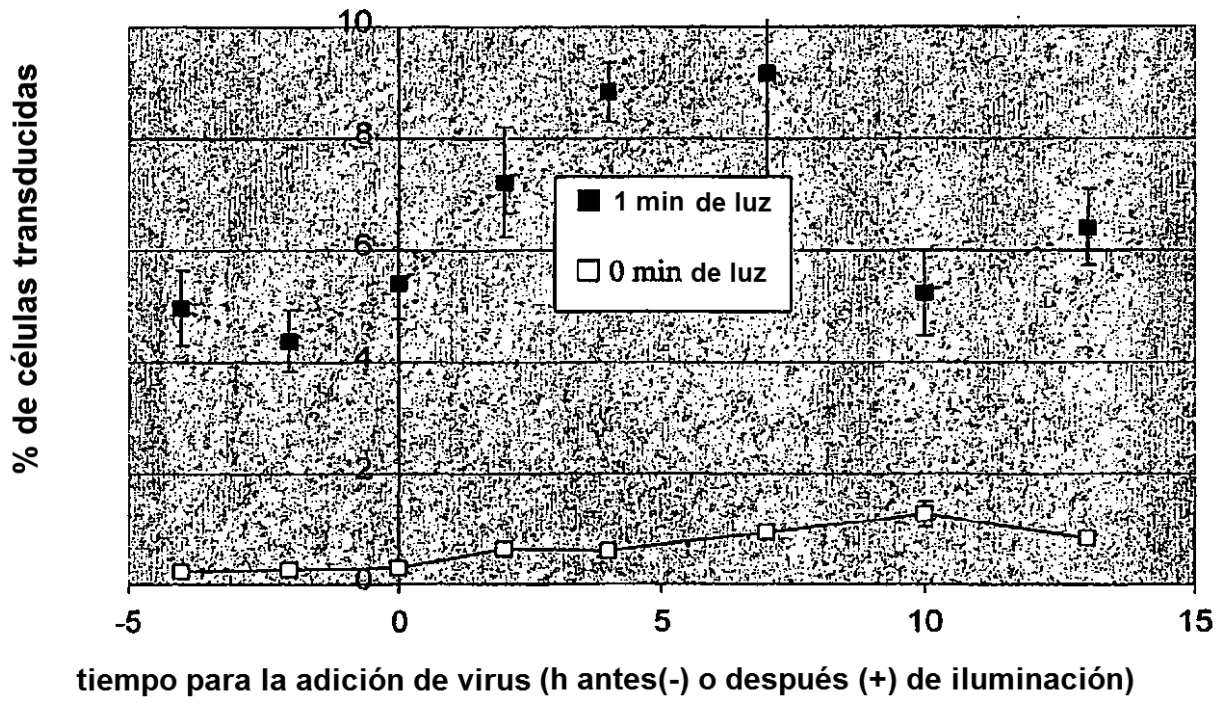
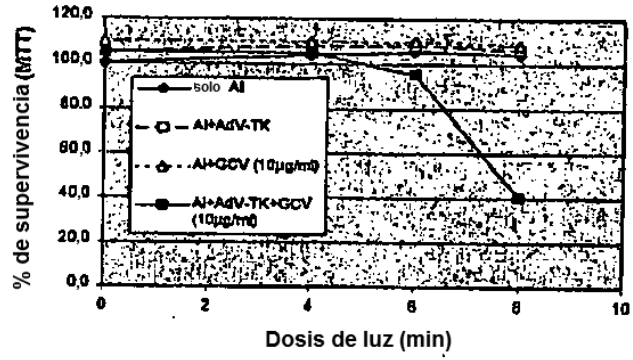
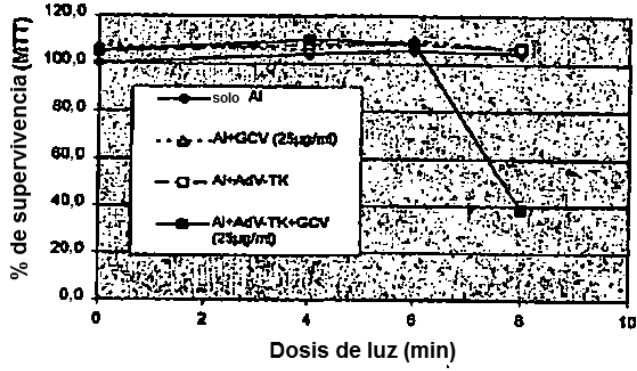


Figura 13

A



B



C

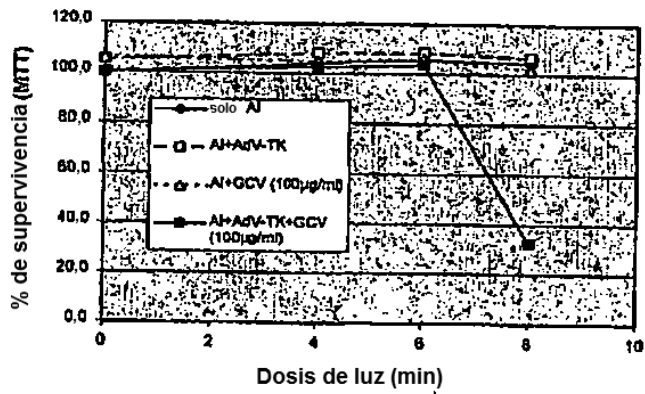


Figura 14