

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 580**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12Q 1/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2015 PCT/EP2015/061354**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177329**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2015 E 15724627 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3146334**

54 Título: **Procedimientos para determinar si un paciente logrará una respuesta después de la radioterapia**

30 Prioridad:

**23.05.2014 EP 14305764**

**24.03.2015 EP 15305426**

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

**13.04.2020**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR;**

**UNIVERSITÉ DE NANTES (20.0%);**

**UNIVERSITÉ D'ANGERS (20.0%);**

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**

**SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%) y**

**INSTITUT DE CANCÉROLOGIE DE L'OUEST SITE**

**RENÉ GAUDUCHEAU (20.0%)**

72 Inventor/es:

**PARIS, FRANÇOIS;**

**DUBOIS, NOLWENN;**

**RIO, EMMANUEL y**

**RIPOCHE, NATACHA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 753 580 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para determinar si un paciente logrará una respuesta después de la radioterapia

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos para determinar si un paciente logrará una respuesta después de la radioterapia.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La radioterapia es uno de los tratamientos terapéuticos y paliativos contra el cáncer más comunes. Su principal limitación se debe a la resistencia intrínseca a la radiación del tumor, lo que limita su eficacia (1). Debido a la mejora de las imágenes estereotáxica con una mejor orientación de la radiación hacia el tumor. Esos aceleradores estereotáxicos están cambiando los planes de irradiación al aumentar la dosis dentro de un número limitado de fracciones (1). Si demostraron una gran eficacia en oligometástasis y tumores sólidos pequeños, estos protocolos de radioterapia hipofraccionada deben validarse para la mayoría del tipo de tumor en función de su localización y de su resistencia a la radiación.

Actualmente, la forma más común de validar la eficacia de la radioterapia se obtiene a través de la visualización del control del volumen tumoral o la regresión por tomografía computarizada o por otras técnicas de imagen no invasivas. Desafortunadamente, la respuesta del volumen tumoral se puede estimar meses después del final de la radioterapia, retrasando cualquier tratamiento alternativo. Descubrir marcadores biológicos que permitan la discriminación entre pacientes que responden y pacientes que son resistentes al tratamiento con radiación representa un problema importante para mejorar el tratamiento antitumoral.

Los biomarcadores se pueden clasificar en tres categorías: ómicas de biopsias tumorales, imágenes fenotípicas y factores secretores (2). Los marcadores tumorales por omics se obtienen esencialmente por genómica y ensayos proteómicos. Si tienen la ventaja de buscar marcadores en una gran variedad de eventos moleculares, la necesidad de biopsias tumorales limita sus estudios a la localización específica del tumor y al número de muestras. Por lo general, esos estudios se dedican a estudios de pronóstico que califican y evalúan el tratamiento. Las imágenes fenotípicas permiten evaluar algunos cambios fisiológicos en el tumor, como la hipoxia, el índice de proliferación celular, la necrosis o la infiltración de células inmunes (3). Las imágenes fenotípicas tienen la ventaja de ser no invasivas. Sin embargo, la heterogeneidad de la respuesta tumoral y la cuantificación constante de los biomarcadores moleculares siguen bajo investigación. Finalmente, los factores secretores provenientes de muestras de sangre, saliva y orina tienen la ventaja de ser fácilmente obtenibles de cualquier paciente y pueden proporcionarse antes y durante todo el tratamiento (4). Esos factores secretores pueden incluir citocinas proinflamatorias, péptidos LDL o células tumorales circulantes. Si algunos de ellos han sido investigados, ninguno de ellos ha sido validado como biomarcador de la eficacia de la radioterapia.

La ceramida esfingolípida también representa un biomarcador secretado potencial e interesante. De hecho, la ceramida es un factor proapoptótico, que se genera rápidamente en la capa externa de la membrana celular a través de la hidrólisis de la esfingomielina por esfingomielinasa ácida o neutra (respectivamente ASM y NSM), pero también en el retículo a través de una vía de síntesis *de novo* dependiente de la ceramida sintasa (5). Varios estudios demuestran la participación de la ceramida en la radiosensibilidad celular y tumoral. El tratamiento con ceramida exógena mejora la muerte celular y la regresión tumoral inducidas por radiación LNCaP (6). Del mismo modo, el aumento de la ceramida endógena a través de DL-PDMP y D-MAPP, respectivamente un inhibidor de la glucosilceramida sintasa y un inhibidor de la ceramidasa, aumenta la radiosensibilidad de Jurkat (7). Además de su participación en la muerte de las células tumorales, se han observado ceramidas en la apoptosis de células endoteliales en respuesta a la radioterapia de alta dosis que está modulando la regresión tumoral. De hecho, las células tumorales de fibrosarcoma o melanoma trasplantadas en ratones, luego irradiadas, indujeron rápidamente una apoptosis masiva de células endoteliales a través de la activación de ASM y la generación de ceramida que participan en la regresión tumoral (8). La invalidación de ASM bloquea la apoptosis de las células endoteliales y la regresión tumoral inducida por radioterapia de alta dosis.

Además de su forma intracelular, las ceramidas secretadas en el medio extracelular también juegan un papel biológico importante en los procesos fisiológicos y patofisiológicos. Se han observado altos niveles de ceramidas en plasma y suero de pacientes con varias fisiopatologías, incluido enfisema pulmonar (9), Wilson disease (10) and multiple organ failure (11). Los niveles de ceramida en plasma aumentan durante la infusión de lípidos en humanos y ratas, y en ratones obesos resistentes a la insulina (12) que puede correlacionarse con la sensibilidad a la insulina, la inflamación y el riesgo aterosclerótico. Curiosamente, la ceramida y su enzima ASM también se han cuantificado en suero de 11

pacientes con tumores macroscópicos de diferentes orígenes después de la radioterapia de rejilla fraccionada espacial (SFGRT) que incluye una primera irradiación a 15 Gy seguida de 30 fracciones de 2 Gy (13). Tres días después del tratamiento, se cuantificó un aumento de ceramidas secretadas en el suero de 5 de los 7 pacientes que respondieron a este protocolo específico de radioterapia. Sin embargo, la poca cantidad de pacientes y el origen diverso de los tumores diluyeron la fuerza de sus resultados y no permiten establecer evidencia estadística sólida sobre la correlación de la eficacia de la ceramida y la radioterapia.

Ogretmen y col: Nature, Reviews, 1 de agosto de 2004 describe que la ceramida induce respuestas antiproliferativas y apoptóticas en células cancerosas, y que la radioterapia provoca la formación de ceramidas que se acumulan en las células.

La Patente de los Estados Unidos US6.274.309 describe un procedimiento para evaluar la sensibilidad celular a la apoptosis relacionada con la esfingomielinasa en el transcurso de una exposición a estímulo de estrés por radiación. Más específicamente, US6.274.309 describe un procedimiento que se basa en la comparación de los niveles de esfingomielina y ceramida dentro de las células.

Ogretmen y col: Drug Resistance Updates, 1 de diciembre de 2001 describe que los agentes anticancerígenos causan elevación de los niveles de ceramida endógena, acompañados de muerte celular apoptótica en células cancerosas humanas.

## RESUMEN DE LA INVENCIÓN:

La presente invención se refiere a procedimientos para determinar si un paciente logrará una respuesta después de la radioterapia. En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN:

El descubrimiento de marcadores biológicos de regresión tumoral inducida por radiación ionizante permitirá una mejor discriminación entre los pacientes que responden y los que son resistentes a la radioterapia. En esta presente invención, los inventores estudiaron la capacidad de las ceramidas plasmáticas, un esfingolípido bioactivo proapoptótico conocido, para correlacionarse con el control del tumor en un estudio clínico de fase II que combina radioterapia hipofraccionada e irinotecán en metástasis hepáticas y pulmonares. Las metástasis hepáticas y pulmonares fueron tratadas de hecho con 4 veces 10 Gy en los días 1, 3, 7 y 10 combinados a 40 mg/m<sup>2</sup> de irinotecán en los días 1 y 7. El plasma de los pacientes se recogió antes del primer tratamiento y después del segundo y cuarto tratamientos. Después de la extracción de lípidos, las ceramidas se cuantificaron por LC-MS/MS y se correlacionaron con la respuesta tumoral inducida por radiación. Primero, se midió la concentración de ceramida plasmática antes de la irradiación y no se encontró que estuviera relacionada con la respuesta potencial a la radioterapia. Luego, el valor de las concentraciones de ceramida se midió en el día 3 o 10 contra la línea base no irradiada. Las concentraciones de ceramida en pacientes que respondieron a la radioterapia aumentaron significativamente en comparación con los pacientes que no respondieron. Finalmente, se estimó la evaluación de las diferentes subclases de ceramidas (en función del número de carbonos de las cadenas de ácidos grasos) y se demostró que las 4 subespecies principales de ceramidas (C16, C22, C24 y C24:1) también aumentaron en respondedores en comparación con los no respondedores. En este presente estudio, los inventores demuestran que la elevación de las ceramidas secretadas en el plasma está correlacionada con la eficacia del tratamiento hipofraccionado.

Por consiguiente, un primer objetivo de la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar si un paciente que padece un cáncer logrará una respuesta después de radioterapia que comprende las etapas de i) determinar el nivel de ceramida en una primera muestra de sangre obtenida del paciente antes de la radioterapia, ii) determinar el nivel de ceramida en una segunda muestra de sangre obtenida del paciente durante o inmediatamente después de la radioterapia, iii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con el nivel determinado en la etapa ii), y iv) concluir que el paciente alcanzará una respuesta cuando el nivel determinado en la etapa ii) sea más alto que el determinado en la etapa i) o concluir que el paciente no alcanzará una respuesta cuando el nivel determinado en la etapa ii) sea inferior al nivel determinado en la etapa i).

Los cánceres a tratar incluyen tumores primarios y tumores metastásicos. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse incluyen, entre otros, células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mamas, colon, esófago, gastrointestinal, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfopitelial; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma

- hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquiolo-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares;
- 5 adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical adrenal; carcinoma endometroide; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma
- 10 lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecoma, maligno; tumor de células granulosas, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma
- 15 de extensión superficial; melanoma maligno en nevo gigante pigmentado; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomyosarcoma; rhabdomyosarcoma embrionario; rhabdomyosarcoma alveolar; sarcoma del estroma; tumor mixto, maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filodes, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma
- 20 embrionario; teratoma, maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes óseas; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma;
- 25 astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemmoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide;
- 30 otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia leucemia de células de linfoma; leucemia mielóide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mielóide y tricoleucemia.
- 35 El término "**radioterapia**" tiene su significado general en la técnica y se refiere al tratamiento del cáncer con radiación ionizante. La radiación ionizante deposita energía que daña o destruye las células en el área a tratar (el tejido diana) al dañar su material genético, haciendo imposible que estas células continúen creciendo. Un tipo de radioterapia comúnmente utilizada involucra fotones, *por ejemplo*, rayos X. Dependiendo de la cantidad de energía que poseen, los rayos se pueden usar para destruir las células cancerosas en la superficie o más profundamente en el cuerpo.
- 40 Cuanto mayor es la energía del haz de rayos X, más profundos pueden llegar los rayos X al tejido diana. Los aceleradores lineales y los betatrones producen rayos X de energía cada vez mayor. El uso de máquinas para enfocar la radiación (como los rayos X) en un sitio de cáncer se llama radioterapia de haz externo. Los rayos gamma son otra forma de fotones utilizados en radioterapia. Los rayos gamma se producen espontáneamente a medida que ciertos elementos (como el radio, el uranio y el cobalto 60) liberan radiación a medida que se descomponen o se desintegran.
- 45 En algunas realizaciones, la radioterapia es una radioterapia externa. Los ejemplos de radioterapia externa incluyen, entre otros, radioterapia de haz externo convencional; radioterapia conformada tridimensional (3D-CRT), que proporciona haces conformados para ajustarse estrechamente a la forma de un tumor desde diferentes direcciones; radioterapia de intensidad modulada (IMRT), *por ejemplo*, tomoterapia helicoidal, que da forma a los haces de radiación para que se ajusten estrechamente a la forma de un tumor y también altera la dosis de radiación según la
- 50 forma del tumor; radioterapia conformada por haz de protones; radioterapia guiada por imagen (IGRT), que combina tecnologías de exploración y radiación para proporcionar imágenes en tiempo real de un tumor para guiar el tratamiento por radiación; radioterapia intraoperatoria (IORT), que administra radiación directamente a un tumor durante la cirugía; radiocirugía estereotáctica, que administra una dosis de radiación grande y precisa a un área tumoral pequeña en una única sesión; radioterapia hiperfraccionada, *por ejemplo*, radioterapia acelerada hiperfraccionada continua (CHART),
- 55 en la que se administra más de un tratamiento (fracción) de radioterapia a un sujeto por día y radioterapia hipofraccionada, en la que se administran dosis más grandes de radioterapia por fracción pero menos fracciones.
- En algunas realizaciones, el procedimiento de la presente invención es particularmente adecuado en el contexto de una radioterapia hipofraccionada. Como se usa en este documento, el término "**radioterapia hipofraccionada**" tiene
- 60 su significado general en la técnica y se refiere a la radioterapia en la que la dosis total de radiación se divide en grandes dosis y los tratamientos se administran menos de una vez al día.

Típicamente, un curso de tratamiento comprende 1, 2, 3, 4 o 5 regímenes de radiaciones ionizantes. En algunas realizaciones, el régimen de radiaciones ionizantes se combina con la administración de al menos un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico incluye aquellos compuestos con actividad anticancerígena, *por ejemplo*, compuestos que inducen apoptosis, compuestos que reducen el tiempo de vida o compuestos que hacen que las células sean sensibles al estrés e incluyen, entre otros, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, asparaginasa, BEG, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfan, campotecina, capecitabina, carboplatin, carmustine, clorambucil, cisplatino, cladribina, clodronato, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomycin, daunorubicin, dienestrol, dietilstilbestrol, docetaxel, doxorubicin, epirubicin, estradiol, estramustina, etoposida, exemestane, filgastrim, fludarabine, fludrocortisona, fluorouracil, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, genisteína, goserelina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, interferón, irinotecan, ironotecán, letrozol, leucovorina, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, nocodazol, octreotida, oxaliplatin, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfímero, procarbazona, raltitrexed, rituximab, estreptozocina, suramina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tioguanina, tiotepa, titanoceno dicloruro, topotecan, trastuzumab, tretinoína, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

En algunas realizaciones, el protocolo de radioterapia se realiza en el paciente como se describe en la **Figura 1**. Brevemente, 4 sesiones de 10 Gy (dosis total: 40 Gy) se extendieron durante 2 semanas en los días 1, 3, 8 y 10 usando un dispositivo acelerador estereotáxico Novalis. Una dosis de 40 mg/m<sup>2</sup> irinotecan (Pfizer) en 250 mL de solución salina fisiológica o glucosa isotónica se inyectó por vía intravenosa 30 a 90 minutos antes de la primera y tercera sesión de radioterapia. En esta realización, la segunda muestra de sangre se obtiene el día 3.

Por "**muestra de sangre**" se entiende un volumen de sangre entera o fracción de la misma, *por ejemplo*, suero, plasma, etc.

Como se usa aquí, el término "**ceramida**" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier *N*-acilsfingosina. Las ceramidas incluyen esfingolípidos en los que la esfingosina se acila con un derivado de acil-CoA de ácido graso para formar una *N*-acilsfingosina. Típicamente, la cadena de carbono está saturada o insaturada. Además, la cadena de carbono comprende 16, 18, 20, 22 o 24 carbonos. En algunas realizaciones, la cadena de carbono es una cadena de carbono C16, C16:1, C18, C18:1, C20, C20:1, C22, C22:1, C24 o C24:1.

Los procedimientos para determinar el nivel de ceramidas en muestras biológicas son conocidos en la técnica, por ejemplo, según se muestra en Kasumov y col. (2010. Anal. Biochem. 401(1):154-161) o Hu y col. (2009. J Lipid Res. 50, 1852-1862). Típicamente, los análisis cuantitativos de ceramidas se realizan mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un espectrómetro de masas. Los inmunoensayos también son posibles y generalmente implican poner en contacto la muestra de sangre con un anticuerpo a ceramida, en condiciones efectivas para permitir la formación de inmunocomplejos. A este respecto, el experto en la técnica podrá evaluar el nivel de ceramidas en la muestra de sangre.

En algunas realizaciones, se determina el nivel de ceramidas totales. En algunas realizaciones, se determina el nivel de al menos una subespecie de ceramida. En algunas realizaciones, la subespecie se selecciona del grupo compuesto por ceramidas C16, C16:1, C18, C18:1, C20, C20:1, C22, C22:1, C24 o C24:1. En algunas realizaciones, se determina el nivel de ceramidas C24.

El procedimiento de la presente invención es particularmente adecuado para discriminar respondedores de no respondedores. Como se usa en el presente documento, el término "**respondedor**" en el contexto de la presente divulgación se refiere a un paciente que logrará una respuesta, *es decir*, un paciente en quien el cáncer es erradicado, reducido o mejorado. Según la invención, los respondedores tienen una respuesta objetiva y, por lo tanto, el término no abarca a los pacientes que tienen un cáncer estabilizado de modo que la enfermedad no progresa después de la radioterapia. Un paciente no respondedor o resistente incluye pacientes en quienes el cáncer no muestra reducción o mejoría después de la radioterapia. Según la invención, el término "**no respondedor**" también incluye pacientes que tienen un cáncer estabilizado. Típicamente, la caracterización del paciente como respondedor o no respondedor se puede realizar por referencia a un conjunto estándar o de entrenamiento. El estándar puede ser el perfil de un paciente que se sabe que responde o no responde o, alternativamente, puede ser un valor numérico. Dichos estándares predeterminados se pueden presentar en cualquier forma adecuada, como una lista o diagrama impreso, un programa de software de ordenador u otros medios. Cuando se concluye que el paciente es un no respondedor, el médico podría tomar la decisión de suspender el protocolo de radioterapia para evitar otros efectos secundarios adversos.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las figuras y ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

## FIGURAS

**Figura 1. Plan de tratamiento del protocolo clínico de la fase II que combina SBRT con irinotecan.** Se aplicaron irradiaciones (10 Gy) en D1, D3, D7 y D10. Se administró irinotecán (40 mg/m<sup>2</sup>) en D1 y D7. Se recogieron muestras de sangre antes del tratamiento (D0) y después de la segunda y cuarta irradiación (D3 y D10).

5

**Figura 2. La variación de Cer total durante el tratamiento se correlaciona con la respuesta tumoral.** **A:** Relación de concentración de Cer en D3 y D10 vs D0 en respondedor completo (CR), respondedor parcial (PR), estabilización tumoral (S) y grupos de progresión (P). **B:** Relación de la concentración de Cer en D3 y D10 vs D0 en el grupo de respuesta tumoral (CR, PR y S) en comparación con el grupo de progresión tumoral (P). **C:** Relación de la concentración de Cer en D3 y D10 vs D0 en el grupo de reducción del tumor (CR, PR) en comparación con el grupo donde los tumores no retrocedieron (S, P). Las mediciones se realizaron por triplicado (Número de pacientes entre paréntesis, media ± SEM, ns = P > 0,05, \* = P < 0,05).

**Figura 3. La evolución de las principales subespecies de Cer durante el tratamiento se correlaciona con la respuesta tumoral.** Relación de C16:0 (**A**), C22:0 (**B**), C24:0 (**C**) y C24:1 Cer (**D**) concentraciones en D3 y D10 vs D0 en el grupo de respuesta objetiva (CR, PR) en comparación con el grupo resistente (S, P). Las mediciones se realizaron por triplicado (Número de pacientes entre paréntesis, media ± SEM, ns = P > 0,05, \* = P < 0,05).

**Figura 4. El nivel de Cer basal no se correlaciona con el resultado de la radioterapia.** Cer de plasma basal se midió en pacientes respondedores y resistentes y la población sana se realizó por triplicado (media ± SEM, ns = P > 0,05, \* = P < 0,05).

**Figura 5. La clasificación de la variación de Cer agrupa a los pacientes según su respuesta tumoral.** CER aumenta y disminuye en D3 y D10, respectivamente, se representan en rojo y verde, donde la mediana igual a 0 está en negro. La posición de cada paciente en la jerarquía se presenta después del análisis de la agrupación 3.0 y la visualización de la vista de árbol según la respuesta del tumor al tratamiento (CR, PR, S, P).

**Figura 6. La modulación de Cer durante el tratamiento discrimina el control del tumor en función del tiempo.** Las curvas de Kaplan-Meier para pacientes sin empeoramiento del volumen tumoral en función del tiempo se muestran para pacientes con un aumento o disminución de Cer en D3 (**A**) y D10 (**B**). El número de pacientes está entre paréntesis. P < 0,05 entre grupos Cer aumenta y Cer disminuye para ambas figuras.

## EJEMPLO

### 35 Material y Procedimientos

#### *Criterios de selección de pacientes y seguimiento*

Un estudio clínico multicéntrico de fase II con SBRT e irinotecán concomitante para adenocarcinoma colorrectal y metástasis hepáticas y pulmonares recidivantes de fluorouracilo (5-FU) con o sin eloxatina o irinotecán, fue realizado de 2008 a 2013 entre 3 centros de oncología franceses (Nantes, Lyon y Lille). Se seleccionaron pacientes (edad media: 64 años; intervalo: 32-80 años), con una esperanza de vida de más de 6 meses y con metástasis hepáticas y/o pulmonares inoperables o recurrentes después de la cirugía. Las metástasis deben ser medibles con el diámetro más grande por debajo o igual a 6 cm. La suma del diámetro máximo de metástasis múltiples debe ser inferior o igual a 6 cm. El volumen diana clínico (CTV) debe ubicarse más de 12 mm lateralmente o 15 mm en la dirección cráneo-caudal del estómago, el intestino delgado, el esófago, la tráquea y las arterias pulmonares.

Los pacientes deben tener un grupo adecuado de células hematológicas (más de 1,5x10<sup>9</sup> glóbulos blancos, 10<sup>11</sup> plaquetas y 90 g/L de hemoglobina) y funciones hepáticas y renales adecuadas (bilirrubina sérica inferior a 1,5 veces y transaminasa y fosfatasa alcalina menos de 5 veces por encima del límite superior de lo normal). Los criterios de exclusión se definieron como un índice de desempeño según la escala de la Organización Mundial de la Salud (OMS) mayor a 2, irradiación toraco-abdominal previa, una contraindicación para irinotecan previa (dentro de los 5 años) o tratamiento concomitante de un cáncer invasivo, enfermedad metastásica difusa, o más de 3 metástasis. Todos los comités de ética institucional aprobaron el protocolo y se obtuvieron consentimientos informados firmados de todos los pacientes.

#### *Tratamiento y recogida de plasma.*

El protocolo de tratamiento completo se describe en la **Figura 1**. Brevemente, se distribuyeron 4 fracciones de 10 Gy en los días (D) 1, 3, 8 y 10 utilizando dispositivos aceleradores estereotácticos Novalis (Brain Lab, Feldkirchen, D) o Cyberknife (Accuray, Sunnyvale, CA). Cualquiera que sea el tipo de acelerador, el 99 % de CTV estaba comprendido por el 75-95 % de isodosis correspondiente a una dosis de 42 a 53 Gy en el centro. 40 mg/m<sup>2</sup> irinotecan (Pfizer, Nueva

York, NY) se inyectó por vía intravenosa 30 a 90 minutos antes de la primera y tercera sesiones de radioterapia. Debido a la ausencia de toxicidad, los 35 pacientes recibieron el tratamiento completo. Se recogieron 20 ml de sangre en tubos con citrato antes de la primera (D0) y después de la segunda (D3) y la cuarta (D10) irradiaciones, luego se almacenaron a 4°C durante 30 minutos. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos a 4°C para recuperar el plasma. Las alícuotas de plasma se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Se recolectó sangre completa de donantes sanos de más de 45 años en el instituto de sangre francés (EFS, Nantes, F), para recuperar el plasma utilizando el mismo protocolo que se describió anteriormente.

### **Criterios de respuesta**

La respuesta tumoral al protocolo se evaluó utilizando RECIST 1.1 (Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos) en la tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía por emisión de positrones y tomografía computarizada (PET/CT) (Eisenhauer y col., 2009. Eur J Cancer. 45(2):228-47). La primera evaluación se realizó 6-8 semanas después del final del tratamiento, luego a los 3, 6 y 12 meses. Una respuesta completa (CR) se definió por la desaparición completa de todas las lesiones. Una respuesta parcial (PR) y una progresión (P) se caracterizaron respectivamente por una reducción mayor del 30 % y un aumento mayor del 20 % de los diámetros más grandes de cada lesión. La estabilidad (S) se declaró cuando la reducción o progresión tumoral fue, respectivamente, insuficiente para definir una PR o una P.

### **Análisis de Cer**

#### *Material*

Estándares ultrapuros de subespecies de Cer (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C20:0, C24:0 y C24:1) y Cer no natural C17:0 utilizados como estándar interno (IS) fueron comprados de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Se adquirieron metanol de grado UPLC y solventes orgánicos de grado analítico de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

#### *Extracción*

Cuarenta microlitros de 1 µM C17 Cer se agregaron a cada muestra. La extracción de lípidos se realizó en dos etapas con modificaciones menores de los procedimientos descritos anteriormente (Hara y Radin, 1978). La primera extracción se realizó mediante la adición de 1,5 mL de mezcla de hexano/propan-2-ol (60:40, V/V) en 100 µL de plasma. La muestra se sometió a vórtice, se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos a 4°C y se recogió la fase superior. Luego se realizó una segunda extracción con 1,5 mL de metanol. Después de la homogeneización y centrifugación a 8000 g durante 5 minutos a 4°C, se recogió la fase superior, se combinó con la primera, se secó bajo nitrógeno a temperatura ambiente y se resuspendió en 150 µL de hexano/propan-2-ol (60:40 v/v).

#### *Purificación*

La purificación del extracto lipídico se optimizó a partir de un procedimiento anterior (Bodennec y col., 2000). Brevemente, las muestras se cargaron en cartuchos de LC-NH<sub>2</sub> (Interchim, Montluçon, F) preacondicionados con 2 ml de hexano. El cartucho de 100 mg se lavó con 1,4 mL de etil acetato-hexano 15:85 (v/v) eluyendo lípidos neutros en una sola fracción. Un segundo lavado con 1,6 mL de cloroformo/metanol 23:1 (v/v) eluyó Cer libre. La fracción de Cer se secó bajo nitrógeno y se redisolvió en 300 µL de MeOH que contenían 10 mM de acetato de amonio del grado más alto (Fluka, Buchs, CH) y ácido fórmico al 0,2 %. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

#### *Análisis de espectrometría de masas*

Fracciones de Cer purificadas se analizaron por LC-ESI-MS/MS en un sistema UPLC Acquity H-Class combinado con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQD (Waters Corporation, Milford, CT). La separación cromatográfica en gradiente se realizó en una columna Waters C18 BEH (2,1 mm x 50 mm) con un tamaño de partícula de 1,8 µM equipada con un prefiltro de 0,5 µM. El calentador de columna se ajustó a 43°C. Las fases móviles consistieron en agua MilliQ que contenía ácido fórmico al 0,2 % y acetato de amonio 10 mM (Eluyente A) y metanol que contenía ácido fórmico al 0,2 % y acetato de amonio 10 mM (Eluyente B). El volumen de inyección fue de 5 µl. Las Cer purificadas se eluyeron en 4 minutos con un gradiente lineal hasta el 98 % del Eluyente B. Antes de la siguiente corrida, se realizó un reequilibrio de 4,00 a 4,10 minutos y una estabilización de 4,10 a 6 minutos con el 95 % de eluyente B. El flujo se ajustó a 0,6 mL/min. Todos los análisis se realizaron usando ionización por electropulverización en el modo de iones positivos con monitoreo de reacciones múltiples (MRM). La medición y el análisis de datos fueron recolectados por el software Mass-Lynx versión 4.1. La integración y cuantificación se realizaron utilizando el software Waters Target Links™.

#### *Análisis estadístico y agrupamiento de datos.*

Se realizaron tres mediciones independientes por muestra de paciente. La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon y el ANOVA con una estimación de confianza del 95 % se realizaron con el paquete StatView 6.0. Para la agrupación jerárquica, las relaciones Cer entre D3 o D10 y D0 se estimaron según el perfil de expresión de otros pacientes (Eisen y col., 1998) por agrupación 3.0 y mostrado por Java TreeView (ambos softwares, <http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>). La independencia de cada grupo se probó mediante la prueba de chi cuadrado. La probabilidad de control tumoral en función del tiempo en pacientes con un aumento o disminución de ceramida se obtuvo mediante el método de Kaplan-Meier (Kaplan, 1958) y en comparación con la prueba de log-rank, que da intervalos de confianza (CI) del 95 %. El valor pronóstico de las variables (sexo, edad, ubicación y volumen del tumor) se calculó utilizando el modelo de regresión multivariante de Cox (Cox, 1972).

10

## **Resultados**

### ***La variación de Cer totales durante el tratamiento se correlaciona con la respuesta tumoral.***

15 La concentración de Cer de plasma se monitorizó por LC-ESI-MS/MS durante el protocolo SBRT con irinotecan, en D3 y D10 y luego, en comparación con el nivel basal, en D0 (**Figura 2**). Primero, no se mostró correlación entre el nivel de aumento de Cer en D3 y D10 después de SBRT con irinotecan y cualquier factor de covarianza (sexo, edad, ubicación del tumor y volumen del tumor; datos no mostrados). Luego, se monitorizó el aumento medio de la concentración de Cer en los diferentes grupos de pacientes en función de su respuesta tumoral (**Figura 2A**). Un año  
20 después del tratamiento, se observó CR en 10, PR en 8, S en 8 y P en 9 pacientes. Observamos que la respuesta a la dosis de Cer en D3 y D10 se correlacionó con la eficacia del tratamiento. La cantidad total de Cer aumentó significativamente en D3 en plasma de pacientes que exhibían una disminución del volumen del tumor (CR: 18,5 % ± 8,92, P < 0,05 y PR: 10,7 % ± 2,27; P < 0,01; ambos vs D0). En contraste, la Cer total en el grupo S se mantuvo estable en D3, luego disminuyó significativamente en D10 (D3: -1,70 % ± 4,36; P > 0,05 y D10: -15 % ± 2,40; ambos  
25 P < 0,01 vs D0) y estaba por debajo del nivel basal para el grupo P (D3: -19,06 % ± 5,72; P < 0,05 y D10: -20,16 % ± 3,71; ambos P < 0,01 vs D0).

Debido a que la detención del crecimiento tumoral es un sello distintivo de la respuesta al tratamiento, primero decidimos determinar una posible correlación entre los respondedores, incluyendo los grupos CR, PR y S, y los  
30 pacientes resistentes incluyendo el grupo P (**Figura 2B**). El nivel de Cer total de este grupo de respuesta (CR, PR y S) fue significativamente mayor en comparación con el nivel basal en D3 (9,91 % ± 3,99; P < 0,05 vs D0), pero no a D10. Curiosamente, el nivel de Cer total de este grupo resistente (P) disminuyó significativamente en D3 y D10 en comparación con la tasa basal (D3: -19,06 % ± 5,72; P < 0,05 vs D0; y D10: -20,17 % ± 3,71; P < 0,01 vs D0). Como se propuso en el presente estudio clínico de fase II, CR y PR se definieron como la respuesta objetiva donde S y P se  
35 consideraron resistentes al tratamiento (**Figura 2C**). Un año después del tratamiento, 18/35 pacientes mostraron una respuesta objetiva, mientras que 17/35 pacientes se consideraron resistentes, debido a la estabilización o progresión del tumor o la aparición de nuevas metástasis pulmonares o hepáticas. Usando este grupo de clasificación, el nivel de Cer total del grupo respondedor objetivo fue significativamente mayor en comparación con el grupo objetivo de nivel de Cer basal en D3 (15,07 % ± 5,02; P < 0,01 vs D0), y significativamente menor para el grupo resistente en D3 y D10  
40 (D3: -9,79 % ± 4,12; P < 0,05 vs D0 y D10: -17,95 % ± 2,27; P < 0,01 vs D0). El aumento de la concentración de Cer plasmática durante el SBRT combinado con irinotecán representa un punto final prometedor que para muchos sirve como un presagio de regresión tumoral. Por otro lado, la disminución de la concentración de Cer plasmática se asocia con la falta de respuesta tumoral del tratamiento.

45 *La evolución de las principales subespecies de Cer durante el tratamiento se correlaciona con la respuesta tumoral.*

Se han buscado doce subespecies de Cer para caracterizar más específicamente la composición de la Cer total. Los compuestos más abundantes fueron los que contenían el ácido graso C24:0 (45,46 % ± 1,06), C24:1 (23,43 % ± 0,90), C22:0 (15,74 % ± 0,34) y C16:0 (7,10 % ± 0,39). Los otros compuestos estaban presentes en cantidades muy  
50 pequeñas (Figura S1). Debido a una posible discrepancia de su respuesta al tratamiento, esas subespecies principales de Cer se cuantificaron por separado, en comparación con su nivel basal en D0 y se correlacionaron con la respuesta tumoral (**Figuras 3A a D**). De hecho, los niveles de estas 4 subespecies siguieron un perfil similar al de los niveles totales de Cer durante el tratamiento. La proporción de C24:0 Cer, el compuesto más abundante, aumentó significativamente en el grupo respondedor objetivo de 11,9 % ± 5,17 en D3 (P < 0,05 vs D0). Estas subespecies  
55 disminuyeron significativamente en el grupo resistente de -11,08 % ± 4,33 en D3 y -19,19 % ± 2,39 en D10 (ambas P < 0,05 vs D0). Las otras tres subespecies principales de Cer exhibieron cambios significativos similares en sus proporciones como se observó para C24:0 Cer. Estos resultados establecen que todas las principales subespecies de Cer plasmática, así como la Cer total, están evolucionando siguiendo un patrón de cambio similar después de SBRT combinado con irinotecán, con niveles crecientes correlacionados con la respuesta tumoral.

60

*El nivel de Cer basal no se correlaciona con el resultado de la radioterapia.*

Debido a que la Cer plasmática parece ser prometedora como un marcador sustituto de la respuesta tumoral, se investigó la correlación del nivel basal de Cer en pacientes con eficacia en el tratamiento. La concentración de Cer plasmática de donantes sanos fue muy homogénea y significativamente menor (media:  $1,98 \mu\text{M} \pm 0,09$ ) que la de los pacientes con alta variabilidad individual (grupo respondedor:  $3,34 \mu\text{M} \pm 0,32$  y grupo resistente  $3,82 \mu\text{M} \pm 0,45$ ; ambas  $P < 0,01$  vs donantes sanos). La concentración de Cer basal aparece como un marcador de presencia de tumor en pacientes. Sin embargo, la comparación de la concentración total de CER entre los dos grupos de pacientes no permitió una discriminación entre el grupo respondedor y el grupo resistente ( $P = 0,67$ ). Por lo tanto, la cantidad de Cer total en pacientes antes de cualquier tratamiento no puede considerarse como un factor de pronóstico de la respuesta tumoral a la SBRT combinada con irinotecán.

10

*La clasificación de la variación de Cer agrupa a los pacientes según su respuesta tumoral.*

La Cer total y su modulación de subespecies durante el tratamiento fueron evaluados para cada paciente y se estableció el agrupamiento jerárquico. Cer aumentada y disminuida en D3 y D10 son representadas respectivamente en rojo y verde, cuando la mediana es igual a 0 están en negro (**Figura 5**). La agrupación de la evolución de Cer individual demostró una jerarquía entre pacientes con respuestas objetivas y resistentes. La jerarquía de la modulación de Cer total en D3 y D10 mostró claramente que los pacientes 8/10 CR y 6/8 PR están agrupados por encima de la respuesta media igual a 0 (ambos  $P < 0,001$ ). En contraste, los pacientes 5/8 S y 8/9 P se agruparon por debajo de esta mediana (ambos  $P < 0,001$ ). Para cada subespecie de Cer, se obtuvo una discriminación similar entre los pacientes objetivos y resistentes (datos no mostrados) sin mejorar la segregación de los pacientes en comparación con el análisis de agrupaciones con Cer total.

15

20

*La modulación de Cer durante el tratamiento discrimina el control del tumor en función del tiempo.*

**[0039]** Finalmente, evaluamos el empeoramiento del volumen del tumor medido por CT-Scan 3, 6 y 12 meses después del tratamiento en función de la evolución de la Cer total en el plasma sanguíneo (**Figura 6**). Las curvas de Kaplan-Meier demuestran claramente que los pacientes con un aumento de Cer en D3 o D10 tienen una alta probabilidad de control tumoral durante el primer año. Curiosamente, ningún paciente con un aumento de Cer en D10 muestra un agravamiento del tumor. Los pacientes con una disminución de Cer tienen un 50 % de posibilidades de empeoramiento del tumor durante el primer año. Estos resultados discriminan clara y estadísticamente la capacidad de control tumoral para pacientes tratados dependiendo del aumento o disminución temprana de Cer (D3 o D10:  $p < 0,01$ ).

25

30

### **Discusión**

En el presente estudio bien definido de fase II que combina SBRT con irinotecán, correlacionamos claramente la elevación de la concentración de Cer en el plasma sanguíneo con la tasa de respuesta tumoral. Del mismo modo, una disminución de la concentración de Cer en el plasma sanguíneo se correlacionó con la estabilización o una progresión tumoral y, por lo tanto, dentro del tratamiento efectivo. Nuestros resultados definieron Cer plasmática como un marcador sustituto temprano de la respuesta tumoral, detectable precozmente durante el tratamiento con radioterapia.

35

40

Los resultados presentados en la **Figura 3**, muestran que los pacientes con metástasis hepáticas o pulmonares de cáncer colorrectal, tienen una concentración de Cer en plasma sanguíneo más alta que los pacientes sanos. Estos resultados están según la literatura que muestra una modulación de Cer en la sangre del paciente que padece diversas patologías (Delogu y col., 1999; Lang y col., 2007; Petrache y col., 2005; Watt y col., 2012). Además, Cer en el flujo sanguíneo también se ha cuantificado después del esquema SFGRT que incluye una fracción de 15 Gy luego 30 de 2 Gy (Sathishkumar y col., 2005). Las concentraciones de Cer plasmática aumentaron significativamente 72 horas después de SFGRT en 3/3 CR y 2/4 PR pacientes. Sin embargo, no se encontró correlación en el grupo no respondedor donde un paciente mostró un aumento del nivel de Cer y el otro una disminución. De hecho, la discriminación significativa de los grupos de aumento y disminución de Cer era imposible debido al pequeño tamaño de la cohorte. Además, los diversos orígenes tumorales diluyeron la fuerza de los resultados. Este prometedora estudio no permitía evidencia estadística que estableciese la Cer secretada como un biomarcador de la eficacia de la radioterapia.

45

50

En el presente estudio, esas dos debilidades se han resuelto. Primero, nuestro estudio incluye una cohorte más grande de 35 pacientes con casi el mismo número de respondedores y resistentes (respectivamente 18 y 17). En segundo lugar, todas las metástasis derivadas del carcinoma colorrectal primario y fueron tratadas por SBRT con irinotecán. Finalmente, los volúmenes tumorales fueron equivalentes, inferiores a 6 cm para la mayor inconsistencia potencial limitante de diámetro debido al tamaño del volumen. Debido a los estrictos criterios de inclusión de pacientes y al seguimiento clínico, pudimos extender los resultados previos sobre la correlación entre la modulación de la Cer total en el torrente sanguíneo y la respuesta tumoral después de la radioterapia. Además, nuestro trabajo arroja nueva luz sobre la subespecie de Cer mejorada después de la irradiación. De hecho, no solo la Cer total, sino todas las subespecies de Cer abundantes (C16:0, C18:0, C22:0, C22:1, C24:0 y C24:1, Cer) aumentaron en el grupo

55

60

respondedor (**Figura 4 y S2**). Sorprendentemente, las disminuciones de todas las subespecies de Cer en el plasma del grupo resistente se observaron principalmente en D10 y no en D3. Curiosamente, la evolución de Cer total es suficiente para evaluar la respuesta de eficacia después de SBRT con irinotecan. La cuantificación y el análisis de las diferentes subespecies de Cer no mejoran la fuerza de las propiedades del biomarcador. Este hallazgo fue confirmado por análisis de agrupamiento. De hecho, pacientes 8/10 CR y 6/8 PR estaban por encima de la mediana de la modulación de Cer total en D3 y D10, cuando pacientes 7/8 S y 8/9 P estaban por debajo (**Figura 5**) La prueba estadística de chi cuadrado demostró que el aumento de Cer plasmática es mayor en el respondedor objetivo que en los pacientes resistentes ( $P < 0,01$ ). No se obtuvo ninguna ventaja midiendo las diferentes subespecies individualmente. Entonces, Cer total representa un biomarcador temprano confiable para la respuesta individual a la radioterapia.

La alta concentración de Cer en el torrente sanguíneo puede explicarse por diferentes mecanismos. ASM y Cer son secretados en el medio extracelular, por células endoteliales activadas por citocinas proinflamatorias que incluyen  $IL-\beta$  o  $TNF-\alpha$  (Marathe y col., 1998). También encontramos que la irradiación de células endoteliales microvasculares primarias HMVEC-L induce la secreción de ASM y Cer en el medio extracelular (datos no mostrados). En esta hipótesis, la liberación de Cer por activación endotelial puede conducir a una posterior radiosensibilización dependiente de Cer de las células tumorales. La elevación de la Cer plasmática también puede deberse al alto nivel de cuerpos apoptóticos tumorales enriquecidos en Cer inducidos por el SBRT con irinotecan. El aumento no regulado de Cer puede aparecer durante la etapa tardía no reversible de muerte celular inducida por daño al ADN (Tepper y col., 1999). El alto nivel de Cer en el torrente sanguíneo podría ser un marcador de esta forma de muerte celular. De hecho, mostramos una correlación entre la fuerza de la regresión tumoral resultante de la muerte celular y el aumento de la Cer plasmática después de SBRT e irinotecan (**Figura 2A**) Actualmente estamos buscando una explicación biológica correcta para la elevación de la Cer plasmática. Otros estudios también deben definir el papel específico de SBRT y el tratamiento con irinotecan en la secreción de Cer.

Debido a nuestros hallazgos, propusimos que la concentración de Cer plasmática representa un biomarcador temprano de la eficacia de respuesta SBRT e irinotecan. Esta afirmación está respaldada por el hecho de que ni el sexo, la edad, la ubicación ni el volumen del tumor fue un factor de covarianza correlacionado con el aumento de ceramida durante el tratamiento. Los datos preliminares muestran que la irradiación de tumores en ratones induce Cer plasmática de una manera dependiente de la dosis (datos no mostrados). Debemos reproducir los experimentos usando irinotecan para estimar su capacidad para inducir Cer plasmática.

Por lo tanto, encontrar marcadores sustitutos tempranos puede permitir a los médicos adaptar o suspender el tratamiento, lo que limita las posibles complicaciones asociadas con los tratamientos que no tienen beneficios clínicos. Además, los biomarcadores tempranos que permiten la adaptación del tratamiento del tumor permitirán una terapia personalizada al reducir el costo del tratamiento y la detención de una terapia dirigida costosa, si es necesario. Se requerirán más investigaciones para demostrar si nuestro hallazgo puede generalizarse a otros protocolos de radioterapia. Los protocolos comunes de radioterapia están diseñados utilizando un programa de dosificación fraccionado de 2 Gy al día durante varias semanas. Todavía no está claro si el fraccionamiento convencional está induciendo Cer intracelular dentro de las células irradiadas. La dosis de radiación de 2 Gy por día puede no ser suficiente para generar Cer. Además, como ya se vio en la muerte de las células tumorales, la generación de Cer podría estar ocurriendo lentamente en el transcurso de varias semanas del tratamiento y, por lo tanto, los cambios en la línea de base pueden no alcanzar el nivel de significación. Otros estudios clínicos deben validar o refutar Cer como un marcador sustituto de la respuesta tumoral después de radioterapias convencionales. Los nuevos dispositivos de radioterapia (acelerador de rayos X estereotáxico, intrahaz, protonterapia) permiten una mejor orientación hacia el tumor. Como consecuencia, los protocolos clínicos están siendo reevaluados y rediseñados para algunas exposiciones tumorales, con una escalada de dosis y una disminución en el número de fracciones. Al aumentar la dosis, se mejora la generación de Cer intracelular y/o la muerte de las células tumorales. En este caso, se esperarían niveles de Cer plasmática de forma aguda después de que la irradiación mejore su detección. Debido a esas especificidades, el aumento de Cer plasmática solo puede ser observable y cuantificable después de una dosis alta de radiación.

Finalmente, este estudio, que proporciona una visión importante y oportuna del impacto de la ceramida plasmática en la respuesta tumoral a SBRT con irinotecan, podría traducirse en una mejora en el manejo clínico de pacientes similares. Nuestros análisis de Kaplan-Meier muestran una discriminación estadística del control de tumores en pacientes, definida por tomografía computarizada durante el primer año de tratamiento, y la elevación o disminución de Cer plasmática (**Figura 6**) Además, la concentración de Cer plasmática en D10 parece más veraz para estimar la probabilidad de que el paciente prolongue el control del tumor durante el año. Cuando Cer disminuye en D3 o D10, el volumen tumoral en el 50 % de los pacientes aumentará, demostrando un fracaso de la terapia durante o justo al final del tratamiento. La evaluación del volumen tumoral por resonancia magnética, tomografía computarizada o PET-Scan puede observarse, pero solo meses después del tratamiento. Esto limita el uso de nuevos tratamientos para pacientes resistentes y aumenta el riesgo de progresión tumoral y complicaciones de tratamientos ineficaces. Los biomarcadores de diagnóstico temprano de la respuesta tumoral durante la radioterapia pueden influir en los médicos para que

adapten o suspendan los tratamientos ineficientes. Además, los pacientes se reaseguran rápidamente de la eficacia de su tratamiento. En esta circunstancia, la modulación de Cer secretada en el flujo sanguíneo representa un biomarcador temprano nuevo e interesante de la respuesta tumoral a protocolos clínicos de radioterapia utilizando dosis altas por fracción.

5

## REFERENCIAS

Bernier J, Hall EJ, Giaccia A (2004) Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* 4(9): 737-47

10 Bibault JE, Ceugnart L, Prevost B, Mirabel X, Lartigau E (2013) CT appearance of pulmonary carcinomas after stereotactic radiation therapy. *Diagnostic and interventional imaging* 94(3): 255-62

Bodennec J, Koul O, Aguado I, Brichon G, Zwingelstein G, Portoukalian J (2000) A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. *J Lipid Res* 41(9): 1524-31

15

Corre I, Niaudet C, Paris F (2010) Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutat Res* 704(1-3): 61-7

Cox DR (1972) Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 34: 187-220

20

Delogu G, Famularo G, Amati F, Signore L, Antonucci A, Trinchieri V, Di Marzio L, Cifone MG (1999) Ceramide concentrations in septic patients: a possible marker of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 27(11): 2413-7

25 Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14863-8

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45(2): 228-47

30

Ganepola GA, Nizin J, Rutledge JR, Chang DH (2014) Use of blood-based biomarkers for early diagnosis and surveillance of colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 6(4): 83-97

35 Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R (2003) Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 300(5622): 1155-9

Hara A, Radin NS (1978) Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem* 90(1): 420-6

40 Kaplan ESM, P. (1958) Non parametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 53: 457- 480

Kavanagh BD, Miften M, Rabinovitch RA (2011) Advances in treatment techniques: stereotactic body radiation therapy and the spread of hypofractionation. *Cancer J* 17(3): 177-81

45 Kimura K, Markowski M, Edsall LC, Spiegel S, Gelmann EP (2003) Role of ceramide in mediating apoptosis of irradiated LNCaP prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 10(2): 240-8

Kumar S, Mohan A, Guleria R (2006) Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers* 11(5): 385-405

50

Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe DS, Lupescu A, Koka S, Eisele K, Klarl BA, Rubben H, Schmid KW, Mann K, Hildenbrand S, Hefter H, Huber SM, Wieder T, Erhardt A, Haussinger D, Gulbins E, Lang F (2007) Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Med.*, 13(2): 164-70

55 Malviya G, Nayak TK (2013) PET imaging to monitor cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 14(7): 669-82

Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ, Tabas I (1998) Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem* 273(7): 4081-8

60

Petrache I, Natarajan V, Zhen L, Medler TR, Richter AT, Cho C, Hubbard WC, Berdyshev EV, Tudor RM (2005) Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nat Med* 11(5): 491-8

- Rodriguez-Lafrasse C, Alphonse G, Aloy MT, Ardail D, Gerard JP, Louisot P, Rousson R (2002) Increasing endogenous ceramide using inhibitors of sphingolipid metabolism maximizes ionizing radiation-induced mitochondrial injury and apoptotic cell killing. *Int J Cancer* 101(6): 589-98
- 5 Sathishkumar S, Boyanovsky B, Karakashian AA, Rozenova K, Giltiy NV, Kudrimoti M, Mohiuddin M, Ahmed MM, Nikolova-Karakashian M (2005) Elevated sphingomyelinase activity and ceramide concentration in serum of patients undergoing high dose spatially fractionated radiation treatment: implications for endothelial apoptosis. *Cancer Biol Ther* 4(9): 979-86
- 10 Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J (1999) Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. *J Clin Invest* 103(7): 971-8
- 15 Watt MJ, Barnett AC, Bruce CR, Schenk S, Horowitz JF, Hoy AJ (2012) Regulation of plasma ceramide levels with fatty acid oversupply: evidence that the liver detects and secretes de novo synthesised ceramide. *Diabetologia* 55(10): 2741-6

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar si un paciente que padece un cáncer logrará una respuesta después de la radioterapia que comprende las etapas de:
- 5 i) determinar el nivel de ceramida en una primera muestra de sangre obtenida del paciente antes de la radioterapia,  
 ii) determinar el nivel de ceramida en una segunda muestra de sangre obtenida del paciente durante o inmediatamente después de la radioterapia,  
 iii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con el nivel determinado en la etapa ii), y  
 10 iv) concluir que el paciente alcanzará una respuesta cuando el nivel determinado en la etapa ii) sea más alto que el determinado en la etapa i) o concluir que el paciente no alcanzará una respuesta cuando el nivel determinado en la etapa ii) sea inferior al nivel determinado en la etapa i).
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el cáncer a tratar incluye tumores primarios y  
 15 tumores metastásicos.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mamas, colon, esófago, gastrointestinal, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos,  
 20 lengua y útero.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en neoplasia maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma  
 25 linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; poliposis familiar adenocarcinoma de coli; carcinoma sólido; tumor carcinoide maligno; adenocarcinoma branquio-loalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma  
 30 acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical adrenal; carcinoma endometroide; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma  
 35 mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor maligno del estroma ovárico; tecomoma maligno; tumor maligno de células granulosas; roblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor maligno de células de Leydig; tumor maligno de células lipídicas; paraganglioma maligno; paraganglioma extra-  
 40 mamario maligno; feocromocitoma; sarcoma de glomangio; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor maligno de  
 45 Brenner; tumor filodes maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; struma ovarii maligno; coriocarcinoma; mesonefoma maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; tumor neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemmoma maligno; tumor maligno de células granulares; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma linfoma  
 55 maligno linfocítico pequeño; linfoma maligno difuso, células grandes; linfoma maligno folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mielóide; leucemia basófila; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mielóide; y tricoleucemia.
- 60 5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la radioterapia consiste en una radioterapia hipofraccionada.

6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1 a 5**, en el que la radioterapia comprende 1, 2, 3, 4 o 5 regímenes de radiaciones ionizantes.
- 5 7. El procedimiento según cualquier de las reivindicaciones **1 a 6**, en el que el régimen de radiaciones ionizantes se combina con la administración de al menos un agente quimioterapéutico.
8. El procedimiento según la reivindicación **7**, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, asparaginasa, BEG, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfán, camptotecina, capecitabina, carboplatin, carmustina, clorambucil, cisplatin, cladribina, clodronato, colchicina, ciclofosfamida, cipoterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dienestrol, dietilstilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estradiol, estramustina, etoposida, exemestana, filgastrim, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracil, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, genisteina, groserelina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, imatinib, interferon, irinotecan, ironotecan, letrozol, leucovorina, leuprolid, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalan, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantron, nilutamida, nocodazol, octreotid, oxaliplatin, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfímero, procarbazina, raltitrexed, rituximab, estreptozocina, suramina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tioguanina, tiotepa, dicloruro de titanoceno, topotecan, trastuzumab, tretinoína, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.
- 10 20 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1 a 8**, en el que el protocolo de radioterapia consiste en 4 sesiones de 10 Gy distribuidas durante 2 semanas en los días 1, 3, 8 y 10, combinadas con la administración de una dosis de irinotecán inyectado 30 a 90 minutos antes de la primera y tercera sesión de radioterapia.
- 25 10. El procedimiento según la reivindicación **9**, en el que la segunda muestra de sangre se obtuvo el día 3.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1 a 10**, en el que el nivel de ceramida se determina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un espectrómetro de masas
- 30 12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1 a 11**, en el que se determina el nivel de ceramida total.
13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1 a 12**, en el que se determina el nivel de al menos una subespecie de ceramida, en el que la subespecie se selecciona del grupo que consiste en ceramidas C16, C16:1, C18, C18:1, C20, C20:1, C22, C22:1, C24 y C24:1.
- 35 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones **1 a 13**, en el que se determina el nivel de ceramidas C24.
- 40

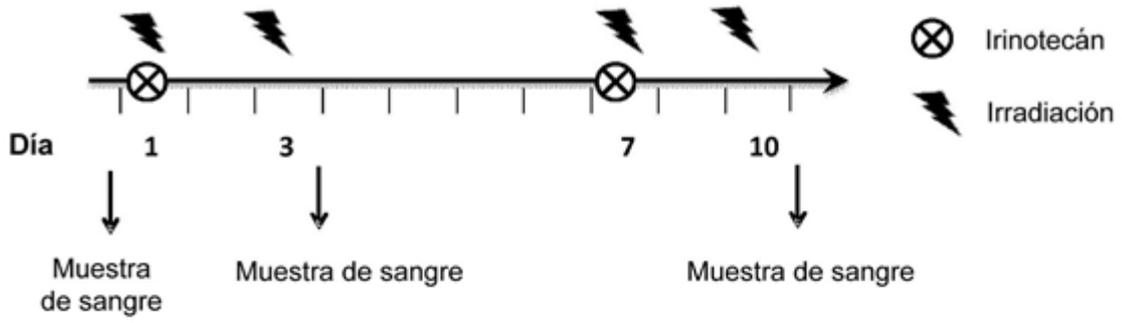


Figura 1

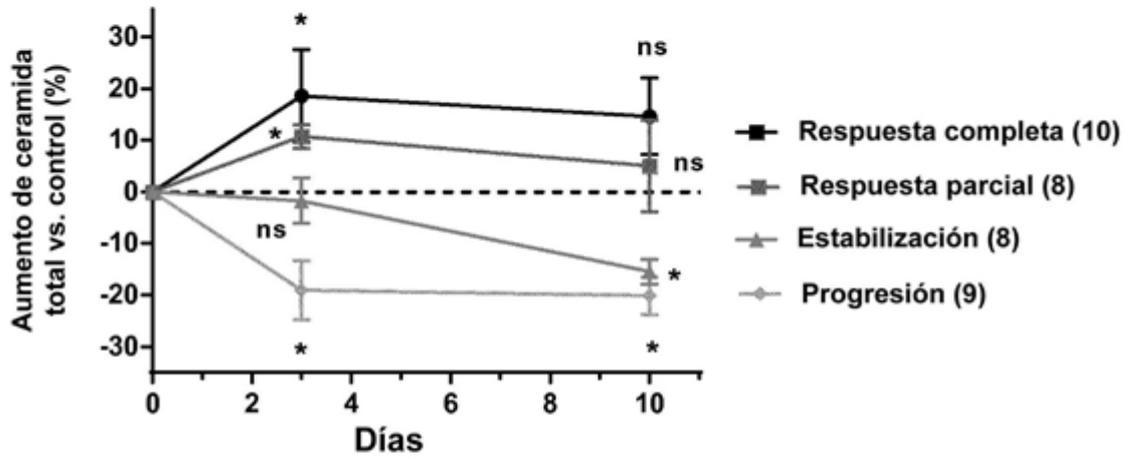


Figura 2A

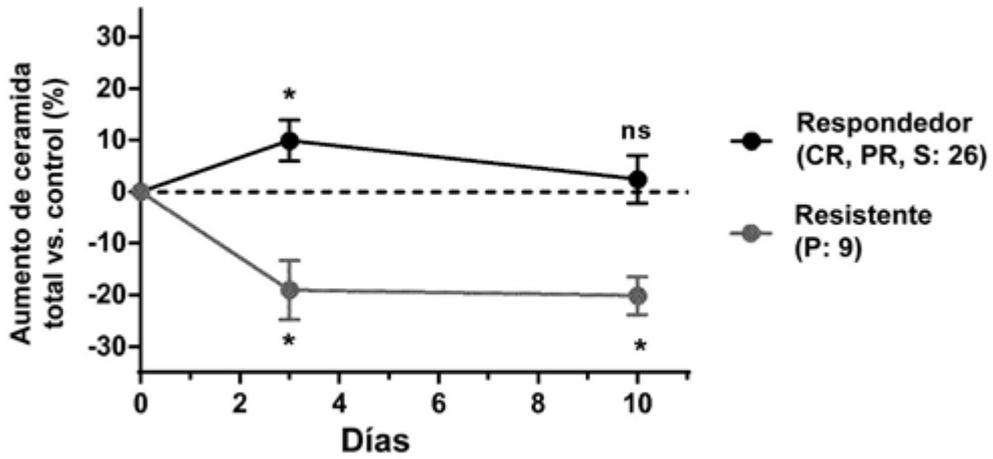


Figura 2B

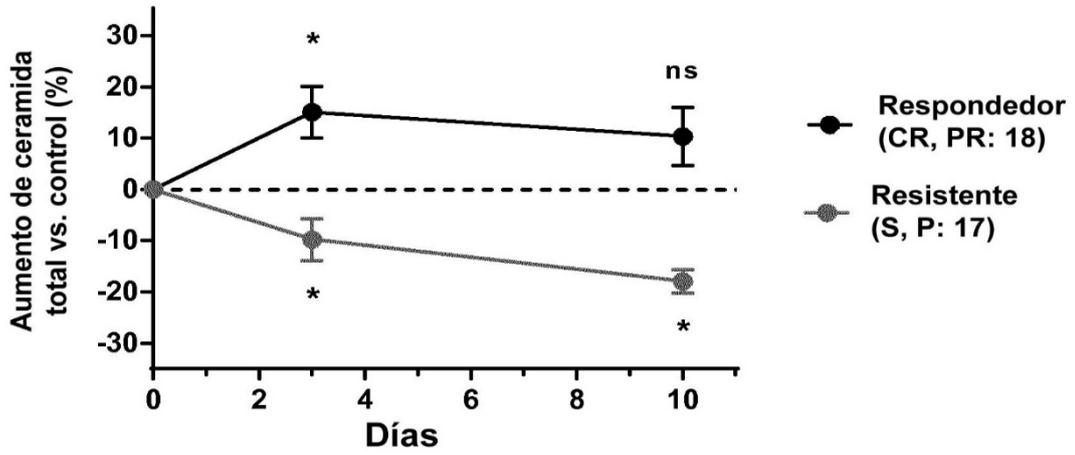


Figura 2C

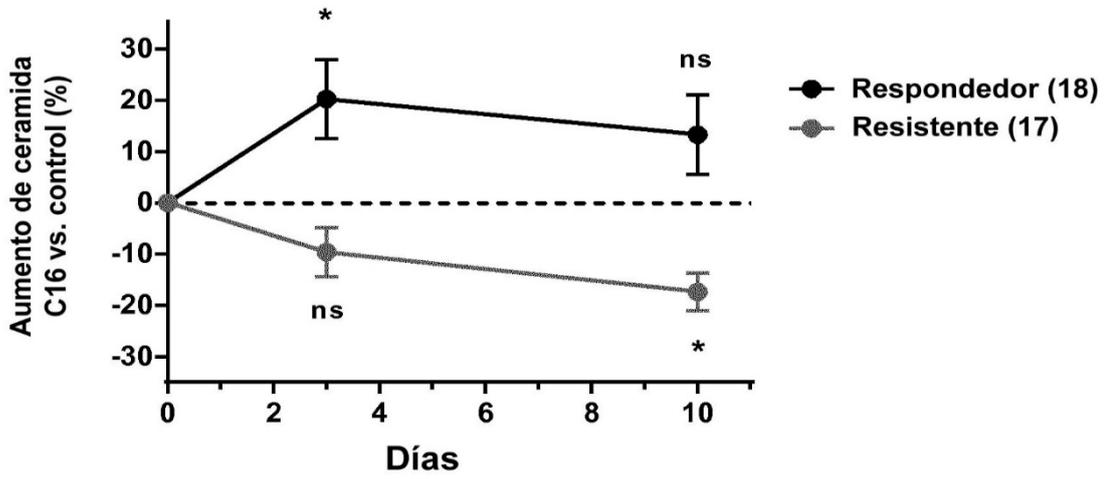


Figura 3A

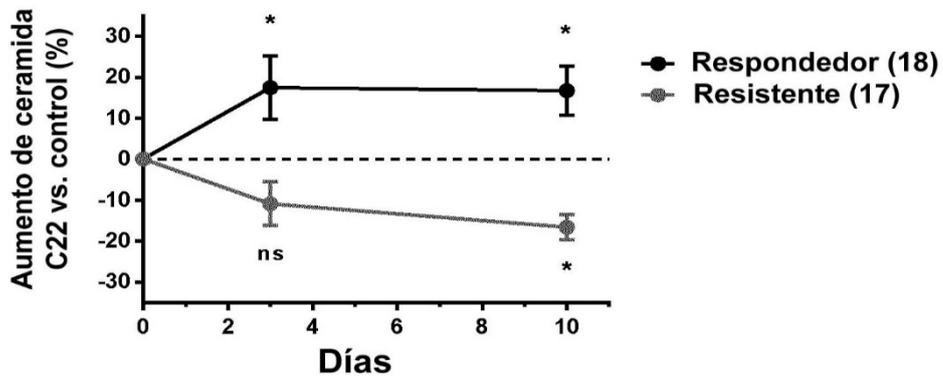


Figura 3B

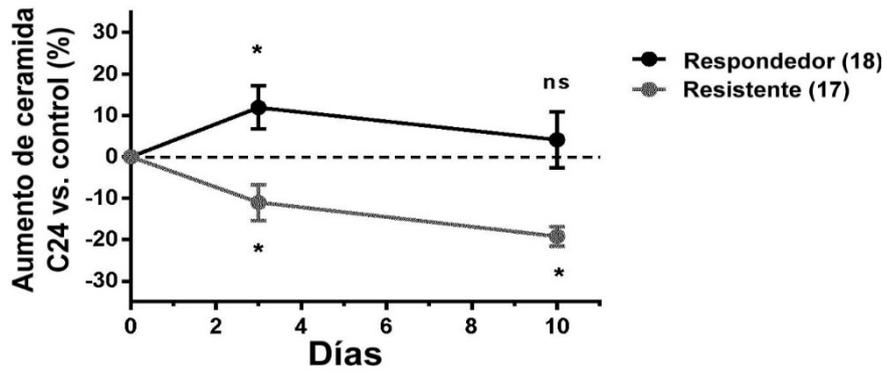


Figura 3C

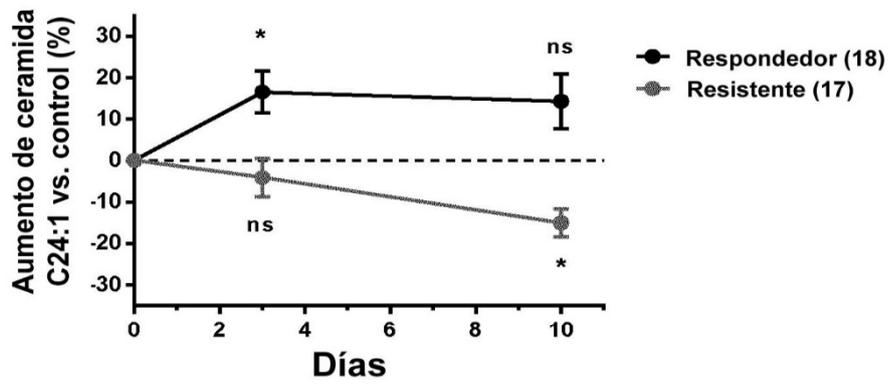


Figura 3D

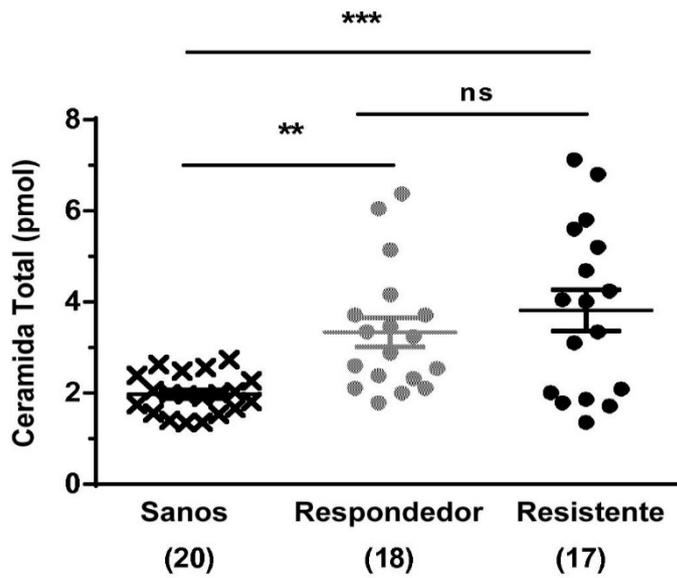


Figura 4

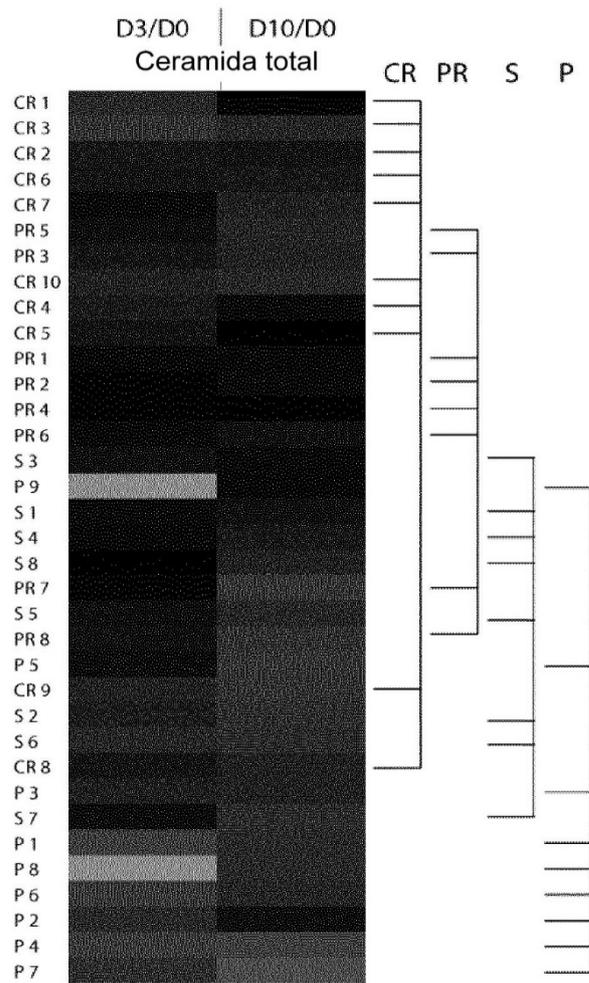


Figura 5

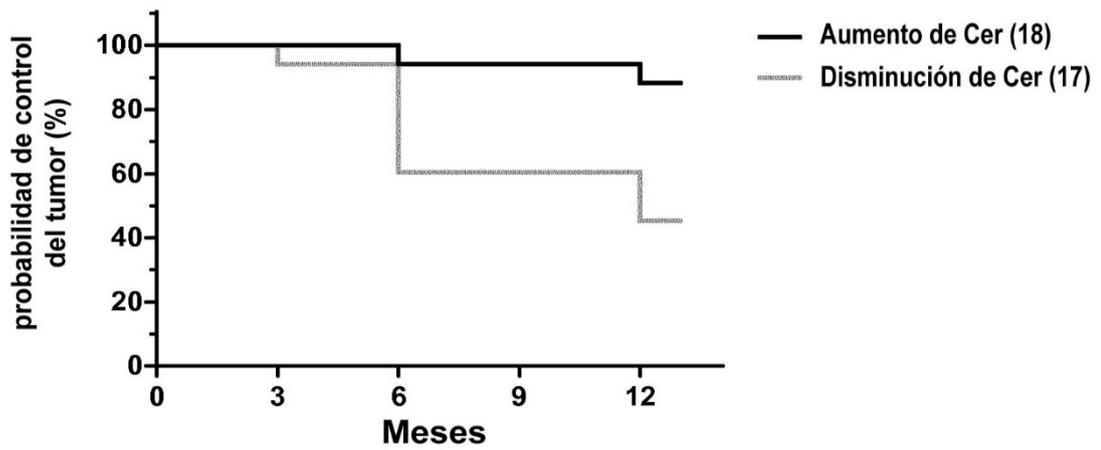


Figura 6A

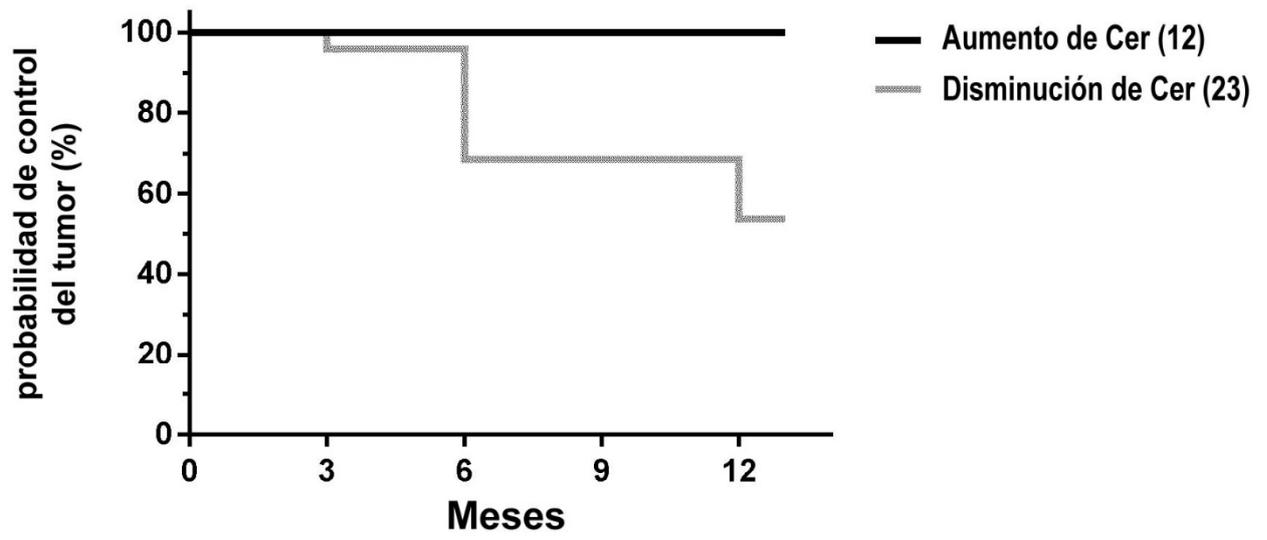


Figura 6B