
Porfínicos para la fotoquimioterapia del cáncer y otras aplicaciones biomédicas

Ofir Arad,^a Ana Gavaldá,^a Óscar Rey,^a Noemi Rubio,^a David Sánchez-García,^a José I. Borrell,^a Jordi Teixidó,^a Santiago Nonell,^{a*} Magdalena Cañete,^b Angeles Juarranz,^b Angeles Villanueva,^b Juan C. Stockert^b y Pablo J. Díaz Jiménez^c.

Porphycene for cancer photochemotherapy and other biomedical applications.

Porfínicos per a la fotoquimioteràpia del càncer i altres aplicacions biomèdiques.

Recibido: 8-V-2002

RESUMEN

La terapia fotodinámica (PDT) o fotoquimioterapia del cáncer es una modalidad terapéutica que consiste en la aplicación de compuestos fotosensibilizadores que se acumulan preferentemente en tejidos neoplásicos. La irradiación del área tumoral con luz visible ocasiona la formación de formas reactivas de oxígeno cuya elevada citotoxicidad produce la muerte de las células malignas. El desarrollo de fotosensibilizadores para la localización de tumores y su tratamiento es un campo de investigación de gran actualidad, a la vez que se descubren nuevas aplicaciones terapéuticas no oncológicas para esas moléculas. Nuestro grupo ha centrado sus esfuerzos en el estudio y desarrollo de porfínicos, isómeros estructurales de las porfirinas, con mejores propiedades fotoquímicas y fotosensibilizantes que éstas. Los porfínicos son candidatos muy atractivos para ser utilizados como fármacos en terapia fotodinámica y otras aplicaciones biomédicas.

Palabras clave: Cáncer. Fotodetección. Fotoquimioterapia. Fotosensibilizadores. Porfínicos. Terapia fotodinámica.

SUMMARY

The photodynamic therapy (PDT) or photochemotherapy of cancer is a treatment modality that uses a photosensitizing drug with tumor-localizing properties. Irradiation of the tumor cells with light results in the formation of highly reactive, cytotoxic oxygen species that induce the death of malignant cells. The development of new photosensitizers for localization and treatment of tumors is a research area of current interest, paralleled by the development of novel non-oncological applications of these drugs. Our group is focused on the study and development of porphycenes, structural isomers of porphyrins, with better photochemical and photosensitizing properties. Porphycenes are highly attractive candidates to be used as photosensitizers for PDT and other biomedical applications.

Key words: Cancer. Photodetection (PD). Photochemotherapy. Photosensitizers. Porphycenes. Photodynamic therapy (PDT).

RESUM

La teràpia fotodinàmica (PDT) o fotoquimioteràpia del càncer és una modalitat terapèutica que consisteix en l'aplicació de compostos fotosensibilitzadors que s'acumulen preferentment en teixits neoplàsics. La irradiació de l'àrea tumoral amb llum visible ocasiona la formació d'espècies reactives d'oxigen amb efectes citotòxics que porten a la mort de les cèl·lules tumorals. El desenvolupament de fotosensibilitzadors per a la localització de tumors i el seu tractament és una àrea de recerca de gran actualitat, a la vegada que es descobren aplicacions terapèutiques no oncològiques per a aquestes molècules. El nostre grup ha centrat el seus esforços en l'estudi i desenvolupament de porfínicos, isòmers estructurals de les porfirines amb millors propietats fotoquímiques i fotosensibilitzants. Els porfínicos són candidats molt atractius per a ser utilitzats com a fàrmacs en la teràpia fotodinàmica.

Mots clau: Càncer. Fotodetecció. Fotoquimioteràpia. Fotosensibilitzadors. Porfínicos. Teràpia fotodinàmica.

1. INTRODUCCIÓN

La terapia fotodinámica del cáncer (PDT) o fotoquimioterapia es una modalidad terapéutica que consiste en la aplicación de compuestos fotosensibilizadores que se acumulan preferentemente en tejidos tumorales. Estos fotosensibilizadores son moléculas orgánicas que transforman la energía luminosa en energía química al igual que

^a Grup d'Enginyeria Molecular, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Via Augusta, 390, E-08017 Barcelona, Spain.

^b Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain.

^c Unidad de Endoscopia Respiratoria y Láser. Servicio de Neumología. Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge, Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet (Barcelona), Spain.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

lo hace la clorofila al catalizar la biosíntesis de glucosa. La irradiación del área tumoral con luz visible ocasiona la formación de especies reactivas de oxígeno con efectos citotóxicos que llevan a la muerte de las células tumorales. Actualmente se están desarrollando fotosensibilizadores para la localización de neoplasias y para su tratamiento, aunque también existen numerosas aplicaciones terapéuticas no oncológicas para esas moléculas.

La principal ventaja de la PDT sobre otros tratamientos convencionales del cáncer, es su selectividad para dañar exclusivamente el tejido tumoral sin inducir graves efectos secundarios en el organismo, ya que sólo en la zona tumoral irradiada se reúnen los tres agentes responsables del efecto fotodinámico: fotosensibilizador, luz y oxígeno. El fotosensibilizador más utilizado en la práctica clínica es el Photofrin® 4, una mezcla de porfirinas de composición y estructura aún hoy insuficientemente caracterizada. Aunque el Photofrin® está dando buenos resultados en distintos tratamientos fotoquimioterapéuticos, se encuentra lejos de ser el fotosensibilizador óptimo, debido a que presenta una escasa absorción en la zona roja del espectro (la cual presenta una mayor penetración a través de los tejidos), y además induce fotosensibilización cutánea en los pacientes, lo que les obliga a evitar la exposición solar durante 3-4 semanas después del tratamiento. Por ello en los últimos años se ha incrementado el interés en la investigación de fotosensibilizadores de segunda generación con mejores propiedades físicas, químicas y terapéuticas que el Photofrin®.

Nuestro grupo ha centrado sus esfuerzos en el estudio y desarrollo de porfíricos 13, que son isómeros estructurales de las porfirinas. Los porfíricos tienen un nivel de simetría menor que las porfirinas por lo que presentan una banda de absorción mucho más intensa en la zona roja del espectro. Esta y otras propiedades los hacen candidatos muy apropiados para ser utilizados como nuevos fármacos en la terapia fotodinámica.

2. TERAPIA FOTODINÁMICA: ANTECEDENTES

La curación de algunas enfermedades por mediación de la luz ya se conocía desde la antigüedad. Las antiguas culturas de Egipto, China, India y Grecia, más de tres mil años antes de la era moderna, trataban el raquitismo, entre otras enfermedades, mediante baños de sol (helioterapia)⁽¹⁾. Estas prácticas pueden considerarse como fototerapias ya que combinan la acción de la luz sobre el cuerpo del paciente sin administrar ningún fármaco fotosensibilizador exógeno⁽²⁾.

Estas técnicas evolucionaron en la India y en Egipto en el siglo XIV a.C. con la administración de extractos de plantas que contienen psoralenos 1, a enfermos de psoriasis y vitiligo en combinación con la exposición a la luz solar⁽³⁾. Dichas técnicas se engloban en el término fotoquimioterapia ya que las acciones terapéuticas se obtienen mediante la absorción de un fotón por un fotosensibilizador exógeno⁽²⁾.

A principios de la era cristiana estas actividades entraron en declive por considerarse prácticas paganas. No fue hasta finales del siglo XVIII que los médicos abordaron científicamente el estudio de los efectos beneficiosos de la exposición solar para el tratamiento de diversas enfermedades. La fototerapia es en la actualidad una tecnología médica bien establecida, con aplicaciones tan diversas como la fotoestimulación de la biosíntesis de la vitamina D, el tratamiento de la hiperbilirrubinemia (ictericia) neonatal y el tratamiento de lesiones musculares por poner sólo algunos ejemplos.

Las primeras investigaciones científicas sobre las *fotoquimioterapias* fueron los estudios experimentales de Raab (1900), discípulo de von Tappeiner, sobre la toxicidad de colorantes de acridina frente al protozoo de vida libre *Paramecium caudatum*^(4,5). Estos trabajos pusieron de relieve la existencia del fenómeno de la fotosensibilización, es decir la producción de daño celular inducido por la acción

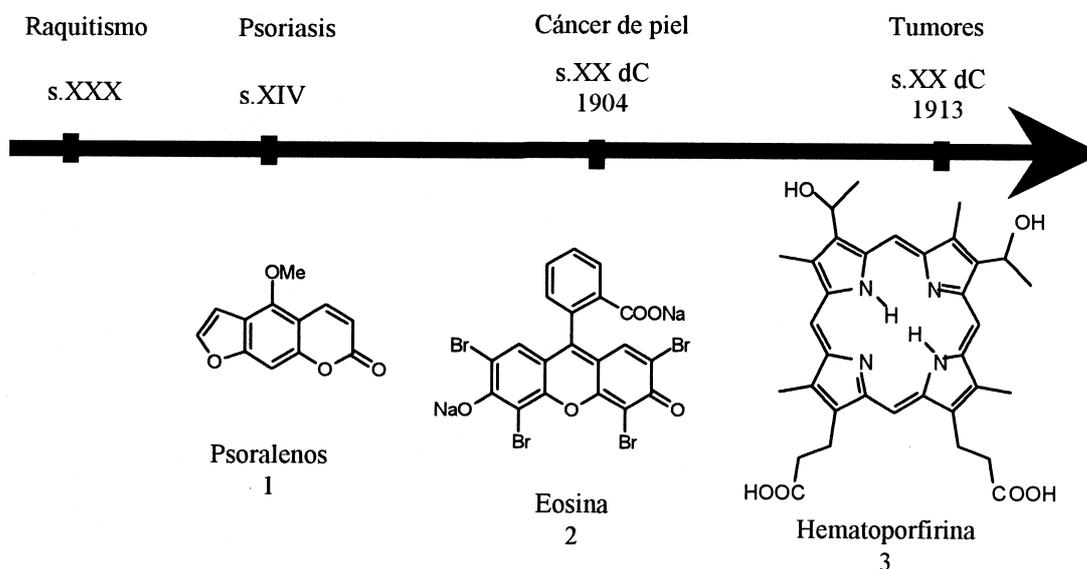


Figura 1. Evolución de las fototerapias y de los fotosensibilizadores a lo largo de la historia.

combinada de la luz y de ciertas sustancias fluorescentes. El médico danés Niels Finzen recibió el premio Nobel en 1903 por desarrollar la fototerapia como ciencia y popularizarla en el tratamiento del *lupus vulgaris*⁽¹⁾. En 1904, von Tappeiner y Jodlbauer relacionaron la fotosensibilización con la presencia de oxígeno y llamaron a este fenómeno «acción fotodinámica» para distinguirla de la fotosensibilización fotográfica. Tres años más tarde publicaron un libro en el que se habla por primera vez de terapia fotodinámica. Se suele usar, refiriéndose a ésta técnica, el acrónimo PDT que deriva del inglés «Photodynamic Therapy»^(6,7).

Dichos investigadores aplicaron por primera vez un fotosensibilizador sobre un tumor. Concretamente trataron tumores de piel aplicando eosina 2 tanto tópicamente como por inyecciones intratumorales y lo iluminaron con luz solar y con luz artificial. Las mejorías de los pacientes fueron notables. A partir de este momento se puede hablar de PDT del cáncer, técnica que combina la acción de la luz sobre un fármaco fotosensibilizador y oxígeno, para fotooxidar biomoléculas de las células tumorales y producir su muerte de forma selectiva⁽⁸⁾.

El interés por los fotosensibilizadores de tipo porfirínico se inició en 1911 con los experimentos de Hausman con la hematoporfirina⁽⁹⁾ (HP) 3. En 1913, Meyer-Betz demostró que las porfirinas podían actuar como fotosensibilizadores en humanos ya que tras inyectarse 200 mg de HP observó una severa hinchazón en las zonas que habían estado expuestas a la luz solar. Esta fotosensibilidad cutánea se mantuvo durante varios meses⁽¹⁰⁾.

En 1924, Policard observó fluorescencia roja en sarcomas de rata al exponerlos a una lámpara de Wood (de luz ultravioleta). La presencia de fluorescencia fue atribuida a la acumulación de porfirinas endógenas formadas al infectar el tumor con bacterias⁽¹¹⁾.

Auler y Banzer (1942) observaron tras una inyección sistémica de HP, una localización y retención selectiva en tumores experimentales notando una necrosis posterior en los mismos⁽¹²⁾. Posteriormente, inyectaron HP a animales inoculados con sarcoma de Jensen y carcinoma de Flicks-Jobling e iluminaron los tumores con una potente lámpara de cuarzo. Debido a que se obtuvieron resultados muy prometedores, se empezó a experimentar en humanos pero las investigaciones se interrumpieron a causa de la Segunda Guerra Mundial.

En 1948, Figge confirmó la retención selectiva de la HP *in vivo* y reconoció la importancia de esta sustancia como herramienta para el diagnóstico de tumores⁽¹³⁾. Rasmussen-Taxdal, Ward y Figge observaron una acumulación selectiva en diferentes tumores, pero las elevadas dosis que se requerían de HP y los riesgos de fotosensibilización asociados desaconsejaban la utilización de esta porfirina como método diagnóstico en humanos⁽¹⁴⁾.

En 1955, Schwartz demostró que las muestras de hematoporfirina comercial que se utilizaban en todas las investigaciones eran una mezcla de numerosas porfirinas y sólo contenían entre un 30 y un 65% de HP. Mediante una purificación parcial, las fracciones más ricas en HP resultaron ser las que peor se localizaban, mientras que el residuo mostraba una afinidad superior por los tumores. Por ello, se centraron los estudios en las fracciones residuales, ensayándose nuevos derivados (complejos con metales, uretanos...). Uno de estos derivados, que había sido obtenido tratando la HP con una mezcla de ácido acético y sulfúrico durante quince minutos y reprecipitando posteriormente con acetato sódico, resultó localizarse muy bien en tumores. A este nuevo compuesto se le dió el nombre de derivado de hematoporfirina (HpD)⁽¹⁵⁾.

Lipson *et al.* iniciaron los estudios con el HpD y observaron un aumento en la acumulación y una retención más duradera en tejidos tumorales en comparación con el teji-

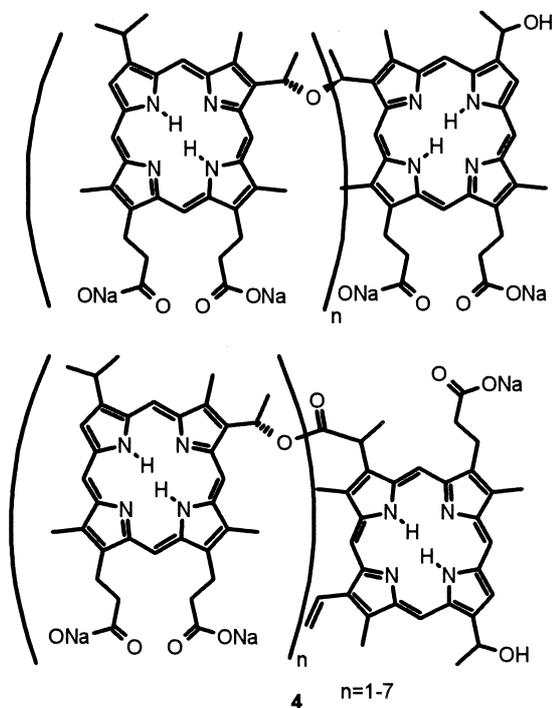


Figura 2. Photofrin® 4.

do normal, y con mejores propiedades fotoquímicas que la HP^(16,17). El HpD es una mezcla oligomérica de ésteres y éteres de la HP y por lo tanto no es una sustancia pura aunque su composición es más constante.

Este derivado se utilizó en humanos para diagnosticar tumores en bronquios, esófago y cuello uterino, con una buena correlación entre las zonas que mostraban fluorescencia y los resultados obtenidos mediante biopsia⁽¹⁸⁻²¹⁾. Después de resultados muy prometedores en ratas y ratones⁽²²⁾, Dougherty (1978) realizó los primeros ensayos de PDT con HpD en humanos con diferentes tipos de tumores, los cuales mostraron en mayor o menor grado una respuesta a la terapia⁽²³⁾.

En los últimos 20 años miles de pacientes han sido tratados mediante PDT, casi todos utilizando como fotosensibilizador el HpD o unas versiones más puras del mismo (Photofrin II® y Photofrin® 4). Canadá, Holanda, Japón, USA, Inglaterra y Francia aprobaron durante la década de los 90 el uso de la PDT en cánceres de esófago, pulmón y vejiga.

3. PRÁCTICA CLÍNICA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA DEL CÁNCER

El tratamiento mediante PDT se realiza en varias etapas. En primer lugar, se administra un fármaco fotosensibilizador al paciente vía tópica o intravenosa, según el cáncer a tratar y en función del fotosensibilizador y de su vía de administración, se espera entre 3 y 96 horas antes de proceder a la iluminación de la zona afectada. De esta forma, se consigue que los niveles de acumulación del fármaco en el tumor sean máximos respecto a los del tejido normal.

Posteriormente, se irradia el tejido tumoral mediante luz láser de longitud de onda adecuada, dirigiéndose a la zona

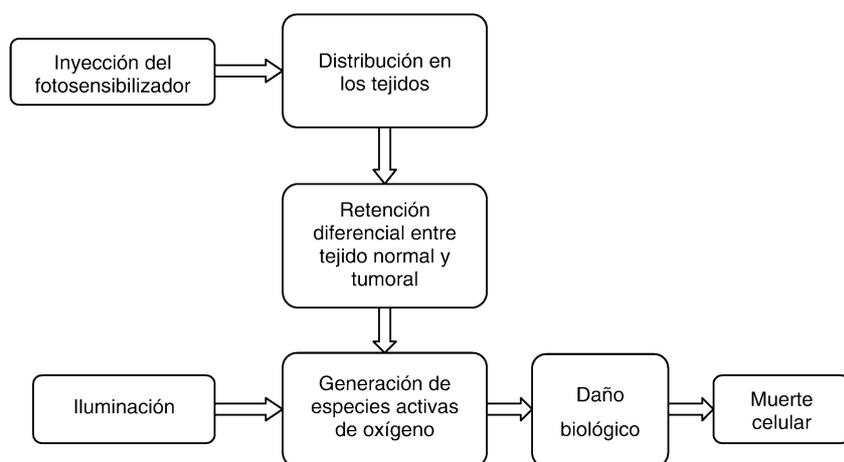


Figura 3. Esquema general de la terapia fotodinámica.

afectada mediante fibras ópticas. La emisión de fluorescencia por parte del fármaco permite al mismo tiempo detectar y localizar el cáncer⁽²⁴⁾, hecho que facilita la óptima situación de las fibras ópticas. La dosis de luz suministrada ha de ser suficientemente alta como para causar una respuesta eficaz en el tejido canceroso. La acción combinada de la luz y del fotosensibilizador genera radicales y formas reactivas de oxígeno que producen un daño biológico irreversible en la zona tratada conduciendo a la muerte celular.

Esta técnica destaca por dos aspectos: en primer lugar el fármaco sólo produce toxicidad después de absorber luz y en segundo lugar la acumulación del fotosensibilizador se produce preferentemente en el tejido tumoral produciendo un daño mínimo en el tejido normal.

4. BASE MOLECULAR DE LA PDT

a) Formulación y transporte de los fotosensibilizadores

Mientras que los fotosensibilizadores hidrofílicos se pueden administrar por inyección intravenosa directamente en soluciones acuosas, la baja solubilidad en agua de los fotosensibilizadores hidrofóbicos requiere su formulación en vehículos adecuados para conseguir un adecuado «targeting». Estos vehículos pueden ser pasivos o activos, los vehículos pasivos son: liposomas, dispersiones en aceites, partículas poliméricas biodegradables o conjugados fotosensibilizador-polímero hidrofílico. Los vehículos activos son complejos con lipoproteínas de baja densidad (LDL) o con anticuerpos monoclonales que dirigen el fotosensibilizador al tumor de forma mucho más selectiva consiguiéndose disminuir las dosis de aplicación y eliminar la fotosensibilización cutánea⁽²⁵⁾.

El fotosensibilizador se localiza en el tumor mediante dos mecanismos, acumulación activa y simple retención, siendo la retención el factor mayoritario si el vehículo es pasivo. La localización y biodistribución del fotosensibilizador viene determinada por: (i) propiedades del mismo (hidrofobicidad, distribución de carga, pK, constante de agregación-disociación y peso molecular), (ii) propiedades de los tejidos tumorales (pH, sistema vascular, drenaje linfático, presencia de macrófagos, etc) y (iii) propiedades de los sistemas de administración del fármaco⁽²⁶⁾. Hay que tener en cuenta sin embargo que algunas de estas pro-

piedades dependen de la especie y, por lo tanto, fármacos que han resultado eficaces en animales experimentales pueden ser inefectivos en humanos debido a la toxicidad sistémica, problemas farmacocinéticos, metabólicos, y a otros factores aún desconocidos.

Una vez inyectado el fotosensibilizador en la corriente sanguínea, puede asociarse con diferentes componentes del plasma, tales como lipoproteínas de densidad baja (LDL), de densidad elevada (HDL) o de densidad muy baja (VLDL), albúmina, globulinas, etc. El grado de asociación de un fotosensibilizador con dichos componentes parece estar relacionado con su grado de hidrofobicidad⁽²⁷⁻²⁹⁾. Así, si se inyecta un fotosensibilizador hidrofóbico por vía intravenosa, éste se une mayoritariamente a las lipoproteínas, mientras que si es hidrofílico, es principalmente transportado por albúmina y otras proteínas plasmáticas. Sin embargo, en fármacos con un considerable grado de hidrofobicidad un aumento en este parámetro no conduce a un aumento de la asociación⁽³⁰⁾. Esta distribución depende también en parte de la concentración relativa y absoluta de los componentes del plasma sanguíneo, ya que esta composición varía en función de la especie animal e incluso puede variar entre individuos de la misma especie.

Uno de los objetivos prioritarios de los investigadores para aumentar el potencial de la PDT es mejorar la localización selectiva. Con la finalidad de aumentar esta localización se intenta aprovechar una serie de características específicas de las células malignas, como la presencia de determinados antígenos o receptores⁽³¹⁾. Se han estudiado una serie de transportadores que por sus características permiten dirigir preferentemente el fotosensibilizador a los tejidos tumorales, como son anticuerpos monoclonales⁽³²⁾, LDL⁽³³⁾, liposomas y lectinas⁽³⁴⁾.

Las LDL son reconocidas por receptores específicos de la célula y el fotosensibilizador puede ser incorporado en la célula por endocitosis si se encuentra unido a las LDL. Este proceso está favorecido en células con un alto contenido de receptores de LDL tales como las células tumorales^(35, 36), células endoteliales y ciertos órganos normales en concreto, glándulas adrenales, hígado y riñón⁽³⁷⁻³⁹⁾.

La fotoinmunoterapia es una técnica que está actualmente en estudio y consiste en utilizar anticuerpos monoclonales antitumorales (MAbs) como medio de transporte del fotosensibilizador^(34, 40). Los MAbs que se unen a receptores específicos de determinados antígenos han mostrado buenos resultados dirigiendo fármacos al objetivo tumo-

ral. Para dirigir el fotosensibilizador al tumor es necesario preparar un complejo formado por un MAb y el máximo número de moléculas de fotosensibilizador sin perder la actividad del MAb. Esto se ha conseguido immobilizando previamente el fotosensibilizador en intermedios poliméricos (poliaminoácidos, dextrano o albúmina) y posteriormente uniendo este complejo al MAb^(41, 42). Esta técnica permitiría utilizar una gran variedad de fotosensibilizadores, incluso aquellos que no se retienen preferentemente en el tumor, y ofrecería una serie de ventajas como la reducción de la dosis y una mínima o nula fotosensibilidad cutánea. Actualmente, se están estudiando algunas limitaciones de la técnica, como son entre otras, la respuesta del sistema inmunológico a este complejo y la influencia del tamaño de dicho complejo.

b) Los fotones como fármacos

Los fotones de luz ultravioleta o visible que el fotosensibilizador absorbe lo promociona a un estado singlete excitado. De allí puede volver al estado fundamental emitiendo fluorescencia o puede pasar al estado triplete por cruzamiento intersistémico. De nuevo el triplete puede decaer al estado fundamental emitiendo fosforescencia o reaccionar con oxígeno para dar oxígeno singlete⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ (mecanismo tipo II). El sensibilizador también puede reaccionar directamente con una biomolécula por transferencia de

electrón o de hidrógeno (mecanismo tipo I)⁽⁴⁶⁾. Esta reacción puede darse también desde el estado singlete (1S_1), si bien el menor tiempo de vida de éste sugiere una menor probabilidad que desde el estado triplete. En ambos casos el resultado final es la oxidación de biomoléculas esenciales iniciándose una cadena autooxidativa⁽⁴⁷⁾. Si los daños son suficientes se produce la muerte celular por un mecanismo apoptótico o necrótico dependiendo, entre otros factores, de la dosis de tratamiento fototerapéutico⁽⁴⁸⁾.

La toxicidad de la PDT *in vivo* es debida principalmente a la producción de oxígeno singlete aunque pueden producirse ambas reacciones e incluso entrar en competencia. El mecanismo que predomina depende en cada caso de las características del fármaco y del medio.

Para ambas reacciones el oxígeno es un requisito. Experimentos *in vitro* utilizando Photofrin[®], demostraron que se conseguía un efecto fotodinámico completo en tejidos con niveles normales de oxigenación, pero la efectividad no aumentaba al incrementar dichos niveles. En cambio, no se producía efecto fotodinámico si se reducía drásticamente el contenido de oxígeno en el área tratada⁽⁴⁹⁾. Tanto los productos de reacción del tipo I como los del tipo II son muy reactivos, causando un daño muy localizado. Los tiempos de vida del oxígeno singlete y su distancia de difusión en un medio celular son muy limitados debido a su elevada reactividad y desactivación por par-

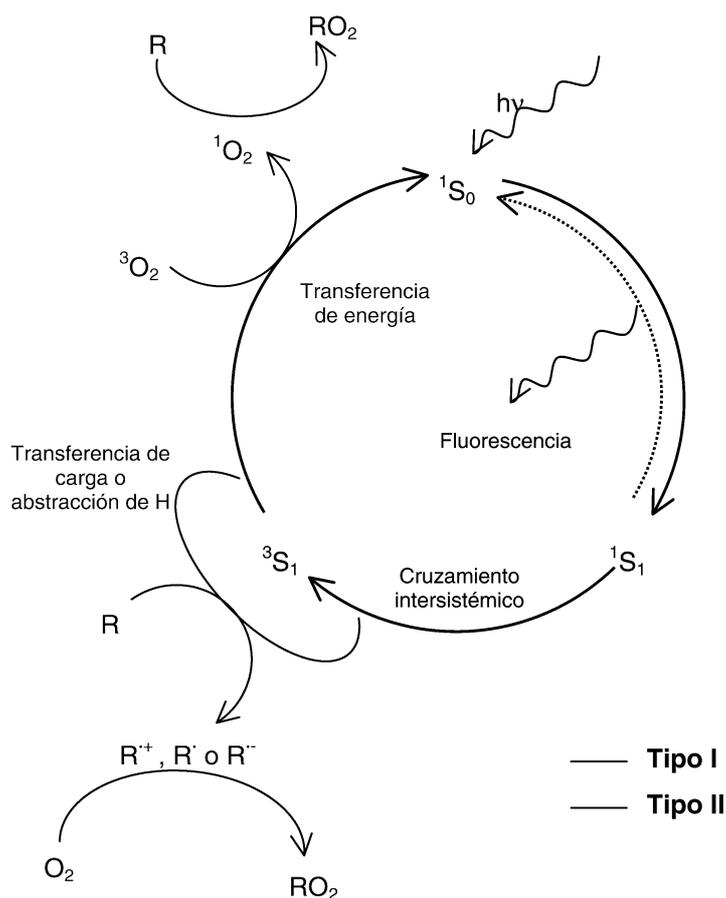


Figura 4. Esquema de los diferentes procesos primarios que tienen lugar en la PDT.

te de los componentes celulares. Se ha estimado que la distancia de difusión del oxígeno singlete en tejidos es de aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$ ⁽⁴⁵⁾.

Debido a la doble selectividad de la técnica y a que las especies citotóxicas tienen un tiempo de vida muy corto, el daño solamente se localiza en las células neoplásicas^(45, 49).

c) Mecanismos de la muerte celular

La distribución del fotosensibilizador entre los componentes del plasma afecta también a la biodistribución en los tejidos y en consecuencia existen dos mecanismos distintos de destrucción del tumor mediante PDT⁽⁴⁶⁾:

Inducción indirecta de muerte celular por destrucción de la vasculatura tumoral. Los fármacos hidrofílicos que se unen preferentemente a albúmina y globulina se acumulan en el estroma vascular y por lo tanto la muerte celular se produce indirectamente debido al daño causado a los vasos sanguíneos y a la consecuente reducción de la concentración de oxígeno y otros nutrientes.

Inducción directa de muerte celular. Los fotosensibilizadores con mayor afinidad por las lipoproteínas de baja densidad se incorporan en el interior de la célula localizándose concretamente en mitocondrias, lisosomas y membrana plasmática, y el efecto fotodinámico conduce a una pérdida de viabilidad o daño celular ya que afecta a la mayoría de componentes celulares. A pH fisiológicos la guanina es la base más sensible de los ácidos nucleicos, mientras que los aminoácidos más sensibles son histidina, triptófano, metionina y cisteína. La fotoperoxidación de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares conduce a cambios en la permeabilidad y pérdida de fluidez. Reacciones secundarias de residuos fotooxidados pueden llevar también a formar enlaces cruzados entre proteínas, ADN y proteínas, proteínas y lípidos, y ADN y lípidos. Todos estos efectos comprometen las funciones de la célula, lo que ocasiona su muerte. En muchos casos ambos efectos (inducción directa e indirecta de muerte celular) contribuyen a la destrucción del tumor.

5. LOS FOTSENSIBILIZADORES

El primer fotosensibilizador utilizado en estudios clínicos fue el derivado de hematoporfirina HpD, el cual es una mezcla compleja de porfirinas. Actualmente se utiliza una versión más pura del mismo denominada Photofrin[®] 4 comercializada por Axcan Pharma Inc. Este fotosensibilizador está aprobado en varios países para tratar algunos tipos de cáncer cervical, de pulmón, esófago, vejiga y estómago, y está siendo ensayado en otros tipos de tumores, con buenos resultados terapéuticos.

Sin embargo, el Photofrin[®] no es el fotosensibilizador ideal para la PDT ya que presenta varios inconvenientes. En primer lugar, esta droga es una mezcla compleja de porfirinas⁽⁵⁰⁾ que contiene más de un 80% de componentes activos y menos del 20% de componentes inactivos. En segundo lugar, el espectro de absorción del Photofrin[®] presenta una banda más intensa sobre los 400 nm (banda de Soret) y unas bandas por encima de 600 nm muy poco intensas. La penetración de la luz en los tejidos depende de su longitud de onda, y para $\lambda < 600 \text{ nm}$ ésta es muy limitada debido a la presencia de cromóforos endógenos y a la dispersión de la luz. Por último, la acumulación del fármaco en la piel provoca una elevada fotosensibilidad cutánea en los pacientes.

Por ello, en los últimos años se han desarrollado nuevos fotosensibilizadores que presentan propiedades más ade-

cuadas para la PDT. El fotosensibilizador ideal debería cumplir con los siguientes requisitos:

Químicos:

1. Compuesto puro con estabilidad química y fotoquímica.
2. Elevado coeficiente de absorción en la zona del rojo (650-800 nm).
3. Elevado rendimiento cuántico de formación de triplete o de especies activas de oxígeno.

Biológicos:

4. Solubilidad en fluidos biológicos. En caso contrario, debe poder transportarse al tumor utilizando algún tipo de formulación (liposomas, aceite de castor,...).
5. Localización y retención selectiva en el tumor.
6. Mínima toxicidad en ausencia de luz.
7. Rápida eliminación del fármaco en los tejidos no tumorales y mínima fotosensibilidad cutánea.

Por ello se están desarrollando nuevos sensibilizadores, llamados de segunda generación. Muchos de ellos se basan en macrociclos tetrapirrólicos aunque se están estudiando también macrociclos de 3 y de 5 unidades de pirroles así como otras familias de colorantes. Existen varias estrategias para mejorar las propiedades fotoquímicas del fármaco. La primera consiste en expandir el anillo de porfina 5 para desplazar la longitud de onda del máximo hacia el rojo. Otra estrategia consiste en introducir un heteroátomo, normalmente nitrógeno para obtener este mismo efecto⁽⁵¹⁾. Por otro lado se puede aumentar la intensidad de la absorción de la banda de menor energía, rompiendo la simetría del sistema π de la molécula⁽²⁾. Formando complejos metálicos de estos fotosensibilizadores se consigue mejorar sus propiedades fotoquímicas ya que por efecto de átomo pesado suele disminuir la fluorescencia y aumentar el rendimiento cuántico de formación de triplete.

Aplicando estas estrategias se obtienen clorinas 6, bacterioclorinas 7, purpurinas^(52, 53) 8, azaporfirinas 9, ftalocianinas⁽⁵⁴⁾ 10, naftalocianinas 11, texafirinas 12, porfínicos 13⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾, etc, como posibles fármacos alternativos aplicables en la PDT del cáncer⁽⁵⁸⁾.

Un caso especial es la protoporfirina IX (PpIX) 18 ya que es un fotosensibilizador generado endógenamente por el ácido 5-aminolevulínico (ALA)⁽⁵⁹⁾. En un primer paso de la biosíntesis del grupo hemo se forma el ALA a partir de glicina y succinil CoA. El ALA evoluciona a PpIX en varios pasos regulados enzimáticamente y por último se incorpora un átomo de hierro al macrociclo de PpIX. Esta incorporación de hierro se realiza en la mitocondria bajo la acción del enzima ferroquelatasa. Bajo circunstancias normales, la biosíntesis está regulada y no se acumula PpIX, pero si se administra exógenamente un exceso de ALA, la PpIX se puede acumular debido a la capacidad limitada de la ferroquelatasa. En la figura 6 se muestran los principales pasos de la biosíntesis de la PpIX.

Aunque la PpIX no es un fotosensibilizador más eficiente que el Photofrin[®], la aplicación tópica de su precursor ALA presenta una serie de ventajas. Se pueden tratar diversas enfermedades dermatológicas muy superficiales (1-2 mm) donde no se requiere longitudes de onda mayores a 630 nm, la terapia no es invasiva, tiene un periodo de fotosensibilización muy corto, produce excelentes resultados cosméticos y es muy bien tolerada por los pacientes.

Otra de las aplicaciones prometedoras del ALA que está en fase de estudio es su utilización como técnica de diagnóstico de cánceres del aparato digestivo, vejiga y pul-

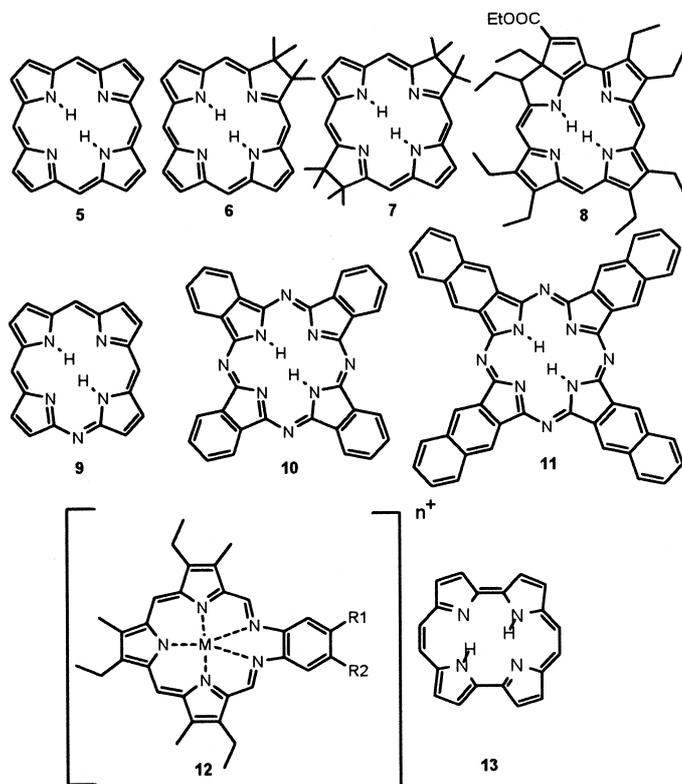


Figura 5. Estructuras de posibles fotosensibilizadores de segunda generación.

TABLA I

Propiedades de algunos fotosensibilizadores de segunda generación^(55, 58, 60, 61) **Verteporfin 14:** monoácido del derivado benzoporfínico, **Purlytin™ 15:** etiopurpurina de estaño, **Foscan® 16:** metatetrahidroxifenilclorina, **NPe6 17:** monoaspartilclorina, **PpIX 18:** protoporfirina IX, **ALA:** ácido 5-aminolevulínico. ϕ_F = rendimiento cuántico de fluorescencia, ϕ_T = rendimiento cuántico de triplete y ϕ_Δ = rendimiento cuántico de oxígeno singlete.

Compuesto	λ (nm) ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	Rendimiento cuántico			Fotosensibilidad Cutánea
		ϕ_F	ϕ_T	ϕ_Δ	
Photofrin II® 4	628 (3000)	0.1	0.6	0.3	6-12 semanas
Verteporfin 14	690 (35000)	0.05	0.75	0.7	5 días
Purlytin™ 15	665 (30000)	0.1	0.8	0.6	4 semanas
Foscan® 16	652 (35000)	0.1	0.9	0.4	3-6 semanas
Npe6 17	664 (38000)	0.1	0.8	0.8	2-4 días
ALA-PpIX 18 (Levulan®)	635 (5000)	0.1	0.8	0.6	-

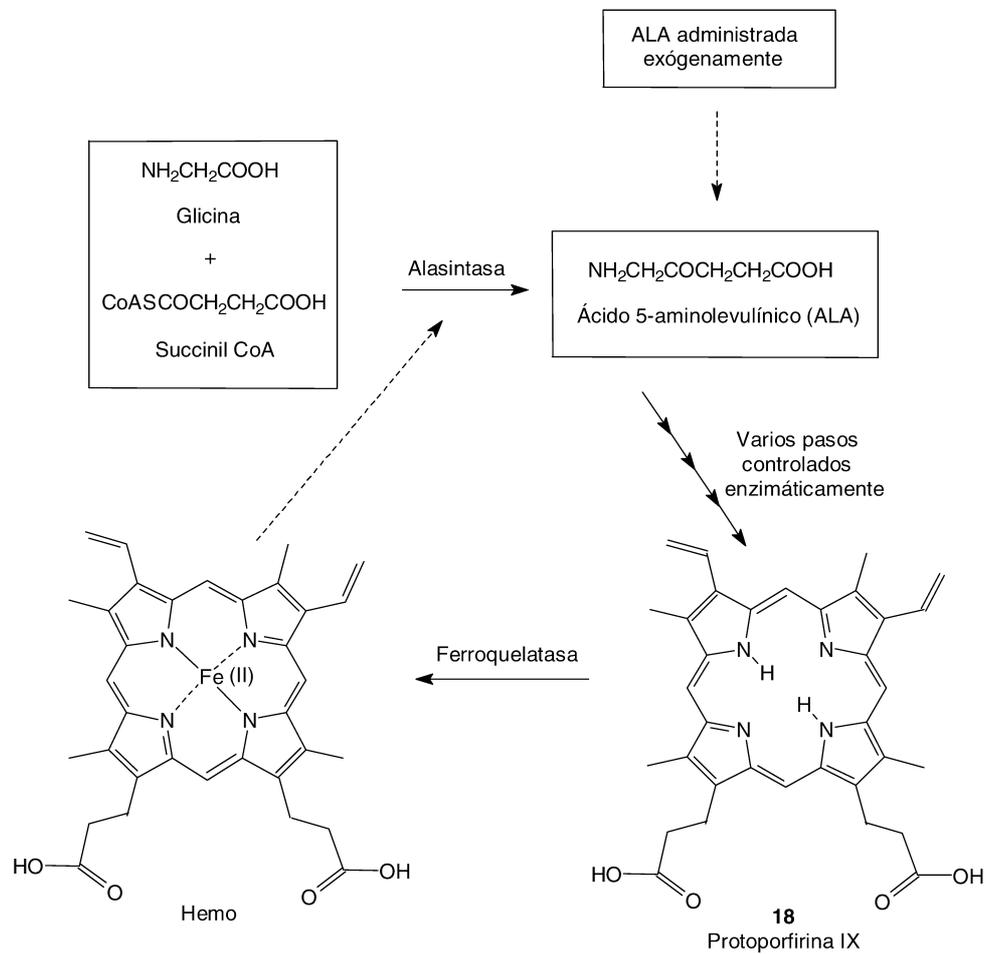


Figura 6. Biosíntesis de la PpIX 18.

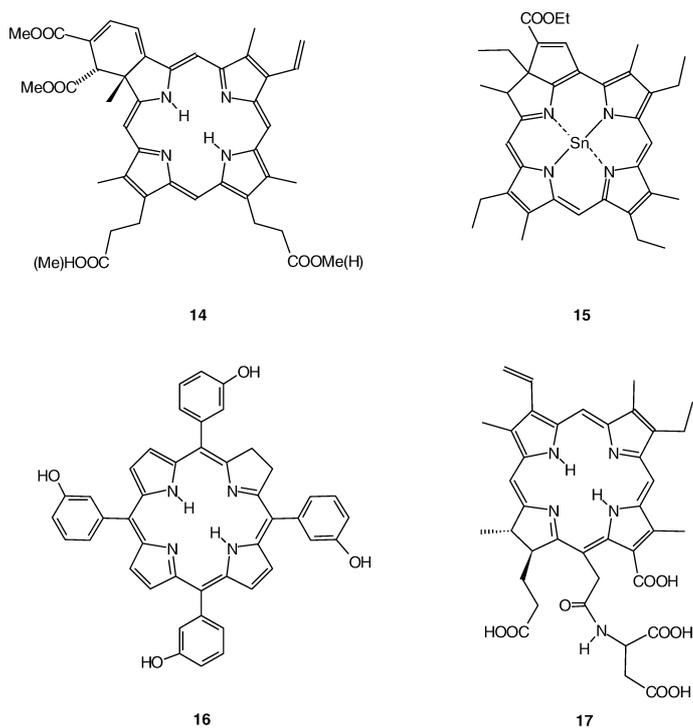


Figura 7. Estructura de 14: Verteporfin, 15: Purlytin™, 16: Foscan®, 17: NPe6.

món. En este caso el ALA se administra por vía sistémica o por inhalación.

En la Tabla I se muestran las principales características de los fotosensibilizadores de segunda generación que están en fases clínicas de investigación.

e estaño, Foscan® 16: meta-tetrahidroxifenilclorina, NPe6 17: monoaspartilclorina, PpIX 18: protoporfirina IX, ALA: ácido 5-aminolevulínico. (F = rendimiento cuántico de fluorescencia, (T = rendimiento cuántico de triplete y ((= rendimiento cuántico de oxígeno singlete.

6. APLICACIONES NO ONCOLÓGICAS

Aunque la PDT ha estado principalmente enfocada al tratamiento del cáncer, en los últimos años se están evaluando nuevas aplicaciones en diferentes campos.

Estética: la fotodepilación se basa en usar un láser que irradia a una longitud de onda adecuada (en función del color del vello y del color de la piel) para eliminar de forma permanente el vello. Actualmente se está estudiando la acción del ALA aplicado tópicamente para mejorar la técnica de la fotodepilación.

Dermatología: mediante la PDT se tratan enfermedades dermatológicas no oncológicas como psoriasis, malformaciones vasculares y acné^(60, 62).

Inactivación fotodinámica de bacterias: el aumento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos ha favorecido el estudio de técnicas antimicrobianas alternativas. Clásicamente se dividen las bacterias en organismos Gram-negativos y Gram-positivos, según su reacción frente a la tinción de Gram. Las Gram(+) poseen una sola pared celular gruesa y homogénea mientras que en las Gram(-) la pared celular es delgada y estratificada con un aspecto

trilaminar⁽⁶³⁾. Varios estudios muestran que se pueden inactivar determinadas bacterias al ser iluminadas después de un periodo de incubación con ciertas porfirinas y ftalocianinas. Concretamente, derivados aniónicos y neutros de estos fotosensibilizadores producen un efecto fototóxico en las bacterias Gram(+), aunque en las Gram(-) el efecto tóxico sólo se produce si se permeabiliza previamente la membrana externa utilizando cloruro cálcico, EDTA o polimixina B⁽⁶⁴⁾. Por el contrario, los derivados catiónicos de estos fotosensibilizadores son capaces de destruir tanto las Gram(+) como las Gram(-) sin previa permeabilización^(65, 66). Las causas de este comportamiento no están esclarecidas todavía pero parece ser que el fotosensibilizador catiónico se une electrostáticamente a grupos negativos de la membrana externa. De esta forma, al irradiar se produce un daño localizado que aumenta la permeabilidad de dicha membrana^(67, 68).

Esta nueva aplicación puede ser de gran utilidad en el tratamiento de tejidos infectados (limpieza de cavidades interiores y en el tratamiento de afecciones bucales, etc).

Inactivación de virus: Otra posibilidad que ha despertado mucho interés es la fotoinactivación de virus en la sangre humana como método para esterilizar sangre y productos derivados para transfusiones⁽⁶⁹⁾. Actualmente es posible esterilizar plasma y algunos derivados sanguíneos como la albúmina y factores de coagulación utilizando calor o detergentes, pero los componentes celulares de la sangre no soportan este tratamiento debido a su fragilidad. Aunque la implantación de métodos preventivos como la selección de donantes y los análisis sanguíneos han disminuido el riesgo de contaminación por agentes infecciosos como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y la hepatitis B y C, este riesgo no se puede eliminar completamente. La fotoinactivación de virus en componentes celulares está todavía en fase de estudio, pero diversos fotosensibilizadores han mostrado resultados prometedores en deter-

TABLA II
Fotosensibilizadores para diferentes aplicaciones fotodinámicas.

Producto	Aplicación	Empresa
Photofrin® (Porfimer sodium 4)	Diagnóstico y tratamiento de tumores sólidos	Axcan Pharma Inc.
LuTex (Motexafin Lutetium 8 M = Lu n = 2)	Lutrin™: tumores sólidos Optrin™: oftalmología Antrin™: enfermedades cardiovasculares	Pharmacyclics
Visudyne® (Verteporfin 14)	Oftalmología (degeneración macular)	Novartis Ophthalmics, QLT Photo Therapeutics
Puryltin™ (SnET2 15)	Aplicaciones oncológicas	Pharmacia&UpJohn
Foscan® (Temoporfin 16)		QuantaNova Ltd.
Npe6 17		Nippon Petrochemicals
Levulan® (ALA-PpIX 18)	Diagnóstico y tratamiento de tumores sólidos, dermatología, ginecología, enfermedades cardiovasculares, fotodepilación	Dusa Pharmaceuticals

minados virus con y sin cobertura⁽⁷⁰⁻⁷²⁾. Es importante que los fotosensibilizadores no produzcan mutaciones en el ADN, y no alteren las funciones biológicas de los componentes de la sangre.

Oftalmología: La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una de las principales causas de ceguera en personas de más de 50 años y se debe a un rápido crecimiento anormal de vasos sanguíneos en la retina. La ruptura de estos vasos produce una progresiva pérdida de la capacidad visual y en el 80-90% de los casos no existe ningún tratamiento adecuado. Los excelentes resultados obtenidos al tratar esta enfermedad mediante PDT muestran un futuro esperanzador; concretamente el Visudyne[®] ya ha sido aprobado internacionalmente para el tratamiento de la DMAE.

Arterioesclerosis: La posibilidad de tratar esta enfermedad con la PDT se basa en el hecho de que las placas de aterosclerosis en las arterias dañadas retienen concentraciones más elevadas de porfirinas que la pared vascular normal⁽⁶⁰⁾.

Ginecología: La ablación de endometrio mediante PDT es una técnica que evita la cirugía y es una alternativa a la histerectomía para mujeres con hemorragias uterinas disfuncionales^(73,74).

En la tabla II se citan algunos fotosensibilizadores registrados para distintas aplicaciones fotodinámicas.

7. LOS PORFICENOS

El porfíceno 13 es un macrociclo tetrapirrólico, isómero estructural de la porfina 5 en el que en vez de intercalar puentes de un solo átomo de carbono entre los pirroles, se intercalan puentes de 2 átomos de carbono entre dos bipirroles. Por lo tanto existe una circulación de 18 electrones (π), y el macrociclo es totalmente aromático. A estos sistemas porfirinoides se les denomina de forma sistemática [18]porfirina-(2.0.2.0).

Su descubrimiento se debe a E. Vogel en 1986, quien lo llamó porfíceno por ser un híbrido entre una porfirina y un aceno⁽⁷⁵⁾. Posteriormente se describieron los 2,7,12,17-tetraalquilporfícenos 19 con restos R = metilo, etilo y propilo⁽⁷⁶⁾, y desde entonces no se han dejado de describir periódicamente derivados con sustituyentes en otras posiciones, así como determinados complejos metálicos⁽⁷⁷⁾. Los análisis de rayos X muestran que los porfícenos son compuestos centrosimétricos de estructura casi plana y simetría D_{2h} . Debido a esta simetría menor que presentan los porfícenos respecto de las porfirinas, se observa un aumento del coeficiente de absorción en la zona visible del espectro. Este aumento de la absorbancia de las bandas Q es debido a que transiciones prohibidas por la simetría de las porfirinas pasan a ser permitidas en los porfícenos. Los estudios realizados sobre propiedades fotoquímicas de los porfícenos (rendimientos cuánticos de fluorescencia, de triplete y de formación de oxígeno singlete) muestran que son buenos candidatos para ser utilizados en la PDT del cáncer⁽⁷⁸⁾.

En el Grupo de Ingeniería Molecular del Instituto Químico de Sarriá (GEM) se sintetizó el 2,7,12,17-tetrafenilporfíceno⁽⁷⁹⁾ (TPPo) 20 y posteriormente se desarrolló una síntesis industrializable para dicho compuesto⁽⁸⁰⁾. La ventaja que presenta el grupo fenilo como sustituyente es que se pueden diseñar diversos derivados usando la química del benceno y regular sus propiedades fisicoquímicas.

El TPPo es un sólido de color violeta brillante, muy insoluble en agua aunque se puede disolver en disolventes apolares dando disoluciones de color azul intenso en diclo-

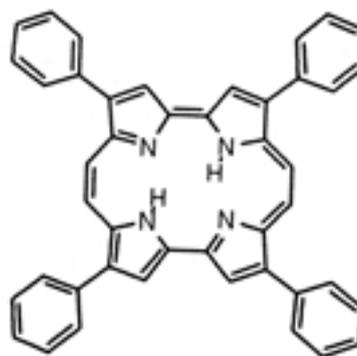


Figura 8. Estructura del 2, 7, 12, 17-tetrafenilporfíceno 20.

TABLA III

Efecto de los sustituyentes en el máximo de absorción del porfíceno.

Sustituyente en las posiciones 2,7, 12, 17	Máximo de absorción (nm)
-H	633
-Pr	637
-Ph	663

rometano y verdoso en hexano o éter. Es una molécula aromática y plana salvo por los fenilos que están inclinados con respecto al plano de la molécula. Como se puede observar en la tabla III, la introducción de los restos fenilo tiene un efecto batocrómico de 30 nm de las bandas Q, con respecto al porfíceno sin sustituyentes.

La reactividad del anillo de porfíceno se halla descrita en diversas patentes. En la figura 9 se puede apreciar las distintas estructuras a las que se puede llegar mediante diversas reacciones químicas⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾. A través de las mismas se pueden unir los porfícenos mediante enlaces éter, éster o amida a otras moléculas, con el objetivo de estudiar su interacción con el fotosensibilizador o para mejorar las propiedades de este último.

El estudio de los porfícenos y de sus complejos metálicos está revelando una información valiosa sobre los mecanismos de la PDT, y en concreto, de la inducción de muerte celular, de la localización de los fármacos en las células y de su interacción con biomoléculas^(48, 90). Pruebas *in vitro* en células tumorales humanas han dado muy buenos resultados^(77, 91-93).

El complejo de paladio del tetrafenilporfíceno (PdTPPo), desarrollado por nuestro grupo, tiene muy buenas propiedades como fotosensibilizador tal y como demuestran los estudios *in vitro* sobre las líneas celulares HeLa⁽⁴⁸⁾ y A549 (células de adenocarcinoma humano de pulmón)⁽⁸⁴⁾. Estudios *in vitro* e *in vivo* con el derivado porfícénico ATMPn (9-acetoxi-2,7,12,17-tetraquis-(β -metoxietil)porfíceno) (19, R= -(CH₂)₂OMe) han mostrado una absorción inusualmente rápida del fotosensibilizador en las células tumorales, lo que sería una gran ventaja para disminuir la duración del tratamiento y la fotosensibilidad cutánea^(93, 95).

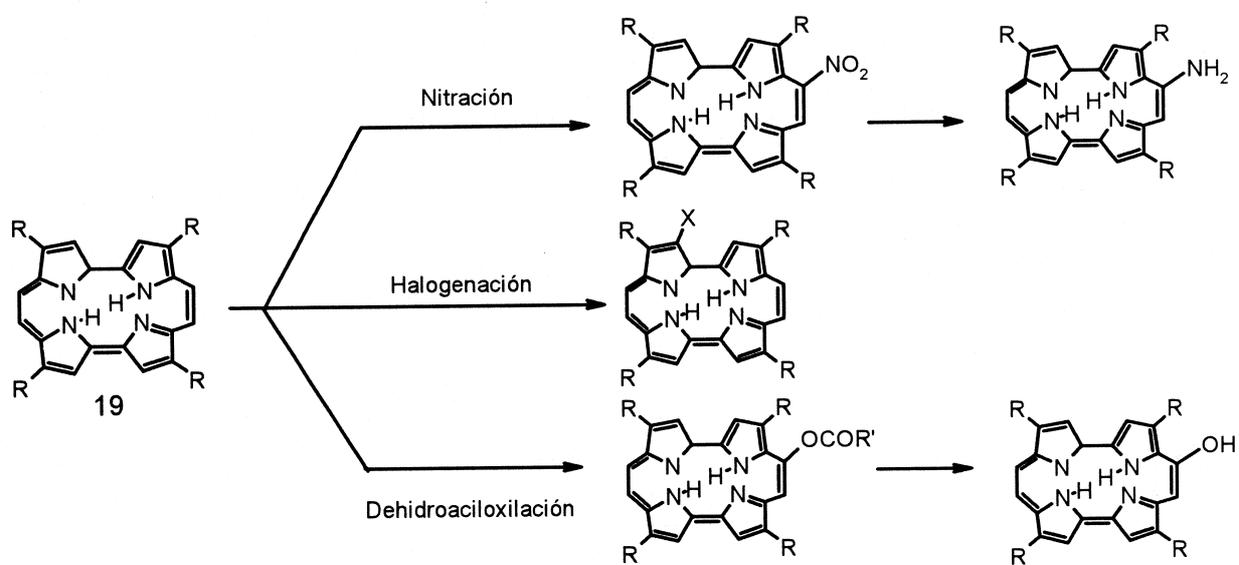


Figura 9. Reactividad de los porfíricos.

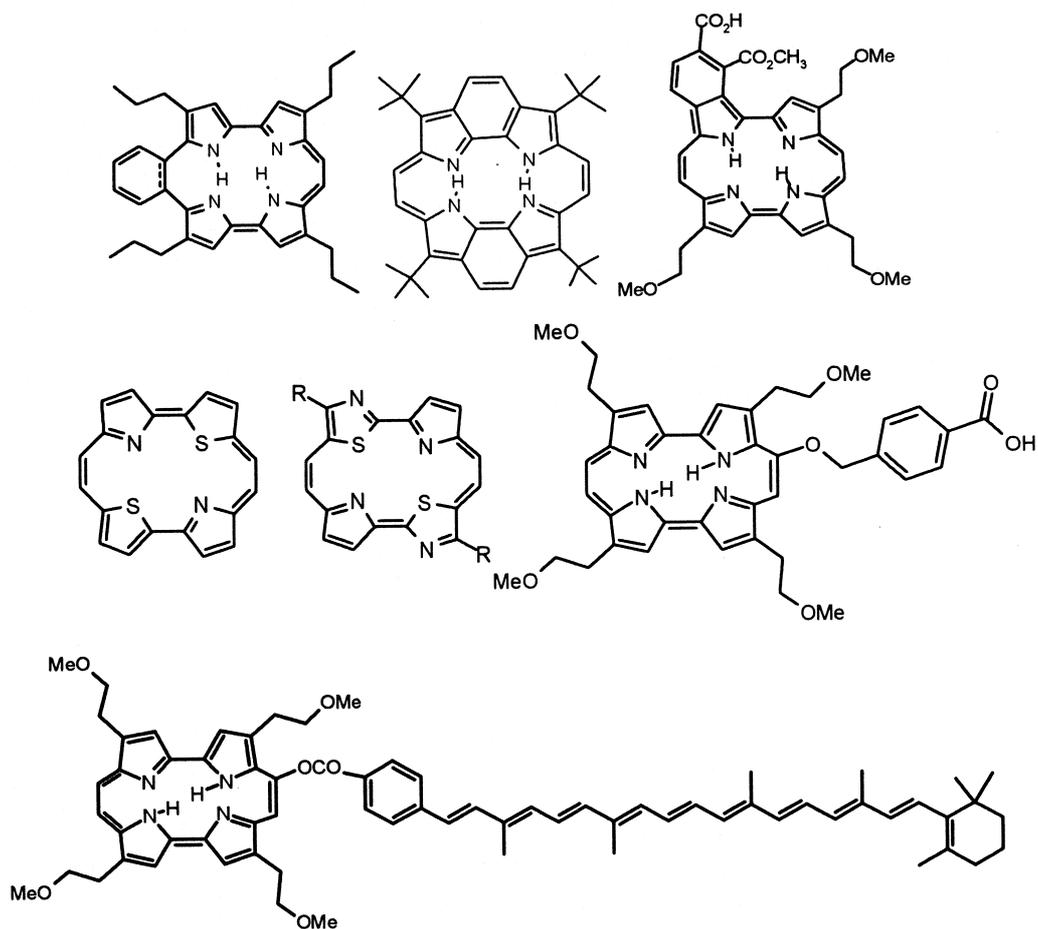


Figura 10. Ejemplos de derivados de porfíricos sintetizados^{77, 84-89} (R = H, t-But, Ph).

8. CONCLUSIONES

La lucha contra el cáncer gana, con la terapia fotodinámica, una nueva y eficaz opción terapéutica que se suma a las técnicas convencionales quirúrgicas, radio- y quimioterapéuticas. Probablemente todas ellas se verán superadas por el desarrollo de las terapias génicas, aunque se calcula que éstas distan todavía unos 25 años. Hasta entonces, es previsible el desarrollo e implantación creciente de la terapia fotodinámica por sus muchas ventajas frente a los tratamientos convencionales. Parte integral de este crecimiento lo constituye el desarrollo de nuevas moléculas fotosensibilizantes con especificidad adecuada a cada tipo de tumor. Las propiedades únicas de los porfíricos los hacen muy interesantes para estas aplicaciones biomédicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda del Ministerio de Ciencia y Tecnología, ref. PM98-0017-C02. A. Gavaldá, O. Rey, N. Rubio y D. Sánchez-García agradecen al Institut Químic de Sarrià la concesión de sendas becas predoctorales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1). Daniell, M.D.; Hill, J.S.: «A History of Photodynamic Therapy». *Aust. N. Z. J. Surg.* 1991, **61**, 340-348.
- (2). Bonnett, R.: «Chemical Aspects of Photodynamic Therapy»; Gordon and Breach Science Publishers: Amsterdam, 2000.
- (3). Spikes, J.D.: «Historical Review - Photodynamic Action: from Paramecium to Photochemotherapy». *Photochem. Photobiol.* 1997, **65**, 142-147.
- (4). Raab, O.: «Über die Wirkung Fluoreszierender Stoffe auf Infusorien». *Z. Biol.* 1900, **39**, 524-546.
- (5). Von Tappeiner, H.: «Über die Wirkung Fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab». *Muench. Med. Wochenschr.* 1900, **47**, 5-7.
- (6). Von Tappeiner, H.; Jesionek, A.: «Therapeutische Versuche mit Fluoreszierenden Stoffen». *Muench. Med. Wochenschr.* 1903, **1**, 2042-2044.
- (7). Von Tappeiner, H.; Jodlbauer, A.: «Über die Wirkungen der Photodynamischen (Fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme». *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 1904, **80**, 427-487.
- (8). Jesionek, A.; Von Tappeiner, H.: «Die Behandlung der Hautkarzinome mit Fluoreszierenden Stoffen». *Arch. Klin. Med.* 1905, **82**, 72-76.
- (9). Hausman, W.: «Die Sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins». *Biochem. Z.* 1911, **30**, 276.
- (10). Meyer-Betz, Z.: «Untersuchungen über die Biologische (Photodynamische) Wirkung des Hämatorporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs». *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 1913, **112**, 476-503.
- (11). Policard, A.: «Étude sur les Aspects Offerts par des Tumeurs Experimentales Examinées a la Lumière de Wood». *CR Soc. Biol.* 1924, **91**, 1423-1425.
- (12). Auler, H.; Banzer, G.: «Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei Geschwulskranker Menschen und Tieren». *Z. Krebsforsch* 1942, **53**, 65-68.
- (13). Figge, F.H.J.; Weiland, G.S.; Manganiello, L.O.J.: «Cancer Detection and Therapy. Affinity of Neoplastic, Embryonic and Traumatized Tissue for Porphyrins and Metalloporphyrins». *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1948, **68**, 640-641.

- (14). Rassmussen-Taxdal, D.S.; Ward, G.E.; Figge, F.H.J.: «Fluorescence of Human Lymphatic and Cancer Tissues Following High Doses of Intravenous Haematoporphyrin». *Cancer.* 1955, **8**, 78-81.
- (15). Schwartz, S.; Absolon, K.; Vermund, H.: «Some Relationships of Porphyrins, X-Rays, and Tumors». *Univ. Minn. Med. Bull.* 1955, **27**, 7-13.
- (16). Lipson, R.L.; Baldes, E.J.: «The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative». *Arch. Dermatol.* 1960, **82**, 508-516.
- (17). Lipson, R.L.; Baldes, E.J.; Olsen, A.M.: «Hematoporphyrin derivative: A New Aid for Endoscopic Detection of Malignant Disease». *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1961, **42**, 623-629.
- (18). Lipson, R.L.; Baldes, E.J.; Olsen, A.M.: «The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor Detection». *J. Natl. Cancer Inst.* 1961, **26**, 1-8.
- (19). Lipson, R.L.; Baldes, E.J.; Olsen, A.M.: «Further Evaluation of the Use of Hematoporphyrin Derivative as a New Aid for the Endoscopic Detection of Malignant Disease». *Dis. Chest.* 1964, **46**, 676-679.
- (20). Lipson, R.L.; Pratt, J.H.; Baldes, E.J.; Dockerty, M.B.: «Hematoporphyrin Derivative for Detection of Cervical Cancer». *Obstet. Gynecol.* 1964, **24**, 78-84.
- (21). Lipson, R.L.; Baldes, E.J.; Gray, M.J.: «Hematoporphyrin Derivative for Detection and Management of Cancer». *Cancer* 1967, **20**, 2255-2257.
- (22). Dougherty, T.J.; Grindey, G.B.; Fiel, R.; Weishaupt, K.R.; Boyle, D.: «Photoradiation Therapy. II. Cure of Animal Tumors with Hematoporphyrin and Light». *J. Natl. Cancer Inst.* 1975, **55**, 115-119.
- (23). Dougherty, T.J.; Kaufman, J.E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K.R.; Boyle, D.; Mittleman, A.: «Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors». *Cancer Res.* 1978, **38**, 2628-2635.
- (24). Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M.: «The History of Photodetection and Photodynamic Therapy». *Photochem. Photobiol.* 2001, **74**(5), 656-669.
- (25). Konan, N.Y.; Gurny, R.; Alléman, E.: «State of the Art in the Delivery of Photosensitizers for Photodynamic Therapy». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2002, **66**, 89-106.
- (26). Kessel, D.; Woodburn, K.: «Biodistribution of Photosensitizing Agents». *Int. J. Biochem.* 1993, **25**, 1377-1383.
- (27). Reyftmann, J.P.; Morliere, P.; Goldstein, J.L.; Santus, R.; Dubertret, L.; Lorange, D.: «Interaction of Human Serum Low Density Lipoproteins with Porphyrins: A Spectroscopic and Photochemical Study». *Photochem. Photobiol.* 1984, **40**, 721-729.
- (28). Kessel, D.; Thompson, P.; Saatio, K.; Nantwi, K.D.: «Tumor Localization and Photosensitization by Sulphonated Derivatives of Tetraphenylporphine». *Photochem. Photobiol.* 1987, **45**, 787-790.
- (29). Kongshaug, M.; Moan, J.; Brown, S.B.: «The Distribution of Porphyrins with Different Tumour Localising Ability Among Human Plasma Proteins». *Br. J. Cancer* 1989, **59**, 188
- (30). Kongshaug, M.; Rimington, C.; Evensen, J.F.; Peng, Q.; Moan, J.: «Hematoporphyrin Diethers-V. Plasma Protein Binding and Photosensitizing Efficiency». *Int. J. Biochem.* 1990, **22**, 1127-1131.
- (31). Mosley, S.T.; Goldstein, J.L.; Brown, M.S.; Falck, J.R.; Anderson, R.G.W.: «Targeted Killing of Cultured Cells by Receptor-Dependent Photosensitization». *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981, **78**, 5717-5721.
- (32). Jiang, F.N.; Jiang, S.; Liu, D.; Richter, A.M.; Levy, J.G.: «Development of Technology for Linking Photosensitizers to a Model Monoclonal Antibody». *J. Immunol. Methods* 1990, **134**, 139-149.

- ⁽³³⁾ . Jiang, F.N.; Allison, B.; Liu, D.; Levy, J.G.: «Enhanced Photodynamic Killing of Target Cells by Either Monoclonal Antibodies or Low Density Lipoprotein Mediated Delivery Systems». *J. Controlled Release* 1992, **19**, 41-58.
- ⁽³⁴⁾ . Klayshchitsky, B.A.; Nechaeva, I.S.; Ponomaryov, G.V.: «Approaches to Targetted Photodynamic Tumor Therapy». *J. Controlled Release* 1994, **29**, 1-16.
- ⁽³⁵⁾ . Gal, D.; MacDonald, P.C.; Porter, J.C.; Simpson, E.R.: «Cholesterol Metabolism in Cancer Cells in Monolayer Culture. III. Low-Density Lipoprotein Metabolism». *Int. J. Cancer* 1981, **28**, 315-319.
- ⁽³⁶⁾ . Norata, G.; Canti, G.; Ricci, L.; Trezzi, E.; Catapano, A.L.: «In Vivo Assimilation of Low Density Lipoproteins by a Fibrosarcoma Tumour Line in Mice». *Cancer Lett.* 1984, **25**, 203-208.
- ⁽³⁷⁾ . Netland, P.A.; Zetter, B.R.; Via, D.P.; Voyta, J.C.: *In Situ* «Labelling of Vascular Endothelium with Fluorescent Acetylated Low Density Lipoprotein». *Histochem. J.* 1985, **17**, 1309-1320.
- ⁽³⁸⁾ . Berenbaum, M.C.; Hall, G.W.; Hoyes, A.D.: «Cerebral Photosensitisation by Haematoporphyrin Derivative. Evidence for an Endothelial Site of Action». *Br. J. Cancer* 1986, **53**, 81-89.
- ⁽³⁹⁾ . Vitols, S.; Angelin, B.; Ericsson, S.; Gahrton, G.; Juliusson, G.; Masquelier, M.; Paul, C.; Peterson, P.; Rudling, M.; Söderberg-Reid, K.; Tidelfelt, U.: «Uptake of Low Density Lipoproteins by Human Leukemic Cells *In Vivo*: Relation to Plasma Lipoprotein Levels and Possible Relevance for Selective Chemotherapy». *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990, **87**, 2598-2602.
- ⁽⁴⁰⁾ . Mew, D.; Wat, C.; Neil Towers, G.H.; Levy, J.G.: «Photoimmunotherapy: Treatment of Animal Tumors with Tumor-Specific Monoclonal Antibody-Hematoporphyrin Conjugates». *J. Immunol.* 1983, **130**, 1473-1477.
- ⁽⁴¹⁾ . Pietersz, G.A.; Cunningham, Z.; McKenzie, I.F.C.: «Specific *In Vitro* Anti-Tumour Activity of Methotrexate-Monoclonal Antibody Conjugates Prepared Using Human Serum Albumin as an Intermediary». *Immunol. Cell. Biol.* 1988, **66**, 43-49.
- ⁽⁴²⁾ . Shih, L.B.; Sharkey, R.M.; Primus, F.J.; Goldenberg, D.M.: «Site-Specific Linkage of Methotrexate to Monoclonal Antibodies Using an Intermediate Carrier». *Int. J. Cancer* 1988, **41**, 832-839.
- ⁽⁴³⁾ . Rodgers, M.A.J.: «On The Problems Involved in Detecting Luminescence from Singlet Oxygen in Biological Specimens». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1988, **1**, 371-378.
- ⁽⁴⁴⁾ . Patterson, M. S.; Madsen, S. J.; Wilson, B. C.: «Experimental Tests of the Feasibility of Singlet Oxygen Luminescence Monitoring *In Vivo* during Photodynamic Therapy». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1990, **5**, 69-84.
- ⁽⁴⁵⁾ . Moan, J.: «On The Diffusion Length of Singlet Oxygen in Cells and Tissues». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1990, **6**, 343-347.
- ⁽⁴⁶⁾ . Ochsner, M.: «Photophysical and Photobiological Processes in the Photodynamic Therapy of Tumors». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1997, **39**, 1-18.
- ⁽⁴⁷⁾ . Dubbelman, T.M.A.R.; Van Steveninck, J.: «Photodynamically Induced Damage to Cellular Functions and its Relations to Cell Death». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1990, **6**, 345-348.
- ⁽⁴⁸⁾ . Cañete, M.; Ortiz, A.; Juarranz, A.; Villanueva, A.; Nonell, S.; Borrell, J.I.; Teixidó, J.; Stockert, J.C.: «Photosensitizing Properties of Palladium-Tetraphenylporphycene on Cultured Tumour Cells». *Anti-Cancer Drug Design* 2000, **15**, 143-150.
- ⁽⁴⁹⁾ . Henderson, B.W.; Fingar, V.H.: «Relationship of Tumor Hypoxia and Response to Photodynamic Treatment in an Experimental Mouse Tumor». *Cancer Res.* 1987, **47**, 3110-3114.
- ⁽⁵⁰⁾ . Byrne, C.J.; Marshallsay, L.V.: «The Composition of Photofrin II». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1990, **6**, 13-27.
- ⁽⁵¹⁾ . Schiwon, K.; Brauer, H.D.; Gerlach, B.; Müller, C.M.; Montforts, F.P.: «Potential Photosensitizers for Photodynamic Therapy IV. Photophysical and Photochemical Properties of Azaporphyrin and Azachlorin Derivatives». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1994, **23**, 239-243.
- ⁽⁵²⁾ . Selman, S.H.; Garbo, G.M.; Keck, R.W.; Kreimer-Birnbaum, M.; Morgan, A.R.: «A Dose Response Analysis of Purpurin Derivatives Used as Photosensitizers for the Photodynamic Treatment of Transplantable FANFT Induced Urothelial Tumors». *J. Urol.* 1987, **137**, 1255-1257.
- ⁽⁵³⁾ . Morgan, A.R.; Garbo, G.M.; Keck, R.W.; Selman, S.H.: «New Photosensitizers for Photodynamic Therapy: Combined Effect of Metalloporpurin Derivatives and Light on Transplantable Bladder». *Cancer Res.* 1988, **48**, 194-198.
- ⁽⁵⁴⁾ . Ginevra, F.; Biffanti, S.; Pagnan, A.; Biolo, R.; Reddi, E.; Jori, G.: «Delivery of the Tumour Photosensitizer Zinc(II)-Phtalocyanine to Serum Proteins by Different Liposomes: Studies *In Vitro* and *In Vivo*». *Cancer Lett.* 1990, **49**, 59-65.
- ⁽⁵⁵⁾ . Sternberg, E.D.; Dolphin, D.; Brückner, C.: «Porphyrin-based Photosensitizers For Use in Photodynamic Therapy». *Tetrahedron* 1998, **54**, 4151-4202.
- ⁽⁵⁶⁾ . Ali, H.; Van Lier, J.E.: «Metal Complexes as Photo- and Radiosensitizers». *Chem. Rev.* 1999, **99**, 2379-2450.
- ⁽⁵⁷⁾ . Jasat, A.; Dolphin, D.: «Expanded Porphyrins and Their Heterologs». *Chem. Rev.* 1997, **97**, 2267-2340.
- ⁽⁵⁸⁾ . Milgrom, L.; MacRobert, S.: «Light Years Ahead». *Chem. Br.* 1998, 45-50.
- ⁽⁵⁹⁾ . Peng, Q.; Warloe, T.; Berg, K.; Moan, J.; Kongshaug, M.; Giercksky, K.E.; Nesland, J.M.: «5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy». *Cancer* 1997, **79**, 2282-2308.
- ⁽⁶⁰⁾ . Fisher, A.M.; Murphree, A.L.; Gomer, C.J.: «Clinical and Preclinical Photodynamic Therapy». *Lasers Surg. Med.* 1995, **17**, 2-31.
- ⁽⁶¹⁾ . Sharman, W.M.; Allen, C.M.; Van Lier, J.E.: «Photodynamic Therapeutics: Basic Principles and Clinical Applications». *Drug Discovery Today* 1999, **4**, 507-517.
- ⁽⁶²⁾ . Dierickx, C.C.; Rox Anderson, R.: «Why Use PDT in Dermatology?» *Int. Photodyn.* 1996, **1**, 2-5.
- ⁽⁶³⁾ . Pumarola, A.; Rodríguez-Torres, A.; García-Rodríguez, J.A.; Piédrola-Angulo, G.: «Microbiología y Parasitología Médica». 1987; Barcelona.
- ⁽⁶⁴⁾ . Nitzan, Y.; Gutterman, M.; Malik, Z.; Ehrenberg, B.: «Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Photosensitized Porphyrins». *Photochem. Photobiol.* 1992, **55**, 89-96.
- ⁽⁶⁵⁾ . Merchat, M.; Villanueva, A.; Giacomoni, P.; Bertoloni, G.; Jori, G.: «Photosensitization of Bacteria to Visible Light by meso-Substituted Porphyrines». *J. Braz. Chem. Soc.* 1995, **6**, 123-125.
- ⁽⁶⁶⁾ . Minnock, A.; Vernon, D.I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Parish, J.H.; Brown, S.B.: «Photoinactivation of Bacteria. Use of a Cationic Water-Soluble Zinc Phthalocyanine to Photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive Bacteria». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1996, **32**, 159-164.
- ⁽⁶⁷⁾ . Merchat, M.; Giacomoni, P.; Villanueva, A.; Bertoloni, G.; Jori, G.: «Meso-substituted Cationic Porphyrins as Efficient Photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative Bacteria». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1996, **32**, 153-157.

- ⁽⁶⁸⁾ Jori, G.; Tonlorenzi, D.: «Photodynamic Therapy for the Treatment of Microbial Infections». *Int. Photodyn.* 1999, **2**, 2-3.
- ⁽⁶⁹⁾ Ben-Hur, E.; Horowitz, B.: «Advances in Photochemical Approaches for Blood Sterilization». *Photochem. Photobiol.* 1995, **62**, 383-388.
- ⁽⁷⁰⁾ Gaspard, S.; Tempête, C.; Werner, G.H.: «Studies on Photoinactivation by Various Phthalocyanines of a Free or Replicating non-Enveloped Virus». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1995, **31**, 159-162.
- ⁽⁷¹⁾ Grandadam, M.; Ingrand, D.; Huriaux, J.-M.; Aveline, B.; Delgado, O.; Vever-Bizet, C.; Brault, D.: «Photodynamic Inactivation of Cell-free HIV Strains by a Red-absorbing Chlorin-type Photosensitizer». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1995, **31**, 171-177.
- ⁽⁷²⁾ Allen, C.M.; Weber, J.M.; Van Lier, J.E.: «Sulfophthalocyanines for Photodynamic Inactivation of Viruses in Blood Products: Effect of Structural Modification». *Photochem. Photobiol.* 1995, **62**, 184-189.
- ⁽⁷³⁾ Gannon, M.J.; Johnson, N.; Roberts, D.J.H.; Holroyd, J.A.; Vernon, D.I.; Brown, S.B.; Lilford, R.J.: «Photosensitization of the Endometrium using 5-Aminolevulinic Acid». *Obstet. Gynecol.* 1995, **173**, 1826-1828.
- ⁽⁷⁴⁾ Van Vugt, D.A.; Krzemien, A.; Roy, B.N.; Foster, W.; Lundahl, S.; Marcus, S.L.; Reid, R.L.: «Photodynamic Endometrial Ablation in the Nonhuman Primate». *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2000, **7**, 125-30.
- ⁽⁷⁵⁾ Vogel, E.; Koecher, M.; Schmickler, H.; Lex, J.: «Porphycene, a New Type of Porphine Isomer». *Angew. Chem.* 1986, **98**, 262-264.
- ⁽⁷⁶⁾ Vogel, E.; Balci, M.; Pramod, K.; Koch, P.; Lex, J.; Ermer, O.: «2,7,12,17-Tetrapropylporphycene- Counterpart of Octaethylporphyrin in the Porphycene Series». *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1987, **26**, 928-931.
- ⁽⁷⁷⁾ Richert, C.; Wessels, J.M.; Müller, M.; Kisters, M.; Benninghaus, T.; Goetz, A.E.: «Photodynamic Antitumor Agents: β -Methoxyethyl Groups Give Access to Functionalized Porphycenes and Enhance Cellular Uptake and Activity». *J. Med. Chem.* 1994, **37**, 2797-2807.
- ⁽⁷⁸⁾ Aramendia, P. F.; Redmond, R. W.; Nonell, S.; Schuster, W.; Braslavsky, S. E.; Schaffner, K.; Vogel, E.: «The Photophysical Properties of Porphycenes: Potential Photodynamic Therapy Agents». *Photochem. Photobiol.* 1986, **44**, 555-559.
- ⁽⁷⁹⁾ Nonell, S.; Bou, N.; Borrell, J.I.; Teixidó, J.; Villanueva, A.; Juarranz, A.; Cañete, M.: «Synthesis of 2,7,12,17-Tetraphenylporphycene (TPPo). First Aryl-substituted Porphycene for the Photodynamic Therapy of Tumors». *Tetrahedron Lett.* 1995, **36**, 3405-3408.
- ⁽⁸⁰⁾ Gavalda, A.; Borrell, J.I.; Teixidó, J.; Nonell, S.; Arad, O.; Grau, R.; Cañete, M.; Juarranz, A.; Villanueva, A.; Stockert, J.C.: «A non-Tetradecarboxylative Synthesis of 2,7,12,17-Tetraphenylporphycene». *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2001, **5**, 846-852.
- ⁽⁸¹⁾ Vogel, E.; Koch, P. A.; Rahbar, A.; Cross, A. D.: «Preparation of Porphycenes Useful in Photodynamic Therapy or As Intermediates for Synthesis of Photoactivable Dyes Suitable for Photodynamic Therapy». *Cytopharm, Inc. USA. 92-US364(9212636)*, **39**. 6-8-1992. WO. 1-29-1992. Patente.
- ⁽⁸²⁾ Vogel, E.; Benninghaus, T.; Richert, C.; Müller, M.; Cross, A. D.: «Preparation of Porphycene Compounds for Photodynamic Therapy». *(Cytopharm, Inc. USA. 92-US4624(9300087))*, **76**. 7-1-1993. WO. 6-5-1992. Patent
- ⁽⁸³⁾ Vogel, E.; Müller, M.; Halpern, O.; Cross, A. D.: «Preparation of 9-Substituted Porphycenes as Photosensitizers». *(Cytopharm, Inc. USA. 96-US4177(9631452))*, **30**. 10-10-1996. WO. 4-4-1996. Patente.
- ⁽⁸⁴⁾ Vogel, E.; Müller, M.; Halpern, O.; Cross, A. D.: «Preparation of Porphycene Esters and Amides for Use in Photodynamic Therapy». *(Cytopharm, Inc. USA. 96-US4176(9631451))*, **36**. 10-10-1996. WO. 4-4-1996. Patente.
- ⁽⁸⁵⁾ Donnerstag, D.: «Benzoporphycene-Neuartige Tetrapyrrolische Porphyrinoide». 1993. Universität Köln. Tesis Doctoral.
- ⁽⁸⁶⁾ Hoppe, M.: «9,10-Benzotetrapropylporphycen-Synthese und Eigenschaften». 1994. Universität Köln. Tesis Doctoral.
- ⁽⁸⁷⁾ Nußbaumer, T.; Krieger, C.; Neidlein, R.: «21,23-Dithia-3,13-diazaporphycenes, Novel Aromatic Porphycene Analogues incorporating Thiazole». *Eur. J. Org. Chem.* 2000, **13**, 2449-2457.
- ⁽⁸⁸⁾ Nußbaumer, T.; Neidlein, R.: «Syntheses of Thiazole-containing Macrocyclics related to Porphycene». *Helv. Chim. Acta.* 2000, **83**, 1161-1167.
- ⁽⁸⁹⁾ Vogel, E.; Müller, M.; Halpern, O.; Cross, A. D.: «Synthesis of C-9 Ethers of Porphycenes for Use in the Photodynamic Therapy». *Cytopharm, Inc. USA. 98-US17918(9815271)*, **62**. 4-16-1998. WO. 10-9-1997. Patente.
- ⁽⁹⁰⁾ Cañete, M.; Lapeña, M.; Juarranz, A.; Vendrell, V.; Borrell, J.I.; Teixidó, J.; Nonell, S.; Villanueva, A.: «Uptake of Tetraphenylporphycene and its Photoeffects on Actin and Cytokeratin Elements of HeLa Cells». *Anti-Cancer Drug Design* 1997, **12**, 543-554.
- ⁽⁹¹⁾ Guardiano, M.; Biolo, R.; Jori, G.; Schaffner, K.: «Tetra-n-propylporphycene as a Tumor Localizer: Pharmacokinetic and Phototherapeutic Studies in Mice». *Cancer Lett.* 1989, **44**, 1-6.
- ⁽⁹²⁾ Villanueva, A.; Cañete, M.; Nonell, S.; Borrell, J.I.; Teixidó, J.; Juarranz, A.: «Photodamaging Effects of Tetraphenylporphycene in a Human Carcinoma Cell Line». *Anti-Cancer Drug Design* 1996, **11**, 89-99.
- ⁽⁹³⁾ Karrer, S.; Szeimies, R.-M.; Ebert, A.; Fickweiler, C.; Abels, C.; Bäuml, W.; Landthaler, M.: «Dose-dependent Photodynamic Effects of 9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-porphycene In Vitro». *Lasers Med. Sci.* 1997, **12**, 307-312.
- ⁽⁹⁴⁾ Gavalda, A.: «Síntesis y Actividad Fotodinámica de Fotosensibilizadores Porfíricos». 2001. Universidad Ramón Llull. Tesis Doctoral.
- ⁽⁹⁵⁾ Karrer, S.; Abels, C.; Szeimies, R. M.; Bäuml, W.; Dellian, M.; Hohenleutner, U.; Goetz, A. E.; Landthaler, M.: «Topical Application of a First Porphycene Dye for Photodynamic Therapy-Penetration Studies in Human Perilesional Skin and Basal Cell Carcinoma». *Arch. Dermatol. Res.* 1997, **289**, 132-137.