



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 316 201**

⑫ Número de solicitud: 200500288

⑮ Int. Cl.:
C12Q 1/34 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **09.02.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.04.2009

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Vigo**
Campus Universitario (Rectorado)
Lagoas Marcosende
36310 Vigo, Pontevedra, ES

⑱ Inventor/es: **Páez de la Cadena Tortosa, María;**
Pallas Pallas, Estrella;
González Gacio, Gloria;
Ayude Vázquez, Daniel y
Rodríguez Berrocal, Francisco Javier

⑳ Agente: **No consta**

② Título: **Procedimiento para determinar la evolución de pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello, mediante la valoración en suero o plasma humano de la enzima alfa-L-fucosidasa.**

③ Resumen:

Procedimiento para determinar la evolución de pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello, mediante la valoración en suero o plasma humano de la enzima alfa-L-fucosidasa.

La presente invención consiste en un nuevo procedimiento para determinar la evolución de los pacientes que son tratados de cáncer de cabeza y cuello consistente en la determinación de los valores de la actividad biológica de la enzima alfa-L-fucosidasa en muestras de suero o plasma humano, antes de recibir tratamiento y durante el seguimiento de la evolución del paciente en respuesta al mismo. Los valores son comparados con un punto de corte preestablecido y con los niveles obtenidos en los controles inmediatamente anteriores. Esto permite determinar en qué pacientes remite la enfermedad, detectar los que presentan aparición de recidiva y/o metástasis, y diferenciar entre los que responden al segundo tratamiento establecido después de la aparición de recidiva y/o metástasis, y los que no lo hacen.

ES 2 316 201 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para determinar la evolución de pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello, mediante la valoración en suero o plasma humano de la enzima alfa-L-fucosidasa.

La presente invención se refiere al desarrollo y puesta a punto de un procedimiento para determinar la evolución de pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello. Este procedimiento se basa en una técnica sencilla, rápida, fiable y económica que consiste en la determinación de los valores de la actividad biológica de la enzima alfa-L-fucosidasa en muestras de suero o plasma humano.

La aplicación en el ámbito clínico-sanitario de este procedimiento constituye una interesante herramienta de cribado para determinar la evolución del paciente en respuesta al tratamiento recibido. Además, permitirá al clínico tomar decisiones sobre la idoneidad del tratamiento aplicado o en su caso aplicar un tratamiento nuevo, evitando así someter al paciente a costosos tratamientos que resultarán inefectivos.

La invención descrita aquí se ha realizado en el curso del trabajo de investigación financiado por el proyecto PGIDT01 SAN00014PR, concedido por la Xunta de Galicia.

Sector de la técnica

El sector de la técnica al que se refiere la invención se incluye, en general, dentro del ámbito biomédico, y más concretamente en el área de la oncología médica.

Según la Sociedad Americana contra el Cáncer, un tercio de las muertes debidas al cáncer podrían ser evitadas efectuando un diagnóstico preciso y un tratamiento y seguimiento adecuado de la patología (American Cancer Society, 2004).

En la actualidad, en el cáncer de cabeza y cuello los tratamientos oncológicos empleados tienen un elevado coste económico y, además, suelen provocar importantes efectos secundarios en los pacientes. Por ello, la búsqueda de marcadores que permitan detectar la aparición de recidivas y/o metástasis tras el tratamiento de la enfermedad es una de las prioridades dentro del ámbito científico oncológico. Pese a ello, el cáncer de cabeza y cuello continúa siendo un problema sanitario de gran importancia y una de las principales causas de muerte, especialmente en los países occidentales.

La utilización de esta prueba para determinar la evolución de los pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello supone una importante mejora con respecto a la información que proporcionan los marcadores utilizados en la actualidad.

Antecedentes de la invención

Los carcinomas de cabeza y cuello son tumores que surgen en la región anatómica situada por encima de las clavículas, con excepción del contenido orbitario y del endocráneo. Casi todos son carcinomas epidermoides en diversos grados de diferenciación, en ocasiones de presentación multifocal y todos comparten una característica clínico-patológica muy importante, que es la riqueza ganglionar que posee la región afectada (González Barón, 1995; González Barón y de Castro Carpeño, 1997). Anualmente hay unos 500.000 nuevos casos en todo el mundo, y constituyen aproximadamente un 5% de todos los tumores diagnosticados en Europa Occidental y Estados Unidos (Parkin *et al*, 1992; Sankaranarayanan *et al*, 1998; Van Houten *et al*, 2000). En España se diagnostican 5.000 nuevos casos por año, siendo la proporción hombre-mujer, tomando todas las localizaciones en conjunto, de 3-4:1, aunque puede haber grandes variaciones según la localización anatómica y el área geográfica considerada (Espinosa Arranz *et al*, 1999). Este predominio masculino está relacionado, fundamentalmente, con la diferencia marcada en los hábitos tóxicos entre ambos sexos en nuestra sociedad. Dada la tendencia actual a igualarse el consumo de tabaco y alcohol en ambos sexos, la incidencia de estos tumores en mujeres ha aumentado en los últimos años. En cuanto a la mortalidad, las tasas españolas son de 11,3 casos por 100.000 habitantes y año para varones y 1 para mujeres (Espinosa Arranz *et al*, 1999).

El tratamiento de los tumores de cabeza y cuello varía en función de la localización de cada tumor. Sin embargo, para conseguir los mejores resultados es necesaria una estrategia multidisciplinar que combine la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.

La cirugía y la radioterapia son el tratamiento estándar establecido para los tumores en estadios I y II de TNM, y conforman el único tratamiento que se puede considerar como curativo. La cirugía paliativa y rehabilitadora está encaminada a aliviar la sintomatología, o a la corrección de defectos funcionales producidos. En caso de ganglios palpables o evidencia de enfermedad subclínica ganglionar se procede al abordaje quirúrgico del cuello mediante vaciamiento ganglionar cervical radical o vaciamiento ganglionar cervical funcional, preservando en esta última tejidos normales funcionales. La radioterapia coadyuvante se aplica cuando hay márgenes inválidos, invasión de planos musculares, infiltración vascular, ganglios cervicales infiltrados o traqueoesofágicos con metástasis, o extensión extracapsular de alguna adenopatía. Por otra parte, la quimioterapia se centra actualmente en la enfermedad localmente avanzada o la

metastásica. Hoy en día existe un protocolo de preservación de órganos, que es un tratamiento alternativo que intenta lograr un buen control de la enfermedad con mínimos cambios funcionales.

A pesar de los avances realizados en el tratamiento de la enfermedad, las cifras de mortalidad para el cáncer de cabeza y cuello no han sufrido variaciones importantes en los últimos 25 años. Esto está muy relacionado con el inadecuado seguimiento de la evolución del paciente tras la terapia curativa y con la aplicación de tratamientos inefectivos.

El seguimiento de la evolución del paciente tratado de cáncer de cabeza y cuello es de suma importancia, y aquí juegan un papel clave los marcadores tumorales séricos. En la actualidad, son tres los utilizados mayoritariamente en la práctica clínica: el antígeno de células escamosas o SCC, la citoqueratina 19 o CIFRA 21-1, y el antígeno carcinoembrionario o CEA (Banal *et al*, 2001; Lachowicz *et al*, 1999; Molina *et al*, 1996, Rosati *et al*, 2000).

En el caso del antígeno de células escamosas se ha encontrado una relación entre el aumento de su concentración sérica y el estadio del tumor, y con la invasión ganglionar. También se ha descrito una correlación con el desarrollo de recidivas, donde parece estar su aplicación más importante.

Muchos autores han encontrado relación entre el incremento en la concentración sérica de la citoqueratina 19 y la localización, el estadio o el grado de diferenciación del tumor, todos ellos factores pronóstico en cáncer de cabeza y cuello. Además, tiene utilidad en la detección de recidivas al igual que el antígeno de células escamosas, por lo que existe controversia sobre cual de los dos tiene de mayor valor en el seguimiento de la evolución de los pacientes tratados de carcinoma de cabeza y cuello.

El incremento en la concentración sérica del antígeno carcinoembrionario también ha sido considerado de gran valor en la detección de recidivas, aunque en el seguimiento de los pacientes de cáncer de cabeza y cuello su utilidad es muy cuestionable.

Los inventores del procedimiento objeto de esta patente han demostrado, a lo largo de sus trabajos de investigación, que existe una relación directa entre la presencia del cáncer y la alteración en la actividad biológica de la enzima alfa-L-fucosidasa, tanto en suero como en tejido, constituyendo un factor pronóstico independiente.

En suero de pacientes con carcinoma de cabeza y cuello los niveles medios de actividad de esta enzima se encuentran disminuidos en más de un 50%, si se compara con controles sanos. Por otra parte, como prueba para la detección postoperatoria de recidivas y/o metástasis, la valoración de la actividad biológica de la enzima alfa-L-fucosidasa ofrece mejores resultados que el antígeno de células escamosas, la citoqueratina 19 y el antígeno carcinoembrionario y permite clasificar mejor a los pacientes con diferente evolución después del primer tratamiento. Además, también permite llevar a cabo una mejor clasificación de los pacientes sometidos a un segundo tratamiento tras la detección de la recidiva y/o metástasis.

La alteración en la actividad biológica de la enzima alfa-L-fucosidasa, detectada por los inventores del procedimiento, en suero de pacientes con carcinoma de cabeza y cuello convierte a esta molécula en un potencial marcador de seguimiento de la evolución de la enfermedad.

El objeto de la presente invención es, por tanto, definir el procedimiento que permite determinar la evolución de pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello mediante la valoración de la glicoproteína alfa-L-fucosidasa en suero o plasma humano.

Explicación de la invención

La presente invención corresponde al desarrollo de un procedimiento para determinar la evolución de pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello, lo que permitirá al clínico tomar decisiones sobre la idoneidad del tratamiento aplicado o, en su caso, aplicar un tratamiento nuevo. Este procedimiento consiste en la determinación de los niveles de actividad hidrolítica de la enzima alfa-L-fucosidasa en muestras de suero o plasma humano, antes de recibir tratamiento y durante el seguimiento de la evolución del paciente en respuesta al mismo. La naturaleza de las muestras empleadas en este procedimiento garantiza que la realización de la prueba no causará más molestias al paciente que las de una extracción de sangre habitual.

La valoración de la actividad alfa-L-fucosidásica se realiza incubando la enzima con sustratos naturales o sintéticos y determinando su capacidad de hidrólisis.

Durante el seguimiento de la evolución de los pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello, los inventores del procedimiento objeto de esta patente hemos demostrado que los pacientes que se encontraban estables al final del seguimiento manifestaron incrementos de los niveles de actividad alfa-L-fucosidásica, alcanzando valores normales en el 81,8% de los casos. En aquellos pacientes en los que la enfermedad fue recurrente, el 70% presentaban inicialmente unos niveles inferiores al punto de corte, no observándose tendencia alguna de recuperación de los mismos. En el 30% restante, con niveles iniciales superiores al punto de corte, la actividad alfa-L-fucosidásica experimentó un descenso antes de la detección de la recidiva en el 75% de los casos. Además, entre los pacientes que experimentaron recidiva y/o metástasis, todos aquellos que respondieron al nuevo tratamiento manifestaron un incremento en los niveles

de actividad alfa-L-fucosidásica, alcanzando valores normales, mientras que los que no respondieron al tratamiento mantuvieron los niveles disminuidos.

Por todo ello, la valoración de los niveles de actividad biológica de la enzima alfa-L-fucosidasa en suero o plasma humano ayuda a clasificar a los pacientes con diferente evolución después del tratamiento, permitiendo determinar en qué pacientes remite la enfermedad, detectar los que presentan aparición de recidiva y/o metástasis, y diferenciar entre los que responden al segundo tratamiento, establecido después de la aparición de recidiva y/o metástasis, y los que no lo hacen.

La adecuada identificación de existencia o no de respuesta al tratamiento del cáncer de cabeza y cuello ayuda a reducir el gasto sanitario al evitar la aplicación de costosos y traumáticos tratamientos que no están resultando efectivos. Además, la mejora en el seguimiento de la evolución se relaciona con una mejor supervivencia de los pacientes por lo que también contribuiría a reducir el costo sanitario al agilizar su recuperación, evitando el gasto diario de un paciente ingresado y de los largos tratamientos oncológicos.

Por otro lado, el reducido coste económico de este procedimiento y la facilidad de obtención de las muestras avalan su viabilidad.

Descripción de un modo de realización

El procedimiento que proponemos comienza con la obtención del suero o del plasma de pacientes que van a ser tratados de cáncer de cabeza y cuello. Después de aplicar el tratamiento se realizan controles de la evolución del paciente, al menos trimestrales, obteniendo para ello una muestra de suero o plasma.

El suero o plasma debe ser conservado a temperaturas inferiores a -20°C hasta la determinación de los valores de las moléculas ya mencionadas.

La actividad hidrolítica de la enzima alfa-L-fucosidasa se determina incubando a 37°C el suero con un sustrato específico para la enzima. Una vez realizada la incubación la reacción se detiene mediante un incremento del pH y una disminución de la temperatura. El producto final de la reacción se cuantifica espectrofluorimétricamente y la actividad catalítica de la enzima se calcula en función del producto liberado.

Los niveles de actividad alfa-L-fucosidásica son comparados con un punto de corte preestablecido (4 U/mL) y con los niveles obtenidos en los controles inmediatamente anteriores.

En los pacientes que manifiestan un incremento en los niveles de actividad alfa- L-fucosidásica en los controles posteriores al tratamiento, se considera que la enfermedad ha remitido.

En los pacientes que mantienen niveles de actividad disminuidos, y por debajo del punto de corte establecido, o bien dichos niveles disminuyen en los controles posteriores al tratamiento, se considera que hay elevado riesgo de presencia de recidiva locorregional y/o metástasis.

Cuando a los pacientes con recidiva y/o metástasis se les aplica un segundo tratamiento, aquéllos que muestran un incremento de los niveles de actividad alfa-L-fucosidásica en los controles posteriores, se considera que responden positivamente al tratamiento. Por otro lado, los pacientes que mantienen niveles de actividad alfa-L-fucosidásica disminuidos y por debajo del punto de corte establecido, se considera que no responden al tratamiento.

Es independiente del objeto de la invención el origen de los reactivos y materiales utilizados para la realización de las técnicas que permiten obtener los valores de actividad biológica de la enzima alfa-L-fucosidasa en suero o plasma humano.

Bibliografía

- *American Cancer Society*. (2004). Cancer facts and figures. ACA, New York.
- Banal A., Hacene K., Berthelot-Ruff E., Mahe E., Fontana X. y Pichon M.F. (2001). Comparison of CYFRA 21.1 and SCC assays in head and neck tumours. *Tumour Biol.*, **22**: 27-35.
- Espinosa Arranz E., Zamora Auñón P., y de las Heras García B. (1999). Carcinomas de cabeza y cuello. *Medicine*, **7**: 5508-5513.
- González Barón M. (1995). Cáncer de cabeza y cuello. *Ed. Ergon*.
- González Barón M. y de Castro Carpeño J. (1997). Cancer 96: Actualizaciones en oncología. *Capítulo: Bases biológicas del cáncer*, 31-47.
- Lachowicz M.A., Hassmann-Poznanska E., Kozlowski M.D. y Rzewnicki I. (1999). Squamous cell carcinoma antigen in patients with cancer of the larynx. *Clin. Otolaryngol.*, **24**: 270-273.

■ **Molina R., Torres M.D., Moragas M., Pérez-Villa J., Filella X., Jo J., Farrus B. Giménez M., Traserra J. y Ballesta A.M.** (1996). Prognostic significance of SCC antigen in the serum of patients with head and neck cancer. *Tumor Biol.*, **17**: 81-89.

5 ■ **Parkin D.M., Muir S.L., Whelan Y., Gao T., Ferlay J. y Whelan S.** (1992). Cancer incidence in five continents, volume IV. *Intenational Agency for Research on cancer (WHO)*. Lyon IARC Scientific Publications.

10 ■ **Rosati G., Riccardi F. y Tucci A.** (2000). Use of tumor markers in the Management of head and neck cancer. *Int..I Biol. Markers*, **15**: 179-183.

■ **Sankaranarayanan R., Rasuyer E., Swaminthan R., Ferlay J., y Whelan S.** (1998). Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res.*, **18**: 4779-4786.

15 ■ **Van Houten V.M.N., Van den Brekel M.W.M., Denkers F., Colnot D.R., Westerga J., Van Diest P.J., Snow G.B., y Brakenhoff R.H.** (2000). Molecular diagnosis of head and neck cancer. *Recent Results Cancer Res.*, **157**: 90-106.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la evolución de pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello mediante la determinación de la actividad hidrolítica de la enzima alfa-L-fucosidasa en suero o plasma humano, antes de recibir el tratamiento y durante el seguimiento de la evolución en respuesta al mismo, que se **caracteriza** por comprender las siguientes etapas:

- a) Incubar a 37°C las muestras de suero o plasma humano, de pacientes de cáncer de cabeza y cuello, con un sustrato específico.
- b) Detener la reacción iniciada en la etapa anterior mediante un incremento de pH y una disminución de la temperatura
- c) Cuantificar espectrofluorimétricamente el producto final de la reacción.
- d) Determinar la actividad catalítica de la enzima alfa-L-fucosidasa a partir de los datos obtenidos en la etapa anterior, en función del producto liberado.
- e) Comparar los resultados con un punto de corte preestablecido y con los valores obtenidos en el mismo individuo antes de recibir el tratamiento.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 316 201

⑫ Nº de solicitud: 200500288

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 09.02.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/34 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	AYUDE, D. et al. Combined use of established and novel tumour markers in the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma. Oncology Reports. 2003. Vol. 10, 1345-1350, páginas 1345 y 1346.	1
A	ES 2187383 A1 (UNIVERSIDAD DE VIGO) 01.06.2003	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
03.03.2009

Examinador
I.Rueda Molins

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.03.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	AYUDE, D. Et al. Combined use of established and novel tumour markers in the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma. Oncology Reports.2003.Vol.10,1345-1350, páginas 1345 y 1346.	2003
D02	ES2187383 A1 (UNIVERSIDAD DE VIGO)	01-06-2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente, divulga un procedimiento para determinar la evolución de pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello mediante la determinación de la actividad hidrolítica de la enzima alfa-L-fucosidasa, que comprende cinco etapas.

El documento D01, divulga el uso del enzima alfa-L-fucosidasa, para el diagnóstico del cáncer de cabeza y cuello.

El documento D02, que refleja el estado de la técnica, muestra un procedimiento para la detección precoz de cáncer colorrectal, mediante la valoración en suero o plasma humano de la enzima alfa-L-fucosidasa.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986).

La reivindicación número 1, reivindica un procedimiento para determinar la evolución de pacientes tratados de cáncer de cabeza y cuello, que comprende cinco etapas: Incubar la muestra de suero a 37 C con un sustrato específico, detener la reacción, cuantificar espectrofluorométricamente el producto final, determinar la actividad del enzima alfa-L-fucosidasa y comparar los resultados con un punto de corte preestablecido y con los valores obtenidos en el mismo individuo antes de recibir el tratamiento.

El documento D01 divulga (en el apartado de materiales y métodos) un procedimiento para el diagnóstico del cáncer de cabeza y cuello, según el cual, partiendo de muestras de suero, se va a medir la actividad del enzima alfa-L-fucosidasa empleando un sustrato específico, en una reacción a 37 C. Posteriormente, usando un fluorómetro, se mide la cantidad del producto final. A partir de este dato, se determina la actividad del enzima alfa-L-fucosidasa y finalmente se comparan los resultados con un punto de corte preestablecido.

La diferencia entre la solicitud de patente y el documento D01 es, que en el citado documento, el procedimiento divulgado se emplea para el diagnóstico (y por tanto los valores obtenidos se comparen únicamente con un punto de corte preestablecido) y no para determinar la evolución de un paciente (lo que hace que, en la solicitud de patente, además los resultados se comparen con valores obtenidos en el mismo individuo antes de recibir el tratamiento).El hecho de que el mismo método divulgado en la solicitud de patente, sea para determinar la evolución de los pacientes y no el diagnóstico del cáncer de cabeza y cuello, resultaría evidente para un experto en la materia. Por tanto, la reivindicación 1, es nueva, pero no presenta actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.