

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 457**

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 17163073 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3206034**

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

30 Prioridad:

23.06.2010 US 357642 P

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

17.03.2021

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:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 812 457 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 procedimientos para detectar cáncer

Derechos gubernamentales

5 La presente invención se hizo en parte con el apoyo del gobierno con el número de subvención EPS-0447479 otorgado 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.

Antecedentes

10 El cáncer es una causa principal de muerte y enfermedad y supone un coste importante en los sistemas médicos en Estados Unidos y en todo el mundo. Algunas publicaciones que se refieren a la conexión entre el cáncer y los ácidos grasos son las siguientes: Baro y col. (British Journal of Cancer, 1988, Vol. 77 (11), 1978-1983) se refiere a anomalías en los perfiles de ácidos grasos en plasma y células sanguíneas de pacientes con cáncer colorrectal. Mannisto y col. (Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 2003, Vol. 12, 1422-1428) se refiere a la conexión entre los ácidos grasos y el riesgo de cáncer de próstata en hombres fumadores. Przybytkowski y col. (Biochemistry and Cell Biology, 15 2007, Vol. 85, 301-310) se refiere a la regulación positiva del ciclo de ácidos grasos libres de triacilglicerol celular por oleato que se asocia con la supervivencia a largo plazo sin suero de las células de cáncer de mama humano. Rissanen y col. (Nutrition and Cancer, 2003, Vol 45, 168-175) se refiere a la conexión entre los ácidos grasos del suero y la incidencia de cáncer de mama. Charles y col. (American Journal of Epidemiology, 2001, Vol. 153(3), 292-298) describe cómo los ácidos grasos no esterificados en plasma predicen la mortalidad por cáncer pero no la mortalidad por cardiopatía coronaria. Charjes y col. (International Journal of Cancer, 1999, Vol 83(5), 585-590) se refiere a la conexión entre la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos y el riesgo de cáncer de mama. Laaksonen y col. (International Journal of Cancer, 20 2004, 111(3), 444-450) se refiere al ácido linoleico sérico y los ácidos grasos poliinsaturados totales en relación con la próstata y otros tipos de cáncer.

25 La detección prematura del cáncer está asociada con mejores opciones de tratamiento y con un resultado mejorado. Por lo tanto, la detección prematura del cáncer puede ayudar a minimizar tanto la enfermedad como el coste, mientras se aumenta típicamente la probabilidad de supervivencia. Por tanto, algunas realizaciones de la invención son procedimientos para determinar la presencia de cánceres en animales.

Sumario

De acuerdo con un primer aspecto, se proporciona un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en un animal, que comprende

- 30 - determinar las cantidades 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 el que
- las cantidades de lípidos en el conjunto de lípidos comprenden una entrada del modelo predictivo,
 - la muestra comprende un fluido corporal o tratamiento del mismo;
- 35 - 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 lípidos FA (16:3), y
 - el modelo predictivo comprende uno o más de procedimiento de reducción de dimensiones, procedimiento de agrupamiento, procedimiento 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 de discriminación de mínimos cuadrados parciales, análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales ortogonales, centrado de la media, centrado de la mediana, escala de Pareto, escala de varianza de la unidad, corrección de señal ortogonal, integración, diferenciación, validación cruzada o curvas características de funcionamiento del receptor.
- 40

45 Preferentemente, el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en vómito plasmático, cerumen, jugo gástrico, leche materna, moco, saliva, sebo, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, suero sanguíneo, humor acuoso, humor vítreo, endolinfá, perilinfá, fluido peritoneal, fluido pleural, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, fluido de aspirado del pezón, orina, heces y fluido de lavado broncoalveolar.

Preferentemente, la muestra es una fracción exosomal.

50 Preferentemente, el conjunto de lípidos comprende al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 200 o no más de 100.000 lípidos.

Se prefiere que el conjunto de lípidos comprende adicionalmente uno o más lípidos seleccionados de la una o más clases, de lípidos seleccionadas 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, el conjunto de lípidos comprende adicionalmente uno o más lípidos seleccionados de la una o más clases, e lípidos seleccionadas 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.

- 5 Normalmente, uno o más lípidos del conjunto de lípidos se seleccionan adicionalmente de uno o más lípidos FA con un intervalo de acilo 10-26 y un número de sitios insaturados de 0-6.

Se prefiere que el al menos un tipo de cáncer comprende cáncer pulmonar.

Preferentemente, el al menos un tipo de cáncer comprende cáncer de mama.

- 10 Preferentemente, las cantidades de lípidos se determinan usando espectrometría de masas, tal como analizador de masas de resonancia de ciclotrón de iones con transformada de Fourier.

Se prefiere que la muestra sea un tratamiento de un fluido corporal y el tratamiento comprende una o más extracciones usando una o más soluciones que comprenden acetonitrilo, agua, cloroformo, metanol, hidroxitolueno butilado, ácido tricloroacético o combinaciones de los mismos.

Preferentemente, el modelo predictivo comprende uno o más procedimientos de reducción de dimensiones.

- 15 Preferentemente, el modelo predictivo comprende uno o más procedimientos seleccionados del grupo que consiste en análisis de componentes principales (PCA), modelado independiente suave de analogía de clases (SIMCA), análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA).

- 20 Se prefiere que el animal se seleccione del grupo que consiste en un ser humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, pollo, pavo, ratón y rata.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en un animal que comprende

- determinar las cantidades de lípidos de los 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 el que
- 25
- las cantidades de lípidos en el conjunto de lípidos comprenden una entrada del modelo predictivo, y
 - la muestra comprende un líquido corporal o el tratamiento del mismo,

- el al menos un tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas, sarcomas, cánceres hematológicos, neoplasias 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 cerebral, 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 rectal, cáncer de nódulo linfático, cáncer de médula ósea, cáncer de estómago, cáncer de útero, leucemia, carcinoma de células basales, cánceres asociados a células epiteliales, cánceres que pueden alterar la regulación o la actividad de la piruvato carboxilasa y tumores asociados con
- 30
- 35 cualquiera de los tipos de cáncer mencionados anteriormente.

- el conjunto de lípidos comprende FA (16:3); y
 - el modelo predictivo comprende uno o más de los métodos de reducción de dimensiones, método de agrupamiento, método de aprendizaje automático, análisis de componentes principales, modelado independiente suave de la analogía de clase, regresión parcial de mínimos cuadrados, regresión ortogonal de mínimos cuadrados, análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, mínimos cuadrados parciales ortogonales análisis discriminante, centrado medio, centrado medio, escalado de Pareto, escalado de varianza de unidad, corrección de señal
- 40
- ortogonal, integración, diferenciación, validación cruzada o curvas características operativas del receptor.

Breve descripción de los dibujos

- 45 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para ilustrar adicionalmente ciertos ejemplos de la presente invención.

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

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

- 50 Figura 3. Fosfatidilcolinas en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).

- Figura 4. Fosfatidilcolinas en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).
- Figura 5. Fosfatidilcolinas en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).
- 5 Figura 6. Fosfatidiletanolaminas en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).
- Figura 7. Fosfatidiletanolaminas en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).
- 10 Figura 8. Fosfatidiletanolaminas en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).
- Figura 9. Fosfatidiletanolaminas-pmg en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).
- Figura 10. Fosfatidiletanolaminas-pmg en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).
- 15 Figura 11. Triacilgliceroles en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).
- Figura 12. Monoacilgliceroles en muestras de seres humanos con cáncer pulmonar, cáncer de mama y sin cáncer (control).
- Figura 13. Clases de lípidos en muestras de seres humanos que comparan el tipo de cáncer.
- 20 Figura 14. Diagrama de valores PC1-PC3 PCA para muestras de cáncer de mama, de control y cáncer pulmonar - 4 componentes, $R^2X = 0,475$, $Q^2 = 0,296$.
- Figura 15. Diagrama de cargas de PC1-PC3 PCA para muestras de cáncer de mama, de control y cáncer pulmonar - 4 componentes, $R^2X = 0,475$, $Q^2 = 0,296$.
- 25 Figura 16. Diagrama de valores OPLS-DA que separa muestras de cáncer pulmonar y de control - componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,253$, $R^2Y = 0,619$, $Q^2 = 0,345$.
- Figura 17. Diagrama de coeficientes OPLS-DA que separa muestras de cáncer pulmonar y de control - componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,253$, $R^2Y = 0,619$, $Q^2 = 0,345$. El diagrama de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de control.
- 30 Figura 18. Diagrama de coeficientes OPLS-DA que separa muestras de cáncer pulmonar y de control - componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,253$, $R^2Y = 0,619$, $Q^2 = 0,345$. El diagrama de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de cáncer pulmonar.
- Figura 19. Diagrama de valores OPLS-DA que separa muestras de cáncer de mama y de control - componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,281$, $R^2Y = 0,762$, $Q^2 = 0,625$.
- 35 Figura 20. Diagrama de coeficientes OPLS-DA que separa 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 diagrama de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de control.
- Figura 21. Diagrama de coeficientes OPLS-DA que separa 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 diagrama de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de cáncer de mama.
- 40 Figura 22. Diagrama de valores OPLS-DA que separa muestras de cáncer pulmonar y de cáncer de mama - componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,309$, $R^2Y = 0,816$, $Q^2 = 0,725$.
- Figura 23. Diagrama de coeficientes OPLS-DA que separa muestras de cáncer pulmonar y de cáncer de mama - componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,309$, $R^2Y = 0,816$, $Q^2 = 0,725$. El diagrama de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de cáncer pulmonar.
- 45 Figura 24. Diagrama de coeficientes OPLS-DA que separa muestras de cáncer pulmonar y de cáncer de mama - componentes ortogonales 1+1, $R^2X = 0,309$, $R^2Y = 0,816$, $Q^2 = 0,725$. El diagrama de coeficientes indica lípidos elevados en muestras de cáncer de mama.
- Figura 25. Un diagrama de flujo que representa una realización de uno de los procedimientos divulgados en el presente documento. El estado del cáncer puede incluir la presencia o ausencia de uno o más tipos de cáncer.

Descripción detallada

5 Algunas realizaciones de la invención incluyen procedimientos para detectar la presencia o ausencia de uno o más tipos de cáncer determinando la cantidad de lípidos en un conjunto de lípidos en una muestra. La muestra puede ser un fluido corporal (o tratamiento del mismo) de un animal. En algunos casos, la muestra (por ejemplo, un extracto de fluido corporal) comprende una concentración de microvesículas de lípidos que es mayor de la normalmente encontrada en un fluido corporal. Las cantidades de lípidos en el conjunto de lípidos se analizan usando un modelo predictivo para determinar la presencia o ausencia de uno o más tipos de cáncer.

10 Los lípidos se denominan de acuerdo con la siguiente notación XXX (YY:ZZ). XXX es la abreviatura para el grupo de lípidos (que en muchos casos indica el grupo principal lipídico) según se proporciona, por ejemplo, en la tabla 1. YY es la cantidad de carbonos en la cadena acilo. ZZ es la cantidad de dobles enlaces en las cadenas acilo.

15 El término lípido, como se usa en el presente documento, se define como un conjunto de uno o más isómeros. Por ejemplo, PC (36:1) es un lípido y está en el conjunto de uno o más de los isómeros de fosfatidilcolina que tienen 36 carbonos en la cadena acilo y un doble enlace en cualquiera de las dos cadenas acilo; estos isómeros tienen pesos moleculares idénticos. Aunque el término lípido puede abarcar el conjunto completo de isómeros, la muestra puede tener, de hecho, solamente un isómero, varios isómeros o cualquier cantidad de isómeros menor que la cantidad total de todos los posibles isómeros en un conjunto. Por consiguiente, lípido puede referirse a uno o más de los isómeros que componen el conjunto completo de posibles isómeros.

Se define que la expresión conjunto de lípidos incluye uno o más lípidos.

20 Se define que la expresión cantidad de lípidos (y expresiones similares tales como, cantidades de lípidos o cantidad de un lípido) abarca una cantidad absoluta de un lípido (por ejemplo, en milimoles) o una cantidad relativa de un lípido (por ejemplo, en % de intensidad relativa).

La tabla 1 proporciona abreviaturas de nombres de lípidos usadas en los datos; se proporcionan otras abreviaturas en el texto según lo 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	Dihidroceramida de hexosilo
LacCer	Lactosilceramida
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	Tetrahydro-12-ceto-leucotrieno b4

25 Los fluidos corporales pueden ser cualquier fluido corporal adecuado para la determinación de cáncer e incluyen, aunque sin limitación, vómito, cerumen (cera del oído), jugo gástrico, leche materna, moco (por ejemplo, drenaje nasal y flema), saliva, sebo (aceite de la piel), semen (incluyendo fluido prostático), sudor, lágrimas, secreción vaginal, suero sanguíneo, humor acuoso, humor vítreo, endolinfa, perilinf, fluido peritoneal, fluido pleural, líquido cefalorraquídeo,

5 sangre, plasma, fluido de aspirado del pezón, orina, heces, fluido de lavado broncoalveolar, sangre periférica, suero, plasma, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo (CSF), esputo, médula ósea, fluido sinovial, humor acuoso, líquido amniótico, fluido de Cowper o fluido preeyaculatorio, eyaculado femenino, materia fecal, cabello, líquido quístico, fluido pleural y peritoneal, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bilis, fluido intersticial, menstruación, pus, secreciones vaginales, secreción mucosa, agua fecal, jugo pancreático, fluidos de lavado de cavidades sinusales, aspirados broncopulmonares u otros fluidos de lavado.

10 El fluido corporal puede ser cualquier tejido animal (por ejemplo, tejidos de mamífero) incluyendo, aunque sin limitación, 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 orgánico. Los órganos pueden incluir, aunque sin limitación, corazón, sangre, vasos sanguíneos, glándulas salivares, 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, piel de la uretra, 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, vaso deferente, vesículas seminales, próstata y pene), faringe, laringe, tráquea, bronquios, pulmones, diafragma, huesos, cartilago, ligamentos o tendones. Los sistemas orgánicos pueden incluir, aunque sin limitación el sistema circulatorio, el sistema digestivo, el sistema endocrino, el sistema excretor, el sistema tegumentario, el sistema linfático, el sistema muscular, el sistema nervioso, el sistema reproductor, el sistema respiratorio o el sistema esquelético.

20 Los fluidos corporales se pueden obtener del animal mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, pero sin limitación, la manipulación de puntos de excreción natural (por ejemplo, mediante la succión o mediante manipulación manual, tal como el pezón mamario para obtener un líquido aspirado del pezón). Los fluidos corporales pueden congelarse en nitrógeno líquido. La preparación de los fluidos corporales puede realizarse de cualquier manera adecuada.

25 El fluido corporal puede obtenerse a través de un tercero, como una parte que no realiza el análisis. Por ejemplo, el fluido corporal puede obtenerse a través de un médico, practicante u otro administrador de atención médica de un sujeto del que se obtiene la muestra. En algunas realizaciones, el fluido corporal se puede obtener por la misma parte que realiza el análisis. En algunas realizaciones, el fluido corporal es la muestra. En otras realizaciones, el fluido corporal se trata para proporcionar la muestra. El tratamiento puede incluir cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, aunque sin limitación, extracción, centrifugación (por ejemplo, ultracentrifugación), liofilización, fraccionamiento, separación (por ejemplo, usando cromatografía en columna o gel) o evaporación. En algunos casos este tratamiento puede incluir una o más extracciones con soluciones que comprenden cualquier disolvente adecuado o combinaciones de disolventes tales como, aunque sin limitación, acetonitrilo, agua, cloroformo, metanol, hidroxitolueno butilado, ácido tricloroacético, tolueno, hexano, benceno o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, 35 en algunas realizaciones, se extraen fracciones de sangre con una mezcla que comprende metanol e hidroxitolueno butilado. En algunos casos, la muestra (por ejemplo, un extracto de fluido corporal o una fracción de microvesícula lipídica de plasma sanguíneo) comprende una concentración de microvesículas de lípidos que es mayor de la normalmente encontrada en un fluido corporal.

40 El volumen de la muestra (por ejemplo, el fluido corporal o tratamiento del mismo) usada para el análisis puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 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.

45 Las amplias clases de lípidos que pueden ser parte de un conjunto de lípidos incluyen, aunque sin limitación, ácidos grasos (caracterizados por un grupo carboxilo y una cadena acilo), glicerolípidos (caracterizados por la presencia de una estructura de glicerol con uno - monoacilgliceroles (MAG), dos - diacilgliceroles (DAG) o tres - triacilgliceroles (TAG) cadenas de acilo graso enlazadas con éster), glicerofofolípidos (GPL) (caracterizados por una estructura de glicerilo con dos cadenas acilo enlazadas por éster y un grupo principal polar enlazado con fosfato - los GPL incluyen fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS), fosfatidilgliceroles (PG), fosfatidilinositoles (PI), inositol y ácidos fosfatídicos), lisoglicerofofolípidos (LGPL) (los LGPL pierden una de las cadenas acilo de la estructura 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 estructura básica de esfingosina con un doble enlace trans entre C4 y C5 de una cadena acilo unida al grupo amino a través de un enlace amida), Bis(monoacilglicero)fosfato (BMP), ceramidas, gangliósidos, esteroides, prenoides, sacarolípidos y policétidos. 55 En algunos casos, el grupo lipídico se basa en la composición de cadena acilo que puede variar de muchas maneras incluyendo la cantidad de carbonos en la cadena acilo y la cantidad de dobles enlaces en la cadena acilo.

60 En otras realizaciones, 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, LisoPEpmg, LisoPS, MAG, PC, PC-pmg, PE, PE-pmg, PGA1, PGB1, SM, esfingosina, TAG, o TH-12-ceto-LTB4. En otras realizaciones más, 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.

- 5 En algunas realizaciones, el conjunto de lípidos usado en el modelo predictivo se limita a los que tienen una mayor probabilidad de encontrarse en combinaciones de lípidos humanos. En otros ejemplos, el conjunto de lípidos excluye cadenas acilo muy cortas, y muy largas (por ejemplo, menos de 10 carbonos y más de 26 carbonos dentro de una cadena). En otros ejemplos más, los lípidos del conjunto de lípidos (por ejemplo, GPL o LGPL) se limitan a los que contienen una cantidad par de carbonos en la cadena acilo. En otros ejemplos, el conjunto de lípidos incluía uno o más lípidos enumerados en la tabla 2.

Tabla 2

<u>Clase de lípido</u>	<u>Grupo de lípido</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Intervalo de cadena de acilo</u>	<u>Sitios insaturados (número de dobles enlaces)</u>	<u>Características adicionales o comentarios</u>	<u>Número total de estructuras consideradas</u>
Ácidos grasos	Ácidos grasos	FA	10-26	0-6		79
Glicerolípidos	Monoacilgliceroles	MAG	10-26	0-6	Número par de carbonos solamente	43
Glicerolípidos	Diacilgliceroles	DAG	22-46	0-12	Número par de carbonos solamente	120
Glicerolípidos	Triacilgliceroles	TAG	44-66	0-18		316
Glicerofosfolípidos	Fosfatidilcolinas	PC	28-44	0-12	Número par de carbonos solamente	77
Glicerofosfolípidos	Fosfatidiletanolaminas	PE	28-44	0-12	Número par de carbonos solamente	77
Glicerofosfolípidos	Fosfatidilserinas	PS	28-44	0-12	Número par de carbonos solamente	77
Glicerofosfolípidos	Fosfatidilinositoles	PI	28-44	0-12	Número par de carbonos solamente	77
Glicerofosfolípidos	Fosfatidilgliceroles	PG	28-44	0-12	Número par de carbonos solamente	77
Glicerofosfolípidos	Ácido fosfatídico	PA	28-44	0-12	Número par de carbonos solamente	77
Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidilcolinas	LysoPC	10-26	0-6	Número par de carbonos solamente	43
Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidiletanolaminas	LysoPE	10-26	0-6	Número par de carbonos solamente	43
Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidilserinas	LysoPS	10-26	0-6	Número par de carbonos solamente	43
Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidilinositoles	LysoPI	10-26	0-6	Número par de carbonos solamente	43

(continuación)

<u>Clase de lípido</u>	<u>Grupo de lípido</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Intervalo de cadena de acilo</u>	<u>Sitios insaturados (número de dobles enlaces)</u>	<u>Características adicionales o comentarios</u>	<u>Número total de estructuras consideradas</u>
Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidilgliceroles	LysoP G	10-26	0-6	Número par de carbonos solamente	43
Lisoglicerofosfolípidos	Ácido lisofosfatídico	LysoP A	10-26	0-6	Número par de carbonos solamente	43
Lisoglicerofosfolípidos	Lysophosphatidylcholines-pmg	LysoPC	10-26	0-6	Número par de carbonos solamente	43
Lisoglicerofosfolípidos	Lisofosfatidiletanolaminas-pmg	LysoPE	10-26	0-6	Número par de carbonos solamente	43
Bis(monoacilglicero)fosfatos		BMP	28-48	0-12		211
Esfingolípidos	Esfingomielinas	SM	30-42	0-3		25
Esfingolípidos	Ceramidas	Cer	30-44	0-3		33
Esfingolípidos	Fosfatos de ceramida	Cer-P	30-44	0-3		33
Esfingolípidos	Ceramidas de hexosa	HexCer	30-44	0-3		33
Esfingolípidos	Gangliósidos A1	GA1	28-46	0-2		57
Esfingolípidos	Gangliósidos A2	GA2	28-46	0-2		57
Esfingolípidos	Gangliósidos D1	GD1	28-46	0-2		57
Esfingolípidos	Gangliósidos D2	GD2	28-46	0-2		57
Esfingolípidos	Gangliósidos M1	GM1	28-46	0-2		57
Esfingolípidos	Gangliósidos M2	GM2	28-46	0-2		57
Esfingolípidos	Gangliósidos M3	GM3	28-46	0-2		57
Esfingolípidos	Gangliósidos A1	GT1	28-46	0-2		57
Ésteres de colesterol	Ésteres de colesterol	CE	10-26	0-6		79

De acuerdo con la realización de la invención, el conjunto de lípidos comprende uno o más lípidos FA (16:3).

En algunos ejemplos, los lípidos en conjunto de lípidos pueden incluir uno o más de BMP (30:1), BMP (32:1), BMP (34:1), BMP (35:4), BMP (36:3), BMP (37:1), BMP (37:7), BMP (38:1), BMP (38:2), BMP (38:4), BMP (39:1), BMP (39:4), BMP (40:1), BMP (40:2), BMP (40:3), BMP (40:4), BMP (40:7), BMP (42:10), BMP (42:2), BMP (42:5), BMP (44:8), CE (16:2), CE (18:2), CE (18:3), CE (18:4), CE (20:2), CE (20:4), CE (20:5), Cer (32:1), Cer (34:1), Cer (36:1), Cer (38:1), Cer (38:4), Cer (40:2), Cer (40:4), DAG (28:0), DAG (32:0), DAG (32:2), DAG (34:0), DAG (34:3), DAG (34:5), DAG (36:0), DAG (36:1), DAG (36:2), DAG (36:3), DAG (36:8), DAG (36:8), DAG (38:1), DAG (38:10), DAG (38:2), DAG (38:3), DAG (38:5), DAG (40:1), DAG (40:2), DAG (40:5), DH-LTB4 (20:3), FA (16:3), FA (19:1), GA2 (30:0), GA2 (33:2), GA2 (35:2), GA2 (37:2), GM3 (41:1), HexCer (32:1), HexDHCer (34:0), LacCer (30:0), LacCer (30:1), LacCer (32:2), LisoPA (16:2), LisoPA (16:3), LisoPA (18:1), LisoPA (22:0), LisoPA (22:1), LisoPC (16:0), LisoPC (18:0), LisoPC (18:1), LisoPC (18:4), LisoPC (20:4), LisoPC (20:5), LisoPC (26:6), LisoPC-pmg (12:0), LisoPC-pmg (18:3), LisoPC-pmg (24:4), LisoPC-pmg (26:0), LisoPE (10:1), LisoPE (16:2), LisoPE (18:2), LisoPE-pmg (18:4), LisoPS (24:1), MAG (18:0), MAG (20:3), MAG (24:2), PC (32:0), PC (32:1), PC (34:1), PC (34:1), PC (34:2), PC (34:3), PC (34:4), PC (34:6), PC (36:1), PC (36:2), PC (36:3), PC (36:4), PC (36:5), PC (36:6), PC (36:9), PC (38:2), PC (38:3), PC (38:4), PC (38:5), PC (38:6), PC (38:7), PC (38:8), PC (38:9), PC (38:9), PC (40:5), PC (40:6), PC (40:7), PC (40:8), PC (40:9), PC (44:12), PC-pmg (30:1), PC-pmg (36:4), PC-pmg (38:5), PC-pmg (38:7), PC-pmg (40:11), PC-pmg (42:1), PE (34:7), PE (36:5), PE (36:7), PE (38:2), PE (38:3), PE (38:4), PE (38:5), PE (38:7), PE (40:4), PE (40:9), PE (42:12), PE (44:11), PE-pmg (28:2), PE-pmg (30:3), PE-pmg (34:6), PE-pmg (34:8), PE-pmg (36:5), PE-pmg (36:6), PE-pmg (40:7), PE-pmg (40:8), PE-pmg (42:10), PE-pmg (42:12), PE-pmg (42:4), PE-pmg (42:7), PE-pmg (42:8), PE-pmg (42:9), PE-pmg (44:10), PE-pmg (44:11), PE-pmg (44:12), PE-pmg (44:7), PE-pmg (44:8), PE-pmg (44:9), PGA1 (20:1), PGB1 (20:1), SM (34:1), SM (34:2), SM (36:1), SM (38:1), SM (40:1), SM (40:2), SM (42:1), SM (42:2), SM (42:3), Esfingosina (18:0), TAG (44:1), TAG (44:3), TAG (46:0), TAG (46:1), TAG (46:2), TAG (46:3), TAG (46:4), TAG (48:0), TAG (48:1), TAG (48:2), TAG (48:3), TAG (48:4), TAG (48:5), TAG (49:1), TAG (49:2), TAG (49:3), TAG (50:0), TAG (50:1), TAG (50:2),

TAG (50:3), TAG (50:4), TAG (50:5), TAG (50:6), TAG (51:2), TAG (51:4), TAG (52:2), TAG (52:3), TAG (52:4), TAG (52:5), TAG (52:6), TAG (52:7), TAG (53:4), TAG (54:2), TAG (54:3), TAG (54:4), TAG (54:5), TAG (54:6), TAG (54:7), TAG (54:8), TAG (55:5), TAG (55:6), TAG (55:7), TAG (56:4), TAG (56:5), TAG (56:6), TAG (56:7), TAG (56:8), TAG (56:9), TAG (58:10), TAG (58:6), TAG (58:8), TAG (58:9), TAG (60:12) o TH-12-ceto-LTB4(20:2).

5 En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen LisoPA (22:0), PE-pmg (42:9), FA (16:3), FA (19:1), CE (18:2), PE-pmg (44:11), BMP (30:1), PE-pmg (44:12), BMP (42:10), BMP (36:3), PC (34:6), BMP (40:3), TAG (50:2), BMP (39:1), DAG (38:3), BMP (37:1), PC-pmg (40:11), DAG (40:5), DAG (32:2), TAG (46:2), BMP (42:5), PE-pmg (42:8), PC (44:12), GA2 (35:2), TAG (50:1), CE (20:5), DAG (40:2), TAG (49:2), LisoPE (18:2), BMP (40:7), DAG (36:8), LisoPC (18:1), PE-pmg (36:5), PE-pmg (42:7), DH-LTB4
10 (20:3), PGA1 (20:1), PGB1 (20:1), BMP (38:4), BMP (35:4), BMP (44:8), TAG (46:1), TAG (44:1), LysoPC (18:4), DAG (36:0), DAG (38:2), LisoPC (20:4), DAG (38:1), LisoPC (26:6), DAG (36:2), DAG (34:5), TAG (49:1), TAG (56:7), DAG (38:5), Cer (40:2), BMP (40:4), GA2 (30:0), LisoPC-pmg (12:0), LisoPC-pmg (26:0), PC-pmg (30:1), LisoPC (20:5), PE-pmg (44:10), PE-pmg (34:8), PE-pmg (44:7), GM3 (41:1), BMP (37:7), PC (38:9), CE (20:4), SM (36:1), LisoPC-pmg (18:3), TAG (54:2), PE (38:5), PC (34:4), PC (34:3), TAG (48:0), TAG (50:5), DAG (32:0), PC (36:3), LisoPA (18:1),
15 TAG (48:3), TAG (50:4), TAG (54:3), LisoPA (16:3), PC (36:1), TAG (58:9), PE-pmg (36:6), TAG (54:7), TAG (56:5), SM (42:1), LisoPA (16:2), DAG (28:0), TAG (46:3), TAG (54:8), SM (42:2), PC (40:8), LisoPE (10:1), PE (44:11), TAG (56:9), PC (40:6), SM (40:1), PE (36:5), Cer (32:1), BMP (39:4), PE-pmg (34:6), DAG (34:3), TAG (54:4), TAG (54:6), TAG (52:6), PE (36:7), PC (38:4), DAG (36:3), PC (36:2), PC (38:6), Cer (40:4), TAG (52:4), MAG (24:2), TAG (54:5), PC (36:5), TAG (50:3), TAG (52:5), MAG (18:0), LisoPA (22:1), TAG (52:3), PC (36:4), PC (40:7), PC (34:2), PC (34:1),
20 Cer (34:1), PC (38:7), Cer (36:1), Cer (38:4), PC (38:5), Cer (38:1), o TAG (44:3).

En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen LisoPA (22:0), PE-pmg (42:9), FA (16:3), FA (19:1), CE (18:2), Cer (36:1), Cer (38:4), PC (38:5), Cer (38:1), o TAG (44:3).

25 En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen LisoPA (22:0), PE-pmg (42:9), FA (16:3), FA (19:1), CE (18:2), PE-pmg (44:11), BMP (30:1), PE-pmg (44:12), BMP (42:10), BMP (36:3), PC (34:6), BMP (40:3), TAG (50:2), BMP (39:1), DAG (38:3), BMP (37:1), PC-pmg (40:11), DAG (40:5), DAG (32:2), TAG (46:2), BMP (42:5), PE-pmg (42:8), PC (44:12), GA2 (35:2), TAG (50:1), PE (36:7), PC (38:4), DAG (36:3), PC (36:2), PC (38:6), Cer (40:4), TAG (52:4), MAG (24:2), TAG (54:5), PC (36:5), TAG (50:3), TAG (52:5), MAG (18:0), LisoPA (22:1), TAG (52:3), PC (36:4), PC (40:7), PC (34:2), PC (34:1), Cer (34:1), PC (38:7), Cer (36:1),
30 Cer (38:4), PC (38:5), Cer (38:1) o TAG (44:3).

En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen TAG (44:3), PC (36:5), PC (38:5), Cer (38:4), PE-pmg (42:9), PC (38:7), LisoPA (22:0), Cer (38:1), Cer (34:1), Cer (36:1), PC (40:7), TAG (54:5), TAG (54:6), CE (18:2), PC (36:4), FA (16:3), PE-pmg (44:11), TAG (52:5), Cer (40:4), CE (20:5), PC (38:6), TAG (50:2), MAG (18:0), FA (19:1), TAG (52:2), LisoPA (22:1), MAG (24:2), TAG (54:7), TAG (50:3), TAG (50:1), DAG (36:3), PC (34:1), TAG (52:6), BMP (30:1), PE-pmg (44:12), CE (20:4), BMP (40:3), PE (44:11), PC (40:8), TAG (56:9), PE-pmg (34:6), PE (36:7), PE (36:5), TAG (56:7), TAG (56:8), DAG (34:3), TAG (56:6), BMP (42:10), TAG (52:3), BMP (39:4), BMP (36:3), TAG (54:3), TAG (56:5), TAG (54:8), PC (34:6), PC (40:6), DAG (36:0), LisoPE (10:1), DAG (40:5), Cer (32:1), TAG (50:5), TAG (50:4), PE-pmg (36:6), BMP (42:5), TAG (46:3) o PE (38:5).

40 En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen TAG (44:3), PC (36:5), PC (38:5), Cer (38:4), PE-pmg (42:9), PC (38:7), LisoPA (22:0), Cer (38:1), Cer (34:1) o Cer (36:1).

En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen LisoPA (22:1), PE-pmg (42:9), CE (20:5), TAG (52:3), LisoPA (22:0), TAG (52:2), DAG (32:0), TAG (54:4), DAG (34:0), DAG (36:0), TAG (54:3), PE-pmg (44:11), TAG (44:3), BMP (30:1), TAG (52:4), BMP (40:3), PC (36:5), PC (36:9), PC (34:6), PE-pmg (44:12), BMP (42:10), BMP (36:3), PC-pmg (40:11), FA (16:3), DAG (38:3), TAG (54:2), BMP (42:5), HexDHCer (34:0), DAG (40:5), Cer (40:4), PC-pmg (30:1), PC (44:12), PE (38:5), PE (42:12), TAG (48:0), PE (36:5), PE-pmg (34:6), MAG (24:2), PE-pmg (36:6), TAG (56:4), TAG (49:3), CE (18:3), FA (19:1), DAG (38:5), TAG (50:0), BMP (38:4), TAG (46:3), TAG (51:4), BMP (35:4), PE-pmg (36:5), PE (44:11), DAG (38:2), TAG (48:3), CE (20:4), CE (18:4), LisoPC-pmg (18:3), BMP (44:8), LisoPC (20:4), TAG (60:12), LisoPC (18:4), PE-pmg (28:2), PE (40:4), PC-pmg (42:1), Esfingosina (18:0), LacCer (32:2), LisoPC (18:0), PE (38:3), MAG (20:3), SM (34:2), PC (40:5), SM (42:1), PE (38:7), LacCer (30:1), TAG (44:1), TAG (58:8), PC (40:9), CE (16:2), TAG (58:10), PE-pmg (44:10), SM (40:2), TAG (50:4), LisoPE-pmg (18:4), GA2 (37:2), PC-pmg (38:5), PC-pmg (36:4), PC (38:2), LacCer (30:0), GA2 (33:2), SM (42:3), PE (38:4), TAG (46:1), PC (32:1), BMP (42:2), LisoPC (16:0), SM (38:1), PE (38:2), TAG (50:3), TAG (58:9), PC (40:6), TAG (48:1), TAG (50:2), BMP (38:2), PE-pmg (40:7), PE-pmg (42:10), LisoPC-pmg (24:4), PC (34:3), PE-pmg (44:9), SM (36:1), PE-pmg (42:12), TAG (48:2), BMP (40:1), PE-pmg (44:8), DAG (36:1), TAG (56:7), LisoPC (26:6), PE-pmg (40:8), CE (18:2), PC (32:0), TAG (54:8), Cer (36:1), GA2 (35:2), TAG (56:6), TAG (56:9), DAG (36:8), PE-pmg (42:7), BMP (40:2), PC (38:3), PC (40:7), DAG (32:2), SM (42:2), SM (40:1), MAG (18:0), TAG (56:8), PE-pmg (42:8), TAG (52:5), DAG (40:1), PC (36:1), SM (34:1), DAG (38:1), TAG (54:7), Cer (38:1), BMP (39:1), BMP (37:1), Cer (34:1), TAG (54:6), PC (38:4), TAG (54:5), PC (36:3), PC (36:4), PC (36:2), PC (34:2) o PC (34:1).

En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen LisoPA (22:1), PE-pmg (42:9), CE (20:5), TAG (52:3), LisoPA (22:0), PC (36:3), PC (36:4), PC (36:2), PC (34:2) o PC (34:1).

5 En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen LisoPA (22:1), PE-pmg (42:9), CE (20:5), TAG (52:3), LisoPA (22:0), TAG (52:2), DAG (32:0), TAG (54:4), DAG (34:0), DAG (36:0), TAG (54:3), PE-pmg (44:11), TAG (44:3), BMP (30:1), TAG (52:4), BMP (40:3), PC (36:5), PC (36:9), PC (34:6), PE-pmg (44:12), BMP (42:10), BMP (36:3), PC-pmg (40:11), FA (16:3), DAG (38:3), PC (40:7), DAG (32:2), SM (42:2), SM (40:1), MAG (18:0), TAG (56:8), PE-pmg (42:8), TAG (52:5), DAG (40:1), PC (36:1), SM (34:1), DAG (38:1), TAG (54:7), Cer (38:1), BMP (39:1), BMP (37:1), Cer (34:1), TAG (54:6), PC (38:4), TAG (54:5), PC (36:3), PC (36:4),
10 PC (36:2), PC (34:2) o PC (34:1).

En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen PC (34:2), PC (34:1), PC (36:2), PC (36:4), PC (36:3), PC (38:4), LisoPA (22:1), PE-pmg (42:9), LisoPA (22:0), CE (20:5), Cer (36:1), CE (18:2), DAG (34:0), SM (34:1), DAG (32:0), PE-pmg (40:8), PC (38:3), DAG (36:0), PC (36:1), TAG (54:5), TAG (54:6), PE-pmg (44:11), PE-pmg (42:8), TAG (52:2), SM (42:2), PC (38:6), TAG (54:7), PC (40:6), PC (40:7), LisoPC (16:0), FA (16:3), TAG (52:5), TAG (44:3), BMP (38:2), BMP (30:1), SM (40:1), PE-pmg (42:10), BMP (40:2), PE-pmg (40:7), SM (36:1), PE (38:2), PC (34:3), PC (36:5), PC (32:0), PC (32:1), BMP (37:1), BMP (40:3), PC (36:9), SM (42:3), PC-pmg (36:4), PC-pmg (38:5), PC (40:9), TAG (54:3), PE-pmg (44:12), BMP (36:3), FA (19:1), BMP (39:1), TAG (50:3), BMP (42:10), PC (34:6), GA2 (35:2), TAG (58:9), PE-pmg (42:7) o LisoPC (18:0).

20 En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen, aunque sin limitación, PC (34:2), PC (34:1), PC (36:2), PC (36:4), PC (36:3), PC (38:4), LisoPA (22:1), PE-pmg (42:9), LisoPA (22:0) o CE (20:5).

En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama y cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen LisoPA (22:1), PC (36:5), TAG (52:3), PC (38:5), CE (20:5), TAG (44:3), PC (38:7), TAG (52:2), TAG (54:4), TAG (52:4), Cer (38:4), DAG (32:0), MAG (24:2), DAG (34:0), TAG (54:3), PC (38:6), Cer (40:4), TAG (52:6), PE-pmg (34:6), PE (36:5), DAG (36:0), Cer (36:1), CE (20:4), PC (36:9), PE-pmg (36:6), PE (38:5), PE (36:7), TAG (50:5), TAG (46:3), TAG (48:3), DAG (36:3), TAG (48:0), PC (40:7), CE (18:3), LisoPE (10:1), TAG (56:5), TAG (52:7), PE (44:11), Cer (38:1), TAG (54:2), LisoPA (16:2), TAG (52:5), TAG (48:4), DAG (28:0), LisoPC-pmg (18:3), HexDHcer (34:0), Cer (32:1), DAG (34:3), TAG (50:3), BMP (39:4), LisoPA (18:1), TAG (49:3), DAG (38:3), MAG (18:0), TAG (56:4), PC (40:8), PE-pmg (42:4), TAG (50:0), TAG (48:5), TAG (50:6), DAG (38:10), BMP (34:1),
30 PC (36:6), BMP (37:7), TAG (55:6), PC (34:4), BMP (32:1), PC (38:8), PC-pmg (38:7), TAG (46:0), TAG (46:4), PC (38:9), TAG (53:4), TAG (55:5), TAG (55:7), TAG (58:6), TAG (58:9), BMP (38:1), TH-12-ceto-LTB4(20:2), PC (34:6), HexCer (32:1), LisoPE (16:2), PE (34:7), LisoPS (24:1), PC (40:5), LisoPC (18:0), TAG (51:2), PE (38:3), Esfingosina (18:0), PC-pmg (38:5), PC-pmg (36:4), BMP (40:4), LacCer (30:1), SM (40:2), BMP (30:1), PC-pmg (42:1), PE-pmg (28:2), PE-pmg (30:3), PE (38:2), CE (20:2), DAG (34:5), BMP (42:2), Cer (34:1), PC (32:1), PE-pmg (44:12), GA2 (37:2), GA2 (33:2), LisoPA (22:0), DAG (40:2), TAG (56:7), TAG (54:5), LisoPE (18:2), LisoPE-pmg (18:4), CE (16:2), TAG (56:6), BMP (40:7), PE-pmg (40:7), BMP (38:2), MAG (20:3), TAG (49:2), PE (38:4), TAG (49:1), PE-pmg (42:10), DAG (36:2), BMP (42:10), TAG (44:1), LisoPC (16:0), PC (38:2), SM (42:2), PE-pmg (44:9), BMP (40:1), PE-pmg (44:8), PE-pmg (44:11), TAG (46:2), LisoPC-pmg (24:4), SM (40:1), PE-pmg (42:9), DAG (40:5), PE (40:9), PE-pmg (40:8), PE-pmg (42:12), PC (38:3), TAG (46:1), BMP (40:2), PC (32:0), TAG (56:8), PE-pmg (42:7), DAG (36:1), GA2 (35:2), LisoPC (26:6), TAG (54:6), TAG (48:1), TAG (54:7), PE-pmg (42:8), DAG (36:8), PC (36:1), SM (34:1), TAG (48:2), DAG (40:1), DAG (32:2), TAG (50:1), FA (16:3), PC (36:4), DAG (38:1), PC (38:4), FA (19:1), PC (36:3), PC (36:2), BMP (37:1), TAG (50:2), BMP (39:1), PC (34:2), CE (18:2), o PC (34:1).

45 En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama y cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen LisoPA (22:1), PC (36:5), TAG (52:3), PC (38:5), CE (20:5), TAG (50:2), BMP (39:1), PC (34:2), CE (18:2), o PC (34:1).

En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama y cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen LisoPA (22:1), PC (36:5), TAG (52:3), PC (38:5), CE (20:5), TAG (44:3), PC (38:7), TAG (52:2), TAG (54:4), TAG (52:4), Cer (38:4), DAG (32:0), MAG (24:2), DAG (34:0), TAG (54:3), PC (38:6), Cer (40:4), TAG (52:6)), PE-pmg (34:6), PE (36:5), DAG (36:0), Cer (36:1), CE (20:4), PC (36:9), PE-pmg (36:6), LisoPC (26:6), TAG (54:6),
50 TAG (48:1), TAG (54:7), PE-pmg (42:8), DAG (36:8), PC (36:1), SM (34:1), TAG (48:2), DAG (40:1), DAG (32:2), TAG (50:1), FA (16:3), PC (36:4), DAG (38:1), PC (38:4), FA (19:1), PC (36:3), PC (36:2), BMP (37:1), TAG (50:2), BMP (39:1), PC (34:2), CE (18:2) o PC (34:1).

En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama y cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen PC (34:2), PC (36:2), TAG (44:3), CE (18:2), PC (34:1), LisoPA (22:1), PC (36:5), Cer (36:1), CE (20:5), PC (36:3), PC (38:4), PC (36:4), Cer (38:4), PC (38:5), PC (38:7), Cer (38:1), TAG (50:2), Cer (34:1), SM (34:1), Cer (40:4), MAG (18:0), MAG (24:2), PC (38:3), PE-pmg (40:8), PE-pmg (42:8), TAG (50:1), DAG (32:0), PC (36:1), DAG (34:0), LisoPC (16:0), PE-pmg (34:6), DAG (36:3), PC (36:9), PE (36:5), TAG (52:6), FA (19:1), PE-pmg (44:11), BMP (38:2), PE (44:11), TAG (48:2), SM (42:2), BMP (40:2), PE-pmg (42:10), PE (36:7), PE-pmg (40:7), BMP (39:1), BMP (37:1), PE-pmg (36:6), PE (38:5), PC (32:0), PE (38:2), GA2 (35:2), DAG (34:3), PE-pmg (44:12), MAG (16:0), PC (32:1), LisoPE (10:1), SM (36:1), BMP (39:4), TAG (56:7) o PE-pmg (42:9).

En algunos ejemplos (por ejemplo, para determinar cáncer de mama y cáncer pulmonar), los lípidos en el conjunto de lípidos incluyen PC (34:2), PC (36:2), TAG (44:3), CE (18:2), PC (34:1), LisoPA (22:1), PC (36:5), Cer (36:1), CE (20:5) o PC (36:3).

5 En algunas realizaciones, la cantidad 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 realizaciones, la cantidad de lípidos en el conjunto de lípidos puede incluir no más de 200, no más de 500, no más de 1.000, no más de 5.000, no más de 10.000 o no más de 100.000 lípidos.

10 Los animales incluyen, aunque sin limitación, primates (por ejemplo, seres humanos), caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, aves o mamíferos. Los animales incluyen los que son mascotas o de zoológico e incluyen cerdos domesticados y caballos (incluyendo caballos de raza). Además, cualquier animal relacionado con actividades comerciales también se incluye, tal como aquellos animales relacionados con la agricultura y la acuicultura y otras actividades en que el control, el diagnóstico y la selección de terapia para enfermedades son una práctica rutinaria en la agricultura para la productividad económica y/o la seguridad de la cadena alimentaria. En algunas realizaciones, el animal es un ser humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, pollo, pavo, ratón o rata.

15 En algunos ejemplos, los tipos de cáncer (incluyendo tumores cancerosos) pueden incluir carcinomas, sarcomas, cánceres hemáticos, neoplasias 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 pulmonar, cáncer pancreático, cáncer cerebral, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, rhabdomyosarcoma, glioblastoma multiforme, meningioma, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, glioma, cáncer oral, carcinoma nasofaríngeo, cáncer renal, cáncer rectal, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de médula ósea, cáncer de estómago, cáncer uterino, leucemia, carcinoma basocelular, cánceres relacionados con células epiteliales o cánceres que pueden alterar la regulación o la actividad de la piruvato carboxilasa. Los tumores cancerosos incluyen, por ejemplo, tumores asociados con cualquiera de los cánceres mencionados anteriormente.

25 En algunas realizaciones, la determinación de la presencia o de la ausencia de uno o más tipos de cáncer incluye determinar la presencia o la ausencia de cada tipo de cáncer.

La cantidad de un lípido puede determinarse usando cualquier técnica adecuada, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los procedimientos de espectrometría de masas descritos en el presente documento.

30 Usando 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 masa, cámara de vacío y sistema de bombeo) y otros componentes, incluyendo, aunque sin limitación, sistemas de separación, tales como sistemas de cromatografía interconectados. El espectrómetro de masas puede ser cualquier espectrómetro de masas adecuado para determinar una cantidad de lípidos. El sistema analizador de masas puede incluir cualquier sistema adecuado incluyendo, aunque sin limitación, analizador de tiempo de vuelo, analizador de cuadrupolo, sector magnético, Orbitrap, trampa de iones lineal o resonancia de ciclotrón de iones con transformada de Fourier (FTICR). En algunos casos, el sistema analizador de masa (por ejemplo, FTICR) tiene suficiente resolución para determinar la identidad del lípido sin medios experimentales adicionales. La fuente de iones puede incluir, aunque sin limitación, ionización por impacto de electrones, electronebulización, ionización química, fotoionización, ionización química por presión atmosférica, ionización por colisión, ionización natural, ionización térmica, ionización por bombardeo de átomos rápidos, ionización con haces de partículas o ionización por desorción láser asistida con matriz (MALDI). En algunos casos, la electronebulización puede ser una fuente de iones no ionizante. Los sistemas de cromatografía interconectados pueden incluir cualquier sistema adecuado de cromatografía incluyendo, aunque sin limitación, cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida (CL) o movilidad de iones (que puede combinarse con procedimientos de CL o de CG). En algunos casos, puede usarse infusión directa. En algunos casos, el sistema de espectrometría de masas es CG/EM o CL/EM.

45 En algunos casos, una vez se han obtenido los espectros de EM, los espectros pueden analizarse para determinar la identidad y la cantidad (por ejemplo, la presencia) de lípidos en la muestra.

50 Para los espectros de EM, el análisis puede incluir cualquier análisis adecuado para determinar la identidad y/o la cantidad de un lípido incluyendo el análisis de una o más características, que incluyen, aunque sin limitación, la comparación de las masas con masas conocidas, los tiempos de retención cromatográfica (por ejemplo, para CG/EM o CL/EM) 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 patrones). En algunos casos, puede usarse 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: pág. 201-208) para identificar los lípidos. La cantidad de lípidos (por ejemplo, la cantidad relativa) puede determinarse por cualquier procedimiento adecuado incluyendo, aunque sin limitación, la función de respuesta del detector de iones, por referencia a patrones añadidos o por dilución de isótopo.

En algunas realizaciones, antes de introducir los datos en el modelo predictivo, los datos pueden pre-procesarse. Los

procedimientos de pre-procesamiento pueden incluir uno o más de cualquier procedimiento adecuado tal como procedimientos de normalización o procedimientos de escala. En algunas realizaciones, los procedimientos de escalonamiento pueden incluir, aunque sin limitación, centrado, varianza de la unidad, varianza de la unidad sin centrado, Pareto y Pareto sin centrado.

5 Un modelo predictivo puede comprender cualquier modelo adecuado para determinar la presencia o la ausencia de uno o más tipos de cáncer. Por ejemplo, el modelo predictivo puede comprender uno o más procedimientos de reducción de dimensiones. En algunas realizaciones, el modelo predictivo comprende uno o más de los procedimientos de agrupamiento (por ejemplo, agrupación de medias-K y agrupación de vecinos más cercanos de K), procedimientos de aprendizaje automático (por ejemplo, redes neurales 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 ortogonales (OPLS), análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) o análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA). Estas técnicas pueden incluir, si se desea, o suplementarse con uno o más procedimientos adecuados incluyendo centrado de la media, centrado de la mediana, escala de Pareto, escala de varianza unitaria, corrección de la señal ortogonal, integración, diferenciación, validación cruzada y curvas de característica de funcionamiento del receptor (ROC). En algunas realizaciones, el modelo predictivo puede desarrollarse usando un conjunto de datos de capacitación, donde los datos de capacitación están diseñados para producir un conjunto de parámetros aplicables y coeficientes. En algunas realizaciones, 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 capacitación pueden incluir datos de control negativo (por ejemplo, cuando no hay cáncer presente en el animal) y datos de control positivo (cuando hay uno o más tipos de cáncer presentes en el animal). El conjunto de datos de capacitación puede usarse para establecer un modelo predictivo que puede determinar dos o más tipos de cáncer.

La figura 25 muestra algunas realizaciones del procedimiento. Ilustra que, en algunos casos, una vez se ha establecido un modelo predictivo usando un conjunto de datos de capacitación, puede hacerse la determinación de la presencia de uno o más tipos de cáncer a partir del modelo predictivo sin ninguna capacitación adicional.

Los procedimientos de la presente invención pueden comprender adicionalmente la determinación de la expresión proteica, expresión génica o tanto de proteínas o sus genes. Puede determinarse la expresión de cualquier proteína adecuada (o su gen), incluyendo, aunque sin limitación, la piruvato carboxilasa, la succinil CoA sintetasa, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la transcelotasa, la transaldolasa, la piruvato deshidrogenasa, una deshidrogenasa, glutaminasa, isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa mitocondrial, succinato deshidrogenasa, fumarato hidratasa, hexoquinasa II, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa 1, lactato deshidrogenasa 5, fosfofructoquinasa 1 y 2, glutatión peroxidasa o glutatión-S-transferasa, o proteínas asociadas con rutas metabólicas tales como, aunque sin limitación, el ciclo de Krebs (también conocido como el ciclo del ácido cítrico), glucolisis, la ruta de pentosa fosfato (oxidativa y no oxidativa), gluconeogénesis, biosíntesis de lípidos, síntesis de aminoácidos (por ejemplo, síntesis de aminoácidos no esenciales), rutas catabólicas, ciclo de la urea, ciclo de Cori o ciclo de glutamato/glutamina. La expresión proteica puede determinarse por cualquier técnica adecuada incluyendo, aunque sin limitación, técnicas que comprenden técnicas de electroforesis en gel (por ejemplo, transferencia de Western), técnicas cromatográficas, técnicas basadas en anticuerpos, técnicas de centrifugación o combinaciones de las mismas. La expresión génica puede determinarse por cualquier técnica adecuada incluyendo, aunque sin limitación, técnicas que comprenden técnicas basadas en PCR (por ejemplo, PCR a tiempo real), técnicas de electroforesis en gel, técnicas cromatográficas, técnicas basadas en anticuerpos, técnicas de centrifugación o combinaciones de las mismas. Los procedimientos para medir la expresión génica pueden comprender medir cantidades de ADNc preparado a partir de ARN aislado de tejido.

Ejemplos

45 **Preparación de plasma:** Se recogió sangre de seres humanos diagnosticados con cáncer de mama, diagnosticados con cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC) y seres humanos sanos (sin cáncer) (también mencionados como de control o normales) en tubos vacutainer que contienen K-EDTA (parte superior púrpura) para anticoagulación y se colocaron inmediatamente en hielo y se centrifugaron a 3.500 xg durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante (plasma) se dividió en alícuotas antes de congelarse rápidamente 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 ultracentrifuga de polialómero de 1 ml usando PBS frío para ajustar el volumen exacto (el volumen completo de los tubos de ultracentrifuga debe llenarse hasta 5 mm de la parte superior para evitar el colapso tras la centrifugación). Se preenfrió el rotor SWTi55 con cubos hasta 4 °C. Los tubos de ultracentrifuga más la tapa en cubos, se pesaron para ajustar todas las masas de muestra a 10 mg de variación usando PBS. Las muestras después se centrifugaron en rotores SWTi55 a 70.000 xg (27.172 r.p.m.) durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo en SWTi55 a 100.000 xg (32.477 r.p.m.) durante 1 h 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 el PBS frío por resuspensión y centrifugaron en SWTi55 a 100.000 xg (32.477 r.p.m.) durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante se retiró y ambos tubos se invirtieron sobre toalla de papel para drenar el exceso de PBS. Los sedimentos se resuspendieron en 2 x 100 μ l de agua 18 MOhm para su transferencia a tubos de microfuga de 2 ml y se liofilizaron

durante una noche. Los sedimentos liofilizados se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de los lípidos.

Extracción de lípidos: El sedimento de la fracción de microvesículas lipídicas se extrajo en 0,5 ml de metanol (calidad de espectrometría de masas) + hidroxitolueno butilado 1 mM por homogeneización con perlas de vidrio de 3 x 3 mm en un molino de mezcla (por ejemplo, MM200, Retsch) durante 1 minuto a 30 Hz. El homogeneizado después se agitó en un balancín durante 30 minutos antes de centrifugación a 14.000 r.p.m. durante 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una microcentrífuga. El sobrenadante se transfirió a un vial de vidrio de tapón de rosca de 1,5 ml con septo de silicona cubierto de teflón y se registra el peso del extracto. El extracto lipídico se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis FT-ICR-EM.

Análisis de FT-ICR-EM: Las muestras se diluyeron 1:5 en metanol + BHT 1 mM + 1 ng/nl de reserpina antes del análisis en un espectrómetro de masas de FT-ICR con trampa de iones lineal híbrido (ThermoFisher LTQ FT, Thermo Electron, Bremen, Alemania), como se describe previamente (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: pág. 201-208). El FT-ICR-EM estaba equipado con una fuente de iones TriVersa NanoMate (Advion BioSciences, Ithaca, NY) con un chip de electronebulización "A" (diámetro interior de boquilla 5,5 μm). El TriVersa NanoMate se hizo funcionar aplicando 2,0 kV con una presión superior de 689,47 Pa (0,1 psi) en modo de iones positivos y 1,5 kV y 3.447,38 (0,5 psi) en el modo negativo. Las ejecuciones de EM se registraron sobre un intervalo de masa de 150 a 1600 Da. Inicialmente, se adquirieron exploraciones de EM de baja resolución durante 1 min para asegurar la estabilidad de la ionización, después de lo cual se recogieron datos de alta precisión de masa usando el analizador FT-ICR donde se adquirieron exploraciones de EM durante 8,5 min y a la resolución de masa diana de 200.000 a 400 m/z. El tiempo de iones máximo AGC (control de ganancia automática) se estableció a 500 ms (pero típicamente utilizó <10 ms) y se adquirieron cinco "exploraciones" para cada espectro guardado; por tanto, el tiempo del ciclo para cada espectro transformado y guardado fue aproximadamente 10 s. El LTQ-FT se afinó y calibró de acuerdo con las recomendaciones convencionales por defecto del fabricante, que consiguió una precisión de masa mejor de 1 ppm. Los espectros de masas FT-ICR se exportaron como listas de masa exacta en un archivo de hoja de cálculo usando QualBrowser 2.0 (Thermo Electron), típicamente exportando todos los picos observados. Las especies de lípidos se asignaron basándose en su masa precisa, aplicando primero una corrección lineal pequeña (típicamente $<0,0005$) basada en la masa observada del patrón interno (reserpina), después usando una herramienta de software propia PREMISE (PREcalculated EXact Mass Isotopologue Search Engine) (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: pág. 201-208) que se validó manualmente. PREMISE es una rutina que empareja los valores m/z observados con los teóricos, sujeta a una ventana de selección que era de 0,0014 Da o más pequeña. Para los lípidos, las masas exactas de una gran cantidad (>3.500) de posibles GLP y sus formas iónicas (principalmente H^+ y Na^+ - modo positivo y - H^+ - modo negativo) se precalcularon en una tabla de búsqueda de hoja de cálculo. El procedimiento global fue suficiente para asignar un GLP a una longitud de cadena de acilo total particular, grado de saturación e identidad de grupo principal.

Análisis de quimiométrica: Los datos de FT-ICR-EM normalizados se importaron en SimcaP (version 11.5, Umetrics, Umeå, Suecia). Los datos se centraron en la media y se graduaron a la varianza de Pareto ($1/\sqrt{dt}$). El análisis de componentes principales (PCA) después se realizó sobre los datos resultantes. Esto se hizo para encontrar muestras atípicas o variables. No se determinaron muestras como atípicas y fue una variable. La variable esfingosina (18:1) se excluyó del análisis posterior. Los diagramas de valores y cargas PCA se muestran en las figuras 14 y 15.

Los modelos de análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) se crearon para tres subconjuntos de datos: normal (es decir, sin cáncer) y cáncer pulmonar, normal (es decir, sin cáncer) y cáncer de mama, y cáncer pulmonar y cáncer de mama. Este análisis determinó una dimensión en el espacio de múltiples variables que maximizan la separación de grupos (por ejemplo, el grupo de control y el grupo de cáncer pulmonar) eliminando al mismo tiempo una dimensión ortogonal a la dimensión mencionada que tiene una varianza de muestra máxima no relacionada con la separación de clases. Este análisis determinó que de las muchas variables la mayoría son 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 iguales en cada fuente de fracción de microvesículas lipídicas (los componentes principales). Las clases principales que dieron lugar a la discriminación se obtuvieron de los diagramas de carga y coeficiente, que se visualizan en los diagramas 3D mostrados en las figuras 1-13. Los diagramas de valores y coeficientes OPLS-DA se proporcionan en las figuras 16-24.

Las intensidades de las especies lipídicas se normalizaron a la respuesta de lípidos totales para generar "fracciones molares". Las clases de lípidos diferentes variaron en sus abundancias, y dentro de una clase también varía sustancialmente la longitud de cadena acilo y el número de dobles enlaces, que era parte de la clasificación. La mayor parte de la varianza surgía de la variabilidad entre sujetos en lugar de la varianza analítica. La diferencia en la abundancia entre las clases para la discriminación fue >4 veces con un coeficiente de variación dentro de una clase de hasta un 50 %. Por ejemplo, el PC (36:3) mostró una media y dt de $1,38 \pm 0,34$ (BrCA) frente a $0,23 \pm 0,1$ (sanos) frente a $0,19 \pm 0,28$ (NSCLC). Este único caso proporcionó separación estadística con valores p de $<0,0001$ (BrCA frente a sanos), $<0,0001$ (BrCA frente a NSCLC). NSCLC frente a sanos no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, otros lípidos dieron altas separación estadística entre NSCLC y sanos. Por lo tanto, se usaron varias clases

juntas para discriminar entre individuos sanos y aquellos con cáncer. La segregación óptima se consiguió usando conjuntos de lípidos donde al menos dos de las clases de sujetos diferían con valores p mejores de 0,01, y un mínimo de diez de dichas clases lipídicas se usaron para una discriminación fiable.

- 5 Se observa que términos como "preferiblemente", "comúnmente" y "típicamente" no se utilizan en el presente documento para limitar el ámbito de la invención reivindicada o para implicar que ciertas características son críticas, esenciales o incluso importantes para la estructura o función de la invención reivindicada. Más bien, estos términos están destinados simplemente a resaltar características alternativas o adicionales que pueden o no ser utilizadas en una realización particular de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en un animal, que comprende
- 5 - determinar las cantidades de lípidos de los 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 el que
- 10 - las cantidades de lípidos de los lípidos en el conjunto de lípidos comprenden una entrada del modelo predictivo, y
 - la muestra comprende un fluido corporal o un tratamiento del mismo,
 - el al menos un tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer pulmonar, cáncer de mama, y tumores asociados con cualquiera de los tipos de cáncer mencionados anteriormente,
 - el conjunto de lípidos comprende FA (16:3), y
 - el modelo predictivo comprende uno o más del procedimiento de reducción de dimensiones, procedimiento de agrupamiento, procedimiento 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 de discriminación de mínimos cuadrados parciales, análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales ortogonales, centrado de la media, centrado de la mediana, escala de Pareto, escala de varianza de la unidad, corrección de señal ortogonal, integración, diferenciación, validación cruzada o curvas características de funcionamiento del receptor.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en vómito plasmático, cerumen, jugo gástrico, leche materna, moco, saliva, sebo, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, suero sanguíneo, humor acuoso, humor vítreo, endolinfa, perilinfa, fluido peritoneal, fluido pleural, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, fluido de aspirado del pezón, orina, heces y fluido de lavado broncoalveolar.
3. Procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra es una fracción exosomal.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que 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 procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el conjunto de lípidos comprende adicionalmente uno o más lípidos seleccionados de la una o más clases de lípidos seleccionadas 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, PEpmg, PGA1, PGB1, SM, esfingosina, TAG y TH-12-ceto-LTB4.
- 30 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el conjunto de lípidos comprende adicionalmente uno o más lípidos seleccionados de la una o más clases de lípidos seleccionadas del grupo que consiste en BMP, FA, MAG, DAG, TAG, PI, PE, PS, PI, PG, PA, LisoPC, LisoPE, LisoPS, LisoPI, LisoPG, LisoPA, LisoPC, LisoPE, SM, Cer, Cer-P, HexCer, GA1, GA2, GD1, GD2, GM1, GM2, GM3, GT1 y CE.
- 35 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que uno o más lípidos en el conjunto de lípidos se selecciona adicionalmente de uno o más lípidos FA con un intervalo de la cadena acilo de 10-26 y un número de sitios insaturados de 0-6.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el al menos un tipo de cáncer comprende cáncer pulmonar.
- 40 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el al menos un tipo de cáncer comprende cáncer de mama.
10. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que las cantidades de lípidos se determinan usando espectrometría de masas, tal como un analizador de masas de resonancia de ciclotrón de iones con transformada de Fourier.
- 45 11. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la muestra es un tratamiento de un fluido corporal y el tratamiento comprende una o más extracciones usando una o más soluciones que comprenden acetonitrilo, agua, cloroformo, metanol, hidroxitolueno butilado, ácido tricloroacético o combinaciones de los mismos.
12. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el modelo predictivo comprende uno o más procedimientos de reducción de dimensiones.
- 50 13. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el modelo predictivo comprende uno o más procedimientos seleccionados del grupo que consiste en análisis de componentes principales (PCA), modelado independiente suave de analogía de clases (SIMCA), análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA).

14. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el animal se selecciona del grupo que consiste en un ser humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, pollo, pavo, ratón y rata.

15. Un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de al menos un tipo de cáncer en un animal que comprende

5 - determinar 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 el que

-las cantidades lipídicas de los lípidos en el conjunto de lípidos comprende una entrada del modelo predictivo, y

10 - la muestra comprende un fluido corporal o el tratamiento del mismo,
- el al menos un tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas, sarcomas, cánceres hematológicos, neoplasias 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 cerebral, 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 rectal, cáncer de nódulo linfático, cáncer de médula ósea, cáncer de estómago, cáncer de útero, leucemia, carcinoma de células basales, cánceres asociados a células epiteliales, cánceres que pueden alterar la regulación de la actividad de la piruvato carboxilasa y tumores asociados con cualquiera de los tipos de cáncer mencionados anteriormente,

20 - el conjunto de lípidos comprende FA (16:3), y

- el modelo predictivo comprende uno o más del procedimiento de reducción de dimensiones, procedimiento de agrupamiento, procedimiento 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 de discriminación de mínimos cuadrados parciales, análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales ortogonales, centrado de la media, centrado de la mediana, escala de Pareto, escala de varianza de la unidad, corrección de señal ortogonal, integración, diferenciación, validación cruzada o curvas características de funcionamiento del receptor.

25

Figura 1

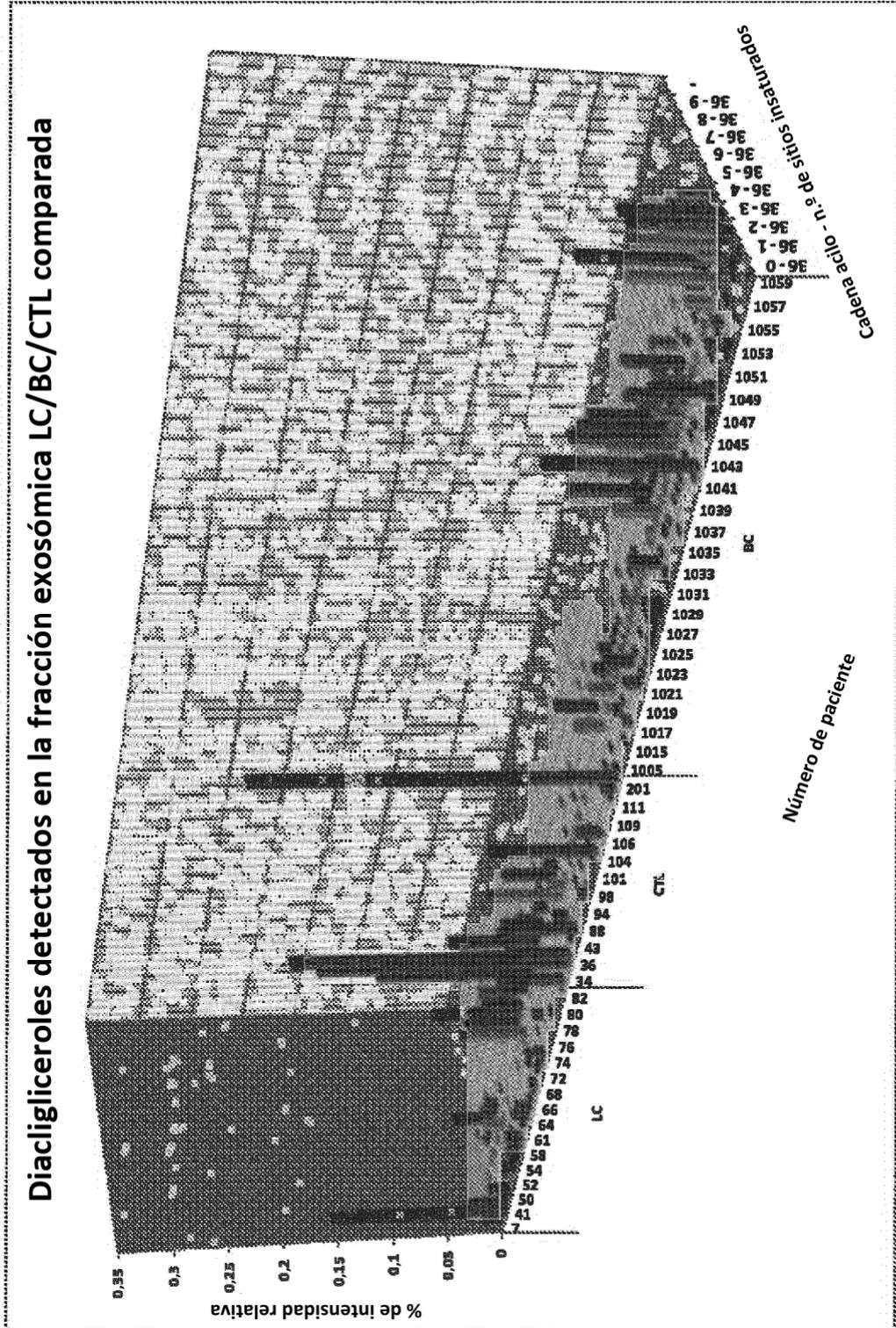


Figura 2

Fosfatidilcolinas detectadas en la fracción exosómica LC/BC/CTL comparada

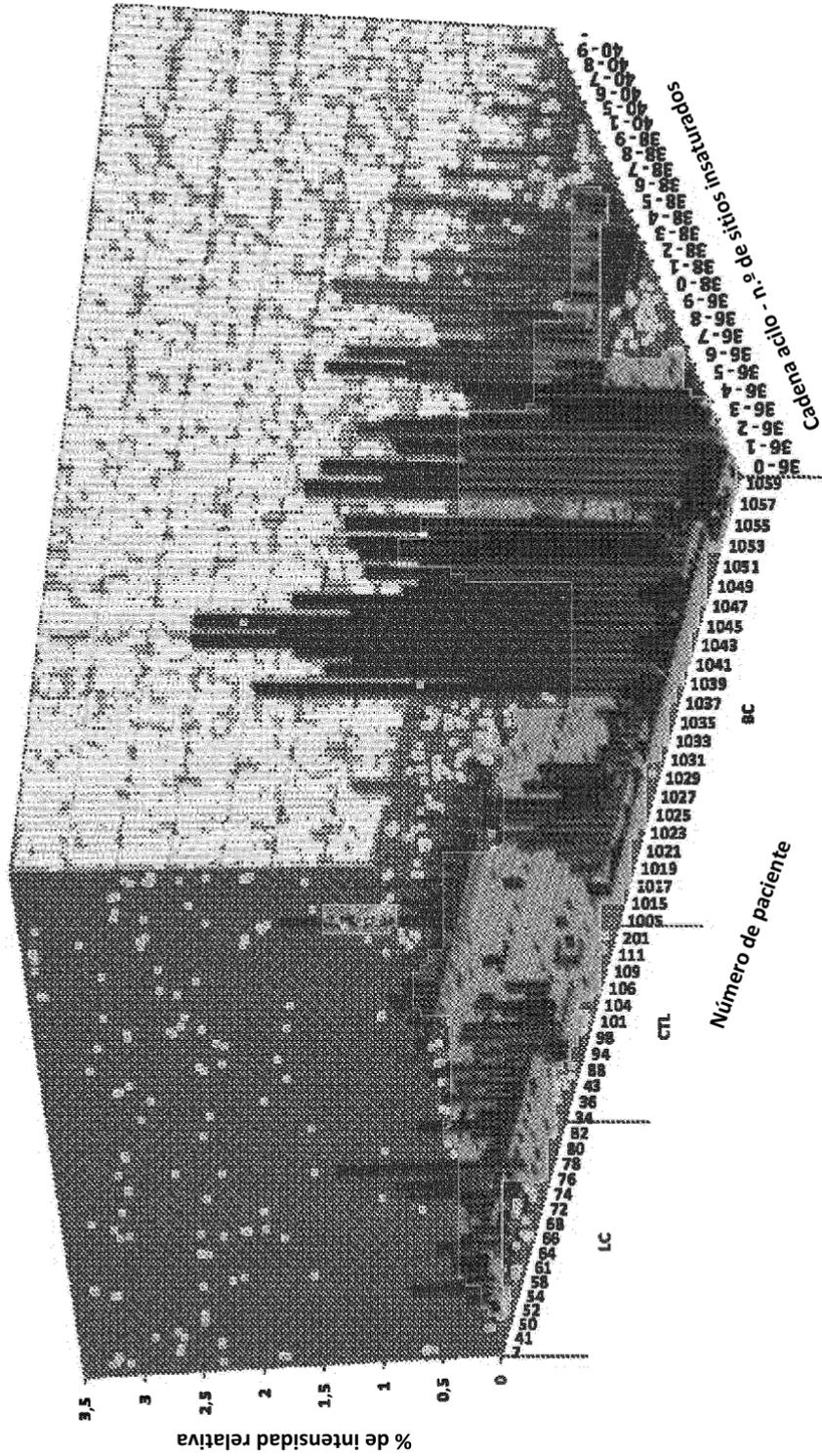


Figura 3

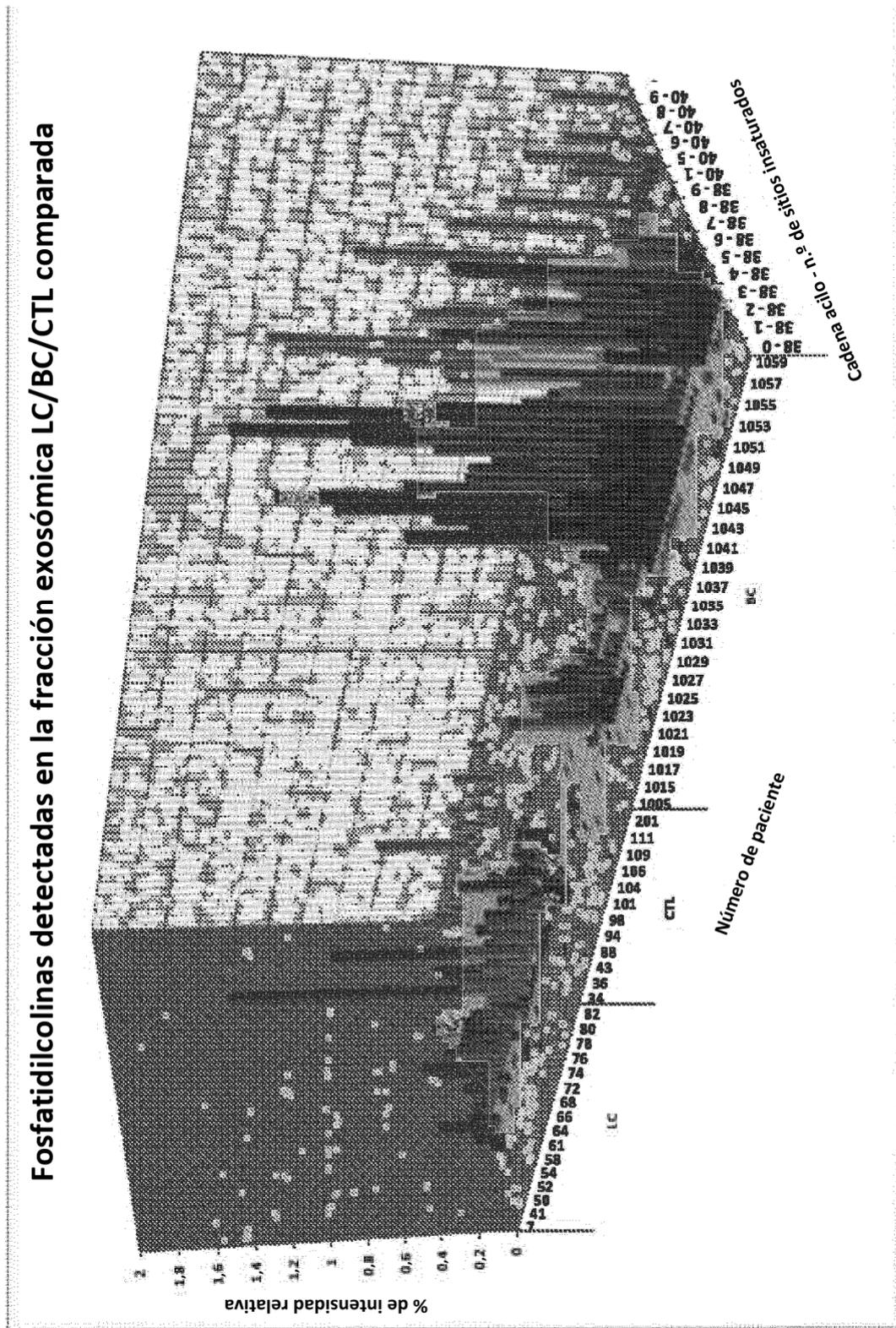


Figura 4

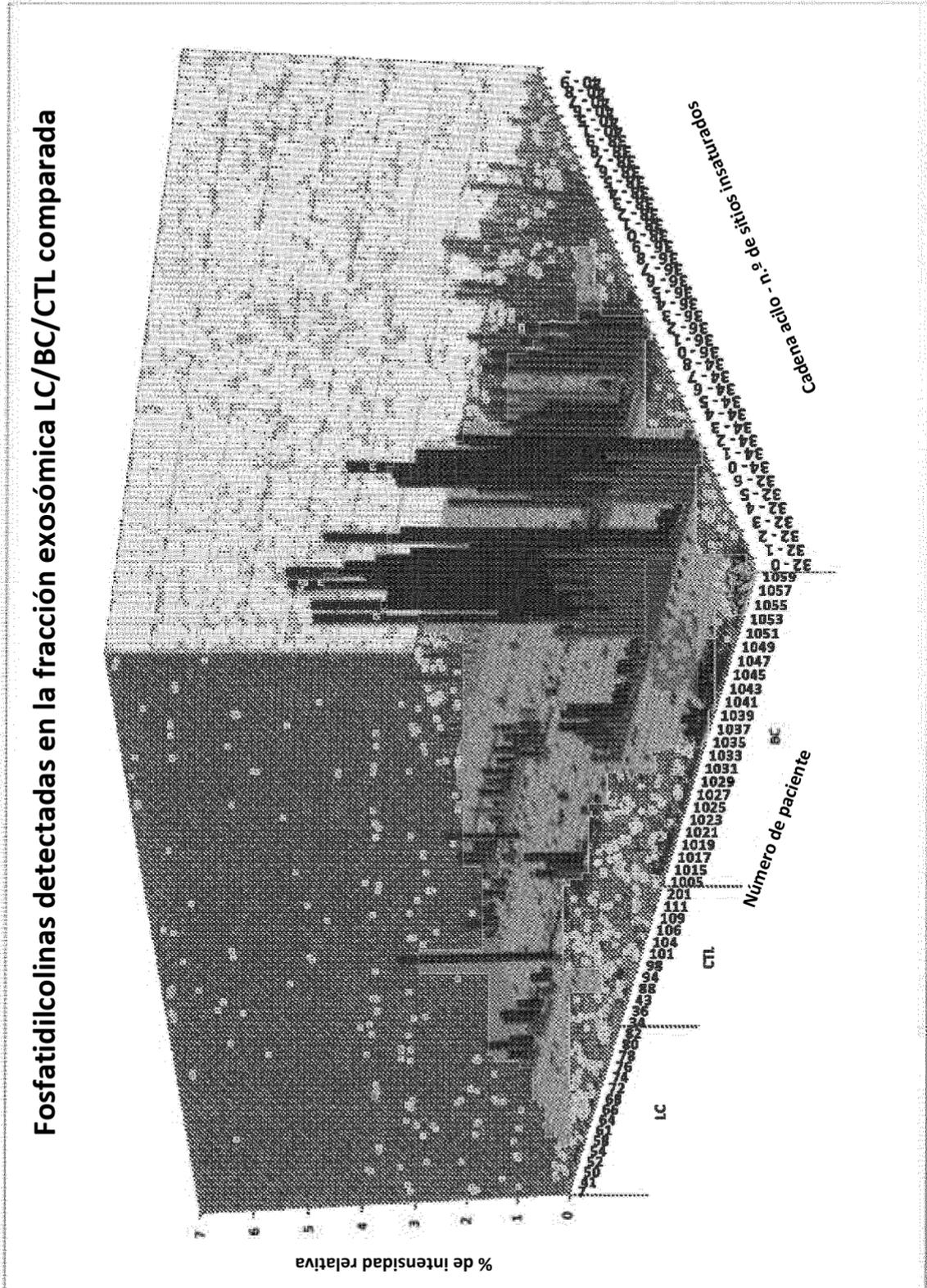


Figura 5

Fosfatidilcolinas detectadas en la fracción exosómica LC/BC/CTL comparada

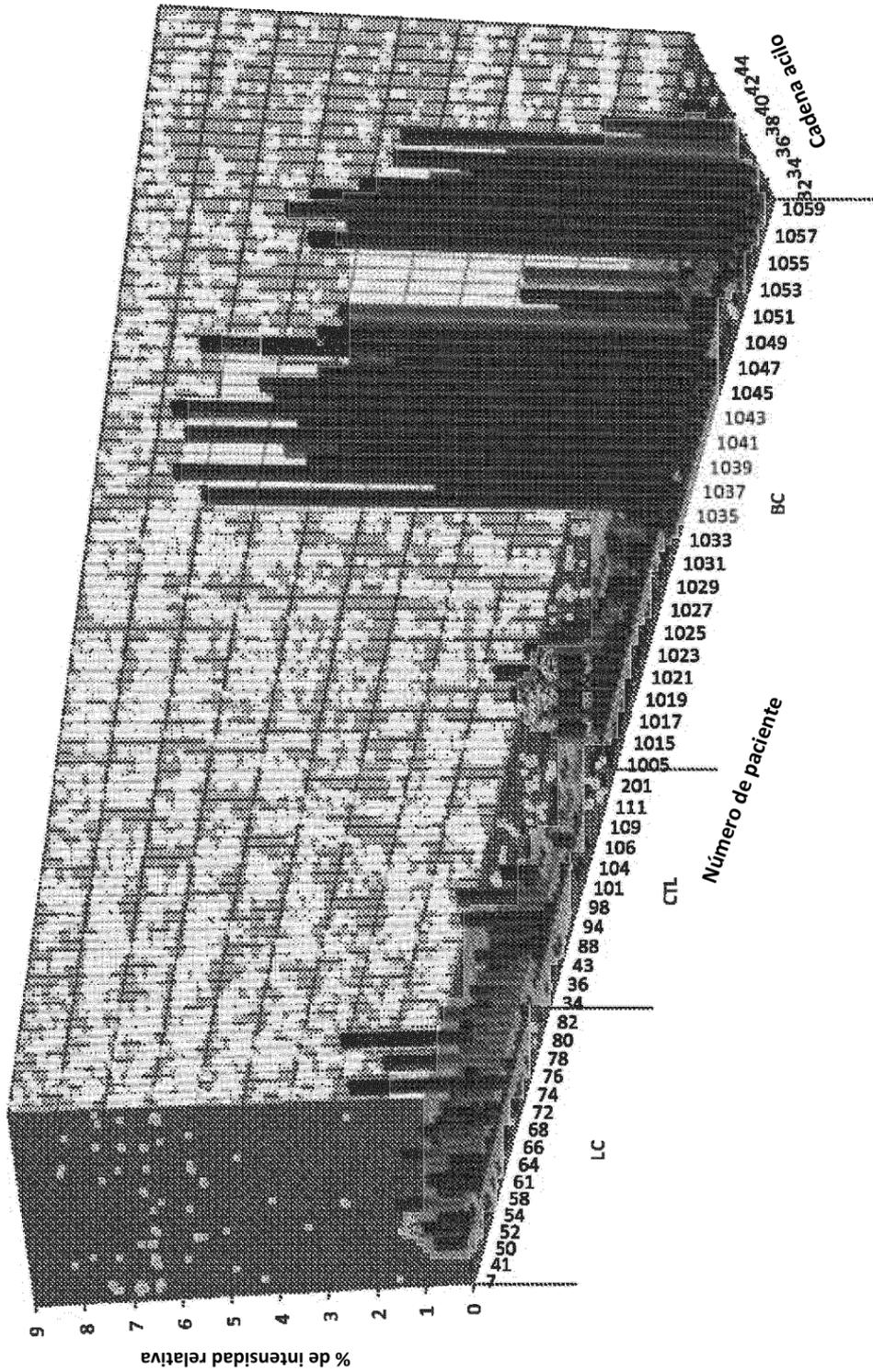


Figura 6

Fosfatidilcolinas detectadas en la fracción exosómica LC/BC/CTL comparada

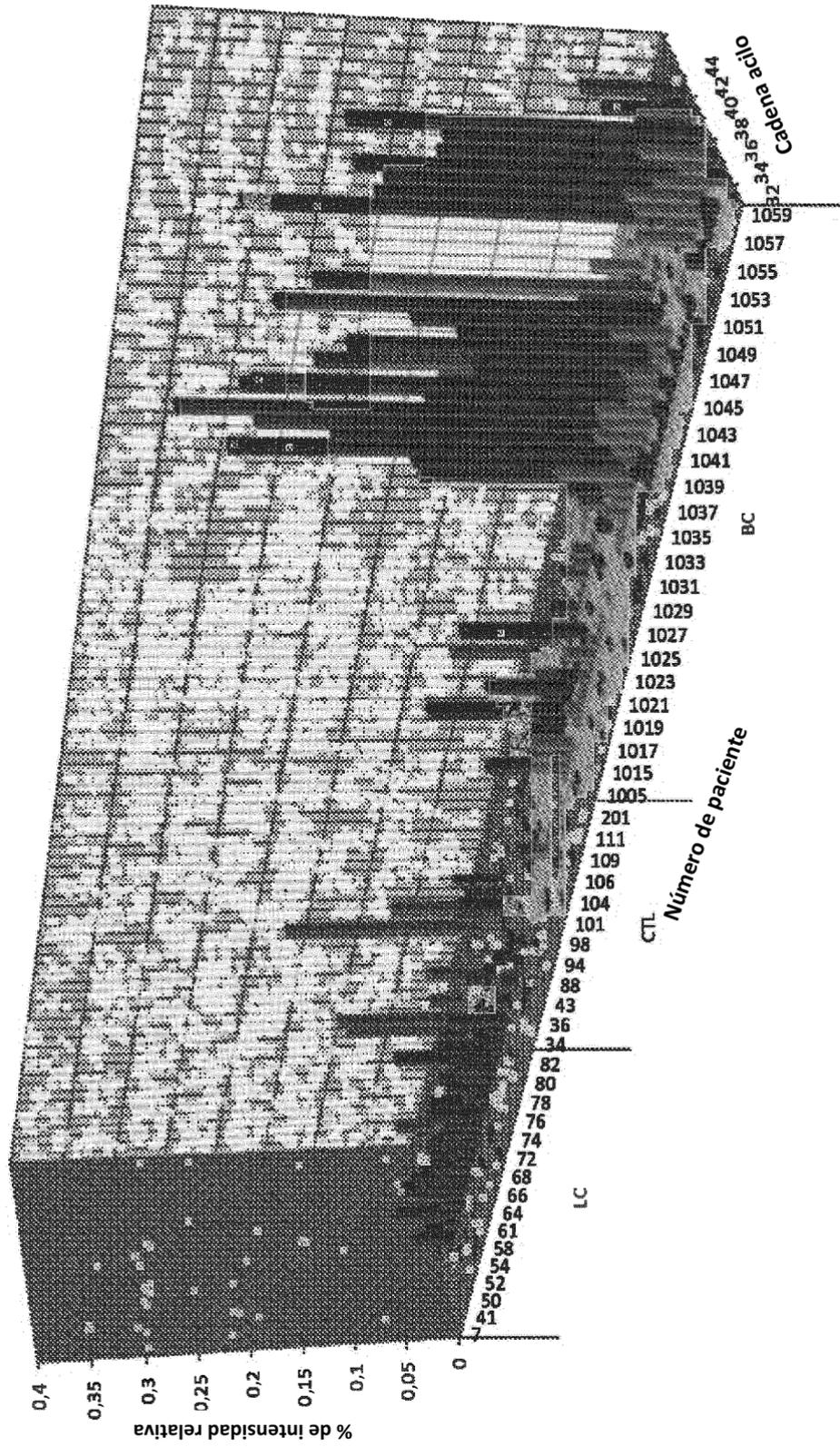


Figura 7

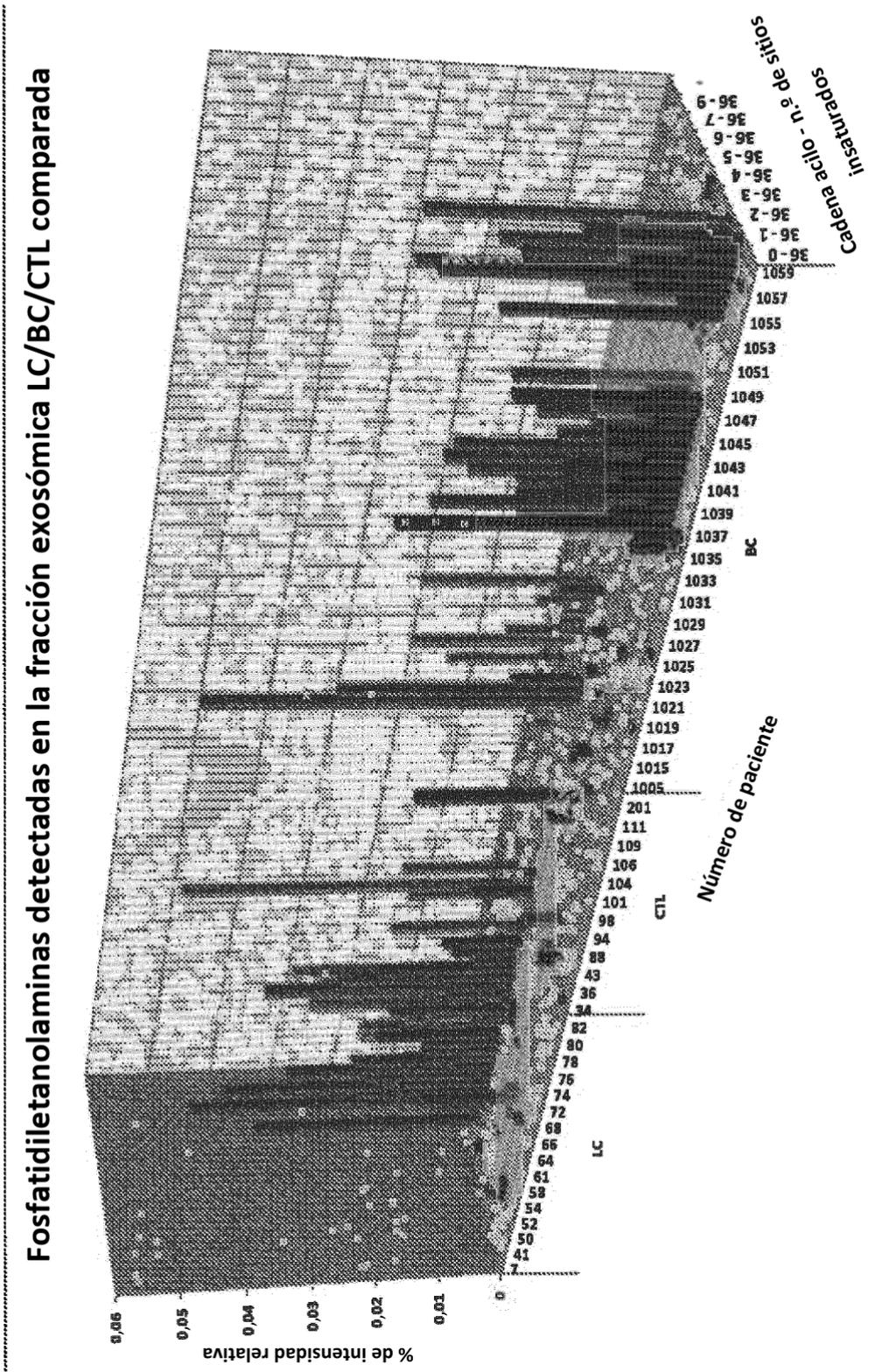


Figura 8

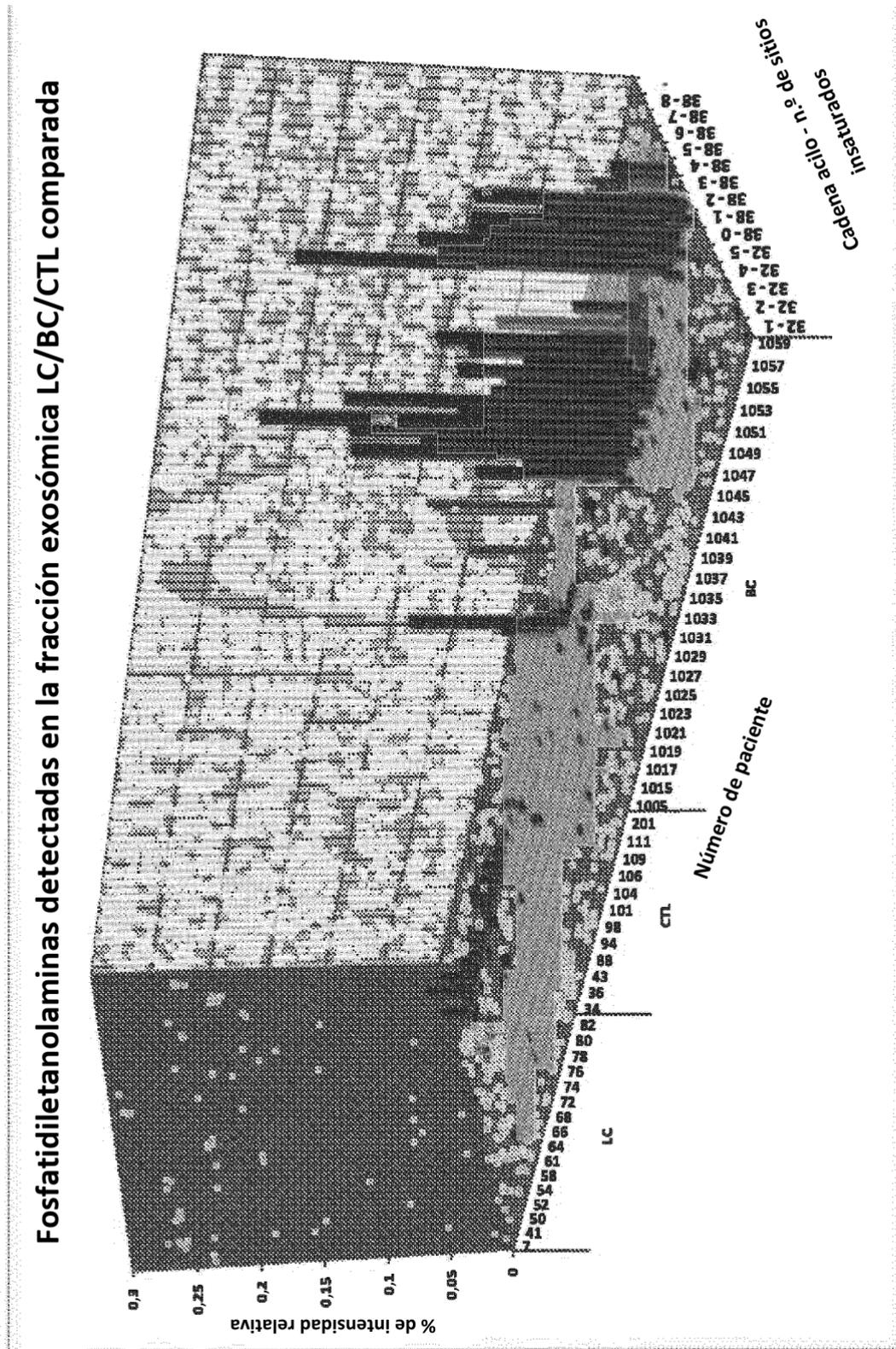


Figura 9

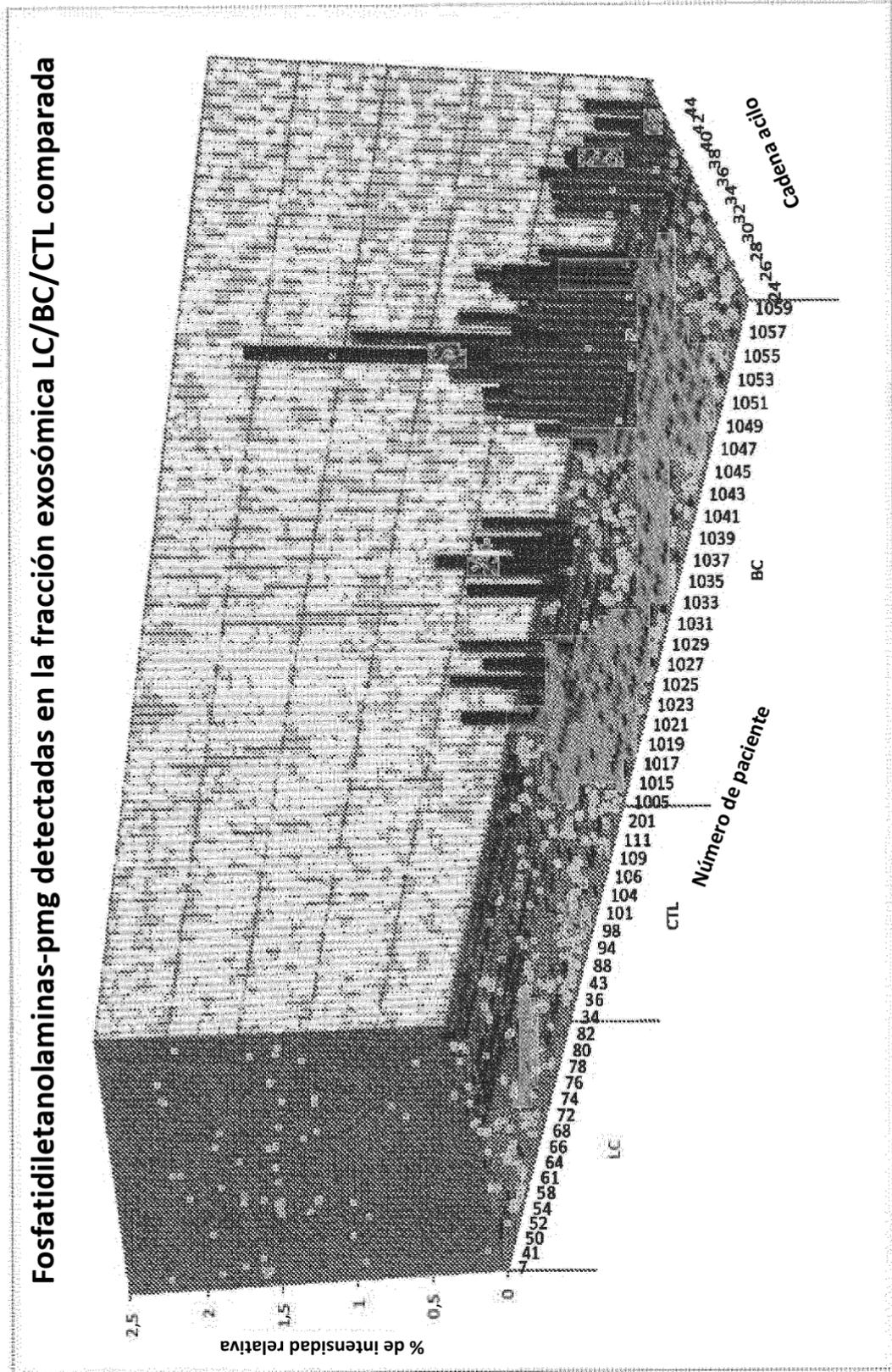


Figura 10

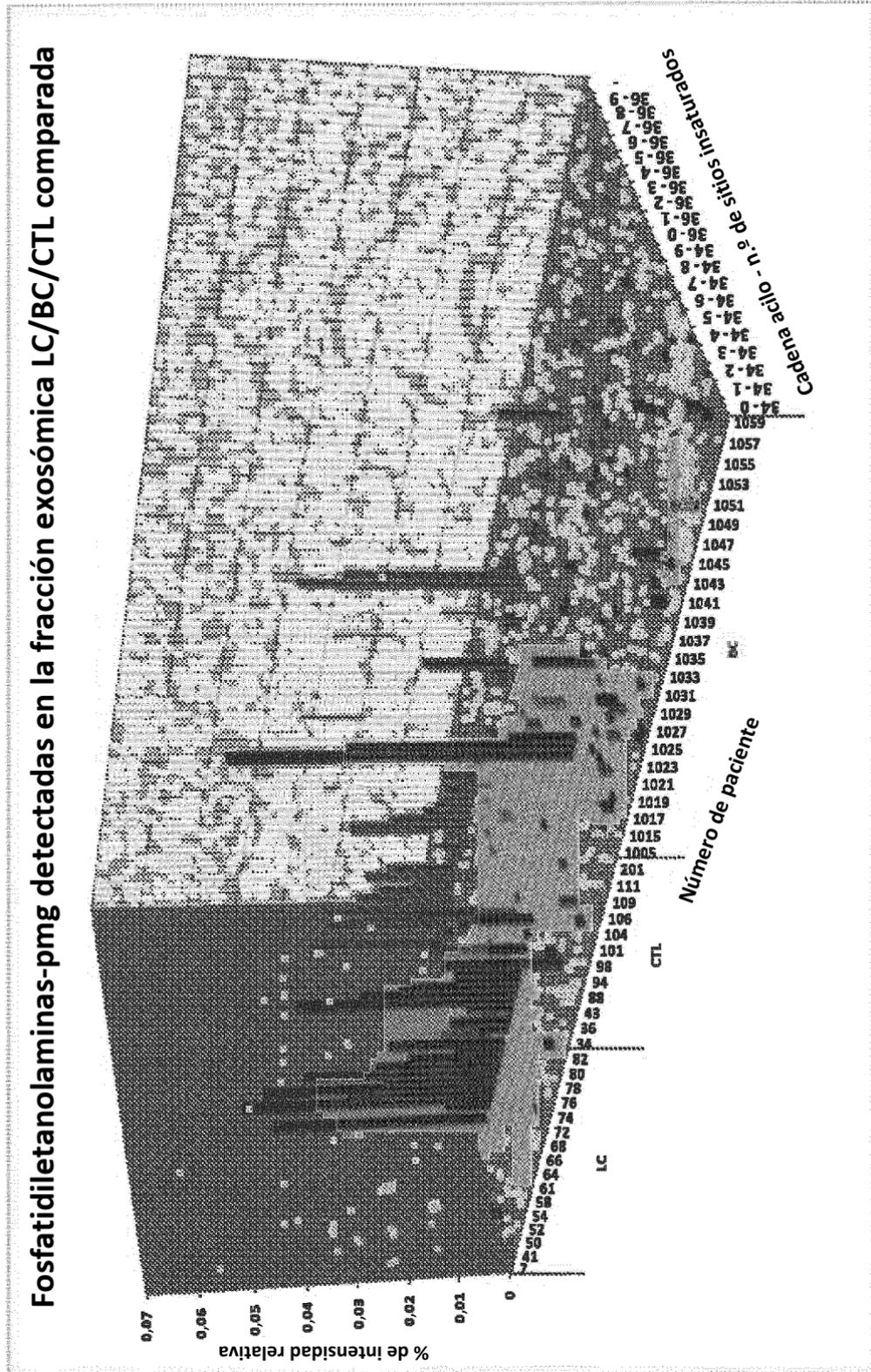


Figura 11

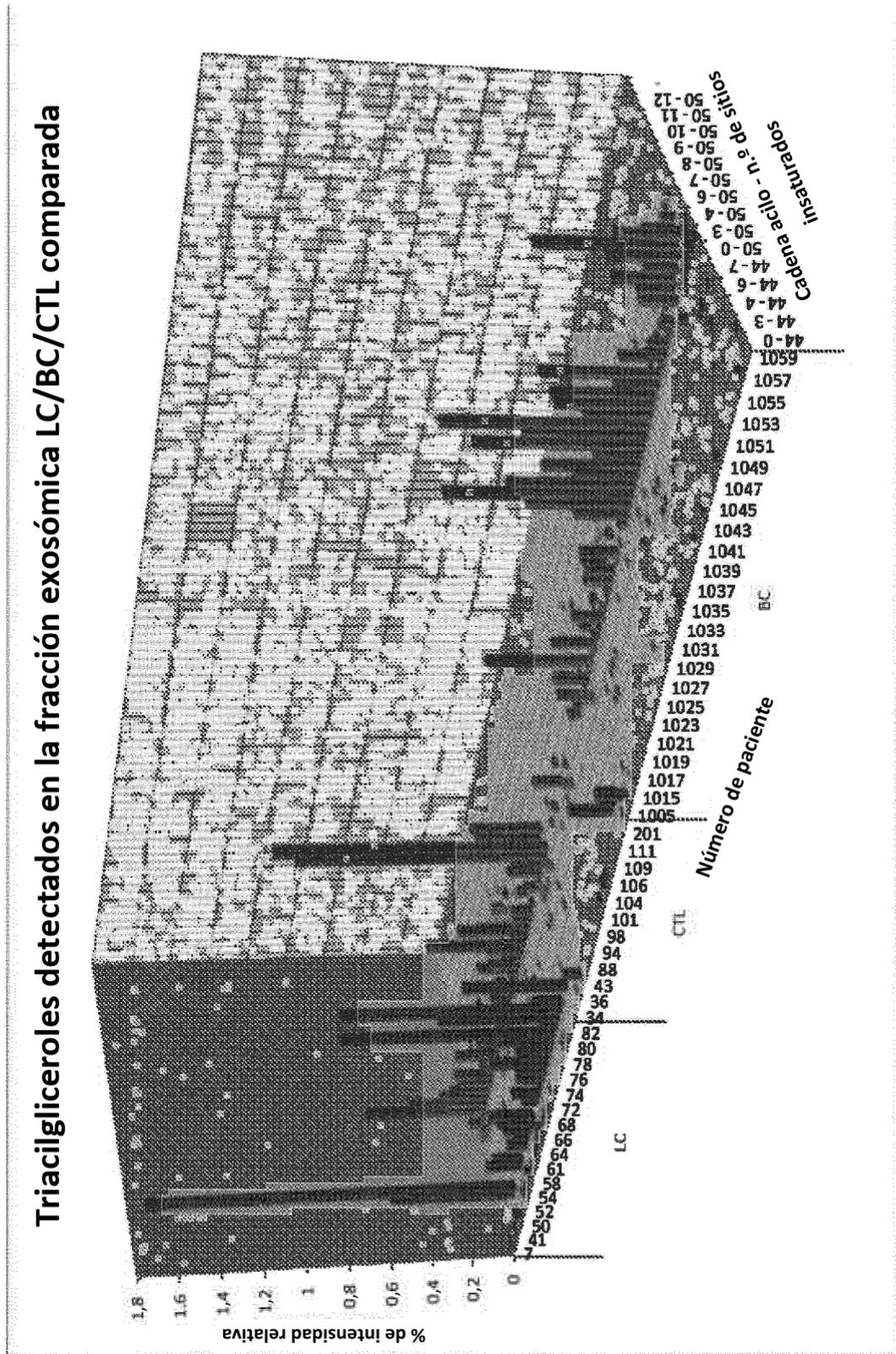


Figura 12

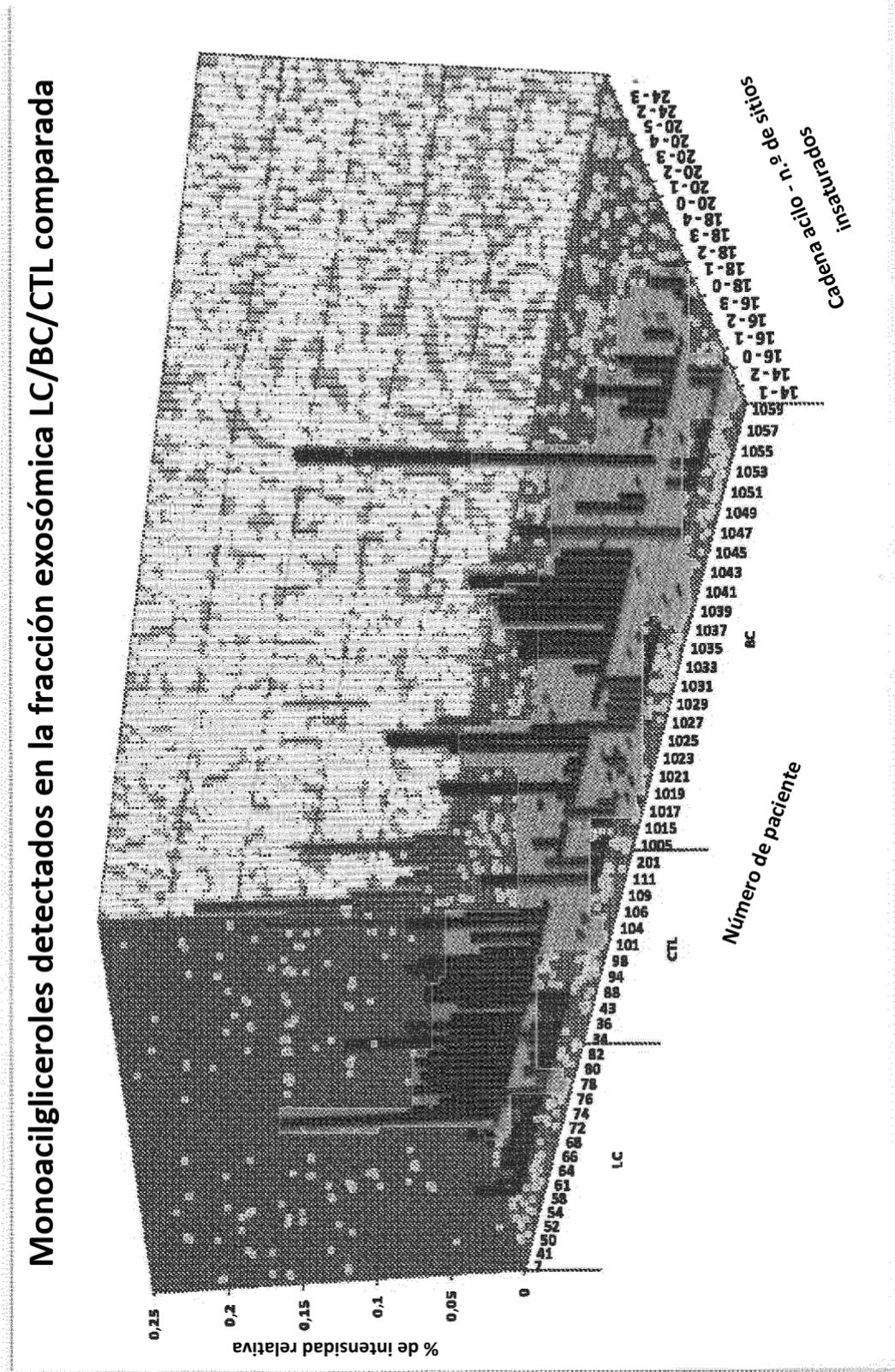


Figura 13

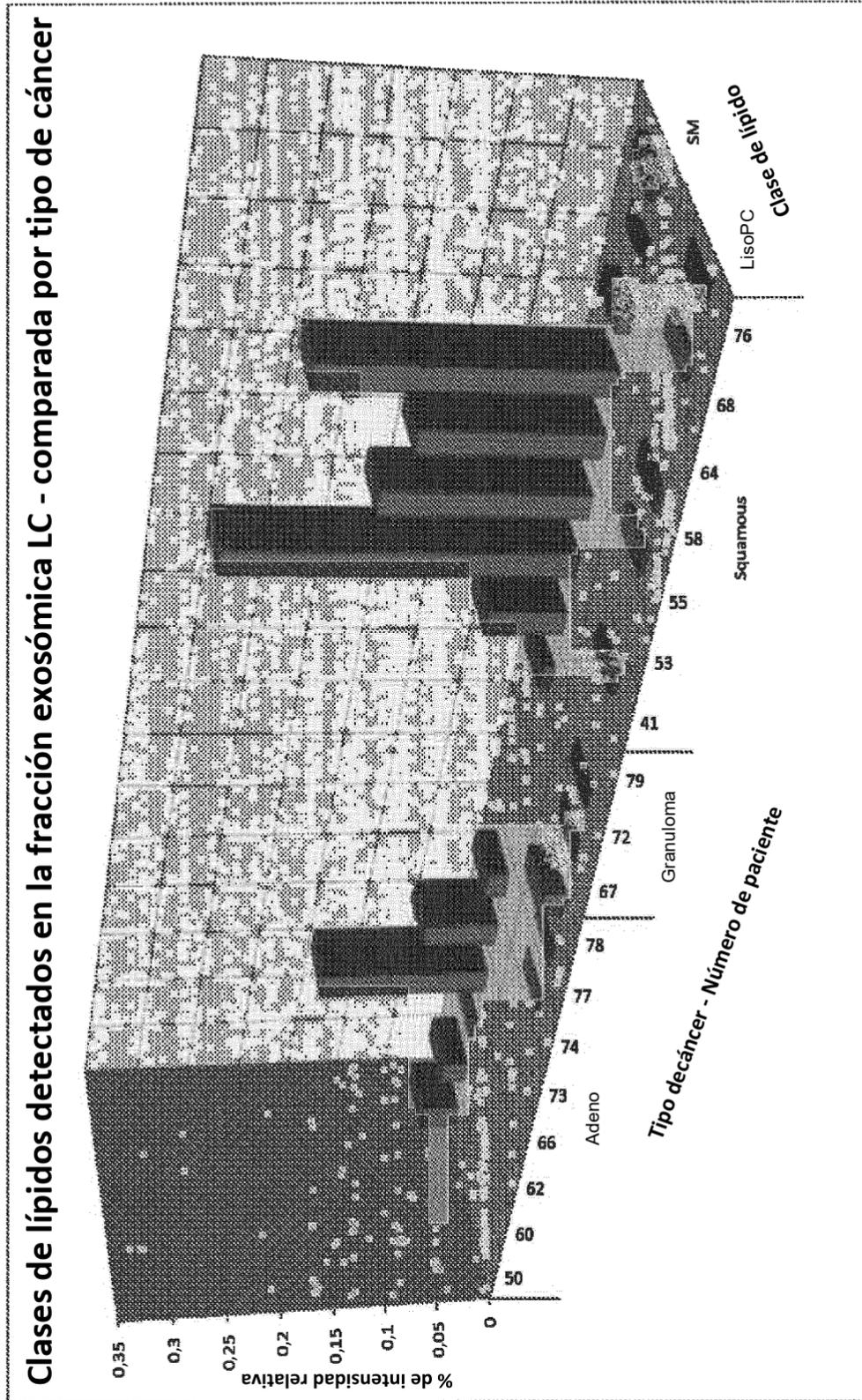


Figura 14

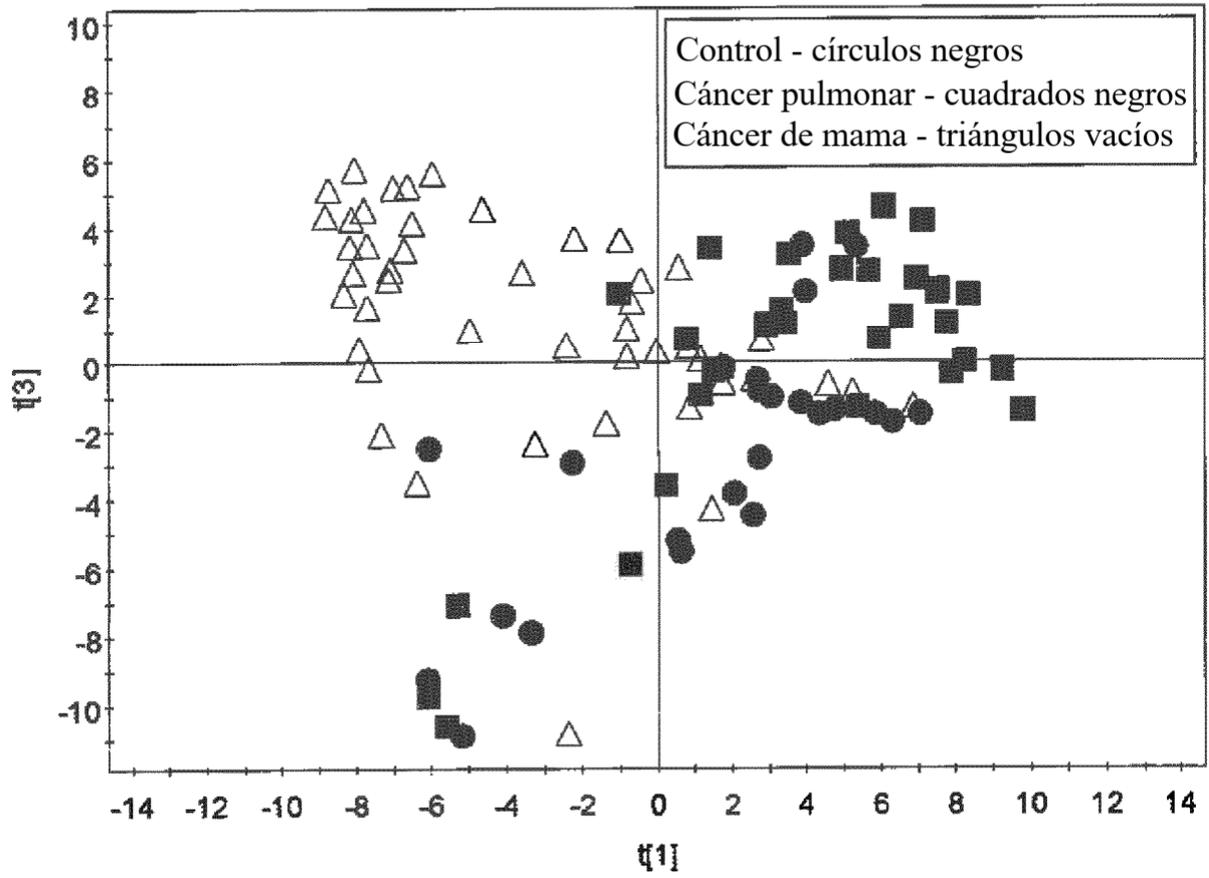


Figura 15

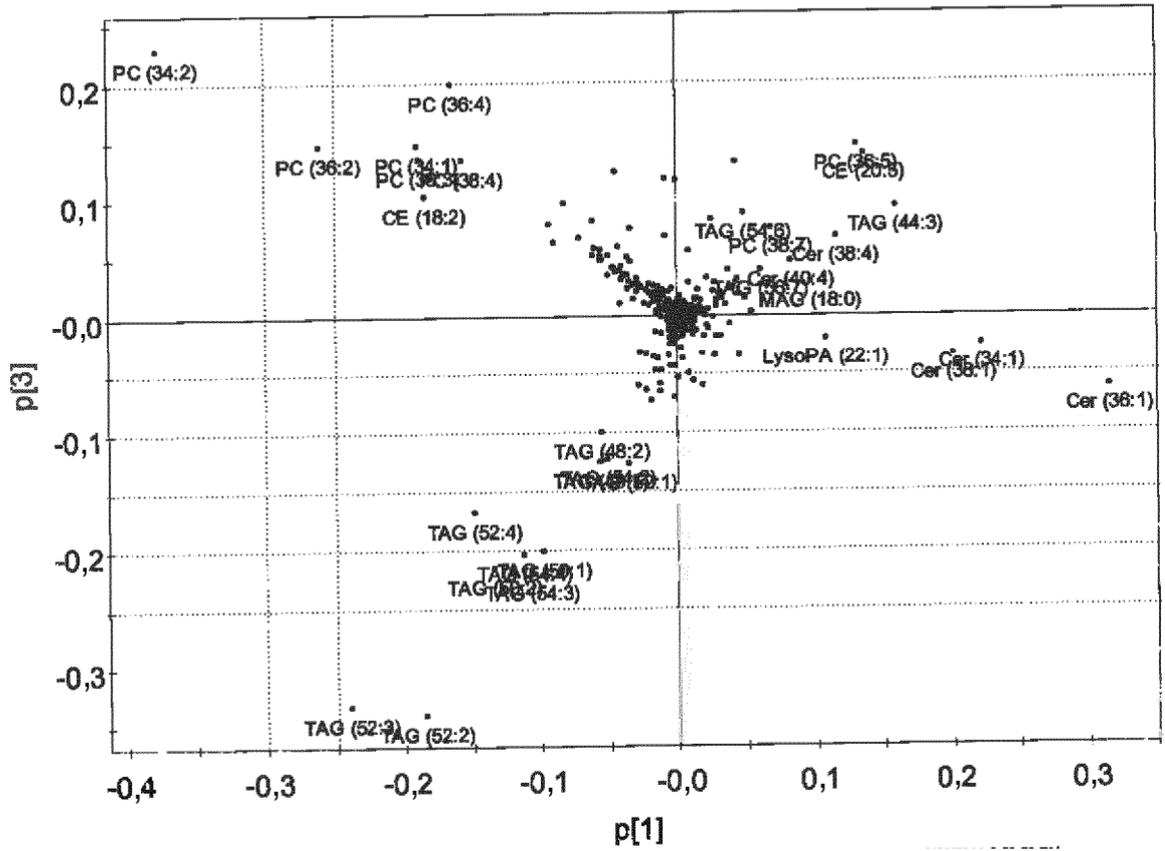


Figura 16

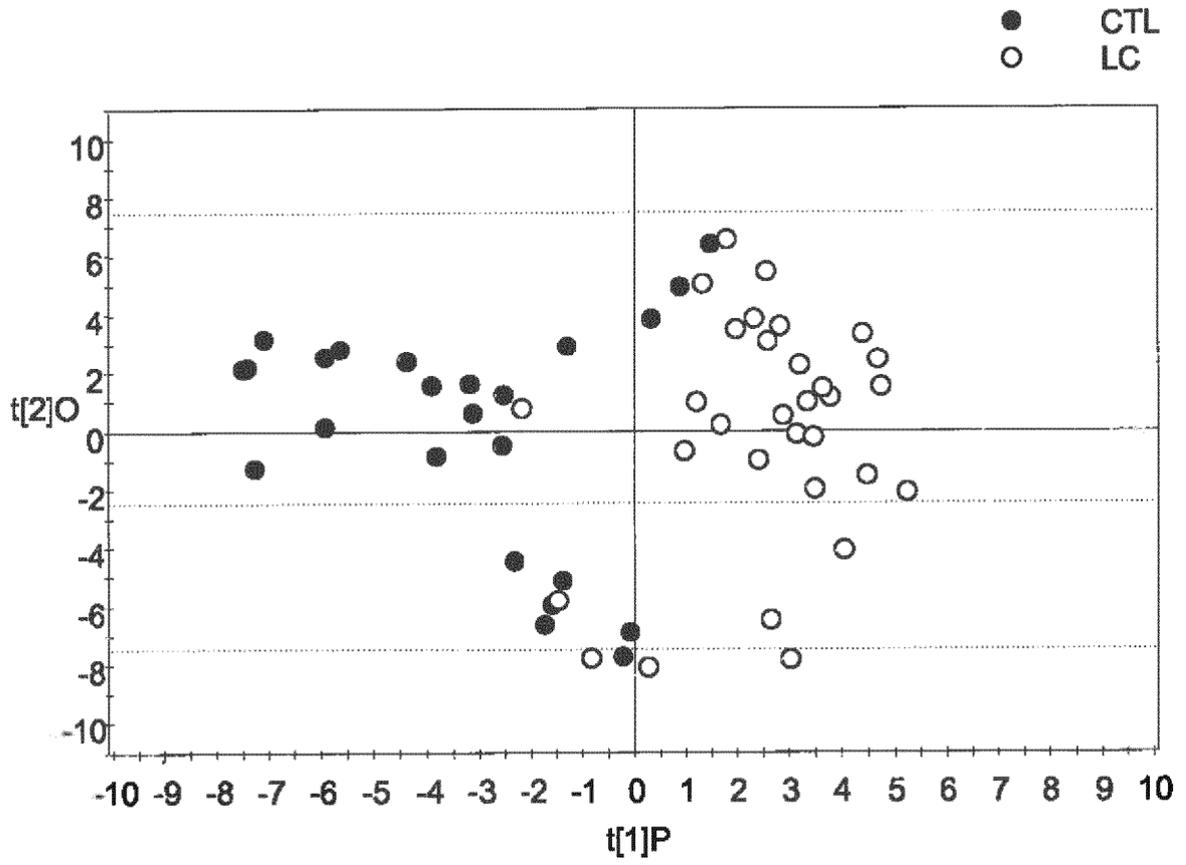
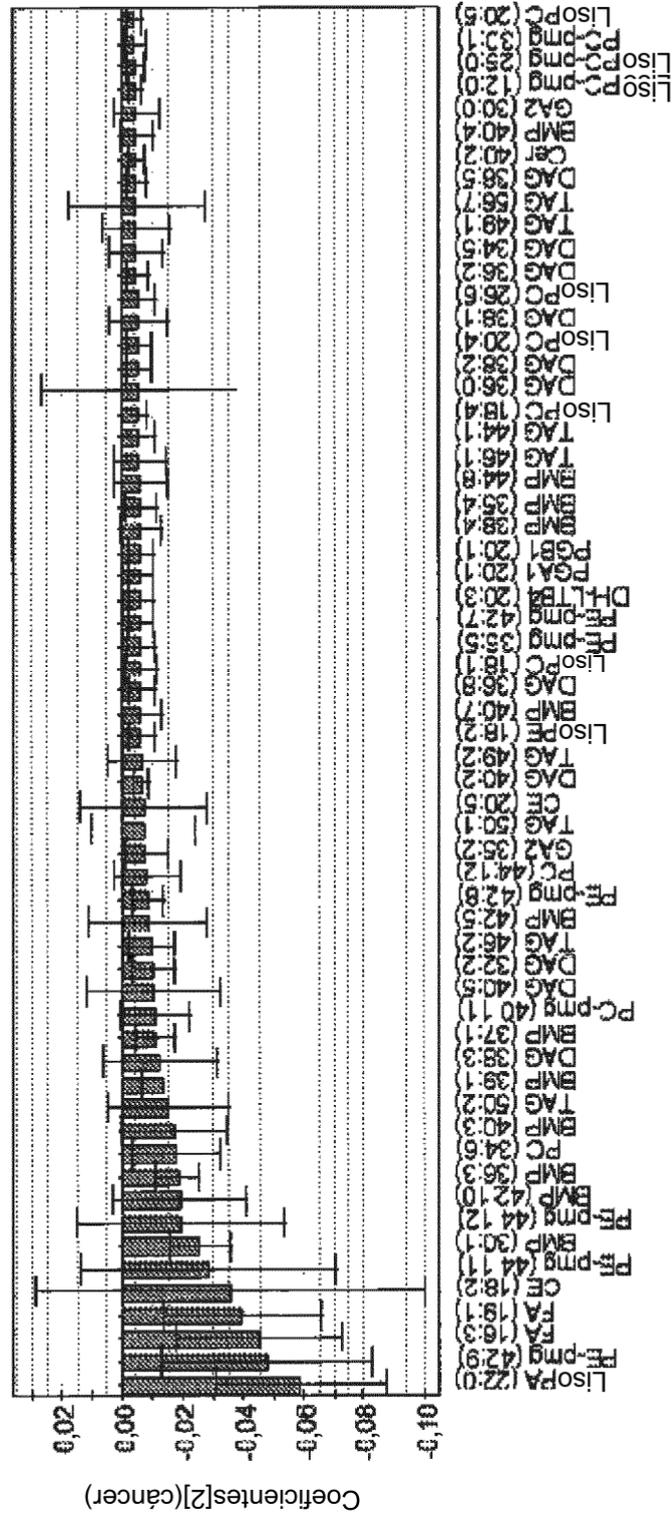


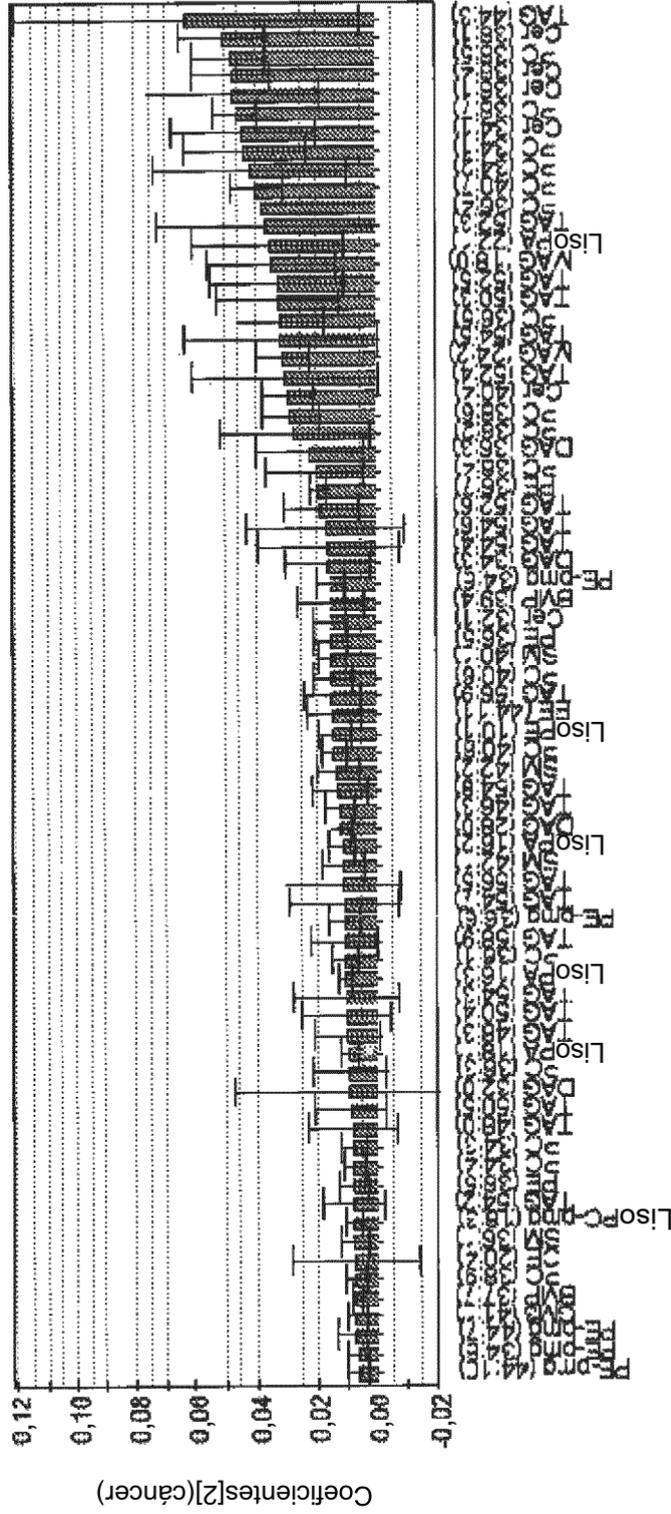
Figura 17



ID var. (primario)

SINCA-P 11.5 - 02/2011 12:08:46 PM

Figura 18



ID var. (primario)

SIMCA-P 11.5 - E2/2011 12:08:14 PM

Figura 19

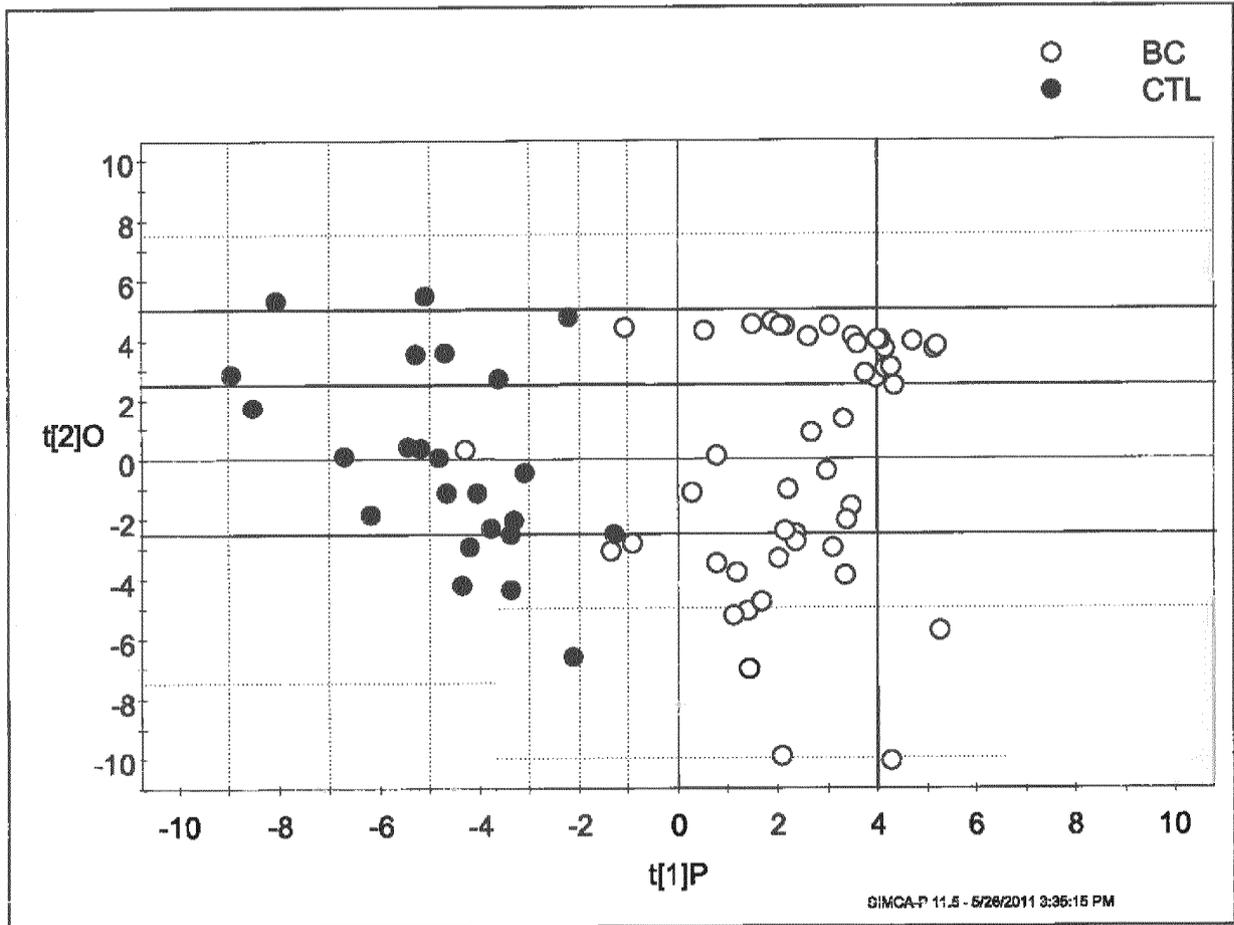
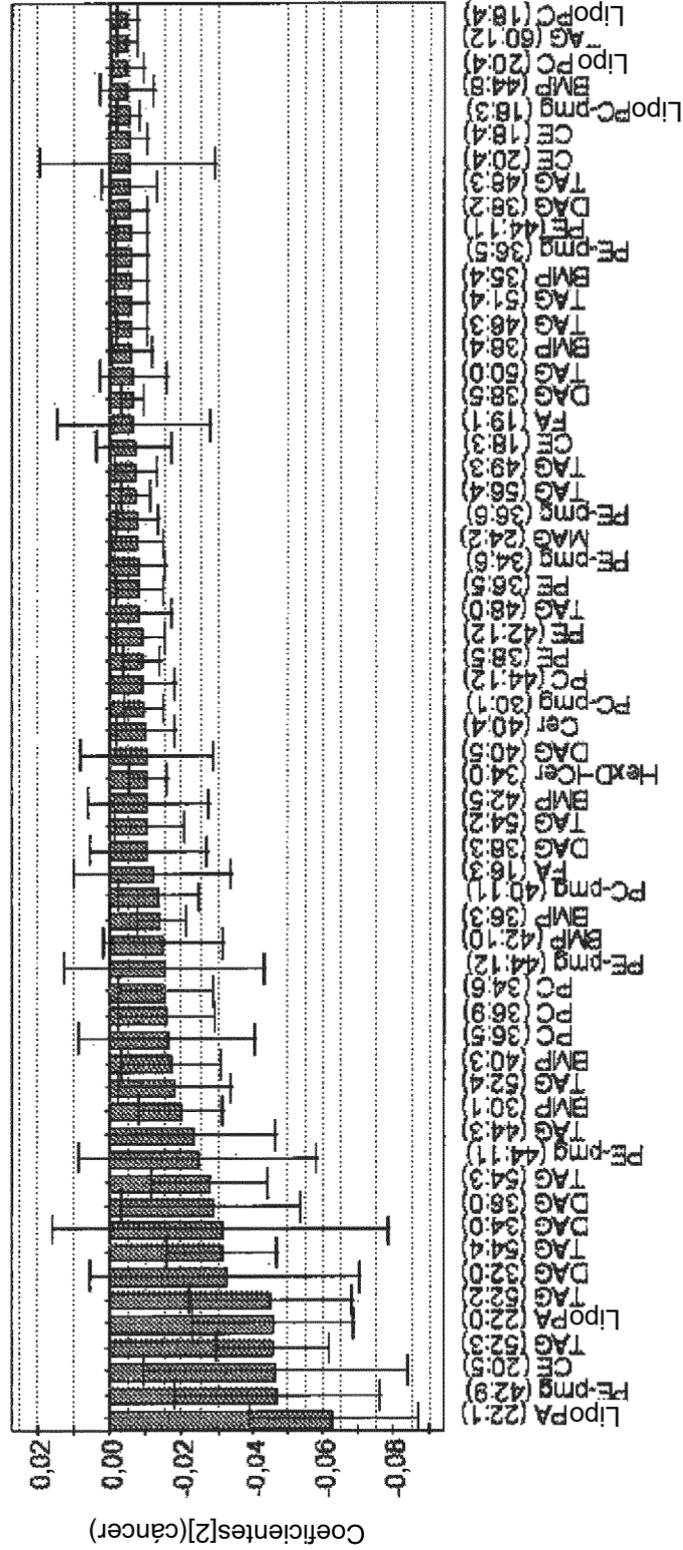


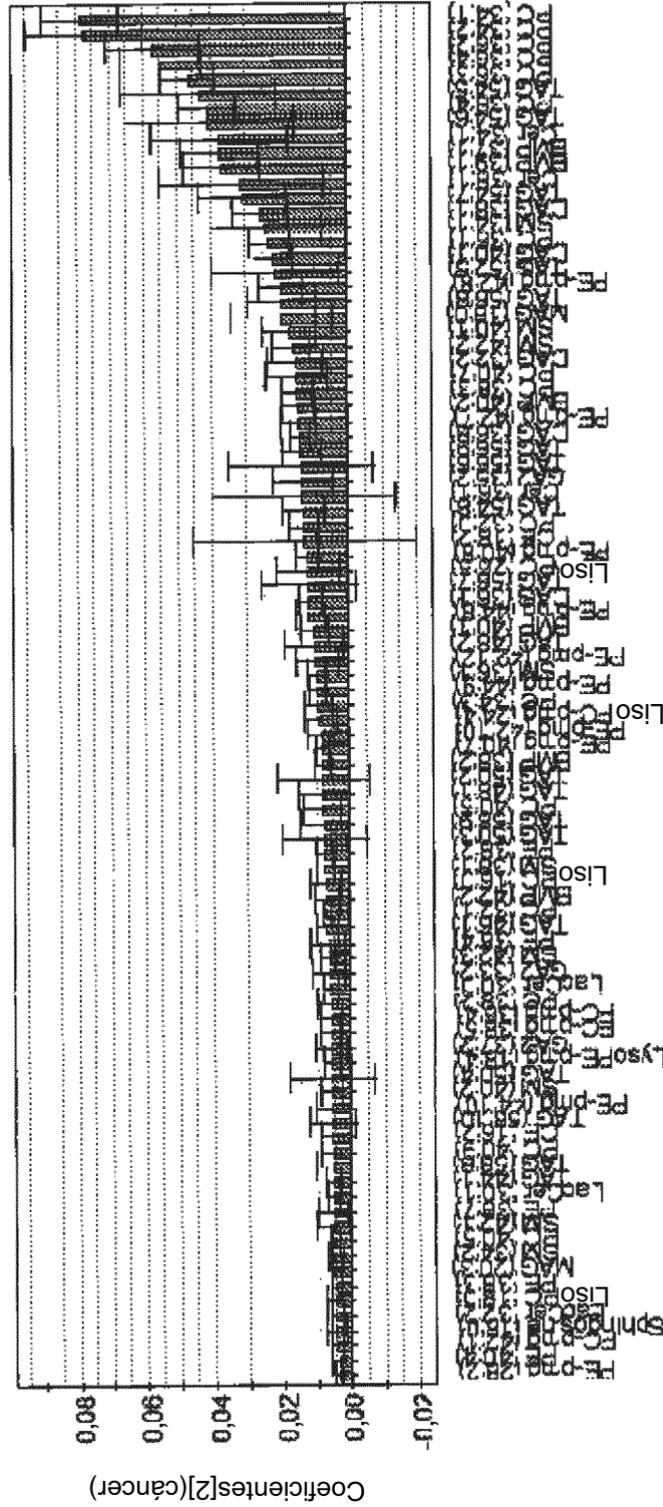
Figura 20



ID var. (primario)

SIMCA-P 11.5 - 6/2/2011 12:28:02 PM

Figura 21



ID var. (primario)

SIMCA-P 11.5 - 6/2/2011 12:25:33 PM

Figura 22

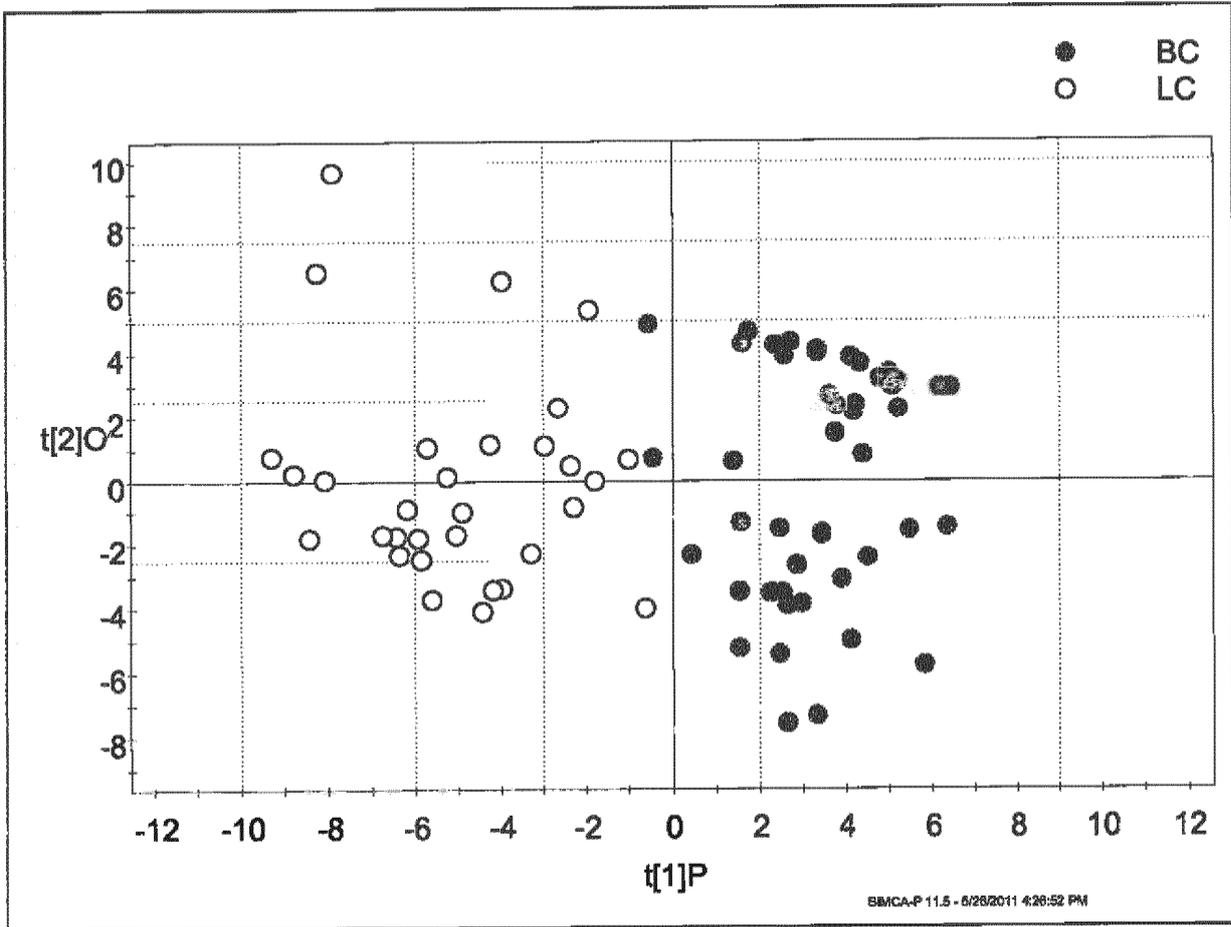
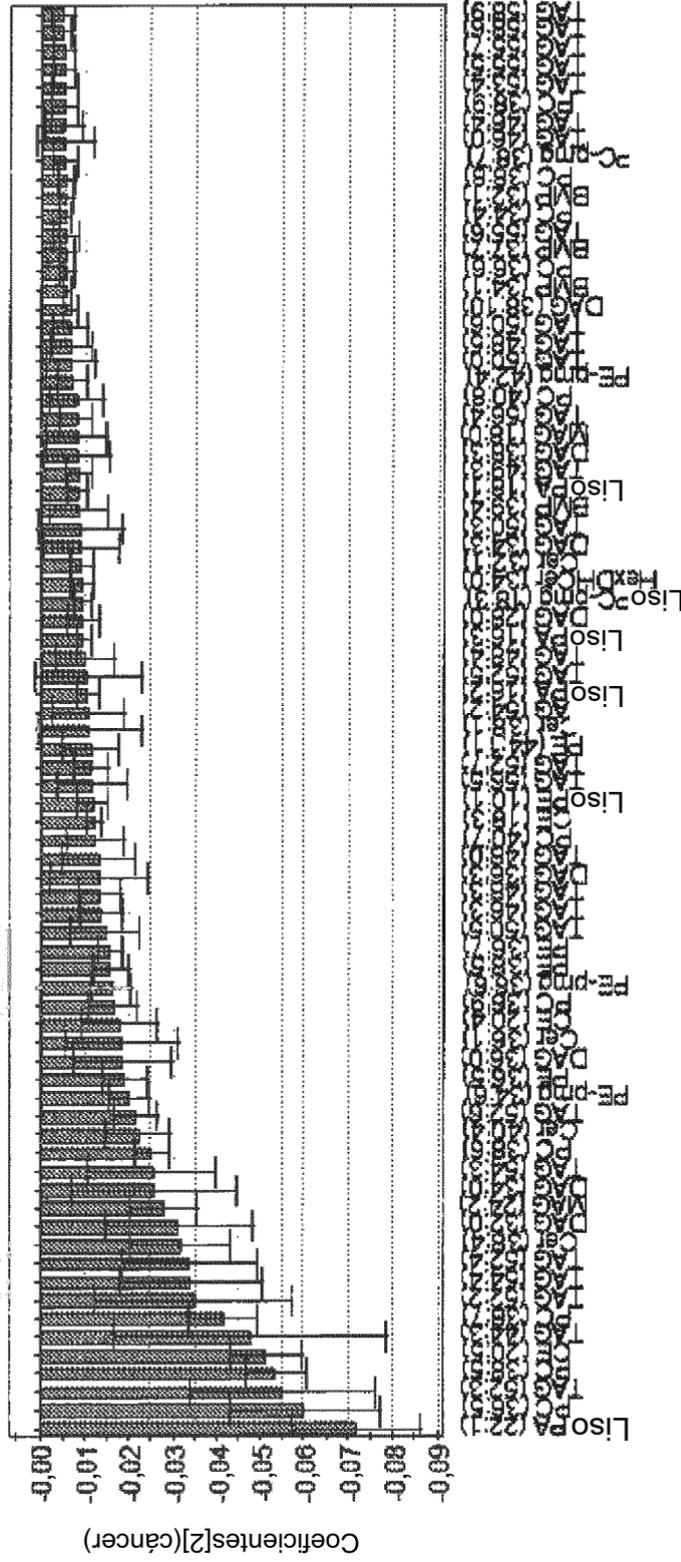
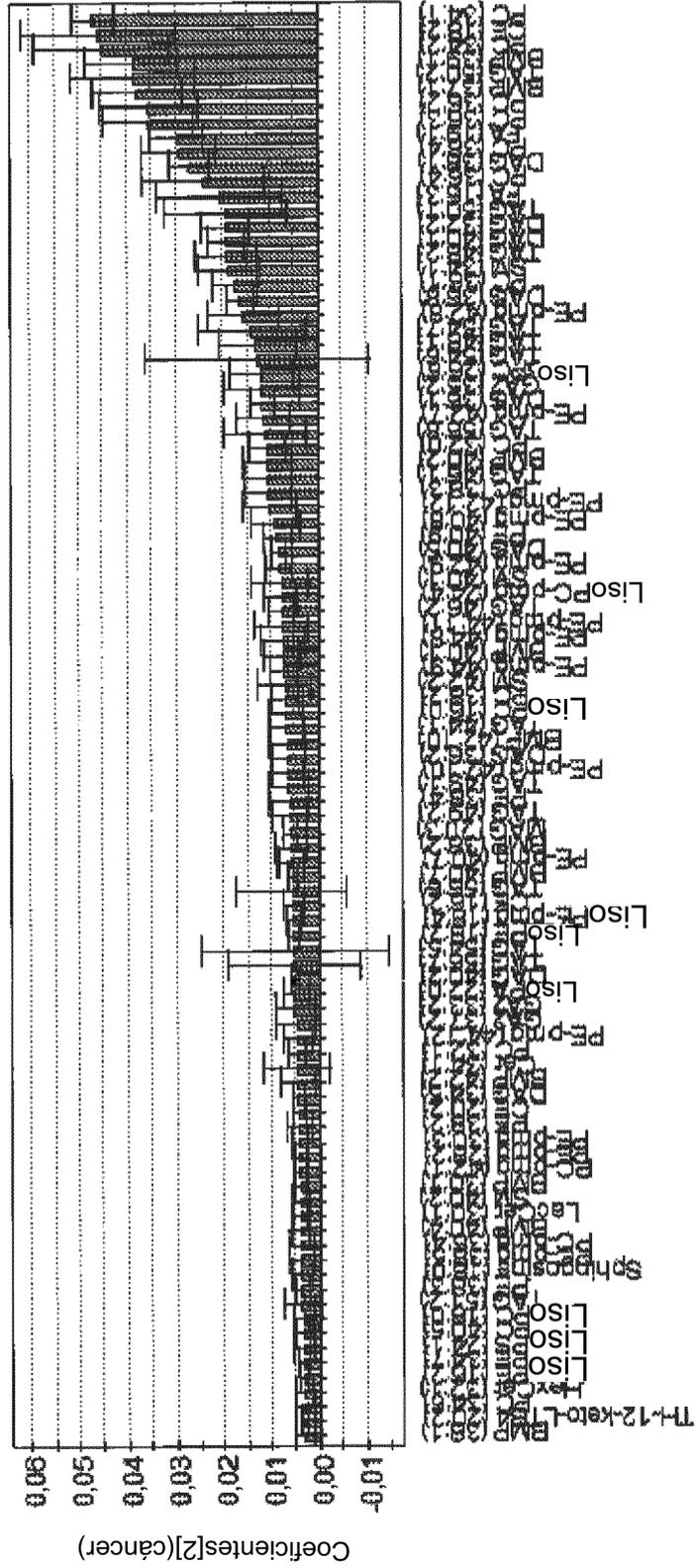


Figura 23



ID var. (primario) SIMCA-P 11.5 - 6/2/2011 12:55:06 PM

Figura 24



ID var. (primario)

SIMCA-P 11.5 - 8/23/2011 12:58:38 PM

Figura 25

