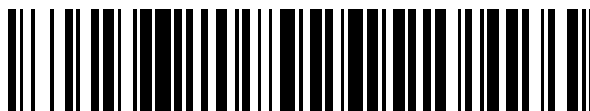


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 160**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/497** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2010 E 10705440 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2376913**

54 Título: **Detección del cáncer a través del aliento que comprende un conjunto de sensores que comprenden nanopartículas conductoras recubiertas**

30 Prioridad:

**09.01.2009 US 143413 P**

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

**09.09.2016**

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT  
FOUNDATION LTD. (100.0%)  
Senate House, Technion City  
32000 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**HAICK, HOSSAM;  
GANG, PENG y  
ADAMS, ORNA**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 582 160 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

Detección del cáncer a través del aliento que comprende un conjunto de sensores que comprenden nanopartículas conductoras recubiertas.

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un conjunto de sensores de nanopartículas de oro conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico para detectar el cáncer.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El análisis de aliento se ha reconocido como una técnica fiable para diagnosticar ciertas afecciones médicas a través de la detección de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en el aliento exhalado. El diagnóstico se realiza normalmente recogiendo muestras de aliento en un recipiente seguido de mediciones posteriores de VOC específicos usando espectrometría de masas.

15

La composición de los VOC en aliento exhalado depende de los procesos metabólicos celulares e incluye, entre otros, hidrocarburos saturados e insaturados, compuestos que contienen oxígeno, compuestos que contienen azufre, y compuestos que contienen nitrógeno. En individuos sanos, la composición proporciona una firma química distinta con una variabilidad relativamente estrecha entre muestras de un único individuo y muestras de diferentes individuos.

20

En el aliento exhalado de pacientes con cáncer, se encontraron niveles elevados de ciertos VOC incluyendo, compuestos alcano C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> volátil, alcanos monometilados específicos, así como derivados de benceno (Phillips y col., *Cancer Biomark.*, 3(2), 2007, 95). Por lo tanto, la composición de VOC en el aliento exhalado de pacientes con cáncer difiere de la de individuos sanos y, por lo tanto, puede usarse para diagnosticar el cáncer. Una ventaja adicional para el diagnóstico del cáncer a través del aliento es la no invasividad de la técnica que tiene el potencial para la investigación a gran escala.

25

30

Actualmente se han aplicado dispositivos de detección de gas para la detección de VOC en muestras de aliento de pacientes de cáncer. Dichos dispositivos realizan una detección de olor a través del uso de un conjunto de sensores de reacción cruzada junto con métodos de reconocimiento de patrones. A diferencia del modelo de "cerradura", cada sensor en el dispositivo de nariz electrónica es ampliamente sensible a una diversidad de olores. En esta arquitectura, cada analito produce una huella clara de un conjunto de sensores de amplia reacción cruzada. Esta configuración puede usarse para ampliar considerablemente la diversidad de compuestos a los que una matriz dada es sensible, para aumentar el grado de identificación de componentes y, en casos concretos, realizar un análisis de los componentes individuales en medios (bio) químicos multicomponentes complejos. Después, pueden aplicarse algoritmos de reconocimiento de patrones a todo el conjunto de señales, obtenidas simultáneamente de todos los sensores en la matriz, con el fin de obtener información sobre la identidad, y la concentración del vapor expuesto para el conjunto de sensores.

35

40

Los dispositivos de detección de gas usados hasta ahora comprenden una diversidad de conjuntos de sensor, incluyendo polímeros conductores, compuestos de polímero no conductor/negro de humano, semiconductores de óxido de metal, tinte fluorescente/sistemas poliméricos, sensores de microbalanza de cuarzo recubiertos con metaloporfirinas, dispositivos de onda acústica de superficie recubiertos con polímero, y tintes quimiosensibles (Mazzone, J. *Thoracic Onc.*, 3(7), 2008, 774). Di Natale y col. (*Biosen. Bioelec.*, 18, 2003, 1209) desvelaron el uso de ocho sensores de gas de microbalanza de cuarzo recubiertos con diferentes metaloporfirinas para analizar la composición del aliento de pacientes con cáncer de pulmón. Chen y col. (*Meas. Sci. Technol.*, 16, 2005, 1535) usaron un par de sensores de onda acústica de superficie (SAW), uno recubierto con una película fina de poliisobutileno (PIB), para detectar VOC como marcadores para cáncer de pulmón. Machado y col. (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 171, 2005, 1286) demostraron el uso de un dispositivo de detección química gaseosa que comprende un sistema de sensor de polímero de carbono con 32 sensores separados para diagnosticar cáncer de pulmón. Mazzone y col. (*Torax*, 62, 2007, 565) desvelaron un conjunto de sensores colorimétricos compuesto por compuestos químicamente sensibles impregnados en un cartílago desechable para analizar muestras de aliento de individuos con cáncer de pulmón y otras enfermedades de los pulmones. Los resultados presentados en estas divulgaciones aún tienen que proporcionar la precisión o consistencia requerida para su uso clínico.

50

55

Los sensores basados en películas compuestas por nanopartículas recubiertas con un revestimiento orgánico

("NPCOC") se aplicaron como quimiorresistores, microbalanza de cristal de cuarzo, sensores electroquímicos y similares. Las ventajas de los NPCOC para aplicaciones de detección surgen de señales de detección mejoradas que pueden manipularse fácilmente a través de la variación de las nanopartículas y/o el tamaño de los agregados, la distancia entre partículas, la composición y la periodicidad. Puede conseguirse adicionalmente una mejor selectividad a través de la modificación de las características de unión de la película de recubrimiento, así como las moléculas enlazadoras. Se demostró que la morfología y el espesor de las redes de NPCOC inducían una notable influencia sobre la respuesta del detector, donde los cambios en la permitividad indujeron un descenso en la resistencia de películas más finas de NPCOC (Joseph y col., J. Phys. Chem. C, 112, 2008, 12507). El conjunto tridimensional de estructuras de NPCOC proporciona un marco adicional para las ampliaciones de señal. Otras ventajas surgen del acoplamiento de nano-estructuras a sustratos en estado sólido que permiten una fácil integración de matrices, respuestas rápidas, y aparatos portátiles accionados por baja energía.

Algunos ejemplos para el uso de NPCOC para aplicaciones de detección se desvelan en las Patentes de Estados Unidos N° 5.571.401, 5.698.089, 6.010.616, 6.537.498, 6.746.960, 6.773.926; las Solicitudes de Patente N° WO 00/00808, FR 2.783.051 US 2007/0114138; y en Wohltjen y col. (Anal. Chem., 70, 1998, 2856), y Evans y col. (J. Mater. Chem., 8, 2000, 183). En particular, el documento US 6.773.926 desvela conjuntos de sensores para detectar un analito químico en un fluido, cuyo conjunto incluye una pluralidad de partículas que tienen un núcleo metálico (por ejemplo, oro) y un ligando acoplado a dicho núcleo. Contrariamente a la presente invención, las partículas del documento US 6.773.926 se polidispersan en el intervalo de de 1 a 100 nm.

La publicación de solicitud de patente internacional número WO 99/27357 desvela un artículo de fabricación adecuado para su uso en la determinación de si o en qué cantidad está presente una especie química en un entorno diana, cuyo artículo comprende una multiplicidad de partículas en una orientación de bloqueo, teniendo dichas partículas un núcleo de metal conductor o aleación de metal conductora, en cada una de dicha partícula teniendo tal núcleo de 0,8 a 40,0 nm de dimensión máxima, y en dicho núcleo una membrana de ligando del espesor de 0,4 a 4,0 nm, que es capaz de interactuar con dichas especies de tal forma que se altera una propiedad de dicha multiplicidad de partículas.

La patente de Estados Unidos N° 7.052.854 desvela sistemas y métodos para el análisis de diagnóstico *ex vivo* usando conjunto basados en nanoestructuras que comprenden una nanopartícula, un medio para detectar un analito/biomarcador diana, y un marcador sustituto. La tecnología de sensor se basa en la detección del marcador sustituto que indica la presencia del analito/biomarcador diana en una muestra de un fluido corporal.

El documento EP 1.215.485 desvela sensores químicos que comprenden una película de nanopartículas formada en un sustrato, comprendiendo la película de nanopartículas una red de nanopartículas entrelazada a través de moléculas de enlazador que tienen al menos dos unidades de enlazador. Las unidades de enlazador son capaces de unirse a la superficie de las nanopartículas y al menos una unidad de potenciación de la selectividad que tiene un sitio de unión para unir de forma reversible una molécula de electrolito. Se detecta un cambio de propiedad física de la película de nanopartículas a través de un medio de detección.

El documento WO 2009/066293 de uno de los inventores de la presente invención desvela un aparato de detección para detectar compuestos volátiles y no volátiles, el aparato comprende sensores de nanopartículas cúbicas recubiertas con un revestimiento orgánico. Se desvelan adicionalmente métodos de uso del mismo en la detección de ciertos biomarcadores para diagnosticar diversas enfermedades y trastornos, incluyendo el cáncer.

Existe una necesidad insatisfecha de un conjunto de sensores de respuesta rápida basados en una diversidad de sensores que proporcionan una mejor sensibilidad, así como selectividad para VOC específicos indicativos de cáncer.

## 50 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un conjunto de sensores para detectar compuestos orgánicos volátiles (VOC) indicativos de diversos tipos de cáncer. El conjunto de sensores comprende nanopartículas de oro (Au) conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico donde las nanopartículas de Au están caracterizadas por una distribución del tamaño de partículas estrecha con un tamaño de partícula medio de 5 nm, un tamaño de partícula en el intervalo de 1-10 nm y una anchura de la curva de distribución a la mitad del valor máximo (FWHM) de menos o igual al 40 % del tamaño de partícula medio, y donde el espesor del revestimiento orgánico está en el intervalo de 0,2-4 nm. La presente invención también proporciona un sistema que comprende el conjunto de sensores junto con un analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones, y métodos de uso del mismo en el diagnóstico de diversos tipos de

cáncer a través del aliento.

La invención se basa en parte en el hallazgo inesperado de que un conjunto de sensores que comprenden nanopartículas conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico en el que las nanopartículas están  
 5 caracterizadas por una distribución del tamaño de partículas estrecha proporciona mejores sensibilidades para detectar VOC. No se observó previamente que el uso de nanopartículas con una distribución del tamaño de partículas bien definida y estrecha mejora la eficacia de la transferencia de electrones para proporcionar una señal mejorada a relaciones de ruido. Se induce adicionalmente un aumento de la sensibilidad para el ajuste del espesor del revestimiento orgánico.

10 De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un conjunto de sensores para detectar VOC indicativos de cáncer que comprende nanopartículas de oro conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico, teniendo las nanopartículas una distribución del tamaño de partículas estrecha con un tamaño de partícula medio de aproximadamente 5 nm y un tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 1-10 nm, y una anchura de la  
 15 curva de distribución a la mitad del valor máximo (FWHM) de menos o igual al 40 % del tamaño de partícula medio, y en el que el espesor del revestimiento orgánico está en el intervalo de aproximadamente 0,2-4 nm.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un sistema para detectar un patrón de VOC indicativos de cáncer que comprende un conjunto de sensores que conforman nanopartículas de oro conductoras  
 20 recubiertas con un revestimiento orgánico, teniendo las nanopartículas una distribución del tamaño de partículas estrecha con un tamaño de partícula medio de aproximadamente 5 nm y un tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 1-10 nm, y una anchura de la curva de distribución a la mitad del valor máximo (FWHM) de menos o igual al 40 % del tamaño de partícula medio, y en el que el espesor del revestimiento orgánico está en el intervalo de aproximadamente 0,2-4 nm, y que comprende adicionalmente un analizador de aprendizaje y reconocimiento de  
 25 patrones en el que el analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones recibe salidas de señal de sensor y las compara con los datos almacenados.

En una realización, las nanopartículas tienen un tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 2-8 nm. En otra realización, las nanopartículas tienen un tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 3-6 nm.

30 En una realización particular, el espesor del revestimiento orgánico está en el intervalo de aproximadamente 0,6-2 nm.

En diversas realizaciones, el revestimiento de las nanopartículas conductoras comprende una monocapa o múltiples  
 35 capas de compuestos orgánicos, en las que los compuestos orgánicos pueden ser moléculas pequeñas, monómeros, oligómeros o polímeros, preferiblemente, el revestimiento orgánico se selecciona entre el grupo que consiste en alquiltioles con cadenas C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>, alquiltiolatos ω-funcionalizados, arenotiolatos, (γ-mercaptopropil)tri-metiloxisilano, sulfuros de dialquilo, xantatos, oligonucleótidos, polinucleótidos, péptidos, proteínas, enzimas, polisacáridos, fosfolípidos, y combinaciones de los mismos. Cada posibilidad representa una realización separada  
 40 de la invención.

En otras realizaciones, los sensores de nanopartículas de oro conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico están en una configuración seleccionada entre el grupo que consiste en cables 1D, películas 2D, y conjuntos 3D. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

45 Aún en otras realizaciones, el sistema de la presente invención comprende adicionalmente un aparato para recoger muestras de aliento. En realizaciones específicas, el sistema de la presente invención comprende un aparato para recoger la respiración alveolar. En otra realización, el sistema de la presente invención comprende adicionalmente al menos uno de un concentrador de respiración y una unidad de deshumidificación.

50 En realizaciones particulares, el sistema de la presente invención comprende adicionalmente al menos uno de un quimiorresistor, quimiocondensador, microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), resonador de onda acústica en bloque (BAW) y de onda acústica de superficie (SAW), celda electroquímica, resonancia de plasmones superficiales (SPR), y espectroscopio óptico. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

55 El analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones puede utilizar diversos algoritmos, incluyendo, pero sin limitación, redes neuronales artificiales, percepción multicapa (MLP), red neuronal de regresión generalizada (GRNN), sistemas de inferencia difusa (FIS), mapa autoorganizado (SOM), función de base radial (RBF), algoritmos genéticos (GAS), sistemas neuro-difusos (NFS), teoría de resonancia adaptativa (ART) y algoritmos estadísticos,

incluyendo, pero sin limitación, análisis de componentes principales (PCA), mínimos cuadrados parciales (PLS), regresión lineal múltiple (MLR), regresión de componentes principales (PCR), análisis de función discriminante (DFA), incluyendo análisis discriminante lineal (LDA), y análisis de conglomerados, incluyendo vecino más cercano.

- 5 De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención proporciona un método de diagnóstico del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar un sistema que comprende un conjunto de sensores de acuerdo con la presente invención, y que comprende adicionalmente un analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones en el que el analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones recibe salidas de señal de sensor y las compara con los datos almacenados, (b) exponer el conjunto de sensores a una muestra de aliento exhalado, y (c) usar algoritmos de aprendizaje y reconocimiento de patrones para determinar la presencia de un patrón de compuestos orgánicos volátiles indicativos de cáncer en la muestra, en el que los VOC indicativos de cáncer en una muestra de aliento se seleccionan entre el grupo que consiste en 4-metil-octano, 2-etil-1-hexanol, 2-etil-4-metil-1-pentanol, 2,3,4-trimetil-pentano, 2,3-dimetil-hexano, fluoruro de trimetilsililo, dimetil-silanodiol, 3-etil-3-metil-2-pentanona, 2-metil-4,6-octadiin-3-ona, 2-propil-1-pentanol, decano, trimetil benceno, etil benceno, heptanol, isopreno, hexano, undecano y 6,10-dimetil-5,9-dodecadien-2-ona.

Incluido dentro del alcance de la presente invención se encuentra el diagnóstico de diversos cánceres incluyendo, pero sin limitación, cánceres de pulmón, cerebro, ovario, colon, próstata, riñón, vejiga, mama, oral y de piel. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

20 De acuerdo con realizaciones particulares, la presente invención proporciona un método de diagnóstico del cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de próstata. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

25 En ciertas realizaciones, el método desvelado en el presente documento también proporciona la discriminación entre muestras de aliento de pacientes que tienen diferentes tipos de cáncer. En realizaciones particulares, la presente invención proporciona la discriminación entre muestras de aliento de pacientes que tienen diferentes fases de un único tipo de cáncer.

30 Realizaciones adicionales y el alcance completo de aplicabilidad de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada dada en lo sucesivo en el presente documento. Sin embargo, se ha de apreciar que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración.

### 35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Abundancia media de 33 VOC que se encontraron en muestras de aliento de individuos sanos (triángulos) y pacientes con cáncer de pulmón (círculos) según se midió por GC-MS.

40 **Figura 2.** (A) Ilustración esquemática de un conjunto de sensores. (B) Micrografía electrónica de transmisión de nanopartículas de oro que indica que las nanopartículas tienen una distribución de tamaño estrecha con un diámetro medio de aproximadamente 3,5 nm. (C) Representación esquemática de nanopartículas de oro recubiertas con un revestimiento orgánico.

45 **Figura 3.** Respuesta de resistencia diferencial relativa  $\Delta R/R_b$  del sensor número 8 con respecto a los biomarcadores más comunes que están presentes en las muestras de aliento de pacientes de cancer de pulmón (es decir, vapores de decano [+], trimetil benceno [□], etil benceno [■], y heptanol [Δ]) y vapor de agua [•] a concentraciones de 0,001-0,05 P/P°.

**Figura 4.** Respuestas de resistencia diferencial relativa  $\Delta R/R_b$  (eje y izquierdo), y nivel de ruido (eje y derecho) a diversos espesores de película (promedio) de nanopartículas de oro recubiertas con ligandos de dodecanotiol tras la exposición a decano a 0,05 P/P°.

50 **Figura 5.** Respuesta de películas de nanopartículas de oro recubiertas con ligandos de hexanotiol que tienen diferentes distribuciones de tamaño con respecto a hexano a 0,001 P/P°.

**Figura 6.** Respuestas de resistencia diferencial relativa,  $\Delta R/R_b$  de los sensores N° S2 y S3 (6A) y los sensores N° S6 y S8 (6B) a muestras de aliento de individuos sanos típicos (H) y pacientes con cáncer de pulmón (LC).

55 **Figura 7.** Patrones de respuesta de 90 muestras de aliento de las cuales 64 son muestras de aliento obtenidas de pacientes de cáncer de pulmón (líneas discontinuas) y 26 son muestras de aliento obtenidas de individuos sanos (líneas continuas). (7A) Patrones de respuesta usando todo el conjunto de sensores. (7B) Patrones de respuesta usando los sensores número S1, S4, S6, S7 y S8.

**Figura 8.** Datos en el espacio de componentes principales de un conjunto de sensores que tiene 9

sensores que se expusieron al aliento de pacientes de cáncer de pulmón (triángulos) y el aliento de individuos sanos (cuadrados).

**Figura 9.** Datos en el espacio de componentes principales de un conjunto de sensores que tiene 9 sensores que se expusieron al aliento de pacientes de cáncer de mama (\*) y el aliento de individuos sanos (0).

**Figura 10.** Datos en el espacio de componentes principales de un conjunto de sensores que tiene 9 sensores que se expusieron al aliento de colon pacientes de cáncer (x) y el aliento de individuos sanos (0).

**Figura 11.** Datos en el espacio de componentes principales de un conjunto de sensores que tiene 9 sensores que se expusieron al aliento de pacientes de cáncer de cabeza y cuello (■) y el aliento de individuos sanos (0).

**Figura 12.** Datos en el espacio de componentes principales de un conjunto de sensores que tiene 9 sensores que se expusieron al aliento de pacientes de cáncer de próstata (◄) y el aliento de individuos sanos (0).

**Figura 13.** GC-MS de VOC metabólicos de 4 células de cáncer de pulmón diferentes *in vitro*; **(13A)** pico 1; **(13B)** pico 2; **(13C)** pico 3; y **(13D)** pico 4. Los datos se basan en un análisis por GC-MS de carcinoma pulmonar de células escamosas (8 pacientes; □), adenocarcinoma (2 pacientes; Δ), carcinoma bronquioalveolar (1 paciente; ∇), y carcinoma de células no pequeñas (1 paciente; ○), como se indicó por Chen y col. (Cancer, 110(4), 2007, 835).

**Figura 14.** Datos en el espacio de componentes principales de un conjunto de sensores que tiene 9 sensores que se expusieron a mezclas de VOC que simulan 4 células de cáncer de pulmón diferentes: carcinoma pulmonar de células escamosas (círculos), adenocarcinoma (pentágonos), carcinoma bronquioalveolar (∇), y carcinoma de células no pequeñas Δ). Se usaron isopreno, hexano, decano y undecano como los cuatro biomarcadores.

**Figura 15.** Datos en el espacio de componentes principales de un conjunto de sensores que tienen 9 sensores que se expusieron a mezclas de VOC que simulan 4 células de cáncer de pulmón diferentes: carcinoma pulmonar de células escamosas (círculos), adenocarcinoma (◐), carcinoma bronquioalveolar (pentágonos), y carcinoma de células no pequeñas (triángulos). Se usaron isopreno, hexano, trimetil benceno y undecano como los cuatro biomarcadores.

**Figura 16.** Características clínicas de 68 pacientes de cáncer (22 con cáncer de pulmón, LC cuadrados; 17 con cáncer de colon, CC estrellas; 15 con cáncer de mama, BC rombos; y 14 con cáncer de próstata, PC triángulos) y 18 controles sanos (círculos). No se aplicaron criterios de inclusión/exclusión en este grupo de voluntarios. El conjunto de sensores no se vio influenciado por los factores de desviación (tal como el género, la edad o los hábitos de fumar). Las nanopartículas de Au se revistieron con **(16A)** 2-etilhexanotiol, **(16B)** decanotiol, y **(16C)** 2-mercaptobenzoxazol.

**Figura 17.** Gráficos PCA de las respuestas de resistencia del conjunto de sensores a muestras de aliento de **(17A)** cáncer de pulmón (LC) y controles sanos, **(17B)** cáncer de colon (CC) y controles sanos, **(17C)** cáncer de mama (BC) y controles sanos, **(17D)** cancer de próstata (PC) y controles sanos y **(17E)** todos los pacientes de cáncer y controles sanos.

#### 40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un conjunto de sensores que comprende nanopartículas de oro conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico donde las nanopartículas están caracterizadas por una distribución del tamaño de partículas estrecha. El espesor del revestimiento orgánico está adaptado para proporcionar mejores sensibilidades para compuestos orgánicos volátiles particulares indicativos de diversos tipos de cáncer. La presente invención también proporciona un sistema que comprende el conjunto de sensores junto con un analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones que utiliza diversos algoritmos para permitir la identificación de volátiles particulares de una mezcla de volátiles. Se desvelan adicionalmente métodos de uso de los mismos para fines de diagnóstico, pronóstico y monitorización.

El conjunto de sensores, de acuerdo con los principios de la presente invención está diseñado para detectar compuestos orgánicos volátiles indicativos de cáncer. Tras la adsorción de un analito, la película/conjunto de nanopartículas conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico (NPCOC) puede aumentar, o agregarse. En estas películas finas de NPCOC puede generarse un cambio relativo en la constante de permitividad de la película tras la adsorción del analito. La respuesta introducida tras la exposición del analito se determina por la naturaleza de la interacción entre la especie de analito (huésped) y el revestimiento molecular de las nanopartículas. Ahora se desvela por primera vez que, el uso de nanopartículas con una distribución de tamaño estrecha recubiertas con un revestimiento orgánico de espesor variable permite la detección de biomarcadores de cáncer en el aliento con una precisión muy alta. Dentro del alcance de la presente invención se encuentra la detección de VOC con una

sensibilidad de menos de una parte por millón (ppm), y más preferiblemente menos de 100 partes por billón (ppb).

Sin desear quedar ligado a teoría o mecanismo de acción alguno, se contempla que los sensores compuestos por nanopartículas que tienen una distribución de tamaño estrecha son más sensibles a la adsorción de analitos. Esto puede atribuirse al empaquetamiento compacto de las nanopartículas que las hace susceptibles a cambios estructurales muy pequeños que se producen tras la adsorción de analitos. Estos cambios estructurales de los conjuntos de nanopartículas afectan a las propiedades electrónicas para inducir respuestas electrónicas. Se contempla que puede inducirse una respuesta de detección por cantidades muy pequeñas de moléculas de analito de acuerdo con los principios de la presente invención. Puede conseguirse una sensibilidad adicional a través de la variación del espesor del revestimiento orgánico.

Las nanopartículas utilizadas en la presente invención tienen un tamaño de partícula que varía de aproximadamente 1 nanómetro (nm) a aproximadamente 10 nanómetros, preferiblemente de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 8 nm. El tamaño de partícula medio de las nanopartículas es de aproximadamente 5 nm con una distribución del tamaño de partículas estrecha, donde el tamaño de partícula varía preferiblemente de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 6 nm.

La distribución del tamaño de las nanopartículas, de acuerdo con los principios de la presente invención, es estrecha. La expresión "distribución del tamaño de partículas estrecha", como se usa en el presente documento, se refiere a una distribución en la que más del 90 % de las partículas tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 0,2-2 veces el tamaño de partícula medio (o promedio). Preferiblemente, más del 95 % de las partículas tienen un tamaño de partícula dentro de este intervalo. Incluso más preferiblemente, más del 99 % de las partículas tienen un tamaño de partícula dentro de este intervalo. Por lo tanto, para un tamaño de partícula medio de 5 nm, una distribución de tamaño estrecha se refiere a una distribución en la que más del 90 %, 95 % o del 99 % de las partículas tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 1-10 nm.

La distribución del tamaño de nanopartícula normalmente se define en cuanto al tamaño de partícula medio y la anchura de la distribución. La anchura de la curva de distribución a la mitad del valor máximo se denomina anchura a media altura (FWHM). La relación entre la FWHM y el tamaño de partícula medio se usa como una medición de la amplitud o la estrechez de la distribución. Por ejemplo, una distribución que tiene un valor FWHM que es mayor que el tamaño de partícula medio se considera relativamente amplio. Como se ha analizado anteriormente, las nanopartículas usadas en la presente invención tienen una distribución del tamaño de partículas estrecha. La FWHM de acuerdo con la presente invención es menor de o igual al 40 % del tamaño de partícula medio. Las nanopartículas son básicamente de forma esférica o esferooidal.

De acuerdo con los principios de la presente invención, el tamaño de partícula medio, como se usa en el presente documento, se refiere al diámetro de partícula promedio que puede determinarse, por ejemplo, usando microscopía electrónica de transmisión (TEM). El tamaño de partícula medio puede determinarse adicionalmente usando otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, fraccionamiento de flujo de sedimentación, espectroscopía de correlación fotónica, dispersión de luz, dispersión de electrones, centrifugación por disco, y similares.

Otra característica importante de la presente invención es el espesor del revestimiento orgánico que afecta a la sensibilidad a la adsorción de diferentes analitos de biomarcador. El revestimiento orgánico tiene un espesor en el intervalo de aproximadamente 0,2 nm a aproximadamente 4 nm. En algunas realizaciones, el conjunto de sensores comprende sensores que tienen nanopartículas de una única especie recubiertas con diversos compuestos orgánicos, donde el espesor del revestimiento orgánico varía de aproximadamente 0,6 nm a aproximadamente 2 nm. El conjunto de sensores también puede comprender sensores que tienen nanopartículas de una única especie recubiertas con diversos compuestos orgánicos, donde el espesor del revestimiento orgánico varía de aproximadamente 0,2 nm a aproximadamente 2 nm para algunas nanopartículas y de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 4 nm para otras nanopartículas. El conjunto de sensores también puede comprender sensores que tienen nanopartículas de diversas especies.

La presente invención también proporciona un sistema para detectar al menos un patrón de VOC indicativos de cáncer que comprende un conjunto de sensores que comprende nanopartículas de oro conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico donde las nanopartículas de oro están caracterizadas por una distribución de tamaño estrecha, donde el tamaño de partícula de las nanopartículas varía de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm con un tamaño de partícula medio de aproximadamente 5 nm, y una anchura de la curva de distribución a la mitad del valor máximo (FWHM) de menos o igual al 40 % del tamaño de partícula medio, y donde el espesor del

revestimiento orgánico varía de aproximadamente 0,2 nm a aproximadamente 4 nm, y que comprende adicionalmente un analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones donde el analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones recibe salidas de señal de sensor y las compara con los datos almacenados.

- 5 El revestimiento de las nanopartículas conductoras comprende una monocapa o múltiples capas de compuestos orgánicos, en el que los compuestos orgánicos pueden ser moléculas pequeñas, monómeros, oligómeros o polímeros (preferiblemente cadenas poliméricas cortas). En realizaciones particulares, los compuestos orgánicos se seleccionan entre el grupo que consiste en alquiltioles con cadenas  $C_3$ - $C_{24}$ , alquiltiolatos  $\omega$ -funcionalizados, arenotiolatos, ( $\gamma$ -mercaptopropil)tri-metiloxisilano, sulfuros de dialquilo, xantatos, oligonucleótidos, polinucleótidos, 10 péptidos, proteínas, enzimas, polisacáridos, fosfolípidos, y combinaciones de los mismos. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

- Otros compuestos orgánicos adecuados como agentes de recubrimiento incluyen, pero sin limitación, alquencil tioles, alquinil tioles, cicloalquil tioles, heterociclicil tioles, heteroaril tioles, tiolatos de alquencilo, tiolatos de alquinilo, tiolatos 15 de cicloalquilo, tiolatos de heterociclicilo, tiolatos de heteroarilo, sulfuros de alquencilo, sulfuros de alquinilo, sulfuros de cicloalquilo, sulfuros de heterociclicilo, sulfuros de heteroarilo, disulfuros de alquencilo, disulfuros de alquinilo, disulfuros de cicloalquilo, disulfuros de heterociclicilo, disulfuros de heteroarilo, sulfitos de alquencilo, sulfitos de alquinilo, sulfitos de cicloalquilo, sulfitos de heterociclicilo, sulfitos de heteroarilo, sulfatos de alquencilo, sulfatos de alquinilo, sulfatos de cicloalquilo, sulfatos de heterociclicilo, sulfatos de heteroarilo, alquencil aminas, alquinil aminas, cicloalquil aminas, 20 heterociclicil aminas, heteroaril aminas, carboxilatos de alquencilo, carboxilatos de alquinilo, carboxilatos de cicloalquilo, carboxilatos de heterociclicilo, y carboxilatos de heteroarilo.

- Un grupo "alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, de cadena ramificada y cíclicos. El grupo alquilo puede tener 1-12 carbonos designados aquí como alquilo  $C_{1-12}$ , 2-6 25 carbonos designados aquí como alquilo  $C_{2-6}$ , 2-4 carbonos designados aquí como alquilo  $C_{2-4}$ , 3-24 carbonos designados aquí como alquilo  $C_{3-24}$ . El grupo alquilo puede estar sin sustituir o sustituido por uno o más grupos seleccionados entre halógeno, haloalquilo, acilo, amido, éster, ciano, nitro y azido.

- Un grupo "cicloalquilo" se refiere a un sistema anular no aromático mono o multicíclico. El grupo cicloalquilo puede 30 tener 3-10 átomos de carbono, o 5-10 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo monocíclicos ejemplares incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares. Un alquilocicloalquilo es un grupo alquilo como se define en el presente documento, unido a un grupo cicloalquilo como se define en el presente documento. El grupo cicloalquilo puede estar sin sustituir o sustituido con uno cualquiera o más de los sustituyentes definidos anteriormente para alquilo.

- 35 Un grupo "alquencilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono que incluye grupos alquencilo de cadena lineal, de cadena ramificada y cíclicos. El grupo alquencilo puede tener 2-8 átomos de carbono (un alquencilo  $C_{2-8}$ ). El grupo alquencilo también puede tener 2-4 átomos de carbono en la cadena (un alquencilo  $C_{2-4}$ ). Los grupos alquencilo ejemplares incluyen, pero sin limitación, etenilo, propenilo, n-butenilo, i-butenilo, 3-metilbut-2-enilo, n-pentenilo, heptenilo, octenilo, ciclohexil-butenilo y decenilo. Un alquilalquencilo es un grupo alquilo como se define en el presente documento, unido a un grupo alquencilo como se define en el presente documento. El grupo alquencilo puede estar sin sustituir o sustituido a través de átomos de carbono disponibles con uno o más grupos definidos anteriormente en el presente documento para alquilo.

- 45 Un grupo "alquinilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono que incluye de cadena lineal y de cadena ramificada. El grupo alquinilo puede tener 2-8 átomos de carbono en la cadena (un alquinilo  $C_{2-8}$ ), o 2-4 átomos de carbono en la cadena (un alquinilo  $C_{2-4}$ ). Los grupos alquinilo ejemplares incluyen, pero sin limitación, etinilo, propinilo, n-butinilo, 2-butinilo, 3-metilbutinilo, n-pentinilo, heptinilo, octinilo y decinilo. Un alquilalquinilo es un grupo alquilo como se define en el presente documento, unido a un grupo alquinilo como se define en el presente documento. El grupo alquinilo puede estar sin sustituir o sustituido a través de átomos de carbono disponibles con uno o más grupos definidos anteriormente en el presente documento para alquilo.

- 55 Un grupo "arilo" se refiere a un sistema anular aromático monocíclico o multicíclico. El grupo arilo puede tener 6-10 átomos de carbono. El arilo está opcionalmente sustituido con al menos un "sustituyente del sistema anular" y combinaciones de los mismos como se define en el presente documento. Los grupos arilo ejemplares incluyen, pero sin limitación, fenilo o naftilo. Un alquilarilo es un grupo alquilo como se define en el presente documento unido a un grupo arilo como se define en el presente documento. El grupo arilo puede estar sin sustituir o sustituido a través de átomos de carbono disponibles con uno o más grupos definidos anteriormente en el presente documento para



alquilo.

Un grupo "heteroarilo" se refiere a un sistema heteroaromático que contiene al menos un anillo heteroátomo en el que el átomo se selecciona entre nitrógeno, azufre y oxígeno. El heteroarilo contiene 5 o más átomos en el anillo. El grupo heteroarilo puede ser monocíclico, bicíclico, tricíclico y similares. También se incluyen en esta definición los anillos benzoheterocíclicos. Los ejemplos no limitantes de heteroarilos incluyen tienilo, benzotienilo, 1-naftotienilo, tiantrenilo, furilo, benzofurilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, pirídilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, indolilo, isoindolilo, indazolilo, purinilo, isoquinolilo, quinolilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, carbolinilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo y similares. El grupo heteroarilo puede estar sin sustituir o sustituido a través de átomos disponibles con uno o más grupos definidos anteriormente en el presente documento para alquilo.

Un "anillo heterocíclico" o grupo "heterocíclico" se refiere a anillos de cinco miembros a ocho miembros que tienen de 1 a 4 heteroátomos, tales como oxígeno, azufre y/o, en particular, nitrógeno. Estos anillos de cinco miembros a ocho miembros pueden estar saturados, completamente insaturados o parcialmente insaturados, siendo preferidos anillos completamente insaturados. Los anillos heterocíclicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, piperidinilo, pirrolidinil, pirrolinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piranilo, tiopiranilo, piperazinilo, indolinilo, dihidrofurano, tetrahidrofurano, dihidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo, dihidropirano, tetrahidropirano, y similares. Un alquilheterocíclico es un grupo alquilo como se define en el presente documento unido a un grupo heterocíclico como se define en el presente documento. El grupo heterocíclico puede estar sin sustituir o sustituido a través de átomos disponibles con uno o más grupos definidos anteriormente en el presente documento para alquilo.

Los "sustituyentes del sistema anular" se refieren a sustituyentes unidos a sistemas anulares aromáticos o no aromáticos, incluyendo, pero sin limitación, H, halo, haloalquilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), acilo, amido, éster, ciano, nitro, azido, y similares.

Un grupo "halógeno" o "halo", como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, se refiere a cloro, bromo, flúor y yodo. El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene algunos o todos los hidrógenos independientemente reemplazados por un grupo halógeno, incluyendo, pero sin limitación, triclorometilo, tribromometilo, trifluorometilo, triidometilo, difluorometilo, clorodifluorometilo, pentafluoroetil, 1,1-difluoroetil bromometilo, clorometilo, fluorometilo, yodometilo, y similares.

Un grupo "acilo", como se usa en el presente documento, incluye grupos tales como, pero sin limitación, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, pentanoilo, pivaloilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, undecanoilo, dodecanoilo, benzoilo, y similares. Los grupos acilo actualmente preferidos son acetilo y benzoilo.

Un grupo "alcoxi" se refiere a un grupo -O-alquilo en el que R es alquilo como se ha definido anteriormente.

Un grupo "tio", como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo SH. Las expresiones "alquiltio", "ariltio" o "arilalquiltio", como se usan en el presente documento, en solitario o como parte de otro grupo, se refieren a cualquiera de los grupos alquilo, arilalquilo o arilo anteriores unidos a un átomo de azufre.

Las expresiones "oligonucleótido" o "polinucleótido", como se usan en el presente documento, se refieren a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que pueden ser mono o bicatenarios, y representan la hebra sentido o antisentido.

Las expresiones "péptido" y "proteína", como se usa en el presente documento, se refieren a un polímero de residuos aminoácidos. Las expresiones se aplican a polímeros aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Pueden usarse muchas más moléculas que satisfacen la definición de "revestimiento orgánico" en el mismo contexto.

De acuerdo con los principios de la presente invención, el revestimiento orgánico está caracterizado por la variación del espesor para proporcionar mejores sensibilidades a compuestos orgánicos volátiles específicos indicativos de cáncer. Sin desear quedar ligado a teoría o mecanismo de acción alguno, una capa fina de revestimiento orgánico en el intervalo de aproximadamente 0,2-0,6 nm es más adecuada para la detección de analitos que tienen una presión de vapor relativamente baja (<10 torr), que se adsorben principalmente sobre la superficie del revestimiento para inducir la señal de detección. Una capa relativamente gruesa de revestimiento orgánico en el intervalo de

aproximadamente 0,6-2 nm y, en otras realizaciones ejemplares, de 2-4 nm, es más adecuada para la detección de analitos que tienen una presión de vapor relativamente alta (>10 torr). En este caso, las moléculas de analito penetran más profundamente en el núcleo del revestimiento para inducir la señal de detección.

5 Los sensores de la presente invención pueden fabricarse a través de un proceso de auto-ensamblado para producir películas que comprenden NPCOC. El término "auto-ensamblado", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso de organización de moléculas sin la intervención de una fuente externa. El proceso de auto-ensamblado tiene lugar en una solución/disolvente o directamente sobre el sustrato en estado sólido. El término "película", como se usa en el presente documento, corresponde a una configuración de montaje bien organizado de  
 10 NPCOC, preferiblemente en una configuración cúbica centrada en el cuerpo (BCC) o cúbica centrada en la cara (FCC). El uso de nanopartículas con una distribución de tamaño estrecha permite un empaquetamiento más compacto de las nanopartículas, dando como resultado de esta manera películas que son más susceptibles a cambios menores en las estructuras de película tras la adsorción de analitos. Por lo tanto, estas películas son más sensibles que las películas que tienen una distribución del tamaño de partícula amplia.

15 La síntesis de NPCOC puede producirse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las nanopartículas de oro pueden sintetizarse usando el método de dos fases (Brust y col., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 801, 1994, 2) con algunas modificaciones (Hostettler y col. Langmuir, 14 1998, 24). En resumen,  $\text{AuCl}_4^-$  se transfiere de una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  a una solución de tolueno por el reactivo de transferencia de fase TOAB. Después  
 20 de aislar la fase orgánica, a la solución se le añaden tioles en exceso. La relación molar de tiol: $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  puede variar entre 1:1 y 10:1, dependiendo del tiol usado. Esto se realiza con el fin de preparar una solución mono-dispersa de nanopartículas de oro en un tamaño medio de aproximadamente 5 nm. Los procedimientos ejemplares incluyen, pero sin limitación, relaciones molares de tiol:Au de 10:1 y 1:1 para nanopartículas de oro recubiertas con dodecanotiol y butanotiol, respectivamente en un tamaño medio de 5 nm. Después de una agitación vigorosa de la  
 25 solución, se añade una solución acuosa del agente reductor  $\text{NaBH}_4$  en gran exceso. La reacción se agita constantemente a temperatura ambiente durante al menos 3 horas para producir una solución de color pardo oscuro de las nanopartículas de Au recubiertas con tiol. La solución resultante se somete adicionalmente a la eliminación del disolvente en un evaporador rotatorio seguido de múltiples lavados usando etanol y tolueno.

30 Las nanopartículas de color recubiertas con 2-mercaptobenzoazol pueden sintetizarse por un método de intercambio de ligandos a partir de las nanopartículas de oro recubiertas con hexanotiol preparadas previamente. En una reacción típica, se añade un exceso de tiol, 2-mercaptobenzoazol, a una solución de nanopartículas de oro recubiertas con hexanotiol en tolueno. La solución se mantiene en agitación constante durante algunos días con el fin de permitir la máxima conversión del ligando como sea posible. Las nanopartículas se purifican a partir de  
 35 ligandos sin tiol mediante extracciones repetidas.

Sin desear quedar ligado a teoría o mecanismo de acción alguno, se contempla que la detección se produce a través de agregación o engrosamiento de las nanopartículas conductoras recubiertas con conjuntos de revestimientos orgánicos, a través de diversas interacciones químicas. Las interacciones incluyen, pero sin  
 40 limitación, interacciones de unión a hidrógeno,  $\pi$ - $\pi$ , huésped-anfitrión, van der Waals, electrostáticas, de transferencia de carga, antígeno-anticuerpo, y combinaciones de las mismas. Los cambios en la permitividad normalmente se producen en películas finas que tienen regiones de discontinuidades en los quimiorresistores, los quimiocondensadores y celdas electroquímicas que consisten en películas 2D o 3D de nanopartículas metálicas.

45 Los métodos ejemplares para obtener conjuntos bi o tridimensionales bien ordenados de NPCOC incluyen, pero sin limitación,

i. Deposición aleatoria de una solución de NPCOC sobre superficies sólidas. La deposición se realiza mediante deposición por goteo, recubrimiento giratorio, recubrimiento por pulverización u otras técnicas  
 50 similares.

ii. Deposición mejorada de campo o inducida por interacción molecular de una solución de NPCOC sobre superficies sólidas.

iii. Técnicas Langmuir-Blodgett o Langmuir-Schaefer. El sustrato se sumerge en vertical a través de una monocapa bidimensional auto-organizada/bien ordenada de NPCOC en la interfaz de subfase de aire, donde esta última se transfiere posteriormente sobre éste. Múltiples inmersiones del sustrato a través de la  
 55 monocapa 2D de NPCOC en la interfaz de subfase de aire, dan como resultado la fabricación de las multicapas ordenadas tridimensionalmente de NPCOC.

iv. Técnicas de litografía suave, tales como impresión por micro-contacto (mCP), moldeo de réplica, micro-moldeo en capilares (MIMIC), y moldeo de micro-transferencia (mTM). Estos métodos se basan en

variaciones del auto-ensamblado y moldeo de réplica de moléculas orgánicas y materiales poliméricos, para fabricar NPCOC de una escala nanométrica a una escala mesoscópica (Whitesides y col., J. Mater. Chem. 7, 1069, 1997).

5 v. Pueden usarse diversas combinaciones de métodos de Langmuir-Blodgett o Langmuir-Schaefer con técnicas de litografía suave para producir películas Langmuir-Blodgett en patrones de NPCOC molecularmente modificados que se transfieren sobre sustratos sólidos.

10 vi. Impresión sobre sustratos en estado sólido o flexibles usando una impresora de inyección designada para electrónica impresa. Se usa una solución que contiene los NPCOC como un material de carga (o "tinta") del cabezal de impresión de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica como se describe, por ejemplo, en Holland y col. (Ink Maker 8, 83, 2005).

De acuerdo con los principios de la presente invención, el conjunto de sensores para detectar volátiles indicativos de cáncer en muestras de aliento comprende una pluralidad de sensores entre 2 a 1000 sensores, más preferiblemente entre 2 a 500 sensores, incluso más preferiblemente entre 2 a 250 sensores, y mucho más preferiblemente entre 2 a 15 125 sensores en cualquier conjunto. El conjunto de sensores puede comprender 9 sensores químicamente sensibles o 14 sensores químicamente sensibles.

20 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un sistema en el que el conjunto de sensores de NPCOC se usa junto con uno cualquiera de un quimiorresistor, un quimiocondensador, una microbalanza de cristal de cuarzo, un resonador de onda acústica en bloque (BAW) y de onda acústica de superficie (SAW), una celda electroquímica, una resonancia de plasmones superficiales (SPR), y un espectroscopio óptico. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

25 Las respuesta de detección tras la exposición de los sensores a un analito pueden inducirse a través de un cambio en uno cualquiera de la conductividad, la resistencia, la impedancia, la capacidad, la inductancia, o las propiedades ópticas de uno o más de los sensores.

30 Para una detección electrónicamente inducida, los contactos eléctricos de las películas de NPCOC que se depositaron sobre un sustrato sólido (por ejemplo, silice, silicio, cuarzo, etc.) para la integración de conjuntos de soporte y/o fácil, pueden realizarse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para inducir contactos eléctricos incluyen, pero sin limitación, fotolitografía, litografía de haz de electrones, haz de iones focalizados (FIB), evaporación/pulverización directa a través de una máscara de sombra, contacto suave (estampación), técnicas de impresión por inyección de nanopartículas conductoras, y otras técnicas similares. Como alternativa, las películas de nanopartículas pueden depositarse en contactos predefinidos que se fabricaron por uno 35 cualquiera de los métodos que se han descrito anteriormente en el presente documento. Los electrodos pueden ponerse en contacto en diversas geometrías de maneras bien conocidas por un experto en la técnica. Los electrodos pueden ponerse en contacto con una distancia de 15  $\mu\text{m}$  entre electrodos adyacentes. Como alternativa, los electrodos se ponen en contacto con una distancia de 100  $\mu\text{m}$  entre electrodos adyacentes. La distancia entre dos electrodos adyacentes está preferiblemente en el intervalo de 100 nm a 5000  $\mu\text{m}$ .

40 La detección puede detectarse a través de cambios en las propiedades ópticas de una red de sensores. La detección también puede realizarse usando elipsometría espectroscópica. Esta técnica mide el cambio en la polimerización tras el reflejo de luz polarizada desde una superficie. Sin desear quedar ligado a teoría o mecanismo de acción alguno, la adsorción de moléculas de analitos induce cambios en el espesor de las capas de redes de NPCOC. El cambio en el espesor o rugosidad induce cambios en la polarización que pueden registrarse por la 45 técnica de elipsometría espectroscópica. La señal obtenida se transporta posteriormente a un analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones para generar un resultado. De esta manera, no se requiere ningún contacto eléctrico. La agregación y/o engrosamiento de los NPCOC tras la adsorción de analitos convierte a esta técnica en ventajosa para detectar volátiles con una sensibilidad muy alta.

50 Dentro del alcance de la presente invención se encuentran métodos para determinar al menos un patrón de compuestos orgánicos volátiles en una muestra de aliento donde los compuestos orgánicos volátiles son biomarcadores para el cáncer. Los métodos comprenden exponer el conjunto de sensores a una muestra de aliento exhalado y usar algoritmos de aprendizaje y reconocimiento de patrones con el fin de analizar la señal de sensor e 55 identificar y cuantificar posiblemente los compuestos o patrones deseados indicativos de cáncer. Por lo tanto, en el presente documento se proporciona un sistema que comprende el conjunto de sensores de la presente invención junto con un analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones. El analizador recibe salidas o patrones de señal del conjunto de sensores y los analiza mediante diversos algoritmos de reconocimiento de patrones para producir una firma de salida. Mediante la clasificación de una firma desconocida usando una base de datos de firmas

almacenadas y conocidas, pueden identificarse los compuestos deseados. De acuerdo con los principios de la presente invención, la detección se obtiene a través de la adsorción de compuestos orgánicos volátiles para proporcionar cambios de señal que después se transportan a un analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones para generar la identificación de los compuestos deseados.

5

Los algoritmos para el análisis de muestras incluyen, pero sin limitación, análisis de componentes principales, análisis lineal de Fischer, algoritmos de red neuronal, algoritmos genéticos, reconocimiento de patrón lógico difuso, y similares. Después de que se complete el análisis, la información resultante puede mostrarse, por ejemplo, en una pantalla, transmitirse a un ordenador huésped, o almacenarse en un dispositivo de almacenamiento para una recuperación posterior.

10

Muchos de los algoritmos son algoritmos basados en redes neuronales. Una red neuronal tiene una capa de entrada, capas de procesamiento y una capa de salida. La información en una red neuronal se distribuye por todas las capas de procesamiento. Las capas de procesamiento están constituidas por nodos que simulan las neuronas mediante la interconexión de sus nodos.

15

Cuando una red neuronal se combina con un conjunto de sensores, los datos del sensor se propagan a través de las redes. De esta manera, se realizan una serie de multiplicaciones de matriz vectorial y los análisis desconocidos pueden identificarse y determinarse fácilmente. La red neuronal se entrena corrigiendo las salidas falsas o no deseadas de una entrada dada. De forma similar al análisis estadístico que revela patrones subyacentes en una colección de datos, las redes neuronales localizan patrones coherentes una colección de datos, en base a criterios predeterminados.

20

Los algoritmos de reconocimiento de patrones adecuados incluyen, pero sin limitación, análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante lineal de Fisher (FLDA), modelado suave independiente de analogía de clases (SIMCA), K vecinos más cercanos (KNN), redes neuronales, algoritmos genéticos, lógica difusa, y otros algoritmos de reconocimiento de patrones. El análisis discriminante lineal de Fisher (FLDA) y el análisis discriminante canónico (CDA), así como combinaciones de los mismos, pueden usarse para comparar la firma de salida y los datos disponibles de la base de datos. Como alternativa, se usa el análisis de componentes principales. El análisis de componentes principales (PCA) implica una técnica matemática que transforma varias variables correlacionadas en un número menor de variables no correlacionadas. El número menor de variables no correlacionadas se conoce como componentes principales. El primer componente principal o autovector representa la mayor variabilidad en los datos posible, y cada componente sucesivo representa la mayor variabilidad restante posible. El objetivo principal del PCA es reducir la dimensionalidad del conjunto de datos de identificar nuevas variables subyacentes.

25

30

35

El análisis de componentes principales compara la estructura de dos o más matrices de covarianza de manera jerárquica. Por ejemplo, una matriz puede ser idéntica a otra, excepto que cada elemento de la matriz se multiplica por una única constante. Por lo tanto, las matrices son proporcionales entre sí. Más particularmente, las matrices comparten autovectores idénticos (o componentes principales), pero sus autovalores difieren en una constante. Otra relación entre matrices es que comparten componentes principales en común, pero sus autovalores difieren. La técnica matemática usada en el análisis de componentes principales se denomina autoanálisis. El autovector asociado al mayor autovalor tiene la misma dirección que el primer componente principal. El autovector asociado al segundo mayor autovalor determina la dirección del segundo componente principal. La suma de los autovalores equivale a la traza de matriz cuadrada y el número máximo de autovectores equivale al número de filas de esta matriz.

40

45

En el presente documento se proporcionan métodos de uso del conjunto de sensores para diagnosticar cáncer. Los métodos incluyen la detección de compuestos orgánicos volátiles como biomarcadores de cáncer a partir del aliento directamente exhalado por el sujeto en el conjunto de sensores de la presente invención. Como alternativa, el conjunto de sensores puede exponerse al espacio vacío de un recipiente en el que se ha depositado el aliento exhalado. Otras posibilidades incluyen exhalar en una bolsa inerte y después exponer el aliento recogido al conjunto de sensores de la presente invención. Por lo tanto, el sistema de la presente invención puede comprender adicionalmente un aparato colector de aliento para recoger muestras de aliento, particularmente muestras de respiración alveolar. Aparatos colectores de aliento ejemplares dentro del alcance de la presente invención son aquellos aprobados por la American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS); (Silkoff y col. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 171, 2005, 912). La respiración alveolar normalmente se recoge de los individuos usando el método fuera de línea. Sin embargo, se entenderá que la recogida de aliento directamente al dispositivo *vis-à-vis* el método en línea se incluye por la presente invención. A veces no es necesario concentrar previamente o

55

deshumidificar la muestra antes de la medición. Cuando se requiere una mejor discriminación entre muestras de aliento de "control" y de "cáncer", se usa un concentrador de respiración y/o una unidad de deshumidificación.

Los concentradores de aliento usados junto con la presente invención incluyen, pero sin limitación,

5

**I. Microextracción en fase sólida (SPME)** - La técnica SPME se basa en una fibra revestida con un líquido (polímero), un sólido (sorbente), o combinación de los mismos. El revestimiento de fibra extrae los compuestos de la muestra por absorción (cuando el revestimiento es líquido) o por adsorción (cuando el revestimiento es sólido). Después, la fibra SPME se inserta directamente en el dispositivo de detección para su desorción y análisis posterior (Ouyang, y col., Anal. Bioanal. Chem., 386, 2006, 1059; Coelho y col., J. Chromatography B, 853, 2007, 1).

10

**II. Tubos adsorbentes** - Los tubos adsorbentes están hechos típicamente de vidrio y contienen diversos tipos de material adsorbente sólido (sorbentes). Los sorbentes usados comúnmente incluyen carbón activado, gel de sílice, y polímeros porosos orgánicos, tales como resinas Tenax y Amberlite XAD. Los tubos adsorbentes están fijados a bombas de muestreo de aire para la recogida de muestras. Una bomba con un caudal calibrado en ml/min extrae un volumen predeterminado de aire a través del tubo adsorbente. Los productos químicos se atrapan sobre el material adsorbente a lo largo de todo el periodo de muestreo. Esta técnica se desarrolló por el US National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH).

15

**III. Concentraciones criogénicas** - La condensación criogénica es un proceso que permite la recuperación de compuestos orgánicos volátiles (VOC) para su reutilización. El proceso de condensación requiere temperaturas muy bajas, de manera que los VOC puedan condensarse. Tradicionalmente, se han usado refrigerantes de clorofluorocarbono (CFC) para condensar los VOC. Actualmente, se usa nitrógeno líquido en el proceso de condensación criogénica (menos de -160 °C).

20

25 Un deshumidificador usado junto con la presente invención puede incluir los siguientes ejemplos no limitantes:

**I. Extraer el aire húmedo sobre bobinas refrigeradas en frío** - usando este enfoque, la humedad del aire se condensa en gotas según pasa a través de bobinas refrigeradas en frío en un recipiente. Después, el aire "seco" se lleva a su temperatura original y se devuelve al dispositivo de detección.

30

**II. Gel de sílice** - es una forma amorfa de dióxido de silicio, que se produce sintéticamente en forma de gránulos o perlas duras irregulares. Una estructura microporosa de cavidades de enclavamiento da un área superficial muy elevada (800 metros cuadrados por gramo). Esta estructura única considera el gel de sílice como un desecante de alta capacidad. Las moléculas de agua se adhieren a la superficie del gel de sílice debido a su baja presión de vapor en comparación con el aire circundante. Cuando se alcanza un equilibrio de presión, la adsorción cesa. Por lo tanto, cuanto mayor es la humedad del aire circundante, mayor es la cantidad de agua que se adsorbe antes de alcanzar el equilibrio. El gel de sílice es ventajoso como una sustancia de secado, ya que el proceso de secado requiere que no haya ninguna reacción química ni ningún subproducto o efecto secundario.

35

**III. Carbón activado** - Se forma procesando carbón con respecto a una sustancia de carbón extremadamente porosa. Debido a su alto grado de microporosidad, el carbón activado posee un área superficial muy grande disponible para reacciones químicas. Puede obtenerse suficiente activación únicamente de la alta área superficial, aunque un tratamiento químico adicional a menudo mejora las propiedades de adsorción del material.

40

**IV. Tamices moleculares desecantes** - Son metal alumino-silicatos cristalinos altamente porosos y sintéticamente producidos. Se clasifican por las muchas cavidades internas de diámetros precisos, concretamente, 3 Å, 4 Å, 5 Å y 10 Å. La adsorción de produce únicamente cuando las moléculas que se van a adsorber tienen diámetros más pequeños que las aberturas de las cavidades. Las moléculas de alta polaridad se absorben mejor en los tamices moleculares. Los tamices moleculares adsorben las moléculas de agua y otros contaminantes de líquidos y gases que descienden a niveles muy bajos de concentraciones, con frecuencia a 1 ppm.

45

En una realización particular, el método descrito en el presente documento se usa para discriminar entre diferentes tipos de cáncer. Los estudios de cromatografía de gases unida a espectrometría de masas (GC-MS) han mostrado que los alcanos C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> volátiles y ciertos alcanos monometilados, así como derivados de benceno parecen estar elevados en diversos casos de cáncer. Los compuestos de interés se encuentran generalmente en el intervalo de 1-20 ppb en el aliento humano sano, pero puede observarse en composiciones de mezcla distintivas a niveles elevados en el intervalo de 10-100 ppb en el aliento de pacientes de cáncer. Los niveles de estos biomarcadores son elevados incluso en las fases tempranas de la enfermedad, ya que reflejan un cambio en la química del cuerpo humano. Este cambio aparece independientemente del tamaño del tumor. Además, los biomarcadores de una

55

enfermedad específica (por ejemplo, cáncer de pulmón) poseen composiciones de mezcla/patrones distintivos que difieren de las composiciones/patrones de los biomarcadores de otras enfermedades. Los compuestos orgánicos volátiles que pueden usarse como biomarcadores para el diagnóstico de cáncer incluyen, pero sin limitación, 4-metil-octano, 2-etil-1-hexanol, 2-etil-4-metil-1-pentanol, 2,3,4-trimetil-pentano, 2,3-dimetil-hexano, fluoruro de trimetilsililo, 5 dimetil-silanodiol, 3-etil-3-metil-2-pentanona, 2-metil-4,6-octadiin-3-ona, 2-propil-1-pentanol, decano, trimetil benceno, etil benceno, heptanol, isopreno, hexano, undecano y 6,10-dimetil-5,9-dodecadien-2-ona.

Como se contempla en el presente documento, el uso de los métodos de la presente invención permite la discriminación entre diferentes tipos de cáncer. En algunas realizaciones, el sistema de la presente invención proporciona el diagnóstico de un único tipo de cáncer en diferentes fases. En otras realizaciones, el sistema de la presente invención proporciona la discriminación entre muestras de aliento obtenidas de pacientes de cáncer de pulmón en diferentes fases (o tamaños tumorales) de la enfermedad.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno en el que una población de células se ha vuelto, en grados variables, insensible a los mecanismos de control que normalmente rigen la proliferación y la diferenciación. Cáncer se refiere a diversos tipos de neoplasmas y tumores malignos, incluyendo tumores primarios, y metástasis tumoral. Los ejemplos no limitantes de cánceres que pueden detectarse por el conjunto de sensores y el sistema de la presente invención son cánceres de cerebro, ovario, colon, próstata, riñón, vejiga, mama, pulmón, oral y de piel. Los ejemplos específicos de cánceres son: carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas y tumores de tipo mixto. Las categorías particulares de tumores incluyen trastornos linfoproliferativos, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer de huesos, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de la tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de piel, cáncer de riñón, así como metástasis de todos los anteriores. Los tipos particulares de tumores incluyen carcinoma hepatocelular, hepatoma, hepatoblastoma, rabdomiosarcoma, carcinoma esofágico, carcinoma tiroideo, ganglioblastoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdoteliosarcoma, carcinoma ductal invasivo, adenocarcinoma papilar, melanoma, carcinoma pulmonar de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma (bien diferenciado, moderadamente diferencial, deficientemente diferenciado o no diferenciado), carcinoma bronquioalveolar, carcinoma de células renales, hipernefoma, adenocarcinoma hipernefroideo, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, tumor testicular, carcinoma de pulmón, incluyendo carcinoma de pulmón de células pequeñas, de células no pequeñas y de células grandes, carcinoma de vejiga, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, retinoblastoma, neuroblastoma, carcinoma de colon, carcinoma rectal, neoplasias malignas incluyendo todos los tipos de leucemia y linfoma, incluyendo: leucemia mielógena aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mastocítica, mieloma múltiple, linfoma mieloide, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin.

El cáncer a diagnosticar puede seleccionarse entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer pancreático, linfoma, mieloma, leucemia, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de hueso, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de colon, y cáncer de tiroides. De acuerdo con realizaciones ejemplares, el cáncer a diagnosticar se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de riñón. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

Debido a las dimensiones en miniatura del conjunto de sensores (en el intervalo de 10-100 nanómetros a unos pocos micrómetros), podría instalarse en cualquier dispositivo electrónico incluyendo, pero sin limitación, un reloj o un teléfono móvil. La integración del conjunto de sensores en un dispositivo electrónico usado comúnmente permite que se use como un sistema de alerta para el inicio del cáncer.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un revestimiento orgánico" incluye una pluralidad de dichos revestimientos orgánicos y equivalentes de los mismos para los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Los principios de la presente invención se demuestran por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

### **Ejemplos**

#### Ejemplo 1: Recogida de aliento exhalado

Después de una exhalación profunda, los sujetos inhalaban hasta la capacidad pulmonar total a través de una boquilla que contenía un cartucho en el puerto de aspiración, con el fin de retirar más del 99,99 % de los contaminantes ambientales de VOC del aire inhalado durante la inspiración. Después, los sujetos exhalaban contra 5 10-15 cm de presión de H<sub>2</sub>O para asegurar el cierre del velo para excluir el arrastre de gas. El gas exhalado se recogió a través de un puerto de exhalación separado de la boquilla en una bolsa de muestreo de gas Mylar no reactiva (adquirida en Eco Medics), que se limpió previamente con gas N<sub>2</sub>. Se realizaron al menos cinco análisis en el aliento exhalado de cada sujeto. Se usó un total de 90 muestras de aliento en las que 26 se obtuvieron de individuos sanos y 64 se obtuvieron de pacientes de cáncer de pulmón. Los pacientes fueron previamente 10 diagnosticados clínicamente usando diversos métodos de diagnóstico, incluyendo biopsia con broncoscopio, exploración por tomografía computerizada (CT) y punción pulmonar. Ninguno de los pacientes de cáncer de pulmón había recibido quimioterapia y/u otro tratamiento antes de que se recogieran las muestras de aliento.

Ejemplo 2: Análisis de aliento exhalado por GC-MS

15 Las muestras de aliento exhalado de sujetos con cáncer de pulmón y de individuos sanos se recogieron en bolsas de muestras Mylar y se analizaron con cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS) en combinación con microextracción en fase sólida (SPME). La técnica SPME se usa para concentrar previamente los VOC en las muestras de aliento. Se insertó un soporte de SPME manual con una fibra de extracción recubierta con: 1) 20 Polidimetilsiloxano (PDMS), 2) Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS/DVB), o 3) Polidimetilsiloxano-Carboxeno (PDMS/Carboxeno) (adquiridos en Sigma-Aldrich) en la bolsa Mylar. Se concentraron entre 500 y 1.000 cm<sup>3</sup> de cada muestra de aliento a través del método SPME con un periodo de extracción de 2 horas, y se administró a GC-MS usando un soporte de SPME manual. La fibra extraída en el soporte de SPME manual se insertó en el inyector GC que funcionó usando el modelo sin fraccionamiento. El perfil de temperatura de la estufa fue: 60 °C, 2 min, 8 °C/min 25 a 100 °C, 15 °C/min a 120 °C, 8 °C/min a 180 °C, 15 °C/min a 200 °C, 8 °C/min a 225 °C. Se usó una columna capilar H5-5MS al 5 % Fenil Metil Siloxano (30 m de longitud, 0,25 mm de d.i., 0,25 µm de espesor). La presión de columna se ajustó a 8,22 psi (56,67 kPa), y el flujo inicial fue de 1,0 ml/min. Finalmente, las estructuras moleculares de los VOC se determinaron a través del conjunto modular estándar.

30 El análisis por GC-MS identificó 33 VOC comunes (Tabla 1) que se habían sintetizado o catabolizado en muestras de aliento de individuos sanos y de pacientes de cáncer de pulmón. De los cuales, se encontraron 11 VOC específicos (Tabla 2) únicamente en el aliento de pacientes de cáncer de pulmón y no en el aliento de individuos sanos, con al menos una confianza del 83 %. La figura 1 muestra la relación de abundancia promedio de 33 VOC (el nombre correspondiente puede encontrarse en la Tabla 1) en muestras de aliento de individuos sanos (controles; 35 triángulos) y en muestras de aliento de pacientes de cáncer de pulmón (círculos). Los compuestos detectados son en su mayor parte alcanos C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> lineales y monometilados, además de ciertos derivados de benceno. Los compuestos que se observaron en muestras de aliento de individuos sanos y pacientes de cáncer de pulmón, estaban presentes no solo en diferentes concentraciones, sino también en composiciones de mezcla distintivas. La figura 1 muestra claramente que los VOC detectados en muestras de aliento de individuos sanos forman un único 40 patrón que difiere del patrón de los VOC en muestras de aliento de pacientes con cáncer de pulmón. Se descubrió que casi todos los VOC estaban en concentraciones más altas en muestras de pacientes de cáncer de pulmón, con las excepciones de VOC1, VOC11, VOC14, VOC25 y VOC26.

45 Tabla 1. VOC que se detectaron en muestras de aliento obtenidas de individuos de control y pacientes de cáncer de pulmón

Símbolo	VOC	Símbolo	VOC	Símbolo	VOC
VOC1	Hidrazina-carboxamida	VOC12	Benceno, 1-metil-2-(1-metiletil)-	VOC22	Undecano, 4,7-dimetil-
VOC2	Hidrazina, metil-	VOC13	Benceno, 1-metil-3-(1-metiletil)-	VOC23	2,4,6-Tris(1,1-dimetil-etil)-4-metilciclohexa-2,5-dien-1-ona
VOC3	Alcohol etílico	VOC14	1,3,5-Cicloheptatrieno	VOC24	Octano,2,6,6-trimetilo
VOC4	o-Xileno	VOC15	Hexano, 3-metilo	VOC25	2-Butanona
VOC5	Benceno, 1-metil-4-(1-metiletilo)	VOC16	Pentano, 3-etil-	VOC26	Hidrazina
VOC6	Etilbenceno	VOC17	1,3,5,7-Ciclooctatetraeno	VOC27	1,3-Pentadieno
VOC7	Estireno	VOC18	Biciclo[4,2,0]octa-1,3,5-trieno	VOC28	Pentano, 3,3-dimetil-
VOC8	Tolueno	VOC19	Hexano, 2,3,4-trimetil-	VOC29	Hexano, 3,3-dimetil-

VOC9	Éter dimetilico	VOC20	Fenol, 2,6-bis(1,1-dimeteil)-4-metil-, metilcarbamato	VOC30	Hexano, 2-metil-
VOC10	Hidroxitolueno butilado	VOC21	Heptano, 2,4dimetilo	VOC31	Hexano, 3-etil-
VOC11	dihidrazida carbónica			VOC32	Hexano, 2,2,3-trimetil-
				VOC33	Ciclopropano, etilideno

Tabla 2. VOC que se detectaron únicamente en muestras de aliento de pacientes de cáncer de pulmón

VOC Nombre	Promedio de abundancia	Desviación estándar	Porcentaje de pacientes
Octano, 4-metil-	0,8913 %	0,8648 %	100 %
1-Hexanol, 2-etil-	0,3324 %	0,2378 %	91,7 %
1-Pentanol, 2-etil-4-metil-	0,3758 %	0,2795 %	91,7 %
Pentano, 2,3,4-trimetil-	0,4054 %	0,4231 %	91,7 %
Hexano, 2,3-dimetil-	1,5288 %	1,0017 %	91,7 %
Fluoruro de trimetilsililo	1,3335 %	0,8325 %	83,3 %
Silanodiol, dimetil-	0,7075 %	0,5258 %	83,3 %
2-Pentanona, 3-etil-3-metil-	0,8339 %	0,3319 %	83,3 %
4,6-Octadiin-3-ona, 2-metil-	0,1650 %	0,0976 %	83,3 %
2-Propil-1-pentanol	0,7412 %	0,8930 %	83,3 %
5,9-Dodecadien-2-ona, 6,10-dimetil-, (E,E)-	0,5493 %	0,3297 %	83,3 %

Ejemplo 3: Síntesis y recubrimiento de nanopartículas de oro

5

Las nanopartículas de oro que tenían un tamaño medio de aproximadamente 5 nm se recubrieron con una diversidad de alcanotiolatos que tenían longitudes de cadena de C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> y alcanotiolato ω-funcionalizado (por ejemplo, 11-mercapto-1-undecanol). Las nanopartículas de oro se sintetizaron usando el método de dos fases estándar de acuerdo con Brust y col. (J. Chem. Soc., Chem. Com., 801, 1994, 2), con algunas modificaciones de acuerdo con Hostetler y col. (Langmuir, 1998, 14, 24). En resumen, AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> se transfirió en primer lugar de una solución acuosa de HAuCl<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O (25 ml, 31,5 mM) a una solución de tolueno por el reactivo de transferencia de fase TOAB (80 ml, 34,3 mM). Después de aislar la fase orgánica, el exceso de los tioles se añadió entonces a la solución. La relación molar de tiol:HAuCl<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O varió entre 1:1 y 10:1 dependiendo del tipo de tiol, con el fin de preparar una solución monodispersada de nanopartículas de oro en un tamaño medio de 5 nm. Por ejemplo, las relaciones molares de tiol:Au fueron de 10:1 y 1:1 para nanopartículas de oro recubiertas con dodecanotiol y butanotiol, respectivamente, a un tamaño medio de 5 nm. Después de la agitación vigorosa de la solución durante 10 min, se añadió una solución acuosa del agente reductor NaBH<sub>4</sub> en gran exceso (25 ml, 0,4 M, enfriada con hielo). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante al menos 3 horas, lo que produjo una solución de color pardo oscuro de las nanopartículas de oro recubiertas con tiol. La solución resultante se sometió a una eliminación del disolvente en un evaporador rotatorio y se siguió de múltiples lavados usando etanol y tolueno.

Las nanopartículas de oro recubiertas con 2-mercaptobenzoazol se sintetizaron por el método de intercambio de ligando de las nanopartículas de oro recubiertas con hexanotiol preparadas previamente. En un exceso de reacción típico de tiol entrante, se añadió 2-mercaptobenzoazol (7 µg) a una solución de nanopartículas de oro recubiertas con hexanotiol en tolueno (3 mg/ml, 5 ml). La solución estuvo en agitación constante durante algunos días para permitir una conversión de ligandos máxima. Las nanopartículas se purificaron de ligandos libres de tiol mediante extracciones repetidas.

Las nanopartículas de oro se caracterizaron usando microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se prepararon muestras para TEM por deposición por goteo 5:1 de una solución de nanopartículas diluida en tolueno sobre moliendas de cobre recubiertas con carbono de malla 200. Las imágenes TEM (Modelo CM120, Philips, Países Bajos) de las nanopartículas de oro se obtuvieron a 120 kV. Las micrografías electrónicas de transmisión de las nanopartículas de oro confirmaron la distribución de tamaño estrecha de las nanopartículas con un diámetro medio de aproximadamente 5 nm.

35

Ejemplo 4: Fabricación de sensores



Los electrodos interdigitados en primer lugar se modelan o depositan sobre la parte superior de la oblea de silicio dopada por p degenerativa que tiene una película de SiO<sub>2</sub> 300 nm (de espesor), usando un proceso de litografía o la evaporación de metal a través de una máscara de sombra. Se muestra una ilustración esquemática del dispositivo en la figura 2(A). El diámetro de los electrodos en espiral es de aproximadamente 3000 μm, y las anchuras de los 5 electrodos de metal son aproximadamente 20 μm cada vez.

En particular, las nanopartículas de oro funcionalizadas (véase la tabla 3) que tenían un diámetro medio de aproximadamente 5 nm (figura 2(B) y figura 2(C)), se dispersaron en cloroformo por sonicación, seguido de una gota de deposición de una solución de nanopartículas de oro en el electrodo. Aunque aún recubierto con una solución, el 10 sustrato se sopló con una corriente de N<sub>2</sub> seco. Este proceso se repitió varias veces para producir la resistencia deseada, preferiblemente de 20 KΩ a 5 MΩ. En otros ejemplos, se prepararon resistencias de película de 5 MΩ a 80 MΩ. El dispositivo se secó durante 2 horas en una campana de gases a una temperatura ambiente, y después se calentó a 50 °C en un horno de vacío durante una noche.

15 **Tabla 3. Compuestos usados para revestir las nanopartículas de oro del conjunto de sensores**

Sensor N°	Moléculas funcionales	S5	2-Etilhexanotiol
S1	4-metoxi-toluenotiol	S6	2-Mercaptobenzoazol
S2	11-mercapto-1-undecanol	S7	Hexanotiol
S3	Decanotiol	S8	Terc-dodecanotiol
S4	1-Butanotiol	S9	3-Metil-1-butanotiol

Ejemplo 5: Respuesta del conjunto de sensores a biomarcadores particulares indicativos de cáncer de pulmón

Los sensores desarrollados del ejemplo 4 se montaron en una placa de circuitos PTFE personalizada que tenía 10 20 sitios de sensor separados. Después, la placa se montó sobre una cámara de ensayo de acero inoxidable que tenía un volumen de menos de 100 cm<sup>3</sup>. Se usó un conmutador multifunción Agilent 34980 controlado por USB para escoger el sensor activo y medir la resistencia correspondiente en un momento dado. Todo el sistema se controló por un programa Labview personalizado.

25 Para probar la sensibilidad de los sensores a los biomarcadores indicativos de cáncer de pulmón, se realizaron mediciones de la respuesta a biomarcadores particulares usando un sistema burbujeador personalizado de acuerdo con Peng y col. (Nano Letters, 8(11), 2008, 5). La respuesta se midió como  $\Delta R/R_b$ , donde  $R_b$  es la resistencia inicial del sensor en ausencia de analito, y  $\Delta R$  es el cambio de resistencia en estado estable corregido inicial tras la exposición del sensor a un analito.

30 En primer lugar, se examinó la respuesta del conjunto de sensores de nanopartículas de oro a los diferentes biomarcadores de cáncer de pulmón a concentraciones entre 0,001P/P° y 0,05 P/P° (P° es la presión de vapor saturada del analito correspondiente a temperatura ambiente). La figura 3 muestra la respuesta de un sensor de nanopartículas de oro recubierto con terc-dodecanotiol (sensor número 8) a diversos analitos. En particular, los 35 analitos que se usaron incluyen biomarcadores de decano, trimetil benceno, etil benceno y heptanol. Como puede observarse a partir de la figura, la respuesta del sensor fue rápida tras la exposición al vapor de analito. Además, la respuesta fue completamente reversible tras cambiar de nuevo a vapor de analito nulo (aire purificado, seco). Sobre todo, el sensor fue sensible a una gran diversidad de concentraciones de vapores de analito con excelente relación señal-ruido (típicamente, más de 10).

40 También se ensayó la respuesta del sensor al vapor de agua se ensayó. Esta característica es significativa, ya que el aliento exhalado contiene una alta concentración de vapores de agua que pueden impedir las mediciones de VOC indicativos de cáncer debido a sus concentraciones relativamente bajas en muestras de aliento. La figura 3 muestra claramente que las respuestas a biomarcadores de cáncer de pulmón son mucho mayores que la respuesta a los 45 vapores de agua que indican la alta sensibilidad del sensor a los biomarcadores de cáncer de pulmón incluso en presencia de altas concentraciones de vapores de agua.

Ejemplo 6: El efecto de la distribución del tamaño de nanopartículas y el espesor del revestimiento orgánico sobre la respuesta electrónica

50 Con el fin de determinar el efecto del espesor del revestimiento orgánico sobre las respuestas de resistencia diferenciales relativas  $\Delta R/R_b$ , se usaron nanopartículas de Au que tenían un diámetro medio de aproximadamente 5,2 nm que se revistieron con ligandos de dodecanotiol en diversos grosores. Las nanopartículas de Au recubiertas

con dodecanotiol se expusieron a decano a 0,05 P/P° y se midieron los valores  $\Delta R/R_b$ . La figura 4 muestra que los niveles de señal dependen en gran medida del espesor del revestimiento orgánico con las bajas respuestas obtenidas para espesores por encima de 10 nm. El ruido calculado muestra un patrón similar al de la señal, indicando que el descenso de la señal en grosores por encima de 10 nm no se debe a un aumento del nivel de ruido.

5

Con el fin de determinar el efecto de la distribución del tamaño de nanopartículas en la señal de los sensores, se usaron nanopartículas de Au con hexanotiol que tenían un tamaño de núcleo medio de aproximadamente 3,6 nm y tamaños que varían de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 18 nm. Una cantidad igual de una solución de nanopartículas de Au con hexanotiol se aplicó en electrodos interdigitados separados (donde cada electrodo se separa de su electrodo adyacente en 10  $\mu\text{m}$ ) y se expuso a diferentes analitos, tales como hexano, heptano, decano, metil benceno, tolueno, etanol, etc. Los sensores se expusieron simultáneamente a un analito determinado a una concentración dada. La figura 5 muestra el efecto de la distribución del tamaño sobre la señal de detección y/o sobre las relaciones señal-ruido de quimiorresistores basados en nanopartículas de Au esféricas recubiertas con hexanotioles. Un aumento en la distribución del tamaño disminuye las relaciones señal-ruido y adicionalmente disminuye la respuesta del sensor.

Por lo tanto, la utilización de nanopartículas que tienen una distribución de tamaño estrecha proporciona señales de detección mejoradas con más de 10 veces la señal de detección obtenida de una distribución de tamaño mas amplia de nanopartículas (tamaño de nanopartículas en el intervalo de 2-18 nm). Los sensores compuestos por nanopartículas con una distribución de tamaño estrecha son, por lo tanto, ventajosos para detectar VOC indicativos de cáncer con sensibilidades muy altas. El espesor del recubrimiento puede optimizarse adicionalmente con respecto a un espesor particular, de acuerdo con los compuestos orgánicos usados, para mejorar las señales de detección.

#### 25 Ejemplo 7: Respuesta del conjunto de sensores a muestras de aliento de individuos sanos y pacientes con cáncer de pulmón

Se ensayó la respuesta del conjunto de sensores a muestras de aliento de individuos sanos y pacientes con cáncer de pulmón. Se usaron en estos experimentos una fuente de vacío y dos interruptores en los que un lado se conectó a la cámara de pruebas, y el otro lado se conectó a la fuente de vacío ("interruptor de vacío") o la muestra de aliento ("interruptor de muestra"). En un experimento típico, las señales de los elementos del conjunto de sensores se recogieron durante 5 minutos de entorno de vacío abriendo el interruptor de vacío y cerrando el interruptor de muestra, seguido de 5 minutos de exposición a muestras de aliento que se recogieron como se ha descrito en el Ejemplo 1 anteriormente en el presente documento, después seguido de otros 5 minutos de entorno de vacío. Las dos últimas etapas se repitieron tres veces para evaluar la reproducibilidad. El análisis de datos de las señales que se recogieron de todos los sensores en el conjunto, se realizó usando análisis de componentes principales estándar y de conglomerados.

Las figuras 6A y 6B muestran las respuestas de resistencia diferenciales relativas,  $\Delta R/R_b$  de los sensores N° S2, S3 y los sensores N° S6, S8, respectivamente a muestras de aliento que se recogieron en una bolsa. Las muestras de aliento se obtuvieron de pacientes de cáncer de pulmón y de individuos sanos (controles) típicos. Las respuestas observadas fueron rápidas (1-10 segundos), completamente reversibles con una reproducibilidad extremadamente buena para todas las muestras. En particular, el sensor N° S2 y el sensor N° S3 mostraron un descenso significativo de la resistencia, mientras que el sensor N° S6 y el sensor N° S8 mostraron un pequeño aumento en la resistencia.

45

En general, se observaron dos tipos de respuestas. La primera es una disminución relativamente grande de la quimiorresistencia como ocurrió, por ejemplo, en S2, S3, S5 y S9. La segunda es un aumento relativamente pequeño de la quimiorresistencia como ocurrió, por ejemplo, en S1, S4, S6, S7 y S8. Sin desear quedar ligado a teoría o mecanismo de acción alguno, los cambios en la resistencia tras la exposición al analito pueden atribuirse al engrosamiento debido a un aumento de distancia de túnel interpartícula que puede aumentar la resistencia o a un aumento en la permitividad de la matriz orgánica que rodea las nanopartículas de metal que pueden disminuir la resistencia debido a un descenso en la energía de activación y una reducción de barreras de pozo potenciales entre las nanopartículas de metal.

55 Se calculó la respuesta media obtenida durante los 3 primeros minutos de exposición a una muestra dada en todos los ciclos. Las figuras 7A-7B muestran los patrones en un espacio multi-sensor para todas las muestras de aliento, incluyendo 64 muestras de aliento de pacientes de cáncer de pulmón y 26 muestras de aliento de individuos sanos. La respuesta a muestras de aliento de cáncer de pulmón fue significativamente diferente de la obtenida para muestras de aliento de individuos sanos. Aunque ciertos sensores proporcionaron cierto solapamiento entre las

muestras, el patrón de muestras "sanas" fue inequívocamente diferente del patrón de muestras de "cáncer de pulmón". Además, se usó el análisis de componentes principales (PCA) para analizar todas las respuestas del conjunto de sensores. La figura 8 muestra la respuesta en el espacio de los componentes principales de un conjunto de sensores de 9 sensores (ejemplo 4) expuesto a muestras de aliento de pacientes de cáncer de pulmón y de individuos sanos. Puede observarse a partir de la figura 8 que no hay ningún solapamiento en los patrones obtenidos de muestras de pacientes de cáncer de pulmón y de individuos sanos. Por lo tanto, un conjunto de sensores de 9 sensores, junto con algoritmos de reconocimiento de patrón, proporciona respuestas con buena discriminación entre patrones de aliento de pacientes con cáncer de pulmón y de individuos sanos.

10 Ejemplo 8: Respuesta del conjunto de sensores a muestras de aliento obtenidas de individuos sanos y de pacientes con cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de próstata

La respuesta del conjunto de sensores a muestras de aliento de individuos sanos y pacientes con diferentes tipos de cáncer se ensayó de forma similar al procedimiento descrito en el ejemplo 7 anteriormente en el presente documento. Particularmente, se obtuvieron muestras de aliento de pacientes que padecían diferentes tipos de cánceres para determinar la sensibilidad de los sensores a diferentes y distintivos patrones de VOC. Los diferentes cánceres ensayados fueron cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de próstata. Las figuras 9-12 muestran la respuesta en el espacio de los componentes principales de un conjunto de sensores de 9 sensores al exponerse a muestras de aliento de pacientes con cáncer de mama (figura 9), cáncer de colon (figura 10), cáncer de cabeza y cuello (figura 11), y cáncer de próstata (figura 12) ensayado cada uno frente a muestras de aliento de individuos sanos.

Usando únicamente dos componentes principales, el conjunto de sensores de la presente invención fue capaz de discriminar entre patrones de cáncer y patrones sanos. De forma importante, la discriminación se obtuvo para diversos tipos de cáncer. Esto demuestra claramente la aplicabilidad del conjunto de sensores y el sistema de la presente invención para su uso clínico en el diagnóstico de diversos tipos de cáncer.

Ejemplo 9: Discriminación entre células de cáncer de pulmón diferentes

30 Para determinar la viabilidad de usar el conjunto de sensores de la presente invención para el diagnóstico de cáncer de pulmón en diferentes estadios de progresión, se usaron muestras que contenían 4 VOC a diferentes relaciones. De acuerdo con Chen y col. (Cancer, 110(4), 2007, 835), las relaciones de estos cuatro VOC (isopreno, hexano (o hexanal), decano (o trimetil benceno) y undecano) indican diferentes fases de la enfermedad del cáncer de pulmón. Por ejemplo, puede usarse una mezcla de 51,5 ppb de isopreno, 15,1 ppb de hexano (o hexanal), 12,5 ppb de decano (o trimetil benceno) y 7,2 ppb de undecano para aliento de cáncer de pulmón simulado de carcinoma pulmonar de células escamosas. Las figuras 13A-13D muestran los resultados del análisis por GC-MS de 4 VOC metabólicos que simulan 4 células de cáncer de pulmón diferentes, concretamente, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma bronquioalveolar, y carcinoma de células no pequeñas *in vitro*.

40 Después, se prepararon diferentes relaciones de los 4 VOC y se expusieron usando un sistema generador de gas al conjunto de sensores en base a nanopartículas de Au recubiertas con las moléculas orgánicas como se describe en el ejemplo 4. Se realizaron dos simulaciones principales. En la primera simulación, se usaron isopreno, hexano, decano y undecano como los cuatro biomarcadores. La figura 14 muestra los datos en el espacio de componentes principales del conjunto de sensores que se expuso a 4 mezclas diferentes de los cuatro biomarcadores que simulan células de cáncer de pulmón seleccionadas entre carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma bronquioalveolar, y carcinoma de células no pequeñas. Es evidente a partir de estos resultados que el conjunto de sensores de 9 sensores es capaz de discriminar entre las diferentes mezclas de VOC básicamente si ningún solapamiento entre las cuatro condiciones.

50 En la segunda simulación, se usaron isopreno, hexano, trimetil benceno y undecano como los cuatro biomarcadores. La figura 15 muestra los datos en el espacio del componente principal del conjunto de sensores que se expuso a 4 mezclas diferentes de los cuatro biomarcadores que simulan células de cáncer de pulmón seleccionadas entre carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma bronquioalveolar, y carcinoma de células no pequeñas. El conjunto de sensores de 9 sensores fue capaz de discriminar entre las diferentes mezclas de VOC donde el único solapamiento es entre carcinoma bronquioalveolar y carcinoma de células no pequeñas. Puede obtenerse una separación adicional a través del uso de 3 componentes principales o a través de un ajuste del revestimiento orgánico.

Por lo tanto, se muestra claramente que, un conjunto de sensores que comprende nueve sensores de

nanopartículas de oro recubiertas con alcanotiolatos proporciona alta sensibilidad a los biomarcadores de diversos cánceres, y puede usarse junto con algoritmos de reconocimiento de patrones para proporcionar una total discriminación entre muestras de aliento de individuos sanos y muestras de aliento de pacientes que padecen uno cualquiera de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon y cáncer de próstata.

5 Además, los resultados presentados en el presente documento muestran que el conjunto de sensores de la presente invención proporciona discriminación entre mezclas de VOC que simulan diferentes fases (o tamaños tumorales) de cáncer de pulmón. Por lo tanto, el conjunto de sensores de la presente invención puede usarse clínicamente, para un diagnóstico temprano de cáncer de pulmón, así como otros tipos de cáncer.

10 Ejemplo 10: Población de ensayo

Se tomaron muestras de aliento de 68 voluntarios con edades de 30-75, que no habían ingerido café o alcohol durante al menos 1 hora y 12 horas, respectivamente, después del consentimiento firmado. Los voluntarios se dividieron como se indica a continuación: 22 pacientes de cáncer de pulmón primario, 17 pacientes de cáncer de

15 colon primario, 15 pacientes de cáncer de mama primario, y 14 pacientes de cáncer de próstata primario. Además, se usaron 18 individuos sanos que coincidieron en edad y estilo de vida con los pacientes de cáncer de ensayo como controles. Todos los pacientes de cáncer se ensayaron directamente después de un diagnóstico mediante métodos clínicos convencionales (por ejemplo, biopsia por broncoscopio, exploración por tomografía computerizada, punción pulmonar, colonoscopia, mamografía, etc.) y antes de la quimioterapia y/u otro tratamiento contra el cáncer.

20 No se realizó ninguna recogida de aliento en los 4 días siguientes a la biopsia. Las características clínicas de la población de estudio para pacientes de cáncer y voluntarios sanos se enumeran en la Tabla 4. Se tomaron muestras de aliento adicionales de 59 voluntarios sanos, con edades de 20-79, para estudiar el efecto de diversos factores de desviación. Todos los experimentos se aprobaron por, y se realizaron de acuerdo con las directrices del comité del Technion para la supervisión de experimentos con seres humanos (Haifa, Israel).

Tabla 4: Características clínicas de 68 pacientes de cáncer y 18 controles sanos. La relación total entre varones y mujeres es de ~1:1.

Tipo de cáncer	Ensayado por GC-MS	Ensayado por conjunto de sensores	Nº de pacientes	Fumador (S/N)	Ex-fumador (S/N)	Histología	Estado	Datos adicionales
Cáncer de pulmón	x		1	S		NSCLC <sup>(1)</sup>	3A	
	x		1	S		NSCLC	3A	Diabetes; Toma Glucofago
		x	1	S		NSCLC	3A	Afección cardíaca isquémica; Toma Plavix, Aspirina.
Cáncer de colon	x	x	1	S		n/a	3B	Niveles altos de colesterol, HTV; Toma Simoville, Aspirina
	x		1	N	N	NSCLC	3B	Diabetes; Toma diversos medicamentos.
	x	x	1	N	S	NSCLC	3B	Toma Optialgin, Oxycontin
		x	1	n/a	n/a	n/a	3B	
		x	1	N	S	NSCLC	3	
	x	x	1	N	N	NSCLC	4	
	x		1	N	N	NSCLC	4	
		x	1	N	S	SqCLC <sup>(2)</sup>	4	HTV, Hiperlipidemia; Toma Normiten, Omnic, Simovill
	x		1	N	N	NSCLC	4	Toma Normiten, Simoville, Teraperin, Omperdex
	x		1	S		NSCLC	4	
		x	1	S		NSCLC	4	Enfermedad cardíaca; Toma diversos medicamentos
		1	S		n/a	4	Presión arterial alta; Toma Kaptobril	
	x	1	n/a	n/a	n/a	4		
	x	1	N	N	NSCLC	4		
	x	1	N	N	NSCLC	4	Infarto; Toma Valium	
x		1	N	N	NSCLC	n/a	Toma medicamentos, no realizó el ensayo adecuadamente	
x		1	S	S	NSCLC	n/a		
	x	1	S	S	NSCLC	n/a		
		1	C	C	Tubotestis	Adenoma		Pre-neoplásico

x	x	1	N	N	N	tubulovelloso	1	
	x	1	N	N	S	AC modificado <sup>(17)</sup> Recto	2	
						AC		
x		1	S	S		n/a	2	
x		2	N	N		n/a	2	
x		1	N	N		n/a	2	Presión arterial alta; Toma diversos medicamentos
x		1	S	S		AC del recto	2	Presión arterial alta; Toma diversos medicamentos
x		1	N	N		n/a	3	Fibrilación atrial; Toma diversos medicamentos
x	x	1	N	N	S	AC del recto	3	Diabetes, presión arterial alta; Toma diversos medicamentos
x	x	1	N	N	S	AC del recto	3	Hiperlipidemia, presión arterial alta; Toma diversos medicamentos
x	x	1	N	N		AC del recto	3	Diabetes, presión arterial alta; Toma diversos medicamentos
x		1	N	N		AC del recto	3	
x		1	N	N		n/a	4	
x		1	S	S		AC del recto	4	Presión arterial alta; Toma Normiten
x		1	S	S		AC del recto	4	
x	x	1	S	S		NEC <sup>(18)</sup>	4	
x		1	N	N		n/a	1	Enfermedad cardíaca, Presión arterial alta, Osteoporosis; Toma diversos medicamentos
x		1	N	N		n/a	1	Trombocitopenia; Toma diversos medicamentos
	x	1	N	N		IDC(5)	1	Gastritis, presión arterial alta; Toma diversos medicamentos
x		1	N	N		IDC	2	Presión arterial alta, Hiperlipidemia; Toma Cilanti Plus y Simoville
	x	1	N	N		n/a	3	
	x	1	N	N		n/a	3	Epilepsia; Toma Doublephat Lamcital y

												Clonax	
x			1	N	N							n/a	Presion arterial alta, Diabetes; Toma diversos medicamentos
x	x		1	N	N							n/a	
x			1	N	N							n/a	Hipoactividad de las glandulas tiroideas; Toma Altroxin y vitaminas
x			1	N	N							n/a	
x	x		1	N	N							n/a	Varias afecciones medica; Toma diversos medicamentos
x			1	N	N							n/a	Diabetes
x			1	N	n/a							n/a	
x			1	N	N							1	
x			1	N	N							1	Glaucoma; Toma diversos medicamentos
x			1	N	N							1	Diabetes; Toma diversos medicamentos
x	x		1	N	N							1	Presion arterial alta; Toma Enaladex
x	x		1	N	N							1	Diabetes, Derivacion coronaria; Toma diversos medicamentos
x			1	N	N							1	Presion arterial alta; Toma diversos medicamentos
x			1	N	N							1	Diabetes, presion arterial alta e Hiperlipidemia; Toma diversos medicamentos
x			1	N	S							1	Arritmia cardiaca; Toma diversos medicamentos
x			1	N	S							1	
x	x		1	N	N							1C	Varias afecciones de salud; Toma diversos medicamentos
x			1	N	N							2	Varias afecciones de salud; Toma diversos medicamentos
x	x		1	N	N							2	Diabetes, ictus cerebral dos años antes del ensayo de aliento; Toma diversos

								medicamentos	
		x	1	S		n/a	2	Problemas de espalda; Toma Casodex	
		x	1	S		AC	4	Presión arterial alta; Toma Enaladex y Clexan	
	x	x	4	N	N				
	x		5	N	N				
		x	2	N	N				
		x	1	S					
Control sano	x	x	1	N	N			Subactividad de las glándulas tiroideas; Toma Latroxin	
	x	x	1	N	N			Presión arterial alta	
	x		1	N	N			Presión arterial alta; Toma medicación para regular la presión arterial	
	x		1	N	N			Toma Altroxin	
		x	1	S				Diabetes	
		x	1	n/a	n/a				

(1) NSCLC = Carcinoma de pulmón de células no pequeñas  
 (2) SqCLC = Carcinoma de pulmón de células escamosas  
 (3) AC = Adenocarcinoma  
 (4) Carcinoma neuroendocrino  
 (5) IDC = Carcinoma ductal invasivo



Ejemplo 11: Recogida de aliento

El aliento exhalado se recogió de manera controlada a partir de la población de ensayo del ejemplo 10. El aire inhalado se limpió de contaminantes ambientales inhalando repetidamente hasta la capacidad pulmonar total durante 5 minutos a través de una boquilla (adquirida en Eco Medics) que contenía un cartucho de filtro en el puerto de aspiración, eliminando de esta manera más del 99,99 % de los VOC exógenos del aire durante la inspiración. Inmediatamente después del lavado pulmonar, los sujetos exhalaban a través de un puerto de exhalación separado de la boquilla contra 10-15 cm de presión de H<sub>2</sub>O para asegurar el cierre del velo para excluir el arrastre de gas. El aliento exhalado contenía una mezcla de aire alveolar y aire del espacio muerto respiratorio. Los sujetos exhalaban en el colector de aliento que automáticamente cargó el aire del espacio muerto en una bolsa separada y la respiración alveolar en una bolsa de muestreo Mylar de 750 ml (fluoruro de polivinilo, adquirida en Eco Medics) en un proceso de una única etapa. Las bolsas Mylar se reutilizaron y se limpiaron minuciosamente antes de cada uso con N<sub>2(g)</sub> fluido (99,999 % de pureza) durante 5-8 minutos (el análisis por GC-MS junto con técnicas de pre-concentración mostró que este proceso de purificación elimina >99 % de los contaminantes y/o los VOC de las bolsas Mylar). Se recogieron al menos dos bolsas de cada individuo para su análisis posterior. Todas las bolsas se analizaron en dos días desde el momento de la recogida del aliento para asegurar la precisión de los resultados.

Ejemplo 12: Fabricación del conjunto de sensores

Se preparó un conjunto de sensores compuesto por 14 quimiorresistores de reacción cruzada basados en compuestos de nanopartículas de Au de 5 nm revestidas con diferentes compuestos orgánicos. Las nanopartículas se sintetizaron mediante un método de dos fases modificado como se describe en el ejemplo 3. Los compuestos orgánicos que se usaron para revestir las nanopartículas son: dodecanotiol, 4-metoxi-toluenotiol, hexanotiol, 11-mercapto-1-undecanol, decanotiol, octadecanotiol, terc-dodecanotiol, 1-butanotilo, 2-etilhexanotiol, 3-metil-1-butanotiol, 2-mercaptobenzoxazol, 11-mercapto-1-undecanol, 2-mercaptobencil alcohol, y 3-Metil-1-butanotiol (todos adquiridos en Sigma-Aldrich).

Se depositaron diez pares de electrodos de oro interdigitados circulares por un evaporador de haz de electrones TFDS-870 (Vacuum Systems & Technologies Ltd., Israel) en obleas de silicio de calidad de dispositivo recubiertas con óxido térmico a 300 nm (adquirido en Silicon Quest International Inc., Santa Clara, CA). El diámetro externo del área de electrodo circular fue de 3000 µm; el espacio entre dos electrodos adyacentes y la anchura de cada electrodo fueron 20 µm ambos. Las nanopartículas de Au recubiertas se dispersaron en cloroformo por sonicación y se depositaron por goteo sobre los electrodos. Aún todavía recubierto con solución, el sustrato se sopló con N<sub>2</sub> seco. Este proceso se repitió varias veces para producir una resistencia deseada de aproximadamente 1 MΩ. El dispositivo se secó durante 2 horas a una temperatura ambiente y después se puso en un horno de vacío a 50 °C durante una noche. Después, los sensores se montaron sobre una placa de circuitos PTFE personalizada para formar el conjunto de sensores de 14 sensores.

Ejemplo 13: Ensayos de aliento

Antes de la exposición del conjunto de sensores del ejemplo 12 a muestras de aliento, se examinaron las respuestas de cada sensor al aliento de pacientes de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata, así como al aliento de controles sanos (figuras 16A, 16B y 16C). Los sensores de la presente invención respondieron rápidamente a las muestras de aliento de todos los pacientes de cáncer. Las respuestas fueron completamente reversibles. La mayor parte de los sensores mostraron un límite de detección de 1-5 ppb. Además, las nanopartículas de Au que se revistieron con 4-metoxi-toluenotiol, 2-mercaptobenzoxazol, o 11-mercapto-1-undecanol mostraron límites de detección de 2-10 ppb tras la exposición a acetaldehído (un VOC prometedor para cáncer de pulmón; Smith y col., Rapid Commun. Mass Spectrom., 17, 2003, 845) y formaldehído (un VOC prometedor para cáncer de mama; Ebeler y col., J. Chromatog. B, 702, 1997, 211), muy por debajo del nivel de concentración de estos VOC en aliento exhalado de pacientes de cáncer (Peng y col., Nature Nanotechnol., 4, 2009, 669).

La respuesta del conjunto de 14 sensores a muestras de aliento de pacientes sanos, de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata y cáncer de mama se analizó usando análisis de componentes principales (PCA). Las figuras 17A-17E muestran los primeros dos componentes principales (PC1 y PC2) para cada sujeto, lo que representa >88 % de varianza. Se obtuvo una buena separación entre patrones sanos y con cáncer, para cada tipo de cáncer por separado (figuras 17A-17D) y también para todos los tipos de cáncer en un único gráfico (figura 17E). Cabe destacar que estos resultados se consiguieron sin ningún tratamiento previo (concentración previa o deshumidificación) de las muestras de aliento. Por lo tanto, un conjunto de sensores que comprende 14 sensores de

nanopartículas de oro recubiertas con un revestimiento orgánico proporciona alta sensibilidad a biomarcadores indicativos de diversos tipos de cáncer. El conjunto de sensores junto con algoritmos de reconocimiento de patrones proporciona una discriminación completa entre muestras de aliento de controles sanos y muestras de aliento de pacientes que padecen uno cualquiera de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de

5 próstata.

## REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de sensores para detectar compuestos orgánicos volátiles indicativos de cáncer, comprendiendo el conjunto de sensores nanopartículas de oro (Au) conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico, en el que las nanopartículas de Au tienen una distribución del tamaño de partículas estrecha con un tamaño de partícula medio de 5 nm, un tamaño de partícula en el intervalo de 1-10 nm y una anchura de la curva de distribución a la mitad del valor máximo (FWHM) de menos de o igual al 40 % del tamaño de partícula medio, y en el que el espesor del revestimiento orgánico de dichas nanopartículas de Au está en el intervalo de 0,2-4 nm.
- 5 2. El conjunto de sensores de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las nanopartículas de Au tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 3-6 nm.
3. El conjunto de sensores de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el espesor del revestimiento orgánico está en el intervalo de 0,6-2 nm.
- 15 4. El conjunto de sensores de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el revestimiento orgánico comprende una monocapa o múltiples capas de compuestos orgánicos seleccionados entre moléculas pequeñas, monómeros, oligómeros y polímeros, preferiblemente en el que el revestimiento orgánico se selecciona entre el grupo que consiste en alquiltioles con cadenas C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>, alcanotiolatos ω-funcionalizados, arenotiolato, (γ-mercaptopropil)tri-metiloxisilano, dialquilo disulfuros, xantatos, oligonucleótidos, polinucleótidos, péptidos, proteínas, enzimas, polisacáridos, fosfolípidos, y combinaciones de los mismos.
- 20 5. El conjunto de sensores de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las nanopartículas de Au conductoras recubiertas con un revestimiento orgánico están en una configuración seleccionada entre cables 1D, 25 películas 2D, y conjuntos 3D.
6. El conjunto de sensores de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos uno de un quimiorresistor, quimiocondensador, microbalanza de cristal de cuarzo, resonador de onda acústica en bloque (BAW) y onda acústica de superficie (SAW), celda electroquímica, resonancia de plasmones superficiales (SPR), y espectroscopio óptico.
- 30 7. Un sistema para detectar un patrón de compuestos orgánicos volátiles indicativos de cáncer, comprendiendo el sistema:
  - 35 (i) un conjunto de sensores para detectar compuestos orgánicos volátiles indicativos de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y
  - (ii) un analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones, en el que el analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones recibe señales de salida de sensor y las compara con los datos almacenados.
- 40 8. El sistema de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el analizador de aprendizaje y reconocimiento de patrones comprende al menos un algoritmo seleccionado entre el grupo que consiste en algoritmos de redes neuronales artificiales, análisis de componentes principales (PCA), percepción multicapa (MLP), red neuronal de regresión generalizada (GRNN), sistemas de inferencia difusa (FIS), mapa autoorganizado (SOM), función de base radial (RBF), algoritmos genéticos (GAS), sistemas neuro-difusos (NFS), teoría de resonancia adaptativa (ART), 45 regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), regresión lineal múltiple (MLR), regresión de componentes principales (PCR), análisis de función discriminante (DFA), análisis discriminante lineal (LDA), análisis de conglomerados, y vecino más cercano, preferiblemente en el que al menos un algoritmo es análisis de componentes principales (PCA).
- 50 9. El sistema de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que comprende adicionalmente un aparato para recoger dichas muestras de aliento, preferiblemente en el que el aparato está diseñado para recoger respiración alveolar.
10. El sistema de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende adicionalmente al menos uno de un 55 concentrador de respiración y una unidad de deshumidificación.
11. Un método de diagnóstico de cáncer en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:
  - proporcionar un sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10;

- exponer el conjunto de sensores a una muestra de aliento exhalado; y  
usar algoritmos de aprendizaje y reconocimiento de patrones para determinar la presencia de un patrón de  
compuestos orgánicos volátiles indicativos de cáncer en la muestra, en el que los compuestos orgánicos  
volátiles indicativos de cáncer se seleccionan entre el grupo que consiste en 4-metil-octano, 2-etil-1-  
5 hexanol, 2-etil-4-metil-1-pentanol, 2,3,4-trimetil-pentano, 2,3-dimetil-hexano, fluoruro de trimetilsililo, dimetil-  
silanodiol, 3-etil-3-metil-2-pentanona, 2-metil-4,6-octadiin-3-ona, 2-propil-1-pentanol, decano, trimetil  
benceno, etil benceno, heptanol, isopreno, hexano, undecano y 6,10-dimetil-5,9-dodecadien-2-ona.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, para diferenciar entre diferentes tipos de cáncer o  
10 diferentes fases de un único tipo de cáncer.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo  
que consiste en cánceres de pulmón, cabeza y cuello, mama, próstata, colon, ovario, riñón, vejiga, oral, y de piel,  
preferiblemente en el que el cáncer es cáncer de pulmón.

Figura 1

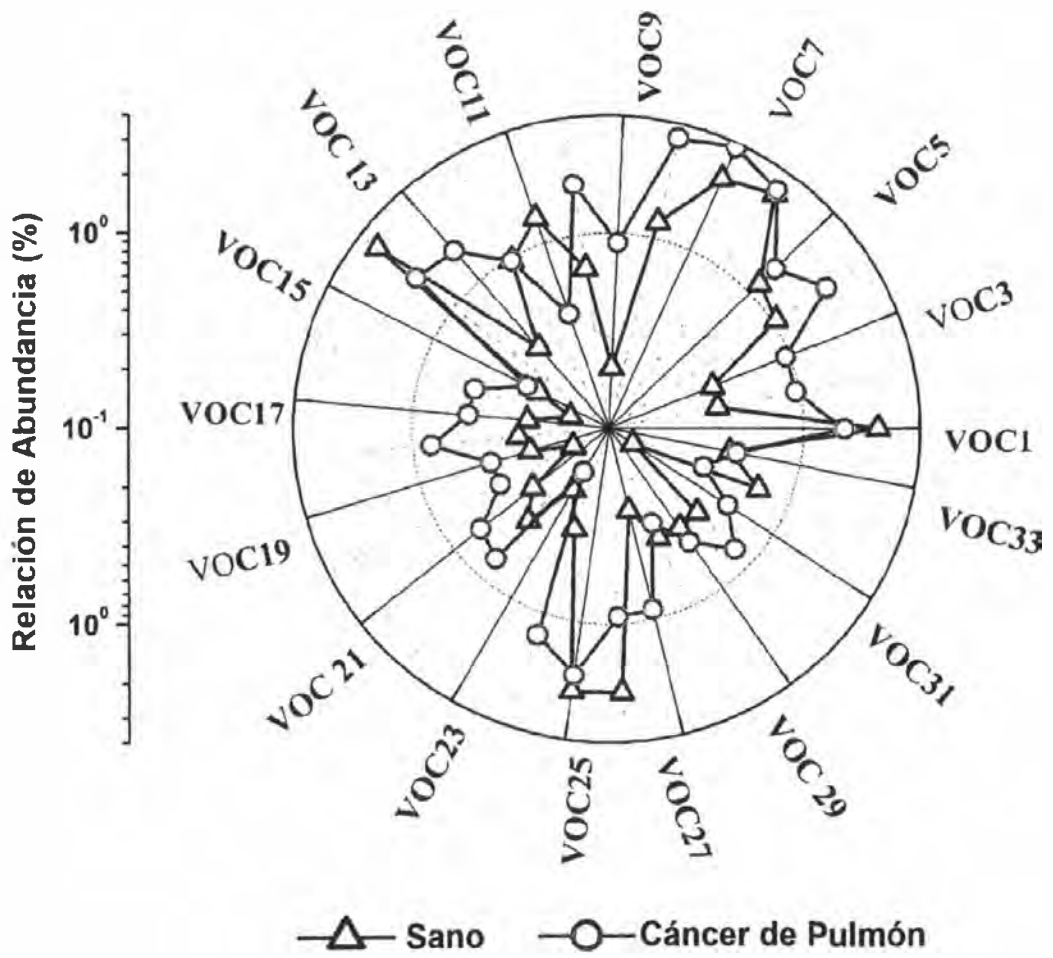


Figura 2

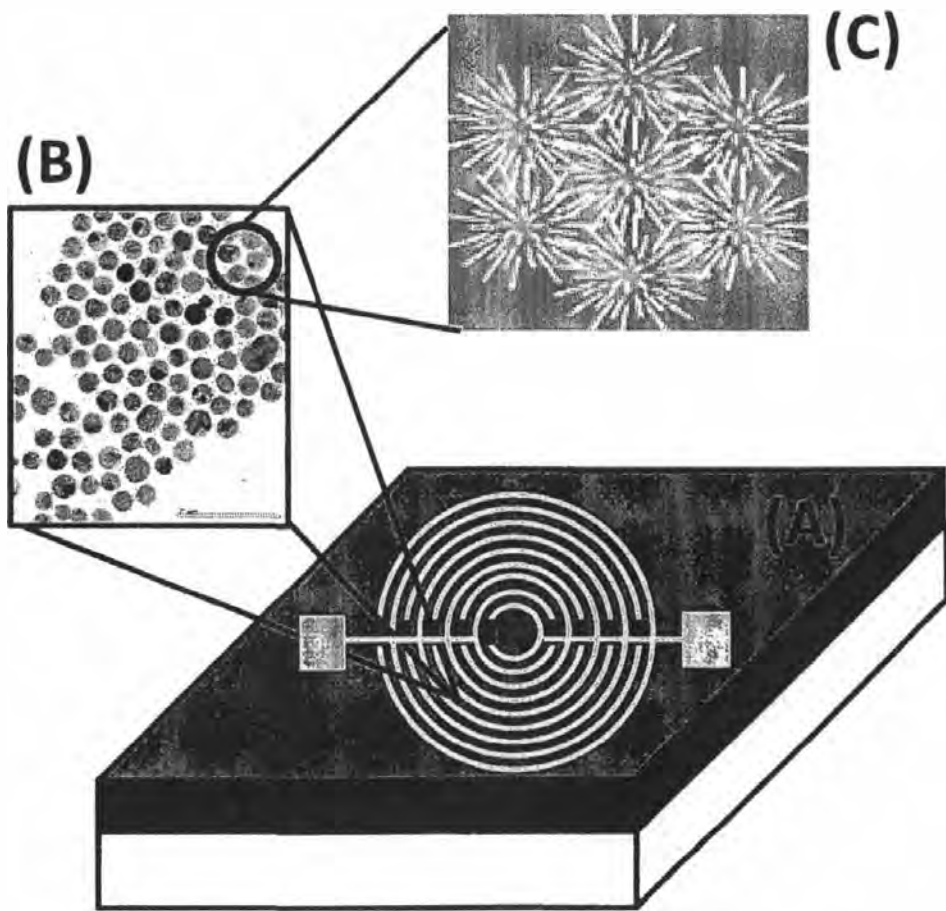


Figura 3

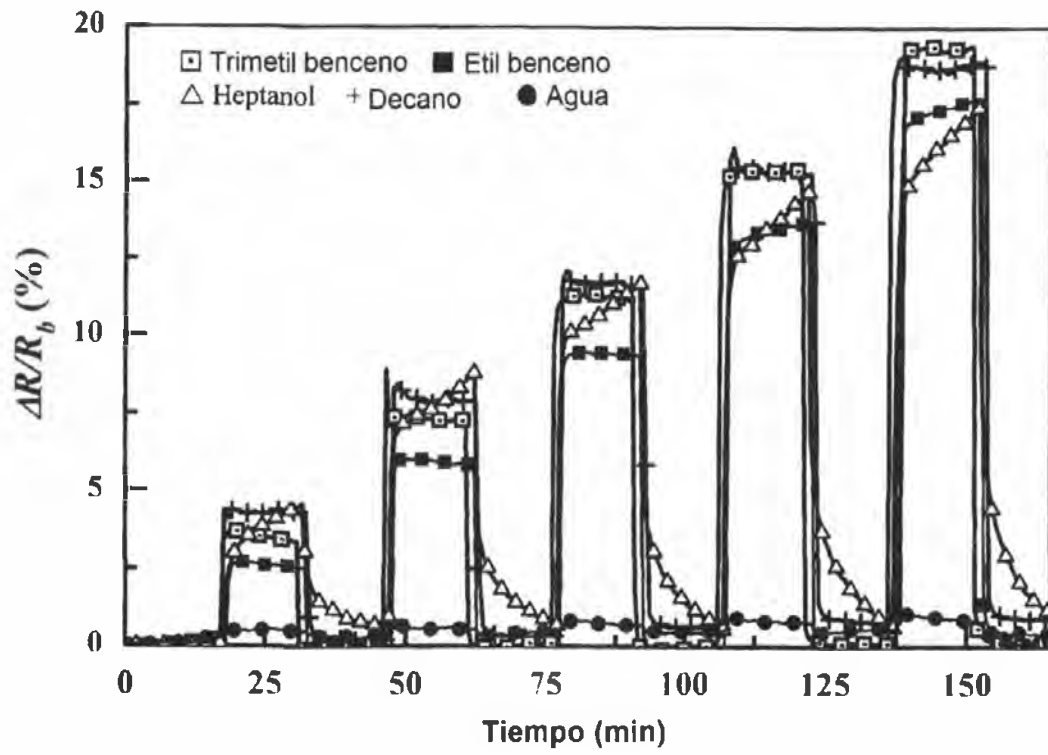


Figura 4

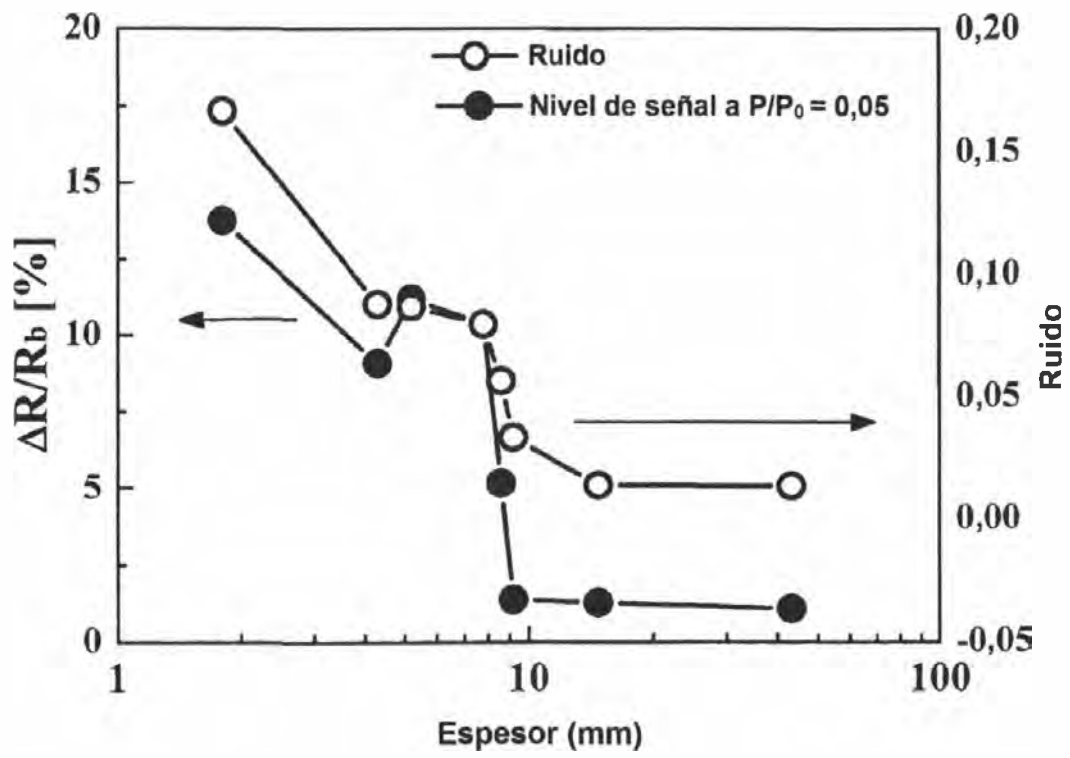




Figura 5

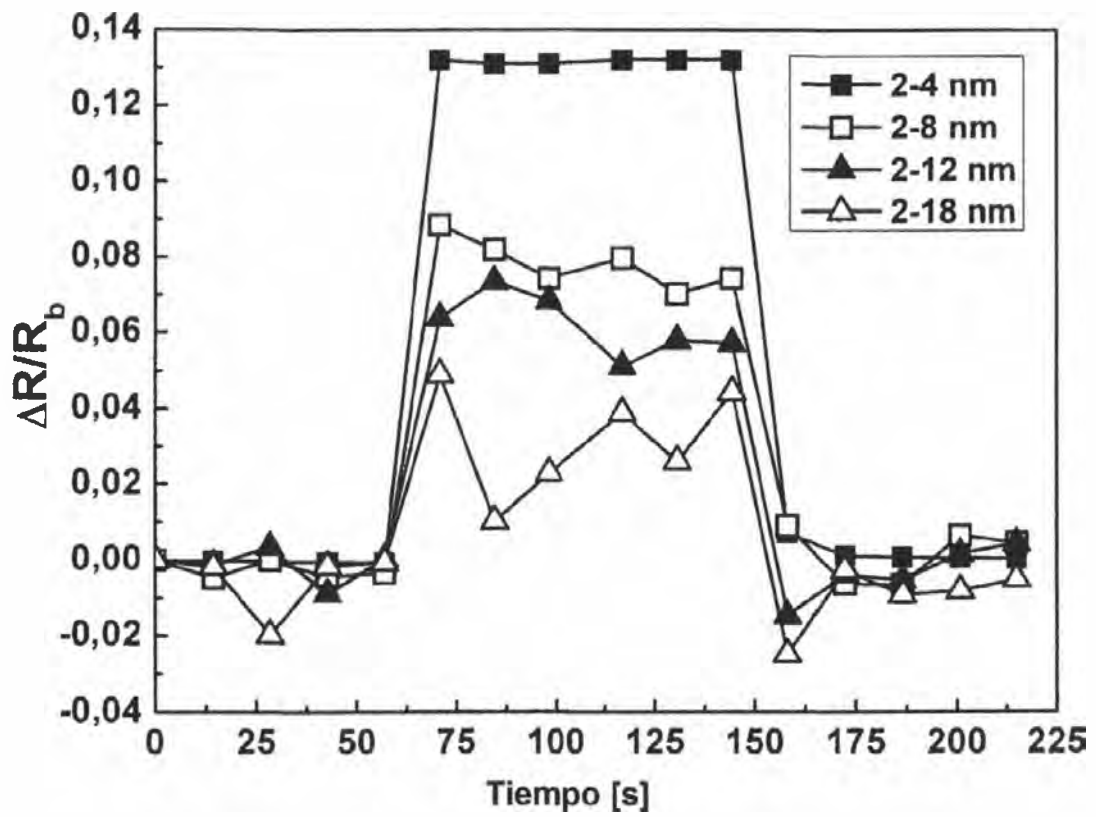


Figura 6A

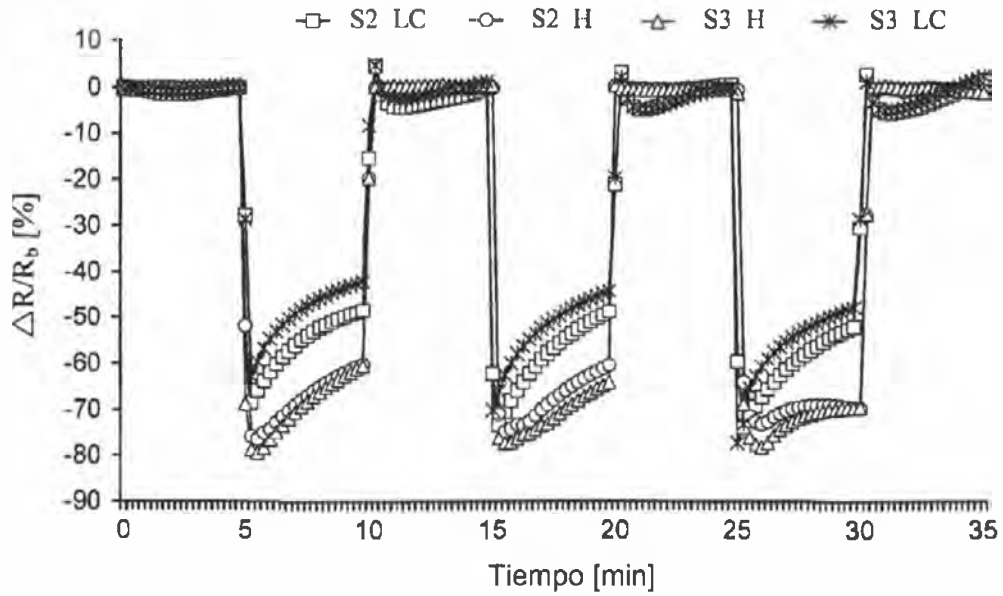


Figura 6B

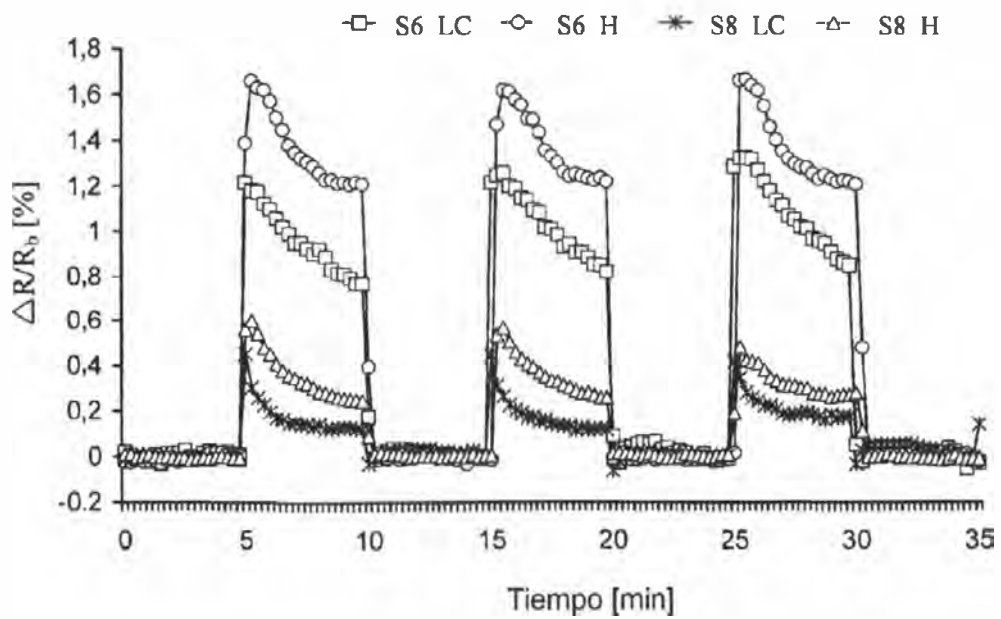


Figura 7A

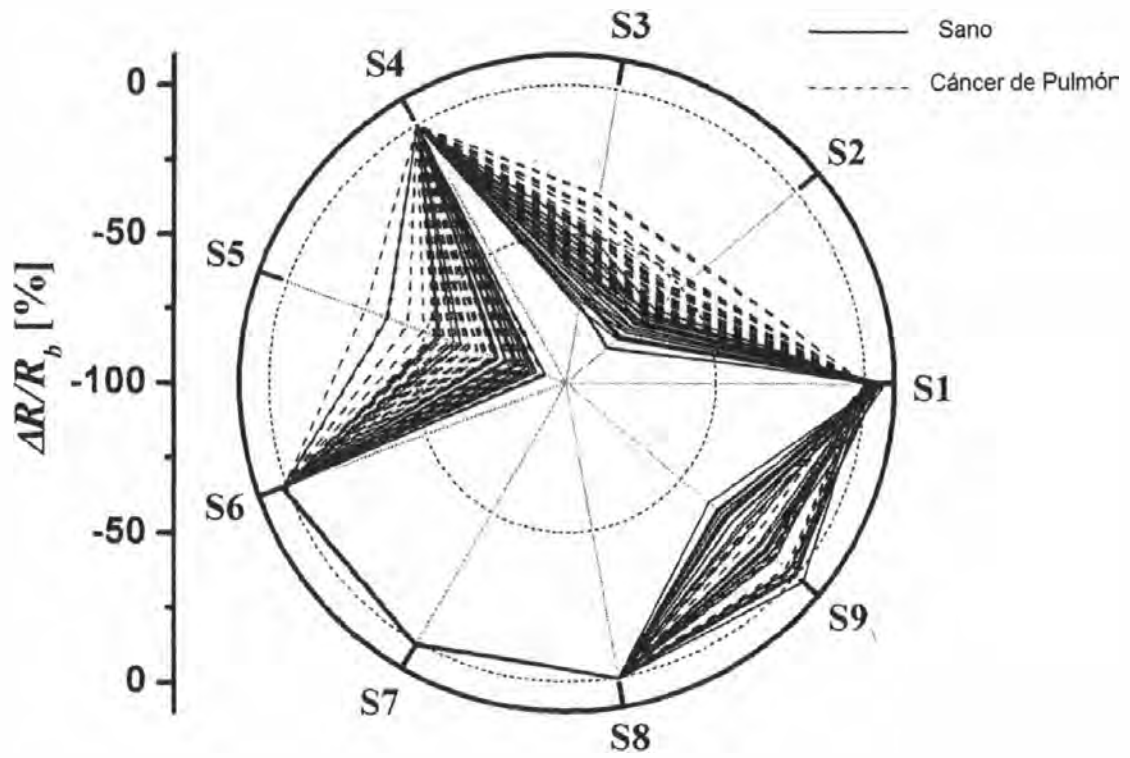


Figura 7B

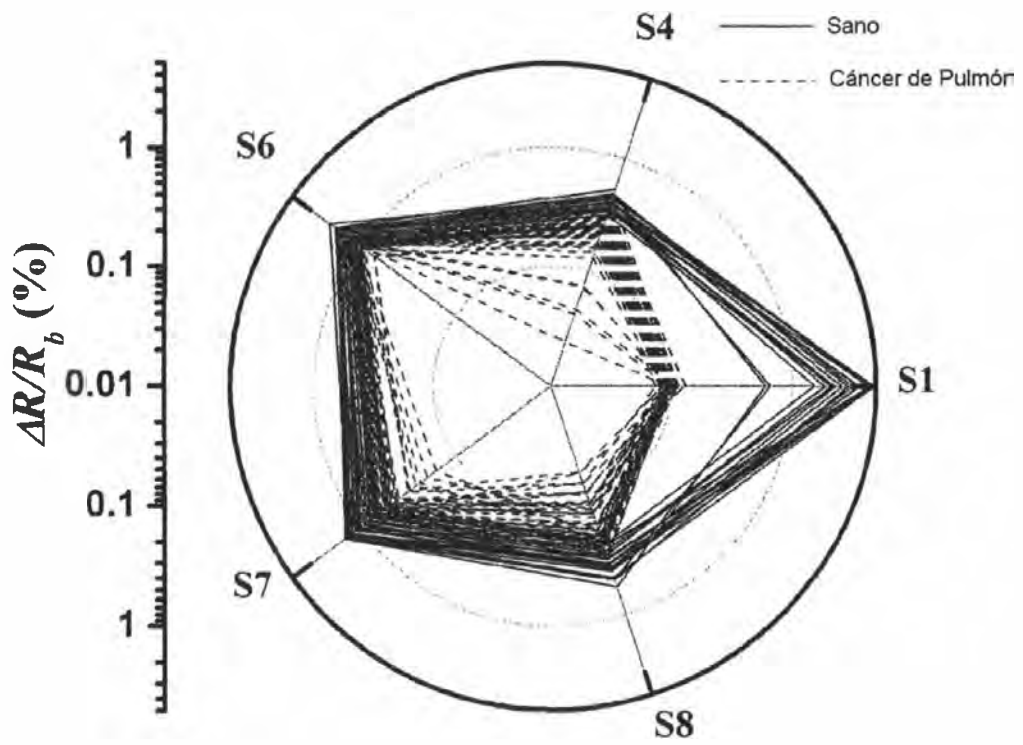


Figura 8

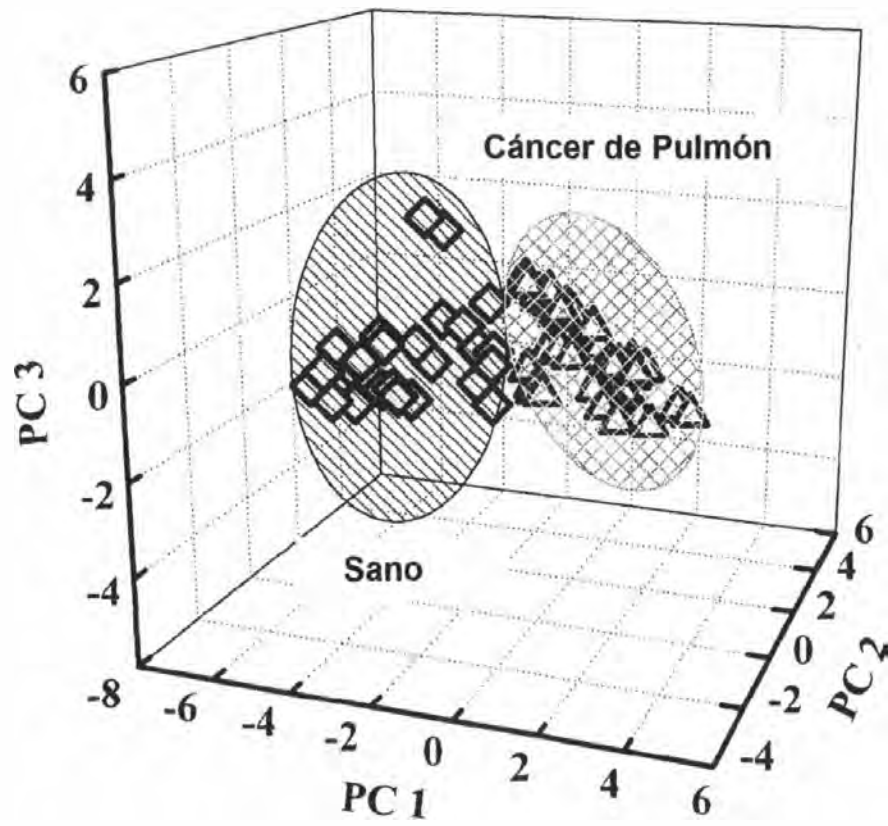


Figura 9

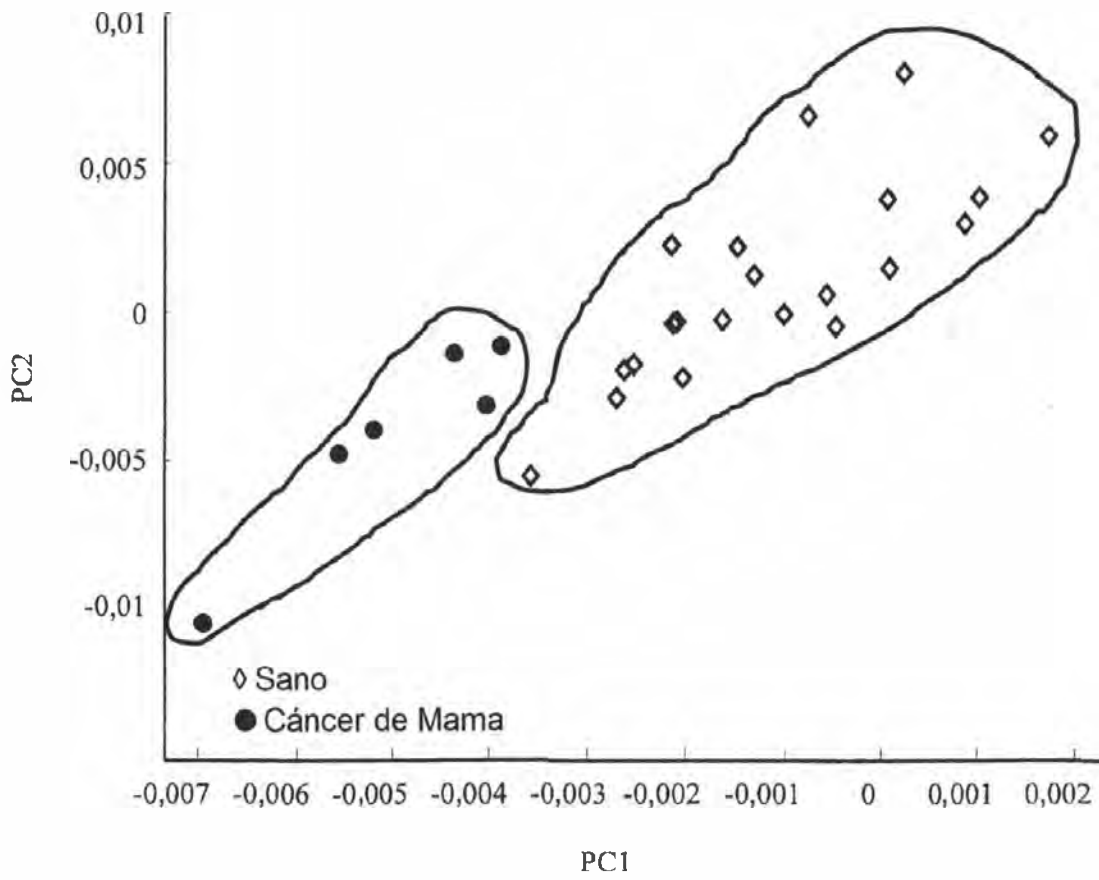


Figura 10

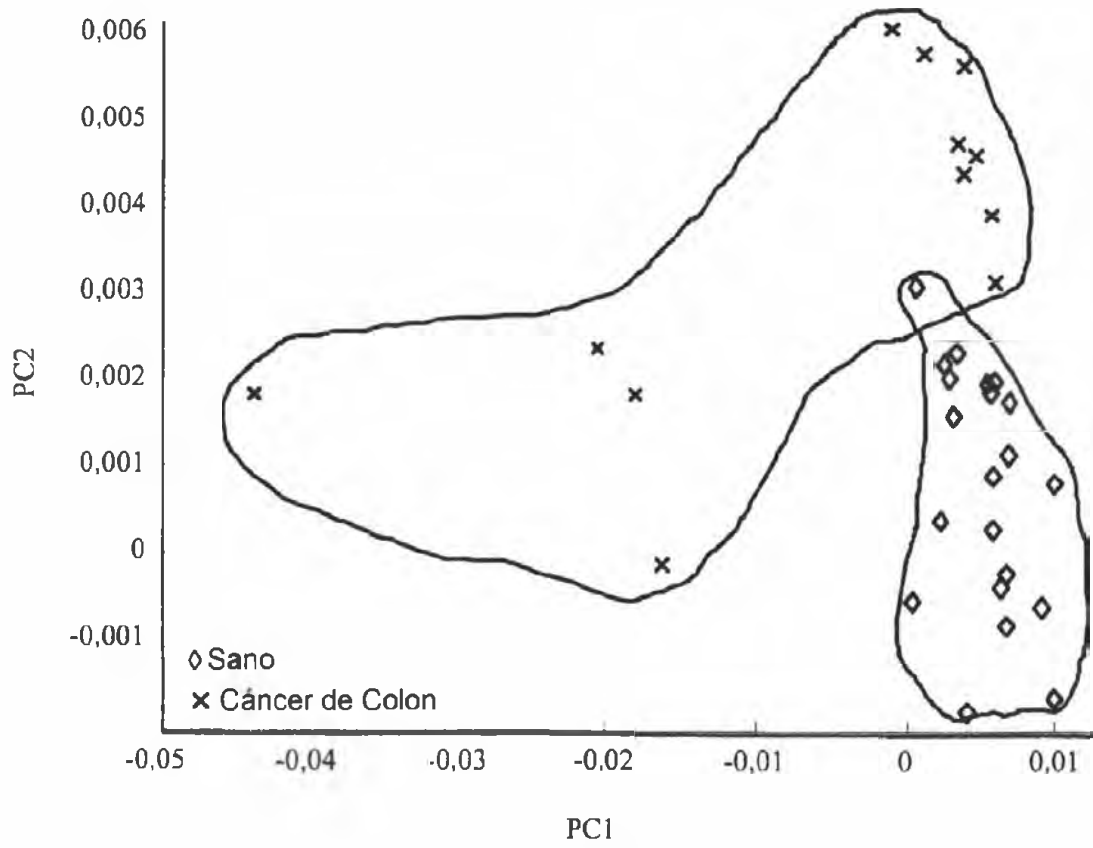


Figura 11

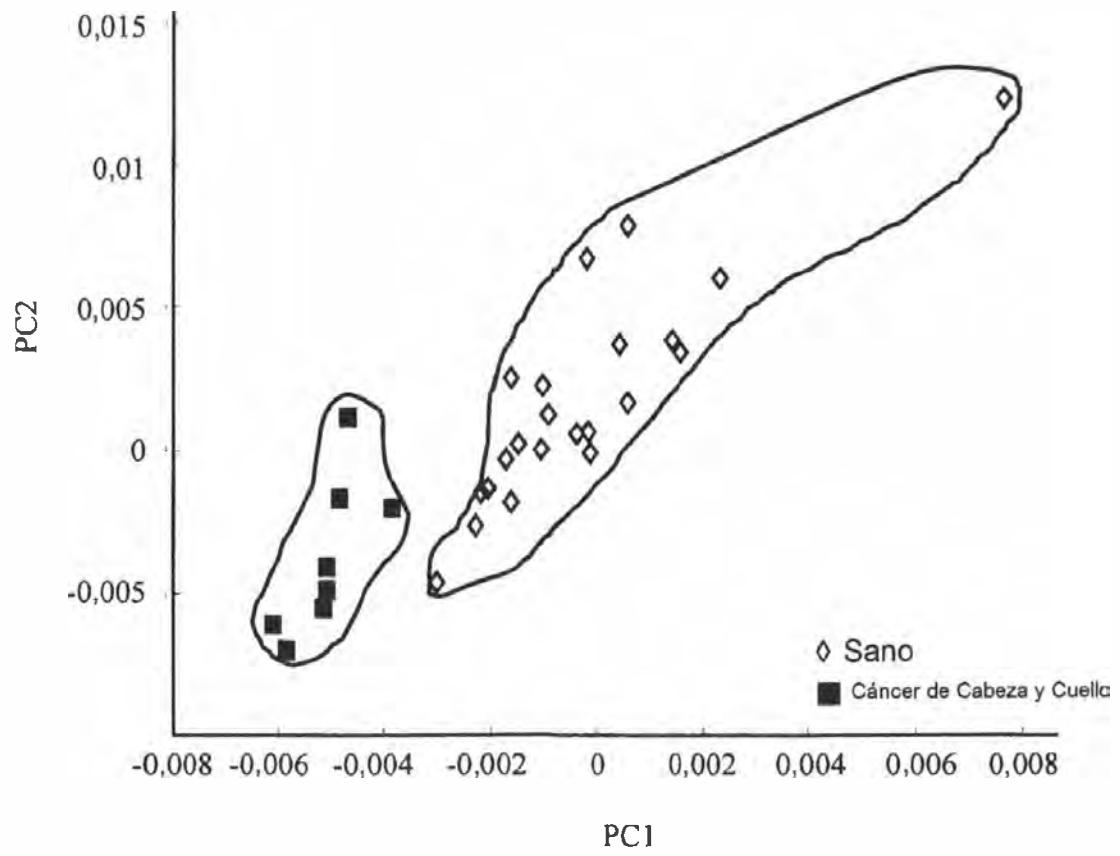




Figura 12

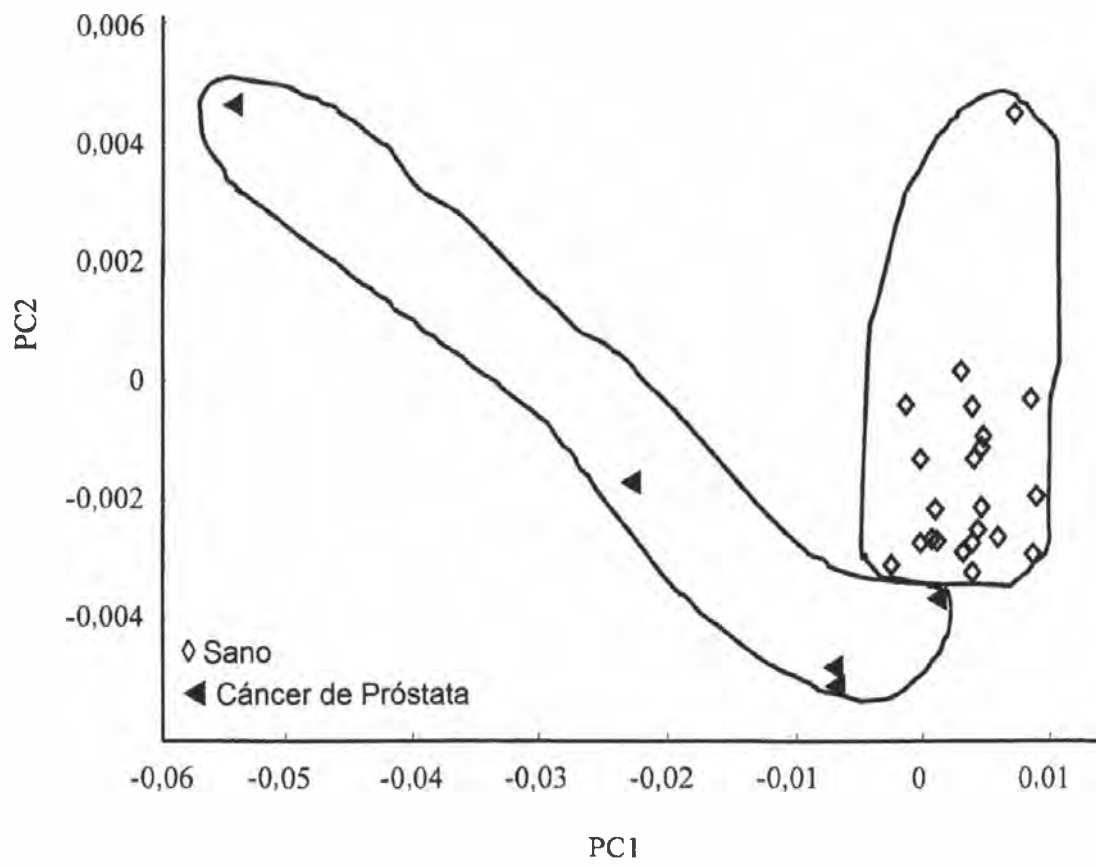


Figura 13A

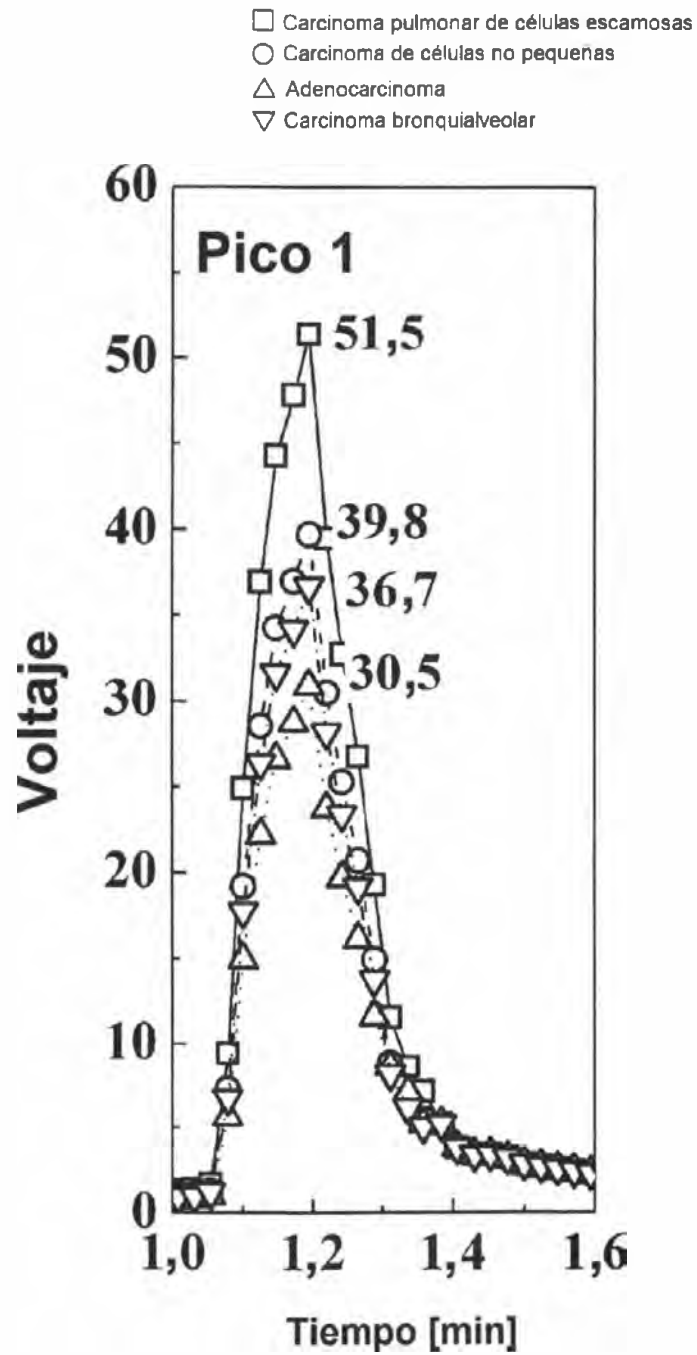


Figura 13B

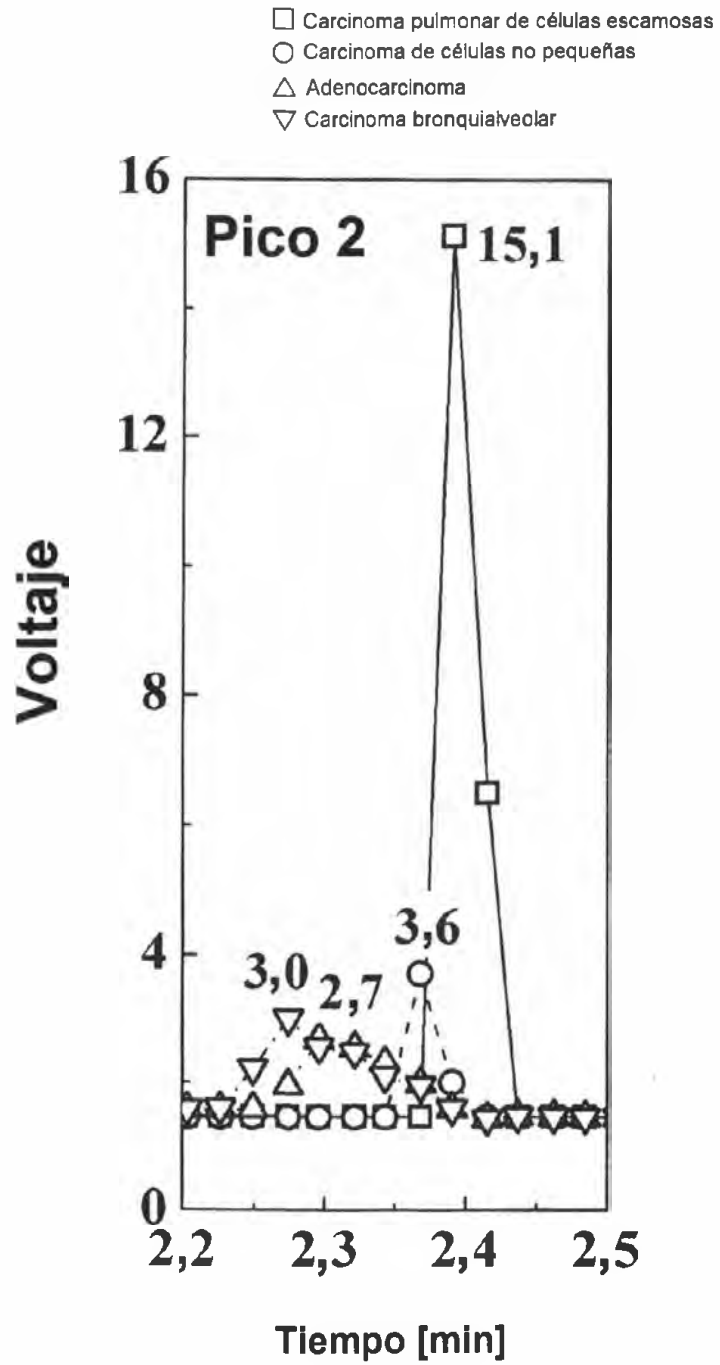


Figura 13C

- Carcinoma pulmonar de células escamosas
- Carcinoma de células no pequeñas
- △ Adenocarcinoma
- ▽ Carcinoma bronquialveolar

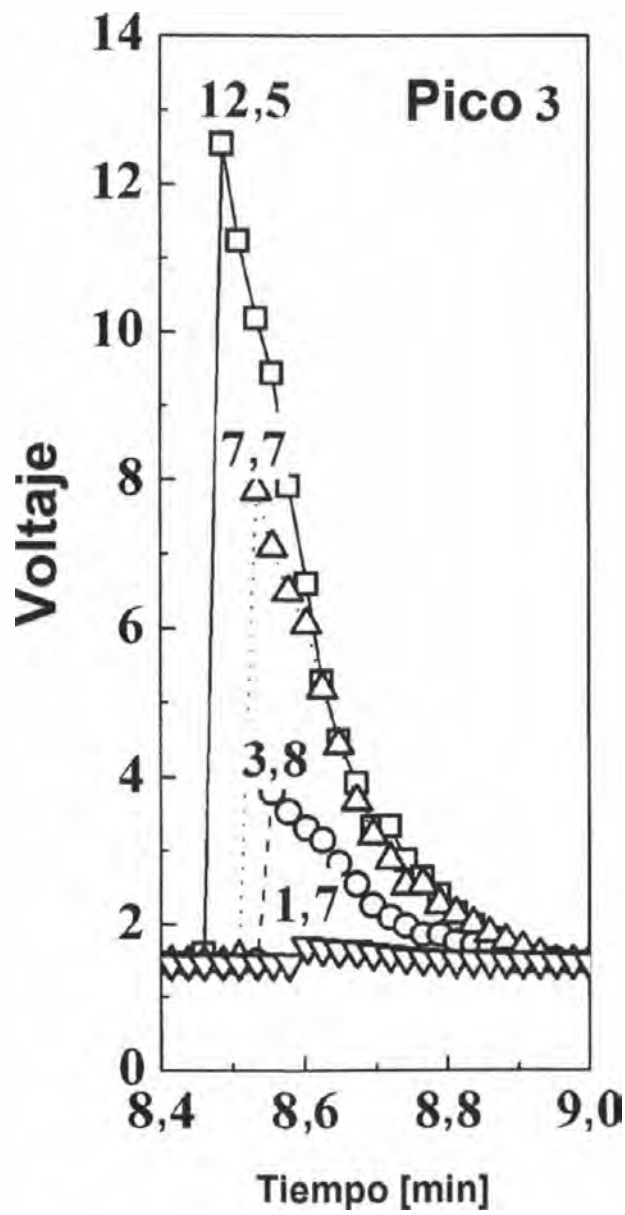


Figura 13D

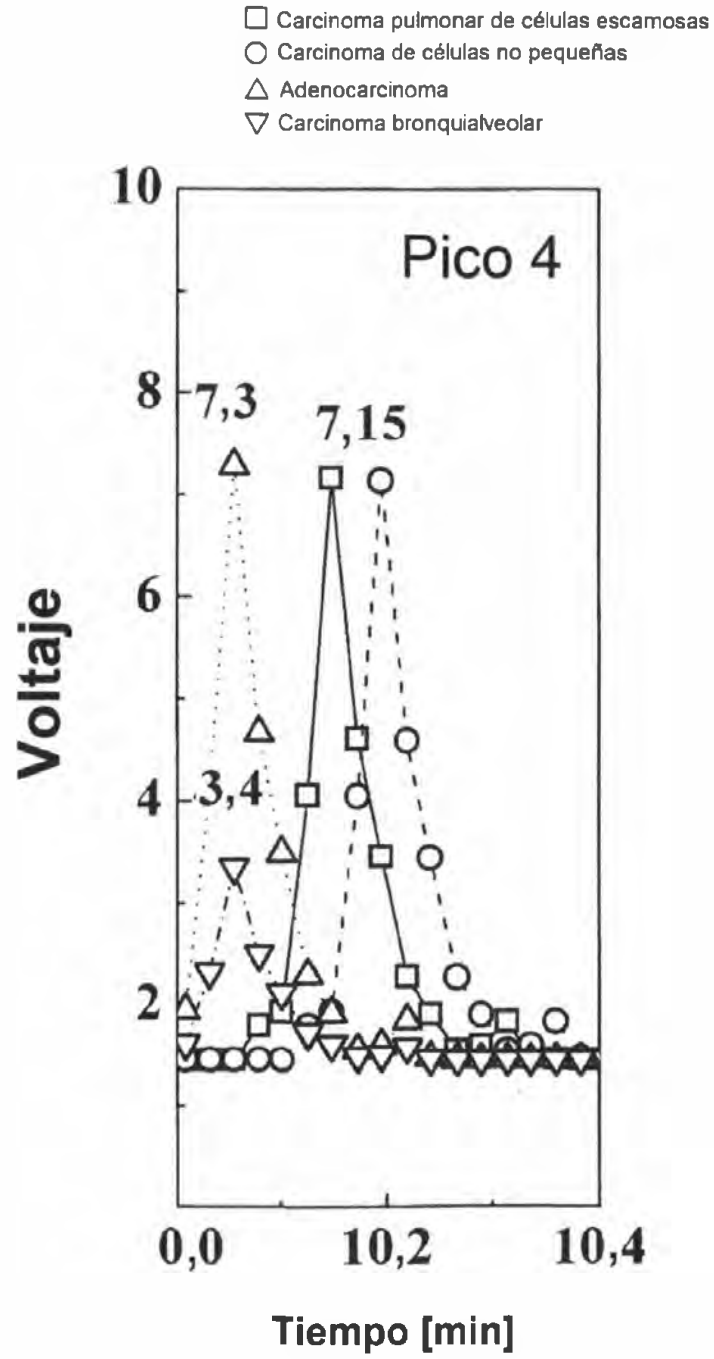


Figura 14

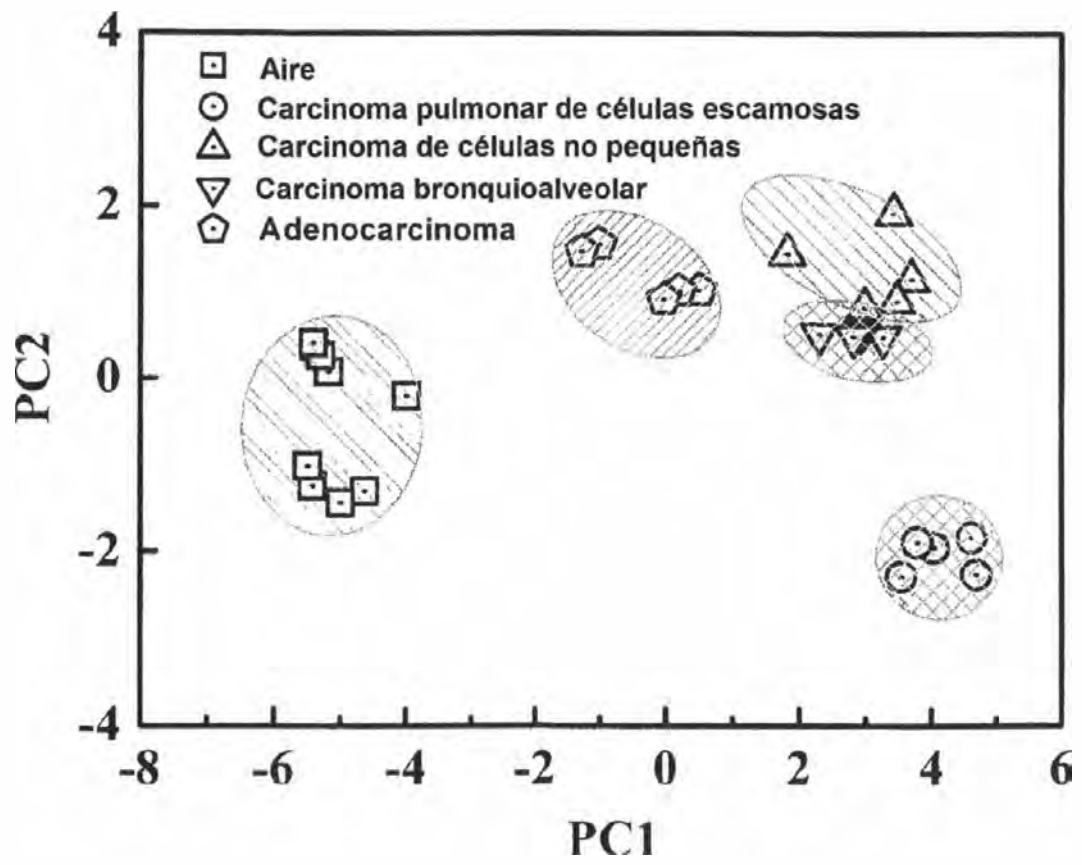


Figura 15

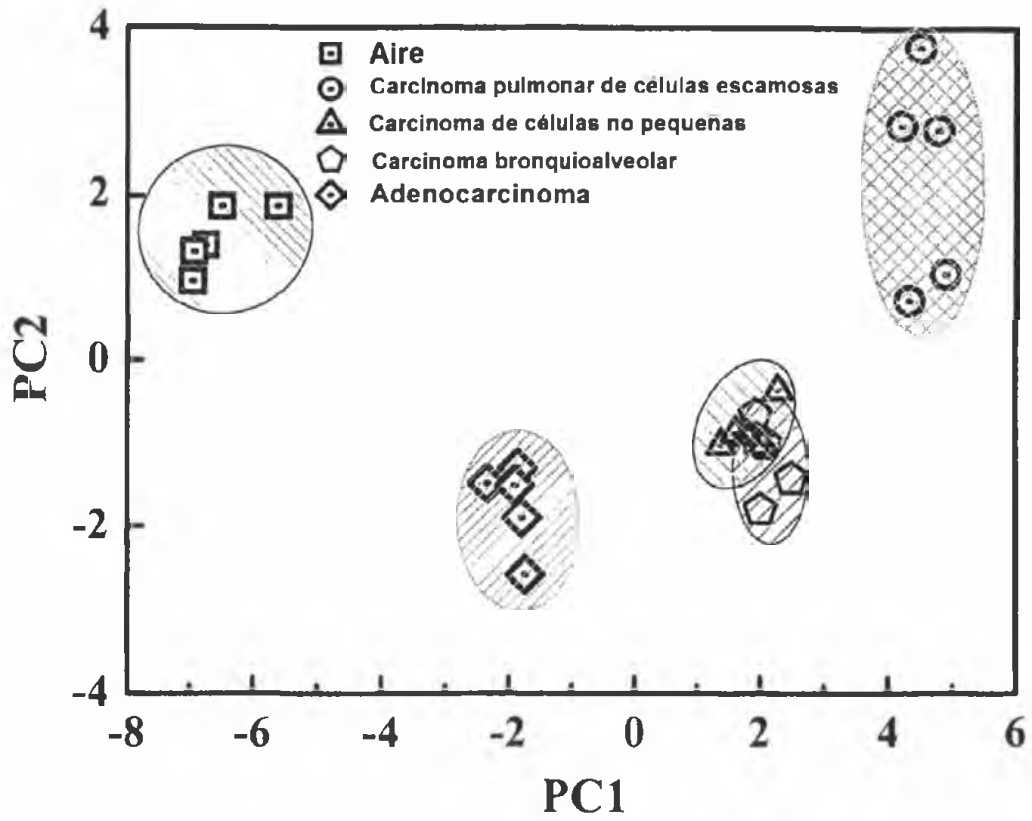


Figura 16A

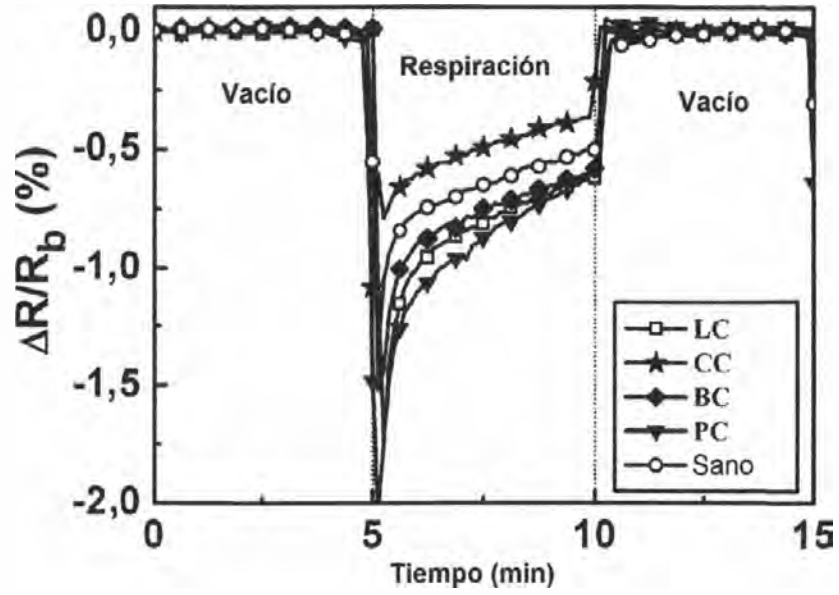


Figura 16B

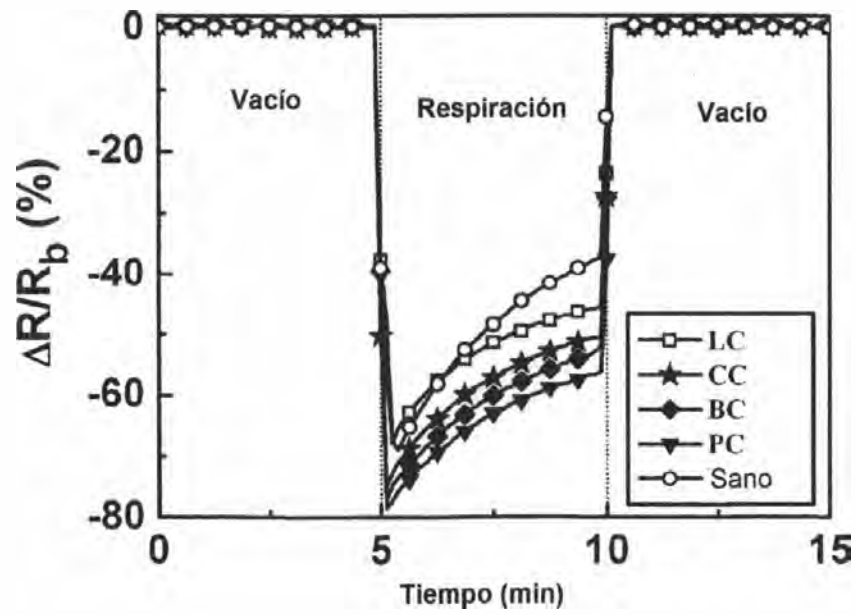




Figura 16C

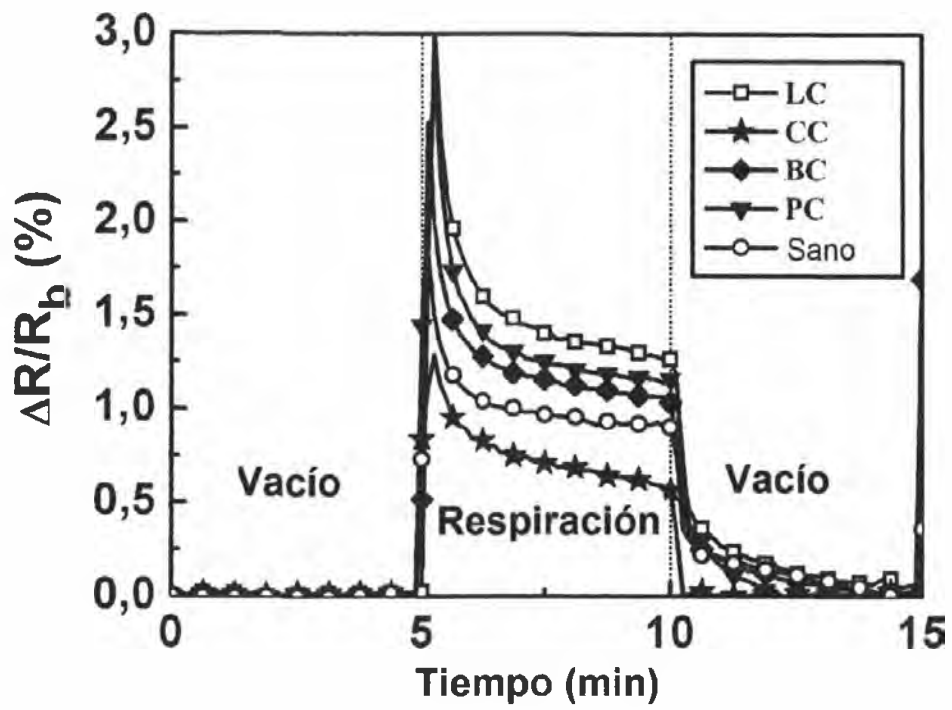


Figura 17A

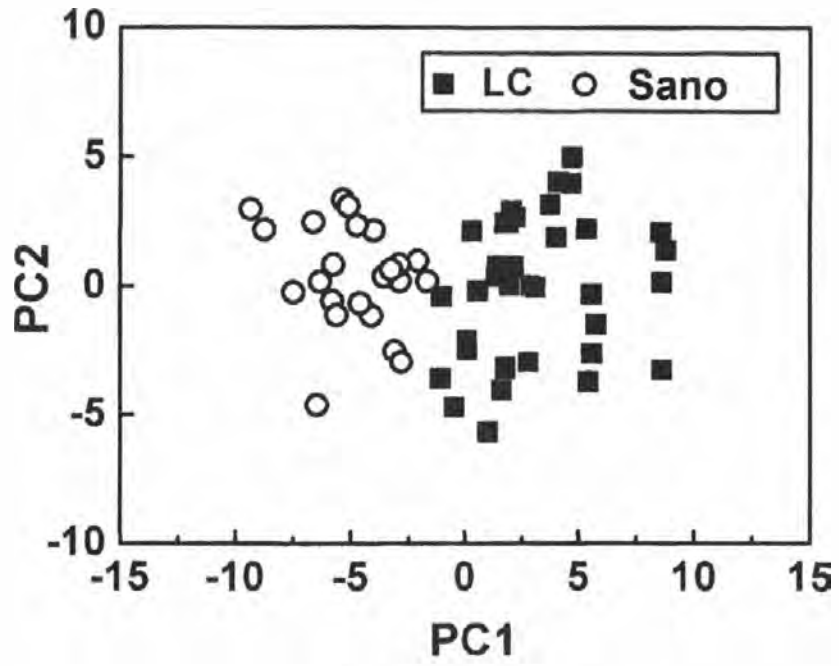


Figura 17B

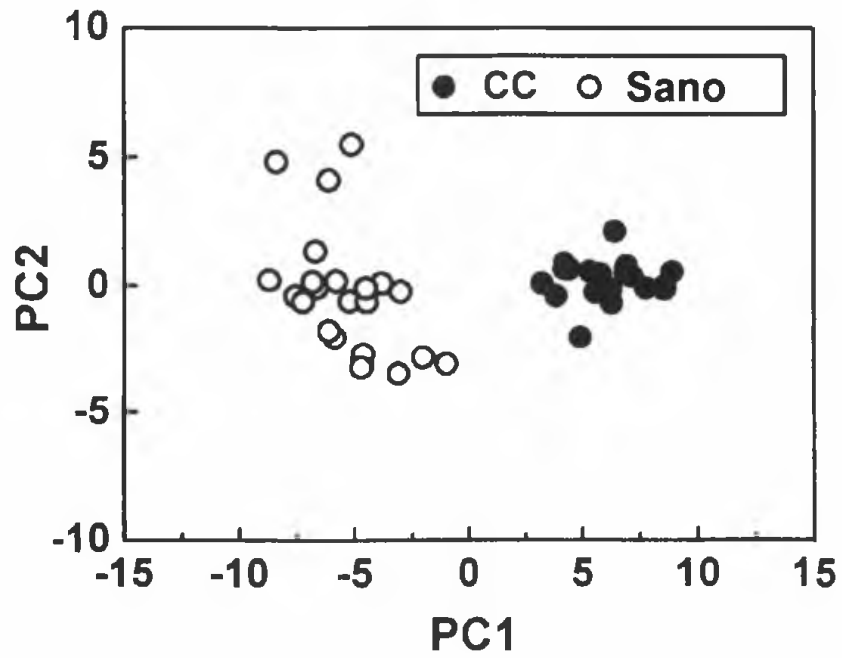


Figura 17C

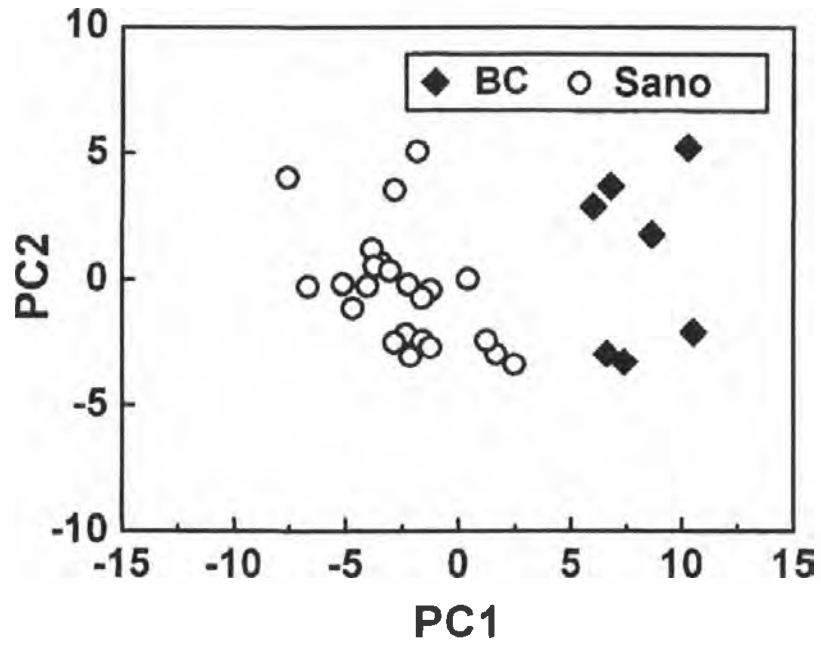


Figura 17D

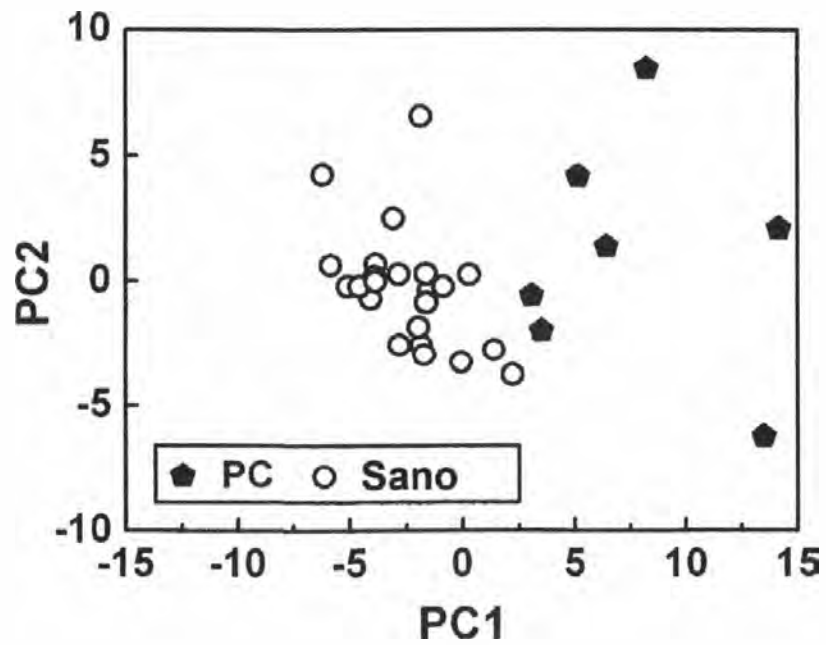


Figura 17E

