

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 092**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2016 PCT/US2016/044753**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17023768**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2016 E 16754031 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3329281**

54 Título: **Detección no invasiva de cáncer que se origina en tejido fuera del pulmón usando respiración exhalada**

30 Prioridad:

31.07.2015 US 201562199698 P

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

04.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FU, XIAOAN;
NANTZ, MICHAEL;
BOUSAMRA, MICHAEL y
VAN BERKEL, VICTOR**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 758 092 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 no invasiva de cáncer que se origina en tejido fuera del pulmón usando respiración exhalada

5 **Campo**

La presente invención se refiere a métodos no invasivos de detección y cribado del cáncer, y más particularmente a un método no invasivo de detección y cribado de cánceres en tejidos fuera del pulmón, así como cánceres que se originan en tejidos fuera del pulmón pero que metastatizan al pulmón.

10

Antecedentes

Los cánceres son una causa importante de muerte en todo el mundo, pero la detección precoz del cáncer es un factor clave para aumentar las tasas de supervivencia de pacientes con cáncer. Actualmente, la obtención de imágenes y la biopsia son las principales técnicas usadas para la detección del cáncer.

15

En los últimos años, el análisis de la respiración exhalada se ha convertido en una frontera de investigación internacional debido a su aplicabilidad para diagnósticos sanitarios no invasivos. Se han desarrollado varios enfoques para analizar la respiración exhalada, que incluyen el uso de matrices de sensores, espectrometría de masas con reacción de transferencia de protones (PTR-MS), espectrometría de masas de tubo de flujo iónico seleccionado (SIFT-MS) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), por nombrar algunos. Aunque se ha informado de algunos compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en la respiración exhalada como posibles biomarcadores de cáncer de pulmón, no ha habido adopción clínica de los métodos de análisis de la respiración para diagnosticar cánceres en tejidos fuera del pulmón o en cánceres que se originan en tejidos fuera del pulmón pero que metastatizan al pulmón.

20

25

Además, el análisis de la respiración exhalada para biomarcadores que indican cáncer, es decir, productos metabólicos eliminados, es una tarea desalentadora, en tanto que se han identificado más de 1700 VOCs endógenos en la respiración humana. Además, muchos de estos VOCs endógenos están presentes en la respiración exhalada en cantidades que son inferiores al error experimental de los métodos de detección que se usan para detectarlos y/o identificarlos. Por ejemplo, muchos de los VOCs en la respiración varían desde solo algunas partes por trillón (ppt) hasta algunas partes por billón (ppb) de concentración; muchas especies químicas en las muestras de respiración están a concentración de millones de veces más altas que los VOCs prevalentes, tales como vapor de agua y dióxido de carbono, que se puede necesitar que sean retirados para evitar saturar la mayoría de los instrumentos analíticos. Además, la respiración es una mezcla químicamente diversa que contiene mezclas análogas/homólogas/isoméricas de alcoholes, cetonas, y aldehídos, que complican la identificación de los biomarcadores de enfermedad; y los VOCs en la respiración pueden incluir constituyentes no metabólicos, que pueden introducir biomarcadores falsos en el análisis de la respiración.

30

35

Así, para analizar eficazmente y con exactitud los VOCs en la respiración para detectar o identificar un estado de enfermedad, existen múltiples obstáculos a vencer. El primer obstáculo a vencer es el de concentrar los VOCs de interés. Los enfoques generales para concentrar uno o más VOCs de interés de muestras gaseosas diluidas se han centrado en uno de los siguientes: métodos químicos, criogénicos y adsortivos. El segundo obstáculo es identificar relaciones específicas entre biomarcador(es) y/o cantidades de biomarcadores específicos, que se puedan correlacionar con un alto nivel de certeza en cuanto a la presencia del estado de enfermedad, con una baja probabilidad de negativos falsos.

40

45

YIWEN XU ET AL: "Detection and Identification of Breast Cancer Volatile Organic Compounds Biomarkers Using Highly-Sensitive Single Nanowire Array on a Chip", JOURNAL OF BIOMEDICAL NANOTECHNOLOGY, vol. 9, no. 7, 1 de junio de 2013 (páginas 1164-1172) desvelan una única matriz de nanohilos sobre un chip con diferentes materiales de paladio, polipirrol y óxido de cinc que se ha fabricado usando el método de deposición electroquímica. Se ha demostrado que la matriz de nanohilos individuales fabricada para el diagnóstico altamente sensible y específico de cáncer de mama detecta cuatro biomarcadores de compuestos orgánicos volátiles: heptanal, acetofenona, miristato de isopropilo y 2-propanol.

50

55

HAITHAM AMAL ET AL: "Assessment of Ovarian Cancer Conditions From Exhaled Breath" OBSTETRICAL AND GYNECOLOGICAL SURVEY, vol. 70, no. 2, 1 de febrero de 2015, páginas 89-91, desvelan un estudio piloto que tiene la finalidad de examinar la posibilidad de detectar fácilmente y no invasivamente y discriminar mujeres con cáncer de ovario (OC) de mujeres que no tiene(n) tumor(es) y de mujeres que tienen neoplasia benigna del aparato genital, usando muestras de respiración exhalada. El análisis de las muestras de respiración con cromatografía de gases asociada con espectrometría de masas muestra que el decanal, nonanal, estireno, 2-butanona y hexadecano podrían servir de posibles marcadores volátiles para OC.

60

MICHAEL PHILLIPS ET AL: "Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer", JOURNAL OF BREATH RESEARCH, vol. 4, no. 2, 2 de marzo de 2010, página 026003, desvelan la búsqueda de biomarcadores de cáncer de mama en la respiración debido a que la enfermedad va acompañada por elevado estrés oxidativo e

65

inducción de enzimas citocromo P450, ambos de los cuales generan compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que son eliminados en la respiración.

5 MICHAEL PHILLIPS ET AL: "Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath" BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 99, no. 1, 24 de febrero de 2006 (2006-02-24), páginas 19-21, desvelan la evaluación de una prueba de respiración para compuestos orgánicos volátiles (VOCs) como factor pronóstico de cáncer de mama.

10 CHANGSONG WANG ET AL: "Volatile Organic Metabolites Identify Patients with Breast Cancer, Cyclomastopathy, and Mammary Gland Fibroma", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 4, 20 de junio de 2014, desvelan un estudio sistemático de perfiles de gas de metabolitos en la respiración exhalada humana por métodos de reconocimiento de patrones.

15 El documento de patente WO 2011/083473 A1 desvela proporcionar conjuntos de VOCs para el análisis de la respiración, y se desvelan métodos de uso de los mismos en el diagnóstico, monitorización o pronóstico de cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata o cáncer de colon.

El documento de patente US 2014/244229 A1 desvela separar y detectar compuestos orgánicos volátiles emitidos de metabolito de células cancerosas gástricas usando HS-SPME/GC-MS.

20 El documento de patente US2015/064796 A1 desvela un método no invasivo de detección o cribado de cáncer de pulmón que incluye detectar niveles elevados de VOCs.

Por tanto, en vista de las limitaciones y los retos con los métodos convencionales de detección/identificación y cribado de cáncer, existe una necesidad de nuevos métodos no invasivos.

25

Sumario

Según la invención, se proporciona un método no invasivo de detección de un estado de enfermedad de cáncer en un espécimen de sujeto en donde el cáncer primario se origina en un tejido fuera del pulmón, comprendiendo el método las etapas de: obtener respiración exhalada del espécimen del sujeto, en donde la respiración exhalada incluye una pluralidad de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que contienen carbonilo seleccionados de 2-butanona, 2-hidroxiacetaldehído, 3-hidroxi-2-butanona y 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE); formar aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo con un compuesto químico reactivo, en donde el compuesto químico reactivo tiene una fórmula general (I) de $H_2N-Z-L-Y$ en donde Z es NH, NR u O; L es un grupo de enlace; Y es un resto N o P disustituido o trisustituido; R se selecciona del grupo que consiste en alquilos, aralquilos, aralquenilos y aralquinilos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos, y en donde la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo reaccionan con el compuesto químico reactivo mediante una reacción de deshidratación para formar aductos de los mismos; cuantificar cada uno de los aductos de cada uno de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo para establecer un valor objeto para cada uno de los aductos; y comparar cada valor objeto con un valor de espécimen sano umbral para cada uno de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo, correspondiendo el valor de espécimen sano umbral a valores calculados a partir de especímenes sanos, para determinar la presencia de dos o más valores objeto en cantidades superiores a su intervalo respectivo de valores de espécimen sano, indicando así una probabilidad sustancial de un estado de enfermedad de cáncer en el espécimen del sujeto. Los tipos a modo de ejemplo de cáncer adecuados para la detección usando los métodos descritos en el presente documento son cánceres primarios que se originan en tejidos fuera del pulmón y pueden incluir cánceres primarios que metastatizan al pulmón. Los cánceres primarios a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinoma supraglótico epidermoide, cáncer pancreático, melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de esófago, condrosarcoma, colangiocarcinoma, linfoma y cáncer escamoso de piel. En otras realizaciones, tres o más, o cuatro o más valores objeto son elevados por encima de sus valores de espécimen sano respectivos.

Según la invención, se proporciona un método no invasivo de cribado de un estado de enfermedad de cáncer en un espécimen del sujeto en donde el cáncer primario se origina en un tejido fuera del pulmón, comprendiendo el método las etapas de: concentrar una pluralidad de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que contienen carbonilo contenidos en la respiración exhalada obtenida del espécimen del sujeto, en donde la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo se selecciona del grupo que consiste en 2-butanona, 2-hidroxiacetaldehído, 3-hidroxi-2-butanona, 4-hidroxihexenal, que forman aductos con un compuesto químico reactivo, en donde el compuesto químico reactivo tiene una fórmula general (I) de $H_2N-Z-L-Y$ en donde Z es NH, NR u O; L es un grupo de enlace; Y es un resto N o P disustituido o trisustituido; R se selecciona del grupo que consiste en alquilos, aralquilos, aralquenilos y aralquinilos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos, y en donde la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo reaccionan con el compuesto químico reactivo mediante una reacción de deshidratación para formar aductos de los mismos; cuantificar los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo para establecer un valor objeto para cada miembro de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo; y comparar el valor objeto para cada miembro de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo con un valor de espécimen sano umbral para cada miembro de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo para determinar la presencia de uno o

más valores objeto en cantidades superiores a su valor de espécimen sano umbral respectivo indicando así una probabilidad sustancial del estado de enfermedad de cáncer en el espécimen del sujeto. En otra realización, tres o más, o cuatro o más valores objeto son elevados por encima de sus valores de espécimen sano respectivos.

5 Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran realizaciones de la invención y, junto con la descripción general de la invención dada anteriormente, y la descripción detallada dada a continuación, sirven para describir la invención.

- 10 La FIG. 1 es una configuración esquemática para concentrar VOCs que contienen carbonilo en una muestra de aire o una muestra de respiración gaseosa, según una realización de la presente invención.
- 15 La FIG. 2A es una fotografía que muestra un preconcentrador conectado a dos tubos de sílice fundida que es adecuado para su uso en el esquema mostrado en la FIG. 1; el preconcentrador se muestra dispuesto sobre un dime estadounidense para indicar su tamaño.
- La FIG. 2B es una micrografía electrónica de barrido que muestra una matriz de micropilotes dentro del preconcentrador mostrado en la FIG. 2A.
- 20 La FIG. 3 es un gráfico que compara los niveles de C_4H_8O en sujetos que tienen una variedad de tipos de cáncer con sujetos sanos de control.
- La FIG. 4 es un gráfico que compara los niveles de $C_2H_4O_2$ en sujetos que tienen una variedad de tipos de cáncer con sujetos sanos de control.
- La FIG. 5 es un gráfico que compara los niveles de $C_4H_8O_2$ en sujetos que tienen una variedad de tipos de cáncer con sujetos sanos de control.
- 25 La FIG. 6 es un gráfico que compara los niveles de 4-HHE en sujetos que tienen una variedad de tipos de cáncer con sujetos sanos de control.

Descripción detallada

30 Como se usa en el presente documento, "especimen sano" se define como un espécimen que no tiene ningún cáncer detectable (como se determina por métodos de detección convencionales de cáncer que incluyen TAC y examen físico) y no tiene un estado de enfermedad de cáncer diagnosticable.

35 Como se usa en el presente documento, "especimen del sujeto" se define como el espécimen del que se obtiene una muestra de respiración exhalada con el fin de diagnosticar o cribar la presencia/ausencia de un estado de enfermedad de cáncer. El espécimen del sujeto puede haber sido previamente cribado usando una tomografía computarizada (TAC), donde se detectó una lesión o nódulo sospechoso, y se favorece una prueba de mayor especificidad (negativo verdadero) que utiliza dos o más, o tres o más valores de biomarcador por encima de su valor de espécimen sano umbral respectivo. Para fines de cribado, el espécimen del sujeto puede no haber sido cribado usando un TAC, pero puede tener otros factores de riesgo (por ejemplo, exposición conocida a carcinógenos, antecedentes familiares de cáncer, o marcadores genéticos) y se favorece una prueba de mayor selectividad (positivo verdadero) que utiliza uno o más valores de biomarcador por encima de su valor de espécimen sano umbral respectivo.

45 Como se usa en el presente documento, "valor de espécimen sano umbral" significa un valor determinado realizando el método de prueba en una pluralidad de especímenes sanos, en donde un valor objeto que supera el valor de espécimen sano umbral determinado indica un estado de enfermedad de cáncer.

50 Como se usa en el presente documento, "probabilidad sustancial de un estado de enfermedad de cáncer" significa que la probabilidad de que exista el estado de enfermedad de cáncer en el espécimen del sujeto es aproximadamente 80 % o más, basado en los niveles de confianza del método de prueba, mientras que la "probabilidad de un estado de enfermedad de cáncer" significa que la probabilidad de que el estado de enfermedad de cáncer exista en el espécimen del sujeto es aproximadamente 50 % o más, basado en los niveles de confianza del método de prueba. Por supuesto, se contemplan además niveles intermedios de probabilidad, tales como aproximadamente 60 % o más, o aproximadamente 70 % o más.

55 Como se usa en el presente documento, "aductos" o "conjugados" indica el producto de reacción de un compuesto químico reactivo y el biomarcador de cáncer de VOCs que contienen carbonilo. Estos aductos se forman por una reacción de deshidratación de un aldehído o una cetona, que transforma el biomarcador de cáncer volátil en un compuesto químico no volátil no natural.

60 Como se ha indicado previamente anteriormente, el análisis de la respiración es una modalidad en desarrollo con potencial de simplificar la prueba diagnóstica de la sospecha de cáncer. Sin embargo, hasta el descubrimiento de la presente invención, ningún método ha demostrado utilidad clínica debido a múltiples factores, tales como concentraciones extremadamente bajas de compuestos de biomarcador de VOCs que contienen carbonilo implicados, complejidades en el proceso de aislamiento de estos compuestos, y la ausencia de un algoritmo de diagnóstico útil para los profesionales clínicos. Las realizaciones de la presente invención se centran en seleccionar

VOCs que contienen carbonilo, tales como 2-butanona, 2-hidroxiacetaldehído, 3-hidroxi-2-butanona, 4-hidroxi-2-hexenal, 4-hidroxi-2-nonenal, y/o una mezcla de compuestos de C₅H₁₀O que incluye 2-pentanona y pentanal.

5 Según las realizaciones de la presente invención, el método de detección de cáncer incluye la captura selectiva y concentración de ciertos biomarcadores de cáncer, es decir, los VOCs que contienen carbonilo, que se pueden lograr por el paso de la respiración exhalada a través de un ensamblaje preconcentrador químico 10, que incluye un preconcentrador químico 15 que tiene una entrada 17 y una salida 19 que permite el paso de la muestra de respiración exhalada a su través, como se muestra en la FIG. 1. El ensamblaje 10 incluye además un dispositivo de película polimérica inflable 25 que se puede acoplar de forma fluida a un caudalímetro 35 antes de la entrada 17 del preconcentrador químico 15. La salida 19 del preconcentrador químico 15 se puede acoplar de forma fluida a un manómetro 40, una válvula 45 y una bomba de vacío 50, como se describe con más detalle más adelante.

15 Se pueden recoger una o más muestras de respiración exhalada de un espécimen del sujeto en el dispositivo de película polimérica inflable 25. Un dispositivo de película polimérica inflable a modo de ejemplo adecuado para la recogida de muestras de respiración exhalada es una bolsa de muestreo de gas Tedlar® de un litro (Sigma-Aldrich Co., LLC, St. Louis, MO), que incluye una válvula de Teflon®. Para la recogida de muestras, los sujetos pueden exhalar directamente en la bolsa de muestreo de gas Tedlar® a través de la válvula de Teflon®, que proporciona una técnica no invasiva de recogida.

20 El caudalímetro 35 no está particularmente limitado a ningún tipo específico de caudalímetro. Ventajosamente, el caudalímetro 35 debe ser capaz de medir con exactitud el volumen de gas que entra en el preconcentrador químico 15, que puede permitir cuantificar la concentración de los VOCs que contienen carbonilo en las muestras de respiración exhalada.

25 El manómetro 40, la válvula 45 y la bomba de vacío 50 no están similarmente particularmente limitados a ningún tipo específico. La bomba de vacío 50 aplica un vacío, que se puede modular o aislar del preconcentrador químico 15 ajustando la válvula 45. El manómetro 40 se puede usar para indicar el apropiado funcionamiento y/o operación de la bomba de vacío 50 y todo el ensamblaje de preconcentrador químico 10.

30 Como se observa anteriormente, los niveles de concentración de muchos biomarcadores en la respiración exhalada están por debajo de los límites de detección de muchas técnicas analíticas convencionales. Sin embargo, la utilización de la reactividad química del grupo funcional carbonilo de los aldehídos y las cetonas con ciertos productos químicos reactivos, los VOCs que contienen carbonilo en la respiración exhalada, se pueden preconcentrar antes del análisis. Por consiguiente, un preconcentrador 15 adecuado útil para preconcentrar los VOCs que contienen carbonilo en la respiración exhalada se describe en la patente de EE. UU. N° 8.663.581, que se describe además en el presente documento. Se debe apreciar que mientras que el preconcentrador y los métodos integrados dentro de las enseñanzas de la patente de EE. UU. N° 8.663.581 se emplearon en realizaciones de la presente invención descritas en el presente documento, la invención no está particularmente limitada a estas. Se pueden utilizar otros dispositivos de preconcentrador y/o métodos, mientras que los dispositivos y métodos sean eficaces en preconcentrar los VOCs que contienen carbonilo requeridos en la respiración exhalada para proporcionar muestras analíticas.

45 Así, según una realización, el preconcentrador químico 15 puede incluir una estructura de soporte y una capa de un compuesto químico reactivo sobre una superficie de la estructura de soporte. Como se usa en el presente documento, la expresión "compuesto químico reactivo" incluye compuestos moleculares mantenidos juntos por enlaces covalentes y sales mantenidas juntas por enlaces iónicos. El compuesto químico reactivo forma conjugados o aductos con los VOCs que contienen carbonilo para afectar la recogida y pre-concentración. Como se usa en el presente documento, "que contiene carbonilo" se refiere a aldehídos y cetonas.

50 En términos generales, los compuestos químicos reactivos incluyen un extremo reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional carbonilo en el VOC de interés; un resto de anclaje capaz de afectar reversiblemente la formación de una capa sobre la superficie de la estructura de soporte, y un grupo de enlace entre el extremo reactivo y el resto de anclaje. Como se representa en la fórmula (I) a continuación, el extremo reactivo incluye un grupo amino (NH₂) unido a un heteroátomo (Z), un grupo de enlace (L) y un resto de anclaje (Y), en donde Z, L e Y se definen a continuación. Según las realizaciones de la presente invención, el compuesto químico reactivo tiene una fórmula general según la fórmula (I):



60 en donde Z es NH, NR u O; L es un grupo de enlace; e Y es un resto N o P disustituido o trisustituido; R se selecciona del grupo que consiste en alquilos, aralquilos, aralquenilos y aralquinilos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos.

65 Según una realización, Y puede ser -NR¹R², o -NR¹R²R³, -PR¹R², -PR¹R²R⁴, en donde R¹, R², R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilos, aralquilos, aralquenilos y aralquinilos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos; y R³ se selecciona

del grupo que consiste en H, alquilos, aralquilos, aralquénilos y aralquínulos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos. En una realización alternativa, R¹ y R² en combinación también pueden formar un anillo heterocíclico, tal como un resto piperidina o morfolina.

5 Según otra realización de la invención, el compuesto químico reactivo puede incluir un extremo reactivo, un resto catiónico y un grupo de enlace L entremedias. Cuando Y es -NR¹R²R³ o -PR¹R²R⁴, el compuesto químico reactivo es una sal catiónica, que puede comprender además A⁻, que es un contraión aniónico. Por consiguiente, el resto catiónico puede comprender un nitrógeno catiónico, tal como un ion amonio, o un fósforo catiónico, tal como un fosfonio.

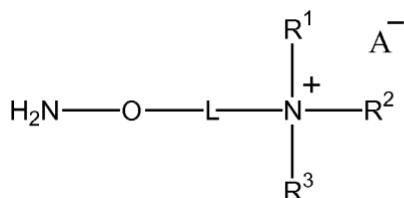
10 Cuando Y es fósforo, R¹, R² y R⁴ pueden ser todos un grupo arilo, tal como fenilo. Cuando Y es nitrógeno, R¹, R² y R³ pueden ser alquilos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos. En una realización alternativa, cuando Y es nitrógeno, R¹, R² pueden ser alquilos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos, y R³ pueden ser H.

15 Según las realizaciones de la invención, el extremo reactivo puede comprender un grupo hidracina o aminooxi. Por ejemplo, Z puede ser nitrógeno, tal como NH o NR, formando así un extremo de hidracina. Alternativamente, Z puede ser oxígeno, formando así un extremo aminooxi. Los extremos hidracina o aminooxi forman el grupo funcional reactivo de los compuestos químicos reactivos, y como tales, los aldehídos y las cetonas reaccionan con los grupos funcionales hidracina o aminooxi mediante una reacción de deshidratación o condensación. Por consiguiente, el extremo reactivo de los productos químicos reactivos y la funcionalidad carbonilo del VOC son reactantes complementarios a la reacción de condensación que forma aductos de los biomarcadores de cáncer de VOCs que contienen carbonilo.

20 Según las realizaciones de la presente invención, los conjugados o aductos formados entre los compuestos químicos reactivos de la fórmula (I) son hidrazonas (cuando Z=N) u oximas (cuando Z=O). En cualquier forma de aducto, el enlace covalente fija el VOC al resto de anclaje y así pre-concentra los biomarcadores de cáncer de VOCs que contienen carbonilo antes del análisis.

25 En el compuesto químico reactivo, el grupo de enlace L enlaza covalentemente el extremo reactivo con el resto de anclaje. Los compuestos químicos reactivos no están particularmente limitados por su grupo de enlace. Sin embargo, la elevada sustitución en la proximidad del extremo reactivo puede aumentar el impedimento estérico y así afectar la reactividad del compuesto. Como tal, el variar la sustitución puede permitir la diferenciación entre analitos de aldehído y cetona, si se desea. Según las realizaciones de la invención, el grupo de enlace puede incluir un segmento no iónico, que puede ser un alquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, o un éter. Por ejemplo, el grupo de enlace L puede ser un segmento de etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, u octilo. El grupo de enlace L puede incluir un éter, tal como polietilenglicol (PEG).

30 Cuando el compuesto químico reactivo es una sal, el miembro aniónico (A) del compuesto químico reactivo es una especie negativamente cargada que contrarresta el resto positivamente cargado. Según otra realización, A puede ser una base conjugada de un ácido fuerte. Por ejemplo, A puede ser un haluro tal como bromuro o cloruro. Según otra realización, A puede ser una base conjugada de un ácido débil. Por ejemplo, A puede ser un carboxilato tal como benzoato. En una realización, Z es O, e Y es nitrógeno, y el compuesto químico reactivo tiene una fórmula general según la de la fórmula (II):



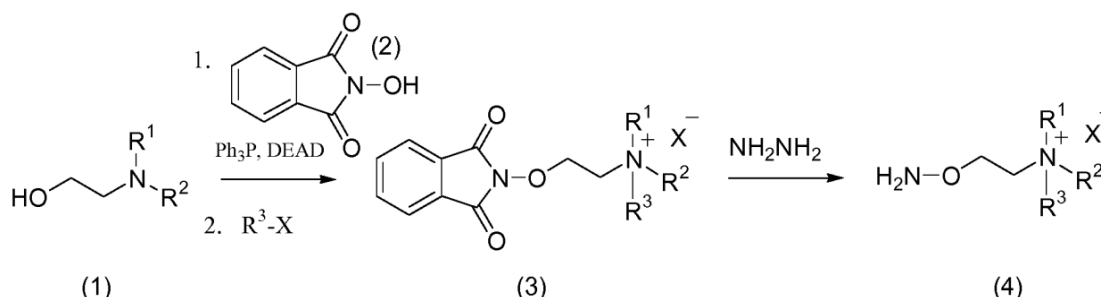
Fórmula (II)

35 donde L, R¹, R², R³ y A se han definido anteriormente. En otra realización, al menos uno de R¹, R² y R³ es un grupo metilo y A es un haluro.

40 También se prevé que el compuesto químico reactivo pueda incluir una pluralidad de extremos reactivos. Por ejemplo, al menos uno de R¹, R² y R³ puede ser un alquilo sustituido o sin sustituir que incluye al menos dos heteroátomos, y que tiene una fórmula general -L¹-Z-NH₂, en donde L¹ es un grupo de enlace entre un nitrógeno de amonio y Z.

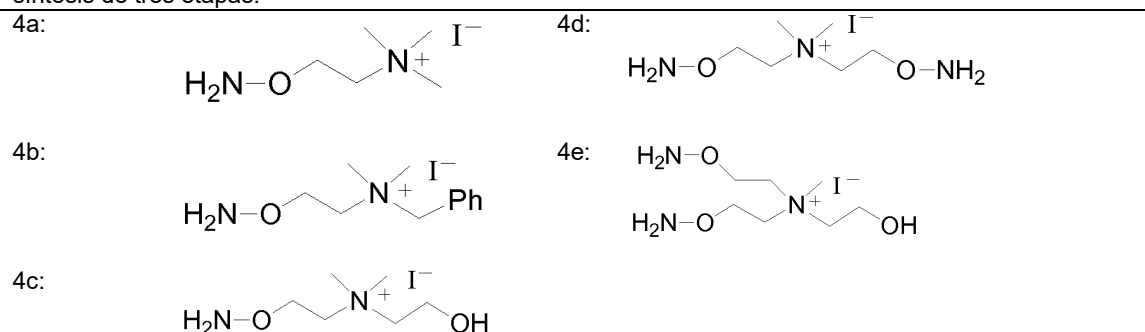
45 Como se muestra en el Esquema 1, se puede obtener un compuesto químico reactivo (4) a modo de ejemplo, según la fórmula (II) donde L es etilo, mediante una secuencia de síntesis de tres etapas. Se puede convertir un

aminoalcohol (1) en la sal de amonio de aminooxi protegida con ftaloilo (3) correspondiente tratando primero el aminoalcohol (1) con N-hidroxiftalimida (2) en condiciones de Mitsunobu, que posteriormente va seguido por cuaternización usando un haluro de alquilo (R^3-X) para proporcionar la sal protegida (3). La retirada del grupo ftaloilo mediante hidrazinólisis proporciona el compuesto reactivo (4). Los compuestos químicos reactivos a modo de ejemplo se muestran en la Tabla 1 a continuación.

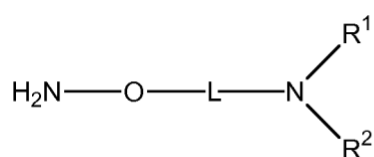


Esquema 1: Síntesis del compuesto reactivo de aminooxi (4) (Ph_3P es trifenilfosfano; DEAD es azodicarboxilato de dietilo).

Tabla 1: Compuestos químicos reactivos 4a-4e a modo de ejemplo preparados según una secuencia de síntesis de tres etapas.



En otra realización más, Z es O, e Y es nitrógeno, y el compuesto químico reactivo tiene una fórmula general según la de la fórmula (III):



Fórmula (III)

Los compuestos químicos reactivos según la fórmula general (III) se pueden preparar omitiendo la etapa de cuaternización (2) en la secuencia sintética mostrada en el Esquema I. Por ejemplo, se puede obtener un compuesto químico reactivo a modo de ejemplo según la fórmula (III) donde L es etilo mediante una secuencia de síntesis de dos etapas. Se puede convertir el aminoalcohol (1) en su aminooxi protegido con ftaloilo correspondiente tratando primero el aminoalcohol (1) con N-hidroxiftalimida (2) en condiciones de Mitsunobu. La retirada del grupo ftaloilo mediante hidrazinólisis proporciona el compuesto reactivo de amina terciaria según la fórmula (III). Un compuesto reactivo de amina terciaria a modo de ejemplo es *N*-(2-(aminooxi)etil)-morfolina (AMA).

Según una realización, el grupo de amina terciaria se puede usar como un grupo de anclaje. En una realización alternativa, el compuesto químico reactivo de amina terciaria se puede convertir en su sal de Bronsted mediante tratamiento con un ácido prótico. Por ejemplo, los compuestos químicos reactivos de amina terciaria de la fórmula (III) se pueden disolver en un disolvente orgánico adecuado y tratar con un ácido para preparar el compuesto químico reactivo de la fórmula (II) donde R^3 es H y A es la base conjugada del ácido.

Los compuestos químicos reactivos se pueden disolver en uno o más disolventes y luego depositar sobre una superficie de una estructura de soporte. El disolvente no está particularmente limitado, pero debe ser capaz de evaporarse mientras que abandona el compuesto químico reactivo sobre la superficie de la estructura de soporte. Los disolventes adecuados incluyen disolventes próticos polares, disolventes apróticos polares, o combinaciones de los mismos. Los disolventes próticos polares a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, agua y alcoholes,

tales como metanol y/o etanol. Los disolventes apróticos polares a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, acetonitrilo, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo y nitrometano. El compuesto químico reactivo se puede proporcionar como un líquido, obtenido combinando el compuesto químico reactivo y al menos un disolvente, que entonces se aplica a una superficie de una estructura de soporte. La retirada del disolvente deposita así el compuesto químico reactivo sobre la superficie de la estructura de soporte como una capa.

Las estructuras de soporte de los preconcentradores químicos, según realizaciones de la presente invención, proporcionan una superficie en la que se puede retener el compuesto químico reactivo después de la retirada de disolvente. Una fuerza de unión que contribuye a retener el compuesto químico reactivo sobre la superficie de la estructura de soporte es la interacción entre la porción del resto de anclaje (por ejemplo, grupo amonio) del compuesto químico reactivo y los grupos funcionales sobre la superficie de la estructura de soporte, tales como hidroxilos, como se trata más adelante.

La configuración de la estructura de soporte no está particularmente limitada por ninguna configuración específica, pero cuando está presente, características tales como la estructura de entrada y salida, formas y patrones de la matriz pueden afectar la eficiencia del compuesto químico reactivo para capturar los analitos químicos deseados. Por consiguiente, la estructura de soporte se puede configurar para optimizar el área superficial y la dinámica de flujo.

En referencia a la FIG. 2A, se proporciona una fotografía que muestra un preconcentrador conectado a dos tubos de sílice fundida, que se muestran situados sobre un dime estadounidense para indicar su tamaño. En la FIG. 2B, se proporciona una micrografía electrónica de barrido que muestra una matriz de micropilotes dentro del preconcentrador mostrado en la FIG. 2A. Se pueden usar otras configuraciones de superficie del preconcentrador.

La estructura de soporte puede comprender cualquier material que sea compatible con el compuesto químico reactivo y sea sustancialmente insoluble en el vehículo de disolvente usado para depositar el compuesto. Más particularmente, la superficie de la estructura de soporte, que puede ser la misma o diferente de la porción subyacente de la estructura de soporte, puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en dieléctricos y semiconductores, que facilita usar técnicas MEMS para la fabricación. Por ejemplo, el material de la superficie puede ser silicio, silicio policristalino, óxido de silicio, nitruro de silicio, oxinitruro de silicio, carburo de silicio, titanio, óxido de titanio, nitruro de titanio, oxinitruro de titanio, carburo de titanio, aluminio, óxido de aluminio, nitruro de aluminio, oxinitruro de aluminio, carburo de aluminio, o combinaciones de los mismos. Ventajosamente, los compuestos químicos reactivos muestran unión excepcional a superficies de estructuras de soporte que comprenden óxido de silicio, óxido de titanio, óxido de aluminio, o combinaciones de los mismos.

La superficie de la estructura de soporte puede afectar las fuerzas de unión para adherir el compuesto químico reactivo a la estructura de soporte. Por ejemplo, la oxidación térmica de la superficie de silicio de la oblea o la deposición de dióxido de silicio puede controlar la densidad de grupos silanol y/o la carga electrostática sobre la superficie de SiO_2 de los micropilotes.

El preconcentrador químico 15 puede comprender además una carcasa que rodea la estructura de soporte, en donde la carcasa tiene una entrada 17 y una salida 19. Según una realización, el preconcentrador químico incluye un conducto de flujo de aire dirigido a la superficie de la estructura de soporte. Los conductos de flujo de aire pueden incluir dispositivos tubulares, que no se unen a la estructura de soporte, o se pueden fabricar en la estructura de soporte. La salida 19 y/o la entrada 17 se pueden configurar para acoplarse con una bomba de muestreo para así facilitar la transferencia de una porción de una muestra gaseosa fuera de la carcasa en la carcasa a través de la entrada.

El compuesto químico reactivo se puede aplicar a la superficie de la estructura de soporte por cualquier método adecuado. En una realización, un líquido que comprende un primer disolvente y el compuesto químico reactivo se pone en contacto con la superficie de la estructura de soporte y el primer disolvente se retira por evaporación a presión reducida. Si se desea, el primer disolvente se puede evaporar en una estufa de vacío. Por ejemplo, se puede preparar una disolución diluida de un compuesto químico reactivo a partir de aproximadamente 3,5 mg del compuesto químico reactivo disuelto en aproximadamente 0,5 ml de un primer disolvente, que simplemente actúa de disolvente portador. Se aplican aproximadamente 10 μl a aproximadamente 20 μl de la disolución diluida al preconcentrador, y entonces el primer disolvente se retira a presión reducida para proporcionar una carga de aproximadamente 0,07 a 0,14 mg del compuesto químico reactivo en el preconcentrador. Después de la retirada del primer disolvente, el preconcentrador químico está listo para concentrar los biomarcadores de VOCs que contienen carbonilo.

En la práctica, se pasa un volumen medido de una muestra de respiración exhalada a través del preconcentrador químico y los VOCs que contienen carbonilo forman aductos con los productos químicos reactivos, que son retenidos sobre la superficie de la estructura de soporte, proporcionando así eficazmente una muestra concentrada de los aductos. Después de interrumpir la exposición, el preconcentrador químico se puede tratar con un segundo disolvente capaz de disolver los aductos de VOC para facilitar la retirada de los aductos de VOC de la superficie de la estructura de soporte y proporcionar una muestra concentrada de los aductos de VOC para pruebas analíticas.

Los disolventes adecuados incluyen disolventes próticos polares, disolventes apróticos polares, o combinaciones de los mismos. Los disolventes próticos polares a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, agua y alcoholes tales como metanol. Los disolventes apróticos polares a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, acetonitrilo, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo y nitrometano. Si se desea, la muestra concentrada eluida se puede concentrar además evaporando al menos una porción del segundo disolvente.

Al menos una porción de la muestra concentrada de los aductos de VOC se puede analizar para identificar y cuantificar los aductos de VOC. Una herramienta analítica a modo de ejemplo es la espectrometría de masas, que se puede realizar con o sin cromatografía. Por ejemplo, el conjugado se puede analizar usando cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectrometría de masas (HPLC-MS) o cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS). Los conjugados químicos neutros, tales como los que se pueden obtener usando compuestos químicos reactivos de amina terciaria según la fórmula general (III), son susceptibles a análisis usando GC-MS. Una característica beneficiosa de los compuestos químicos reactivos de amina terciaria es su capacidad para ser protonados con ácido y formar una carga positiva, que es especialmente muy apta para análisis por espectrometría de masas de resonancia ciclotrónica de ión de transformada de Fourier (FT-ICR-MS), tratada más adelante. Comparando los resultados de FT-ICR-MS y GC-MS, en general, se pueden identificar y/o cuantificar todos los aductos de cetonas y aldehídos. Se debe apreciar que también pueden ser útiles otras técnicas analíticas, por ejemplo, espectroscopía de láser, etc., para cuantificar los aductos de biomarcador. También se pueden utilizar patrones internos para ayudar en el proceso de identificación y/o cuantificación.

Si el compuesto químico reactivo utilizado es una sal catiónica según la fórmula general (II), otro método útil de análisis del conjugado es FT-ICR-MS. La funcionalidad catiónica también confiere sensibilidad excepcionalmente alta por FT-ICR-MS de ión [+] usando técnicas de nanoelectropulverización. Esta sensibilidad excepcionalmente alta permite límites de detección en los intervalos de femtomolar a attomolar. Esta sensibilidad es órdenes de magnitud mejor que incluso la GC-MS más sensible, que, en general, requiere 100-1.000 femtomoles o más para la detección. Además, debido a que los VOCs se convierten en no volátiles, la disolución analítica final se puede concentrar (por ejemplo, a sequedad) y absorber por una cantidad muy pequeña de disolvente. Además, la FTMS de nanoelectropulverización solo necesita algunos microlitros de volumen de muestra.

Además, también se puede acoplar FT-ICR-MS con ionización química (CI) o fotoionización (PI) y operar en modo de ión negativo [-]. La operación en modo de ión [-] rechaza la fase catiónica y permite el análisis de otros productos químicos retenidos en el preconcentrador químico. En cualquier modo, los aductos de VOC del compuesto químico reactivo se pueden desorber de la superficie del soporte de estructura del preconcentrador por disolución con disolvente seguido por análisis directo de FT-ICR-MS.

Las muestras concentradas de los aductos de VOC que contienen carbonilo, que se pueden obtener de especímenes sanos y especímenes de sujeto, se pueden analizar usando FT-ICR-MS y cuantificar. Entonces se pueden comparar los resultados analíticos entre los grupos de especímenes usando métodos estadísticos, tales como la prueba de Wilcoxon para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de espécimen. Según las realizaciones de la presente invención, se han identificado biomarcadores de VOCs que contienen carbonilo específicos (es decir, 2-butanona, 2-hidroxiacetaldehído, 3-hidroxi-2-butanona, 4-hidroxi-2-hexenal, 4-hidroxi-2-nonenal, y una mezcla de compuestos de $C_5H_{10}O$ que incluye 2-pentanona y pentanal) que están presentes a niveles elevados en la respiración exhalada de pacientes con cáncer (especímenes de sujeto) con diferentes tipos de cánceres primarios que se originan en tejidos fuera del pulmón y pueden incluir cánceres primarios que metastatizan al pulmón. Los cánceres primarios a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinoma supraglótico epidermoide, cáncer pancreático, melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de esófago, condrosarcoma, colangiocarcinoma, linfoma y cáncer escamoso de piel.

En el presente documento, los presentes inventores describen un análisis cuantitativo, usando preconcentradores químicos de microrreactores de silicio para la captura de VOCs que contienen carbonilo, que forman aductos de los VOCs que contienen carbonilo contenidos en la respiración exhalada, y la identificación/cuantificación de VOCs que contienen carbonilo específicos que están relacionados con la histología del cáncer. El método descrito en el presente documento solo requiere que un paciente sujeto proporcione una cantidad suficiente de respiración exhalada, tal como llenando una bolsa Tedlar de un litro con respiración exhalada. La muestra de respiración exhalada se puede procesar entonces adicionalmente y analizar cuantitativamente, por ejemplo por espectrometría de masas.

Sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, los métodos descritos en el presente documento se argumentan en el principio creído de que el cáncer induce estrés oxidativo y enzimas oxidasa, y esto a su vez produce mayores concentraciones de VOCs que contienen carbonilo específicos que son liberados en la sangre y se desplazan a los pulmones donde los VOCs que contienen carbonilo son exhalados en la respiración. Los VOCs que contienen carbonilo se producen en vías bioquímicas como productos intermedios, y algunos pueden ser únicos para una vía dada, tal como la oxidación de lípidos inducida por radicales libres. Por tanto, la investigación centrada en la identificación de biomarcadores de VOCs que contienen carbonilo de cáncer en la respiración exhalada usando la tecnología de preconcentradores químicos de microrreactores de silicio que los presentes inventores desarrollaron

previamente para la captura y el análisis de VOC de carbonilo traza en aire y respiración exhalada.

Ahora se desvelan a continuación ejemplos no limitantes de un método de detección de un estado de enfermedad de cáncer, según la descripción. Estos ejemplos son simplemente con el fin de ilustración y no se deben considerar como limitantes del alcance de la invención o el modo en el que se puede poner en práctica. Otros ejemplos serán apreciados por un experto habitual en la técnica.

Ejemplos

10 El preconcentrador químico

Los preconcentradores químicos (o microrreactores de silicio) se fabricaron a partir de obleas de silicio de 4" usando técnicas de fabricación convencionales de sistemas microelectromecánicos (MEMS), tal como se describe en Li, M. et al. (2012) Preconcentration and Analysis of Trace Volatile Carbonyl Compounds, Anal. Chem. 84:1288-1293 y la patente de EE. UU. Nº 8.663.581. El microrreactor (FIG. 2A) incluye una matriz de micropilotes que definen canales microfluídicos (observados en la FIG. 2B). Los micropilotes tienen una relación de aspecto con dimensiones de 50 μm \times 50 μm \times 250 μm creadas por grabado en seco por iones reactivos (DRIE). La distancia de centro a centro de los micropilotes es 100 μm . El tamaño del canal es 7 mm x 5 mm, con un volumen total en el microrreactor de aproximadamente 5 μl . El microrreactor incluye más de cinco mil micropilotes cuadrados correspondientes a un área superficial total de micropilotes de aproximadamente 260 mm^2 . Se ajustaron la entrada y salida del microrreactor con tubos de sílice fundida desactivada de 190 μm de D.E., 100 μm de D.I, usando un agente de unión basado en sílice (véase la Fig. 2A).

Se realizó la funcionalización superficial de los canales y micropilotes con yoduro de 2-(aminoxio)-*N,N,N*-trimetiletanamonio (ATM) (Estructura 4a en la Tabla 1) inyectando yoduro de ATM en disolución de metanol de concentración conocida en el microrreactor a partir de un puerto de conexión, seguido por evaporación del disolvente a vacío. La carga superficial ligeramente negativa de los micropilotes de óxido de silicio permite la unión electrostática de ATM catiónico sobre las superficies de los micropilotes. ATM reacciona quimiosselectivamente con VOCs que contienen carbonilo traza en la respiración exhalada por medio de oximación con alta reactividad.

30 Recogida y procesamiento de especímenes de respiración exhalada

Se recogieron muestras de aire y respiración exhalada en bolsas Tedlar® de un litro (Sigma-Aldrich, EE. UU.). El protocolo de investigación detallado para la recogida de muestras de respiración exhalada fue autorizado por el Comité de ética médica (IRB) en la Universidad de Louisville. Se analizaron muestras de respiración exhalada de controles sanos (n=193) y pacientes con diversos tipos de cánceres primarios que se originaron fuera del pulmón (n=32) y se determinaron las concentraciones de todos los compuestos que contenían carbonilo. Todo el diagnóstico clínico de los pacientes con cánceres primarios que se originaron fuera del pulmón se hizo independiente de la recogida de muestras de respiración exhalada.

Para la recogida de muestras de respiración exhalada, los sujetos exhalarían directamente la respiración en bolsas Tedlar® a través de la punta de Teflon®, proporcionando así una técnica de recogida no invasiva que era fácilmente aceptada por los pacientes. Después de la recogida de respiración exhalada, se conectaron las bolsas Tedlar® al puerto de entrada del microrreactor a través de un tubo de sílice fundida. El puerto de salida del microrreactor se conectó a una bomba de vacío mediante el otro tubo de sílice fusionada en el microrreactor como se muestra en la FIG. 2A. El ensamblaje de análisis 10, mostrado en la FIG. 1, para la captura de VOCs que contienen carbonilo incluye una bomba de vacío 50 para extraer muestras de respiración gaseosa de la bolsa Tedlar® a través del preconcentrador recubierto con ATM 15. Después de que se hubiera extraído la muestra de respiración exhalada a través del preconcentrador 15 y evacuado por vacío, se desconectó el preconcentrador 15. Finalmente, se eluyeron los aductos de ATM-VOC del preconcentrador 15 con 100 μl de metanol frío para proporcionar 99 % de recuperación ATM-VOC. Se analizó directamente la disolución diluida por FT-ICR-MS. Se añadió una cantidad conocida de ATM-acetona-d6 en metanol al eluyente como patrón interno. Se determinaron las concentraciones de todos los compuestos de carbonilo en la respiración exhalada por comparación de la abundancia relativa con la de ATM-acetona-d6 añadido como referencia de patrón interno.

55 Instrumentación de FT-ICR-MS

Se analizó el eluyente por una trampa iónica lineal híbrida-FT-ICR-EM (Finnigan LTQ FT, Thermo Electron, Bremen, Alemania) equipada con una fuente de iones TriVersa NanoMate (Advion BioSciences, Ithaca, NY) con un chip de electropulverización (diámetro interno de boquilla 5,5 μm). TriVersa NanoMate fue operado en modo de ión positivo aplicando 2,0 kV sin presión de cabeza. Inicialmente, se adquirieron barridos de MS de baja resolución durante 1 minuto para garantizar la estabilidad de la ionización, después de que se recogieran datos de exactitud de masa usando el analizador FT-ICR. Se adquirieron barridos de FT-MS durante 8,5 min a una resolución de masa diana de 100.000 a 800 m/z. El tiempo de ión máximo de AGC (control automático de ganancia) se estableció a 500 ms (pero normalmente se utilizó <10 ms) y se adquirieron cinco "mscans" para cada espectro guardado; así, el tiempo de ciclo para cada espectro transformado y guardado fue aproximadamente 10 segundos. Se exportaron los espectros de

masas de FT-ICR como listas de masa exacta en un archivo de hoja de cálculo usando QualBrowser 2.0 (Thermo Electron), normalmente exportando todos los picos observados. Se asignaron aductos de ATM y ATM-VOC basándose en su masa precisa aplicando primero una pequeña corrección lineal (normalmente <0,0005) basada en la masa observada del patrón interno.

5
Análisis de datos estadísticos

10 Se separaron las concentraciones de VOC de carbonilo medidas en las muestras de respiración exhalada en control de espécimen sano (n=193), cáncer primario solo (n=13), cáncer primario metastásico a los grupos de pulmón (n=19) y todos los pacientes con cáncer primario, es decir, tanto cáncer primario solo como primario metastásico al pulmón (n=32). Los grupos que tenían un número suficiente de muestras se analizaron por la prueba de Wilcoxon para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las pruebas de Wilcoxon se realizaron usando Minitab versión 16.0.

15 Resultados y discusión

20 Se caracterizaron las eficiencias de captura de carbonilo por el preconcentrador recubierto de ATM usando primero patrones de carbonilo individuales y mezclas de patrones de carbonilo. Las eficiencias de captura están afectadas por la velocidad de la mezcla de VOCs que circulan a través de los preconcentradores, así como la relación molar de ATM/compuesto de carbonilo. Se han logrado eficiencias de captura superiores a 98 % para cetonas y aldehídos traza en condiciones optimizadas de microestructura de preconcentrador y de operación.

25 Antes del análisis de la respiración exhalada, se determinaron las concentraciones de VOCs de carbonilo de muestras de aire de laboratorio, aire de la sala de la clínica y aire de la calle. Entonces, se midieron las concentraciones de VOCs de carbonilo en las muestras de respiración exhalada de 193 controles sanos (especímenes sanos) y 32 pacientes (especímenes de sujeto) con cánceres primarios que se originaron fuera del pulmón. Los pacientes con cánceres primarios se subdividieron en grupos en los que el cáncer primario había metastatizado al pulmón (melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de ovario, colangiocarcinoma, linfoma y cáncer escamoso de piel) y grupos en los que no se identificó cáncer metastásico en el pulmón (cáncer de esófago, cáncer supraglótico epidermoide, mesotelioma, condrosarcoma y cáncer pancreático). Se han detectado VOCs que contienen carbonilo de C1 (formaldehído) a C12 en las muestras de respiración exhalada de los sujetos sanos y los pacientes con cánceres primarios que se originaron fuera del pulmón (tanto cáncer primario solo como primario metastásico al pulmón).

35 Esto representa un amplio intervalo de tipos oncológicos de células y tejidos de origen. Para explicar los datos más cuidadosamente - cuando se comparó con una cohorte de 193 pacientes de control, cada paciente con cáncer tuvo al menos un compuesto de carbonilo que estaba presente a niveles superiores a dos desviaciones estándar por encima de los niveles identificados en la población de control. Esto se representa en los gráficos de las FIGS. 3-6, cada uno de los cuales representa los valores para uno de los cuatro marcadores diferentes, es decir, C₄H₈O (FIG. 3), C₂H₄O₂ (FIG. 4), C₄H₈O₂ (FIG. 5) y 4-HHE (FIG. 6), para una variedad de cánceres. La barra más a la izquierda en cada gráfica es el valor medio para la población de control (con barras de error que representan la desviación estándar), mientras que las restantes barras son los valores para los pacientes con los cánceres indicados.

45 Por tanto, como se ilustra en las Tablas 2 y 3 a continuación, todos los sujetos con cada tipo de cáncer tuvieron valores elevados para al menos uno de los cuatro marcadores diferentes y la mayoría tuvieron niveles elevados de al menos dos marcadores diferentes.

Tabla 2: Porcentaje de sujetos que tienen al menos 1, 2 o 3 marcadores elevados

Distribución de compuestos	N	1 o más	2 o más	2 o más
Total de otros cánceres	32	93,70 %	65,60 %	40,60 %
Cáncer primario (No METS)	13	84,60 %	61,50 %	38,40 %
Metástasis al pulmón (METS)	19	100 %	68,40 %	42,10 %

50

Tabla 3: Datos a modo de ejemplo de niveles elevados de marcadores en sujetos con una amplia variedad de tipos de cáncer primario

Distribución Primaria	N	C₄H₈O	C₂H₄O₂	C₄HO₈O₂	4-HHE	1 o más	2 o más	2 o más
Epidermoide esofágico	9	66,70 %	66,70 %	66,70 %	33,30%	100 %	66,70 %	44,40 %
Supraglotis	1					100 %	100 %	100 %
Mesotelioma	1					0	0	0
Condrosarcoma	1					0	0	0
Pancreático	1					100%	100%	0
Distribución METS	N	C₄H₈O	C₂H₄O₂	C₄HO₈O₂	4-HHE	1 o más	2 o más	2 o más
Melanoma	4	50 %	25 %	75 %	50 %	100 %	50 %	50 %
Cáncer de colon	5	60 %	40 %	100 %	20 %	100 %	60 %	40 %
Mama	2					100 %	100 %	50 %
Renal	2					100 %	100 %	50 %
Páncreas	1					100 %	100 %	0
Próstata	1					100 %	100 %	100 %
Ovario	1					100 %	0 %	0
Colangiocarcinoma	1					100 %	100 %	0 %
Linfoma	1					100 %	0 %	0
Piel escamosa	1					100 %	100 %	100 %

REIVINDICACIONES

1. Un método no invasivo de detección de un estado de enfermedad de cáncer en un espécimen del sujeto en donde el cáncer primario se origina en un tejido fuera del pulmón, comprendiendo el método las etapas de:

obtener respiración exhalada del espécimen del sujeto, en donde la respiración exhalada incluye una pluralidad de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que contienen carbonilo seleccionados de 2-butanona, 2-hidroxiacetaldehído, 3-hidroxi-2-butanona y 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE);

formar aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo con un compuesto químico reactivo, en donde el compuesto químico reactivo tiene una fórmula general (I) de:



en donde Z es NH, NR u O; L es un grupo de enlace; Y es un resto N o P disustituido o trisustituido; R se selecciona del grupo que consiste en alquilos, aralquilos, aralquenilos y aralquinilos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos, y en donde la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo reaccionan con el compuesto químico reactivo mediante una reacción de deshidratación para formar los aductos de los mismos;

cuantificar cada uno de los aductos de cada uno de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo para establecer un valor objeto para cada uno de los aductos; y

comparar cada valor objeto con un valor de espécimen sano umbral para cada uno de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo, correspondiendo el valor de espécimen sano umbral a un valor calculado a partir de especímenes sanos, para determinar la presencia de dos o más valores objeto en cantidades superiores a sus valores de espécimen sano umbral respectivos, indicando así una probabilidad sustancial de un estado de enfermedad de cáncer en el espécimen del sujeto.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el estado de enfermedad de cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma supraglótico epidermoide, cáncer pancreático, melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de esófago, condrosarcoma, colangiocarcinoma, linfoma, y cáncer escamoso de piel.

3. El método de una de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además:

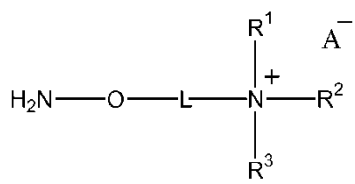
concentrar la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo contenidos en la respiración exhalada obtenida de una pluralidad de especímenes sanos, en donde la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo forman aductos con el compuesto químico reactivo; y

cuantificar los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo en la pluralidad de especímenes sanos para establecer los valores de espécimen sano umbral para cada uno de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo.

4. El método de una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde obtener respiración exhalada del espécimen del sujeto comprende recoger la respiración exhalada en un dispositivo inflable de película polimérica para proporcionar un dispositivo inflado que comprende una muestra de respiración; y en donde formar aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo con un compuesto químico reactivo comprende pasar la muestra de respiración a través de un preconcentrador químico que comprende los productos químicos reactivos.

5. El método de la reivindicación 4, en donde pasar la muestra de respiración a través de un preconcentrador químico comprende conectar el dispositivo inflado a una entrada del preconcentrador químico, y aplicar presión reducida a una salida del preconcentrador químico para inducir el flujo de la muestra de respiración del dispositivo inflado a través del preconcentrador químico.

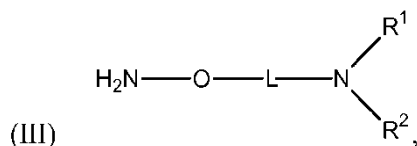
6. El método de una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde Z es O, e Y es un nitrógeno disustituido o trisustituido para proporcionar el compuesto químico reactivo que tiene una fórmula general (II)



en donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilos, aralquilos, aralquenilos y aralquinilos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos, o en donde R^1 y R^2 en combinación forman un anillo heterocíclico; R^3 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilos, aralquilos, aralquenilos y aralquinilos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin

sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos; y A es un contraión aniónico; y en donde dicho grupo de enlace L comprende un segmento no iónico seleccionado del grupo que consiste en un alquilo sustituido o sin sustituir, un arilo sustituido o sin sustituir, y un éter.

- 5 7. El método de una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde Z es O, e Y es un nitrógeno disustituido para proporcionar el compuesto químico reactivo que tiene una fórmula general (III)



- 10 en donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilos, aralquilos, aralquenos y aralquinos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos, o en donde R^1 y R^2 en combinación forman un anillo heterocíclico.

- 15 8. El método de la reivindicación 1, en donde el producto químico reactivo es una sal de 2-(aminooxi)-N,N,N-trimetiletanamonio.

- 20 9. El método de una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde cuantificar los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo para establecer el valor objeto para cada miembro de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo comprende analizar los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo usando un espectrómetro de masas.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el espectrómetro de masas usa espectrometría de masas de resonancia ciclotrónica de ión de transformada de Fourier (FTICR-MS).

- 25 11. El método de la reivindicación 9, en donde el espectrómetro de masas se acopla con un aparato de cromatografía.

12. Un método no invasivo de cribado de un estado de enfermedad de cáncer en un espécimen del sujeto en donde el cáncer primario se origina en un tejido fuera del pulmón, comprendiendo el método las etapas de:

- 30 concentrar una pluralidad de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que contienen carbonilo contenidos en la respiración exhalada obtenida del espécimen del sujeto, en donde la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo se selecciona del grupo que consiste en 2-butanona, 2-hidroxiacetaldehído, 3-hidroxi-2-butanona y 4-hidroxi-hexenal, que forman aductos con un compuesto químico reactivo, en donde el compuesto químico reactivo tiene una fórmula general (I) de:



- 40 en donde Z es NH, NR u O; L es un grupo de enlace; Y es un resto N o P disustituido o trisustituido; R se selecciona del grupo que consiste en alquilos, aralquilos, aralquenos y aralquinos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o sin sustituir, y opcionalmente contienen uno o más heteroátomos, y en donde la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo reaccionan con el compuesto químico reactivo mediante una reacción de deshidratación para formar los aductos de los mismos;
- 45 cuantificar los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo para establecer un valor objeto para cada miembro de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo; y
- comparar el valor objeto para cada miembro de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo con un valor de espécimen sano umbral para cada miembro de los aductos de la pluralidad de VOCs que contienen carbonilo para determinar la presencia de dos o más VOCs que contienen carbonilo en cantidades superiores a su valor de espécimen sano umbral respectivo indicando así una probabilidad sustancial del
- 50 estado de enfermedad de cáncer en el espécimen del sujeto.

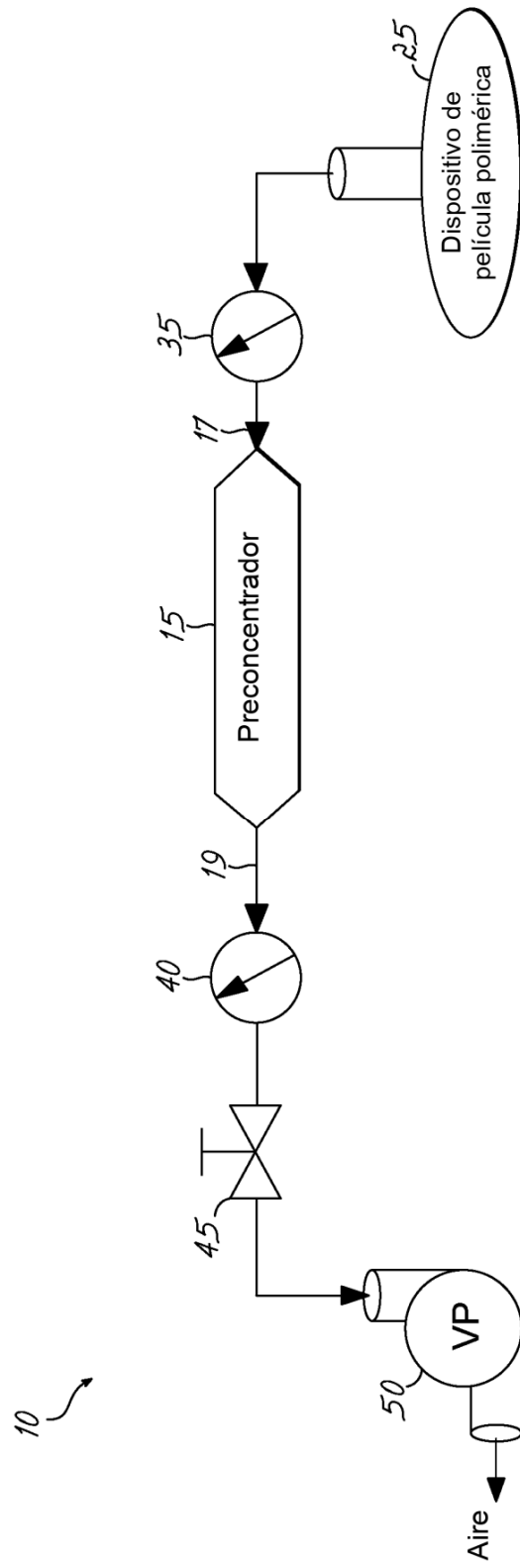


FIG. 1

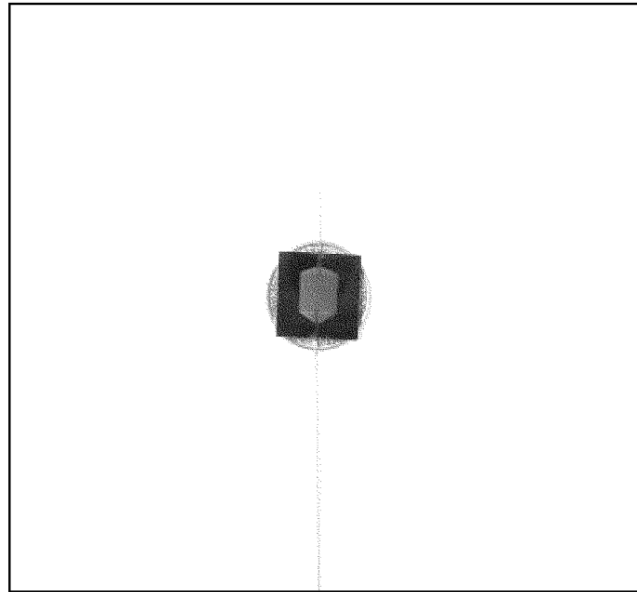


FIG. 2A

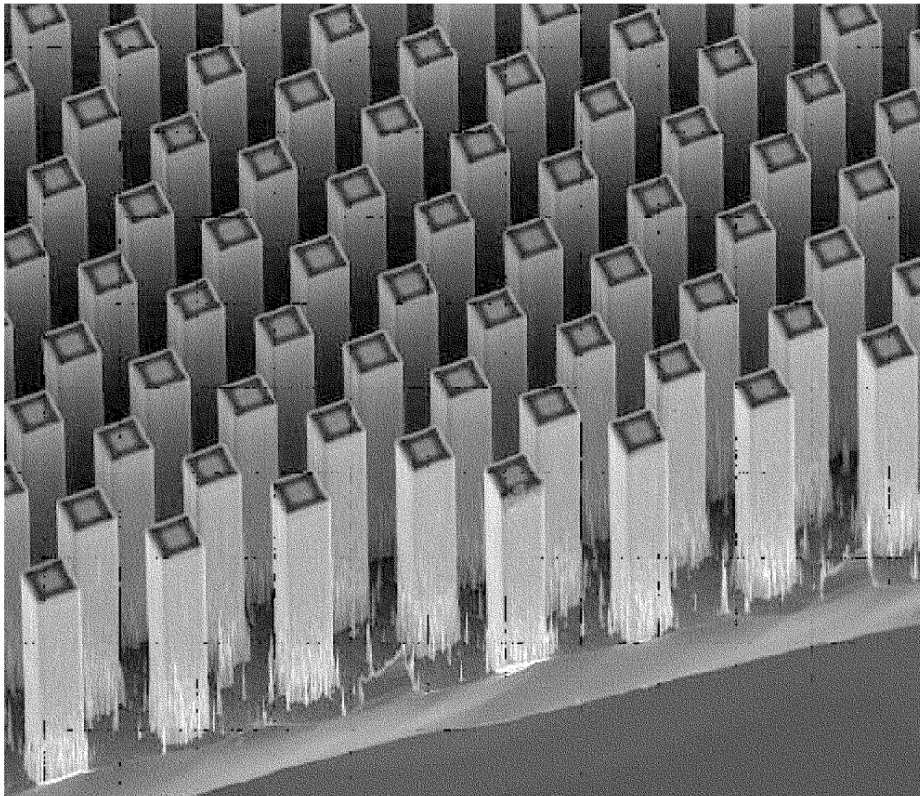


FIG. 2B

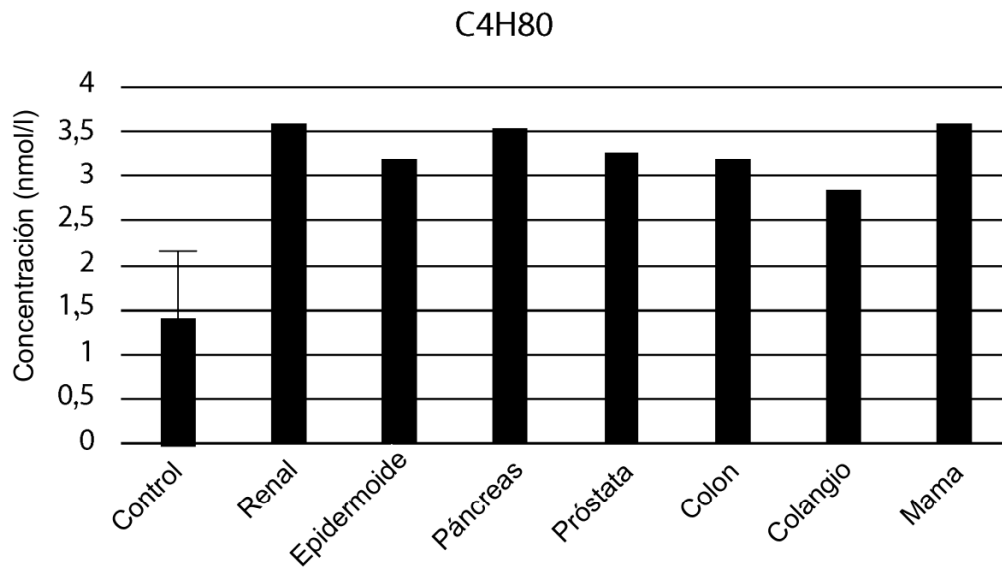


FIG. 3

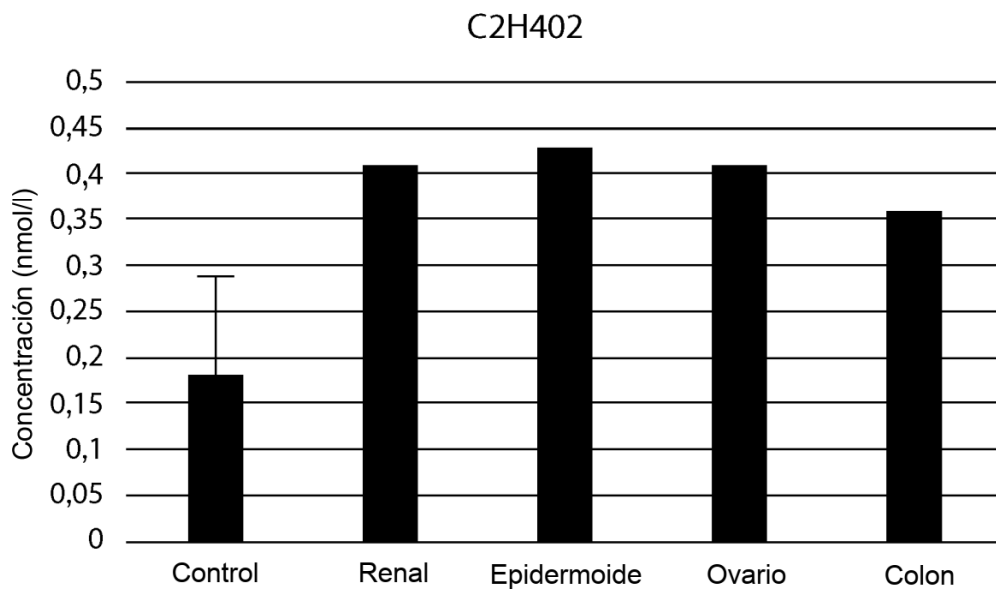


FIG. 4

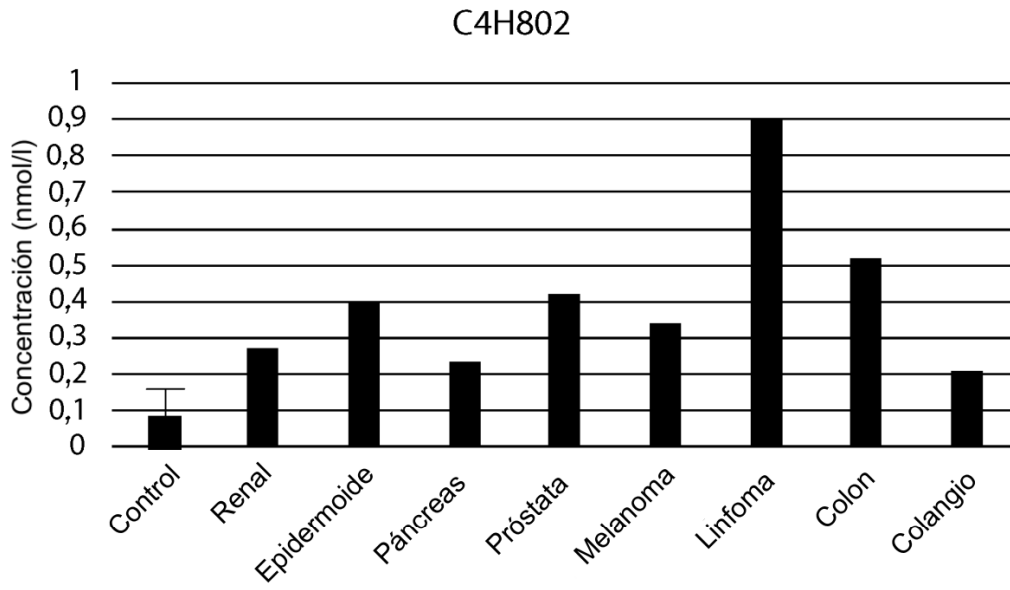


FIG. 5

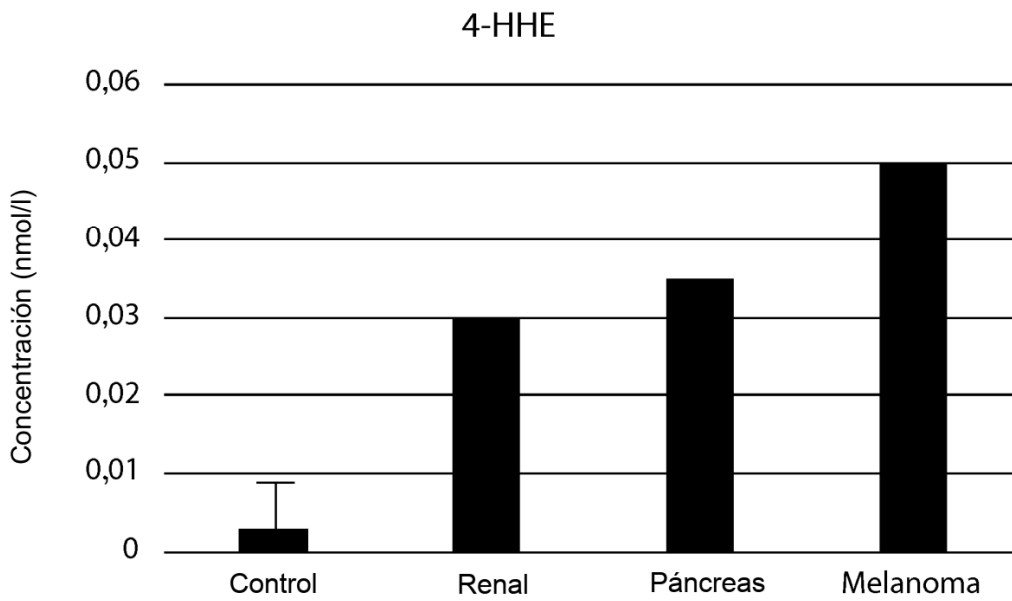


FIG. 6