



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 218**

51 Int. Cl.:
A61K 31/685 (2006.01)
A61K 31/688 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03782263 .2**
96 Fecha de presentación : **01.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1569657**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **Uso de lípidos anfífilicos para la preparación de una composición farmacéutica para reducir la metástasis tumoral.**

30 Prioridad: **03.12.2002 EP 02026897**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.09.2011

73 Titular/es:
FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GmbH
Else-Kröner-Strasse 1
61352 Bad Homburg V.D.H., DE

72 Inventor/es: **Schlotzer, Ewald;**
Wärnheim, Torbjörn;
Jansen, Marc y
Treutner, Karl-Heinz

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 365 218 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).

DESCRIPCION

Uso de lípidos anfifílicos para la preparación de una composición farmacéutica para reducir la metástasis tumoral.

La presente invención se refiere al uso de lípidos anfifílicos como único compuesto activo para la preparación de una composición farmacéutica para reducir la metástasis tumoral, en el que los lípidos anfifílicos son fosfolípidos.

5 Los tumores y enfermedades cancerosas en general están entre las principales causas de enfermedad grave y muertes de seres humanos. Incluso tras la extracción quirúrgica de un tumor, los pacientes frecuentemente padecen enfermedades tumorales, principalmente metástasis tumorales. El desarrollo de carcinosis peritoneal tras el tratamiento quirúrgico de cánceres digestivos, por ejemplo, es todavía una causa frecuente de recidiva. En cáncer gástrico con invasión serosa, hasta el 50% de los pacientes desarrollan carcinosis peritoneal incluso si se realiza resección curativa (Boku T *et al.*, Br J Surg 1990; 77:436-9; y Jansen M *et al.*, Chirurg 2001; 72:561-5). Varios estudios demostraron que la detección de células tumorales aisladas, libres en la cavidad peritoneal puede servir como marcador de pronóstico para la supervivencia posoperatoria de pacientes con cáncer gástrico y colorrectal (Koga S *et al.*, J Cancer Res Clin Oncol 1984; 108:236-8; Schott A *et al.*, Ann Surg 1998; 227:372-9; Bando E *et al.*, Am J Surg 1999; 178:256-62; y Broll R *et al.*, Langenbecks Arch Chir 1996; 381:51-8).

15 La recidiva de tumor peritoneal puede ser un resultado de células tumorales libres intraperitoneales, residuales producidas por invasión serosa del tumor primario o exfoliación intraoperatoria. La invasión de células tumorales en la pared peritoneal es un proceso complejo que incluye unión, proteólisis y migración (Schwartz OK, Semin Oncol 1996; 23:316-24). La etapa más importante en el desarrollo de la diseminación peritoneal parece residir en la adhesión de células tumorales a células mesoteliales o componentes de la matriz extracelular (Kiyasu Y *et al.*, Cancer Res 1981; 41:1236-9; Koga S *et al.*, Gann 1980; 71:8-13; y Schwartz OK, Semin Oncol 1996; 23:316-24). Estudios experimentales sugieren que las metástasis peritoneales tienden a producirse principalmente en sitios de peritoneo lesionado (Yashiro M *et al.*, Cancer 1996; 77:1668-75).

25 La unión de células de cáncer gástrico a la superficie peritoneal representa la primera etapa necesaria en la invasión de células tumorales (Schwartz OK, Semin Oncol 1996; 23:316-24). En un estudio de microscopía electrónica de barrido Kiyasii *et al.* pudieron demostrar que las células cancerosas no se adherían a las células mesoteliales sino al tejido conjuntivo submesotelial que se encuentra libre. Sin embargo, las células mesoteliales se volvían hemisféricas y se producía exfoliación en presencia de células de cáncer gástrico (Kiyasu Y *et al.*, Cancer Res 1981; 41:1236-9).

30 Puesto que la cirugía sola sigue siendo una cura incompleta, se han evaluado numerosos tratamientos adicionales. La quimioterapia intraperitoneal es un método fiable para tratar la diseminación peritoneal, pero se han descrito complicaciones frecuentes (Hagiwara *et al.*, Surgery 1988; 104:874-881; Fass *et al.*, Langenbecks Arch Chir Suppl Kongress bd 1998; 115:1363-1366; Sayag *et al.*, Oncology 1993; 50:333-337; Fujimura *et al.*, Int Surg 1999; 84:60-66; Fujimoto *et al.*, Ann Surg 1990; 212:592-596; y Koga *et al.*, Cancer 1988; 61:232-237).

35 Se han hecho intentos de inhibir la unión de células tumorales. Puesto que la adhesión de células tumorales peritoneales está mediada por moléculas de adhesión, se usaron anticuerpos con especificidad para moléculas de adhesión para inhibir la diseminación de células de cáncer gástrico humanas (Chailley-Heu B *et al.*, Biochem J 1997; 328(Pt1):251-6). El principal problema para el uso clínico de anticuerpos respectivos parece ser la diferente expresión de estos antígenos en tumores de diferente origen y otras líneas celulares.

40 Además, se han notificado pruebas para reducir metástasis peritoneales usando sulfato de dextrano y hialuronato de sodio en modelos animales (Hagiwara A *et al.*, Anticancer Drugs 1997; 8:894-7; y Haverlag R *et al.*, Eur J Surg 1999; 165: 791-5).

45 El sulfato de dextrano condujo a una reducción de la implantación tumoral en los sitios de lesión en la pared abdominal de ratones (Hagiwara A *et al.*, Anticancer Drugs 1997; 8:894-7; y Hagiwara A *et al.*, Anticancer Drugs 2000; 11:873-7). Al mismo tiempo, los autores notificaron una supervivencia prolongada en el grupo de tratamiento tras la inoculación de células de melanoma. Sin embargo, se observaron varios efectos secundarios cuando se usó dextrano para la prevención de la adhesión. Los principales problemas fueron edema, efusión pleural, mal funcionamiento de la coagulación potencialmente mortal y reacciones alérgicas graves (diZerega GS, Curr Opin Obstet Gynecol 1996; 8:230-7; y Treutner KH *et al.*, Chirurg 2000; 71:510-7).

50 Se comprobó que el hialuronato de sodio aumentaba el potencial metastásico de células tumorales colorrectales, probablemente mediado por el receptor CD44 (Tan *et al.*, Br J Surg 2001; 88:246-250). Por tanto, se concluyó que este tratamiento conduce a una potenciación del crecimiento tumoral intraperitoneal.

55 El documento EP-A-0 381 514 y HAKOMORI SEN-ITIROH *ET AL* ("Glycosphingolipid antigens and cancer therapy". CHEMISTRY & BIOLOGY (LONDRES), vol. 4, n.º 2, 1997, páginas 97-10) se refieren al uso de esfingolípidos y glicoesfingolípidos para reducir la metástasis tumoral. El documento US-A-4 797 479 y SAKAI ATSUSHI *ET AL* ("Deacylation-reacylation cycle: A possible absorption mechanism for the novel lymphotropic antitumor agent dipalmitoylphosphatidylfluorouridine in rats". JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 82, n.º 6, 1993, páginas 575-578) da a conocer el uso de nucleósido-fosfolípidos como agentes antitumorales y antimetastásicos.

En vista de la anterior técnica anterior, la presente invención se refiere al problema del tratamiento médico de enfermedades cancerosas, específicamente a la inhibición de metástasis y recidiva tumorales.

5 Según la presente invención, este problema se soluciona mediante el uso de lípidos anfifílicos como único compuesto activo para la preparación de una composición farmacéutica para reducir la metástasis tumoral, en el que los lípidos anfifílicos son fosfolípidos.

Los presentes inventores han demostrado sorprendentemente que las metástasis tumorales pueden reducirse significativamente mediante la administración de un lípido anfifílico, siendo el lípido anfifílico un fosfolípido, lo que da como resultado un aumento de las tasas de supervivencia. El lípido anfifílico es seguro y no provoca efectos secundarios no deseados.

10 La expresión "lípido anfifílico" se usa en esta solicitud para referirse a una molécula orgánica con una estructura principal de glicerol (o poliol, tal como alcohol) sustituida con dos cadenas de acilo acopladas mediante enlaces éster y un grupo polar sustituido en el grupo hidroxilo restante del alcohol. El término anfifílico aclara que compuestos respectivos contienen grupos tanto hidrófilos como lipófilos al mismo tiempo. Los lípidos anfifílicos que van a usarse según la presente invención forman bicapas, preferiblemente liposomas, tras su dispersión en un líquido. Para 15 el uso médico de la presente invención, es necesario que los lípidos anfifílicos sean farmacéuticamente aceptables. Cualquier lípido anfifílico que sea un fosfolípido y cumpla estos requisitos puede usarse según la presente invención.

La expresión "composición farmacéutica" se usa en la presente solicitud para referirse entre otras a composiciones farmacéuticas que han de aprobarse por una autoridad reguladora (EMA, FDA, etc.). Sin embargo, la expresión "composición farmacéutica" no se limita a estas composiciones sino que abarca cualquier composición o dispositivo médico que contenga lípidos anfifílicos como único compuesto activo y sea adecuado para el uso médico reivindicado. 20

La presente descripción abarca el uso de un único tipo específico de lípido anfifílico para la preparación de una composición farmacéutica para reducir la metástasis tumoral así como el uso de una combinación de diversos lípidos anfifílicos para este fin, en el que el/los lípido(s) anfifílico(s) es/son un(os) fosfolípido(s). Más específicamente, la presente descripción incluye el uso médico de fosfolípidos conocidos para reducir la metástasis tumoral que hasta la fecha se han usado como emulsionantes para la preparación de emulsiones grasas para nutrición parenteral. 25

En la presente solicitud, el término fosfolípido (PL) se usa para referirse a una estructura principal de glicerol que contiene dos cadenas de acilo acopladas mediante enlaces éster y un grupo polar, que contiene fósforo sustituido en el grupo hidroxilo restante del glicerol. Derivados lipídicos polares respectivos pueden ser de origen natural, semisintético o sintético. Por tanto, pueden proporcionarse fosfolípidos mediante y prepararse a partir de fuentes naturales, puesto que son un componente común de la membrana en células de origen animal y vegetal. Los fosfolípidos que se producen de manera natural pueden extraerse y purificarse. Hasta la fecha, se han usado fosfolípidos respectivos por ejemplo para la preparación de emulsiones grasas para nutrición parenteral. 30

Existen varias fuentes diferentes de fosfolípidos de calidad farmacéutica, por ejemplo huevo y semilla de soja. Dependiendo de su origen, la composición detallada en cuanto a composición de ácidos grasos así como composición de grupo polar variará. Pueden proporcionarse fosfolípidos de composición molecular más definida mediante una combinación de purificación y fraccionamiento de fosfolípidos endógenos incluyendo una etapa sintética final (fosfolípidos semisintéticos) o mediante una ruta meramente sintética (fosfolípidos sintéticos). 35

Los lípidos y más específicamente los fosfolípidos son componentes naturales de la cavidad abdominal. Se especuló que esta sustancia puede formar una capa lubricante sobre la superficie peritoneal (Beavis *et al.*, Perit Dial Int 1994; 14:348-355; y Chailley-Heu *et al.*, Biochem J 1997; 328(Pt1):251-256). La aplicación intraperitoneal de fosfolípidos condujo a una disminución significativa de la formación de adhesión, especialmente en sitios de lesión peritoneal, sin ningún efecto secundario sobre la cicatrización de anastomosis, heridas de laparotomía e incisiones hepáticas (Muller *et al.*, J Surg Res 2001; 96:68-74; Muller *et al.*, Langenbecks Arch Surg 2001; 386:278-284; y documento WO 98/535800). Sin embargo, al día de hoy, no se han sugerido los lípidos como tales como sustancia activa para el tratamiento de enfermedades cancerosas, en particular para la reducción de la metástasis. 40 45

En el uso médico de lípidos anfifílicos según la presente descripción, se reducen las metástasis tumorales entre otras debido a la inhibición de la adhesión de células tumorales, la inhibición de la adhesión de células metastásicas y/o la inhibición del crecimiento de metástasis tumorales.

50 Según la presente descripción, los lípidos anfifílicos pueden usarse para la reducción de cualquier metástasis tumoral, tales como recidiva de carcinosis peritoneal y otros diversos cánceres, por ejemplo, cáncer gástrico, de colon, de ovarios o pancreático.

El uso médico de la presente descripción tiene como objetivo, por supuesto, reducir la aparición de metástasis a cero. Sin embargo, un uso médico de lípidos anfifílicos que logre una reducción significativa del número de metástasis y/o un aumento en la tasa de supervivencia debe considerarse ya como una mejora significativa y está cubierto por la presente invención. 55

5 Los lípidos anfífilos pueden administrarse para tratamiento profiláctico. Según una realización específicamente preferida, los lípidos anfífilos se usan para el tratamiento profiláctico de la recidiva intraperitoneal de tumores, específicamente tumores malignos, por ejemplo cáncer gastrointestinal y cáncer del sistema genitourinario tal como cáncer de ovarios o cáncer de vejiga. El paciente puede haberse sometido a resección curativa antes del tratamiento o someterse a un tratamiento quirúrgico respectivo poco después de la administración de lípidos anfífilos.

10 En el uso médico de la presente invención, el lípido anfífilo que es un fosfolípido está presente como único principio activo para reducir la metástasis tumoral en la composición farmacéutica. La expresión "compuesto activo" se usa en la presente solicitud para referirse al compuesto en una composición que es responsable del efecto observado (reducción de la metástasis tumoral). Se logran ventajas específicas con el lípido anfífilo que es un fosfolípido como único compuesto activo, puesto que los lípidos anfífilos no provocan ningún efecto secundario en contraposición a la mayoría de los compuestos antitumorales y fármacos radiactivos, que se sabe que provocan todos efectos secundarios significativos.

En un aspecto de la presente descripción, los lípidos anfífilos se usan para tratar a un mamífero. Se prefiere especialmente el tratamiento de seres humanos.

15 Los lípidos anfífilos pueden administrarse en cualquier forma y concentración que sea clínicamente eficaz. Según una realización de la presente invención, se dispersa un fosfolípido en una disolución acuosa. La disolución contiene preferiblemente el fosfolípido en una concentración del 0,05% al 25% (p/v), más preferiblemente en una concentración del 0,5% al 20% (peso/peso) y lo más preferiblemente en una concentración del 1,5% al 10% (peso/peso).

20 Para la administración, los lípidos anfífilos pueden formularse en cualquier composición farmacéutica adecuada. La preparación de una dispersión para administración local, tal como instilación o inyección, en la que se prefiere especialmente la administración intraperitoneal.

25 Según una realización especialmente preferida, los lípidos anfífilos se administran dispersados en un líquido acuoso y la cantidad de líquido administrada está por encima del volumen de recubrimiento mínimo, es decir, por encima del volumen que contiene suficientes cantidades de lípidos anfífilos necesarias para recubrir todas las superficies internas. Los órganos absorberán el agua y los lípidos anfífilos formarán un recubrimiento sobre las superficies internas.

30 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a métodos para preparar composiciones farmacéuticas para tratar la metástasis tumoral, método que comprende etapas en las que se mezclan lípidos anfífilos como único compuesto activo con una disolución acuosa. Los lípidos anfífilos se dispersan preferiblemente en una disolución acuosa. La dispersión puede obtenerse mediante varias alternativas bien conocidas en la técnica tales como homogeneización a alta presión. Preferiblemente, la dispersión se prepara de una manera tal que se obtienen liposomas con un tamaño de partícula de 40 a 100 nm.

35 El método para la preparación de la composición farmacéutica también comprende además preferiblemente una etapa, en la que la dispersión o los componentes usados para la preparación de la misma se esterilizan.

También en esta realización de la presente invención, el lípido anfífilo es un fosfolípido. Además, los lípidos anfífilos pueden ser un único tipo específico de lípido anfífilo o una combinación de diferentes lípidos anfífilos. La composición farmacéutica no contiene ningún compuesto activo actualmente usado para el tratamiento de tumores y metástasis. Los lípidos anfífilos son el único compuesto farmacológico activo en la composición farmacéutica.

40 **Breve descripción de las figuras**

- | | | |
|----|-------------|--|
| 45 | La figura 1 | muestra los resultados del análisis del volumen tumoral en presencia de diversas concentraciones de PL tal como se describe en el ejemplo 2. |
| | La figura 2 | muestra los resultados del análisis del área media de unión tumoral en presencia de diversas concentraciones de PL tal como se describe en el ejemplo 2. |
| 45 | La figura 3 | muestra los resultados del análisis del índice de cáncer peritoneal (ICP) en presencia de diversas concentraciones de PL tal como se describe en ejemplo 2. |
| | La figura 4 | muestra los resultados del análisis de la supervivencia relativa de los animales de prueba usados en el ejemplo 2. |
| 50 | La figura 5 | muestra los resultados de la supervivencia relativa de los animales de prueba usados en el ejemplo 3. |
| | La figura 6 | muestra los resultados del análisis del índice de cáncer peritoneal (ICP) en presencia de diversas concentraciones de PL tal como se describe en el ejemplo 3. |

- La figura 7 muestra un intestino ciego con abrasión del peritoneo a. 30 días tras PL150
b. 30 días tras NaCl
- La figura 8 muestra los resultados del análisis del volumen tumoral en presencia de diversas concentraciones de PL tal como se describe en el ejemplo 3.
- 5 La figura 9 muestra los resultados del análisis del área media de unión tumoral en presencia de diversas concentraciones de PL tal como se describe en ejemplo 3.
- La figura 10 muestra los resultados del ensayo de adhesión del ejemplo 4, es decir, la inhibición de la adhesión de células de cáncer rectal sobre placas de microtitulación recubiertas con In en presencia de diversas concentraciones de PL.
- 10 La figura 11 muestra los resultados del ensayo de adhesión del ejemplo 4, es decir, la inhibición de la adhesión de células de cáncer rectal sobre placas de microtitulación recubiertas con coll IV en presencia de diversas concentraciones de PL.
- La figura 12 muestra los resultados del ensayo de adhesión del ejemplo 4, es decir, la inhibición de la adhesión de células de cáncer gástrico sobre placas de microtitulación recubiertas con fn en presencia de diversas concentraciones de PL.
- 15 La figura 13 muestra los resultados del ensayo de adhesión del ejemplo 5,
a) adhesión de células de cáncer gástrico sobre laminina en presencia de 1,0 g de PL.
b) adhesión de células de cáncer gástrico sobre laminina en el grupo control.
- La figura 14 muestra los resultados del ensayo de adhesión del ejemplo 5, es decir, la inhibición de la adhesión de células de cáncer gástrico sobre placas de microtitulación recubiertas con In en presencia de diversas concentraciones de PL.
- 20 La figura 15 muestra los resultados del ensayo de adhesión del ejemplo 5, es decir, la inhibición de la adhesión de células de cáncer gástrico sobre placas de microtitulación recubiertas con fn en presencia de diversas concentraciones de PL.
- 25 La figura 16 muestra los resultados del ensayo de adhesión del ejemplo 5, es decir, la inhibición de la adhesión de células de cáncer gástrico sobre placas de microtitulación recubiertas con coll IV en presencia de diversas concentraciones de PL.

Ejemplo 1

30 El método para preparar los PL puede depender de la fuente elegida de los PL y las moléculas que van a obtenerse. El nivel de purificación puede ser de particular importancia para los PL de origen natural. Los expertos en la técnica conocen métodos de purificación para lograr una calidad fácilmente aceptable para uso intravenoso, basándose por ejemplo en procesos de precipitación/extracción con disolvente repetidos (F Nielloud, G Marti Mestres, Pharmaceutical Emulsions and Suspensions, cap. 1.VB, 6.VI Marcel Dekker, NY 2000; con referencias adicionales).

35 Para proporcionar un PL en una forma adecuada para el fin pretendido, los fosfolípidos se formulan regularmente en una dispersión liposómica que puede fabricarse y almacenarse hasta su uso. Una dispersión liposómica se adsorberá fácilmente sobre las superficies internas del paciente, tales como las superficies internas del peritoneo, y por tanto formará capas mono o multilaminares que impedirán la adhesión de células tumorales a las superficies recubiertas.

40 Desde un punto de vista farmacéutico, una dispersión de liposomas de este tipo debe satisfacer varias condiciones. Por motivos de estabilidad y funcionalidad, la dispersión debe prepararse preferiblemente usando homogeneización a alta presión u otros métodos que sean adecuados para obtener un tamaño de partícula muy pequeño (submicrométrico). Además, la disolución debe ser estéril. Se alcanzan niveles que garantizan una esterilidad apropiada mediante esterilización térmica que se usa como elección preferida para lograr la esterilidad. Sin embargo, esto impone tensiones sobre la estabilidad fisicoquímica de la formulación.

45 Pueden prepararse fácilmente formulaciones optimizadas que contienen fosfolípidos apropiadamente equilibrados con buenas propiedades de formación de bicapas, o formulados con aditivos que podrían ayudar a proporcionar una dispersión liposómica estable, usando métodos industriales para la preparación y esterilización (I Hanin y G Pepeu (eds.): "Phospholipids" págs. 115-122, Plenum Press NY 1990; M J Groves, "Parenteral Products", Heinemann 1973).

50 Se prepararon las siguientes dispersiones de fosfolípidos:

1. 30 g de fosfolípidos de huevo
25 g de glicerol
NaOH hasta pH = 8
Agua para inyección (WFI) hasta 1000 ml
- 5 2. 20 g de lecitina
Tampón NaCl/fosfato hasta pH = 7 e isotonicidad
WFI hasta 1000 ml
3. 20 g de lecitina (fosfatidilcolina)
0,1 g de oleato de sodio
- 10 25 g de glicerol
WFI hasta 1000 ml
4. 25 g de fosfatidilcolina
5 g de fosfatidiletanolamina
Tampón NaCl fosfato hasta pH = 7 e isotonicidad
- 15 WFI hasta 1000 ml

Se agitó el polvo de PL en el líquido mencionado y se sometió a homogeneización a alta presión hasta que se obtiene una dispersión muy fina de partículas que contienen liposomas que tienen un tamaño en el intervalo de 50-100 nm. Se esterilizó la dispersión así obtenida mediante tratamiento en autoclave y se almacenó hasta su uso adicional.

En algunos de los siguientes ejemplos, se ha usado la dispersión 1 anterior.

20 Ejemplo 2

El desarrollo de carcinosis peritoneal tras inyección intraperitoneal de células tumorales (línea celular: DHD/K12/TRb) en ratas BD IX es un modelo animal bien establecido (Dunnington *et al.*, Int J Cancer 1987; 39:248-254; Reisser *et al.*, Bull Cancer 1991; 78:249-252; y Qin *et al.*, Int J Cancer 1991; 47:765-770) que se usó en el presente experimento para observar si los fosfolípidos tienen un efecto terapéutico.

25 1. Cultivo celular

Se usó la línea celular DHD/K12/TRb. Se obtienen las células de un adenocarcinoma de colon inducido en ratas BD-IX singénicas (García-Olmo *et al.*, Cancer Lett 1998; 132:127-133). Se adquirió la línea celular de la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ecacc, Salisbury, RU).

30 Se cultivaron las células en monocapas en un frasco de tejido tisular (75 cm² Falcon, Becton Dicsidson-Gambil, Heidelberg, Alemania) en DMEM y F10 de Ham (1:1; GIBCO) complementado con de suero bovino fetal (GIBCO) al 10% y gentamicina (GIBCO) al 0,005%. Se cultivaron los cultivos celulares a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire. Se pasaron las células tras tratamiento con tripsina al 0,125% durante 2 min. Se sedimentaron las células tras centrifugación durante 10 min. a 200 g, se suspendieron en 20 ml de PBS y se sedimentaron de nuevo. Se resuspendió el sedimento celular en 30 ml de medio completo y se sembró con una razón de división de 1:3. Sólo se usaron células de tres pases para los experimentos. El día de la operación, se suspendieron 2x10⁶ células en 100 µl de medio completo.

35 2. Animales y anestesia

40 Se incluyó un total de 90 ratas BD-IX hembra (peso corporal medio de 250 +/- 28 g) en este estudio. Se mantuvieron las ratas en jaulas protectoras por parejas con acceso ilimitado a agua y alimento para ratas convencional. Se asignaron aleatoriamente los animales a nueve grupos diferentes de números iguales (tabla 1). Se realizó el procedimiento quirúrgico en condiciones estériles y anestesia general mediante inyección intramuscular de ketamina 100 mg/kg (ketamina al 10%, Sanofi-Ceva, Düsseldorf, Alemania) y xilacina 5 mg/kg (Rompun al 2%, Bayer, Leverkusen, Alemania).

	30 días - lesiones peritoneales	30 días + lesiones peritoneales	90 días
Fosfolípidos 75 mg/kg (PL75)	10	10	10
Fosfolípidos 150 mg/kg (PL150)	10	10	10
NaCl al 0,9%	10	10	10

3. Procedimiento quirúrgico

5 Se inyectaron células tumorales junto con disolución de fosfolípidos por medio de una incisión en la línea media de 2 cm en la cavidad peritoneal. En el grupo 2, adicionalmente, se realizó una abrasión del peritoneo parietal y visceral en el costado derecho y en el intestino ciego usando un bisturí. (Muller *et al.*, J Surg Res 2001; 96:68-74). Antes de la cirugía y al final del periodo de observación se midió el peso corporal en todos los animales.

4. Evaluación de la carcinosis peritoneal

10 Tras intervalos de 30 y 90 días, respectivamente, se sacrificaron los animales mediante una dosis letal de isoflurano mediante inhalación. Se abrió el abdomen mediante dos incisiones paramedianas para realizar una exploración completa. Se midió la expansión de la carcinosis peritoneal (mm²) usando una tableta digitalizadora y se midió mediante software a medida en un ordenador personal (Treutner KH *et al.*, J Surg Res 1995; 59:764-71). Tras una resección sutil se midió el volumen tumoral (ml) mediante desplazamiento de agua.

15 Además, se determinó el índice de cáncer peritoneal (ICP), tal como se describe por Sugarbaker *et al.* (Sugarbaker PH *et al.*, Cancer Treat Res 1996; 81:149-68). Se adaptó el ICP a los tamaños tumorales en ratas. Se usaron las siguientes puntuaciones de tamaño de lesión; LS-1: tamaño tumoral < 2 mm, LS-2: 2,1-5 mm; LS-3: > 5 mm o confluencia. Se llevó a cabo la exploración abdominal por un observador independiente, ciego.

20 Finalmente, se tomaron muestras de la pared abdominal, el intestino ciego, el yeyuno, el hígado, el bazo y el epipión mayor y se fijaron en disolución de formaldehído. Se tiñeron secciones con un espesor de 5 µm con hematoxilina y eosina para la microscopía óptica.

5. Análisis estadístico

25 Se expresaron todos los datos como medias +/- error estándar de la media (EEM). Se realizó el análisis estadístico con un ANOVA de dos vías con contrastes según la comparación por parejas. Se ajustó el nivel de significación según Bonferroni a $\alpha/18 = 0,00278$. Se compararon las curvas de supervivencia usando la prueba de rangos logarítmicos.

6. Resultados

La realización del procedimiento quirúrgico inicial fue sin incidentes en todos los animales. Todas las ratas desarrollaron carcinosis peritoneal independientemente del tratamiento. No se observó ningún efecto secundario adverso tras la inyección de fosfolípidos.

30 Peso corporal

Tras 30 días, la reducción media del peso corporal fue de 18 ± 9 g en el grupo control (C). En el grupo PL75 así como en el grupo PL150, el peso corporal permaneció casi constante con diferencias de $1 \pm 2,8$ g y -2 ± 5 g, respectivamente. Esas diferencias no eran significativas.

Volumen

35 El volumen tumoral en el grupo control alcanzó $9,27 \pm 1,5$ ml con desperitonealización (C+dp) y $14,45 \pm 0,75$ ml sin lesiones peritoneales (C). En el grupo de ensayo sin desperitonealización, se encontró una reducción significativa del volumen tumoral tras el tratamiento con concentraciones de fosfolípidos superiores tanto a $7 \pm 0,59$ ml (PL75) como a $7,13 \pm 0,91$ ml (PL150) respectivamente ($p < 0,0001$). Aunque pudo encontrarse una reducción marcada del volumen tumoral en el PL150+dp, la diferencia no fue significativa en comparación con el grupo control ($p = 0,0817$) (figura 1).

40 Área

El área media de unión tumoral en el grupo control tras 30 días fue de $640 \pm 112,5$ mm² (C+dp) y $1691 \pm 123,6$ mm²(C). En el grupo PL75, se midieron $1082,43 \pm 169,4$ mm² (PL75+dp) y $1048,42 \pm 209,3$ mm² (PL75). En el grupo

PL150 se probaron $480 \pm 41,6 \text{ mm}^2$ (PL150+dp) y $836,49 \pm 155,9 \text{ mm}^2$ (PL150). Se encontró una reducción significativa del área de unión tumoral sólo en el grupo PL 150 (figura 2).

ICP

5 Con respecto al índice de cáncer peritoneal (ICP), el grupo control alcanzó un valor de $39 \pm 2,03$ (C+dp) y $43 \pm 1,125$ (C), respectivamente. En comparación con el grupo control, se encontró una reducción significativa en el grupo PL150 con $29,6 \pm 1,97$ (PL150+dp) y $25,7 \pm 2,29$ (PL150). El ICP registrado en el grupo PL75 era igual en el subgrupo con lesiones peritoneales ($38,2 \pm 1,14$, PL75+dp) y se redujo significativamente en el segundo subgrupo ($33 \pm 1,62$, PL75) (figura 3).

Tasa de supervivencia

10 Durante el periodo de observación de 90 días, sólo sobrevivió un animal en el grupo control. La mediana del tiempo de supervivencia fue de $68,5 \pm 3,56$. Todas las ratas en el grupo PL75 murieron debido a la evolución del tumor hasta el octavo día postoperatorio con una mediana del tiempo de supervivencia de $66,5 \pm 2,79$. La supervivencia en el grupo PL150 (mediana de $74,3 \pm 2,71$), sin embargo, se prolongó obviamente en comparación con el grupo control aunque la diferencia no era significativa ($p = 0,13$). (Figura 4).

15 Histología

Pudo comprobarse histológicamente en todos los animales la infiltración de cáncer colónico. Las pruebas de infiltración tumoral se restringieron a la serosa. No pudo detectarse invasión en capas más profundas. Se encontró un crecimiento tumoral exofítico. Desde el punto de vista histológico, no se produjeron diferencias en el crecimiento tumoral intraperitoneal en el grupo control en comparación con los grupos de ensayo.

20 Ejemplo 3

Se derivó la línea celular de cáncer gástrico NUGC-4 de metástasis de ganglios linfáticos de una mujer de 35 años de edad. La histología del tumor original describió un adenocarcinoma escasamente diferenciado (Schwartz OK, Semin Oncol 1996; 23: 316-24; y Akiyama S *et al.*, Jpn J Surg 1988; 18:438-46). El modelo experimental de diseminación peritoneal en ratones desnudos está bien establecido (Nakashio T *et al.* Int J Cancer 1997; 70:612-8, Satta T *et al.*, Gastroenterol Jpn 1993; 28:580) y se usó en el presente estudio.

1. Cultivo celular

Se adquirió la línea celular de cáncer gástrico humano NUGC-4 del Banco de Recursos de Investigación del Cáncer Japonés (Tokyo, Japón). Se mantuvieron las células en monocapas en un frasco de cultivo tisular (75 cm^2 , Falcon, Becton Dickinson-Gambil, Heidelberg, Alemania) en medio RPMI 1640 (GIBCO, Paisley, RU), complementado con suero bovino fetal al 10% (GIBCO), penicilina y estreptomycin (GIBCO). Se incubaron los cultivos celulares a 37°C en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% en aire. Se pasaron las células tras tratamiento con tripsina al 0,125% durante 6 min. Se sedimentaron las células tras centrifugación durante 10 min. a 200 g, se suspendieron en 20 ml de PBS y se sedimentaron de nuevo. Se resuspendió el sedimento celular en 30 ml de medio completo y se sembró con una razón de división de 1:3. Sólo se usaron células de tres pases para los experimentos. El día de la operación, se suspendieron 1×10^6 células en 100 μl de medio completo.

2. Animales y anestesia

Se incluyó un total de 90 ratones BALB/C nu/nu hembra (peso corporal medio $20,2 \pm 2$ g) en este estudio. Se mantuvieron las ratas en jaulas protectoras por parejas con acceso ilimitado a agua y alimento para ratones convencional. Se asignaron aleatoriamente los ratones a nueve grupos diferentes de números iguales (tabla 1). Se realizó el procedimiento quirúrgico en condiciones estériles y anestesia general mediante inyección intramuscular de ketamina 40 mg/kg (ketamina al 10%, Sanofi-Ceva, Düsseldorf, Alemania) y KG medetomidina 0,1 mg/kg (Dormitor).

3. Procedimiento quirúrgico

Se inyectaron células tumorales con disolución de fosfolípidos por medio de una incisión en la línea media de 1 cm en la cavidad peritoneal. En el grupo 2, adicionalmente, se realizó una abrasión del peritoneo parietal y visceral en el costado derecho y en el intestino ciego usando un bisturí. Antes de la cirugía y al final del periodo de observación se midió el peso corporal en todos los animales.

4. Evaluación de la carcinosis peritoneal

Tras intervalos de 30 y 90 días, respectivamente, se sacrificaron los animales mediante una dosis letal de isoflurano mediante inhalación. Se abrió el abdomen mediante dos incisiones paramedianas para realizar una exploración completa. Se midió la expansión de la carcinosis peritoneal (mm^2) usando una tableta digitalizadora y se midió mediante software a medida en un ordenador personal. Tras una resección sutil se midió el volumen tumoral (ml) mediante desplazamiento de agua.

Además, se determinó el índice de cáncer peritoneal (ICP), tal como se describe por Sugarbaker *et al.* (Sugarbaker PH *et al.*, Cancer Treat Res 1996; 81:149-68). Se adaptó el ICP a los tamaños tumorales en ratones. Se usaron las siguientes puntuaciones de tamaño de lesión; LS-1: tamaño tumoral < 2 mm, LS-2: 2,1-5 mm; LS-3: > 5 mm o confluencia. Se llevó a cabo la exploración abdominal por un observador independiente, ciego.

5 Finalmente, se tomaron muestras de la pared abdominal, el intestino ciego, el yeyuno, el hígado, el bazo y el epiplón y se fijaron en disolución de formaldehído. Se tiñeron secciones con un espesor de 5 μ m con hematoxilina y eosina para la microscopía óptica.

5. Análisis estadístico

10 Se expresaron todos los datos como medias +/- error estándar de la media (EEM). Se realizó el análisis estadístico con un ANOVA de dos vías con contrastes según la comparación por parejas. Se ajustó el nivel de significación según Bonferroni a $\alpha/18 = 0,00278$. Se compararon las curvas de supervivencia usando la prueba de rangos logarítmicos.

6. Resultados

15 Todos los ratones desarrollaron carcinosis peritoneal, independientemente del tratamiento. No se produjo ningún efecto secundario adverso tras la inyección de fosfolípidos.

En el grupo control ningún ratón vivió durante más de 75 días. La mediana del tiempo de supervivencia fue de 69 ± 3 días. En el grupo PL150 la supervivencia relativa fue mayor con una mediana del tiempo de supervivencia de 73 ± 5 días. En el grupo PL75, cuatro animales sobrevivieron el periodo de observación de 90 días completo. Sin embargo, la mediana del tiempo de supervivencia fue de sólo 59 ± 6 días (figura 5).

20 Tras 30 días, el índice de cáncer peritoneal (ICP) en el grupo control era de $16,4 \pm 1,7$ sin y $21,7 \pm 0,77$ con lesiones peritoneales (dp). Se produjeron cambios minoritarios tras el tratamiento con PL75. El ICP era de 14 ± 1 y $17,8 \pm 1,09$ (dp), respectivamente. Sin embargo, las diferencias no eran significativas en comparación con los valores control. Se logró un ICP inferior significativo en el grupo PL150 con $9 \pm 1,68$ ($p = 0,0002$) y $14,3 \pm 1,07$ ($p = 0,0001$) tras la desperitonealización local (figura 6).

25 Se encontró predominantemente unión de células tumorales en el sitio de la incisión abdominal. Si se habían realizado lesiones peritoneales convencionales, la carcinosis peritoneal se centraba en estos sitios (figura 7 a, b). El ICP medio del "colon" en el grupo control llegó casi al valor máximo ($2,9 \pm 0,09$), mientras que el ICP registrado en esos sitios se redujo en los grupos de tratamiento. Sin embargo, como consecuencia de la evaluación del colon completo en lugar del intestino ciego, no se pudo encontrar una influencia significativa de los PL sobre la adhesión tumoral en comparación con el grupo control en esta zona. El ICP del "costado derecho" en ambos grupos de ensayo disminuyó significativamente. 30 días tras el tratamiento los valores eran de $1,7 \pm 0,44$ en el grupo PL75 y $0,9 \pm 0,44$ en el grupo PL150, respectivamente, en comparación con $2,8 \pm 0,13$ en el grupo control.

35 El volumen tumoral en el grupo control registrado 30 días de manera posoperatoria era de $0,9 \pm 0,1$ ml (dp) y $0,9 \pm 0,17$ ml. Los valores respectivos en el grupo PL75 alcanzaron $0,67 \pm 0,14$ ml (dp) y $1,0 \pm 0,13$ ml. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas en ambos subgrupos. Tras la administración de PL150, el volumen tumoral en el subgrupo con lesiones peritoneales pudo reducirse hasta un valor de $0,48 \pm 0,09$ ml (dp) y $0,6 \pm 0,16$. Ambos resultados no eran significativamente diferentes a los del grupo control. Sin embargo, los valores de p eran de $0,04$ (figura 8). El área media de adhesión de células tumorales en el grupo control llegó hasta $217 \pm 31,5$ mm² (dp) y $245 \pm 29,3$ mm² en comparación con $184 \pm 28,3$ mm² (dp) y $201 \pm 30,3$ mm² en el grupo PL75. El grupo PL150 desarrolló un área respectiva de sólo 145 ± 17 mm² (dp) y $164 \pm 32,8$ mm². La diferencia entre el grupo control frente a PL150 en ambos grupos no era significativa, aunque los valores de p eran muy bajos con $p = 0,049$ en el ensayo sin lesiones peritoneales y $p = 0,08$ en el ensayo con lesiones (figura 9).

Estos resultados muestran por tanto que los PL pueden usarse para inhibir la adhesión de células tumorales peritoneales en la pared abdominal.

45 EJEMPLO 4

En este estudio *in vitro*, se determinó la influencia de los fosfolípidos sobre la adhesión de células de cáncer colónico a componentes de la matriz extracelular. Específicamente, se analizó la reactividad de las células cancerosas con varias integrinas, concretamente los componentes de la membrana basal principal colágeno IV (coll IV) y laminina (ln) así como fibronectina (fn), que desempeña un papel importante en la cicatrización de heridas.

50 1. Células tumorales

Se adquirió la línea celular de cáncer rectal humano HRT-18 del Banco de Recursos de Investigación del Cáncer Japonés (Tokyo, Japón). Se mantuvieron las células en monocapas en un frasco de cultivo tisular (75 cm², Falcon, Becton Dickinson-Gambil, Heidelberg, Alemania) en medio RPMI 1640 (GIBCO, Paisley, RU), complementado

5 con suero bovino fetal al 10% (GIBCO), penicilina y estreptomycin (GIBCO). Se incubaron los cultivos celulares a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire. Se pasaron las células tras tratamiento con tripsina al 0,125% durante 6 min. Se sedimentaron las células tras centrifugación durante 10 min. a 200 g, se suspendieron en 20 ml de PBS y se sedimentaron de nuevo. Se resuspendió el sedimento celular en 30 ml de medio completo y se sembró con una razón de división de 1:3. Sólo se usaron células de tres pases para los experimentos.

2. Componentes de la matriz extracelular (MEC)

10 Se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) para experimentos de adhesión. Se disolvieron los componentes de la MEC purificados en PBS con las siguientes concentraciones: colágeno IV (coll IV) - 2,5 µg/ml (Biomol, Hamburgo, Alemania), fibronectina (fn) - 10 µg/ml (Boehringer, Mannheim, Alemania) y laminina (ln) - 50 µg/ml (Boehringer, Mannheim, Alemania). Se encontró que estas concentraciones eran óptimas en la serie de dilución precedente. Se añadieron a los pocillos y se incubaron a 4°C durante 24 horas (coll IV, fn), o a 37°C durante 45 min. en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire (ln) respectivamente. Se bloqueó la unión no específica a proteínas de los pocillos recubiertos añadiendo BSA al 1% (p/v) (4°C, 12 h) y enjuagando los pocillos con tampón Hepes.

15 3. Ensayo de adhesión

Para los experimentos de adhesión, se desprendieron células de cáncer colónico con colagenasa I (15 min., 37°C, Worthington, Freehold, EE.UU.), se lavaron una vez con RPMI 1640, se centrifugaron (200 g durante 10 min.), se resuspendieron en RPMI 1640 y se preincubaron durante 30 min. en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire (37°C). Se sembraron setenta mil células tumorales en 100 µl de medio en pocillos recubiertos con ln y fn y 30.000 células en pocillos recubiertos con coll IV según la serie de dilución. Se realizó la evaluación de células adherentes usando tinción con cristal violeta según el método descrito por Aumeilley *et al.*, y Tietze *et al.* Tras un tiempo de incubación de 30 min., se eliminó el sobrenadante con células no adherentes mediante dos lavados con RPMI 1640 calentado. Se fijaron las células unidas con etanol/metanol al 30% (v/v) durante 15 min. a temperatura ambiente. Se tiñeron las células con cristal violeta al 0,1% (p/v) (Sigma, Hamburgo, Alemania), se lavaron extensamente con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Se resuspendió el tinte con 50 µl de Triton X-100 al 0,2% (v/v)/pocillo y se midió entonces la producción de color en un lector de ELISA a 590 nm (Titertek Multiscan Plus MKII, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Alemania). La densidad óptica (DO) mostró una relación lineal con la cantidad de células entre 1×10^3 y 1×10^5 células por pocillo, tal como se determina mediante la serie de dilución.

30 La tinción de control de BSA/poliestireno sin células condujo a valores de densidad óptica (DO) mínimos de 0,01-0,07. Estos valores se restaron de los obtenidos en los experimentos.

Fosfolípidos

Tras la preparación completa de la suspensión de células tumorales, se añadió la disolución de PL con las siguientes concentraciones: 0,1, 0,5, 0,75, 1 y 1,5 mg/100 µl de medio. Las concentraciones usadas se correlacionaban con los experimentos *in vivo*.

35 4. Análisis estadístico

Se realizaron todos los experimentos tres veces por cuadruplicado. Se expresan los datos como medias +/- error estándar de la media (EEM). Se usó ANOVA de una vía con contrastes según la comparación por parejas para el análisis estadístico. Se ajustó el nivel de significación según Bonferroni a $\alpha/10 = 0,005$.

5. Resultados

40 Laminina

En el ensayo de adhesión de células rectales humanas (HRT-18) sobre laminina tras un tiempo de incubación de 30 min., se detectó una extinción media de $0,7 \pm 0,07$ en el grupo control. La adición de fosfolípidos con una concentración de 0,75 (ext. $0,5 \pm 0,08$), 1 (ext. $0,44 \pm 0,07$) y 1,5 (ext. $0,39 \pm 0,08$) mg/pocillo condujo a una reducción significativa de la adhesión de células tumorales ($p < 0,0001$). El tratamiento con una concentración de 1,5 mg/pocillo redujo la unión de células hasta el 46% en comparación con el grupo control (figura 10).

Colágeno IV

50 La extinción tras la incubación de 30.000 células tumorales sobre colágeno IV fue de $0,34 \pm 0,03$. Mientras que el tratamiento con la concentración más baja de fosfolípidos (0,1 mg/pocillo) condujo a un aumento de la adhesión de células tumorales (ext. $0,5 \pm 0,03$), pudo alcanzarse una reducción del 24% con 1,5 mg de fosfolípidos/pocillo (ext. $0,26 \pm 0,02$). Se compararon las diferencias observadas en este ensayo con el grupo control y eran sólo significativas con la concentración máxima ($p < 0,0001$) (figura 11).

Fibronectina

5 Sobre fibronectina, se observó una reducción de la adhesión de células tumorales análoga a los experimentos sobre laminina. Ya el tratamiento con 0,5 mg fosfolípidos/pocillo (ext. $0,99 \pm 0,09$) condujo a una reducción significativa de la unión de células en comparación con la extinción en el grupo control con un valor de $1,17 \pm 0,1$ ($p = 0,0005$). La influencia de concentraciones de fosfolípidos superiores (0,75, 1, 1,5 mg/pocillo) era también significativa ($p < 0,0001$). Se observó la reducción máxima de la adhesión de células tumorales sobre fibronectina tras la adición de 1,5 mg de fosfolípidos/pocillo (37%) (figura 12).

Ejemplo 5

10 En este estudio *in vitro*, se determinó la influencia de los fosfolípidos sobre la adhesión de células de cáncer gástrico a componentes de la matriz extracelular.

1. Células tumorales

15 Se adquirió la línea celular de cáncer gástrico humano NUGC-4 del Banco de Recursos de Investigación del Cáncer Japonés (Tokyo, Japón). Se mantuvieron las células en monocapas en frascos de cultivo tisular (75 cm^2 , Falcon, Becton Dickinson-Gambil, Heidelberg, Alemania) en medio RPMI 1640 (GIBCO, Karlsruhe, Alemania), complementado con suero bovino fetal al 10% (GIBCO), penicilina y estreptomycin (GIBCO). Se incubaron los cultivos celulares a 37°C en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% en aire. Se pasaron las células tras tratamiento con tripsina al 0,125% durante 6 min. Se sedimentaron las células tras centrifugación durante 10 min. a 200 g, se suspendieron en 20 ml de PBS y se sedimentaron de nuevo. Se resuspendió el sedimento celular en 30 ml de medio completo y se sembró con una razón de división de 1:3. Sólo se usaron células de tres pases para los experimentos.

20 2. Componentes de la matriz extracelular (MEC)

25 Se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) para experimentos de adhesión. Se disolvieron los componentes de la MEC purificados en PBS con las siguientes concentraciones: coll IV - $2,5 \mu\text{g/ml}$ (Biomol, Hamburgo, Alemania), fn - $10 \mu\text{g/ml}$ (Boehringer, Mannheim, Alemania), ln - $50 \mu\text{g/ml}$ (Boehringer, Mannheim, Alemania). Se añadieron a los pocillos y se incubaron a 4°C durante 24 horas (coll IV, fn), o a 37°C durante 45 min. en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% en aire (ln) respectivamente. Se bloqueó la unión no específica a proteínas de los pocillos recubiertos añadiendo BSA al 1% (p/v) (4°C , 12 h) y enjuagando los pocillos con tampón Hepes.

3. Ensayo de adhesión

30 Para los experimentos de adhesión, se desprendieron células de cáncer colónico con colagenasa I (Worthington, Freehold, EE.UU.) durante 15 min. a 37°C , se lavaron una vez con RPMI 1640, se centrifugaron (200 g durante 10 min.), se resuspendieron en RPMI 1640 y se preincubaron durante 30 min. en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% en aire a 37°C . Se sembraron 50.000 células tumorales en $100 \mu\text{l}$ de medio en cada pocillo. Se realizó la evaluación de células adherentes usando tinción con cristal violeta según el método descrito por Aumailley *et al.*, y Tietze *et al.* (Aumailley *et al.*, Exp Cell Res 1989; 181(2):463-474; and Tietze *et al.*, Exp Mol Pathol 1999; 66(2):131-139). Tras un tiempo de incubación de 30 min., se eliminó el sobrenadante con células no adherentes mediante dos lavados con RPMI 1640 calentado.

40 Se fijaron las células unidas con etanol/metanol al 30% (v/v) durante 15 min. a temperatura ambiente. Se tiñeron las células con cristal violeta al 0,1% (p/v) (Sigma, Hamburgo, Alemania), se lavaron extensamente con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Se resuspendió el tinte con $50 \mu\text{l}$ de Triton X-100 al 0,2% (v/v)/pocillo y se midió entonces la producción de color en un lector de ELISA a 590 nm (Titertek Multiscan Plus MKII, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Alemania). La densidad óptica (DO) mostró una relación lineal con la cantidad de células entre 1×10^3 y 5×10^4 células por pocillo, tal como se determina mediante la serie de dilución. La tinción de control de BSA/poliestireno sin células condujo a valores de densidad óptica (DO) de 0,01-0,07. Estos valores se restaron de los obtenidos en los experimentos.

45 4. Fosfolípidos

Tras la preparación completa de la suspensión de células tumorales, se añadió la disolución de fosfolípidos con las siguientes concentraciones: 0,05, 0,1, 0,5, 0,75 y 1 mg/100 μl de medio. Las concentraciones usadas se correlacionaban con los experimentos *in vivo* posteriores.

5. Análisis estadístico

50 Se realizaron todos los experimentos tres veces por cuadruplicado. Se expresan los datos como medias +/- error estándar de la media (EEM). Se usó ANOVA de una vía con contrastes según la comparación por parejas para el análisis estadístico. Se ajustó el nivel de significación según Bonferroni a $\alpha/10 = 0,005$.

6. Resultados

5 El análisis de la adhesión de células tumorales a BSA al 1% condujo a una extinción media de $0,27 \pm 0,013$ a 590 nm. El recubrimiento con laminina (ln) y fibronectina (fn) condujo a un aumento de casi dos veces de la adhesión de células tumorales con valores medios de $0,56 \pm 0,09$ (ln) y $1,17 \pm 0,1$ (fn), respectivamente. Las células cancerosas mostraron una adhesión más pronunciada a colágeno IV (coll IV) con una extinción media de $0,97 \pm 0,05$.

10 La adhesión de células tumorales sobre ln registrada tras la adición de PL se redujo significativamente. El efecto era dependiente de la concentración en comparación con el control. Incluso la cantidad mínima de 0,05 mg de PL/100 μ l condujo a una extinción reducida de $0,4 \pm 0,02$. El tratamiento con 0,1 o 0,5 mg de PL/100 μ l reveló valores de extinción de $0,33 \pm 0,05$ y $0,28 \pm 0,04$, respectivamente. Pudo demostrarse el efecto máximo con 0,75 mg de PL/100 μ l con una extinción de $0,25 \pm 0,04$. La reducción relativa de la adhesión de células tumorales sobre laminina en comparación con el control llega al 59%. El tratamiento con 1 mg de PL/100 μ l no mostró ninguna disminución adicional de la adhesión de células tumorales. La extinción media fue de $0,26 \pm 0,02$. La evaluación estadística reveló diferencias significativas para todas las concentraciones de fosfolípidos en comparación con el grupo control ($p < 0,0001$) (figura 13 a,b; 14).

15 La adhesión de células tumorales sobre fn no pudo reducirse significativamente con concentraciones de fosfolípidos bajas. La adición de 0,05 mg de PL/100 μ l y 0,1 mg de PL/100 μ l dio como resultado una ligera reducción de la extinción con valores medios de $0,59 \pm 0,018$ y $0,6 \pm 0,009$. Sin embargo, pudo observarse una reducción significativa de la adhesión de células tumorales tras el tratamiento con 0,5 mg de PL/100 μ l, (ext. $0,44 \pm 0,023$), así como con 0,75 mg de PL/100 μ l, (ext. $0,41 \pm 0,025$) y 1 mg de PL/100 μ l (ext. $0,39 \pm 0,02$). Se encontró una situación similar en comparación con ln con efectos iguales tanto de 0,75 mg/100 μ l como 1 mg/100 μ l de PL, lo que indica que se alcanza la influencia máxima sobre la adhesión. La reducción relativa de la adhesión de células tumorales en comparación con los valores control llega al 35% (figura 15).

25 Las células NUGC-4 de cáncer gástrico se adhieren al colágeno IV de manera creciente en comparación con todos los otros componentes de la matriz extracelular examinados. La influencia de los fosfolípidos sobre la adhesión de células a coll IV era también dependiente de la concentración. La reducción oscilaba entre una extinción media $0,9 \pm 0,02$ tras la administración de 0,05 mg de PL/100 μ l y un efecto máximo tras el tratamiento con 1 mg de PL/100 μ l, con un valor medio de $0,46 \pm 0,03$. Se encontraron diferencias significativas desde 0,1 hasta 1 mg de PL/pocillo ($p < 0,0001$). En comparación con el valor control, esto significa una reducción máxima de células tumorales adhesivas del 53% (figura 16).

30 En resumen, las pruebas experimentales proporcionadas demuestran que los PL intraperitoneales tienen un efecto de reducción de la adhesión de células de tumor colorrectal en ratas, células de cáncer gástrico en ratones desnudos e inhiben la adhesión de células de cáncer gástrico así como células de cáncer rectal sobre placas de microtitulación recubiertas con colágeno IV, laminina y fibronectina. Estos resultados muestran por tanto que los PL inhiben la adhesión de células tumorales peritoneales y son por tanto adecuadas para reducir la metástasis tumoral.

35

REIVINDICACIONES

1. Uso de lípidos anfifílicos como único compuesto activo para la preparación de una composición farmacéutica para reducir la metástasis tumoral, en el que los lípidos anfifílicos son fosfolípidos.
- 5 2. Uso de lípidos anfifílicos según la reivindicación 1, en el que el fosfolípido es un fosfoglicérido y/o una fosfatidilcolina.
3. Uso de lípidos anfifílicos según la reivindicación 1 ó 2, en el que se usa un único tipo específico de lípido anfifílico o una combinación de diferentes lípidos anfifílicos para la preparación de la composición farmacéutica.
- 10 4. Uso de lípidos anfifílicos según la reivindicación 1, en el que las metástasis tumorales se reducen debido a la inhibición de la adhesión de células tumorales, debido a la inhibición de la adhesión de células metastásicas y/o la inhibición del crecimiento de metástasis tumorales.
5. Uso de lípidos anfifílicos según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las metástasis tumorales se reducen mediante tratamiento profiláctico de la recidiva intraperitoneal de tumores, específicamente tumores malignos, por ejemplo cáncer gastrointestinal, tal como cáncer gástrico, de colon o pancreático, y cáncer del sistema genitourinario tal como cáncer de ovarios o cáncer de vejiga.
- 15 6. Uso de lípidos anfifílicos según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fosfolípido se usa para el tratamiento terapéutico o profiláctico de pacientes.
7. Uso de lípidos anfifílicos según la reivindicación 6, en el que el paciente se ha sometido a resección curativa o paliativa.
8. Uso de lípidos anfifílicos según las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el paciente es un mamífero.
- 20 9. Uso de lípidos anfifílicos según la reivindicación 8, en el que el paciente es un ser humano.
10. Uso de lípidos anfifílicos según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el lípido anfifílico es un fosfolípido que está presente como una disolución acuosa que contiene del 0,05% al 25% (p/v) de un fosfolípido.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que el fosfolípido está presente como una disolución acuosa que contiene del 0,5% al 20% (p/v) de un fosfolípido.
- 25 12. Uso según la reivindicación 11, en el que el fosfolípido está presente como una disolución acuosa que contiene del 1,5% al 10% (p/v) de un fosfolípido.
13. Uso de un fosfolípido según una de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el fosfolípido se formula en una disolución para administración local, tal como instilación o inyección, preferiblemente para administración intraperitoneal.
- 30 14. Método para preparar una composición farmacéutica para reducir la metástasis tumoral, método que comprende etapas, en las que se mezclan lípidos anfifílicos como único compuesto activo con una disolución acuosa, en el que los lípidos anfifílicos son fosfolípidos.
15. Método según la reivindicación 14, en el que el fosfolípido es una fosfatidilcolina.
16. Método según la reivindicación 14, en el que los lípidos anfifílicos se dispersan en la disolución acuosa.
- 35 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que la dispersión se obtiene mediante homogeneización a alta presión.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que las metástasis tumorales se reducen debido a la inhibición de la adhesión de células tumorales, debido a la inhibición de la adhesión de células metastásicas y/o la inhibición del crecimiento de metástasis tumorales.
- 40 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que las metástasis tumorales se reducen mediante tratamiento profiláctico de la recidiva intraperitoneal de tumores, específicamente tumores malignos, por ejemplo cáncer gastrointestinal, tal como cáncer gástrico, de colon o pancreático, y cáncer del sistema genitourinario tal como cáncer de ovarios.

Figura 1

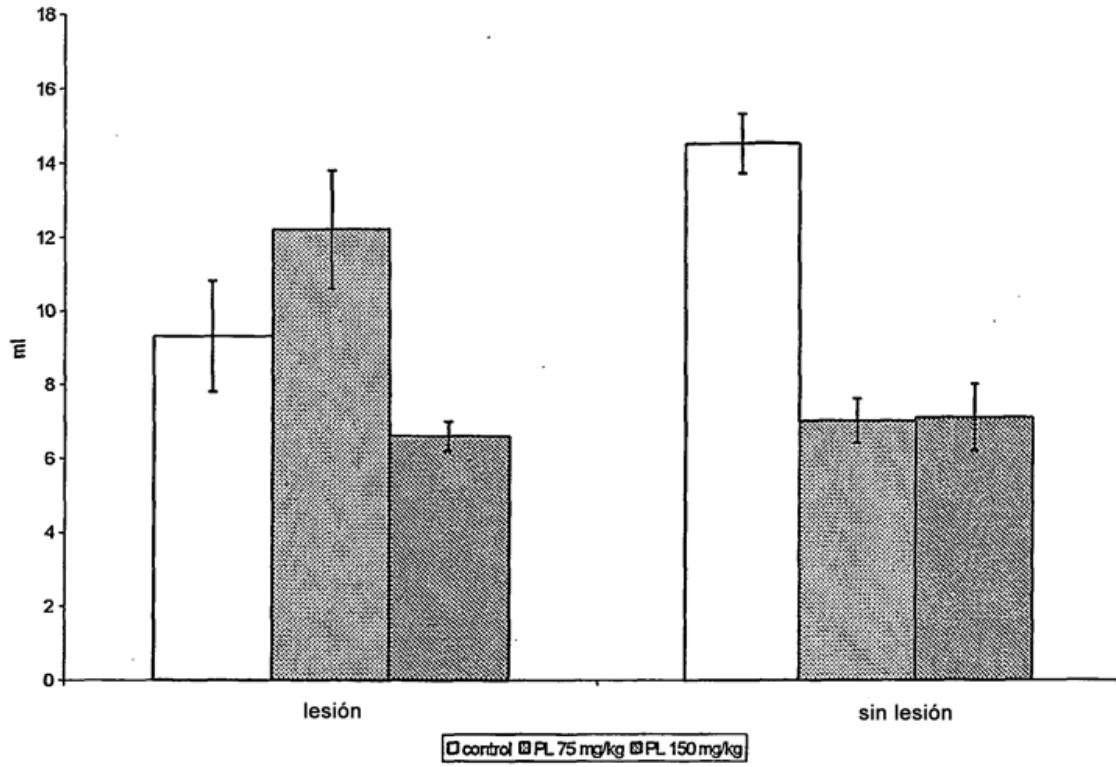


Figura 2

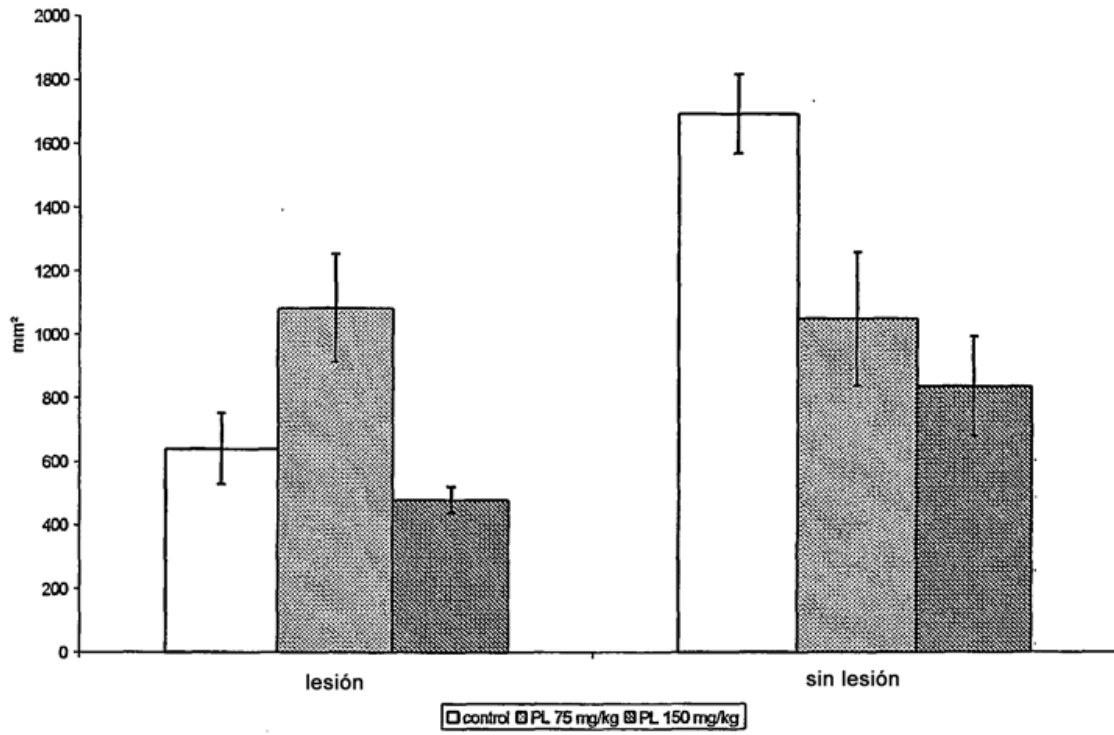


Figura 3

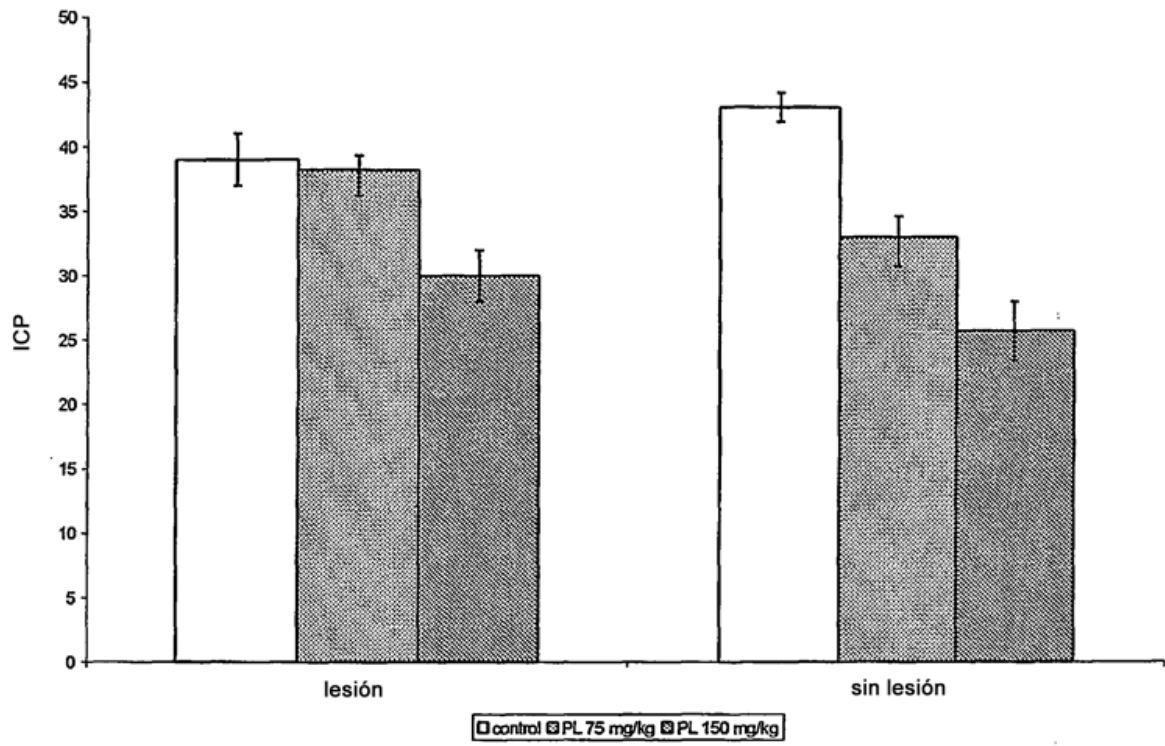


Figura 4

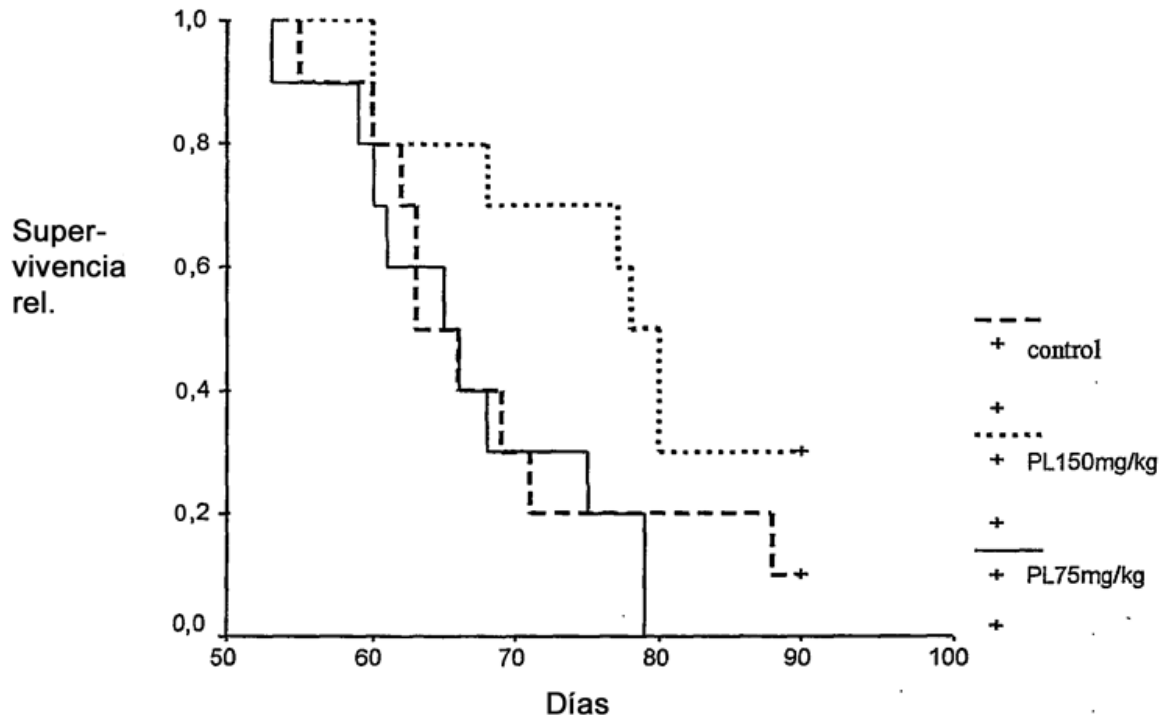


Figura 5

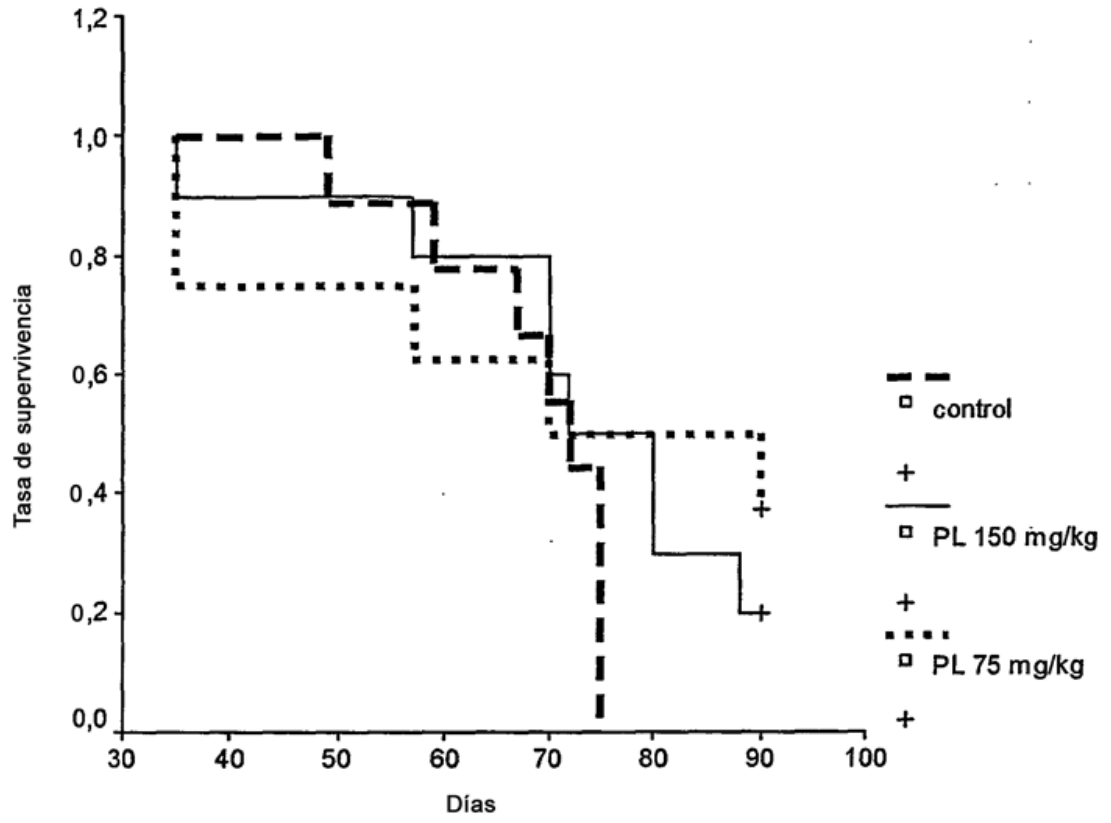


Figura 6

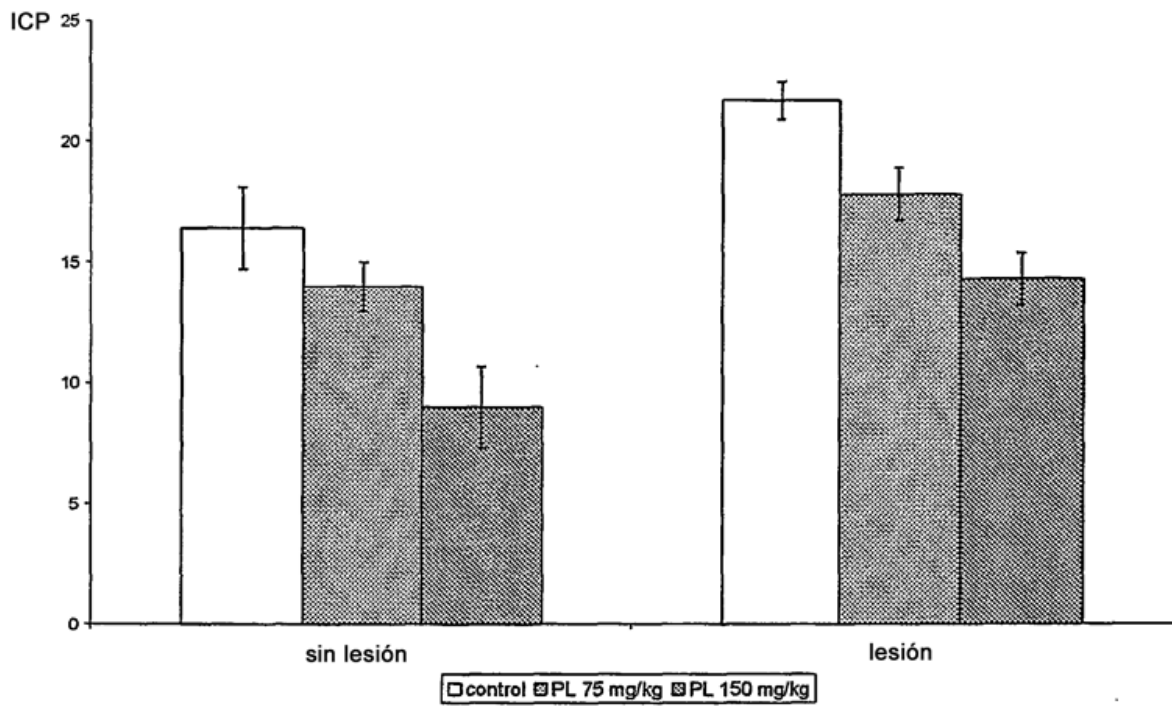


Figura 7

a



b

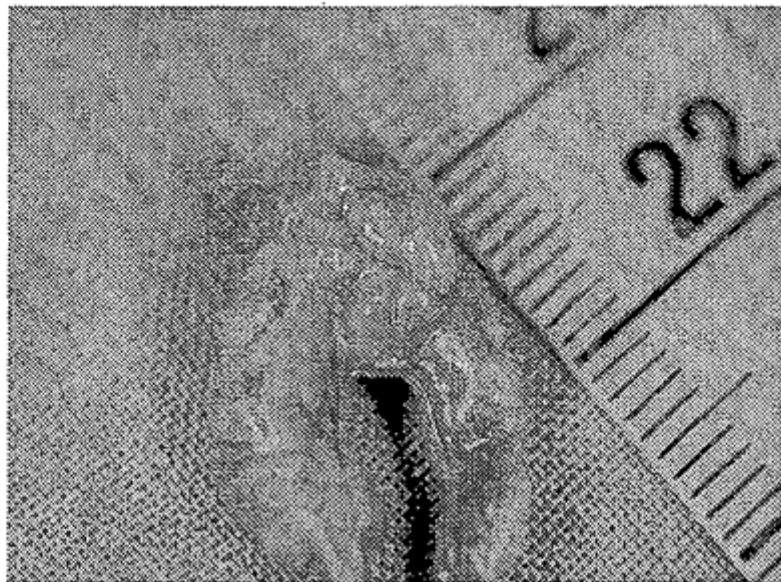


Figura 8

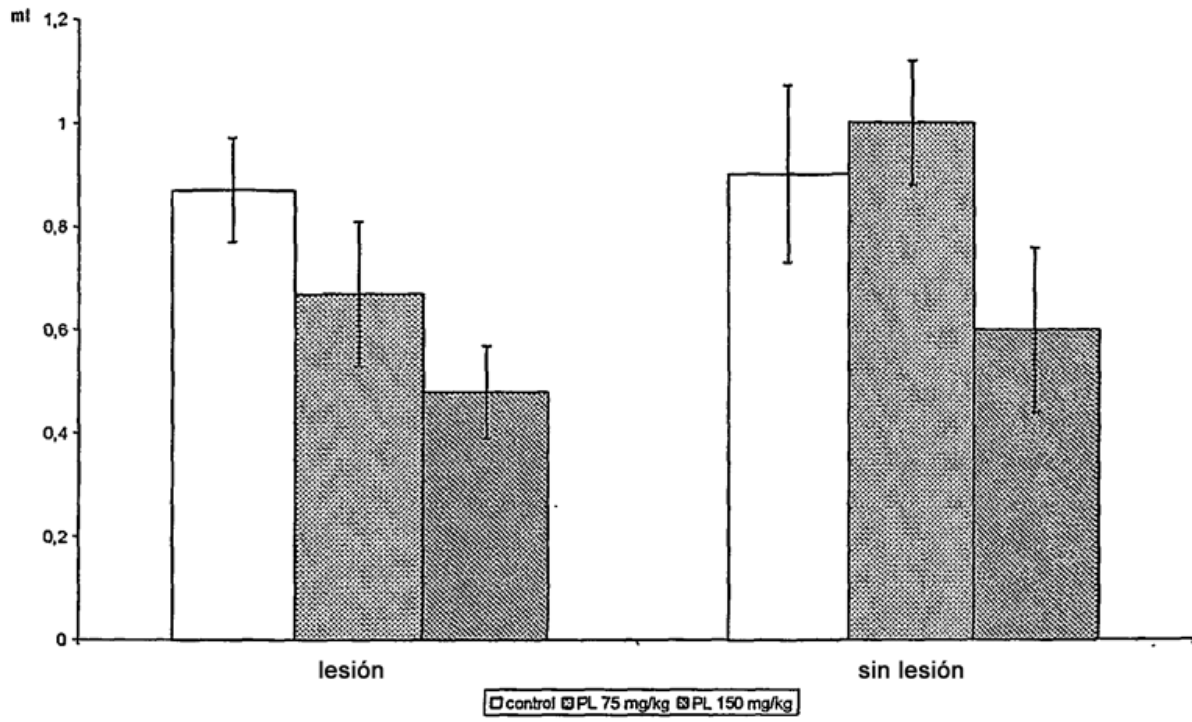


Figura 9

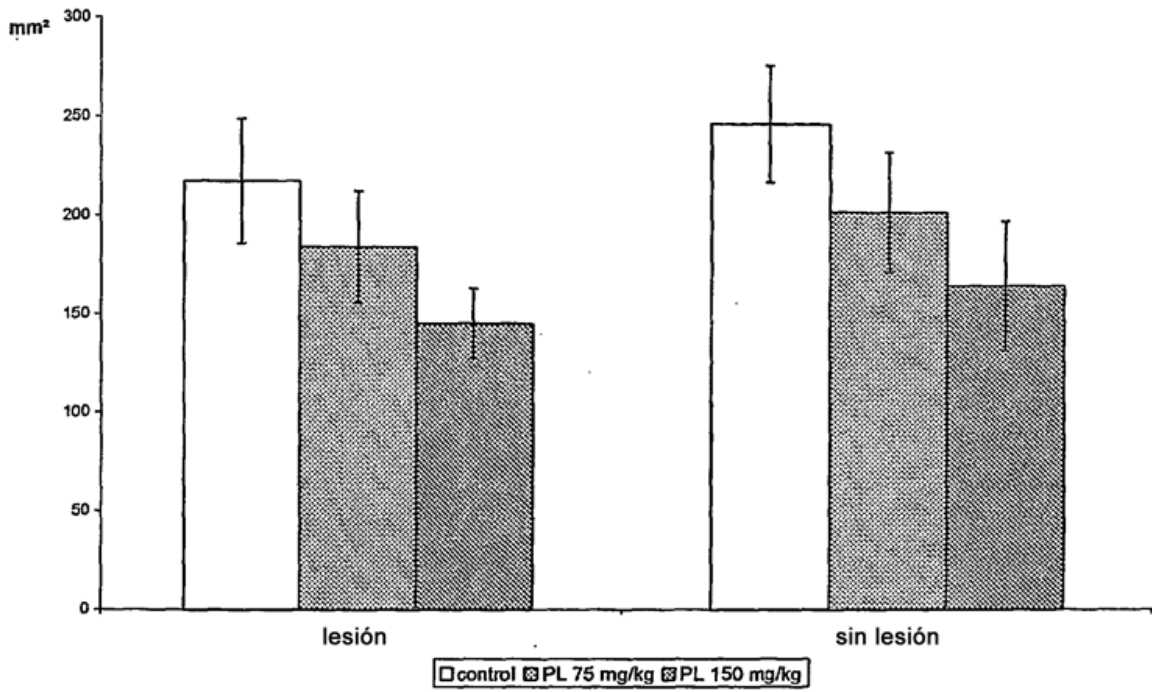


Figura 10

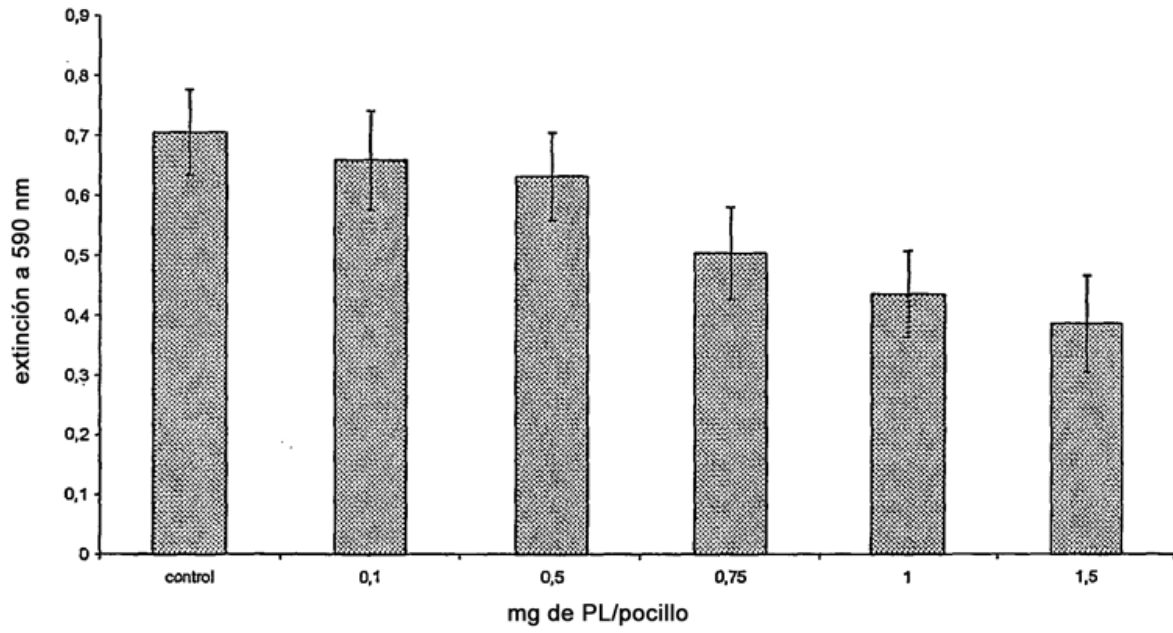


Figura 11

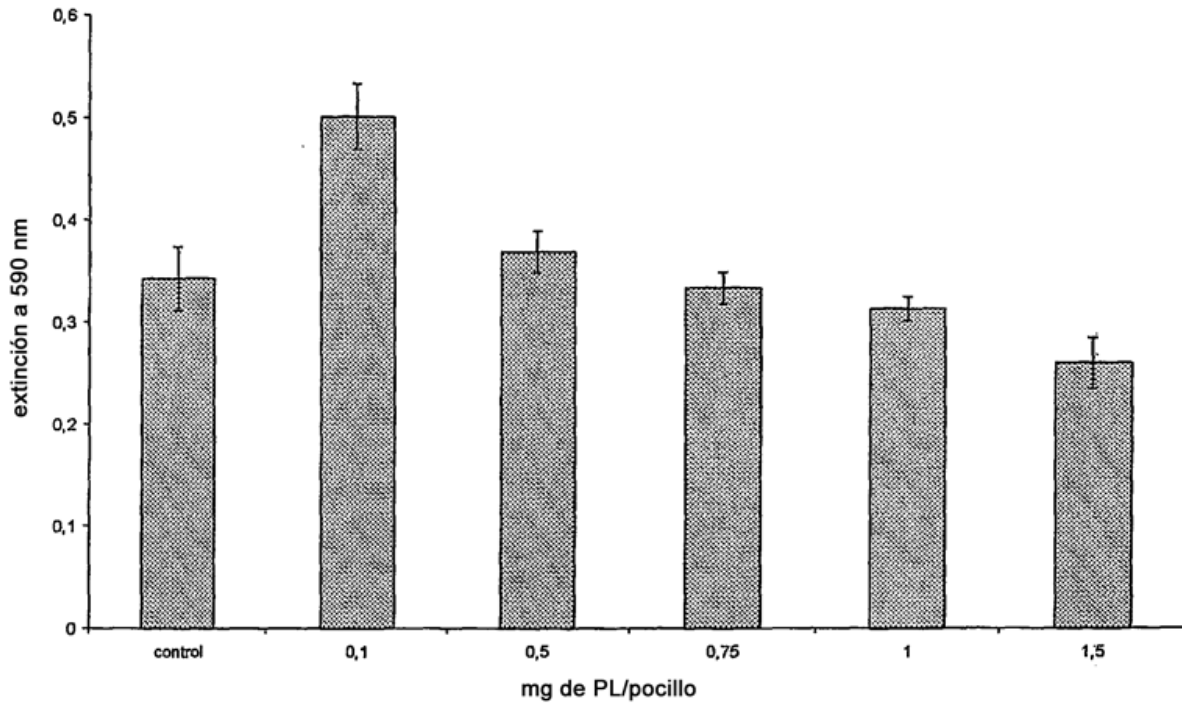


Figura 12

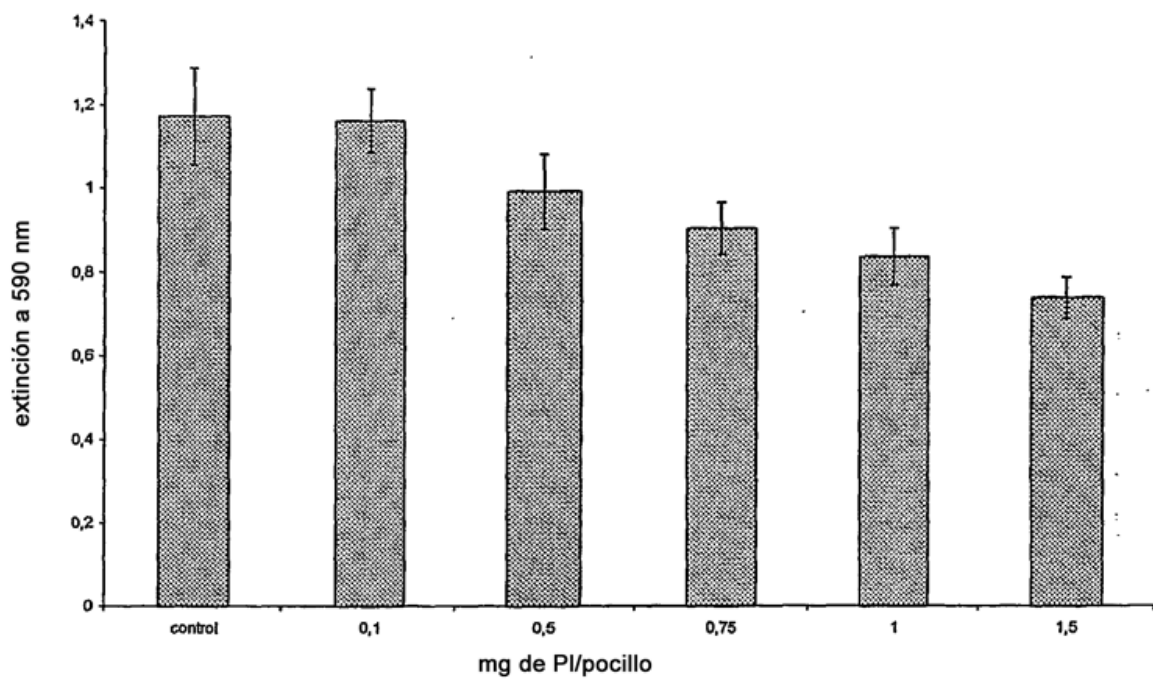
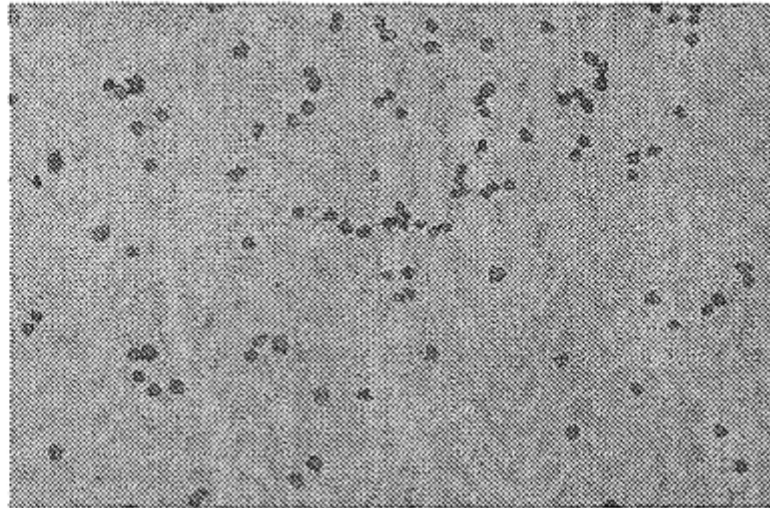


Figura 13

a



b

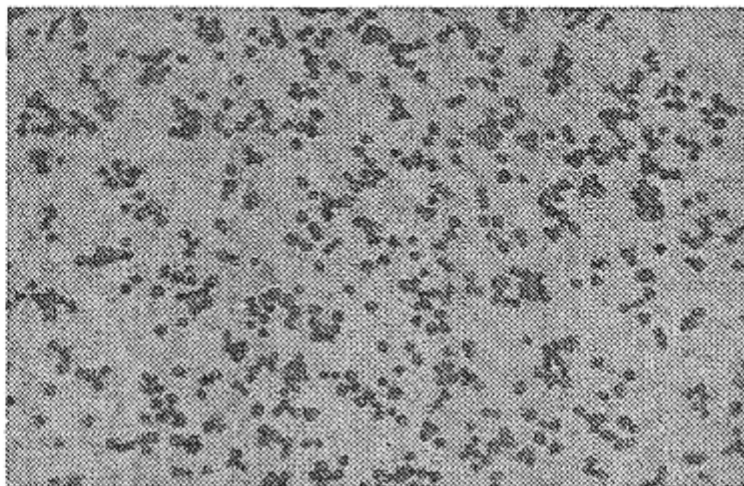


Figura 14

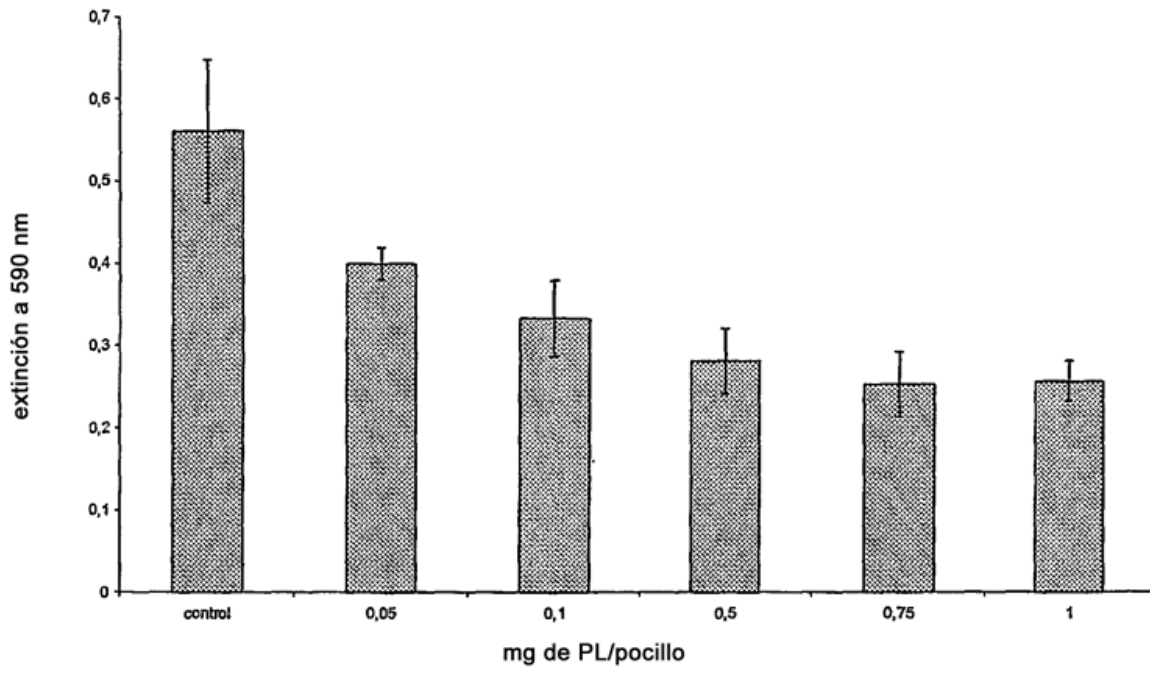


Figura 15

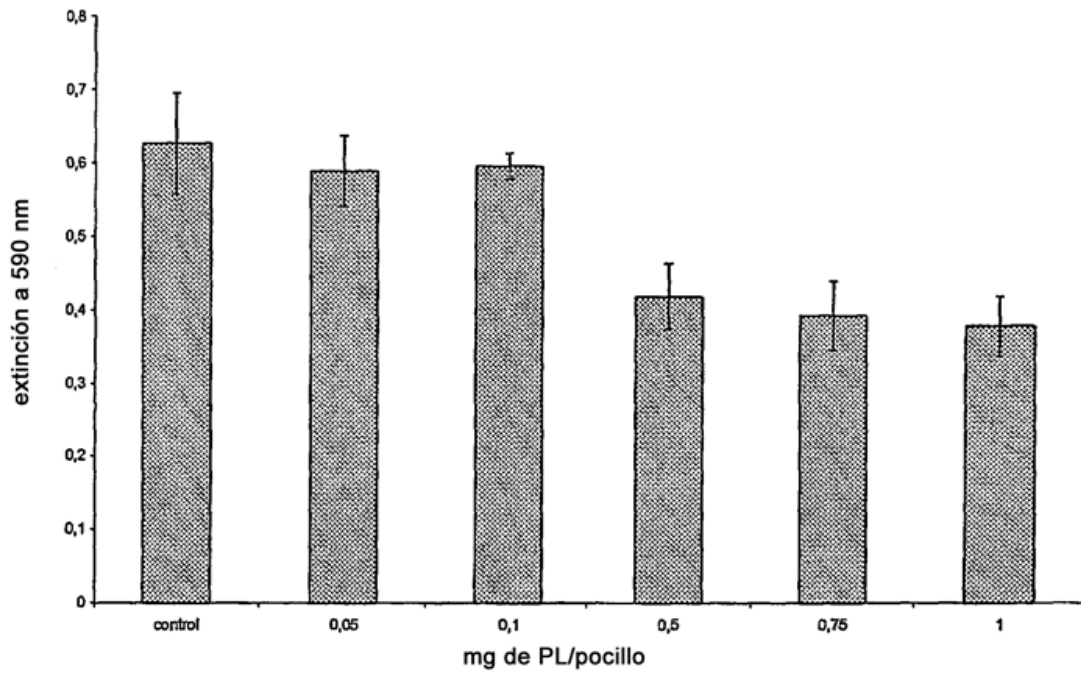


Figura 16

