

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 011**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2018** **E 18174963 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2023** **EP 3575793**

54 Título: **Método de diagnóstico de cáncer basado en el análisis lipidómico de un líquido corporal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.02.2024

73 Titular/es:

FONS JK GROUP, A.S. (100.0%)
Pernstynske namesti 51
53002 Pardubice, CZ

72 Inventor/es:

HOLCAPEK, MICHAL;
JIRASKO, ROBERT;
WOLRAB, DENISE y
CIFKOVA, EVA

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 960 011 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

Método de diagnóstico de cáncer basado en el análisis lipidómico de un líquido corporal

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico de cáncer de riñón basado en el análisis lipidómico de un líquido corporal, que es adecuado para para cribado de alto rendimiento con una alta sensibilidad y especificidad.

10 **Antecedentes de la técnica**

El cáncer es una de las enfermedades humanas más graves, que provoca un gran número de muertes en todo el mundo. Existen numerosos tipos de cáncer, normalmente clasificados según el órgano primario, cuando las células tumorales comienzan a crecer. Incluso el cáncer de un órgano particular tiene varios subtipos de enfermedad, lo que da como resultado una gran complejidad y heterogeneidad de esta enfermedad, lo que requiere un tratamiento personalizado para aumentar las posibilidades de una recuperación completa o al menos parcial de pacientes individuales. El diagnóstico temprano del cáncer es la cuestión más crítica investigada por muchos equipos de investigación en todo el mundo, porque el diagnóstico temprano del cáncer puede aumentar significativamente las posibilidades de supervivencia y recuperación. Desafortunadamente, muchos tipos de cáncer no presentan síntomas o solo presentan síntomas menores en los estadios tempranos, de modo que la situación común es que el paciente se diagnostica demasiado tarde. El pronóstico es mucho mejor cuando la enfermedad se reconoce antes, pero los métodos de diagnóstico disponibles actualmente son complejos, costosos y laboriosos, lo que no es adecuado para el cribado poblacional de rutina. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar continuamente nuevos métodos para el cribado y el diagnóstico del cáncer y para distinguir entre diversos tipos de cáncer, que sean rápidos, económicos, con una invasividad limitada, adecuados para el cribado rutinario de alto rendimiento, con una sensibilidad y especificidad suficientes, es decir, bajo porcentaje de resultados falsos positivos y falsos negativos.

Se investigan diversos métodos basados en biomarcadores específicos, usando muestras de líquidos corporales, lo más comúnmente sangre. Estos biomarcadores provisionales son a menudo proteínas, glicoproteínas, productos de escisión de proteínas y ARN corto, tal como miARN. El diagnóstico usando estos biomarcadores normalmente se basa en métodos inmunoquímicos o PCR.

Sería deseable desarrollar métodos de diagnóstico basados en otras metodologías y otro tipo de biomarcadores. Estos métodos de cribado deben cumplir varios requisitos, tales como la disponibilidad de tratamiento para una enfermedad diagnosticada tempranamente con un pronóstico significativamente mejor en comparación con un diagnóstico tardío, un rendimiento de muestra suficientemente alto para poder realizar al menos un cribado poblacional parcial de individuos con mayor riesgo, el precio del cribado tiene que ser aceptable para el sistema sanitario en relación con los beneficios obtenidos por el diagnóstico temprano, etc. La recogida de sangre u orina es una parte común de la atención sanitaria preventiva. Para el cribado poblacional, es indispensable una metodología de alto rendimiento basada en análisis de sangre. Una vez que el análisis de sangre da un resultado positivo, deben realizarse investigaciones adicionales, tales como métodos de obtención de imágenes, es decir, espectroscopia de resonancia magnética. Sin embargo, aun cuando tal prueba es necesaria con urgencia, hasta el momento existen tan solo estudios limitados para el análisis del cáncer a partir de sangre basándose principalmente en el análisis de ADN, ARN o proteínas. Estudios anteriores demostraron que los lípidos desempeñan un papel crucial en el desarrollo del cáncer, tal como se demuestra en el análisis de tejidos tumorales y líneas celulares [E. Cífková, M. Holčápek, M. Lisa, D. Vrána, J. Gatěk, B. Melichar, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 991-1002, E. Cífková, M. Lisa, R. Hrstka, D. Vrána, J. Gatěk, B. Melichar, M. Holčápek, Rapid Commun. Mass Spectrom. 31 (2017) 253-263], pero aún no para líquidos corporales que pueden recogerse aplicables para cribado de alto rendimiento. Los primeros intentos hacia el análisis lipidómico de los líquidos corporales humanos los ha presentado Metanomics [documentos US 2013/0140452, WO 2016/207391], pero desafortunadamente las sensibilidades y especificidades eran demasiado bajas para aplicaciones de la vida real.

Patel N. *et al.*, PLOS ONE, 9(3): e88841, 2014; Hammad L.A. *et al.*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009; 23: 863-876; Lisa M., Journal of Chromatography A, 1525 (2017) 96-108 son documentos representativos que dan a conocer el estado de la técnica en el campo del análisis de lípidos en muestras corporales mediante espectrometría de masas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método que usa el análisis lipidómico para el diagnóstico de un cáncer de riñón. La principal ventaja de la presente invención es que la obtención del perfil lipidómico funciona bien para todos los estadios del cáncer, incluidos los estadios más tempranos. La hipótesis básica y bastante simple que explica el éxito del análisis lipidómico para el cribado del cáncer es que las células tumorales se dividen tan rápidamente que estas células requieren un gran número de unidades estructurales para la preparación de bicapas lipídicas de nuevas células tumorales. Este proceso es mucho más rápido que la división celular convencional en el organismo sano, por tanto, la composición lipidómica de la célula tumoral y normal debe ser diferente también, y estos cambios

también se ven reflejados en los líquidos corporales que pueden recogerse.

La presente invención tiene como objetivo superar los problemas y desafíos del estado de la técnica actual, y proporcionar un método de diagnóstico del cáncer de riñón a partir del análisis de líquidos biológicos, siendo dicho método utilizable para el cribado poblacional de alto rendimiento rutinario.

La presente invención, por tanto, proporciona un método de diagnóstico del cáncer de riñón basado en el análisis lipídico de una muestra de líquido corporal tomada del cuerpo de un paciente, que comprende las etapas de:

- 10 - realizar en la muestra adiciones conocidas de un conjunto de patrones internos que comprenden al menos un patrón interno para cada clase de lípido presente en la muestra,
- posteriormente procesar la muestra mediante extracción lipídica líquido-líquido o mediante extracción lipídica en fase sólida,
- 15 - medición de la muestra procesada mediante un método de espectrometría de masas,
- determinar las concentraciones para al menos 28, más preferiblemente para todos los lípidos presentes a un nivel por encima del umbral de detección del método de espectrometría de masas, usando los patrones internos para las correspondientes clases de lípidos para la cuantificación, o usando concentraciones relativas, o usando las razones de concentraciones y/o intensidades de señal,
- 20 - evaluación estadística de las concentraciones determinadas de los lípidos, determinando dicha evaluación estadística el nivel de probabilidad de que el paciente padezca cáncer de riñón, basándose en las concentraciones de lípidos determinadas en comparación con un patrón canceroso y un patrón no canceroso, en el que el patrón canceroso y el patrón no canceroso se determinan mediante análisis estadístico de las concentraciones de lípidos para un grupo de muestras cancerosas y muestras no cancerosas conocidas; y en el que la evaluación estadística se realiza por separado para hombres y mujeres.

30 El método de la invención permite distinguir entre una persona sana y una persona que padece cáncer de riñón. El patrón canceroso indica que el paciente padece cáncer.

El término "líquido corporal" incluye líquidos corporales seleccionados de plasma, suero, sangre, orina.

35 En realizaciones preferidas, se determinan las concentraciones de al menos 28, o al menos 37, o al menos 60, o al menos 120, o al menos 230, o al menos 400, o al menos 406, o al menos 440, o al menos 450, o al menos 500 lípidos.

40 En una realización preferida, se determinan las concentraciones de al menos 28 lípidos cuando el líquido corporal es sangre, plasma o suero. En la tabla 2 a continuación se muestra un conjunto particularmente preferido de al menos 28 lípidos. En la tabla 1 a continuación se muestra un conjunto más preferido de lípidos.

El paciente es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

45 Los patrones internos deben ser compuestos de tipo lipídico, estructuralmente cercanos a la clase de lípido relevante. Normalmente, los patrones internos son compuestos que tienen la estructura (en particular, la estructura de cabeza polar) típica de la clase de lípido relevante pero que contiene ácidos grasos con cadenas más cortas que los lípidos que se producen de manera natural (por ejemplo, cadenas 12:0 o 14:0) o ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono (por ejemplo, cadenas 17:0, 17:1 o 19:1) o análogos marcados isotópicamente (por ejemplo, D7-Chol, D7-CE 16:0).

Las clases de lípidos son las siguientes:

Ésteres de colesterol (CE)	Lisofosfatidilserinas (LPS)
Ceramidas (Cer)	Monoacilgliceroles (MG)
Diacilgliceroles (DG)	Ácidos fosfatídicos (PA)
Dihexosilceramidas (Hex2Cer)	Fosfatidilcolinas (PC)
Hexosilceramidas (HexCer)	Fosfatidiletanolaminas (PE)
Colesterol	Fosfatidilgliceroles (PG)
Ácidos lisofosfatídicos (LPA)	Fosfatidilserinas (PS)
Lisofosfatidilcolinas (LPC)	Esfingomielinas (SM)
Lisofosfatidiletanolaminas (LPE)	Sulfátidos, sulfohexosilceramidas (Sul o SulfoHexCer)
Lisofosfatidilgliceroles (LPG)	Sulfodihexosilceramidas (SulfoHex2Cer)
Gangliósidos GM3	Triacilgliceroles (TG)

55 Un ejemplo de un conjunto de patrones internos (IS) es la siguiente lista:

D7-CE 16:0	LPE 14:0	PG 14:0/14:0
Cer d18:1/12:0	LPG 14:0	PS 14:0/14:0
DG 12:1/12:1	LPA 14:0	SM d18:1/12:0
Hex2Cer d18:1/12:0	MG 19:1	SulfoHexCer d18:1/12:0
HexCer d18:1/12:0	PA 14:0/14:0	TG 19:1/19:1/19:1
D7-Chol	PC 14:0/14:0	LPS 17:1
LPC 17:0	PE 14:0/14:0	GM3 18:1/12:0

La notación de compuestos lipídicos en este texto es tal como sigue: abreviatura de la clase de los compuestos, número de carbonos: número de dobles enlaces. La abreviatura de la clase puede ir precedida de información sobre el marcaje isotópico, si es relevante.

Debido a la adición del patrón interno antes del procesamiento de la muestra, pueden compensarse ligeras diferencias debidas, por ejemplo, a errores de pipeteo, ya que el patrón interno se ve afectado de la misma manera que los compuestos diana. Esto garantiza una mejor fiabilidad de la cuantificación de lípidos individuales.

Las extracciones lipídicas líquido-líquido se conocen en la técnica. Pueden usarse disolventes orgánicos, seleccionados entre alcanos clorados, dialquil éteres, alcoholes y mezclas de agua, que forman sistemas bicapa que contienen fases orgánicas y acuosas. Preferiblemente se usan cloroformo, metil-terc-butil éter, metanol, etanol, propanol y/o butanol. Lo más preferiblemente, se usa un sistema de cloroformo - metanol - agua, tal como se describe, por ejemplo, en E. Cífková, M. Holčápek, M. Lisa, D. Vrána, J. Gatěk, B. Melichar, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 991-1002; o en E. Cífková, M. Lisa, R. Hrstka, D. Vrána, J. Gatěk, B. Melichar, M. Holčápek, Rapid Commun. Mass Spectrom. 31 (2017) 253-263. La fase orgánica del sistema de extracción líquido-líquido que contiene lípidos se recoge y se usa para su procesamiento adicional. Las extracciones en fase sólida (SPE) se conocen en la técnica. El sorbente de material normalmente no polar (fase inversa) se usa para capturar lípidos que contienen cadenas de acilo hidrófobas. En primer lugar, se lava la columna de SPE y se acondiciona con disolvente de elución débil (por ejemplo, agua), luego se carga la muestra (por ejemplo, orina), se lava con agua y finalmente se eluye con un disolvente fuerte adecuado para la elución de lípidos retenidos, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, o en mezcla con disolventes clorados (diclorometano, cloroformo, etc.) o hidrocarburos (heptano, hexano, etc.). Como la migración y la solubilidad de los componentes de la muestra dependen del tiempo, es muy preferible que la etapa de extracción siempre se realice del mismo modo para todas las muestras medidas en un lote, en particular que la extracción se realice a lo largo del mismo período de tiempo para cada muestra. La fase orgánica normalmente se procesa mediante evaporación del disolvente orgánico y volviendo a disolver el residuo en un disolvente o mezcla de disolventes con la mayor solubilidad para los compuestos diana antes de diluirlo en el disolvente para la medición por espectrometría de masas. Los disolventes adecuados para mediciones de espectrometría de masas incluyen alcanos clorados, alcanos y alcoholes, preferiblemente cloroformo o diclorometano, hexano y alcoholes C1-C4, más preferiblemente una mezcla de cloroformo y 2-propanol (por ejemplo, en una razón en volumen de 1:1) o hexano:2-propanol:cloroformo 7:1,5:1,5 o cloroformo - metanol - 2-propanol (1:2:4, v/v/v). Pueden añadirse componentes adicionales, por ejemplo, acetato de amonio, ácido acético, etc. Alcanos, a menos que se defina lo contrario, significan alcanos C1-C6, preferiblemente alcanos C1-C4.

Se prefiere eliminar las proteínas de la muestra durante o después de la extracción, ya que las proteínas pueden interferir indeseablemente con el análisis de lípidos.

El método de espectrometría de masas se selecciona preferiblemente de espectrometría de masas indiscriminada, cromatografía de líquidos - espectrometría de masas (CL/EM), cromatografía de líquidos de rendimiento ultra alto - espectrometría de masas (UHPLC/EM), cromatografía de fluidos supercríticos - espectrometría de masas (SFC/EM), cromatografía de fluidos supercríticos de rendimiento ultra alto - espectrometría de masas (UHPSFC/EM) y espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI/EM).

El método de la presente invención se beneficia del uso de una muestra combinada. Una muestra combinada es una muestra preparada mezclando volúmenes idénticos de varias muestras, en la que las muestras mezcladas incluyen muestras de pacientes con cáncer y voluntarios sanos. La proporción de muestras provenientes de hombres con respecto a muestras provenientes de mujeres debe ser aproximadamente la misma que en el lote de muestras medido. El término "aproximadamente la misma" se refiere a una desviación de la proporción de hombres:mujeres en el lote medido de como máximo un 20 %, preferiblemente como máximo un 10 %, más preferiblemente como máximo un 5 %. La muestra combinada se obtiene preferiblemente combinando 50-100 muestras.

Las concentraciones de patrones internos en la mezcla se optimizaron cuidadosamente con el fin de que fueran aplicables a todos los métodos basados en espectrometría de masas usados en esta invención. La concentración del patrón interno debe estar de ese modo preferiblemente en el intervalo de concentración de los lípidos que se producen de manera natural. Sin embargo, como el intervalo de concentración varía significativamente dentro de la clase de lípido, se prefiere usar la concentración entre el 10 y el 100 % de la concentración de las especies de lípidos que se producen de manera natural más abundantes dentro de la clase respectiva, más preferiblemente entre

el 20 y el 80 %.

La muestra combinada, procesada de la misma manera que cualquier otra muestra, es decir, con adiciones conocidas de una mezcla de patrón interno y sometida a extracción líquido-líquido y a cualquier otra etapa de procesamiento de la muestra, se usa para la validación completa y el control de calidad durante las mediciones de espectrometría de masas. El orden de las muestras es aleatorio para la preparación y medición de las muestras para evitar secciones de medición de muestras cancerosas y no cancerosas en una determinada porción de la secuencia de medición.

La muestra combinada puede usarse para observar la exactitud intradiaria y la precisión intradiaria, así como la exactitud interdiaria y la precisión interdiaria.

Además, es ventajoso preparar muestras de prueba o muestras combinadas con adiciones conocidas de concentraciones variables de la mezcla de patrón interno.

El límite de detección (LOD) de un lípido se determina preferiblemente basándose en la razón de señal con respecto a ruido, por ejemplo, tal como $S/N = 3$.

La muestra combinada con adiciones conocidas de concentraciones variables de la mezcla de patrón interno se usa para determinar el límite inferior de cuantificación (LLOQ) y el límite superior de cuantificación (ULOQ), correspondiendo dichos límites al primer y último punto del intervalo de linealidad de la curva de calibración. La curva de calibración es la dependencia de la señal de la concentración de un lípido. El intervalo de linealidad de la curva de calibración es un intervalo desde LLOQ hasta ULOQ, donde puede determinarse la concentración de lípidos.

Las concentraciones de todos los lípidos presentes en un nivel por encima del LLOQ y por debajo del ULOQ del método de espectrometría de masas también se denominan comúnmente "perfil lipídómico".

La cuantificación (determinación de concentraciones) de todos los lípidos presentes en un nivel por encima del LLOQ y por debajo del ULOQ del método de espectrometría de masas, usando los patrones internos para las clases de lípidos correspondientes para la cuantificación, comprende preferiblemente los siguientes procedimientos y correcciones:

- corrección isotópica (deisotopía), es decir, corrección de la intensidad de señal de un lípido debido a la contribución isotópica $M+2$ de otro lípido con un peso molecular que es 2 unidades de masa menor que dicho lípido (por ejemplo, interferencia isotópica del lípido con un doble enlace adicional) o debido a la contribución isotópica $M+1$ de otro lípido con un peso molecular 1 unidad de masa menor que dicho lípido (por ejemplo, interferencias entre los subgrupos PC y SM). La corrección se realiza restando la intensidad relativa $M+2$ (o $M+1$) calculada basándose en la intensidad conocida en los espectros medidos.
- procedimiento de relleno con ceros en el que las señales de especies de lípidos que no se detectan para una muestra particular se reemplazan por del 50 al 100 %, preferiblemente por del 60 al 100 %, más preferiblemente por del 60 al 70% o por del 80 al 90 % o por el 67 % o por el 80 % de la concentración mínima observada para dichas especies de lípidos en todas las muestras.

La exactitud y fiabilidad de la cuantificación se garantiza o se mejora mediante las siguientes características:

- uso de al menos un patrón interno de la clase de lípidos exógenos para la cuantificación de especies de lípidos en cada clase,
- coelución y colonización de patrones internos de (sub)clases de lípidos y analitos de la misma clase de lípidos usando o bien el método de cromatografía de separación de clases de lípidos acoplado a espectrometría de masas (EM) o bien EM sin ninguna separación cromatográfica. Este coprocesamiento se garantiza por la adición del patrón interno antes de que la muestra se procese,
- uso de la muestra combinada con adiciones conocidas de los patrones internos como muestra de control de calidad inyectada después de un número predeterminado de muestras,
- control de medición extrayendo la respuesta de la señal de cada patrón interno en cada muestra y evaluación de respuesta de la señal de aquellos a lo largo del periodo de tiempo de la secuencia de medición diariamente
- procedimiento de relleno con ceros,
- corrección isotópica.

Estas características ayudan a controlar la calidad de las mediciones mediante la prevención de una baja reproducibilidad, falta de robustez, cambios de señal a lo largo del tiempo, supresión/potenciación de iones, efectos de arrastre y el cambio de respuesta del espectrómetro de masas debido a contaminación.

5 Cuando se determinan varios cientos de lípidos en cientos de muestras, puede suceder que la señal esperada no se detecte para algunas moléculas de lípidos debido a diversos motivos, y entonces la concentración debe notificarse como "por debajo del LLOQ" de acuerdo con la práctica analítica establecida. Este enfoque analítico bien
10 establecido no funciona bien en el caso de la cuantificación lipídica, y el MDA basado en tal enfoque proporcionaría una mala resolución de los grupos sano/enfermo, y puede no proporcionar una sensibilidad y especificidad aceptables para la detección del cáncer. Este enfoque se adapta a los casos en los que todas las señales faltantes corresponden a la situación en la que la concentración real del analito está por debajo del LLOQ, por ejemplo, la determinación de un bajo número de analitos bien separados por cromatografía. Sin embargo, la situación en la cuantificación de lípidos es muy diferente, porque se cuantifican aproximadamente 150-400 lípidos por muestra y muchos de ellos (o todos en el caso de la indiscriminada) se eluyen conjuntamente, lo que puede dar
15 como resultado la ausencia de señal debido a otros motivos además de la concentración por debajo del LLOQ, principalmente debido a la supresión de iones u otros motivos que causan la caída de la señal, incluida la contaminación del sistema, impurezas de la fase móvil, sangrado de la columna cromatográfica, etc. La complejidad del análisis lipídico es enorme y es una situación natural que algunas señales no se registren ni procesen de manera adecuada independientemente de la mejor práctica analítica y un cuidadoso trabajo analítico. Por tanto, se ha desarrollado un nuevo enfoque de relleno con ceros donde los valores que faltan por cualquier motivo se reemplazan por del 75 al 85 %, preferiblemente por el 80 %, de la concentración mínima observada para esta especie de lípido en todas las muestras. Este enfoque mejora significativamente la calidad del análisis estadístico posterior. Los presentes resultados preliminares muestran que cuando se descuida el enfoque de relleno con ceros, la calidad de la detección del cáncer es significativamente peor o imposible. Después de eso, se calculan el
20 promedio y la desviación estándar de los duplicados.

La evaluación estadística se realiza preferentemente mediante análisis multivariante de datos (MDA). Los métodos de MDA pueden ser métodos estadísticos no supervisados, tal como el análisis de componentes principales (PCA), o métodos estadísticos supervisados, tal como las proyecciones ortogonales al análisis discriminante de estructuras latentes (OPLS-DA).
30

El "patrón canceroso" significa el patrón de concentraciones de lípidos típico de muestras de un líquido corporal obtenidas de pacientes que padecen cáncer de riñón. Habitualmente, se obtiene mediante análisis estadístico de las muestras obtenidas de pacientes que padecen cáncer de riñón frente a muestras obtenidas de voluntarios sanos.
35

La evaluación estadística se realiza por separado para hombres y mujeres.

Preferiblemente, la evaluación estadística implica

40 - preprocesamiento de datos tal como centrado, escalado y/o transformación. El centrado correlaciona los cambios relativos con el promedio del conjunto de datos. El escalado unifica el impacto de diferentes intervalos de concentración sobre el modelo (escalado UV y de Pareto) de modo que las concentraciones bajas (quizás igualmente importantes) no queden enmascaradas por concentraciones muy abundantes. La transformación logarítmica ensambla los datos a la distribución normal. Un preprocesamiento apropiado tiene una influencia significativa sobre la calidad de los resultados.
45

- Análisis PCA usado para la identificación de valores atípicos, errores de medición y otros factores influyentes. El análisis PCA también puede visualizar diferencias entre grupos, así como agrupar las muestras de control de calidad (QC) en comparación con otras muestras.
50

- Análisis de discriminación (OPLS-DA) para la separación de grupos de pacientes con cáncer y voluntarios sanos. El análisis de discriminación se realiza para hombres y mujeres por separado.

55 - Asignación de los parámetros estadísticos así como la evaluación del poder de predicción.

En primer lugar, se usan los métodos estadísticos para construir modelos estadísticos (patrones cancerosos y patrones no cancerosos) basados en perfiles lipídicos de líquidos corporales de voluntarios sanos y pacientes con cáncer. Estos modelos estadísticos se utilizan luego para visualizar las diferencias del patrón canceroso y no canceroso, así como para la determinación del nivel de probabilidad de que el paciente padezca cáncer de riñón o esté sano, basándose en las concentraciones de lípidos determinadas que resultan en un patrón canceroso o un patrón no canceroso, respectivamente.
60

La sensibilidad y especificidad describen el poder de predicción del método para asignar correctamente muestras de grupos de voluntarios sanos o de pacientes con cáncer. Los valores de sensibilidad y especificidad deben ser superiores al 70 %, preferiblemente superiores al 80 % o superiores al 85 %, más preferiblemente superiores al 90 % para muestras de clasificación conocida y desconocida. En algunas realizaciones, los valores de sensibilidad y
65

especificidad logrados son superiores al 95 % para muestras de clasificación conocida y desconocida.

El rendimiento de muestras de la metodología de la invención es de al menos 10.000 muestras al año y un aparato de espectrometría de masas al nivel actual de automatización de los laboratorios de espectrometría de masas convencionales.

Los conjuntos de lípidos adecuados que van a determinarse para diagnosticar la presencia del cáncer se obtienen normalmente mediante un análisis de todos los lípidos detectables para un grupo de voluntarios sanos y pacientes con cáncer. Se prefieren los lípidos que están presentes en diferentes cantidades en las muestras sanas frente a las cancerosas para su inclusión en los conjuntos de lípidos que van a determinarse.

Tabla 1. La siguiente tabla muestra un conjunto preferido de lípidos cuyas concentraciones se determinan preferiblemente en la presente invención en muestras de sangre. Opcionalmente, pueden determinarse las concentraciones de lípidos adicionales.

Glicerofosfolípidos					
LPC 15:0	PC 36:2	PC O-36:5	PE 37:3	PE O-36:6	PI 34:2
LPC 16:0	PC 36:3	PC O-37:1	PE 37:5	PE O-36:7	PI 34:3
LPC 16:1	PC 36:4	PC O-37:2	PE 37:6	PE O-37:1	PI 35:0
LPC 18:0	PC 36:5	PC O-37:3	PE 38:0	PE O-37:2	PI 35:1
LPC 18:1	PC 37:3	PC O-38:2	PE 38:1	PE O-37:3	PI 36:1
LPC 18:2	PC 37:4	PC O-38:3	PE 38:2	PE O-38:0	PI 36:2
LPC 20:3	PC 37:5	PC O-38:4	PE 38:4	PE O-38:1	PI 36:3
LPC 20:4	PC 37:6	PC O-38:5	PE 38:5	PE O-38:2	PI 36:4
LPC 22:6	PC 38:2	PC O-38:6	PE 38:6	PE O-38:3	PI 38:1
LPC O-16:0	PC 38:3	PC O-39:2	PE 38:7	PE O-38:4	PI 38:2
LPE 16:0	PC 38:4	PC O-39:3	PE 39:0	PE O-38:5	PI 38:3
LPE 18:0	PC 38:5	PC O-40:5	PE 39:4	PE O-38:6	PI 38:4
LPE 18:1	PC 38:6	PC O-40:6	PE 39:5	PE O-39:0	PI 38:5
LPE 18:2	PC 39:5	PC O-40:9	PE 39:6	PE O-39:1	PI 40:0
LPE 20:4	PC 39:6	PE 32:1	PE 40:4	PE O-39:2	PI 40:4
LPE 22:5	PC 40:4	PE 33:1	PE 40:5	PE O-40:0	PI 40:5
LPE 22:6	PC 40:5	PE 33:2	PE 40:6	PE O-40:4	PI 40:6
PC 30:0	PC 40:6	PE 34:0	PE 40:7	PE O-40:5	PS 34:0
PC 32:0	PC O-33:0	PE 34:1	PE 41:2	PE O-40:6	PS 36:1
PC 32:1	PC O-33:1	PE 34:2	PE 42:9	PE O-40:7	PS 36:4
PC 32:2	PC O-33:2	PE 34:3	PE O-33:1	PE O-40:8	PS 36:5
PC 34:1	PC O-34:1	PE 35:1	PE O-34:1	PE O-40:9	PS 37:0
PC 34:2	PC O-34:2	PE 35:2	PE O-34:2	PE O-42:2	PS 38:1
PC 34:3	PC O-34:3	PE 35:3	PE O-35:1	PG 32:1	PS 38:2
PC 34:4	PC O-35:1	PE 35:5	PE O-35:2	PG 36:0	PS 38:3
PC 35:1	PC O-35:2	PE 36:1	PE O-35:3	PG 36:4	PS 38:4
PC 35:2	PC O-35:3	PE 36:2	PE O-36:1	PI 32:0	PS 38:6
PC 35:3	PC O-36:1	PE 36:3	PE O-36:2	PI 32:1	PS 38:7
PC 35:4	PC O-36:2	PE 36:4	PE O-36:3	PI 33:0	PS 42:1
PC 35:5	PC O-36:3	PE 36:5	PE O-36:4	PI 33:1	
PC 36:1	PC O-36:4	PE 37:0	PE O-36:5	PI 34:1	
Esfingolípidos					
Cer 33:2 (OH)	Hex2Cer 33:2 (OH)	SM 34:0	SM 41:3	Sul 38:2	Sul 42:3 (OH)
Cer 34:1	Hex2Cer 34:1	SM 34:1	SM 42:1	Sul 38:2 (OH)	SulfoHex2Cer 34:1
Cer 34:2	Hex2Cer 39:1 (OH)	SM 34:2	SM 42:2	Sul 40:0 (2OH)	SulfoHex2Cer 40:1
Cer 34:3	Hex2Cer 39:2 (OH)	SM 35:1	SM 42:3	Sul 40:0 (OH)	SulfoHex2Cer 42:1
Cer 35:3 (OH)	Hex2Cer 40:1	SM 36:0	SM 42:4	Sul 40:1	SulfoHex2Cer 42:2
Cer 36:2	Hex2Cer 41:3 (OH)	SM 36:1	SM 43:1	Sul 40:1 (OH)	GM3 34:1
Cer 36:3	Hex2Cer 42:2	SM 36:2	SM 43:2	Sul 40:2	GM3 34:2
Cer 36:4	HexCer 33:2 (OH)	SM 37:0	SM 43:3	Sul 40:2 (OH)	GM3 36:1
Cer 39:2 (OH)	HexCer 34:1	SM 37:1	Sul 32:1 (OH)	Sul 41:1	GM3 36:2
Cer 40:1	HexCer 39:2 (OH)	SM 38:0	Sul 34:0 (OH)	Sul 41:1 (OH)	GM3 38:1
Cer 40:2	HexCer 40:1	SM 38:1	Sul 34:1	Sul 41:2	GM3 38:2
Cer 40:2 (OH)	HexCer 41:2 (OH)	SM 38:2	Sul 34:1 (OH)	Sul 41:2 (OH)	GM3 40:2
Cer 41:1	HexCer 41:3 (OH)	SM 39:1	Sul 34:2	Sul 42:0 (2OH)	GM3 40:1
Cer 41:2 (OH)	HexCer 42:1	SM 39:2	Sul 34:2 (OH)	Sul 42:1	GM3 41:1
Cer 41:3 (OH)	HexCer 42:2	SM 40:0	Sul 35:1	Sul 42:1 (2OH)	GM3 41:2

Cer 42: 1	HexCer 42:2 (OH)	SM 40:1	Sul 36:1	Sul 42:1 (OH)	GM3 42:3
Cer 42:2	HexCer 43:1	SM 40:2	Sul 36:1 (OH)	Sul 42:2	GM3 42:2
Cer 42:2 (OH)	SM 32:1	SM 40:3	Sul 37:1	Sul 42:2 (2OH)	GM3 42:1
Cer 42:3	SM 32:1	SM 41:1	Sul 38:1	Sul 42:2 (OH)	GM3 42:2 (OH)
Cer 43:1	SM 33:1	SM 41:2	Sul 38:1 (OH)	Sul 42:3	GM3 42:1 (OH)
Glicerolípidos					
MG 16:0	DG 36:1	TG 47:2	TG 50:5	TG 53:4	TG 56:4
MG 16:1	DG 36:2	TG 48:0	TG 51:1	TG 53:5	TG 56:5
MG 18:0	DG 36:3	TG 48:1	TG 51:2	TG 54:1	TG 56:6
MG 18:1	DG 36:4	TG 48:2	TG 51:3	TG 54:2	TG 56:7
MG 18:2	TG 42:2	TG 48:3	TG 51:4	TG 54:3	TG 56:8
MG 19:0	TG 44:0	TG 48:4	TG 51:5	TG 54:4	TG 57:1
DG 30:0	TG 44:1	TG 49:0	TG 51:6	TG 54:5	TG 58:0
DG 32:0	TG 44:2	TG 49:1	TG 52:1	TG 54:6	TG 58:2
DG 32:1	TG 45:0	TG 49:2	TG 52:2	TG 54:7	TG 58:3
DG 32:2	TG 45:1	TG 49:3	TG 52:3	TG 54:8	TG 58:4
DG 34:0	TG 46:0	TG 50:0	TG 52:4	TG 55:4	TG 58:5
DG 34:1	TG 46:1	TG 50:1	TG 52:5	TG 55:5	TG 58:6
DG 34:2	TG 46:2	TG 50:2	TG 52:6	TG 55:6	TG 58:7
DG 34:3	TG 47:0	TG 50:3	TG 53:2	TG 56:1	TG 58:8
DG 36:0	TG 47:1	TG 50:4	TG 53:3	TG 56:2	TG 58:8
Lípidos de esterol					
CE 14:0	CE 16:1	CE 18:2	CE 20:4	CE 22:6	sulfato de colesterol
CE 16:0	CE 18:1	CE 18:3	CE 20:5	colesterol	sulfato de colesterol (OH)

Tabla 2. La siguiente tabla muestra el conjunto más preferido de lípidos cuyas concentraciones se determinan lo más preferiblemente en la presente invención en las muestras de sangre.

Esfingolípidos			
Cer42: 1	SM 38:1	SM 42:1	Sul 40:2 (OH)
SM 32:1	SM 39:1	SM 43:1	Sul 41:1
SM 33:1	SM 40:1	Sul 34:0 (OH)	Sul 41:1 (OH)
SM 34:2	SM 40:2	Sul 34:2 (OH)	Sul 42:1
SM 36:2	SM 41:1	Sul 40:1	Sul 42:1 (2OH)
SM 37:1	SM 41:2	Sul 40:1 (OH)	Sul 42:1 (OH)
Glicerofosfolípidos			
LPC 18:1	LPC 18:2	PC 32:2	PC 36:3

5

Tabla 3. La siguiente tabla muestra un conjunto preferido de lípidos cuyas concentraciones se determinan preferiblemente en la presente invención para muestras de orina. Opcionalmente, pueden determinarse las concentraciones de lípidos adicionales.

Conjugados de esterol	Sulfoglicoesfingolípidos	
sulfato de hidroxipregnenolona	Sul 34:1	Sul 42:1 (2OH)
conjugado de ácido litocólico-glicina	Sul 34:1 (OH)	Sul 42:0 (2OH)
sulfato de cortisol	Sul 36:1	Sul 43:1 (2OH)
ácido glicoquenodesoxicólico	Sul 36:1 (OH)	Sul 43:0 (2OH)
sulfato de ácido litocólico	Sul 38:1	SulfoHex ₂ Cer 34:1
glucurónido de testosterona	Sul 38:1 (OH)	SulfoHex ₂ Cer 34:1 (OH)
ácido glicocólico	Sul 40:2	SulfoHex ₂ Cer 36:1
glucurónido de androsterona / glucurónido de dihidrotestosterona	Sul 40:1	SulfoHex ₂ Cer 38:1
	Sul 41:2	SulfoHex ₂ Cer 38:1 (OH)
sulfato de colesterol	Sul 40:2 (OH)	SulfoHex ₂ Cer 40:2
sulfato de ácido glicoquenodesoxicólico	Sul 41:1	SulfoHex ₂ Cer 40:1
glucurónido de hidroxilandrosteronediol	Sul 40:1 (OH)	SulfoHex ₂ Cer 41: 1
glucurónido de 11-oxo-androsterona	Sul 40:0 (OH)	SulfoHex ₂ Cer 40:1 (OH)
glucurónido de hidroxilandrosterona	Sul 42:3	SulfoHex ₂ Cer 42:3
ácido taurolitocólico	Sul 42:2	SulfoHex ₂ Cer 42:2
ácido sulfocólico	Sul 41:2 (OH)	SulfoHex ₂ Cer 42:1
glucurónido de pregnanodiol	Sul 42:1	SulfoHex ₂ Cer 41:1 (OH)
ácido taurodesoxicólico	Sul 41:1 (OH)	SulfoHex ₂ Cer 40:0 (2OH)
ácido sulfoglicolitolocólico	Sul 41:0 (OH)	SulfoHex ₂ Cer 42:2 (OH)

ácido taurocólico	Sul 40:0 (2OH)	SulfoHex ₂ Cer 42:1 (OH)
sulfato de ácido glicoquenodesoxicólico	Sul 42:3 (OH)	SulfoHex ₂ Cer 41:0 (2OH)
glucurónido de aldosterona	Sul 42:2 (OH)	SulfoHex ₂ Cer 42:0 (2OH)
glucurónido de tetrahidroaldosterona	Sul 42:1 (OH)	
sulfato de psicósina	Sul 42:0 (OH)	
glucurónido de ácido desoxicólico	Sul 41:0 (2OH)	
glucurónido de ácido cólico	Sul 43:2 (OH)	
glucurónido de ácido glicoquenodesoxicólico	Sul 43:1 (OH)	

En las siguientes tablas se muestran conjuntos preferidos de lípidos para tipos individuales de cánceres.

- 5 Tabla 4. Especies más reguladas por incremento y por disminución del gráfico-S del modelo OPLS-DA cuando se comparan muestras no cancerosas con muestras cancerosas para ambos sexos y hombres (M) y cáncer de riñón (N=no tumoral, T=tumoral, los datos sobre sensibilidad y especificidad se refieren a un conjunto de personas cuyas muestras se midieron empleando UHPSFC/EM).

Gráfico-S	N-T cáncer de riñón M
Especies reguladas por incremento en cáncer	DG 34:0 DG 36:0 MG 18:0 MG 16:0 TG 42:2 TG 49:0 Cer 42:3
Especies reguladas por disminución en cáncer	SM 42:1 SM 41:1 TG 58:6 LPC 18:2 SM 40:1 SM 38:1 SM 41:2 Cer 42:1 SM 40:2 TG 58:4
N.º: N/T	75/81
Sensibilidad [%]	90,1
Especificidad [%]	90,7

- 10 Tabla 5. Especies más reguladas por incremento y por disminución del gráfico-S del modelo OPLS-DA cuando se comparan muestras no cancerosas con muestras cancerosas para mujeres (F) (N=no tumoral, T=tumoral, los datos sobre sensibilidad y especificidad se refieren a un conjunto de personas cuyas muestras se midieron empleando UHPSFC/EM).

Gráfico-S	N-T cáncer de riñón F
Especies reguladas por incremento en cáncer	MG 18:0 MG 16:0 DG 34:0 DG 36:0 - - -
Especies reguladas por disminución en cáncer	SM 42:1 SM 41:1 SM 41:2 TG 56:1 PC 32:2 SM 40:1 Cer 42:1 TG 47:1 TG 49:1 TG 51:4
N.º: N/T	95/31

Sensibilidad [%]	74,2
Especificidad [%]	100

Tabla 6. Especies más reguladas por incremento y por disminución del gráfico-S del modelo OPLS-DA cuando se comparan muestras no cancerosas con muestras cancerosas para hombres (M) y cáncer de riñón (N=no tumoral, T=tumoral, los datos sobre sensibilidad y especificidad se refieren a un conjunto de personas cuyas muestras se midieron empleando MALDI-EM).

Gráfico-S	N-T cáncer de riñón M
Regulado por incremento	SulfoHex2Cer 42:2
Especies reguladas por disminución en cáncer	SM 43:1 Sul 41:1 (OH) SM 39:1 Sul 40:1 (OH) Sul 34:0 (OH) Sul 40:1 SM 41:1 Sul 42:1 (OH) SM 32:1 Sul 34:2 (OH)
N.º: N/T	75/81
Sensibilidad [%]	86,4
Especificidad [%]	93,3

Tabla 7. Especies más reguladas por incremento y por disminución del gráfico-S del modelo OPLS-DA cuando se comparan muestras no cancerosas con muestras cancerosas para mujeres (F) (N=no tumoral, T=tumoral, los datos sobre sensibilidad y especificidad se refieren a un conjunto de personas cuyas muestras se midieron empleando MALDI-EM).

Gráfico-S	N-T cáncer de riñón F
Regulado por incremento	SulfoHex2Cer 42:2
Especies reguladas por disminución en cáncer	Sul 41:1 (OH) Sul 34:0 (OH) SM 39:1 SM 43:1 Sul 40:1 (OH) Sul 42:1 (OH) Sul 42:1 (2OH) Sul 41:1 SM 41:1 Sul 40:1
N.º: N/T	95/31
Sensibilidad [%]	77,4
Especificidad [%]	99,0

Tabla 8. Especies más reguladas por incremento y por disminución del gráfico-S del modelo OPLS-DA cuando se comparan muestras no cancerosas con muestras cancerosas para hombres (M) (N=no tumoral, T=tumoral, los datos sobre sensibilidad y especificidad se refieren a un conjunto de personas donde se combinan los resultados de MALDI y UHPSFC).

Gráfico-S	N-T cáncer de riñón M
Especies reguladas por incremento en cáncer	DG 34:0 DG 36:0 MG 18:0 MG 16:0 SulfoHex2Cer 42:2 TG 49:0 TG 42:2 PI 38:6
Especies reguladas por disminución en cáncer	SM 42:1 TG 58:6 SM 41:1

	Sul 41:1 (OH) SM 40:1 SM 43:1 SM 38:1 Sul 40:1 (OH) SM 39:1 SM 41:2
N.º: N/T	75/81
Sensibilidad [%]	93,8
Especificidad [%]	93,3

Tabla 9. Especies más reguladas por incremento y por disminución del gráfico-S del modelo OPLS-DA cuando se comparan muestras no cancerosas con muestras cancerosas para mujeres (F) (N=no tumoral, T=tumoral, los datos sobre sensibilidad y especificidad se refieren a un conjunto de personas donde se combinan los resultados de MALDI y UHPSFC).

5

Gráfico-S	N-T cáncer de riñón F
Especies reguladas por incremento en cáncer	MG 18:0 MG 16:0 DG 34:0 DG 36:0 Cer 42:3 SulfoHex ₂ Cer 42:2 - -
Especies reguladas por disminución en cáncer	SM 42:1 SM 41:1 Sul 41:1 (OH) SM 41:2 SM 39:1 Sul 42:1 (OH) Sul 40:1 (OH) TG 51:4 TG 49:2 PC 32:2
N.º: N/T	95/31
Sensibilidad [%]	83,9
Especificidad [%]	100

Tabla 10. Especies más reguladas por incremento y por disminución del gráfico-S del modelo OPLS-DA cuando se comparan muestras de plasma no cancerosas con muestras de plasma cancerosas de riñón para hombres (M) y mujeres (F) (N=no tumoral, T=tumoral, los datos sobre sensibilidad y especificidad se refieren a un conjunto de personas cuyas muestras se midieron empleando EM indiscriminada).

10

Gráfico-S	N-T riñón F	N-T riñón M
Especies reguladas por incremento en cáncer	PE 42:9 SM 42:2 PC 38:4 MG 19:0 LPC O-16:0 TG 56:5 PS 32:2 SM 36:0 CE 16:0 LPC 18:0	LPC 16:0 SM 42:2 Hex2Cer 34:1 PS 42:1 PS 36:5 HexCer 42:2 CE 16:0 PC 34:1 PS 36:4 MG 18:0
Especies reguladas por disminución en cáncer	CE 14:0 PC 32:2 SM 33:1 SM 32:1 PC 34:4 SM 39:1 SM 41:1 PC 34:3	LPC 18:2 PE P-36:4 SM 39:1 PC 34:4 SM 41:2 PC O-36:5 PS 38:7 SM 41:1

	HexCer 42:1 LPC 18:2	TG 56:6 SM 40:2
N.º: T/N	28/31	71/30
Sensibilidad [%]	100	95,8
Especificidad [%]	93,6	76,7

Tabla 11. Especies más reguladas por incremento y por disminución del gráfico-S del modelo OPLS-DA cuando se comparan muestras de orina no cancerosas (N) con muestras de orina cancerosas de riñón (T) para ambos sexos, hombres (M) y mujeres (F) (N=no tumoral, T=tumoral, los datos sobre sensibilidad y especificidad se refieren a un conjunto de personas cuyas muestras se midieron empleando MALDI-EM.

Gráfico-S	N-T cáncer de riñón ambos sexos	N-T cáncer de riñón M	N-T cáncer de riñón F
Especies reguladas por incremento en cáncer	SulfoHex2Cer 42:2 Sul 42:3 SulfoHex2Cer 40:2 SulfoHex2Cer 38:1 SulfoHex2Cer 42:1 cortisol sulfate SulfoHex2Cer 40:1 SulfoHex2Cer 34:1 SulfoHex2Cer 38:1 (OH) ácido sulfocólico	SulfoHex2Cer 40:2 Sul 42:3 SulfoHex2Cer 38:1 ácido sulfocólico SulfoHex2Cer 42:2 SulfoHex2Cer 38:1 (OH) SulfoHex2Cer 34:1 SulfoHex2Cer 42:1 SulfoHex2Cer 34:1 (OH) Sul 43:1 (2OH)	Sul 42:3 SulfoHex2Cer 40:2 SulfoHex2Cer 42:2 SulfoHex2Cer 38:1 (OH) SulfoHex2Cer 42:1 Sul 43:1 (2OH) Sul 42:3 (OH) SulfoHex2Cer 40:1 Sul 42:2 SulfoHex2Cer 41:1 (OH)
Especies reguladas por disminución en cáncer	ácido taurolitocólico	Sul 40:0 (2OH)	ácido taurolitocólico
	Sul 40:0 (2OH) Sul 41:0 (2OH) Sul 38:1 (OH) sulfato de colesterol Sul 41:0 (OH) Sul 40:0 (OH) SulfoHex2Cer 40:0 (2OH) Sul 42:0 (2OH) Sul 40:1 (OH)	Sul 41:0 (2OH) Sul 41:0 (OH) Sul 38:1 (OH) Sul 40:0 (OH) Sul 40:1 (OH) Sul 42:0 (2OH) Sul 42:1 (2OH) Sul 41:1 (OH) Sul 41:1	ácido taurocólico ácido taurodesoxicólico ácido sulfoglicolitolocólico Sul 40:0 (2OH) Sul 34:1 (OH) Sul 41:0 (2OH) Sul 38:1 (OH) Sul 40:0 (OH) Sul 42:1 (2OH)
N.º: N/T	70/101	34/72	36/29
Sensibilidad [%]	87,1	91,7	86,2
Especificidad [%]	87,1	76,5	86,1

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Gráfico de OPLS-DA para el análisis de muestras no cancerosas y cancerosas que padecen cáncer de riñón para hombres.

Figura 2: Gráfico de OPLS-DA para el análisis de muestras no cancerosas y cancerosas que padecen cáncer de riñón para mujeres.

T1, T2, T3, T4 son estadios del cáncer (tumor primario) según la clasificación TNM. T1 es un estadio muy temprano del cáncer.

Descripción detallada de la invención

Recogida de muestras:

Se recogen muestras de líquidos corporales humanos de pacientes con cáncer y voluntarios sanos en el hospital, normalmente sangre u orina. Otros tipos de muestras se aíslan de la sangre, tal como plasma y suero. La sangre de sujetos humanos se recoge del modo convencional y bien establecido usado en hospitales en tubos que contienen anticoagulante, tales como tubos con EDTA, heparina, citrato, luego se aísla el suero o plasma usando protocolos estandarizados bien conocidos por un experto en la técnica, almacenamiento a -80 °C en la clínica, transporte desde la clínica hasta el laboratorio analítico usando bolsas de transporte biológico con hielo seco (-20 °C), almacenamiento nuevamente a -80 °C hasta el análisis.

Elaboración de un conjunto de patrones internos (mezcla de patrones internos):

Generalmente, se usa una mezcla de patrones internos para la cuantificación de especies de lípidos. El patrón

interno para cada clase de lípidos se comporta del mismo modo que los compuestos diana que pertenecen a esta clase de lípidos. Debido a la adición del patrón interno antes del procesamiento de la muestra, pueden compensarse ligeras diferencias debidas, por ejemplo, a errores de pipeteo, ya que el patrón interno se ve afectado de la misma manera que los compuestos diana. En una realización particular, se pesan 2-4 mg de cada patrón en viales de vidrio para HPLC de 2 ml usando una balanza analítica y se disuelven en el volumen correspondiente (cloroformo:2-propanol - 2:8) con el fin de obtener una concentración final de 0,25, 1, 2 o 2,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Los patrones para cada clase de lípidos se mezclan entre sí para formar mezclas de patrones internos tal como se describe en la siguiente tabla para todos los tipos de análisis de EM que se muestran en el presente documento.

Preferiblemente, se prepara una mezcla de patrones internos en una cantidad suficiente para todo el experimento, con el fin de evitar variaciones en la cuantificación debido a ligeras diferencias en la concentración de los patrones internos, cuando la mezcla se prepara múltiples veces para lotes individuales. Pueden prepararse alícuotas de esta mezcla de patrones internos y almacenarlas a -80°C .

Table 12. Preparación de mezcla de patrones internos.

Patrones internos	PM	Concentración madre [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Volumen [μl]	Concentración en líquido corporal [nmol/ml]
CE d7 16:0	631,6285	2	200	443,3
Cer d18:1/12:0	481,4495	2	4	11,6
DG 12:1/12:1	452,3502	2	15	46,4
Hex2Cer d18:1/12:0	805,5551	2	4	7,0
HexCer d18:1/12:0	643,5023	2,1	3	6,9
Chol d7	393,6988	2	300	1066,8
PI 33:1 d7	846,596	1	16	13,2
LPC 17:0	509,3481	2,1	20	57,7
LPE 14:0	425,2542	2	4	13,2
LPG 14:0	478,2308	2,1	14	43,0
MG 19:1	370,3083	2	30	113,4
PA 14:0/14:0	614,3924	2	4	9,1
PC 14:0/14:0	677,4996	2	60	124,0
PE 14:0/14:0	635,4526	2	4	8,8
PG 14:0/14:0	688,4291	2	2	4,1
PS 14:0/14:0	701,4244	2	4	8,0
SM d18:1/12:0	646,505	2	20	43,3
SulfoHexCer d18:1/12:0	740,4857	0,25	0,28	0,1
TG 19:1/19:1/19:1	926,8302	2	75	113,3
PC 44:2	897,719	2	80	124,8
Disolvente		CHCl ₃ :IPA 2:8	140,72	
Volumen total			1000	

Procesamiento de muestras:

Se realizan adiciones conocidas de la mezcla de patrones internos apropiada en todas las muestras antes de la homogeneización y extracción.

Las extracciones lipídicas se realizaron preferiblemente mediante procedimientos bien establecidos usando sistemas de extracción de cloroformo - metanol - agua, tal como se publicó en trabajos anteriores de los inventores [E. Cífková, M. Holčapek, M. Lisa, D. Vrána, J. Gatěk, B. Melichar, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 991-1002; E. Cífková, M. Lisa, R. Hrstka, D. Vrána, J. Gatěk, B. Melichar, M. Holčapek, Rapid Commun. Mass Spectrom. 31 (2017) 253-263]. El orden de las muestras para las extracciones es aleatorio.

Se transfieren 25 μl de suero o plasma y 17,5 μl de mezcla de patrones internos y 2 ml de cloroformo y 1 ml de metanol a un vial de vidrio (4 ml). Las muestras biológicas también contienen proteínas, lo que puede dar lugar a muestras pegajosas y viscosas. Debe garantizarse que la pipeta extraiga 25 μl de suero o plasma y no se bloquee con los componentes viscosos durante la extracción. Los viales de vidrio se cierran y se ponen durante 10 minutos en el baño de ultrasonidos a 40°C para su homogeneización. Después de eso, se permite que las muestras alcancen la temperatura ambiente con el fin de garantizar que no se evaporen los disolventes orgánicos cuando se abren los viales. Se añaden 600 μl de agua a cada muestra. Las muestras se cierran y se agitan con vórtex durante 1 min. Es importante realizar la etapa de extracción siempre de la misma forma para todas las muestras de un lote (un estudio). Los lípidos diana de la espectrometría de masas tienen más solubilidad en la fase orgánica (fase inferior). Posteriormente, las muestras se centrifugan durante 3 min a 3000 rpm con el fin de separar la fase orgánica y la acuosa (entre estas dos fases se forma una capa proteica en forma de precipitado blanco). La fase acuosa (fase superior) se retira mediante una pipeta de vidrio. El disolvente orgánico que contiene los compuestos diana se

evapora bajo una corriente de nitrógeno a 30 °C y los viales de vidrio que contienen el residuo (compuestos diana) se almacenan a -80 °C. Antes del análisis, se permite que las muestras alcancen la temperatura ambiente (para que no puedan extraer agua del aire al abrir los viales) y luego el residuo de la extracción y evaporación (etapa anterior) se disuelve en 500 µl de cloroformo:2-propanol (1:1, v/v). Es aconsejable preparar suficiente mezcla de disolvente de cloroformo:2-propanol (1:1, v/v) para todas las muestras para evitar variaciones entre lotes individuales de la mezcla de disolventes. Las muestras se agitan con vórtex cuidadosamente durante 1 minuto para garantizar que los compuestos diana se disuelvan. La disolución se filtra usando un filtro de jeringa de 0,2 µm con el fin de deshacerse de los componentes no disueltos que pueden comprometer el análisis de EM. Los viales se cierran con tapas de PTFE y se almacenan a -80 °C.

Para las muestras de orina, se realiza una extracción en fase sólida de fase inversa. Se cargan 2 ml de orina humana junto con 3 µl de una mezcla de patrones internos disueltos en metanol (SufoHexCer d18:1/12:0 de concentración 1,7 µg/ml y ácido taurocólico D4 de concentración 16,7 µg/ml) en un cartucho tC18 de 200 mg (Sep-Pak Vac, tamaño de partícula de 37-55 µm) (Waters, Milford, MA, EE. UU.) previamente cebado con 3 ml de metanol seguido por 3 ml de agua. Las columnas se lavan con 3 ml de agua y los lípidos estudiados se eluyen adicionalmente con 3 ml de metanol. Los eluatos se recogen, luego se evaporan mediante una suave corriente de nitrógeno y se redisuelven en la mezcla de 300 µl de metanol antes de la medición.

Preparación de muestras para análisis de UHPSFC/EM

El filtrado se diluye 5 veces o 20 veces con una mezcla de hexano:2-propanol:cloroformo 7:1,5:1,5 y se transfiere a un vial de HPLC. Los viales que contienen el filtrado diluido se cierran con tapas con ranuras para su análisis con UHPSFC/EM y se colocan en el inyector automático.

Preparación de muestras para análisis de EM indiscriminada.

Los filtrados se diluyen 10 veces dependiendo de las muestras mediante una mezcla de cloroformo - metanol - 2-propanol (1:2:4, v/v/v) que contiene 7,5 mmol/l de acetato de amonio y un 1 % de ácido acético.

Preparación de muestras para análisis de MALDI-EM

Se disuelve 9-aminoacridina de matriz MALDI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en una mezcla de metanol - agua (4:1, v/v) para proporcionar una concentración de 5 mg/ml o 10 mg/ml y se mezcla con extractos de lípidos particulares (1:1, v/v); menos preferiblemente, los extractos de lípidos pueden diluirse con metanol (1:1, 1:2 o 1:3, v/v) antes de mezclar con la matriz. La cantidad depositada de mezcla de extracto/matriz es de 1 µl y se usa cristalización de gotitas secas para la deposición de la muestra sobre la placa objetivo. Se aplica la deposición de una pequeña alícuota de cloroformo en los puntos de la placa de MALDI antes de la aplicación de la mezcla de extracto/matriz diluida para evitar que la gota se extienda.

Desarrollo y validación del método de espectrometría de masas (EM)

En particular, se desarrollaron tres métodos principales basados en EM para la cuantificación lipídica, que se describen con más detalle en el presente documento. El método se beneficia del uso de muestras combinadas, que es una mezcla de volúmenes idénticos de todas las muestras para estudios más pequeños con menos de 100 sujetos. En este estudio, la muestra combinada se prepara a partir de volúmenes iguales de pacientes con cáncer seleccionados al azar que padecen diferentes tipos de cáncer y muestras de voluntarios sanos, manteniendo la razón de hombres y mujeres en la misma proporción que en el conjunto de muestras. La muestra combinada se usa para el desarrollo y optimización del método. La muestra combinada con y sin mezcla de patrones internos añadida por cada clase de lípidos que va a cuantificarse se usa para la validación completa y el QC durante las mediciones. El orden de las muestras siempre es aleatorio en las secuencias de muestras para evitar mediciones de muestras cancerosas y no cancerosas en cierta porción de la secuencia.

La prueba de idoneidad del sistema se llevó a cabo antes del procedimiento de validación en tres niveles de concentración notificados normalmente como niveles de concentración baja, media y alta. Todos los niveles de concentración deben estar dentro del rango dinámico lineal. El nivel de concentración baja está cerca del límite inferior de cuantificación (LLOQ), el nivel de concentración media está en el medio del intervalo dinámico lineal y el nivel de concentración alta está cerca del límite superior de cuantificación (ULOQ). En una realización particular, se usan 5, 17,5 y 30 µl de mezcla de IS preparada tal como se describió anteriormente para los niveles de concentración baja, media y alta, respectivamente. Se determinaron parámetros de validación tales como selectividad, exactitud, precisión, curva de calibración, límites de detección y cuantificación, efecto de matriz, arrastre y estabilidad de acuerdo con las recomendaciones de organizaciones autorizadas, tales como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Se determinaron parámetros individuales para IS que representan propiedades de la clase de lípidos. La selectividad se determinó comparando los resultados obtenidos para 3 extractos de muestras de suero combinadas con adiciones conocidas antes de la extracción de la mezcla de IS al nivel de concentración baja, media y alta y 3 extractos de

muestras de suero apropiadas sin adiciones conocidas, con el fin de demostrar que la mezcla de patrones internos puede medirse en el líquido corporal, ya que no se producen de manera natural. La exactitud, repetibilidad y precisión se estudiaron usando la muestra de suero combinada con adiciones conocidas antes o después de la extracción a niveles de concentración baja, media y alta. La exactitud y precisión intermedia se estudiaron usando tres muestras por nivel de concentración y dos operarios independientes para la preparación de las muestras. La repetibilidad se determinó mediante múltiples inyecciones de la misma muestra. La exactitud interdiaria y la precisión interdiaria se evaluaron entre tres ejecuciones independientes en dos días diferentes utilizando tres muestras en el nivel de concentración baja, media y alta. El LLOQ y el ULOQ correspondieron al primer y último punto del intervalo de linealidad, respectivamente. El límite de detección (LOD) se determinó basándose en la razón de señal con respecto a ruido ($S/N = 3$) observada a partir del cromatograma de iones reconstruido o de los espectros de masas de pérdida neutra (NL) y de iones precursores (PI) (EM indiscriminada) de una mezcla de patrones internos. La recuperación de la extracción se determinó calculando la razón de la respuesta de la señal de muestras con adiciones conocidas antes y después de la extracción para la concentración baja, media y alta. La eficiencia del proceso se determinó calculando la razón de la respuesta de la señal de las muestras con adiciones conocidas antes de la extracción y el patrón puro a diferentes concentraciones. El efecto de la matriz se calculó a partir de la razón de la respuesta de la señal de muestras con adiciones conocidas después de la extracción y el patrón puro. El arrastre se evaluó para cada IS mediante la inyección de una muestra en blanco con el disolvente puro después de la muestra de calibración a un nivel de concentración alta (factor de dilución de 10). La fiabilidad de los resultados obtenidos dentro del análisis de grandes conjuntos de muestras se evaluó mediante pruebas de estabilidad en el instrumento y de congelación y descongelación. La estabilidad del extracto de plasma con adiciones conocidas a un nivel de concentración media se midió en un inyector automático a ciertos intervalos de tiempo: 0, 4, 8, 12, 16 y 24 horas. La muestra para el experimento de congelación y descongelación se analizó inmediatamente después de la descongelación completa sin asistencia en un inyector automático.

Tabla 13. Esquema de dilución para la calibración con muestra combinada para volúmenes de UHPSFC/EM en μl .

Mezcla de IS	Muestra combinada	Hexano:2-propanol:cloroformo (7:1,5:1,5, v/v/v)
150	100	250
100	100	300
50	100	350
20	100	380
15	100	385
10	100	390
5	100	395
3,5	100	396,5
2	100	398
Mezcla de IS diluida 1:50		
75	100	325
50	100	350
25	100	375
10	100	390
7,5	100	392,5
5	100	395
2,5	100	397,5
1	100	399

Para la calibración, se usó la mezcla optimizada de IS para todos los métodos en varias diluciones con el fin de calibrar en los intervalos de concentración relevantes para clases de lípidos individuales. Dependiendo del factor de dilución del método espectrométrico de masas correspondiente, se usaron las cantidades correspondientes de matriz. Por ejemplo, UHPSFC/EM usa una dilución 1:5 de extractos de muestras. Por tanto, se añadieron 115 de plasma en blanco de una muestra combinada.

UHPSFC/EM

La cromatografía de fluidos supercríticos es una herramienta para la separación de compuestos de diferente polaridad empleando dióxido de carbono supercrítico (fase móvil) como componente principal para eliminar los compuestos de un adsorbente (columna - fase estacionaria). La adición de un disolvente orgánico (normalmente metanol) al dióxido de carbono supercrítico amplía el intervalo de aplicación de UHPSFC y permite la eliminación de compuestos más polares de la columna. Generalmente, los compuestos pueden diferenciarse si son más solubles en agua o alcoholes que los de naturaleza polar o si son más solubles, por ejemplo, en hexano, que los de naturaleza no polar. Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria, la fase móvil y los compuestos objetivo, como polares o no polares, pueden forzarse interacciones. Por ejemplo, los compuestos polares prefieren interactuar con fases estacionarias polares y, con el fin de eliminarlos de la fase estacionaria, puede usarse una fase móvil polar para eliminar los compuestos de la fase estacionaria. Un ajuste cuidadoso de estas interacciones mediante la optimización de las propiedades de la fase móvil usando una determinada fase estacionaria permite la separación de compuestos. La optimización de las dimensiones y las propiedades de la fase estacionaria, tales como un tamaño de

partícula más pequeño y partículas esféricas de los sorbentes, permite una mayor eficiencia y, por tanto, se denomina cromatografía de fluidos supercríticos de rendimiento ultra alto (UHPSFC).

La separación cromatográfica puede optimizarse para la separación de clases de lípidos, teniendo en cuenta, en particular, lo siguiente. Una clase de lípidos tiene un resto estructural dominante (grupo de cabeza polar) en común, que es el principal responsable de la interacción que gobierna el mecanismo de retención. Una clase de lípidos puede comprender numerosas especies de lípidos que varían en la longitud y estructura de la cadena de hidrocarburos (por ejemplo, dobles enlaces). Se añaden patrones internos para cada (sub)clase de lípidos, por tanto, es posible identificar y cuantificar todas las especies de lípidos dentro de una (sub)clase de lípidos particular comparándola con el patrón interno de la clase. Análisis de EM: el uso de un espectrómetro de masas preciso y de alta resolución como detector permite la identificación y cuantificación de lípidos, ya que cada especie de lípido tiene un valor m/z definido y da una respuesta de señal dependiendo de la concentración en la muestra. Con el fin de mejorar la ionización y, por tanto, la respuesta de la señal de los compuestos objetivo, se añaden a la muestra o a la fase móvil aditivos como ácidos y tampones. En el caso de UHPSFC/EM, el uso de un disolvente de constitución como metanol acidificado mejora adicionalmente la sensibilidad.

En una realización particular, una descripción detallada de todos los parámetros aplicados para el método de UHPSFC/EM para obtener los resultados presentados a continuación en el presente documento es tal como sigue: Instrumento – Sistema de cromatografía de convergencia de ultra rendimiento Acquity (UPC²) vinculado al espectrómetro de masas de cuadrupolo híbrido-movilidad iónica de onda viajera-tiempo de vuelo Synapt G2 Si de Waters. Configuraciones cromatográficas - fase estacionaria: columna Acquity BEH UPC² (100 × 3 mm, 1,7 μ m, Waters), la velocidad de flujo fue de 1,9 ml/min, el volumen de inyección de 1 μ l, la temperatura de la columna de 60 °C, el regulador activo de contrapresión (ABPR) se ajustó a 1800 psi, modo de gradiente: CO₂ y metanol con acetato de amonio 30 mM y el 1 % de agua. El gradiente comenzó con el 1 % de modificador y aumentó hasta el 51 % en 5 min, después de eso se mantuvo constante durante 1 min y se devolvió nuevamente a las condiciones de partida con un tiempo total de ejecución de 7,5 min. Lavado de la aguja de inyección: una mezcla de hexano - 2-propanol - agua (1:2:0,5, v/v). Lavado de la columna después de cada inyección de muestra biológica: se inyectó un blanco usando un gradiente rápido: 0 min – 1 %, 1,4 min - 51 %, 1,6 min - 51 %, 1,8 min - 1 % y 4,8 min - 1 % de modificador, efluente de constitución: bomba HPLC 515 (Waters), velocidad de flujo de constitución 0,25 ml/min de metanol con el 1 % de agua y el 0,1% de ácido fórmico.

Configuraciones de ESI - EM: voltaje capilar de 3 kV, cono de muestreo de 20 V, compensación de fuente de 90 V, temperatura de fuente de 150 °C, temperatura de secado de 500 °C, flujo de gas del cono de 50 l h⁻¹, el flujo de gas de secado de 1000 l h⁻¹ y el gas nebulizador de 4 bar. Modo de resolución o modo de sensibilidad en modo de iones positivos y un intervalo de masa de m/z 50-1200. El tiempo de exploración fue de 0,15 s y las mediciones se realizaron en el modo continuo. Se usó el péptido leucina encefalina como masa de bloqueo con un tiempo de exploración de 0,1 s y un intervalo de 30 s.

Durante el análisis, las muestras en la secuencia deben aleatorizarse de modo que no se midan de manera consecutiva muestras del mismo tipo, por ejemplo, solo muestras sanas (no cancerosas). Esto garantiza que, en caso de error en un momento determinado, no solo se vea afectado un tipo de muestra. Además, es importante medir muestras de QC después de una cantidad predeterminada de muestras para verificar el rendimiento del instrumento.

Antes de medir muestras biológicas, se miden muestras sin inyección, en blanco y de QC para verificar el rendimiento del instrumento y después de eso se continúa con las muestras biológicas. Todas las muestras se miden por duplicado y después de 20 muestras o 40 + 40 inyecciones (muestra + lavado) respectivamente, se miden muestras de QC y en blanco. Durante todo el estudio, el control de la medición y la preparación de muestras se realiza evaluando las áreas de pico de cada patrón interno de cada muestra y exportando los resultados en el archivo de Microsoft Excel. Las muestras de QC son alícuotas de un extracto de una mezcla de muestras de suero o plasma. La masa de bloqueo se mide continuamente durante el análisis; sin embargo, la corrección de la masa de bloqueo no se aplica en línea, ya que los resultados preliminares mostraron que la exactitud de la masa es peor usando la corrección en línea. Además, se aplica el modo continuo para que sea posible monitorizar la resolución del instrumento. Después de las mediciones, se reduce el ruido de los datos sin procesar usando el software MassLynx de Waters. Esto mejora los espectros de masas así como reduce significativamente el tamaño del archivo, lo que permite un manejo más fácil de los archivos para su procesamiento adicional. Los archivos se procesan adicionalmente aplicando la corrección de masa de bloqueo y convirtiendo los archivos del modo perfil al modo centroides, lo que mejora la exactitud de la masa y reduce adicionalmente el tamaño del archivo. El tamaño del archivo es importante para el procesamiento de datos. El software de procesamiento apenas puede tratar con archivos de gran tamaño y grandes números de muestra, dando como resultado errores continuos que hacen que el procesamiento sea lento y engorroso.

Todas las investigaciones referentes al control de medición, el modo de perfil y la corrección de masa de bloqueo fuera de línea, así como la reducción de ruido, mejoraron la calidad de los datos.

EM indiscriminada

Los experimentos que se presentan a continuación en el presente documento se realizaron en un espectrómetro de masas con trampa de iones lineal de cuadrupolo 6500 QTRAP (Sciex, Concord, ON, Canadá) equipado con una sonda de ESI con la siguiente configuración de parámetros de ajuste: un voltaje de pulverización iónica de 5200 V, un gas de cortina de 20 psi, una temperatura de la fuente de 50 °C, un gas fuente de iones (1) de 15 psi y un gas fuente de iones (2) de 10 psi. Se miden las exploraciones de EM/EM con una velocidad de exploración de 1000 Dais, un potencial de desagrupación de 80 V, un potencial de entrada de 10 V y una energía de colisión especificada en la tabla 17. Las muestras se introducen mediante una inyección de flujo usando un cromatógrafo de líquidos Agilent Serie 1290 (Agilent Technologies) que consiste en una bomba binaria Agilent 1290 y un inyector automático Agilent 1260. Se inyectaron 50 µl de muestra en una velocidad de flujo de 3 µl/min de una mezcla de cloroformo - metanol - 2-propanol (1:2:4, v/v/v) que contenía 7,5 mmol/l de acetato de amonio y el 1 % de ácido acético con un tiempo de análisis de 12 min y una temperatura del inyector automático de 20 °C. El sistema de CL/EM se lava después de cada análisis con una mezcla de metanol - 2-propanol - agua (2:2:1, v/v/v) que contiene 7,5 mmol/l de acetato de amonio y el 1 % de ácido acético. Los experimentos de datos medidos se extraen usando el software LipidView con una tolerancia de masa de 0,3 Da, una S/N = 5 mínima y una intensidad mínima del 1 %. Los datos sin procesar caracterizados por el tipo de exploraciones, valores de m/z e intensidades de picos se exportan como datos .txt y se procesan adicionalmente usando el script de macros de Microsoft Excel de los inventores para la detección y cuantificación de lípidos. Las clases de lípidos se caracterizan usando el tipo de exploraciones, y las especies de lípidos individuales en exploraciones de EM/EM seleccionadas se detectan según los valores de m/z con una tolerancia de masa de 0,3 Da basándose en la base de datos compilada a partir de lípidos identificados en la muestra combinada, seguido por la corrección isotópica de las intensidades de iones. La concentración de especies de lípidos se calcula a partir de la intensidad de iones corregida relacionada con la intensidad de los patrones internos de la clase de lípidos.

Tabla 14. Caracterización de exploraciones de EM/EM indiscriminada y sus parámetros para clases de lípidos individuales. PI – exploración de iones precursores y NL – exploración de pérdida neutra.

Clase de lípido	Tipo de exploración de EM/EM	Energía de colisión	Iones observados
CE	PI 369; PI 376	12	[M+NH ₄] ⁺
Cer	PI 264; PI 266	35	[M+H] ⁺
DG	NL 35	20	[M+NH ₄] ⁺
Hex2Cer	PI 264; PI 266	35	[M+H] ⁺
HexCer	PI 264; PI 266	35	[M+H] ⁺
Colesterol	PI 369; PI 376	12	[M+NH ₄] ⁺
LPA	NL 115	25	[M+NH ₄] ⁺
LPC	PI 184	35	[M+H] ⁺
LPE	NL 141	30	[M+H] ⁺
LPG	NL 189	30	[M+NH ₄] ⁺
LPS	NL 185	30	[M+H] ⁺
MG	NL 35	20	[M+NH ₄] ⁺
PA	NL 115	25	[M+NH ₄] ⁺
PC	PI 184	35	[M+H] ⁺
PE	NL 141	30	[M+H] ⁺
PG	NL 189	30	[M+NH ₄] ⁺
PS	NL 185	30	[M+H] ⁺
SM	PI 184	35	[M+H] ⁺
SulfoHexCer	NL 98	25	[M+H] ⁺
TG	NL 17	30	[M+NH ₄] ⁺

Espectrometría de masas MALDI

Los espectros de masas se midieron usando el espectrómetro de masas MALDI de resolución ultra alta LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) equipado con un láser UV de nitrógeno (337 nm, 60 Hz) con un diámetro de haz de aproximadamente 80 µm × 100 µm. El instrumento LTQ Orbitrap se hace funcionar en modo de iones negativos en un intervalo de masa normal m/z 400 - 2000 y la resolución de masa se establece en R = 100.000 (anchura completa a la mitad de la definición máxima, en m/z 400). El movimiento de la muestra en zigzag (o espiral hacia afuera) con un tamaño de etapa de 250 µm se utiliza durante la adquisición de datos individuales. La energía del láser corresponde al 15 % del máximo y para cada medición se acumulan 2 microexploraciones/exploración con 2 disparos de láser por microexploración en 36 posiciones diferentes para lograr una señal reproducible. Cada muestra (mezcla de matriz con puntos y extracto de líquido corporal) se dispone en puntos cinco veces. El tiempo total de adquisición de una muestra, incluidos cinco puntos consecutivos, es de alrededor de diez minutos. Cada medición está representada por un espectro de MALDI-EM promedio con miles de valores de m/z. Posteriormente, se realiza la asignación automática de picos y picos de m/z particulares se hacen coincidir con moléculas desprotonadas de una base de datos creada durante el procedimiento de identificación usando el script de macros de Excel. Esta asignación de picos da como resultado la generación de la lista de m/z

presente de los lípidos estudiados con las intensidades promedio en espectros particulares para cada muestra que se usa para una evaluación estadística adicional.

Los valores de intensidades por debajo del LLOQ (valor mínimo del nivel de confianza estadística) se reemplazan posteriormente por 2/3 del valor cuantificado más bajo para unificar valores estadísticamente insignificantes o de cero y permitir un procesamiento adicional basado en cálculos logarítmicos. Las intensidades corregidas se normalizan posteriormente a IS o se generan razones particulares de intensidades dentro de una clase de lípidos. Finalmente, se realizan la evaluación estadística y la comparación del conjunto de datos normalizados.

10 *Procesamiento y cuantificación de datos.*

El procesamiento de datos comienza con la exportación de datos desde el software del proveedor de EM (por ejemplo, Waters, Sciex o Thermo Scientific) a un software de procesamiento de datos, que puede ser Microsoft Excel para que las etapas adicionales se realicen de manera semiautomática usando, por ejemplo, un script de Excel avanzado, en particular corrección isotópica y relleno con ceros. Deben inyectarse periódicamente muestras de control de calidad (QC) para comprobar la respuesta correcta y constante del espectrómetro de masas. La muestra típica de QC es una muestra combinada que contiene patrones internos para todas las clases de lípidos que van a cuantificarse, que se inyecta cada 20 inyecciones y las respuestas de los patrones internos individuales se representan gráficamente frente al tiempo. Si las respuestas de los patrones internos se reducen demasiado, entonces es la indicación de un problema instrumental, normalmente el espectrómetro de masas requiere limpieza debido a la inyección de demasiadas muestras. El intervalo de limpieza típico es de aproximadamente cientos de muestras, pero puede depender en gran medida de la calidad de los extractos de muestras preparados, la geometría de la fuente de iones, la configuración del sistema, la calidad de los disolventes y los aditivos utilizados en la fase móvil.

El siguiente ejemplo describe el ejemplo de medición de UHPSFC/EM en el instrumento Synapt G2Si de Waters, pero un enfoque similar también es aplicable a otros métodos de EM y diferentes plataformas de EM de cualquier proveedor de instrumentos. Los archivos con reducción de ruido, corrección de masa de bloqueo y convertidos se procesan adicionalmente con el software MarkerLynx. La tabla de secuencia reducida que solo incluye muestras de plasma y suero y muestras de QC debe prepararse en MassLynx con el sufijo correspondiente en el nombre de la muestra (sample_nr2O_AFAMM). Luego tiene que determinarse el intervalo de tiempo de exploración para cada clase de lípido en toda la secuencia (por ejemplo, se usa m/z 250-350 para CE). Para cada clase de lípido, el método se crea en MarkerLynx con el intervalo de exploración correspondiente, que se combinará, la separación de picos de masa de 50 mDa y el umbral de intensidad del marcador de 3000. El método para cada clase de lípido se aplica para la secuencia y se crea la tabla de MarkerLynx con valores de m/z contra las intensidades combinadas. Esta tabla se exporta a un archivo de texto y se importa a una base de datos interna para la identificación y cuantificación de especies de lípidos usando Microsoft Excel. Los valores de m/z obtenidos de MarkerLynx se comparan con los valores de m/z precisos depositados como base de datos para cientos de especies de lípidos para la identificación. La base de datos se creó evaluando especies presentes en muestras de tejidos y líquidos corporales. Las especies de lípidos identificadas se corrigen y cuantifican isotópicamente calculando la concentración en relación con la intensidad y la concentración del IS de (sub)clase obteniendo la tabla de concentraciones de especies de lípidos frente a muestras individuales. Se realiza el procedimiento de relleno con ceros. Se calcula el promedio de las múltiples muestras inyectadas para especies de lípidos individuales. La matriz de datos final, donde las columnas son sujetos individuales y las líneas son lípidos individuales, se usa para una evaluación estadística adicional de MDA para la cuantificación absoluta. Para una cuantificación relativa, la concentración de especies individuales dentro de una clase se relaciona con la suma de las concentraciones de esta clase de lípidos en una muestra. Luego la tabla resultante se usa tanto para la evaluación estadística como para la cuantificación absoluta.

La base de datos de especies de lípidos monitorizadas durante la etapa de identificación en el modo de iones positivos junto con el cálculo de la corrección isotópica para los picos isotópicos M+1 y M+2 (denominado deisotopía) se describe en el documento EP 18152687 (tabla 5) y puede usarse en el presente método.

La base de datos de especies de lípidos monitorizadas durante la etapa de identificación en el modo de iones negativos junto con el cálculo de la corrección isotópica para los picos isotópicos M+1 y M+2 (denominado deisotopía) se describe en el documento EP 18152687 (tabla 6) y puede usarse en el presente método.

Evaluación estadística

Las concentraciones medidas de lípidos individuales de todos los sujetos medidos se importan a un software estadístico (por ejemplo, SIMCA de Umetrics, Suecia). Se eligen la transformación y el escalado apropiados, normalmente transformación logarítmica y escalado de Pareto o UV. El escalado y la transformación se basan en el análisis PCA, donde es deseable la distribución normal de pacientes sanos y con cáncer. El análisis PCA también se usa para encontrar posibles valores atípicos; de ser así, se somete a prueba la influencia del valor atípico sobre el modelo (eliminando el valor atípico y comprobando el modelo) y se cuestionan los métodos de medición. Si se identifica un problema técnico en caso de medición de valores atípicos, entonces esta medición se elimina del

conjunto de datos. El método PCA se usa para encontrar otros factores influyentes, tales como el sexo o la edad. Las muestras de QC deben agruparse estrechamente entre sí en el análisis de PCA, normalmente cerca de la mitad del gráfico de PCA.

- 5 La siguiente etapa es el uso de análisis de discriminación (OPLS-DA) para la separación de grupos de pacientes con cáncer y voluntarios sanos por separado para hombres y mujeres. El escalado y la transformación se basan en los resultados de PCA, pero es necesario encontrar el modelo final. Los modelos se ajustan a todos los datos juntos y también a estratos separados para covariables influyentes. Se usan diferentes grupos de lípidos para construir el modelo y explorar la influencia sobre la separación entre sanos frente a con cáncer. El modelo final se elige basándose en múltiples factores como un buen ajuste (todas las muestras conocidas se clasifican correctamente), la estabilidad del modelo (observaciones no demasiado influyentes), una buena capacidad de predicción (mediante validación cruzada realizada automáticamente y luego manualmente con grupos aleatorios de observaciones) y razonamiento biológico y resistencia a la eliminación de lípidos sin importancia. Los modelos finales se usan para identificar muestras desconocidas y se estiman la sensibilidad y especificidad basándose en estas predicciones. Para este fin, se representan gráficamente curvas de características operativas del receptor (ROC) y se calcula el área bajo la curva (AUC). Se somete a prueba de nuevo que el modelo tiene una buena capacidad de predicción por medio de la clasificación final. Tras esta última validación del modelo, se identifican los lípidos más desregulados mediante el gráfico S o el gráfico de carga. Para estos lípidos más desregulados, se usan gráficos de caja que comparan los valores promedio en el grupo de pacientes con cáncer y sanos para diferentes estratos para encontrar la interpretación biológica exacta.

Resultados de los experimentos:

- 25 La presente invención permite determinar si el paciente sometido a prueba padece cáncer, es decir, distinguir entre una persona sana y una persona que padece cáncer.

Ejemplo A: Análisis lipídico mediante UHPSFC/EM de plasma humano de pacientes con cáncer y voluntarios sanos

- 30 Se analizaron muestras de líquidos corporales de varios pacientes que padecían cáncer de riñón y voluntarios sanos para determinar su perfil lipídico usando UHPSFC/EM. En general, pueden usarse concentraciones absolutas y relativas de las especies de lípidos para determinar diferencias en muestras de diferentes estados de salud. A continuación, se usaron concentraciones absolutas para el análisis estadístico con el fin de visualizar diferencias entre grupos de muestras y errores en la preparación o mediciones de las muestras. Después del centrado, la transformación y el escalado de Pareto, se realizó PCA de todas las muestras con el fin de identificar valores atípicos y errores de medición.

- 40 Si el PCA no supervisado no muestra ninguna agrupación significativa según parámetros indeseables (por ejemplo, día de análisis) y valores atípicos inexplicables, entonces se realiza un análisis de OPLS-DA supervisado para mejorar el modelo estadístico aplicable también para las predicciones. Si se identifican agrupaciones o valores atípicos no deseados, se necesitan investigaciones adicionales para identificar el motivo de los mismos.

- 45 Para el análisis de OPLS-DA, las muestras tienen que definirse según su clasificación, es decir, grupos de muestras cancerosas y no cancerosas. El análisis de OPLS-DA permite la visualización de diferencias entre grupos de muestras. Se prefiere tener una diferenciación clara, lo que significa un espacio entre ambos grupos. Sin embargo, puede suceder que haya una pequeña superposición de ambos grupos, ya que las diferencias en el patrón de lípidos en los líquidos biológicos no son lo suficientemente grandes debido a la variabilidad biológica de las muestras o a que el tipo de cáncer investigado no muestra una diferencia suficientemente grande en el perfil de lípidos medido en el fluido biológico. La figura 1 muestra el gráfico de OPLS-DA para el análisis de muestras cancerosas y no cancerosas que padecen cáncer de riñón para hombres. La sensibilidad para el análisis de muestras de cáncer de riñón de hombres es del 90,1 % y la especificidad es del 90,7 %.

- 50 La figura 2 representa el gráfico de OPLS-DA para el análisis de muestras cancerosas y no cancerosas que padecen cáncer de riñón para mujeres. La sensibilidad es del 74,2 % y la especificidad del 100 % para el análisis de muestras de cáncer de riñón de mujeres.

Tabla 15. Parámetros estadísticos para el análisis de UHPSFC/EM de muestras de plasma no cancerosas y muestras de plasma cancerosas de hombres (M) y mujeres (F) para cáncer de riñón.

Especie	Cambio en veces		Valor de p		Valor de T	
	F	M	F	M	F	M
TG 48:2	0,4	0,5	1,0E-07	7,7E-04	5,5	3,3
TG 50:3	0,6	0,6	2,2E-07	4,9E-06	5,5	4,6
TG 50:2	0,6	0,6	1,0E-07	1,2E-04	5,6	3,8
TG 51:4	0,5	0,6	1,3E-05	1,6E-05	4,5	4,3
TG 51: 3	0,6	0,6	9,4E-08	8,6E-07	5,8	5,1

TG 51:2	0,5	0,5	1,2E-08	1,0E-05	6,1	4,5
TG 52:3	0,7	0,7	1,3E-04	2,4E-06	3,9	4,8
TG 53:4	0,6	0,6	4,5E-05	2,3E-05	4,2	4,3
TG 53:3	0,6	0,6	9,8E-06	2,9E-05	4,6	4,2
Cer40:1	0,6	0,7	2,8E-04	3,4E-03	3,7	2,8
Cer42:1	0,5	0,6	1,0E-06	1,8E-04	5,3	3,7
PC 32:2	0,4	0,7	8,3E-07	1,1E-02	5,1	2,3
PC 34:2	0,6	0,7	7,6E-09	6,6E-07	6,7	5,1
PC 34:1	0,6	0,7	1,9E-06	4,0E-03	5,2	2,7
PC O-36:4	0,7	0,8	2,4E-03	2,0E-02	3,0	2,1
PC O-36:3	0,6	0,8	8,1E-06	6,4E-02	4,6	1,5
PC 36:4	0,7	0,7	1,6E-04	5,9E-04	3,9	3,3
PC 36:3	0,6	0,7	8,9E-08	3,3E-06	6,0	4,7
PC 36:2	0,6	0,6	6,7E-08	1,6E-07	6,1	5,4
PC 38:6	0,7	0,8	2,3E-02	7,4E-02	2,1	1,5
PC 38:5	0,7	0,7	1,2E-02	8,1E-03	2,4	2,4
PC 38:4	0,8	0,7	1,1E-02	3,0E-05	2,4	4,2
PC 38:3	0,7	0,7	4,7E-03	9,2E-05	2,7	3,9
SM 34:2	0,7	0,7	3,3E-03	1,3E-04	2,9	3,8
SM 34:1	0,6	0,6	2,6E-06	4,8E-09	5,1	6,1
SM 36:2	0,8	0,7	3,0E-02	1,9E-03	2,0	3,0
SM 36:1	0,8	0,7	6,9E-02	1,9E-03	1,5	3,0
SM 38:2	0,7	0,8	1,1E-02	1,8E-02	2,4	2,1
SM 38:1	0,6	0,6	4,7E-05	7,2E-06	4,3	4,5
SM 40:2	0,6	0,6	2,3E-04	1,2E-05	3,8	4,4
SM 40:1	0,6	0,6	1,0E-04	4,7E-07	4,1	5,2
SM 41:2	0,5	0,6	4,9E-06	4,6E-06	5,0	4,6
SM 41:1	0,5	0,5	3,5E-07	3,0E-08	5,6	5,7
SM 42:3	0,8	0,7	4,2E-02	4,3E-03	1,8	2,7
SM 42:2	0,7	0,6	3,7E-03	1,7E-05	2,9	4,3
SM 42:1	0,4	0,5	4,7E-05	2,3E-03	4,2	2,9
LPC 16:0	0,7	0,7	8,9E-03	4,9E-04	2,5	3,4
LPC 18:2	0,4	0,5	1,2E-08	8,7E-07	6,1	5,0
LPC 18:1	0,6	0,8	7,1E-04	2,3E-02	3,4	2,0
LPC 18:0	0,7	0,7	2,5E-02	3,4E-04	2,0	3,5

Tabla 16. Parámetros estadísticos para el análisis de MALDI-EM de muestras de plasma no cancerosas y muestras de plasma cancerosas de hombres (M) y mujeres (F) para cáncer de riñón.

Especie	Cambio en veces		Valor de p		Valor de T	
	F	M	F	M	F	M
Sulfato de colesterol	0,57	0,80	5,1E-09	1,6E-02	6,3	2,2
SM 32:1	0,54	0,60	4,3E-10	1,4E-11	7,4	7,2
SM 33:1	0,57	0,63	1,4E-08	4,4E-10	6,6	6,6
SM 34:2	0,77	0,71	3,7E-03	6,7E-06	2,9	4,5
SM 34:1	0,72	0,75	3,4E-04	3,0E-05	3,7	4,2
SM 34:0	0,68	0,70	7,8E-05	1,2E-06	4,2	5,0
SM 35:1	0,64	0,66	1,1E-05	4,1E-08	4,8	5,7
SM 36:2	0,86	0,74	7,2E-02	1,8E-04	1,5	3,7
SM 36:1	0,81	0,74	1,5E-02	2,5E-05	2,3	4,2
SM 37:1	0,66	0,65	7,0E-05	1,1E-07	4,2	5,5
SM 38:2	0,76	0,69	2,7E-03	4,0E-06	3,0	4,7
SM 38:1	0,65	0,64	1,8E-05	9,9E-10	4,7	6,5
SM 39:1	0,52	0,53	3,4E-08	2,1E-14	6,4	8,4
SM 40:2	0,65	0,64	1,0E-05	2,2E-08	4,8	5,8
SM 40:1	0,65	0,63	2,5E-05	6,1E-10	4,6	6,5
SM 41:2	0,60	0,64	5,2E-07	1,3E-08	5,6	5,9
SM 41:1	0,58	0,59	1,3E-06	2,8E-12	5,5	7,5
SM 42:1	0,61	0,62	4,6E-06	9,0E-10	5,1	6,5
SM 43:3	0,65	0,75	2,1E-06	3,4E-05	5,0	4,1
SM 43:2	0,62	0,64	3,1E-05	2,9E-06	4,4	4,7
SM 43:1	0,39	0,39	8,2E-10	1,8E-11	6,6	7,4
Sul 32:1 (OH)	0,63	0,81	6,0E-07	6,9E-04	5,2	3,3
Sul 34:1	0,62	0,68	5,6E-05	2,0E-05	4,3	4,3
Sul 34:1 (OH)	0,61	0,68	1,6E-05	2,9E-05	4,7	4,2
Sul 34:0 (OH)	0,43	0,58	4,9E-08	3,5E-05	6,1	4,1

Sul 40:1	0,62	0,60	4,6E-04	1,1E-05	3,6	4,4
Sul 41:1	0,49	0,60	4,2E-07	2,7E-05	5,5	4,2
Sul 40:1 (OH)	0,57	0,58	9,1E-06	5,1E-08	4,8	5,6
Sul 41:1 (OH)	0,50	0,52	3,6E-07	6,4E-09	5,7	6,1
Sul 40:0 (2OH)	0,71	0,88	1,7E-05	3,4E-02	4,3	1,8
Sul 42:1 (OH)	0,58	0,61	8,5E-06	1,2E-07	4,9	5,5
Sul 42:1 (2OH)	0,55	0,60	8,8E-04	1,1E-04	3,3	3,8
Sul 42:0 (2OH)	0,72	0,85	8,2E-05	2,2E-02	3,9	2,0
SulfoHex ₂ Cer 42:2	1,34	1,84	9,1E-02	2,7E-02	-1,4	-2,0
PI 36:4	0,59	0,82	2,7E-05	4,9E-02	4,3	1,7
PI 36:3	0,54	0,75	8,6E-06	1,3E-02	4,6	2,3
PI 36:2	0,62	0,81	6,5E-06	1,2E-02	4,7	2,3
PI 36:1	0,53	0,70	4,7E-07	5,0E-04	5,4	3,4
PI 38:5	0,52	0,74	7,1E-07	1,1E-02	5,3	2,3
PI 38:3	0,60	0,72	6,6E-06	7,3E-04	4,8	3,3

Tabla 17. Parámetros estadísticos para el análisis de MALDI-EM de muestras de orina no cancerosas y muestras de orina cancerosas de hombres (M) y mujeres (F) para cáncer de riñón.

Especie	Cambio en veces		Valor de p de riñón		Valor de T	
	F	M	F	M	F	M
sulfato de cortisol	1,9	3,8	5,2E-02	1,3E-03	-1,7	-3,1
sulfato de ácido litocólico	1,4	2,4	2,0E-01	4,4E-02	-0,9	-1,7
sulfato de colesterol	1,1	1,7	3,8E-01	1,3E-02	-0,3	-2,3
ácido taurolitocólico	0,6	1,6	1,0E-01	9,7E-02	1,3	-1,3
ácido sulfocólico	2,3	6,6	5,7E-02	5,7E-03	-1,7	-2,6
ácido taurodesoxicólico	0,8	2,8	3,3E-01	8,6E-03	0,5	-2,4
ácido sulfoglicolítico	1,0	1,6	4,4E-01	2,9E-02	0,2	-1,9
ácido taurocólico	0,6	2,0	8,6E-02	1,3E-02	1,4	-2,3
sulfato de ácido glicoquenodesoxicólico	1,0	2,3	4,8E-01	1,5E-02	0,0	-2,2
sulfato de psicossina	1,1	1,4	3,8E-01	5,2E-02	-0,3	-1,7
Sul 34:1 (OH)	1,1	1,0	3,8E-01	4,4E-01	-0,3	-0,1
Sul 36:1 (OH)	1,7	1,8	7,8E-02	3,9E-03	-1,5	-2,8
Sul 38:1	1,2	1,0	3,2E-01	4,9E-01	-0,5	0,0
Sul 38:1 (OH)	1,1	0,7	4,3E-01	1,3E-01	-0,2	1,1
Sul 40:2	1,6	1,5	1,8E-01	8,2E-02	-1,0	-1,4
Sul 41:2	1,8	1,9	7,9E-02	1,8E-03	-1,5	-3,0
Sul 41:1	0,9	1,0	4,1E-01	4,5E-01	0,2	0,1
Sul 40:1 (OH)	0,8	0,9	3,0E-01	3,4E-01	0,5	0,4
Sul 40:0 (OH)	0,7	1,0	1,6E-01	4,5E-01	1,0	0,1
Sul 42:3	2,9	3,6	3,8E-02	3,3E-04	-1,9	-3,6
Sul 42:2	2,2	2,1	5,7E-02	5,1E-03	-1,7	-2,6
Sul 42:1	1,2	1,4	2,8E-01	8,3E-02	-0,6	-1,4
Sul 41:1 (OH)	0,9	0,9	3,6E-01	3,6E-01	0,4	0,4
Sul 41:0 (OH)	0,8	0,9	2,3E-01	3,3E-01	0,8	0,5
Sul 40:0 (2OH)	0,7	0,9	1,7E-01	3,3E-01	1,0	0,5
Sul 42:3 (OH)	1,6	2,0	8,5E-02	6,7E-04	-1,4	-3,3
Sul 41:0 (2OH)	0,8	0,9	2,0E-01	3,9E-01	0,9	0,3
Sul 43:2 (OH)	1,5	1,9	1,2E-01	1,0E-03	-1,2	-3,2
Sul 42:1 (2OH)	0,8	1,1	2,0E-01	2,8E-01	0,9	-0,6
Sul 42:0 (2OH)	0,8	1,0	2,8E-01	4,5E-01	0,6	-0,1
Sul 43:1 (2OH)	1,7	2,1	7,7E-02	3,7E-04	-1,5	-3,5
Sul 43:0 (2OH)	1,4	1,3	1,8E-01	8,7E-02	-0,9	-1,4
SulfoHex ₂ Cer 34:1	2,9	2,8	1,9E-02	2,6E-03	-2,2	-2,9
SulfoHex ₂ Cer 34:1 (OH)	2,1	1,8	5,4E-02	6,3E-03	-1,7	-2,6
SulfoHex ₂ Cer 36:1	2,2	3,4	4,1E-02	1,8E-04	-1,8	-3,7
SulfoHex ₂ Cer 38:1	3,1	3,4	4,2E-02	2,1E-03	-1,8	-3,0
SulfoHex ₂ Cer 38:1 (OH)	1,9	1,9	4,9E-02	5,5E-03	-1,7	-2,6
SulfoHex ₂ Cer 40:2	3,0	3,8	3,7E-02	1,2E-03	-1,9	-3,2
SulfoHex ₂ Cer 40:1	3,7	2,5	3,5E-02	2,4E-03	-1,9	-2,9
SulfoHex ₂ Cer 41:1	2,3	2,7	4,3E-02	6,3E-05	-1,8	-4,0
SulfoHex ₂ Cer 40:1 (OH)	1,7	0,8	1,8E-01	2,0E-01	-1,0	0,9
SulfoHex ₂ Cer 42:3	2,6	3,5	3,9E-02	1,3E-03	-1,9	-3,1
SulfoHex ₂ Cer 42:2	4,5	3,3	2,5E-02	1,1E-03	-2,1	-3,2
SulfoHex ₂ Cer 42:1	3,3	2,6	3,5E-02	1,1E-03	-1,9	-3,2
SulfoHex ₂ Cer 41:1 (OH)	1,8	1,7	7,9E-02	1,0E-02	-1,5	-2,4

SulfoHex ₂ Cer 40:0 (2OH)	1,2	0,8	3,1E-01	2,2E-01	-0,5	0,8
--------------------------------------	-----	-----	---------	---------	------	-----

Aplicabilidad industrial

- 5 El método de la invención puede usarse para el cribado poblacional de toda la población o de grupos seleccionados de la población basándose en factores de riesgo tales como edad, sexo, índice de masa corporal, predisposiciones genéticas, conductas de riesgo, etc. Los sujetos que tienen resultados positivos del cribado poblacional por encima de un umbral predeterminado pueden someterse entonces a exámenes y pruebas adicionales (por ejemplo, tomografía computarizada u otros métodos avanzados de obtención de imágenes). Puesto que el presente método de cribado no es invasivo, puede realizarse en un modo de alto rendimiento y puede detectar estadios tempranos de
- 10 cánceres.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico de cáncer de riñón basado en el análisis lipidómico de una muestra de líquido corporal seleccionada de plasma, suero, sangre u orina, tomada del cuerpo de un paciente, caracterizado porque comprende las etapas de:
- realizar en la muestra adiciones conocidas de un conjunto de patrones internos que comprenden al menos un patrón interno para cada clase de lípido presente en la muestra,
- posteriormente procesar la muestra mediante extracción lipidómica líquido-líquido o mediante extracción lipidómica en fase sólida,
- medición de la muestra procesada mediante un método de espectrometría de masas,
- determinar las concentraciones para al menos 28, más preferiblemente para todos los lípidos presentes a un nivel por encima del umbral de detección del método de espectrometría de masas, usando los patrones internos para las correspondientes clases de lípidos para la cuantificación, o usando concentraciones relativas de lípidos, o usando razones de concentraciones y/o intensidades de señal,
- evaluación estadística de las concentraciones determinadas de los lípidos, determinando dicha evaluación estadística el nivel de probabilidad de que el paciente padezca cáncer de riñón, basándose en las concentraciones de lípidos determinadas en comparación con un patrón canceroso y un patrón no canceroso, en el que el patrón canceroso y el patrón no canceroso se determinan mediante análisis estadístico de las concentraciones de lípidos para un grupo de muestras cancerosas y muestras no cancerosas conocidas; y en el que la evaluación estadística se realiza por separado para hombres y mujeres.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el paciente es un mamífero, preferiblemente un ser humano.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los patrones internos son compuestos de lípidos exógenos, que tienen la estructura de cabeza polar típica de la clase de lípido relevante y que contienen acilos grasos con cadenas más cortas que los lípidos que se producen de manera natural, preferiblemente cadenas 12:0 o 14:0, o acilos grasos con un número impar de átomos de carbono, preferiblemente cadenas 17:0, 17:1 o 19:1, o los patrones internos son análogos marcados isotópicamente de los lípidos de la clase de lípido relevante, preferiblemente D7-Chol, D7-CE 16:0.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un conjunto de patrones internos contiene:
- | | |
|--------------------|------------------------|
| D7-CE 16:0 | MG 19:1 |
| Cer d18:1/12:0 | PA 14:0/14:0 |
| DG 12:1/12:1 | PC 14:0/14:0 |
| Hex2Cer d18:1/12:0 | PE 14:0/14:0 |
| HexCer d18:1/12:0 | PG 14:0/14:0 |
| D7-Chol | PS 14:0/14:0 |
| LPC 17:0 | SM d18:1/12:0 |
| LPE 14:0 | SulfoHexCer d18:1/12:0 |
| LPG 14:0 | TG 19:1/19:1/19:1 |
| LPA 14:0 | LPS 17:1 |
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método de espectrometría de masas se selecciona de espectrometría de masas indiscriminada, cromatografía de líquidos de rendimiento ultra alto - espectrometría de masas, cromatografía de fluidos supercríticos de rendimiento ultra alto - espectrometría de masas y espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se usa una muestra combinada preparada mezclando volúmenes idénticos de varias muestras, en el que las muestras mezcladas incluyen muestras de pacientes con cáncer y voluntarios sanos, y se procesa del mismo modo que las muestras medidas, preferiblemente se usa la muestra combinada para observar la exactitud intradiaria y la precisión intradiaria, así como la exactitud interdiaria y la precisión interdiaria, y/o para determinar el límite inferior de cuantificación y el límite superior de cuantificación, y/o para control de calidad durante las mediciones del conjunto de muestras para todos los métodos.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el orden de las muestras es aleatorio en secuencias de medición de muestras.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de determinar las concentraciones de todos los lípidos presentes a un nivel por encima del límite inferior de cuantificación del método de espectrometría de masas, usando los patrones internos para las correspondientes clases de lípidos para la cuantificación, comprende uno o más de los siguientes procedimientos y correcciones:
- 5 - corrección isotópica,
- procedimiento de relleno con ceros en el que las señales de especies de lípidos que no se detectan para una muestra particular se reemplazan por del 50 al 100 %, preferiblemente por del 60 al 100 % de la concentración mínima observada para dichas especies de lípidos en todas las muestras.
- 10 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la evaluación estadística implica
- 15 - preprocesamiento de datos tal como centrado, escalado y/o transformación;
- análisis PCA para la identificación de factores influyentes tales como valores atípicos o errores de medición,
- 20 - análisis de discriminación mediante OPLS-DA para la separación de grupos de pacientes con cáncer y voluntarios sanos,
- asignación de los parámetros estadísticos así como la evaluación del poder de predicción.

Figura 1

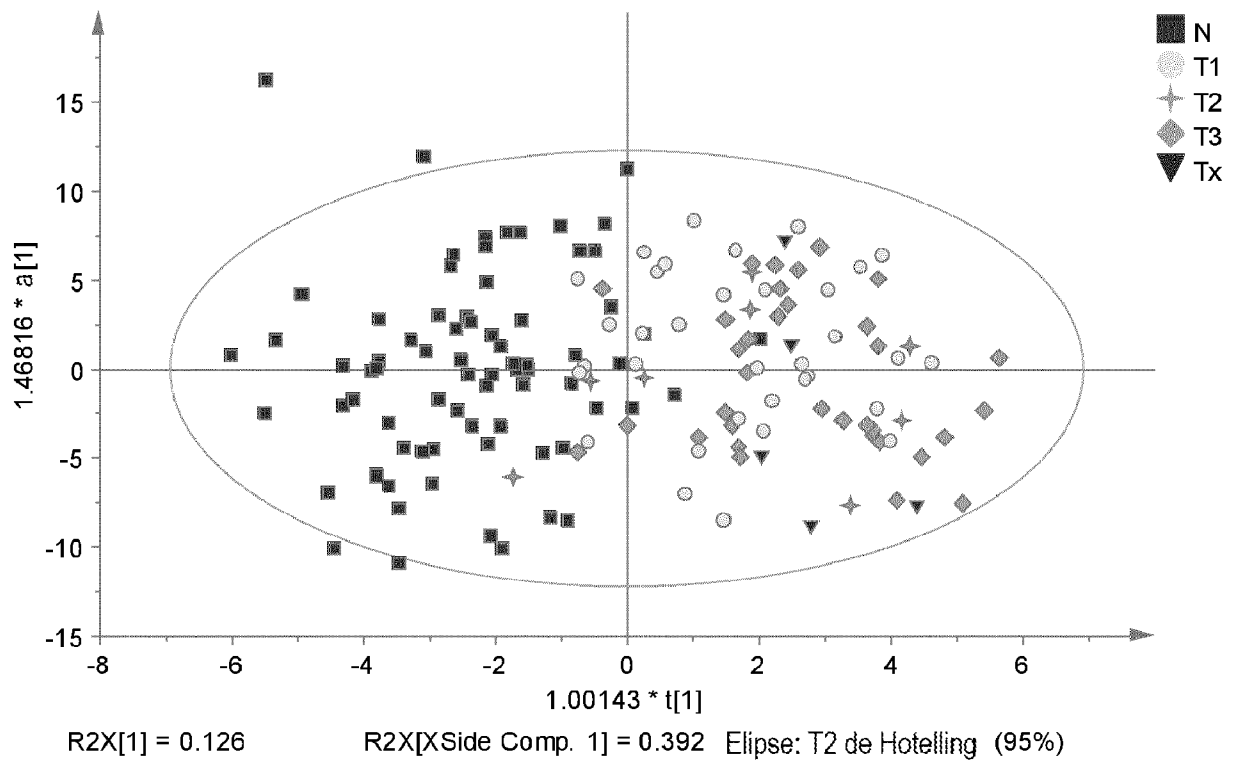


Figura 2

