

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 530**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2011** **E 21200018 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024** **EP 3955004**

54 Título: **Uso de ácidos grasos en métodos para detectar el cáncer**

30 Prioridad:

23.06.2010 US 35764210 P

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

26.11.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
300 East Market Street, Suite 300
Louisville, KY 40202-1959, US**

72 Inventor/es:

**FAN, TERESA WHEI-MEI;
LANE, ANDREW NICHOLAS;
HIGASHI, RICHARD M. y
BOUSAMRA, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 989 530 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

Uso de ácidos grasos en métodos para detectar el cáncer

5 Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 61/357,642, presentada el 23 de junio de 2010.

10 Derechos gubernamentales

Esta invención se realizó en parte con el apoyo del gobierno bajo la subvención número EPS-0447479 otorgada por la Fundación Nacional de Ciencias/Oficina del Programa Experimental para Estimular la Investigación Competitiva (EPSCoR). El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

15 Antecedentes

El cáncer es una causa importante de muerte y sufrimiento y representa un costo importante para los sistemas médicos en los Estados Unidos y en todo el mundo. La detección temprana se asocia con mejores opciones de tratamiento y mejores resultados. Por lo tanto, la detección temprana del cáncer puede ayudar a minimizar tanto el sufrimiento como el costo, al tiempo que, típicamente, aumenta las posibilidades de supervivencia. Por tanto, algunas modalidades de la invención son métodos para determinar la presencia de cánceres en animales.

25 Resumen

La invención consiste en métodos para determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en un animal que comprende determinar cantidades lipídicas de lípidos en un conjunto de lípidos que comprende PC 38:5 en una muestra del animal, y determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en el animal con un modelo predictivo. En estos métodos, las cantidades lipídicas de los lípidos en el conjunto de lípidos comprenden una entrada del modelo predictivo, y la muestra comprende un líquido corporal o un tratamiento de este.

En algunas modalidades, el líquido corporal se selecciona del grupo que consiste en plasma, vómito, cerumen, jugo gástrico, leche materna, moco, saliva, sebo, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, suero sanguíneo, humor acuoso, humor vítreo, endolinfa, perilinfa, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, líquido aspirado del pezón, orina, heces y líquido de lavado bronquioalveolar. En aún otras modalidades, el líquido corporal es sangre o plasma. En aún otras modalidades, la muestra comprende una fracción de microvesículas lipídicas.

En algunas modalidades ilustrativas, el conjunto de lípidos comprende al menos 10 lípidos, al menos 50 lípidos, al menos 100 lípidos, al menos 200 lípidos o no más de 100 000 lípidos.

En algunos casos, el conjunto de lípidos comprende, además, uno o más lípidos seleccionados de la una o más clases de lípidos seleccionados del grupo que consiste en BMP, CE, Cer, DAG, DH-LTB4, FA, GA2, GM3, HexCer, HexDHCer, LacCer, LisoPA, LisoPC, LisoPC-pmg, LisoPE, LisoPE-pmg, LisoPS, MAG, PC, PC-pmg, PE, PE-pmg, PGA1, PGB1, SM, esfingosina, TAG y TH-12-ceto-LTB4. En otros casos, el conjunto de lípidos comprende uno o más lípidos seleccionados de la una o más clases de lípidos seleccionados del grupo que consiste en FA, MAG, DAG, TAG, PI, PE, PS, PI, PG, PA, LisoPC, LisoPE, LisoPS, LisoPI, LisoPG, LisoPA, LisoPC, LisoPE, BMP, SM, Cer, Cer-P, HexCer, GA1, GA2, GDI, GD2, GM1, GM2, GM3, GT1 y CE. En aún otros casos, uno o más lípidos adicionales

50 en el conjunto de lípidos se seleccionan del grupo que consiste en (32:1) y TAG (54:4).

En algunas modalidades, el al menos un tipo de cáncer comprende cáncer de pulmón.

En algunas modalidades de la invención, el al menos un tipo de cáncer comprende cáncer de mama.

En algunas modalidades de las invenciones, el al menos un tipo de cáncer comprende cáncer de pulmón y cáncer de mama.

En algunas modalidades de la invención, las cantidades lipídicas se determinan mediante el uso de espectrometría de masas, tal como con un analizador de masas por resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier.

En otras modalidades, la muestra es un tratamiento de un líquido corporal. Por ejemplo, la muestra puede ser un tratamiento de un líquido corporal que comprende una o más extracciones mediante el uso de una o más soluciones que comprenden acetonitrilo, agua, cloroformo, metanol, hidroxitolueno butilado, ácido tricloroacético o sus combinaciones.

En algunas modalidades, el modelo predictivo comprende uno o más métodos de reducción de dimensiones, tales como uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en análisis de componentes principales (PCA), modelado independiente suave de analogía de clases (SIMCA), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales (OPLS-DA).

En algunas modalidades de la invención, el animal se selecciona del grupo que consiste en humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, pollo, pavo, ratón y rata.

En otras modalidades de la invención, el al menos un tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas, sarcomas, cánceres hematológicos, neoplasias malignas neurológicas, carcinoma de células basales, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de ovario, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, rhabdomyosarcoma, glioblastoma multiforme, meningioma, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, glioma, cáncer oral, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de riñón, cáncer de recto, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de médula ósea, cáncer de estómago, cáncer de útero, leucemia, carcinoma de células basales, cánceres relacionados con células epiteliales, cánceres que pueden alterar la regulación o actividad de la piruvato carboxilasa y tumores asociados con cualquiera de los tipos de cáncer mencionados anteriormente.

En modalidades adicionales, el método comprende determinar la presencia o ausencia de más de un tipo de cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos siguientes forman parte de la presente descripción y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor mediante referencias a uno o más de esos dibujos en combinación con la descripción de las modalidades específicas presentadas en la presente descripción.

Figura 1. Diacilgliceroles en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 2. Fosfatidilcolinas en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 3. Fosfatidilcolinas en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 4. Fosfatidilcolinas en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 5. Fosfatidilcolinas en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 6. Fosfatidiletanolaminas en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 7. Fosfatidiletanolaminas en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 8. Fosfatidiletanolaminas en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 9. Fosfatidiletanolaminas-pmg en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 10. Fosfatidiletanolaminas-pmg en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 11. Triacilgliceroles en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 12. Monoacilgliceroles en muestras de humanos con cáncer de pulmón, cáncer de mama y sin cáncer (control).

Figura 13. Clases de lípidos en muestras de humanos que comparan el tipo de cáncer.

Figura 14. Gráfico de puntuaciones de PCA PC1-PC3 para muestras de cáncer de mama, control y cáncer de pulmón: 4 componentes, $R^2X = 0,475$, $Q^2 = 0,296$.

Figura 15. Gráfico de cargas de PCA PC1-PC3 para muestras de cáncer de mama, control y cáncer de pulmón: 4 componentes, $R^2X = 0,475$, $Q^2 = 0,296$.

Figura 16. Gráfico de puntuaciones de OPLS-DA que separa las muestras de cáncer de pulmón y de control:

componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,253$, $R^2Y = 0,619$, $Q^2 = 0,345$.

Figura 17. Gráfico de coeficientes de OPLS-DA que separa las muestras de cáncer de pulmón y de control: componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,253$, $R^2Y = 0,619$, $Q^2 = 0,345$. El gráfico de coeficientes indica lípidos elevados en las muestras de control.

Figura 18. Gráfico de coeficientes de OPLS-DA que separa las muestras de cáncer de pulmón y de control: componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,253$, $R^2Y = 0,619$, $Q^2 = 0,345$. El gráfico de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de cáncer de pulmón.

Figura 19. Gráfico de puntuaciones de OPLS-DA que separa las muestras de cáncer de mama y de control: componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,281$, $R^2Y = 0,762$, $Q^2 = 0,625$.

Figura 20. Gráfico de coeficientes de OPLS-DA que separa las muestras de cáncer de mama y de control: componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,281$, $R^2Y = 0,762$, $Q^2 = 0,625$. El gráfico de coeficientes indica lípidos elevados en las muestras de control.

Figura 21. Gráfico de coeficientes de OPLS-DA que separa las muestras de cáncer de mama y de control: componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,281$, $R^2Y = 0,762$, $Q^2 = 0,625$. El gráfico de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de cáncer de mama.

Figura 22. Gráfico de puntuaciones de OPLS-DA que separa las muestras de cáncer de pulmón y de cáncer de mama: componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,309$, $R^2Y = 0,816$, $Q^2 = 0,725$.

Figura 23. Gráfico de coeficientes de OPLS-DA que separa las muestras de cáncer de pulmón y de cáncer de mama: componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,309$, $R^2Y = 0,816$, $Q^2 = 0,725$. El gráfico de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de cáncer de pulmón.

Figura 24. Gráfico de coeficientes de OPLS-DA que separa las muestras de cáncer de pulmón y de cáncer de mama: componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,309$, $R^2Y = 0,816$, $Q^2 = 0,725$. El gráfico de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de cáncer de mama.

Figura 25. Un diagrama de flujo que representa una modalidad de uno de los métodos descritos en la presente descripción. El estado cáncer puede incluir la presencia o ausencia de uno o más tipos de cáncer.

Descripción detallada

Algunas modalidades de la invención incluyen métodos para detectar la presencia o ausencia de uno o más tipos de cáncer mediante la determinación de la cantidad de lípidos en un conjunto de lípidos en una muestra. La muestra puede ser un líquido corporal (o un tratamiento de este) de un animal. En algunos casos, la muestra (por ejemplo, un extracto de líquido corporal) comprende una concentración de microvesículas lipídicas que es superior a la que se encuentra normalmente en un líquido corporal. Las cantidades lipídicas en el conjunto de lípidos se analizaron mediante el uso de un modelo predictivo para determinar la presencia o ausencia de uno o más tipos de cáncer.

Los lípidos se designan de acuerdo con la siguiente notación XXX (YY:ZZ). XXX es la abreviatura para el grupo de lípidos (en muchos casos indica el grupo principal de lípidos) como se proporciona, por ejemplo, en la Tabla 1. YY es el número de carbonos en la cadena de acilo. ZZ es el número de dobles enlaces en las cadenas de acilo.

El término lípido, tal como se usa en la presente descripción, se define como una colección de uno o más isómeros. Por ejemplo, PC (36:1) es un lípido y es la colección de uno o más de los isómeros de fosfatidilcolina que tienen 36 carbonos en la cadena de acilo y un doble enlace en cualquiera de las dos cadenas de acilo; estos isómeros tienen pesos moleculares idénticos. Aunque el término lípido puede abarcar toda la colección de isómeros, la muestra puede, de hecho, tener solo un isómero, varios isómeros o cualquier número de isómeros menor que el número total de todos los isómeros posibles en una colección. En consecuencia, lípido puede referirse a uno o más de los isómeros que conforman la colección completa de posibles isómeros.

El término conjunto de lípidos se define para incluir uno o más lípidos.

El término cantidad lipídica (y frases similares tales como cantidades de lípidos o cantidad de un lípido) se define para abarcar una cantidad absoluta de un lípido (por ejemplo, en mmoles) o una cantidad relativa de un lípido (por ejemplo, en % de intensidad relativa).

La Tabla 1 proporciona las abreviaturas de los nombres de los lípidos usados en los datos; se proporcionan otras abreviaturas en el texto según sea necesario.

Tabla 1

Abreviatura	Nombre
BMP	Bis(monoacilglicero)fosfatos
CE	Ésteres de colesterol
Cer	Ceramidas
DAG	Diacilgliceroles
DH-LTB4	Dihidroleucotrieno b4
FA	Ácidos grasos
GA2	Gangliósidos A2
GM3	Gangliósidos M3
HexCer	Ceramidas de hexosa
HexDHCer	Hexosil dihidroceramida
LacCer	Lactosil ceramida
LisoPA	Ácido lisofosfatídico
LisoPC	Lisofosfatidilcolinas
LisoPC-pmg	Lisofosfatidilcolinas-plasmalógenos
LisoPE	Lisofosfatidiletanolaminas
LisoPE-pmg	Lisofosfatidiletanolaminas-plasmalógenos
LisoPS	Lisofosfatidilserinas
MAG	Monoacilgliceroles
PC	Fosfatidilcolinas
PC-pmg	Fosfatidilcolinas-plasmalógenos
PE	Fosfatidiletanolaminas
PE-pmg	Fosfatidiletanolaminas-plasmalógenos
PGA1	Prostaglandina A1
PGB1	Prostaglandina B1
SM	Esfingomielinas
Esfingosina	Esfingosina
TAG	Triacilgliceroles
TH-12-ceto-LTB4	Tetrahidro-12-ceto-leucotrieno b4

Los líquidos corporales pueden ser cualquier líquido corporal adecuado para la determinación del cáncer e incluyen, pero no se limitan a vómito, cerumen (tapón de cerumen), jugo gástrico, leche materna, moco (por ejemplo, drenaje nasal y flema), saliva, sebo (aceite de la piel), semen (que incluye el líquido prostático), sudor, lágrimas, secreción vaginal, suero sanguíneo, humor acuoso, humor vítreo, endolinf, perilinf, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, líquido aspirado del pezón, orina, heces, líquido de lavado bronquioalveolar, sangre periférica, suero, plasma, ascitis, líquido cefalorraquídeo (CSF), esputo, médula ósea, líquido sinovial, humor acuoso, líquido amniótico, líquido de Cowper o líquido preeyaculatorio, eyaculación femenina, materia fecal, cabello, líquido de quiste, líquido pleural y peritoneal, líquido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bilis, líquido intersticial, menstruación, pus, secreciones vaginales, secreción mucosa, agua de heces, jugo pancreático, líquidos de lavado de las cavidades sinusales, aspirados broncopulmonares u otros líquidos de lavado. Un líquido corporal puede incluir, además, la cavidad del blastocito, la sangre del cordón umbilical o de la circulación materna que puede ser de origen fetal o materno.

El líquido corporal puede obtenerse de cualquier tejido animal (por ejemplo, tejidos de mamíferos), que incluye, pero no se limita a tejido conectivo, tejido muscular, tejido nervioso, tejido adiposo, tejido endotelial o tejido epitelial. El tejido puede ser al menos parte de un órgano o parte de un sistema de órganos. Los órganos pueden incluir, pero no se limitan a corazón, sangre, vasos sanguíneos, glándulas salivales, esófago, estómago, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestino grueso, intestino delgado, recto, ano, colon, glándulas endocrinas (por ejemplo, hipotálamo, pituitaria, cuerpo pineal, tiroides, paratiroides y glándulas suprarrenales), riñones, uréteres, vejiga, uretra, piel, cabello, uñas, linfa, ganglios linfáticos, vasos linfáticos, leucocitos, amígdalas, adenoides, timo, bazo, músculos, cerebro, médula espinal, nervios periféricos, nervios, órganos sexuales (por ejemplo, ovarios, trompas de Falopio, útero, vagina, glándulas mamarias (por ejemplo, mamas), testículos, conductos deferentes, vesículas seminales, próstata y pene), faringe, laringe, tráquea, bronquios, pulmones, diafragma, huesos, cartílago, ligamentos o tendones. Los sistemas de órganos pueden incluir, pero no se limitan a sistema circulatorio, sistema digestivo, sistema endocrino,

sistema excretor, sistema tegumentario, sistema linfático, sistema muscular, sistema nervioso, sistema reproductivo, sistema respiratorio o sistema esquelético.

Los líquidos corporales pueden congelarse en nitrógeno líquido. La preparación de los líquidos corporales eliminados puede realizarse de cualquier manera adecuada.

El líquido corporal puede obtenerse a través de un tercero, tal como una parte que no realiza el análisis. Por ejemplo, el líquido corporal puede obtenerse a través de un clínico, médico u otro administrador de atención médica de un sujeto del cual se deriva la muestra. En algunas modalidades, el líquido corporal puede obtenerse por la misma parte que realiza el análisis.

En algunas modalidades, el líquido corporal es la muestra. En otras modalidades, el líquido corporal se trata para proporcionar la muestra. El tratamiento puede incluir cualquier método adecuado, que incluye, pero no se limita a extracción, centrifugación (por ejemplo, ultracentrifugación), liofilización, fraccionamiento, separación (por ejemplo, mediante el uso de cromatografía en columna o en gel) o evaporación. En algunos casos, este tratamiento puede incluir una o más extracciones con soluciones que comprenden cualquier solvente adecuado o combinaciones de solventes, tales como, pero no limitado a acetonitrilo, agua, cloroformo, metanol, hidroxitolueno butilado, ácido tricloroacético, tolueno, hexano, benceno o sus combinaciones. Por ejemplo, en algunas modalidades, las fracciones de sangre se extraen con una mezcla que comprende metanol e hidroxitolueno butilado. En algunos casos, la muestra (por ejemplo, un extracto de líquido corporal o una fracción de microvesículas lipídicas de plasma sanguíneo) comprende una concentración de microvesículas lipídicas que es superior a la que se encuentra normalmente en un líquido corporal.

El volumen de la muestra (por ejemplo, el líquido corporal o el tratamiento de este) usado para analizar puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 20 ml, tal como, no más de aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1 o aproximadamente 0,1 ml.

Amplias clases de lípidos que pueden formar parte de un conjunto de lípidos incluyen, pero no se limita a ácidos grasos (caracterizados por un grupo carboxilo y una cadena acilo), glicerolípidos (caracterizados por la presencia de una cadena principal de glicerol con uno: monoacilgliceroles (MAG), dos: diacilgliceroles (DAG) o tres: triacilgliceroles (TAG), cadenas de ácidos grasos unidas por éster), glicerofosfolípidos (GPL) (caracterizados por una cadena principal de glicerilo con dos cadenas de acilo unidas por éster y un grupo de cabeza polar unido por fosfato; los GPL incluyen fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS), fosfatidilgliceroles (PG), fosfatidilinositoles (PI), inositol y ácidos fosfatídicos), lisoglicerofosfolípidos (LGPL) (a los LGPL les falta una de las cadenas de acilo en la cadena principal de glicerol, por ejemplo, en la posición C2: los LGPL incluyen lisofosfatidilcolinas (LisoPC), lisofosfatidiletanolaminas (LisoPE), lisofosfatidilserinas (LisoPS), lisofosfatidilgliceroles (LisoPG), lisofosfatidilinositoles (LisoPI), lisoinositol y ácidos lisofosfatídicos), esfingolípidos (SPL) (caracterizados por una cadena principal de esfingosina con un doble enlace trans entre C4 y C5 de una cadena acilo unida al grupo amino mediante un enlace amida), bis(monoacilglicerol)fosfato (BMP), ceramidas, gangliósidos, esteroides, prenoides, sacarolípidos y policétidos. En algunos casos, el grupo de lípidos se basa en la composición de la cadena acilo, que puede variar en cualquier número de formas, que incluye el número de carbonos en la cadena acilo y el número de dobles enlaces en la cadena acilo.

En otras modalidades, los lípidos en el conjunto de lípidos pueden provenir de una o más clases de lípidos, tales como BMP, CE, Cer, DAG, DH-LTB4, FA, GA2, GM3, HexCer, HexDHCer, LacCer, LisoPA, LisoPC, LisoPC-pmg, LisoPE, LisoPE-pmg, LisoPS, MAG, PC, PC-pmg, PE, PE-pmg, PGA1, PGB1, SM, esfingosina, TAG o TH-12-ceto-LTB4. En aún otras modalidades, los lípidos en el conjunto de lípidos pueden provenir de una o más clases de lípidos, tales como FA, MAG, DAG, TAG, PC, PE, PS, PI, PG, PA, LisoPC, LisoPE, LisoPS, LisoPI, LisoPG, LisoPA, LisoPC, LisoPE, BMP, SM, Cer, Cer-P, HexCer, GA1, GA2, GD1, GD2, GM1, GM2, GM3, GT1 o CE.

En algunas modalidades, el conjunto de lípidos usado en el modelo predictivo se limita a aquellos que tienen una mayor probabilidad de encontrarse en reservas de lípidos humanos. En otras modalidades, el conjunto de lípidos excluye cadenas de acilo muy cortas y muy largas (por ejemplo, menos de 10 carbonos y más de 26 carbonos dentro de una cadena). En aún en otras modalidades, los lípidos del conjunto de lípidos (por ejemplo, GPL o LGPL) se limitan a aquellos que contienen un número par de carbonos en la cadena de acilo. En otros ejemplos, el conjunto de lípidos incluyó uno o más lípidos enumerados en la Tabla 2.

Tabla 2

Lípido Clase	Grupo de lípidos	Abreviaturas	Cadena de Acilo Intervalo	Sitios insaturados (# de dobles enlaces)	Características o comentarios adicionales	# total de estructuras consideradas
Ácidos Grasos	Ácidos grasos	FA	10-26	0-6		79

ES 2 989 530 T3

5	Glicerolípidos	Monoacilgliceroles	MAG	10-26	0-6	# par de carbonos solamente	43
	Glicerolípidos	Diacilgliceroles	DAG	22-46	0-12	# par de carbonos solamente	120
	Glicerolípidos	Triacilgliceroles	TAG	44-66	0-18		316
10	Glicerofosfolípidos	Fosfatidilcolinas	PC	28-44	0-12	# par de carbonos solamente	77
	Glicerofosfolípidos	Fosfatidiletanolaminas	PE	28-44	0-12	# par de carbonos solamente	77
	Glicerofosfolípidos	Fosfatidilserinas	PS	28-44	0-12	# par de carbonos solamente	77
15	Glicerofosfolípidos	Fosfatidilinositoles	PI	28-44	0-12	# par de carbonos solamente	77
	Glicerofosfolípidos	Fosfatidilgliceroles	PG	28-44	0-12	# par de carbonos solamente	77
	Glicerofosfolípidos	Ácido fosfatídico	PA	28-44	0-12	# par de carbonos solamente	77
20	Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidilcolinas	LisoPC	10-26	0-6	# par de carbonos solamente	43
	Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidiletanolamina	LisoPE	10-26	0-6	# par de carbonos solamente	43
	Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidilserina	LisoPS	10-26	0-6	# par de carbonos solamente	43
25	Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidilinositoles	LisoPI	10-26	0-6	# par de carbonos solamente	43
	Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidilgliceroles	LisoPG	10-26	0-6	# par de carbonos solamente	43
	Lisoglicerofosfolípidos	Ácido lisofosfatídico	LisoPA	10-26	0-6	# par de carbonos solamente	43
30	Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidilcolinas-pmg	LisoPC	10-26	0-6	# par de carbonos solamente	43
	Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidiletanolaminas-pmg	LisoPE	10-26	0-6	# par de carbonos solamente	43
	Bis(monoacilglicero)fosfatos		BMP	28-48	0-12		211
40	Esingolípidos	Esingomielinas	SM	30-42	0-3		25
	Esingolípidos	Ceramidas	Cer	30-44	0-3		33
	Esingolípidos	Fosfatos de ceramida	Cer-P	30-44	0-3		33
45	Esingolípidos	Hexosa Ceramidas	HexCer	30-44	0-3		33
	Esingolípidos	Gangliósidos A1	GAI	28-46	0-2		57
	Esingolípidos	Gangliósidos A2	GA2	28-46	0-2		57
50	Esingolípidos	Gangliósidos D1	GDI	28-46	0-2		57
	Esingolípidos	Gangliósidos D2	GD2	28-46	0-2		57
	Esingolípidos	Gangliósidos M1	GM1	28-46	0-2		57
55	Esingolípidos	Gangliósidos M2	GM2	28-46	0-2		57
	Esingolípidos	Gangliósidos M3	GM3	28-46	0-2		57
	Esingolípidos	Gangliósidos A1	GT1	28-46	0-2		57
60	Esingolípidos						
65	Esingolípidos						

Ésteres de colesterol	Ésteres de Colesterol	CE	10-26	0-6		79
-----------------------	-----------------------	----	-------	-----	--	----

- 5 En algunas modalidades, los lípidos en el conjunto de lípidos pueden incluir uno o más de PC (32:1), PC (38:5) o TAG (54:4).
- En algunas modalidades (por ejemplo, para determinar el cáncer de pulmón), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen TAG (54:4) o PC (38:5).
- 10 En algunas modalidades (por ejemplo, para determinar el cáncer de mama), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen TAG (54:4), PC-pmg (38:5) o PC (32:1).
- PC (32:1). En algunas modalidades (por ejemplo, para determinar el cáncer de mama y el cáncer de pulmón), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen PC (38:5), TAG (54:4) o PC (32:1).
- 15 En algunas modalidades (por ejemplo, para determinar el cáncer de mama y el cáncer de pulmón), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen PC (38:5), PC (32:1).
- 20 En algunas modalidades, el número de lípidos en el conjunto de lípidos puede incluir al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 500 o al menos 1000 lípidos. En algunas modalidades, el número de lípidos en el conjunto de lípidos puede incluir no más de 200, no más de 500, no más de 1000, no más de 5000, no más de 10 000 o no más de 100 000 lípidos.
- 25 Los animales incluyen, pero no se limitan a primates (por ejemplo, humanos), caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, aviares o mamíferos. Los animales incluyen aquellos como mascotas o que se encuentran en zoológicos e incluyen cerdos y caballos domesticados (que incluye los caballos de carreras). Además, también se cualquier animal relacionado con actividades comerciales, tales como aquellos animales relacionados con la agricultura y la acuicultura y otras actividades en las que el monitoreo, el diagnóstico y la selección de terapias de enfermedades son una práctica rutinaria en la cría para la productividad económica y/o la seguridad de la cadena alimentaria. En algunas modalidades, el animal es un humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, pollo, pavo, ratón o rata.
- 30 Los tipos de cáncer (que incluye los tumores cancerosos) pueden incluir, pero no se limitan a carcinomas, sarcomas, cánceres hematológicos, neoplasias malignas neurológicas, carcinoma de células basales, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de ovario, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, rhabdomyosarcoma, glioblastoma multiforme, meningioma, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, glioma, cáncer oral, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de riñón, cáncer de recto, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de médula ósea, cáncer de estómago, cáncer de útero, leucemia, carcinoma de células basales, cánceres relacionados con células epiteliales o cánceres que pueden alterar la regulación o actividad de la piruvato carboxilasa. Los tumores cancerosos incluyen, por ejemplo, tumores asociados con cualquiera de los cánceres mencionados anteriormente.
- 35 En algunas modalidades, determinar la presencia o ausencia de uno o más tipos de cáncer incluye determinar la presencia o ausencia de cada tipo de cáncer.
- 40 La cantidad de un lípido puede determinarse mediante el uso de cualquier técnica adecuada, que incluye, por ejemplo, cualquiera de los métodos de espectrometría de masas descritos en la presente descripción.
- 45 Mediante el uso de un sistema de espectrometría de masas, se obtiene el espectro de espectrometría de masas de la muestra. El sistema de espectrometría de masas puede comprender los componentes habituales de un espectrómetro de masas (por ejemplo, fuente de ionización, detector de iones, analizador de masas, cámara de vacío y sistema de bombeo) y otros componentes, que incluyen, pero no se limitan a sistemas de separación, tales como sistemas de cromatografía interconectados. El espectrómetro de masas puede ser cualquier espectrómetro de masas adecuado para determinar una cantidad lipídica. El sistema analizador de masas puede incluir cualquier sistema adecuado que incluye, pero no se limita a analizador de tiempo de vuelo, analizador de cuadrupolo, sector magnético, Orbitrap, trampa de iones lineal o resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier (FTICR). En algunos casos, el sistema analizador de masas (por ejemplo, FTICR) tiene resolución suficiente para determinar la identidad de los lípidos sin medios experimentales adicionales. La fuente de iones puede incluir, pero no se limita a ionización por impacto de electrones, electropulverización, ionización química, fotoionización, ionización química a presión atmosférica, ionización por colisión, ionización natural, ionización térmica, ionización por bombardeo rápido de átomos, ionización por haz de partículas o desorción e ionización asistida por matriz y láser (MALDI). En algunos casos, la electropulverización puede ser una fuente de iones no ionizantes. Los sistemas de cromatografía interconectados pueden incluir cualquier sistema de cromatografía adecuado, que incluye, pero no se limita a cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (LC) o movilidad iónica (que pueden combinarse con métodos LC o GC). En algunos casos, puede usarse la infusión directa. En algunos casos, el sistema de espectrometría de masas es GC/MS o LC/MS.
- 50
- 55
- 60
- 65

En algunos casos, una vez que se obtienen los espectros de MS, los espectros pueden analizarse para determinar la identidad y la cantidad (por ejemplo, la presencia) de lípidos en la muestra.

Para los espectros de MS, el análisis puede incluir cualquier análisis adecuado para determinar la identidad y/o cantidad de un lípido, que incluye el análisis de una o más características, que incluyen, pero no se limitan a comparación de masas con masas conocidas, tiempos de retención cromatográfica (por ejemplo, para GC/MS o LC/MS) y patrones de fragmentación de masas. En algunos casos, el análisis puede incluir una comparación de características con las de una base de datos (por ejemplo, una base de datos de estándares). En algunos casos, PREMISE (Lane, A.N., T.W.-M. Fan, X. Xie, H.N. Moseley, y R.M. Higashi, Stable isotope analysis of lipid biosynthesis by high resolution mass spectrometry and NMR Anal. Chim. Acta, 2009. 651: p. 201-208.) puede usarse para identificar lípidos. La cantidad lipídica (por ejemplo, la cantidad relativa) puede determinarse mediante cualquier método adecuado, que incluye, pero no se limita a la función de respuesta del detector de iones, mediante referencia a estándares enriquecidos o mediante dilución de isótopos.

En algunas modalidades, antes de que los datos se introduzcan en el modelo predictivo, los datos pueden procesarse previamente. Los métodos de procesamiento previo pueden incluir uno o más de cualquier método adecuado, tal como métodos de normalización o métodos de escalado. En algunas modalidades, los métodos de escalado pueden incluir, pero no se limita a centrado, varianza unitaria, varianza unitaria sin centrado, Pareto y Pareto sin centrado.

Un modelo predictivo puede comprender cualquier modelo adecuado para determinar la presencia o ausencia de uno o más tipos de cáncer. Por ejemplo, el modelo predictivo puede comprender uno o más métodos de reducción de dimensiones. En algunas modalidades, el modelo predictivo comprende uno o más de métodos de agrupamiento (por ejemplo, agrupamiento de K medias y agrupamiento de los K vecinos más cercanos), métodos de aprendizaje automático (por ejemplo, redes neuronales artificiales (ANN) y máquinas de vectores de soporte (SVM)), análisis de componentes principales (PCA), modelado independiente suave de analogía de clases (SIMCA), regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), regresión de mínimos cuadrados ortogonales (OPLS), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) o análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales (OPLS-DA). Estas técnicas pueden, si se desea, incluir o complementarse con uno o más métodos adecuados que incluyen centrado en la media, centrado en la mediana, escalado de Pareto, escalado de varianza unitaria, corrección de señal ortogonal, integración, diferenciación, validación cruzada y curvas características operativas del receptor (ROC). En algunas modalidades, el modelo predictivo puede desarrollarse mediante el uso de un conjunto de datos de entrenamiento, donde los datos de entrenamiento se diseñan para producir un conjunto de parámetros y coeficientes aplicables. En algunas modalidades, el conjunto de parámetros y coeficientes puede usarse para determinar si un animal tiene cáncer y, en algunos casos, el tipo de cáncer. Los datos de entrenamiento pueden incluir datos de control negativos (por ejemplo, cuando no hay cáncer presente en el animal) y datos de control positivos (donde uno o más tipos de cáncer están presentes en el animal). El conjunto de datos de entrenamiento puede usarse para establecer un modelo predictivo que pueda determinar dos o más tipos de cáncer.

La Figura 25 muestra algunas modalidades del método. Esta ilustra que, en algunos casos, una vez que se ha establecido un modelo predictivo mediante el uso de un conjunto de datos de entrenamiento, puede hacerse la determinación de la presencia de uno o más tipos de cáncer a partir del modelo predictivo sin ningún entrenamiento adicional.

Los métodos de la presente invención pueden comprender, además, la determinación de la expresión de proteínas, la expresión de genes o ambas, de proteínas o sus genes. Puede determinarse cualquier expresión de proteína adecuada (o su gen), que incluye, pero no se limita a piruvato carboxilasa, succinil CoA sintetasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, transcetolasa, transaldolasa, piruvato deshidrogenasa, una deshidrogenasa, glutaminasa, isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, deshidrogenasa malato mitocondrial, succinato deshidrogenasa, fumarato hidratasa, hexoquinasa II, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa 1, lactato deshidrogenasa 5, fosfofructocinasa 1 y 2, glutatión peroxidasa o glutatión-S-transferasa, o proteínas asociadas con vías metabólicas tales como, pero no limitadas al ciclo de Krebs (también conocido como ciclo del ácido cítrico), glucólisis, vía de las pentosas fosfato (oxidativa y no oxidativa), gluconeogénesis, biosíntesis de lípidos, síntesis de aminoácidos (por ejemplo, síntesis de aminoácidos no esenciales), vías catabólicas, ciclo de la urea, ciclo de Cori o ciclo glutamato/glutamina. La expresión de proteínas puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada que incluye, pero no se limita a técnicas que comprenden técnicas de electroforesis en gel (por ejemplo, transferencia Western), técnicas cromatográficas, técnicas basadas en anticuerpos, técnicas de centrifugación o sus combinaciones. La expresión génica puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada que incluye, pero no se limita a técnicas que comprenden técnicas basadas en PCR (por ejemplo, PCR en tiempo real), técnicas de electroforesis en gel, técnicas cromatográficas, técnicas basadas en anticuerpos, técnicas de centrifugación o sus combinaciones. Los métodos para medir la expresión génica pueden comprender medir cantidades de ADNc elaborado a partir de ARN aislado de tejido.

Ejemplos

Preparación de plasma: Se extrajo sangre de humanos diagnosticados con cáncer de mama, diagnosticados con cáncer de pulmón, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y humanos sanos (libres de cáncer)

(también denominados control o normales). La sangre se recolectó en tubos Vacutainer que contenían K-EDTA (tapa violeta) para anticoagulación y se colocó inmediatamente en hielo y se centrifugó a 3500 xg durante 15 minutos a 4 °C. Se dividieron alícuotas del sobrenadante (plasma) antes de la congelación instantánea en N₂ líquido y se mantuvo a -80 °C hasta la preparación de la fracción.

Preparación de la fracción: Se descongeló el plasma y se transfirieron 0,8 ml a tubos de ultracentrífuga de polialómero de 1 ml mediante el uso de PBS frío para ajustar el volumen exacto (el volumen completo de los tubos de ultracentrífuga debe llenarse hasta 5 mm de la parte superior para evitar el colapso durante la centrifugación). El rotor SWTi55 con cubetas se enfrió previamente a 4 °C. Se pesaron los tubos de ultracentrífuga más la tapa en la cubeta para ajustar todas las masas de las muestras dentro de 10 mg de variación mediante el uso de PBS. Después, las muestras se centrifugaron en un rotor SWTi55 a 70 000 xg (27 172 rpm) durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó nuevamente en SWTi55 a 100 000 xg (32 477 rpm) durante 1 hora a 4 °C para sedimentar la fracción de microvesículas lipídicas. El sedimento de la primera centrifugación (fracción de microvesículas) y el sedimento de la fracción de microvesículas lipídicas se lavaron en PBS frío mediante resuspensión y se centrifugaron en SWTi55 a 100 000 xg (32 477 rpm) durante 1 hora a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y ambos tubos se invirtieron sobre una toalla de papel para drenar el exceso de PBS. Los sedimentos se resuspendieron en 2x100 µl de agua de 18 MOhm para transferirlos a tubos de microcentrífuga de 2 ml y se liofilizaron durante la noche. Los sedimentos liofilizados se mantuvieron a -80 °C hasta la extracción de lípidos.

Extracción de lípidos: El sedimento de la fracción de microvesículas lipídicas se extrajo en 0,5 ml de metanol (grado de espectrometría de masas) + hidroxitolueno butilado 1 mM mediante homogeneización con perlas de vidrio de 3 x 3 mm en un molino mezclador (por ejemplo, MM200, Retsch) durante 1 minuto a 30 Hz. Después, el homogeneizado se agitó en un balancín durante 30 minutos antes de la centrifugación a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C en una microcentrífuga. El sobrenadante se transfirió a un vial de vidrio con tapa de rosca de 1,5 ml con tabique de silicona revestido de teflón y se registró el peso del extracto. El extracto lipídico se almacenó a -80 °C hasta el análisis FT-ICR-MS.

Análisis FT-ICR-MS: Las muestras se diluyeron 1:5 en metanol + BHT 1 mM + reserpina 1 ng/ml antes del análisis en un espectrómetro de masas híbrido de trampa de iones lineal-FT-ICR (ThermoFisher LTQ FT, Thermo Electron, Bremen, Alemania), como se describió anteriormente (Lane, A.N., T.W.-M. Fan, X. Xie, H.N. Moseley, and R.M. Higashi, Stable isotope analysis of lipid biosynthesis by high resolution mass spectrometry and NMR Anal. Chim. Acta, 2009. 651: p. 201-208). El FT-ICR-MS se equipó con una fuente de iones Tri Versa NanoMate (Advion BioSciences, Ithaca, NY) con un chip de electropulverización "A" (diámetro interior de la boquilla 5,5 µm). El TriVersa NanoMate se operó mediante la aplicación de 2,0 kV con una presión de cabeza de 0,1 psi en modo de iones positivos y 1,5 kV y 0,5 psi en el modo negativo. Las corridas de MS se registraron en un intervalo de masas de 150 a 1600 Da. Inicialmente, se adquirieron escaneos de MS de baja resolución durante 1 min para garantizar la estabilidad de la ionización, después de lo cual se recolectaron datos de alta precisión de masa mediante el uso del analizador FT-ICR donde se adquirieron escaneos de MS durante 8,5 min y con la resolución de masa objetivo de 200 000 a 400 m/z. El tiempo máximo de iones del AGC (control automático de ganancia) se estableció en 500 ms (pero típicamente se utilizó <10 ms) y se adquirieron cinco "µscans" para cada espectro guardado; por tanto, el tiempo de ciclo para cada espectro transformado y guardado fue de aproximadamente 10 s. El LTQ-FT se ajustó y se calibró de acuerdo con las recomendaciones estándar predeterminadas del fabricante, que lograron una precisión de masa superior a 1 ppm. Los espectros de masas FT-ICR se exportaron como listas de masas exactas en un archivo de hoja de cálculo mediante el uso de QualBrowser 2.0 (Thermo Electron), típicamente mediante la exportación de todos los picos observados. Las especies de lípidos se asignaron en base a su masa exacta, mediante una primera aplicación de una pequeña corrección lineal (típicamente <0,0005) en base a la masa observada del estándar interno (reserpina), después mediante el uso de una herramienta de programa informático interna PREMISE (PREcalculated EXact Mass Isotopologue Search Engine) (Lane, A.N., T.W.-M. Fan, X. Xie, H.N. Moseley, and R.M. Higashi, Stable isotope analysis of lipid biosynthesis by high resolution mass spectrometry and NMR Anal. Chim. Acta, 2009. 651: p. 201-208) que se validó manualmente. PREMISE es una rutina que coincide con los valores teóricos observados de m/z, sujeto a una ventana de selección que fue de 0,0014 Da o menor. Para los lípidos, las masas exactas de un gran número (>3500) de posibles GPL y sus formas iónicas (principalmente H⁺ y Na⁺ - modo positivo y -H⁺ - modo negativo) se calcularon previamente en una tabla de búsqueda de hoja de cálculo. El método general fue suficiente para asignar un GPL a una longitud total de cadena de ácido, un grado de saturación y una identidad de cabeza de grupo particulares.

Análisis quimiométricos: Los datos normalizados de FT-ICR-MS se importaron a SimcaP (versión 11.5, Umetrics, Umeå, Suecia). Los datos fueron centrados en la media y se escalan según la varianza de Pareto (1/√sd). Después, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) sobre los datos resultantes. Esto se hizo para encontrar muestras o variables atípicas. No se determinó que ninguna muestra fuera atípica y una variable sí lo era. La variable Esfingosina (18:1) se excluyó de análisis posteriores. Las puntuaciones de PCA y los gráficos de carga se muestran en las Figuras 14 y 15.

Se crearon modelos de análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales (OPLS-DA) a partir de tres subconjuntos de datos: normal (es decir, libre de cáncer) y cáncer de pulmón, normal (es decir, libre de cáncer) y

cáncer de mama, y cáncer de pulmón y cáncer de mama. Este análisis determinó una dimensión en el espacio multivariado que maximiza la separación de grupos (por ejemplo, el grupo de control y el grupo de cáncer de pulmón) al tiempo que elimina una dimensión ortogonal a la dimensión mencionada que tiene una varianza de muestra máxima no relacionada con la separación de clases. Este análisis determinó cuáles de las muchas variables son más diferentes entre las clases de datos.

OPLS-DA mostró una buena separación de los perfiles de lípidos totales de las tres clases de plasma. Algunos de los lípidos eran esencialmente los mismos en cada fuente de fracción de microvesículas lipídicas (los componentes comunes). Las clases principales que dieron lugar a la discriminación se obtuvieron de los gráficos de carga y coeficientes, que se visualizan en los gráficos 3D que se muestran en las Figuras 1-13. Los gráficos de puntuaciones y coeficientes de OPLS-DA se proporcionan en las Figuras 16-24.

Las intensidades de las especies de lípidos se normalizaron con respecto a la respuesta lipídica total para generar "fracciones molares". Las diferentes clases de lípidos variaban en su abundancia, y dentro de una clase, la longitud de algunas cadenas de acilo y el número de dobles enlaces también varían sustancialmente, lo que formó parte de la clasificación. La mayor parte de la variación surgió de la variabilidad entre sujetos más que de la variación analítica. La diferencia en abundancia entre clases para la discriminación fue >4 veces con un coeficiente de variación dentro de una clase de hasta el 50 %. Por ejemplo, la PC (36:3) mostró una media y una sd de $1,38 \pm 0,34$ (BrCA) versus $0,23 \pm 0,1$ (sano) versus $0,19 \pm 0,28$ (NSCLC). Este único caso proporcionó una separación estadística con valores de p de $<0,0001$ (BrCA versus sanos), $<0,0001$ (BrCa versus NSCLC). NSCLC versus sano no alcanzó significación estadística. Sin embargo, otros lípidos dieron una alta separación estadística entre NSCLC y sano. Por lo tanto, se usaron varias clases juntas para discriminar entre individuos sanos y aquellos con cáncer. La segregación óptima se logró mediante el uso de conjuntos de lípidos donde al menos dos de las clases de sujetos diferían con valores de p mejores que 0,01, y se usó un mínimo de diez de tales clases de lípidos para una discriminación confiable.

Se hace notar que los términos como "preferentemente," "comúnmente" y "típicamente" no se utilizan en la presente descripción para limitar el alcance de la invención reivindicada o para dar a entender que determinadas características son críticas, esenciales, o incluso importantes para la estructura o función de la invención reivindicada. Más bien, estos términos se proponen meramente para alternativas resaltadas o características adicionales que pueden o no ser utilizadas en una modalidad particular de la presente invención.

En la presente descripción se proporcionan descripciones detalladas de una o más modalidades. Debe entenderse, sin embargo, que la presente invención puede llevarse a la práctica de diversas formas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en un animal, que comprende
 - determinar las cantidades lipídicas de lípidos en un conjunto de lípidos en una muestra del animal, y
 - determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en el animal con un modelo predictivo; en donde
 - las cantidades lipídicas de lípidos en el conjunto de lípidos comprenden una entrada del modelo predictivo, y
 - la muestra comprende un líquido corporal o un tratamiento de este,
 - el al menos un tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama y tumores asociados con cualquiera de los tipos de cáncer mencionados anteriormente,
 - el conjunto de lípidos comprende PC(38:5), y
 - el modelo predictivo comprende uno o más del método de reducción de dimensiones, el método de agrupamiento, método de aprendizaje automático, análisis de componentes principales, modelado independiente suave de analogía de clases, regresión de mínimos cuadrados parciales, regresión de mínimos cuadrados ortogonales, análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales, centrado en la media, centrado en la mediana, escalado de Pareto, escalado de varianza unitaria, corrección de señal ortogonal, integración, diferenciación, validación cruzada o curvas características operativas del receptor.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el líquido corporal se selecciona del grupo que consiste en plasma, vómito, cerumen, jugo gástrico, leche materna, moco, saliva, sebo, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, suero sanguíneo, humor acuoso, humor vítreo, endolinfa, perilinfa, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, líquido aspirado del pezón, orina, heces y líquido de lavado bronquioalveolar.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la muestra es una fracción exosomal.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el conjunto de lípidos comprende al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 200 o no más de 100 000 lípidos.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el conjunto de lípidos comprende, además, uno o ambos de PC(32:1) o TAG(54:4), preferentemente el conjunto de lípidos comprende PC(32:1), PC(38:5) y TAG(54:4).
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el conjunto de lípidos comprende, además, uno o más lípidos seleccionados de la una o más clases de lípidos seleccionados del grupo que consiste en BMP, CE, Cer, DAG, DH-LTB4, FA, GA2, GM3, HexCer, HexDHCer, LacCer, LisoPA, LisoPC, LisoPC-pmg, LisoPE, LisoPE-pmg, LisoPS, MAG, PC, PC-pmg, PE, PE-pmg, PGA1, PGB1, SM, Esfingosina, TAG, y TH-12-ceto-LTB4, preferentemente seleccionado de la una o más clases de lípidos seleccionados del grupo que consiste en PC, PE o TAG, y con mayor preferencia el conjunto de lípidos comprende, además, uno o más de PC (34:4), PC (38:3) o PC (40:5).
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conjunto de lípidos comprende, además, uno o más lípidos seleccionados de la una o más clases de lípidos seleccionados del grupo que consiste en FA, MAG, DAG, TAG, PI, PE, PS, PI, PG, PA, LisoPC, LisoPE, LisoPS, LisoPI, LisoPG, LisoPA, LisoPC, LisoPE, BMP, SM, Cer, Cer-P, HexCer, GA1, GA2, GD1, GD2, GM1, GM2, GM3, GT1 y CE.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el al menos un tipo de cáncer comprende cáncer de pulmón.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el al menos un tipo de cáncer comprende cáncer de mama.
10. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde las cantidades lipídicas se determinan mediante el uso de espectrometría de masas, tal como un analizador de masas por resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier.
11. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra es un tratamiento de un líquido corporal y el tratamiento comprende una o más extracciones mediante el uso de una o más soluciones que comprenden acetonitrilo, agua, cloroformo, metanol, hidroxitolueno butilado, ácido tricloroacético o sus combinaciones.

12. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el modelo predictivo comprende uno o más métodos de reducción de dimensiones.
- 5 13. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el modelo predictivo comprende uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en análisis de componentes principales (PCA), modelado independiente suave de analogía de clases (SIMCA), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), y análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales (OPLS-DA).
- 10 14. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el animal se selecciona del grupo que consiste en humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, pollo, pavo, ratón y rata.
- 15 15. Un método para determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en un animal, que comprende
 - determinar las cantidades lipídicas de lípidos en un conjunto de lípidos en una muestra del animal, y
 - determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en el animal con un modelo predictivo; en donde
 - las cantidades lipídicas de lípidos en el conjunto de lípidos comprenden una entrada del modelo predictivo, y
 - 20 - la muestra comprende un líquido corporal o un tratamiento de este,
 - el al menos un tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas, sarcomas, cánceres hematológicos, neoplasias malignas neurológicas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, rabdomiosarcoma, glioblastoma multiforme, meningioma, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, glioma, cáncer oral, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de riñón, cáncer de recto, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de médula ósea, cáncer de estómago, cáncer de útero, leucemia, carcinoma de células basales, cánceres relacionados con células epiteliales, cánceres que pueden alterar la regulación o actividad de la piruvato carboxilasa y tumores asociados con cualquiera de los tipos de cáncer mencionados anteriormente,
 - 30 - el conjunto de lípidos comprende PC(38:5), y
 - el modelo predictivo comprende uno o más de método de reducción de dimensiones, método de agrupamiento, método de aprendizaje automático, análisis de componentes principales, modelado independiente suave de analogía de clases, regresión de mínimos cuadrados parciales, regresión de mínimos cuadrados ortogonales, análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales, centrado en la media, centrado en la mediana, escalado de Pareto, escalado de varianza unitaria, corrección de señal ortogonal, integración, diferenciación, validación cruzada o curvas características operativas del receptor.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1

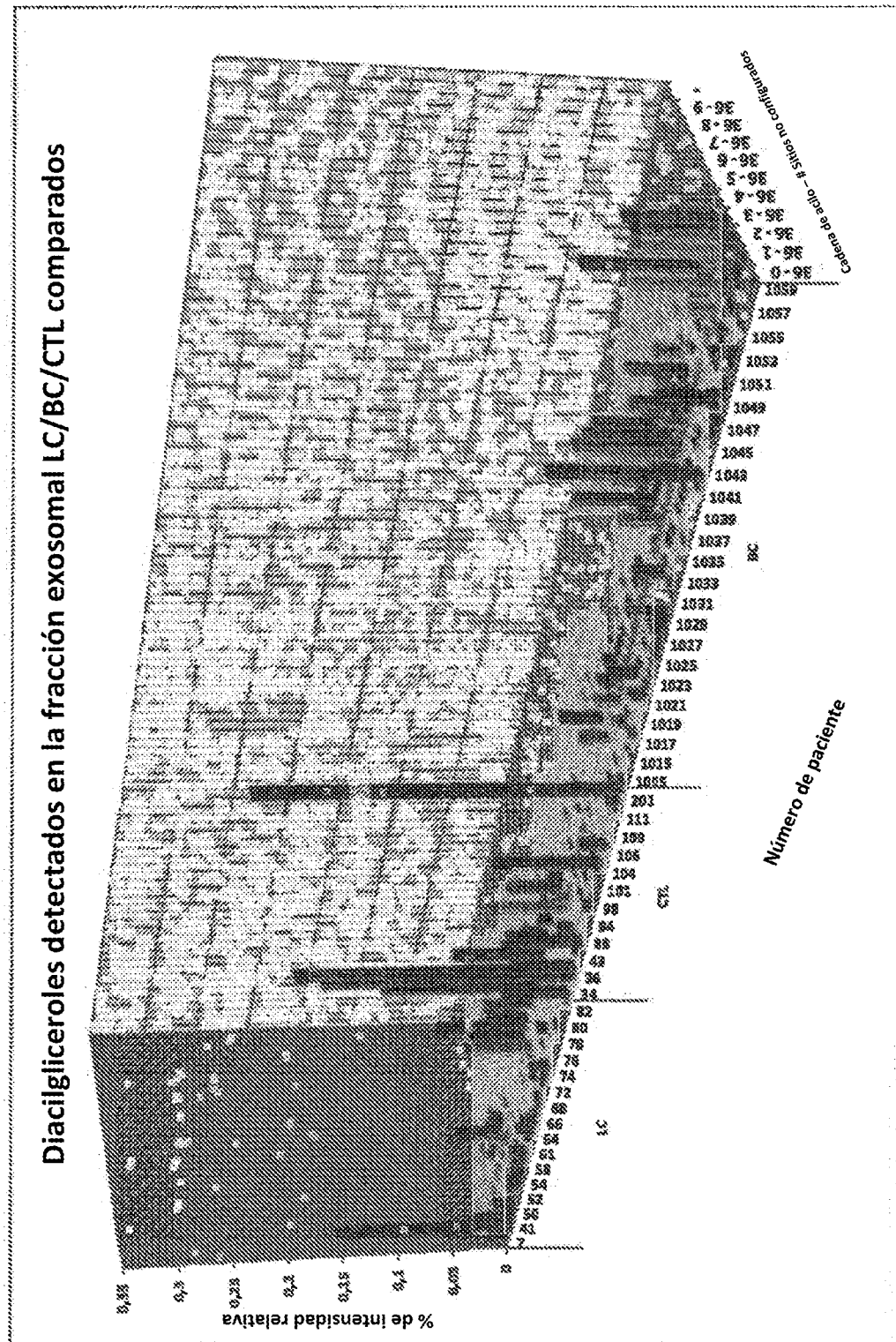


Figura 2

Fosfatidilcolinas detectadas en la fracción exosomal LC/BC/CTL comparadas

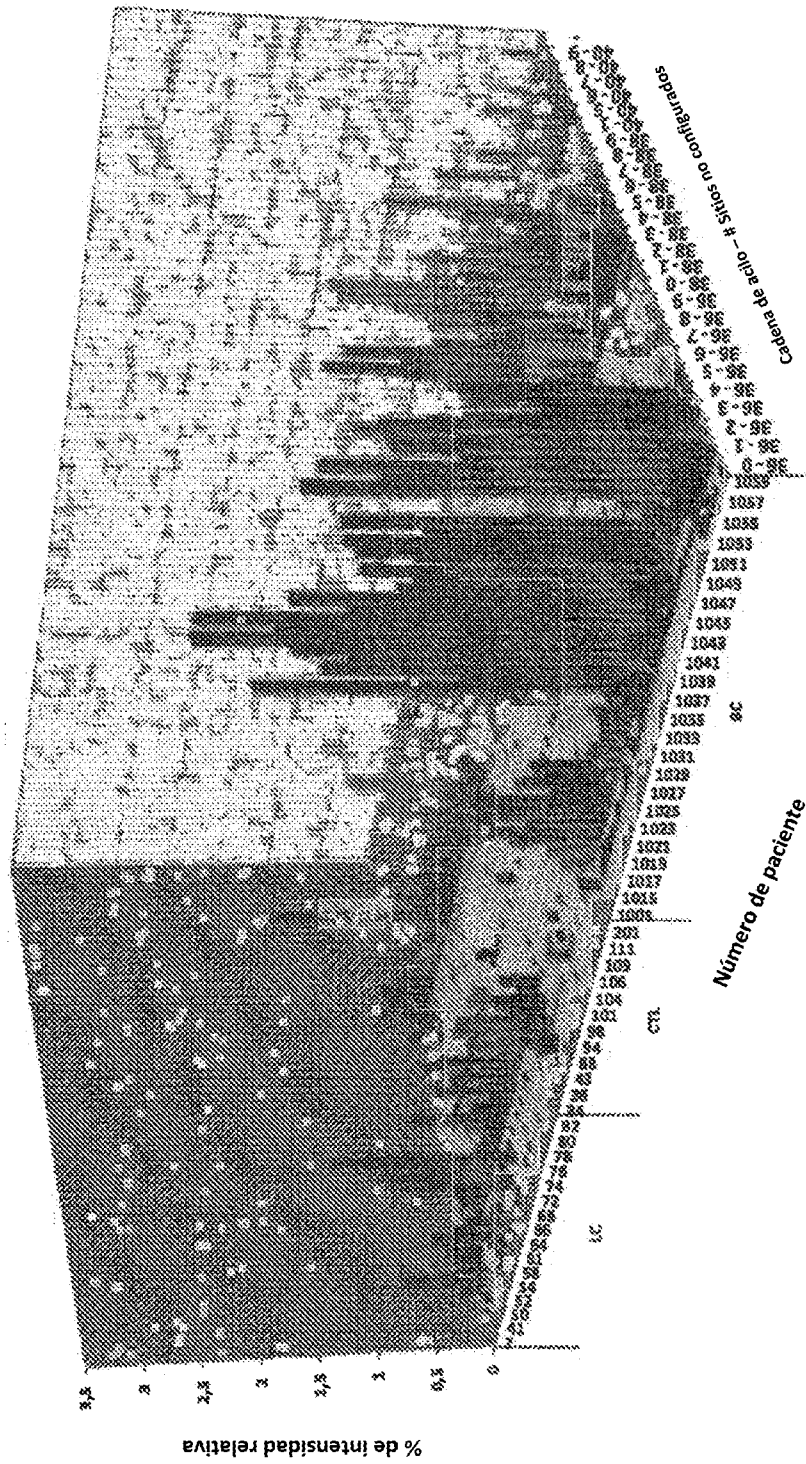


Figura 3

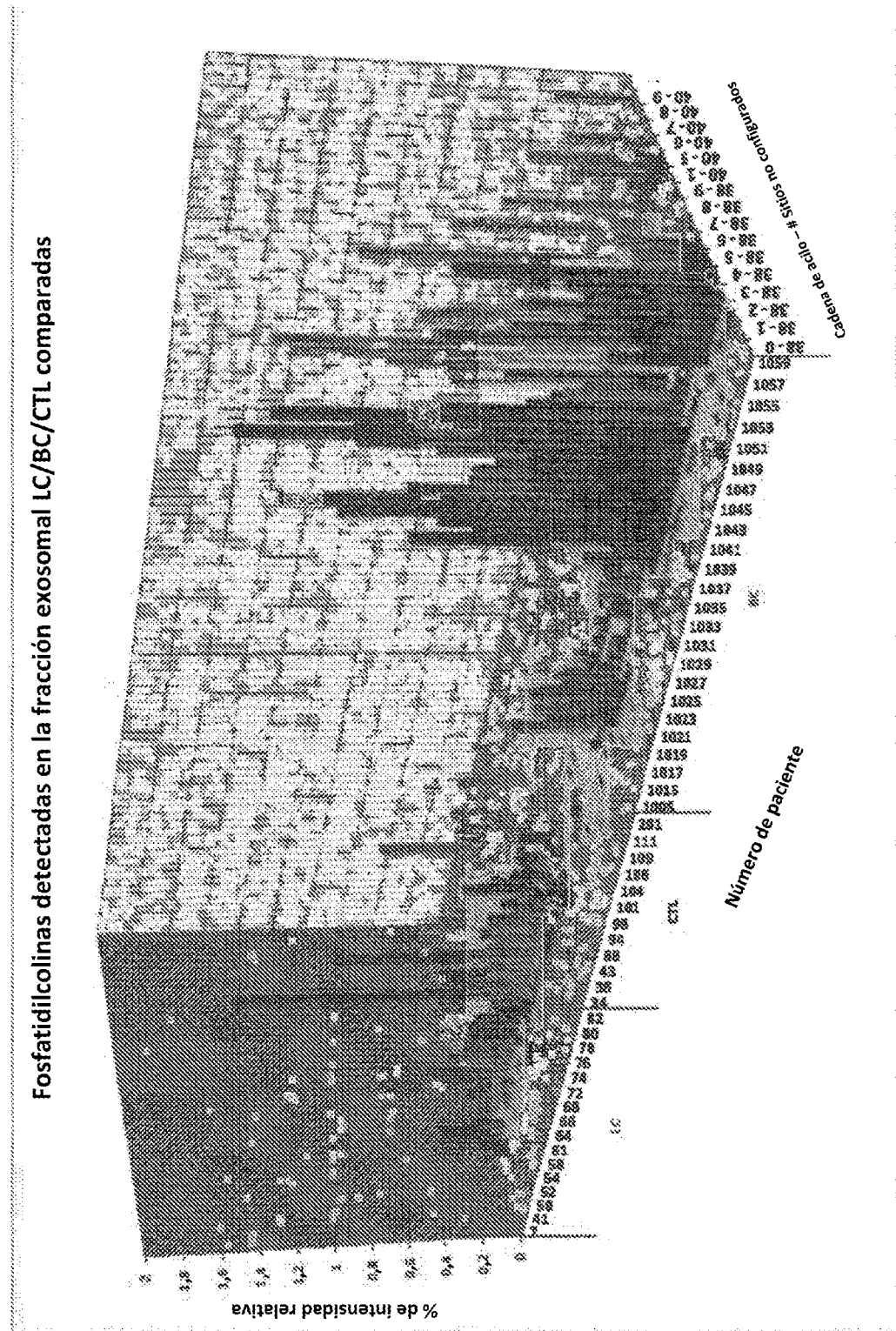


Figura 4

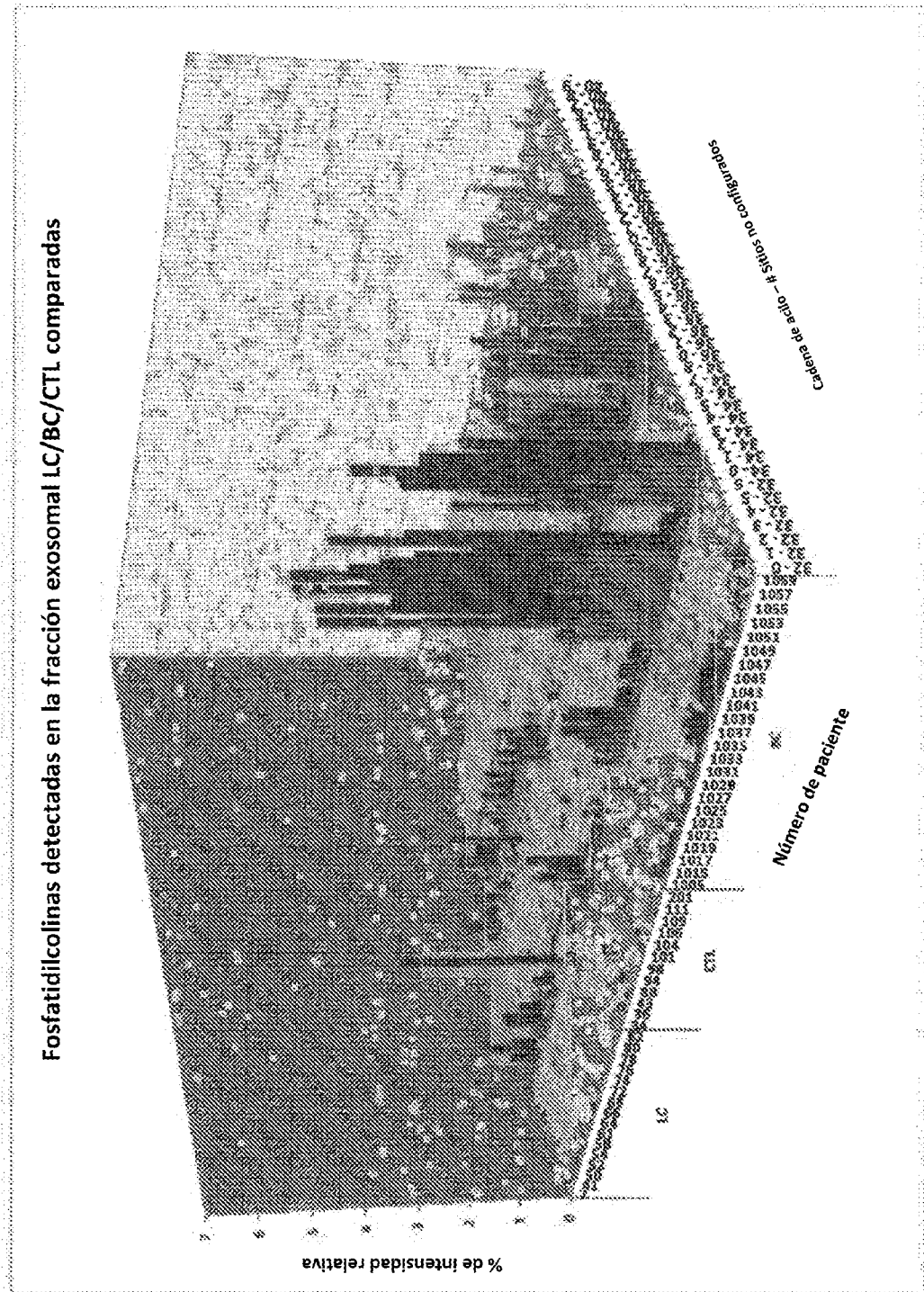


Figura 5

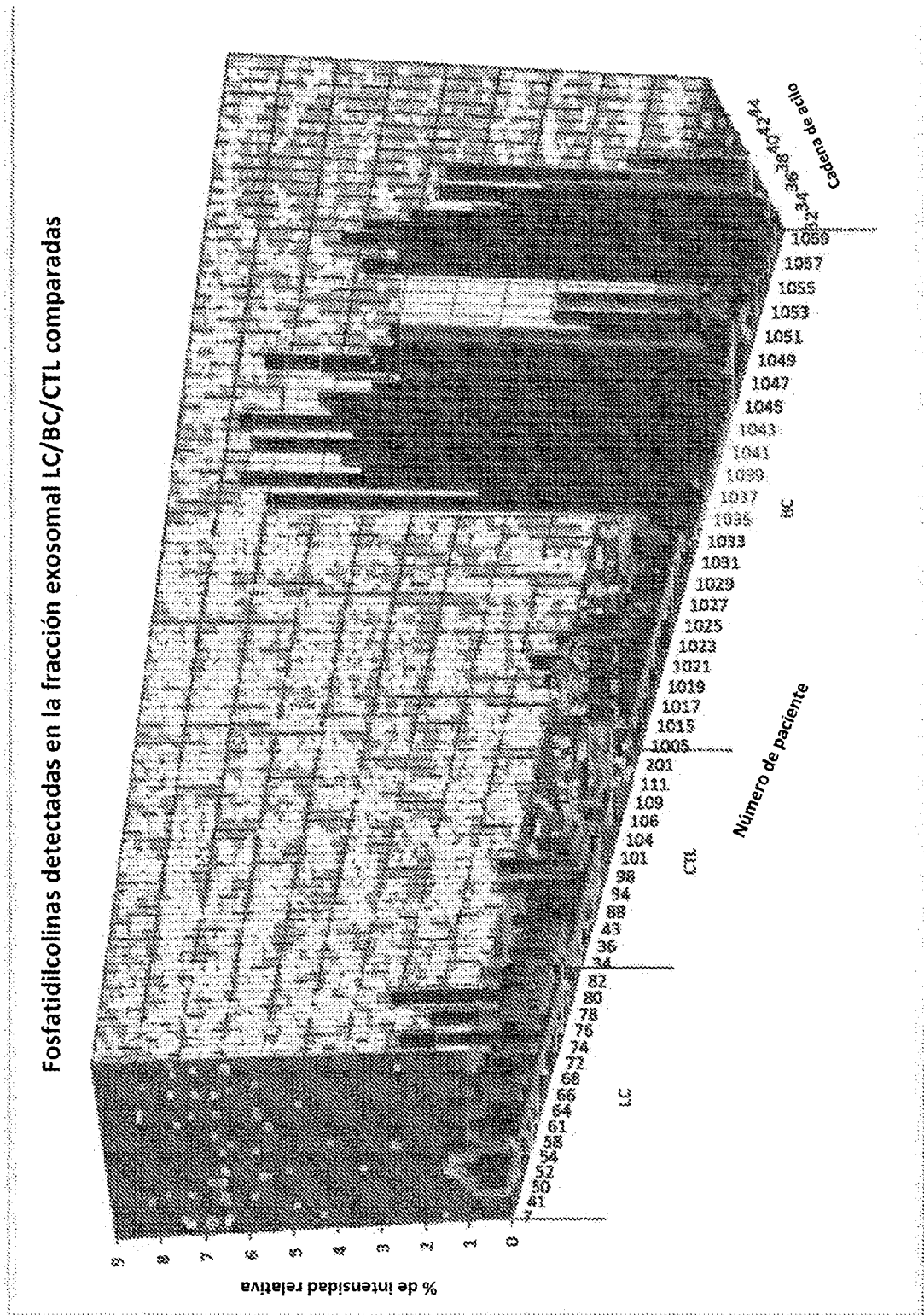


Figura 6

Fosfatidiletanolaminas detectadas en la fracción exosomal LC/BC/CTL comparadas

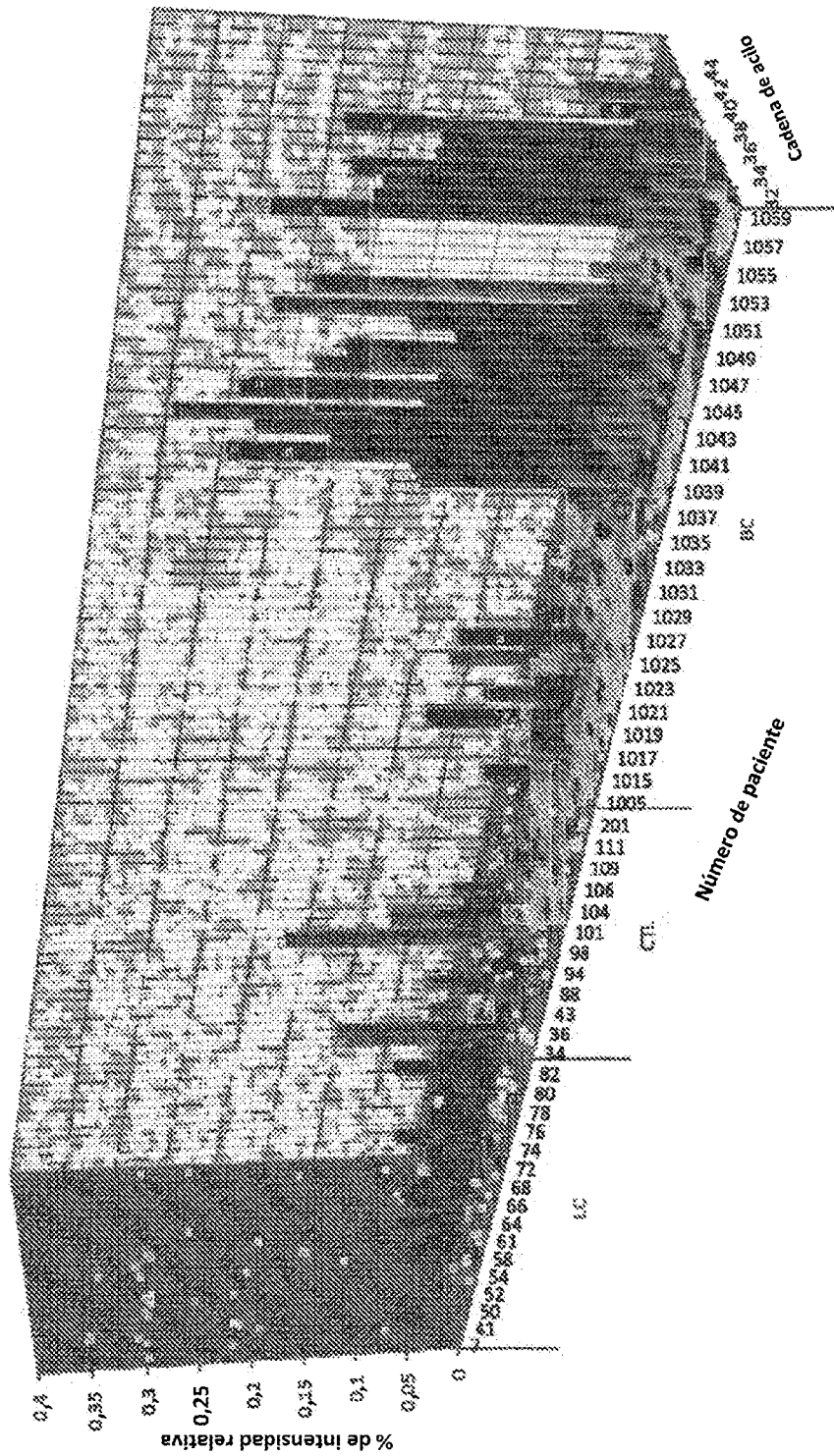


Figura 7

Fosfatidiletanolaminas detectadas en la fracción exosomal LC/BC/CTL comparadas

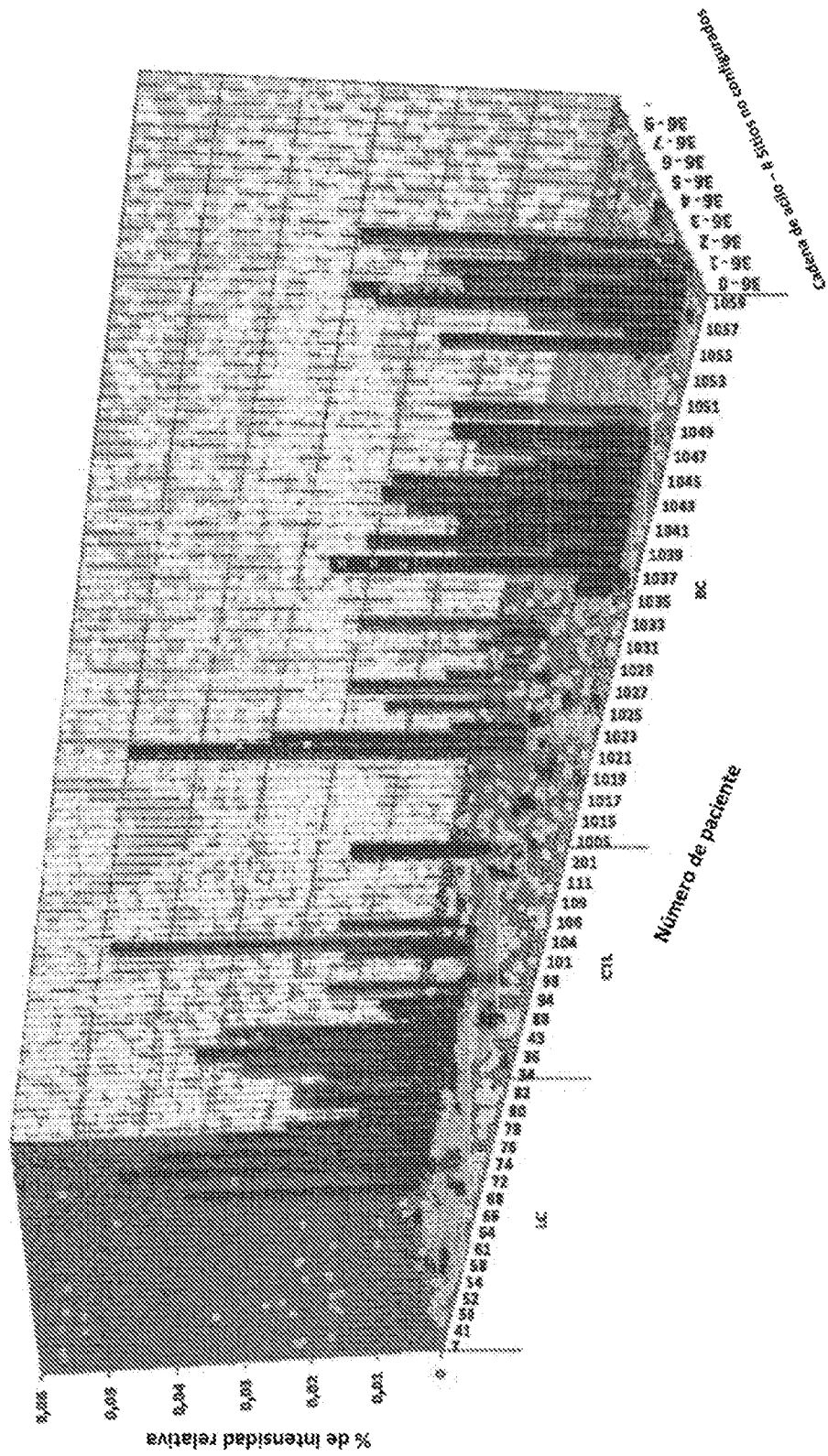


Figura 8

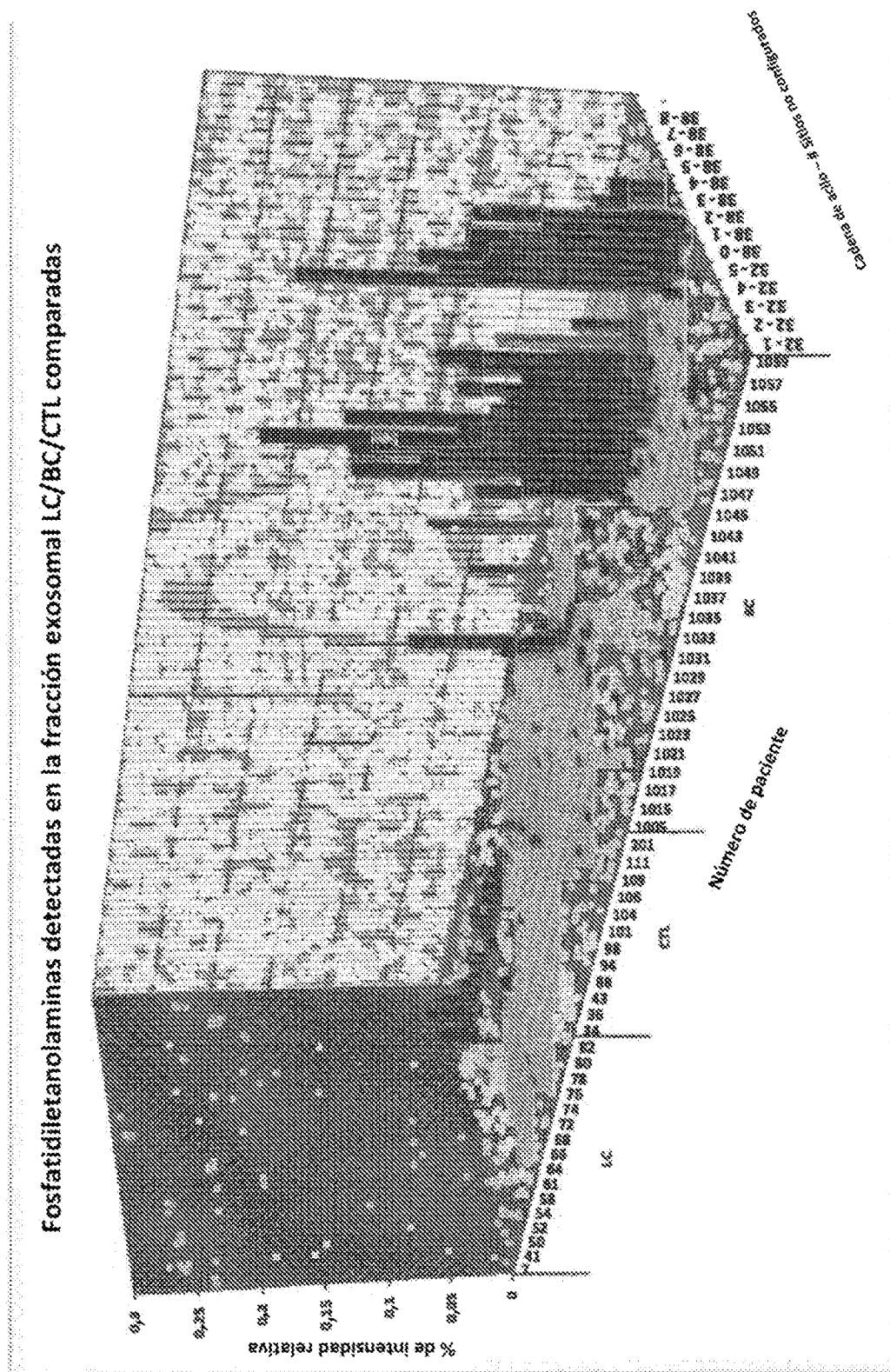


Figura 9

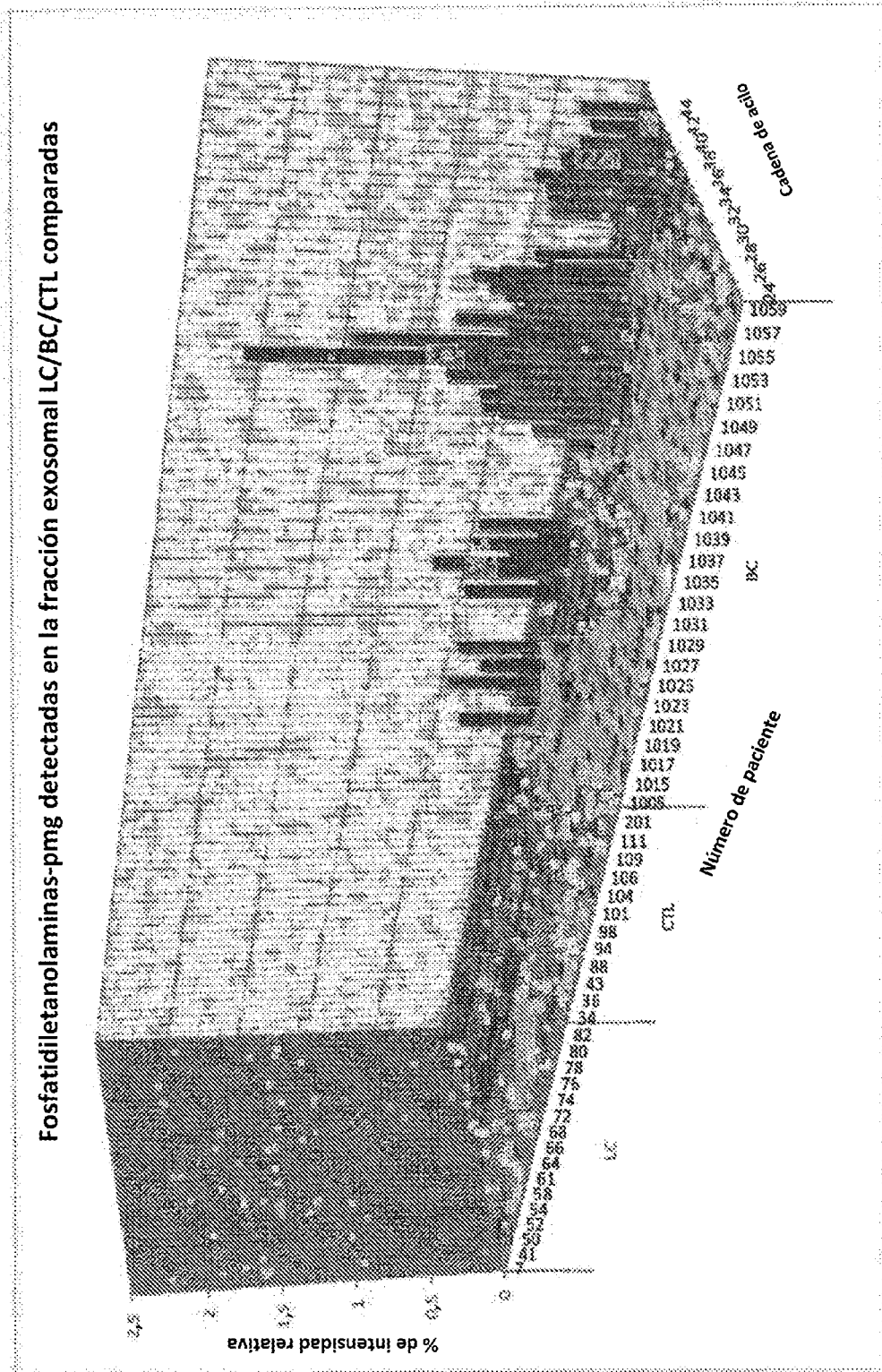


Figura 10

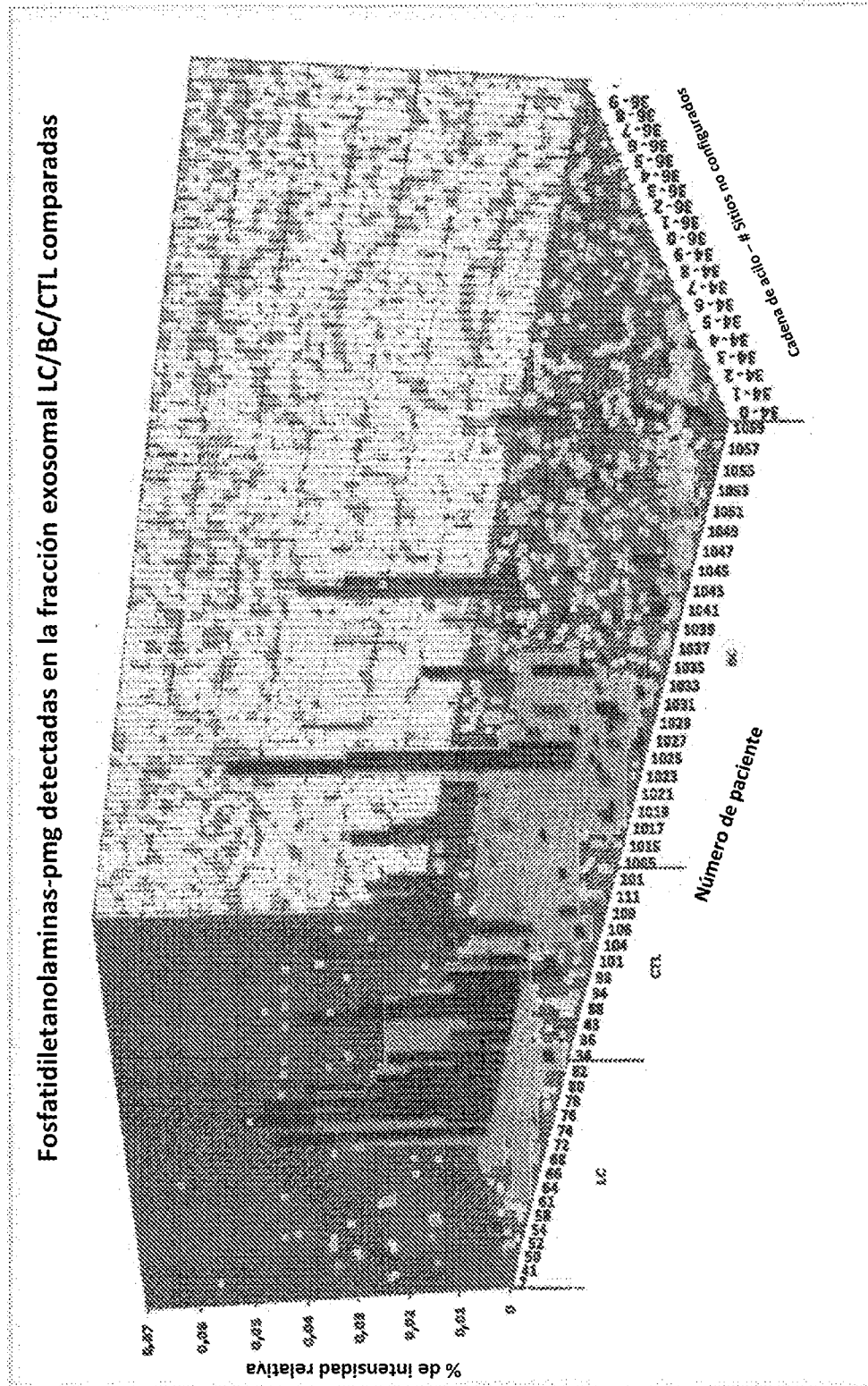


Figura 11

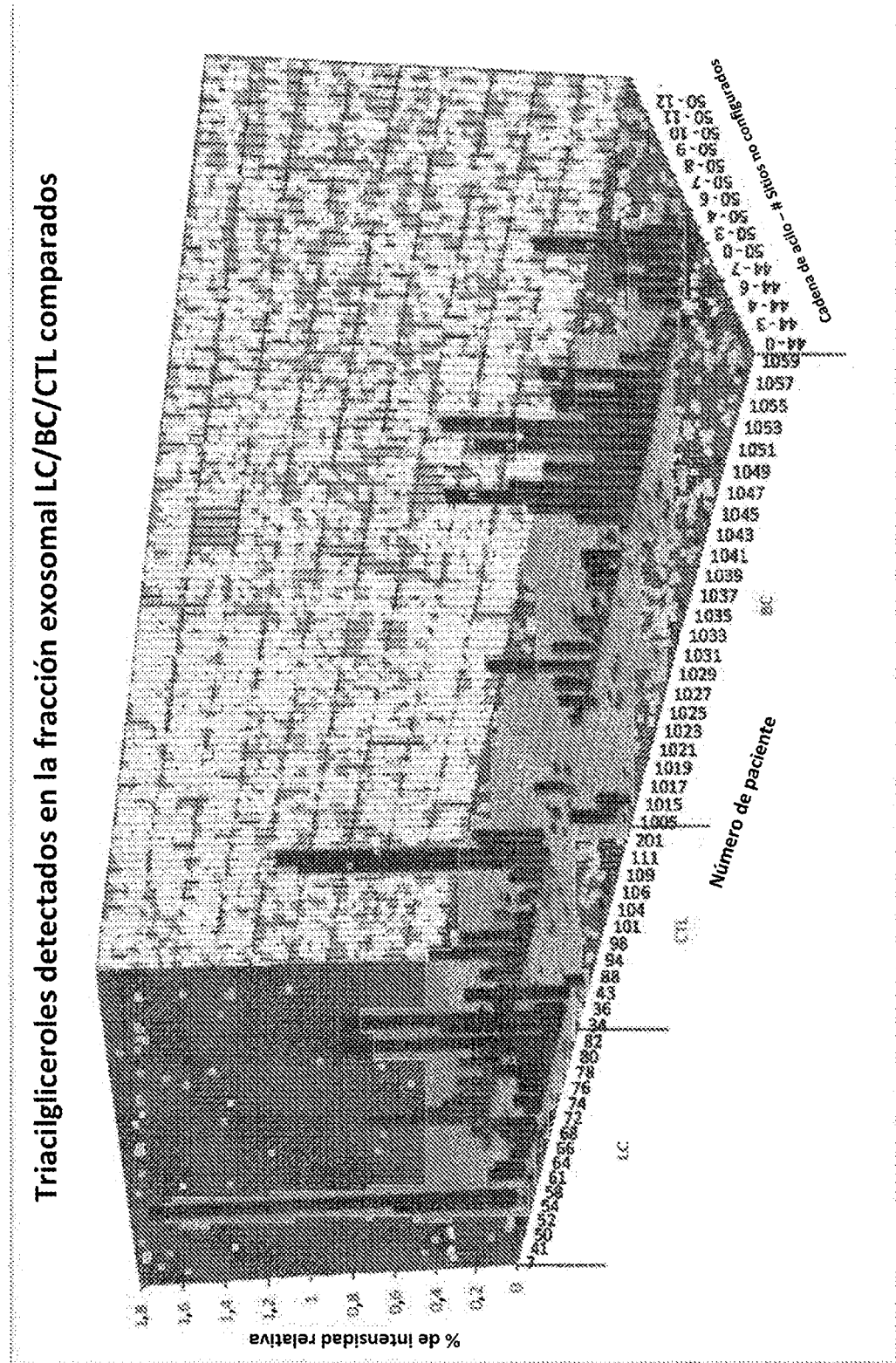


Figura 12

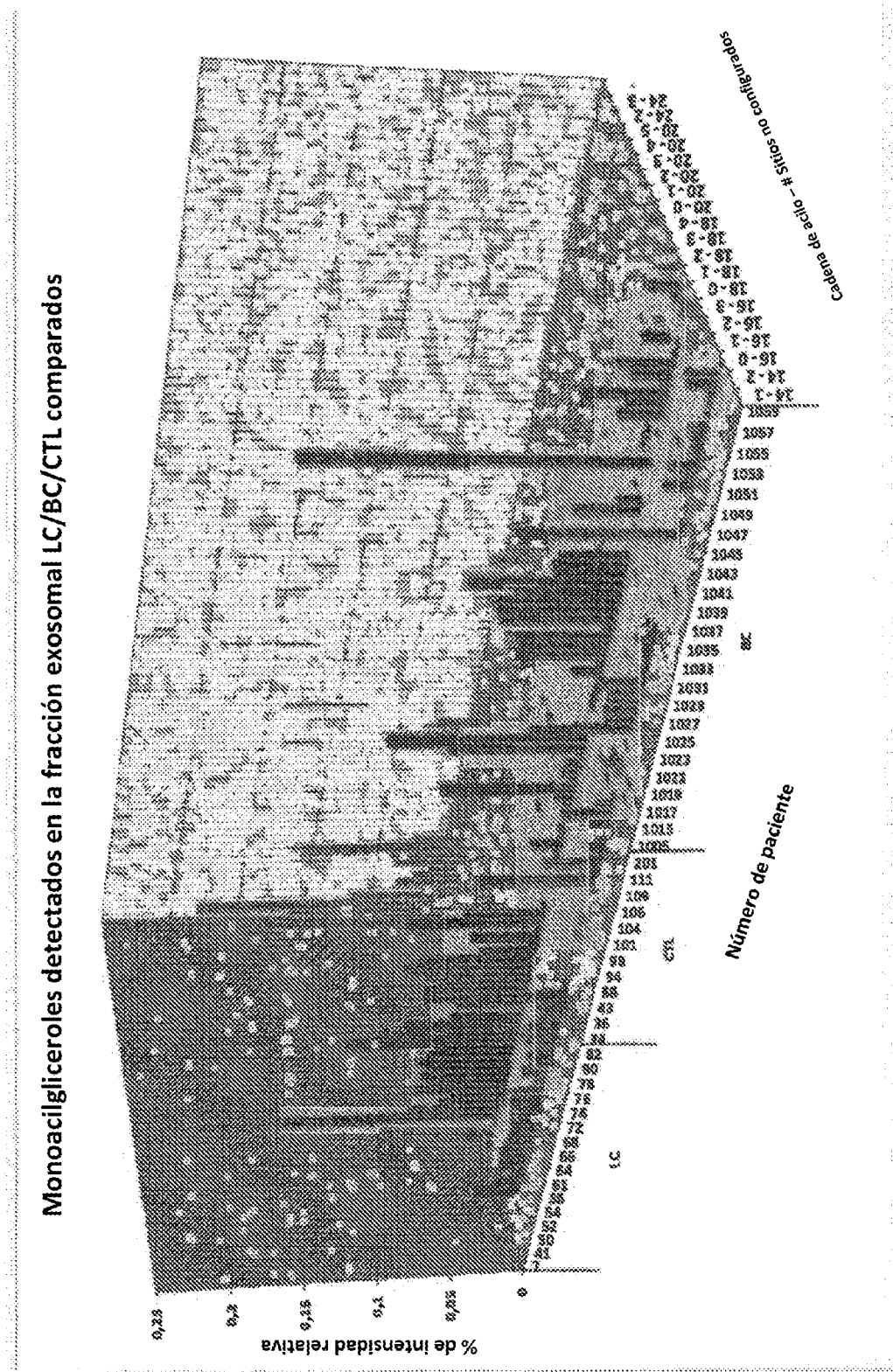


Figura 13

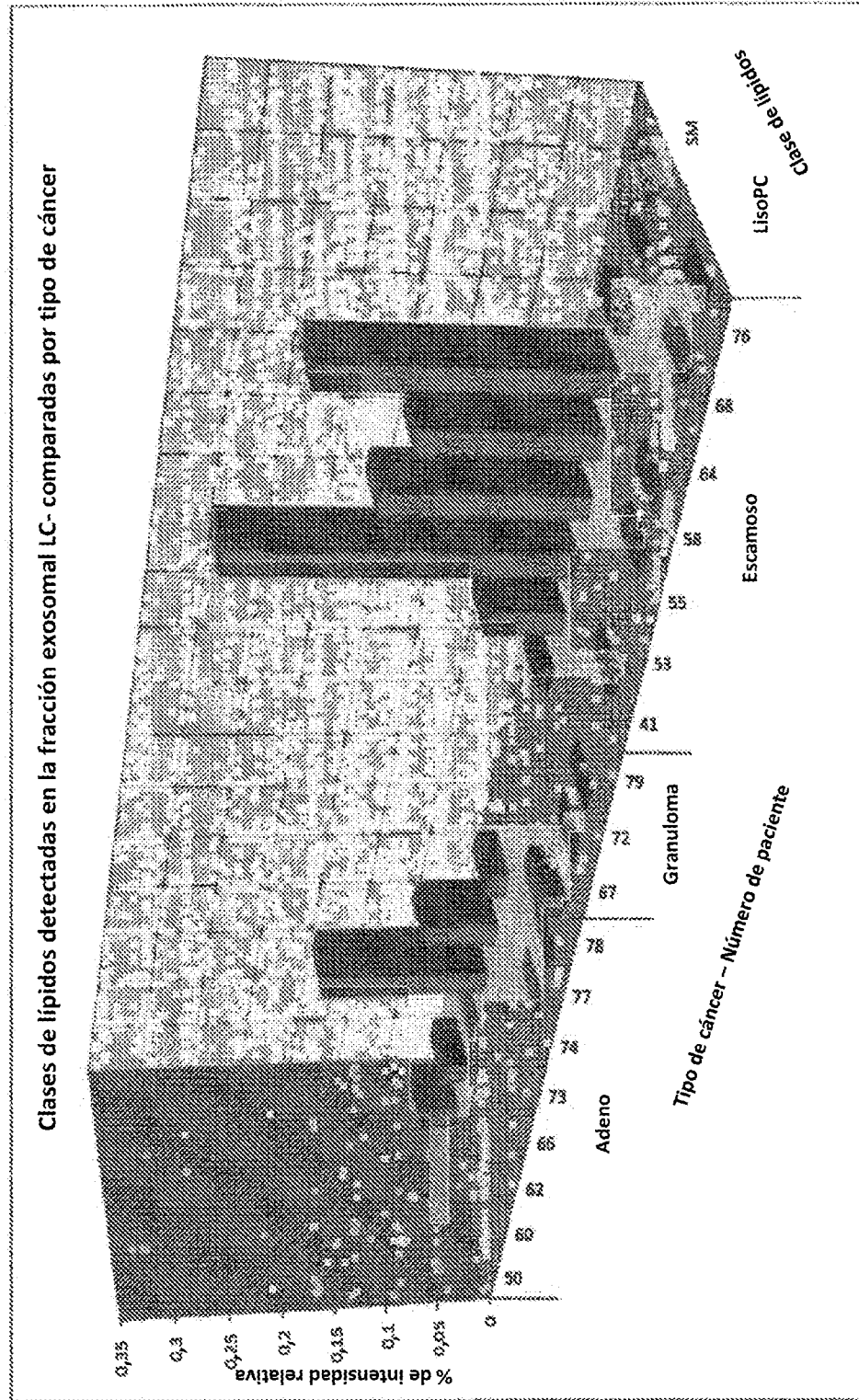


Figura 14

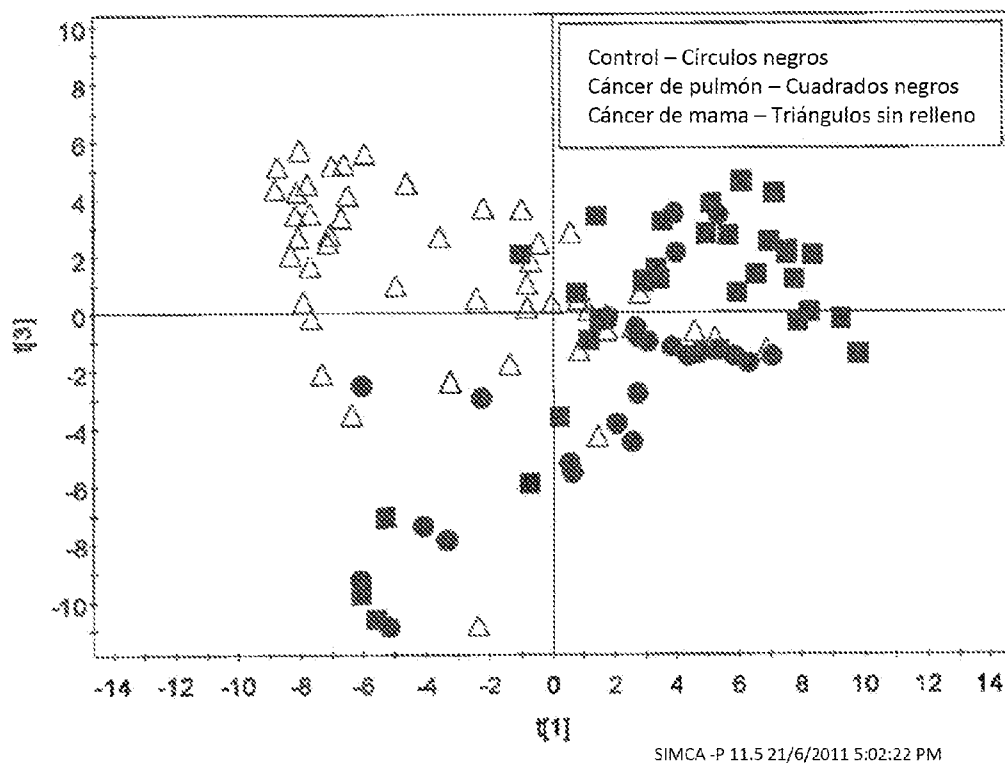


Figura 15

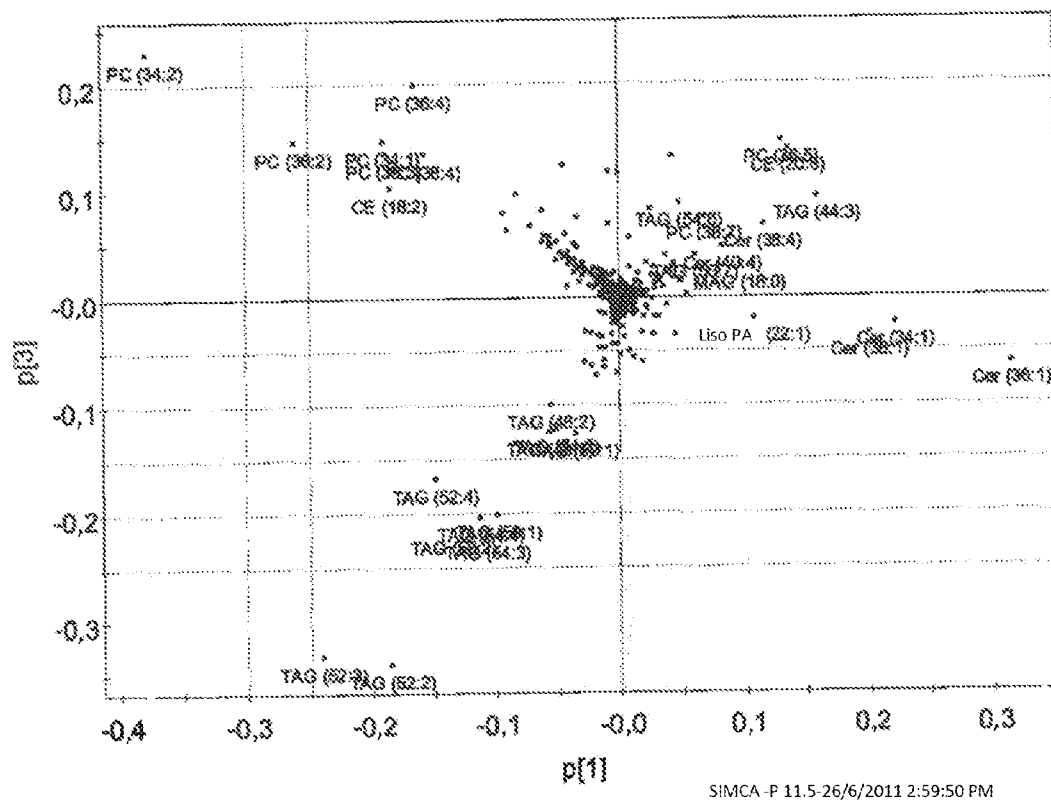


Figura 16

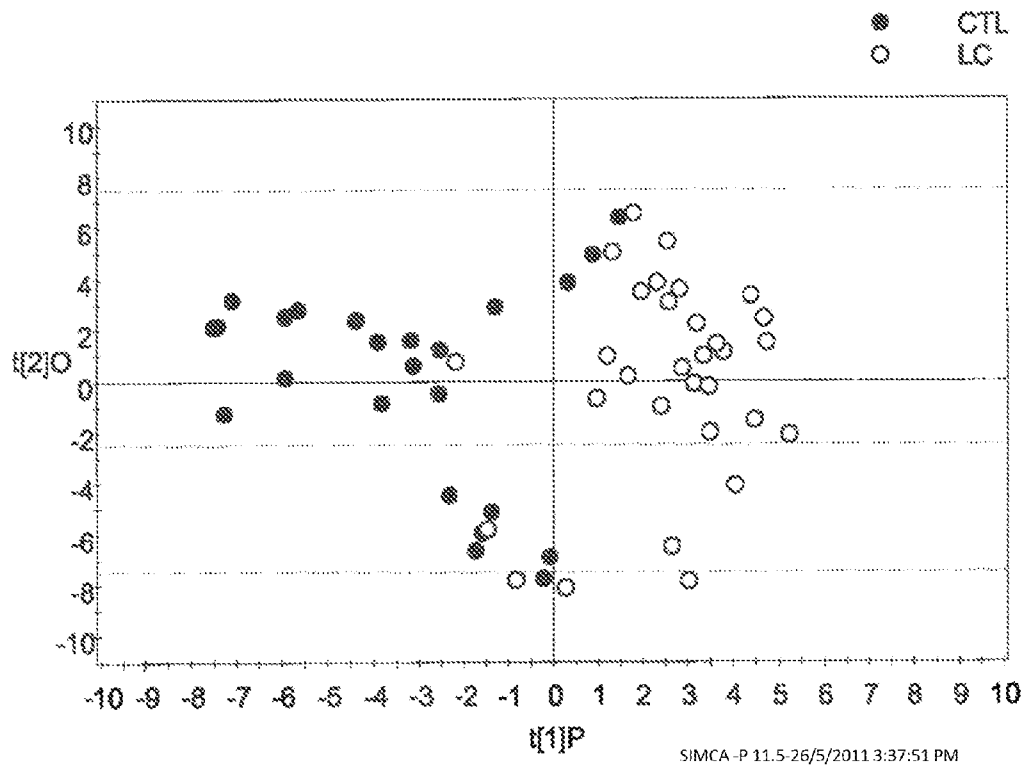
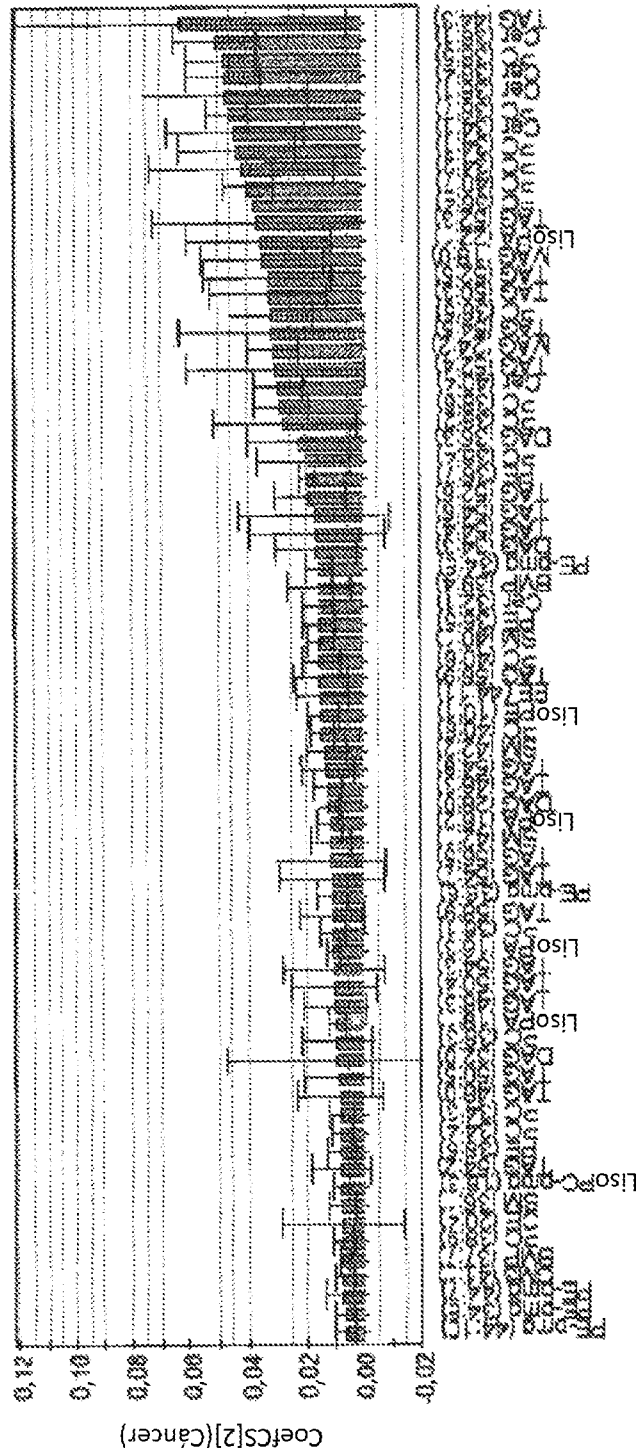


Figura 18



Var ID (primario)

SIMCA-P 11.5 -2/6/2011 12:09:14 PM

Figura 19

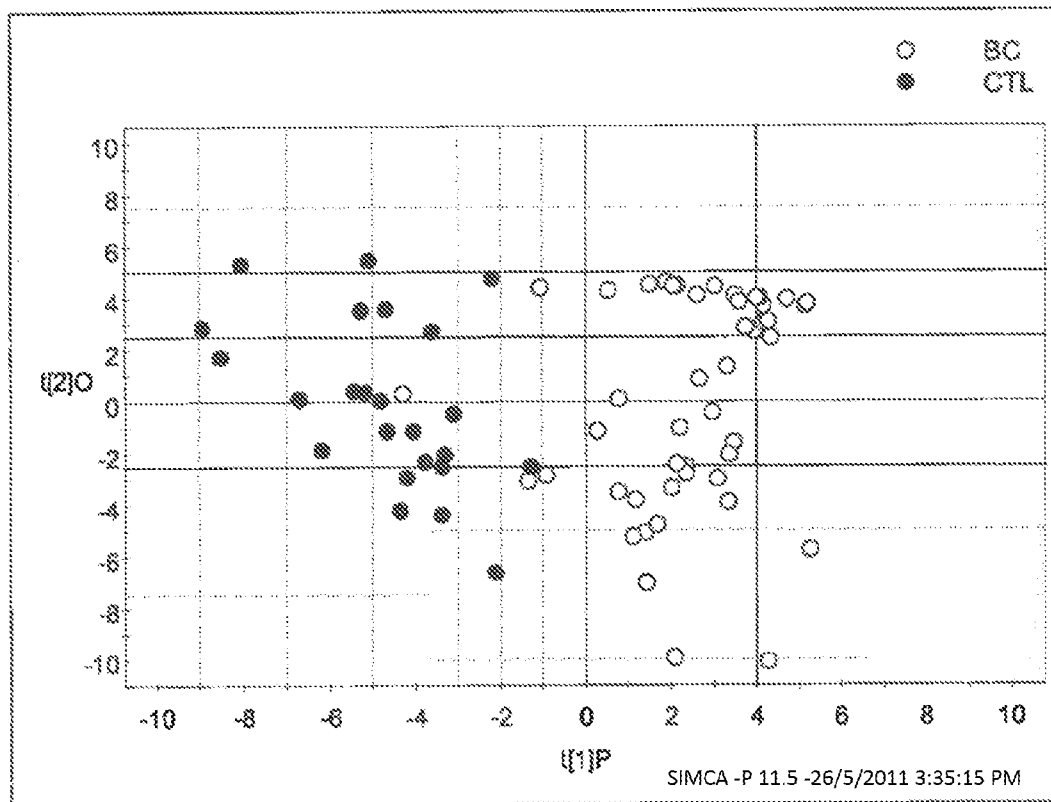


Figura 20

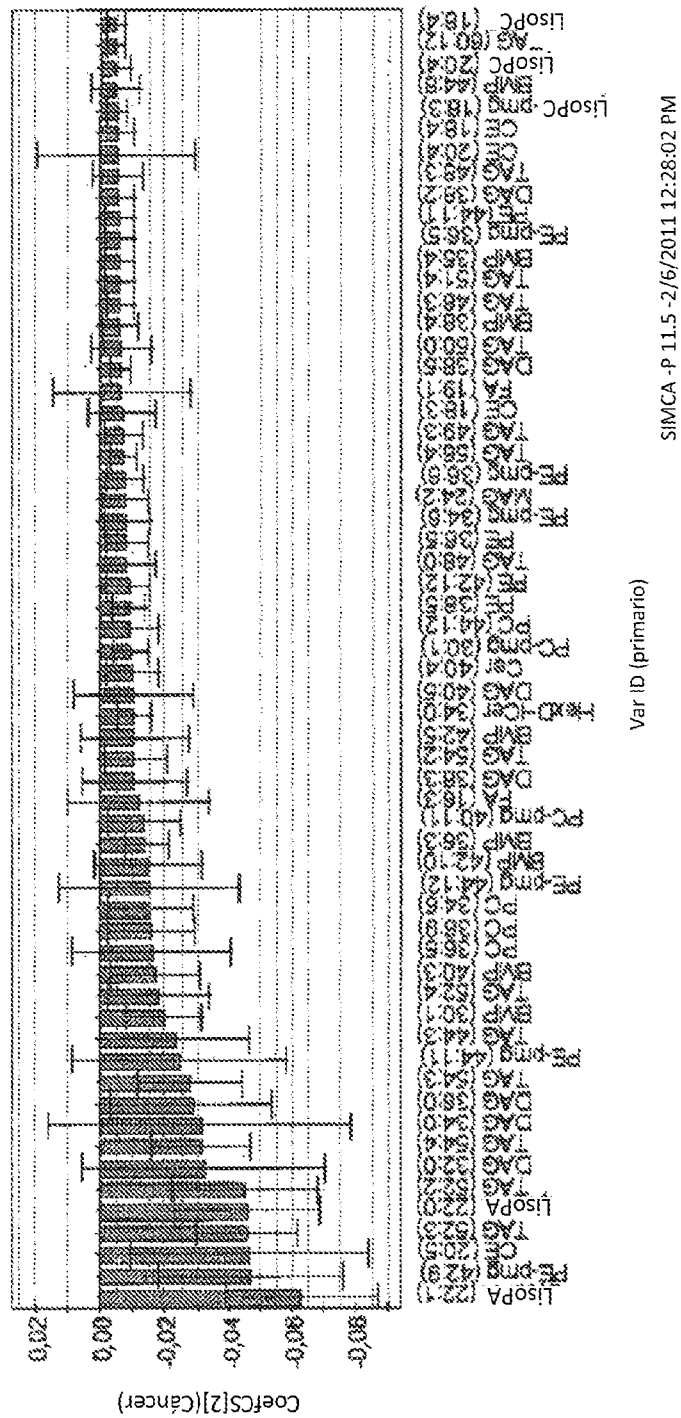


Figura 21

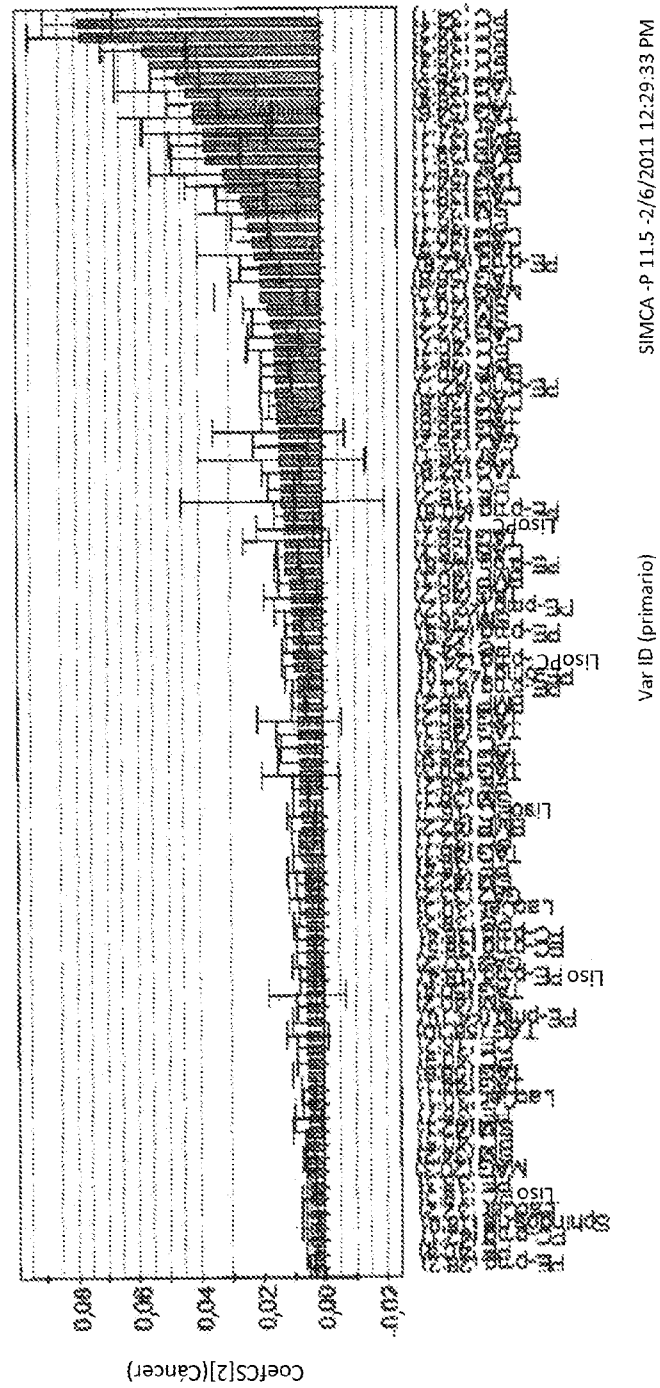


Figura 22

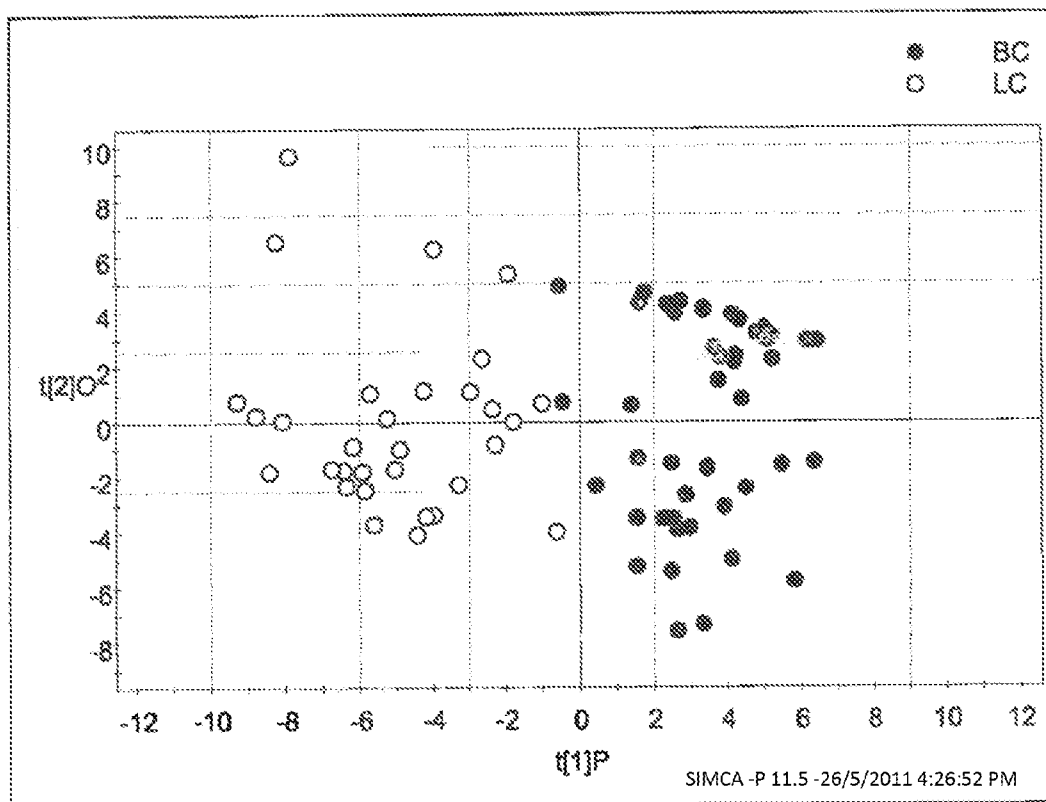


Figura 23



Figura 24

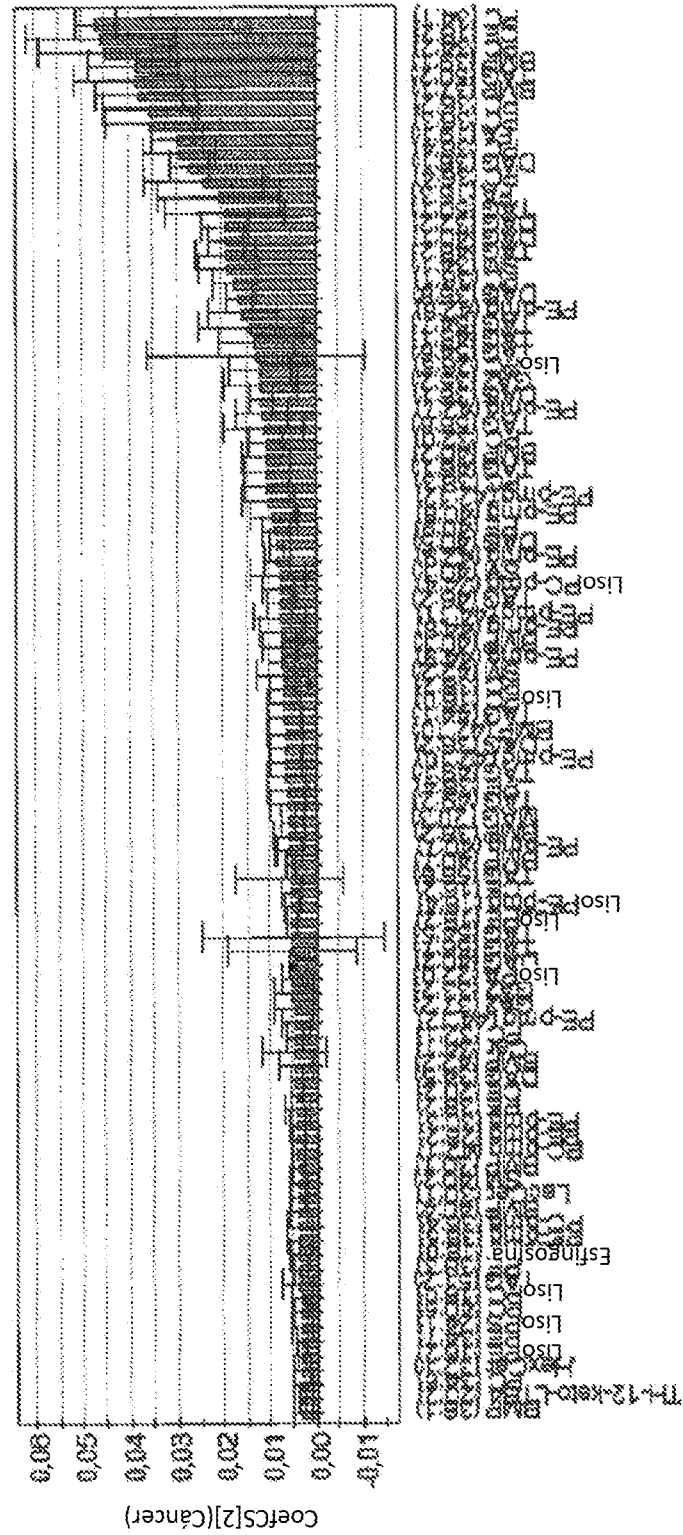


Figura 25

