

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 848**

21 Número de solicitud: 201301151

51 Int. Cl.:

G01N 21/65

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.12.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.08.2015

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, Pío Manuel;
CHIUSSI , Stefano;
SERRA RODRÍGUEZ , Julia;
STEFANOV, Stefan;
LÓPEZ ÁLVAREZ , Miriam y
VALDÉS PONS, Roberto**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico de cánceres de mucosa oral y faríngea**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de cánceres en la cavidad oral y faringe mediante el uso de la espectroscopía Raman, que comprende la cuantificación de las intensidades y áreas de una diversidad de las bandas Stokes del espectro y la definición y cálculo de índices que resultan de dividir las áreas de dos bandas diferentes. El diagnóstico se determina por proximidad de los valores de estos índices con los valores previamente obtenidos en células normales y en células cancerosas.

ES 2 543 848 A1

Procedimiento para el diagnóstico de cánceres en mucosa oral y faríngea

DESCRIPCIÓN

5 Antecedentes

Cánceres de cavidad oral y faringe

Cáncer de cabeza y cuello es un término amplio que abarca el grupo heterogéneo de cánceres que se presentan en las vías aéreas superiores y el tracto digestivo, incluyendo la cavidad oral, la faringe y la laringe. Más del 90% de estos cánceres se desarrollan en el epitelio escamoso de los revestimientos de la mucosa, por lo que se conoce como carcinoma de células escamosas. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de estos carcinomas son la exposición al tabaco y el consumo excesivo de alcohol. Se estima que este tipo de cáncer constituye el 6% del total y es la sexta causa de muerte relacionada con el cáncer. La incidencia del cáncer oral en España es de aproximadamente 6-13 casos por cada 100.000 hombres/año y 1-2 casos por cada 100.000 mujeres/año. La tasa global a los 5 años de supervivencia es de alrededor de 50-60% y depende principalmente de la etapa del tumor al momento del diagnóstico.

La histología es actualmente el método estándar para el diagnóstico de cánceres de la cavidad oral y la orofaringe. Ésta examina la morfología, grado de diferenciación y el número de mitosis presentes en la muestra. La precisión del método depende del muestreo apropiado de la lesión de que se trate y la correcta interpretación patológica. Junto con la histología, el tamaño, la afectación de los ganglios linfáticos, invasión perineural, invasión vascular y metástasis a distancia se tienen en cuenta con el fin de adaptar el tratamiento y decidir sobre la terapia adyuvante. Estos factores se utilizan como predictores de la agresividad del tumor y la probabilidad de recurrencia. Hay un período en la transformación maligna o carcinogénesis, en el que se definen las lesiones como pre-malignas. Éstas son la leucoplasia oral (OLK), hiperplasia, displasia mucosa (leve a severa) [P. Holmstrup, P. Vedtofte, J. Reibel, K. Stoltze, Oral Oncol. 2006, 42, 461]. Con la creciente capacidad proliferativa de las células hiperplásicas, el contenido y los tipos de ADN y ARN, proteínas y lípidos va a cambiar tanto cualitativa como cuantitativamente, lo que induce variaciones espectrales de células y tejidos. Todos estos cambios existen antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas y patológicas y, por tanto, ofrecen la oportunidad para el diagnóstico precoz del cáncer de cavidad oral. La identificación temprana y la delimitación de estas lesiones malignas, junto con una terapia eficaz son cruciales para mejorar las tasas de supervivencia de los pacientes.

Hoy en día, existe la necesidad clínica de nuevas tecnologías para diagnosticar estos estadios tempranos de la enfermedad e incrementar la rapidez con la que un médico puede hacer el diagnóstico y prescribir el tratamiento apropiado. Técnicas ópticas tales como la espectroscopia de dispersión elástica, técnicas de fluorescencia, espectroscopia infrarroja y la tomografía de coherencia óptica han sido evaluados para la detección de tumores de cabeza y cuello (Amelink A, Kaspers OP, Sterenborg HJ, van der Wal JE, Roodenburg JL, Witjes MJ: Non-invasive measurement of the morphology and physiology of oral mucosa by use of optical spectroscopy. Oral Oncol 2008, 44(1):65-71)), (Arens C, Reussner D, Woenkhaus J, Leunig A, Betz CS, Glanz H: Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions. Eur Arch Otorhinolaryngol 2007, 264(6):621-6), (Vokes DE, Jackson R, Guo S, et al: Optical coherence tomography enhanced microlaryngoscopy: preliminary report of a non-contact optical coherence tomography system integrated with a surgical microscope. Ann Otol Rhinol Laryngol 2008, 117:538-547)]. Entre ellos, la espectroscopía Raman ha mostrado un considerable potencial como herramienta de diagnóstico en el tracto aérodigestivo superior, así como en una gama de otros tejidos y órganos, incluyendo la vejiga, mama, hueso, pulmón, sangre, ganglios linfáticos, la laringe, estómago y colon.

Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica analítica de alta resolución cuyo principio se basa en la irradiación de un tejido diana con una luz láser monocromática y posterior registro de la luz dispersada inelásticamente, que constituye el espectro Raman. Los espectros de muestras biológicas muestran una “huella digital” (fingerprint) característica que viene determinada por el tipo de vibraciones moleculares específicas de los enlaces químicos, proporcionando así información de la composición química o bioquímica de los tejidos. La región Stokes del espectro Raman, situada entre 500 y 2000 cm^{-1} , se correlaciona con las vibraciones moleculares de importancia bioquímica; así pues, las estructuras y conformaciones bioquímicas específicas del tejido nos brindan una oportunidad única para distinguir entre diferentes tipos de tejidos. Dado que las enfermedades y otras anomalías patológicas conducen a cambios químicos y estructurales, se observan cambios en los espectros de vibración que pueden ser utilizados como marcadores fenotípicos, sensibles de la enfermedad. La espectroscopia Raman no requiere una preparación especial de la muestra ni marcadores, la presencia de agua no distorsiona el análisis, la adquisición del espectro es rápida y la intensidad de banda Raman es directamente proporcional a la concentración.

En la última década se han dado importantes avances tecnológicos en espectrometría y técnicas de computación que han permitido avanzar de forma significativa en la espectroscopia Raman aplicada a las ciencias biológicas y de la vida [DC de Veld DC, Bakker Schut TC, Skurichina

M, Witjes MJ, Van der Wal JE, Roodenburg JL, Sterenborg HJ. *Lasers Med Sci* 2005, 19(4):203-9], [N Stone, MSc (Dist.); Pela Stavroulaki, MD; Catherine Kendall, MSc (Dist.); Martin Birchall, MD; Hugh Barr, MD (Dist.). *Laryngoscope*, 110:1756–1763, 2000] [Harris AT, Garg M, Yang XB, Fisher SE, Kirkham J, Smith DA, Martin- Hirsch DP, High AS: Raman spectroscopy and advanced mathematical modelling in the discrimination of human thyroid cell lines. *Head Neck Oncol* 2009, 1(1): 38]. Se ha demostrado que el registro de los espectros Raman se puede realizar “in vitro” y “ex vivo” sin perturbar el entorno celular. Además, la técnica es capaz de detectar alteraciones mínimas en la composición bioquímica de las células vivas con el fin de producir una huella dactilar molecular para el diagnóstico del tejido diana.

La espectroscopía Raman en oncología

En oncología, la espectroscopía Raman se está investigando como una herramienta de diagnóstico para caracterizar los cambios malignos tempranos. Aunque los estudios clínicos en la cabeza y el cuello son escasos, [Yi Li, Zhi-Ning Wen, Long-Jiang Li, Meng-Long Li, Ning Gao and Yan-Zhi Guo, *J. Raman Spectrosc.* 2010, 41, 142–147] demuestran en su publicación que la diferencia en los espectros entre la mucosa normal y el carcinoma es sutil pero los valores de sus variaciones son estadísticamente significativas. La comparación de los espectros Raman mostró un aumento de intensidad en las bandas Raman asociadas a las proteínas y el contenido de ADN, vinculadas ambas a la cancerización. Por su parte, investigadores del *Hospital Universitario de Groningen* [de Veld 2005, *vide supra*] publicaron un estudio con 37 pacientes con lesiones de la mucosa oral, mostrando variaciones claras entre diferentes capas de células (capa de tejido conectivo frente a queratina / epitelio). El grupo de *Investigación Biofotónica en el Hospital Royal Gloucestershire* [G Shetty, C Kendall, N Shepherd, N Stone, H Barr. *Br J Cancer* 2006, 94(10): 1460-4] demostró que la espectroscopía Raman es una técnica muy sensible y específica para la identificación de los cambios bioquímicos en la carcinogénesis del esófago de Barrett. Ya en el año 2000, Stone *et al.* [Stone 2000, *vide supra*] examinaron el uso de espectroscopía Raman en la detección de tumores malignos de laringe a partir de quince muestras de pacientes de distintas edades (18 a 79 años). Estos autores pudieron analizar por Raman tres tipos de muestras (carcinoma de células normales, displásicas y de células escamosas), con unas sensibilidades entre 76 y 92%, dependiendo del tipo de tejido examinado, y determinaron que las diferencias espectrales están asociadas a variaciones en el ADN, aminoácidos, colágeno y glicolípidos. Recientemente, Wen-Liang Jo *et al* [Wen-Liang Lo, Jian-Yun Lai, Stephen E. Feinberg, Kenji Izumi, Shou-Yen Kao, Che-Shoa Chang, Alan Lin and Huihua Kenny Chiang. *J. Raman Spectrosc.* 2011, 42, 174–178.] y Deshmukh *et al* [Atul Deshmukh; S. P. Singh; Pankaj Chaturvedi; C. Murali Krishna. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(12)] encontraron por microRaman diferencias moleculares entre la mucosa oral normal y anormal (carcinoma de células escamosas) y evaluaron la variación del contenido de las

proteínas, el ADN y los lípidos, permitiendo así identificar varios índices de malignidad para carcinomas.

Existen aplicaciones de variantes de esta técnica para distinguir tejidos sanos y carcinomas referidos a otras patologías. Por ejemplo, en la patente “Distinguishing between invasive ductal carcinoma and invasive lobular carcinoma using Raman molecular imaging” (WO2009035946A1) se muestran ejemplos donde se registran bases de datos de espectros de imagen Raman aplicados a tipos de tejidos de cáncer de próstata, hígado o pecho. O más recientemente en WO2011072380A1. Estas difusiones no afectan en principio a la presente invención por no tratarse del mismo método ni patología.

Descripción de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de cáncer de mucosa oral y faríngea por medio de espectroscopía Raman que comprende las siguientes etapas:

-Toma de muestra de células (*in vitro* o “*ex vivo*”)

-Irradiación de una muestra con una luz láser comprendida dentro de los rangos tanto de ultravioleta, infrarrojo o visible y registro del espectro Raman de la muestra en el rango 100 - 3500 cm^{-1} , más particularmente entre 950 -1800 cm^{-1} .

-Cuantificación de las intensidades y áreas de una diversidad de las bandas Stokes del espectro Raman.

-Se definen y calculan índices que resultan de dividir las áreas de dos bandas diferentes:

-Se determina el diagnóstico por proximidad de los valores de estos índices con los valores previamente obtenidos en células normales y en células cancerosas.

	Valor en células normales	Valor en células cancerosas	Valor en células muestra
Índice A			
Índice B			
Índice C			

Otro aspecto de la invención se refiere a la diversidad de modos de toma de la muestra, que permite el análisis de muestras tanto *in vitro* como *ex vivo* en el laboratorio utilizando equipos de Raman convencionales.

En otro aspecto de la invención el presente procedimiento es aplicable a diferentes tipos de cáncer (neoplasias), entre ellos, los del tracto aerodigestivo superior, estómago, colon, vejiga, mama, hueso, pulmón, hígado y próstata.

5 En otro aspecto de la invención el presente procedimiento es aplicable al diagnóstico de neoplasias en diferentes estadios, tales como la leucoplasia oral, hiperplasia, displasia mucosa (leve a severa), que pueden considerarse como lesiones pre-malignas o potencialmente malignas, anteriores a la aparición de manifestaciones clínicas y patológicas, permitiendo así el diagnóstico precoz del cáncer de cavidad oral.

10

Este procedimiento puede utilizar con una diversidad de tipos de láseres que emiten en el rango visible, tales como el láser de He-Ne (632 nm), láser de diodo (637 nm, 785 nm) o similar. También los láseres emisores de radiación en los rangos ultravioleta (habitualmente 488 nm o 532 nm) o en el infrarrojo cercano, como el láser de Nd-YAG (1064 nm) pueden utilizarse.

15

Este procedimiento puede ser implementado por ordenador u otros medios electrónicos para facilitar y agilizar el tratamiento de la información diagnóstica.

Descripción de los dibujos

20 Figura. 1. Espectro Raman de células de mucosa con carcinoma epidermoide.

Figura. 2. Espectro Raman de células de mucosa sana

Descripción detallada de la invención

25 En un modo de realización particular, se han identificado y cuantificado las áreas de las bandas de Stokes asociadas a la fenilalanina (1003 cm^{-1}), amida III ($1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$), amida I (1665 cm^{-1}) y grupos C-H (1450 cm^{-1}).

A continuación se ha definido y calculado los siguientes índices:

30 Índice P (proteínico) = área banda amida III / área banda grupos CH
Índice F (fenilalanínico) = área banda amida III / área banda fenilalanina
Índice L (lipídico) = área banda fenilalanina / área banda amida I

Como un ejemplo de realización preferida se describe el siguiente procedimiento para el diagnóstico *in vitro* y *ex vivo* del carcinoma epidermoide:

35

1. Toma de muestra de mucosa humana oral/faríngea (epitelio pseudoestratificado no queratinizado) de aspecto sano y patológico (carcinoma epidermoide)

2. Preparación con micrótopo, sobre portaobjetos con recubrimiento metálico, de una sección cuyo espesor esté comprendido entre 15 y 120 micras.
3. Registro del espectro Raman en el rango $950 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ con un equipo convencional dotado de un láser de He-Ne, de diodo o similar, que emita en torno a 633 nm.
- 5 4. Evaluación del espectro y cuantificación de las intensidades y áreas de las bandas Stokes asociadas a la fenilalanina (1003 cm^{-1}), amida III ($1200-1400 \text{ cm}^{-1}$), amida I (1665 cm^{-1}) y grupos C-H (1450 cm^{-1}).
5. A partir de las razones de las áreas de dichas bandas se determinan los siguientes índices:

10

Índice P (proteínico) = área banda amida III / área banda grupos CH

Índice F (fenilalanínico) = área banda amida III / área banda fenilalanina

Índice L (lipídico) = área banda fenilalanina / área banda amida I

6. Se elabora el diagnóstico por comparación de los valores de estos índices con los parámetros de normalidad y malignidad determinados para el carcinoma epidermoide.

15

	parámetros de normalidad	parámetros de malignidad
Índice P (proteínico)	$0,87 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,1$
Índice F (fenilalanínico)	$10,0 \pm 0,7$	$19,1 \pm 1,9$
Índice L (lipídico)	$0,20 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$

EJEMPLO 1:

- 20 *Determinación de índices en células de carcinoma epidermoide de mucosa oral/faríngea "ex vivo".*

Se toma una muestra del tejido mucosa humana faríngea (epitelio pseudoestratificado no queratinizado) de aspecto patológico (carcinoma epidermoide).

- 25 Se prepara con micrótopo una sección del tejido de espesor 15 micras y se coloca sobre un portaobjetos con recubrimiento de aluminio.

Se utiliza un espectrómetro micro-Raman (Horiba Jobin Yvon LABRam-HR800, resolución 4 cm^{-1} , 950 grooves/mm) equipado con un microscopio confocal (magnificación 50x) y un láser He-Ne (633 nm, energía máxima de 11,5 mW).

- 30 Se registra el espectro Raman en el rango entre 800 y 1800 cm^{-1} , con un barrido de 15 segundos y un acumulado de 5 barridos, (Fig. 1).

Se evalúa y cuantifica (Tabla 1) el espectro registrado determinando el área de las bandas asociadas a la fenilalanina (1003 cm^{-1}), amida III ($1200\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$), amida I (1665 cm^{-1}) y grupos C-H (1450 cm^{-1}).

Tabla 1

Amida III	Ph	Amida I	C-H
88167,704	5732,19	55339,96	84261,62
85397,01	3944,7	32327,06	62349,68
124194,81	6607,6	28876,63	94763,62
60505,038	4654,27	35693,49	74462,4
89400,51	3699,93	24393,47	66121,91

5

Se determinan los valores de los índices P, L y F (Tabla 2). El conjunto de datos se compara con los parámetros de normalidad y de malignidad, que permite concluir que el diagnóstico corresponde a un carcinoma epidermoide.

10

Tabla 2

	Parámetros de la muestra	Parámetros de normalidad	Parámetros de malignidad
Índice P (proteínico)	1,2	$0,87 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,1$
Índice F (fenilalanínico)	18,2	$10,0 \pm 0,7$	$19,1 \pm 1,9$
Índice L (lipídico)	0,13	$0,20 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$

15 EJEMPLO 2:

Determinación de índices en células de mucosa oral/faríngea sana "ex vivo".

Se toma una muestra del tejido mucosa humana faríngea (epitelio pseudoestratificado no queratinizado) de aspecto sano.

20 Se prepara con micrótopo una sección del tejido de espesor 15 micras y se coloca sobre un portaobjetos con recubrimiento de aluminio.

Se utiliza un espectrómetro micro-Raman (Horiba Jobin Yvon LABRam-HR800, resolución 4 cm^{-1} , 950 grooves/mm) equipado con un microscopio con focal (magnificación 50x) y un láser He-Ne (633 nm, energía máxima de 11,5 mW).

Se registra el espectro Raman en el rango entre 800 y 1800 cm^{-1} , con un barrido de 15 segundos y un acumulado de 5 barridos, (Fig. 2).

Se evalúa y cuantifica (Tabla 3) el espectro registrado determinando el área de las bandas asociadas a la fenilalanina (1003 cm^{-1}), amida III (1200-1400 cm^{-1}), amida I (1665 cm^{-1}) y grupos C-H (1450 cm^{-1}).

Tabla 3

Amida III	Ph	Amida I	C-H
87747,83	6928,28	50444,64	83354,77
36280,14	4587,88	26287,07	44201,84
40323,4	5655,88	21900,26	46341,47
86482,09	7822,28	31966,84	95463,12
84550,94	6600,31	33865,38	92501,96

Se determinan los valores de los índices P, L y F (Tabla 4). El conjunto de datos se compara con los parámetros de normalidad y de malignidad, que permite concluir que el diagnóstico corresponde a un mucosa sana.

Tabla 4

	Parámetros de la muestra	Parámetros de normalidad	Parámetros de malignidad
Índice P (proteínico)	0,92	$0,87 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,1$
Índice F (fenilalanínico)	10,6	$10,0 \pm 0,7$	$19,1 \pm 1,9$
Índice L (lipídico)	0,19	$0,20 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* y *ex vivo* para el diagnóstico de carcinoma epidermoide de mucosa oral y faríngea **que comprende** las siguientes etapas ;
 - a) irradiación de tejido de células epiteliales con una luz láser comprendida en los rangos ultravioleta, infrarrojo o visible y registro del espectro Raman en el rango $950-1800\text{ cm}^{-1}$,
 - b) cuantificación de las intensidades y áreas de las bandas Stokes del espectro Raman,
 - c) calcular índices relativos que resultan de dividir las áreas de dos bandas diferentes,
 - d) determinar el diagnóstico por proximidad de los valores de estos índices con los valores previamente obtenidos en células normales y en células cancerosas.
2. Procedimiento *in vitro* y *ex vivo* para el diagnóstico de carcinoma epidermoide de mucosa oral y faríngea por medio de espectroscopia Raman, según reivindicación 1, **caracterizado por:**
 - identificar y cuantificar en la etapa b) las áreas de las bandas de Stokes asociadas a la fenilalanina (1003 cm^{-1}), amida III ($1200-1400\text{ cm}^{-1}$), amida I (1665 cm^{-1}) y grupos C-H (1450 cm^{-1}).
 - definir y calcular los siguientes índices en la etapa c):
 - Índice P (proteínico) = área banda amida III / área banda grupos CH
 - Índice F (fenilalanínico) = área banda amida III / área banda fenilalanina
 - Índice L (lipídico) = área banda fenilalanina / área banda amida I
3. Procedimiento *in vitro* y *ex vivo* para el diagnóstico de carcinoma epidermoide de mucosa oral y faríngea por medio de espectroscopia Raman, según reivindicaciones 1-2, **caracterizado por** el hecho de que las etapas a) a d) son implementadas por ordenador.
4. Procedimiento *in vitro* y *ex vivo* para el diagnóstico de carcinoma epidermoide de mucosa oral y faríngea, según reivindicaciones 1-3 **caracterizado por** comprender además una etapa previa de preparación de la muestra.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 1-4 para el diagnóstico de diferentes estadios de neoplasias de carcinoma epidermoide de mucosa oral y faríngea.

Figura. 1

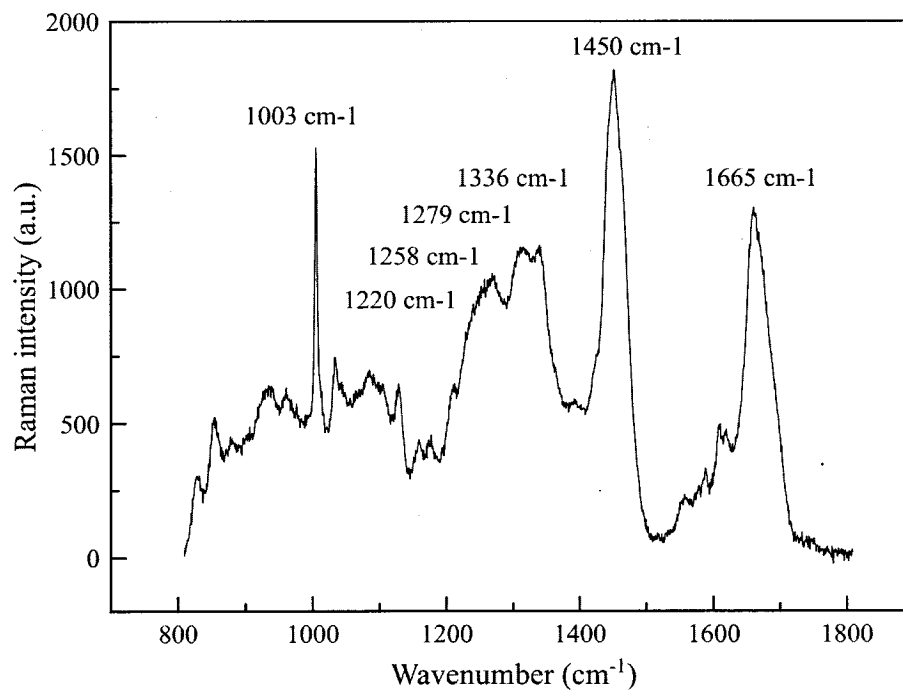
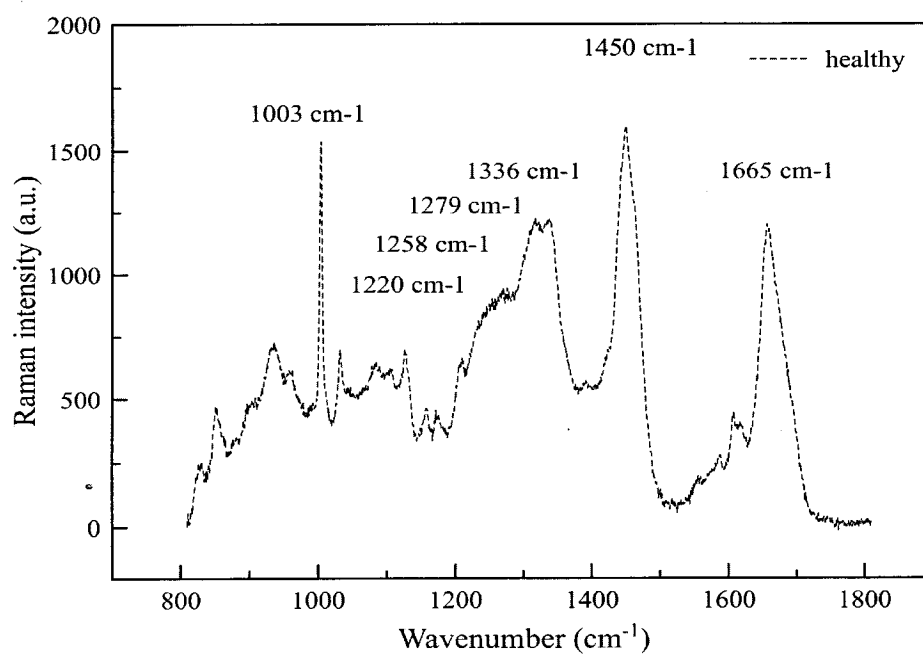


Figura. 2





- ②① N.º solicitud: 201301151
②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.12.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N21/65** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LI Z. et al. Raman microspectroscopy as a diagnostic tool to study single living nasopharyngeal carcinoma cell lines. Biochem Cell Biol. 09.11.2012, Vol. 91, páginas 182-186 (todo el documento).	1
X	YE Y. et al. Characterization and discrimination of nasopharyngeal carcinoma and nasopharyngeal normal cell lines using confocal Raman microspectroscopy. Spectroscopy. 2011, Vol. 25, páginas 217-224 (todo el documento).	1
A	KHMALADZE A. et al. Tissue-Engineered Constructs of Human Oral Mucosa examined by Raman Spectroscopy. Tissue Engineering: Part C. 16.11.2012, Volumen 19, Número 4, páginas 299-306 (todo el documento).	1-5
A	KRISHNAKUMAR N. et al. Raman spectroscopic investigation of the chemopreventive response of naringenin and its nanoparticles in DMBA-induced oral carcinogenesis. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 18.06.2013, Vol. 115, páginas 648-653 (todo el documento).	1-5

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
30.01.2015

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/4

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

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, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.01.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-5	SI
	Reivindicaciones	1	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	2-5	SI
	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 se publica.

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	LI Z. et al. Biochem Cell Biol., Vol.91, páginas 182-186	09.11.2012
D02	YE Y. et al. Spectroscopy. Vol. 25, páginas 217-224	2011
D03	KHMALADZE A. et al. Tissue Engineering: Part C. Volumen 19, Número 4, páginas 299-306	16.11.2012
D04	KRISHNAKUMAR N. et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. Vol. 115, páginas 648-653	18.06.2013

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

Procedimiento *in vitro* y *ex vivo* para el diagnóstico de carcinoma epidermoide de mucosa oral y faríngea que comprende las siguientes etapas: a) irradiación con una luz láser y registro del espectro Raman; b) cuantificación de las intensidades y áreas de las bandas Stokes del espectro Raman; c) calcular índices relativos que resultan de dividir las áreas de dos bandas diferentes; d) determinar el diagnóstico por proximidad de los valores de estos índices con los valores previamente obtenidos en células normales y en células cancerosas (reivindicación 1). En la etapa b) se identifican y cuantifican las áreas de las bandas de Stokes asociadas a fenilalanina (1003 cm⁻¹), amida III (1200-1400 cm⁻¹), amida I (1665 cm⁻¹) y grupos C-H (1450 cm⁻¹) y se calculan los índices P (área banda amida III / área banda grupos CH), F (área banda amida III / área banda fenilalanina) y L (área banda fenilalanina / área banda amida I) en la etapa c) (reivindicaciones 2 a 5).

D01 prueba el potencial de la espectroscopía Raman en el diagnóstico del carcinoma nasofaríngeo.

D02 estudia la utilidad de la espectroscopía Raman en el diagnóstico del carcinoma nasofaríngeo.

D03 demuestra la aplicación de la espectroscopía Raman a la construcción de equivalentes de mucosa oral *in vitro* (EVPOMEs) y a la monitorización de los injertos *in situ*. Para ello analiza las bandas correspondientes a fenilalanina, amida I, amida III y grupos CH y estudia los índices obtenidos al dividir las áreas de las bandas de CH y fenilalanina y las áreas de las bandas de amida III y fenilalanina. Este último índice se emplea para determinar el efecto de rapamicina, sustancia de efecto antitumoral e inhibidor del crecimiento celular.

D04 estudia mediante espectroscopía Raman los cambios biomoleculares que se producen en respuesta al efecto preventivo de nanopartículas de naringenina en carcinogénesis oral. Para ello analiza numerosas bandas, como las correspondientes a fenilalanina, amida I, amida III y grupos CH.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**REIVINDICACIÓN 1**

D01 prueba el potencial de la espectroscopía Raman en el diagnóstico del carcinoma nasofaríngeo. Con este fin se lleva a cabo el análisis de numerosas bandas, entre ellas las correspondientes a amida I, amida III, fenilalanina y grupos CH y, además, se estudia el índice que resulta de dividir las áreas de las bandas de los grupos CH y de amida I.

D02 estudia la utilidad de la espectroscopía Raman en el diagnóstico del carcinoma nasofaríngeo analizando, entre otras, las bandas correspondientes a amida I, amida III, fenilalanina y grupos CH. También estudia el índice que resulta de dividir las áreas de las bandas de los grupos CH y de amida I.

En consecuencia, las características de la reivindicación 1 ya son conocidas por lo que esa reivindicación no se puede considerar nueva a la vista del estado de la técnica ni, por tanto, presenta actividad inventiva.

REIVINDICACIONES 2 a 5

En la documentación y bases de datos que han sido consultadas se han encontrado documentos que divulgan el diagnóstico del carcinoma de mucosa oral y faríngea que comprende la irradiación con una luz láser y registro del espectro Raman, así como la cuantificación de las intensidades y áreas de las bandas Stokes del espectro Raman y el cálculo de los índices relativos que resultan de dividir las áreas de dos bandas diferentes, incluidas algunas de las reivindicadas. Sin embargo, en los documentos mencionados no se ha encontrado que se lleve a cabo, en concreto, el análisis de los tres índices que son objeto de la presente solicitud. Por consiguiente, las reivindicaciones 2 a 5 son nuevas y presentan actividad inventiva.