

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780039935.9

[43] 公开日 2009年9月9日

[11] 公开号 CN 101529249A

[22] 申请日 2007.6.4

[21] 申请号 200780039935.9

[30] 优先权

[32] 2006.8.30 [33] EP [31] 06119780.2

[86] 国际申请 PCT/EP2007/055472 2007.6.4

[87] 国际公布 WO2008/025579 英 2008.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.27

[71] 申请人 梅坦诺米克斯有限公司

地址 德国柏林

[72] 发明人 T·B·沃克 R·洛塞

M·M·赫罗尔德 J·C·威尔莫

A·普奥考汀 E·莱博尔德

B·范拉文兹韦 W·梅勒特

G·科埃略巴勒莫库尼亚

E·法比安 V·施特劳斯

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 陈迎春

权利要求书 4 页 说明书 24 页

[54] 发明名称

用于诊断溶血性贫血的工具和方法

[57] 摘要

本发明涉及用于诊断溶血性贫血或其素质的方法。 其还涉及测定化合物是否能够在受试者中诱导溶血性贫血的方法和涉及鉴定用于治疗溶血性贫血的药物的方法。 此外, 本发明还涉及包括代谢物特征值的数据集合、包括所述数据集合的数据存储介质以及用于诊断溶血性贫血的系统 and 装置。 最后, 本发明涉及一组代谢物或用于测定其的工具在制备用于诊断受试者溶血性贫血的诊断装置或组合中的用途。

1. 用于诊断溶血性贫血或其素质的方法，其包括：
 - (a) 测定怀疑患有溶血性贫血或具有其素质的受试者的受试样品中脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的量；和
 - (b) 将步骤(a)中测定的量与参照相比较，由此将诊断出溶血性贫血或其素质。
2. 权利要求 1 的方法，其中已使所述受试者与怀疑能够诱导溶血性贫血的化合物接触。
3. 确定化合物是否能够在受试者中诱导溶血性贫血的方法，其包括：
 - (a) 测定已与怀疑能够诱导溶血性贫血的化合物接触的受试者其样品中脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的量；和
 - (b) 将步骤(a)中测定的量与参照相比较，由此测定该化合物诱导溶血性贫血的能力。
4. 权利要求 2 或 3 的方法，其中所述化合物是芳族胺类、胍类或羟胺类。
5. 权利要求 1 至 4 中任一项的方法，其中所述参照来源于(i) 已与芳族胺类、胍类或羟胺类接触的受试者或(ii)患有血管外溶血性贫血的受试者。
6. 权利要求 5 的方法，其中受试样品和参照中脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的相同或相似量是溶血性贫血或其素质的指示。
7. 权利要求 1 至 4 中任一项的方法，其中所述参照来源于(i) 未与芳族胺类、胍类或羟胺类接触的受试者或(ii)已知不患有血管外溶血性贫血或其素质的受试者。
8. 权利要求 1 至 4 中任一项的方法，其中所述参照是关于受试者群体的脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的经计算的参照。
9. 权利要求 7 或 8 的方法，其中与参照相比受试样品中不同量的脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 是溶血性贫血或其素质的指示。

10. 权利要求 7 至 9 中任一项的方法，其中与参照相比脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 量的增加是溶血性贫血的指示。

11. 权利要求 1 至 10 中任一项的方法，其中所述方法还包括测定至少一种肾上腺皮质类固醇。

12. 权利要求 11 的方法，其中与参照相比所述至少一种肾上腺皮质类固醇量的减少是溶血性贫血的指示。

13. 鉴定用于治疗溶血性贫血的物质的方法，其包括步骤：

(a) 测定已与用于治疗溶血性贫血的候选物质接触的患有溶血性贫血的受试者其样品中脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和 ribal 的量；和

(b) 将步骤(a)中测定的量与参照相比，由此将鉴定出药物。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述参照来源于(i) 已与芳族胺类、肟类或羟胺类接触的受试者或(ii)患有血管外溶血性贫血的受试者。

15. 权利要求 14 的方法，其中在受试样品与参照中不同量的脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 是物质用于治疗溶血性贫血的指示。

16. 权利要求 13 至 15 中任一项的方法，其中与参照相比脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 量的减少是物质用于治疗溶血性贫血的指示。

17. 权利要求 13 至 16 中任一项的方法，其中所述方法还包括测定至少一种肾上腺皮质类固醇。

18. 权利要求 17 的方法，其中与参照相比所述至少一种肾上腺皮质类固醇量的增加是物质用于治疗溶血性贫血的指示。

19. 权利要求 13 的方法，其中所述参照来源于(i) 未与芳族胺类、肟类或羟胺类接触的受试者或(ii)已知未患有血管外溶血性贫血或其素质的受试者。

20. 权利要求 13 的方法，其中所述参照是关于受试者群体中脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的经计算的参照。

21. 权利要求 21 或 20 的方法，其中受试样品和参照中脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的相同或相似量是物质用于治疗溶血性贫血的指示。

22. 权利要求 1 至 21 中任一项的方法，其中所述溶血性贫血是血管外溶血性贫血。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述血管外溶血性贫血是由芳族胺类、肟类或羟胺诱导的。

24. 权利要求 1 至 23 中任一项的方法，其中所述成组的代谢物的测定包括质谱法(MS)。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述质谱法是液相色谱(LC)-MS 或气相色谱(GC)-MS。

26. 权利要求 1 至 25 中任一项的方法，其中所述样品是所述受试者体液的样品。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述体液是血液。

28. 权利要求 1 至 27 中任一项的方法，其中所述受试者是哺乳动物。

29. 包括脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的特征值的数据集合。

30. 权利要求 29 的数据集合，其还包括至少一种肾上腺皮质类固醇的特征值。

31. 包括权利要求 29 或 30 的数据集合的数据存储介质。

32. 一种系统，其包括

(a) 用于比较样品代谢物的特征值的工具，其有效连接至

(b) 权利要求 31 的数据存储介质。

33. 权利要求 32 的系统，还包括用于测定样品代谢物的特征值的工具。

34. 诊断组合，包括脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 或用于测定其的工具。

35. 权利要求 34 的诊断组合，其中所述组合还包括至少一种肾上腺皮质类固醇或用于测定其的工具。

36. 一种诊断装置，其包括

(a) 用于测定脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的特征值的工具；

和

(b) 基于通过(a)的工具所测定的特征值用于诊断溶血性贫血或其素质

的工具。

37. 权利要求 36 的诊断装置，其中所述装置还包括用于测定至少一种肾上腺皮质类固醇的工具。

38. 脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 或用于测定其的工具在制备用于诊断受试者溶血性贫血的诊断装置或组合中的用途。

39. 权利要求 38 的用途，其中将进一步使用至少一种肾上腺皮质类固醇或用于测定其的工具。

用于诊断溶血性贫血的工具和方法

描述

本发明涉及用于诊断溶血性贫血或其素质的方法。其还涉及确定化合物是否能够在受试者中诱导溶血性贫血的方法和鉴定用于治疗溶血性贫血的药物的方法。此外，本发明涉及包括代谢物的特征值的数据集合、包括所述数据集合的数据存储介质和用于诊断溶血性贫血的系统 and 装置。最后，本发明涉及一组代谢物或用于测定其的工具的用途，其用于制备诊断受试者溶血性贫血的诊断装置或组合。

溶血性贫血由不断增加的红细胞(RBC)破坏引起。根据该破坏的位置，溶血性贫血分为血管内溶血性贫血（当溶血发生在血管内时）和血管外溶血性贫血（当溶血通过主要在脾内的吞噬细胞进行时）。溶血性贫血可以是不同因素的结果，例如遗传因素或环境因素。环境因素可以是例如，与作为环境污染结果的毒性化合物接触。已知诱导溶血的溶血性贫血的化合物是例如芳香胺类、羟胺或肟类和它们的盐。该类型的溶血性贫血被认为是血管外类型。

血液学、临床和组织病理学参数目前用于诊断溶血性贫血的毒理学研究。具体地，预示着溶血的溶血性贫血的血液学参数是：减少的 RBC 计数、减少的血红蛋白浓度和减少的血细胞比容值；增加的平均红细胞容积 (MCV；=大红细胞溶血性贫血)；通常减少的平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC；=低色性溶血性贫血 (hypochromic hemolytic anemia))；增加的网织红细胞计数(在 2-3 天内)；异常红细胞形态学的存在，例如红细胞大小不均、多染性、球形红细胞、异形红细胞以及晚幼红细胞、海因茨小体的发生；白细胞计数通常增加。来源于临床化学的溶血性贫血的参数是：增加的血清胆红素水平(主要在血管内溶血性贫血的 8 至 10 小时中)；增加的血清乳酸脱氢酶(同工酶 1)活性；增加的游离血清血红蛋白和减少的触珠

蛋白水平(主要在血管内容血性贫血中); 增加的促红细胞生成素水平; 血红蛋白尿。溶血性贫血的组织病理学标准是: 特征为红髓增大和增加的红细胞吞噬作用的脾重量的增加; 髓外血细胞生成(主要在肝和脾中); 血铁黄素蛋白沉着症(肝、脾、肾); 肝巨噬细胞的活化; 骨髓中增加的红细胞生成。

临床病理学参数中的这些变化作为红细胞破坏的结果发生。不存在用于诊断溶血的溶血性贫血的唯一标记。溶血性贫血期间发生的许多生物化学变化是替换被破坏的红细胞(即网织红细胞、异常红细胞形态、促红细胞生成素)的病毒生理学反应。然而, 在使溶血和病理生理学体征变得明显的事件之间存在明显的时间间隔。此外, 溶血病因的显著效应是显示临床体征所必需的。

用于有效和可靠地确定溶血性贫血, 特别是其早期发作或素质的灵敏而且特异性的方法目前还不可获得, 然而却是受到高度的期待。

因此, 本发明根本的技术问题可看作是提供用于有效和可靠诊断溶血性贫血和/或其素质的工具和方法。技术问题通过权利要求中表征的和本文下面描述的实施方案得以解决。

因此, 本发明涉及用于诊断溶血性贫血或其素质的方法, 该方法包括:

(a)测定怀疑患有溶血性贫血或怀疑具有其素质的受试者的受试样品中脱氧胞苷的量; 和

(b)将步骤(a)中测定的量与参照相比较, 由此将诊断出溶血性贫血或其素质。

根据本发明所提及的表述“用于诊断的方法”是指基本上由上述步骤组成的或可包括另外步骤的方法。然而, 应理解的是在优选实施方案中, 方法是离体(即不在人或动物身体中实施的)进行的方法。本文中所使用的诊断是指评估受试者患病的概率。如本领域技术人员将理解的, 这样的评估, 尽管优选是, 但通常不是对于 100%的接受诊断的受试者而言都是正确的。然而, 所述术语要求统计学上显著部分的受试者可被鉴定为患有疾病或具有其素质。一部分是否是统计学上显著的可由本领域技术人员使

用熟知的统计评估工具例如置信区间的测定、p-值测定、Student 氏 t-检验、Mann-Whitney 检验等测定而无需过多实验。详细内容见于 Dowdy 和 Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983。优选置信区间为至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%。p-值优选为 0.2、0.1、0.05。

根据本发明的诊断包括相关疾病或其症状的监测、验证和分类。监测涉及记录已诊断的疾病,例如,涉及分析疾病的进展、特定治疗对疾病进展的影响或疾病期间或在疾病的成功治疗之后产生的并发症。验证涉及加强或证实已使用其他指示剂或标记进行的诊断。分类涉及根据症状的强度或类型而将诊断划分为不同的种类。

术语“溶血性贫血”是指特征为减少的红细胞量的受试者的病理生理状况。优选,本文中所使用的溶血性贫血可通过血液学、临床病理学和组织病理学参数来表征。预示着溶血性贫血的血液学参数是:减少的 RBC 计数、减少的血红蛋白浓度和减少的血细胞比容值;增加的平均红细胞容积(MCV;=大红细胞溶血性贫血);任选地,减少的平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC;=低色性溶血性贫血);增加的网织红细胞计数(在 2-3 天内);异常红细胞形态学的存在,例如红细胞大小不均、多染性、球形红细胞、异形红细胞以及晚幼红细胞、海因茨小体;白细胞计数任选地增加。来源于临床化学的溶血性贫血的参数是:增加的血清胆红素水平(主要在血管内容血性贫血的 8 至 10 小时中);增加的血清乳酸脱氢酶(同工酶 1)活性;增加的游离血清血红蛋白和减少的触珠蛋白水平(主要在血管内容血性贫血中);增加的促红细胞生成素水平;血红蛋白尿。溶血性贫血的组织病理标准是:特征为例如红髓增大和增加的红细胞吞噬作用的脾重量的增加;髓外血细胞生成(主要在肝和脾中);血铁黄素蛋白沉着症(肝、脾、肾);肝中巨噬细胞的活化;骨髓中增加的红细胞生成。更优选,溶血的溶血性贫血是血管外溶血的溶血性贫血。最优选,其由芳族胺类、脲类或羟胺类以及其盐引起,或与所述类型的溶血性贫血的生物化学和生理学参数相似。

下列表 1 给出预示着人贫血症的血液学参数的参考值:

表 1:

参数	单位	参考值	备注
RBC	T/L	男性: 4.5 – 5.9 女性: 4.1 – 5.1	
Hb	g/dL	男性: > 13.0 女性: > 12.0	
血细胞比容	%	男性: 36.0 – 48.2 女性: 34.7 – 44.7	
MCV	µm ³	80 – 96	
MCHC	g/dL	33 – 36	
网织红细胞	%	0.5 – 2	
WBC	G/L	4.4 – 11.3	
胆红素	µmol/L	2 – 21	
LDH, 总的	U/L	135 - 315	IFCC (37 °C)
LDH1	%	15 - 23	琼脂糖凝胶电泳
血清中的游离血红蛋白	mg/L	< 20	
触珠蛋白	mg/dL	> 20	CRM470/RM002 标准
促红细胞生成素	U/L	6 – 25	2. IRP B 标准

下列表 2 中给出预示着啮齿类动物（例如大鼠）中贫血症的血液学参数的参考值:

表 2:

参数	单位	样品的数目	参考范围	备注
RBC	T/L	734 690	雄性: 7.7 – 9.0 雌性: 7.3 – 8.6	Ref. 1

Hb	mmol/L	734 690	雄性: > 9.2 雌性: > 8.7	Ref. 1
血细胞比容	%	734 690	雄性: 43.8 – 50.4 雌性: 41.0 – 47.2	Ref. 1
MCV	μm ³	1424	53 - 60	Ref. 1
MCHC	mmol/L	1424	19.8 – 22.5	Ref. 1
网织红细胞	%	804	2 – 4	Ref. 1
WBC	G/L	734 690	雄性: 5.0 – 10.6 雌性: 3.3 – 7.8	Ref. 1
胆红素, 总的	μmol/L	695 683	雄性: 0.8 – 2.0 雌性: 1.0 – 2.4	Ref. 1
LDH, 总的	U/L	791	76 – 233	Ref. 1, IFCC (37 °C)
LDH1	%	10	7.6 - 10	Ref. 2
血清中游离 Hb	mg/L		对于大鼠没有值	
触珠蛋白	mg/dL		对于大鼠没有值	
促红细胞生成素	U/L		17 - 25	Ref. 3-5

参考文献:

Gretener, P., Reference Values for HanBrl:WIST (SPF) Rats, 2003 八月版本,

Kuz'minskaya, U.A.和 Alekhina, S.M. Effect of Chlorocamphene on the Isoenzyme Spectrum of Lactate Dehydrogenase in the Rat Serum and Liver. Environmental Health Perspectives, 13:127 – 132, 1976,

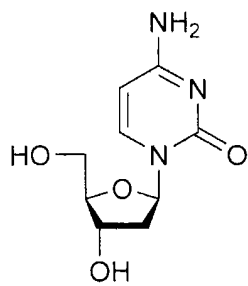
Giglio J.等人, Depressed Plasma Erythropoietin levels in rats with hemodynamically-mediated acute renal failure, Acta Physiol.Pharmacol Latinoam. 40, 299-308, 1990,

Jelkmann W. 等人, Dependence of erythropoietin production on blood oxygen affinity and hemoglobin concentration in rats, *Biomed Biochim Acta* 46, S304-308, 1987,

Wang R-Y 等人, Effects of aging on erythropoietin secretion in female rats, *Mechanisms of Ageing and Development* 103, 81-90, 1998.

本文中所使用的“素质”是指受试者仍未发生疾病或任何上述疾病症状或其他诊断标准,但将在未来在预先确定的预后窗口内以某种可能性发生疾病。预测窗口(predictive window)是其中受试者将按照预测的可能性发生溶血性贫血的间隔。预测窗口可以是在通过本发明的方法分析后受试者的整个剩余寿命。然而,优选,预测窗口是在已获得将通过本发明的方法分析的样品后1个月、6个月或1、2、3、4、5或10年的间隔。在素质的情况下,所述可能性可与溶血性贫血的统计表现的可能性显著不同。优选,发生溶血性贫血的可能性是至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%。素质的诊断有时可以指受试者将发生疾病的可能性的预后或预测。

本文中所使用的术语“脱氧胞苷”优选是指具有下式A中公开的化学结构的代谢物:



(式 A)

应理解在本发明的方法中,优选测定除了脱氧胞苷之外的代谢物。本文中所使用的代谢物是指特定代谢物的至少一个分子到至多为所述特定代谢物的许多分子。还应理解,一组代谢物是指其中对于各代谢物可存在至少一个分子到至多为许多分子的多种化学上不同的分子。根据本发明的代谢物包括所有种类的有机或无机化合物(包括由生物材料例如生物体所包含的化合物)。优选,根据本发明的代谢物是小分子化合物。更优选,假

设涉及多种代谢物，所述多种代谢物代表代谢物组，即在特定时间和特定条件下由生物体、器官、组织或细胞包含的代谢物的集合。

代谢物是小分子化合物，例如代谢途径的酶的底物、此类途径的中间体或通过代谢途径获得的产物。代谢途径在本领域内是熟知的并且可在物种间可发生变化。优选，所述途径包括至少柠檬酸循环、呼吸链、光合作用、光呼吸作用、糖酵解、糖异生、磷酸己糖途径、氧化性磷酸戊糖途径、脂肪酸的产生和 β -氧化、尿素循环、氨基酸生物合成途径、蛋白质降解途径例如蛋白酶体降解（proteasomal degradation）、氨基酸降解途径、下列物质的生物合成或除解：脂质、多聚乙酰(包括例如黄酮类化合物和异黄酮类化合物)、类异戊二烯(包括例如萜类、固醇类、类固醇类、类胡萝卜素类、叶黄素类)、碳水化合物类、苯丙素类（phenylpropanoids）和衍生物、生物碱类（alkaloids）、苯环型化合物类、吲哚类、吲哚-硫化合物（indole-sulfur compound）、紫菜碱类、花色素类、激素类、维生素类、辅助因子例如辅基类或电子载体类、木质素、硫代葡萄糖酸盐类、嘌呤类、嘧啶类、核苷类、核苷酸类和相关分子例如 tRNA、microRNA (miRNA) 或 mRNA。因此，小分子化合物代谢物优选由下列种类化合物组成：醇类、烷烃类、烯烃类、炔烃类、芳香族化合物、酮类、醛类、羧酸类、酯类、胺类、亚胺类、酰胺类、氰化物类、氨基酸类、肽类、硫醇类、硫酯类、磷酸酯类、硫酸酯类、硫醚类、亚砷类、醚类或上述化合物的组合或衍生物。代谢物中的小分子可以是正常细胞功能、器官功能或动物生长、发育或健康所需的初级代谢物。此外，小分子代谢物还包含具有必要的生态学功能的次级代谢物，例如允许生物体适应其环境的代谢物。此外，代谢物不限于所述初级和次级代谢物，其还包括人造小分子化合物。所述人造小分子化合物来源于外源提供的小分子，其为所施用的或由生物体吸收的但非如上定义的初级或次级代谢物的小分子。例如，人造小分子化合物可以通过动物的代谢途径从药物获得的代谢物。此外，代谢物还包括肽类、寡肽类、多肽类、寡核苷酸类和多核苷酸类，例如 RNA 或 DNA。更优选，代谢物具有 50 Da (道尔顿) 至 30,000 Da, 最优选低于 30,000 Da、低于 20,000

Da、低于 15,000 Da、低于 10,000 Da、低于 8,000 Da、低于 7,000 Da、低于 6,000 Da、低于 5,000 Da、低于 4,000 Da、低于 3,000 Da、低于 2,000 Da、低于 1,000 Da、低于 500 Da、低于 300 Da、低于 200 Da、低于 100 Da 的分子量。然而，优选，代谢物具有至少 50 Da 的分子量。最优选，根据本发明的代谢物具有 50 Da 到至多 1,500 Da 的分子量。

除了脱氧胞昔以外的通过本发明的方法测定的优选代谢物是肾上腺皮质类固醇类。特别地，预期根据本发明将另外测定至少一种肾上腺皮质类固醇。本文中所用的术语“肾上腺皮质类固醇类”优选包括 18-羟基皮质酮、醛固酮、11-脱氧皮质醇、皮质醇和可的松。如果待检查的受试者是人，所述至少一种肾上腺皮质类固醇优选是皮质醇。如果检查的受试者是啮齿类动物，所述至少一种肾上腺皮质类固醇优选是 18-羟基皮质酮或 11-脱氧皮质醇和，更优选将测定两种肾上腺皮质类固醇。如果一起测定 18-羟基皮质酮和 11-脱氧皮质醇，更优选考虑通过基于 NMR 的技术或基于抗体的技术例如 ELISA 或 LC-MS/MS 来进行测定。

本文中所使用的术语“受试样品”是指用于通过本发明的方法诊断溶血性贫血或其素质的样品。所述受试样品是生物学样品。来自生物来源（即生物学样品）的样品通常包括多种代谢物。用于本发明的方法的优选生物学样品是来自体液，优选血液、血浆、血清、唾液、尿液或脑脊液的样品，或通过例如活组织检查从细胞、组织或器官产生的样品。更优选，样品是血液、血浆或血清样品，最优选是血浆样品。生物学样品来源于本文中其他地方详述的受试者。获得上述不同类型的生物学样品的技术在本领域内是熟知的。例如，可通过血液采集获得血液样品，而组织或器官样品将通过例如活组织检查获得。

优选在将上述样品用于本发明的方法之前对它们进行预处理。如在下面更详细描述，所述预处理可包括释放或分离化合物或除去过多材料或废物所需要的处理。合适的技术包括化合物的离心、提取、分级分离、超滤、蛋白质沉淀之后过滤和纯化和/或富集。此外，为了以适合用于化合物分析的形式或浓度提供化合物，进行其他预处理。例如，如果气相色谱联

合质谱法用于本发明的方法，需要在进行所述气相色谱之前衍生该化合物。合适和必需的预处理取决于用于进行本发明方法的方法并且对于本领域技术人员来说是熟知的。之前描述的经预处理的样品也由本发明使用的术语“样品”所包括。

本文中所使用的术语“受试者”涉及动物，优选涉及哺乳动物例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、仓鼠、猪、绵羊、狗、猫、马、猴或牛以及还优选涉及人。更优选，受试者是啮齿目动物，最优选大鼠。可使用本发明方法诊断的其他动物是鱼类、鸟类或爬行类动物。优选，所述受试者正接触或者已经接触怀疑能够诱导溶血性贫血的化合物。已经与怀疑诱导溶血性贫血的化合物接触的受试者可以是例如用于就例如化合物的毒性进行筛选测定的实验动物，例如大鼠。怀疑已与能够诱导溶血性贫血的化合物接触的受试者可以是就选择合适的疗法而待诊断的受试者。优选，本文中所使用的能够诱导溶血性贫血的化合物是指芳族胺类或羟胺类。

本文中使用的术语“测定量”是指测定由本文中提及的样品包含的上述代谢物的至少一种特征性质。根据本发明的特征性质是表征代谢物的物理和/或化学性质包括生物化学性质的特征。此类性质包括例如，分子量、粘性、密度、电荷、自旋、光学活性、颜色、荧光、化学发光、元素组成、化学结构、与其他化合物反应的能力、在生物学读出系统中引起反应的能力（例如，报告基因的诱导）等。所述性质的值可用作特征性质和可由本领域内熟知的技术来测定。此外，特征性质可以通过标准运算例如算术计算（例如乘法、除法或对数运算）从代谢物的物理和/或化学性质的值产生的任何特征。最优选，至少一个特征性质允许测定和/或化学鉴定所述至少一个代谢物及其量。因此，特征值优选也包括涉及从其产生特征值的代谢物丰度的信息。例如，代谢物的特征值可以是质谱中的峰值。这样的峰值包含代谢物的特征信息，即质荷比(m/z)信息以及与样品中所述代谢物的丰度（即其量）相关的强度值。

如之前所描述的，可以优选根据本发明定量或半定量地测定受试样品包含的上述代谢物。关于定量测定，基于就本文上面提及的特征性质的测

定值可测定代谢物的绝对量或精确量或可测定代谢物的相对量。可在不能或不会测定代谢物的精确量的情况下测定相对量。在所述情况中，可测定其中代谢物存在的量与以第二样品包含的所述代谢物的第二量相比是增大了还是减少了。因此定量分析代谢物还包括有时称为代谢物的半定量分析的分析。

此外，本发明的方法中所使用的测定优选包括在之前提及的分析步骤之前使用化合物分离步骤。优选，所述化合物分离步骤产生由样品包含的代谢物的时间分辨分离。因此，优选根据本发明使用的用于分离的合适技术包括所有色谱分离技术，例如液相色谱(LC)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)、薄层色谱、大小排阻或亲和色谱。这些技术对于本领域内技术人员来说是熟知的且可由本领域技术人员使用而无需另外的实验。最优选，LC和/或GC是本发明方法期望的色谱技术。用于代谢物此类测定的合适装置在本领域中是熟知的。优选使用质谱，特别是气相色谱质谱联用(GC-MS)、液相色谱法质谱法(LC-MS)、直接输注质谱法或傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR-MS)、毛细管电泳质谱法(CE-MS)、高效液相色谱联合质谱法(HPLC-MS)、四极质谱法、任何连续联合质谱法，例如MS-MS或MS-MS-MS、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)、热解质谱法(Py-MS)、离子迁移率质谱法或飞行时间质谱法(TOF)。最优选，如下面详细所述使用LC-MS和/或GC-MS。所述技术公开于例如Nissen, *Journal of Chromatography A*, 703, 1995: 37-57, US 4,540,884或US 5,397,894，其公开内容通过引用合并入本文。作为备选技术或除了质谱技术以外可将下列技术用于化合物的测定：核磁共振(NMR)、磁共振成像(MRI)、傅里叶变换红外分析(FT-IR)、紫外线(UV)光谱法、折光率(RI)、荧光检测、放射性化学检测、电化学检测、光散射(LS)、分散式拉曼光谱术或火焰电离检测(FID)。这些技术对于本领域技术人员来说是熟知的且可使用而无需另外的实验。本发明的方法优选可通过自动化技术辅助。例如，可通过机器人自动进行样品处理或预处理。优选通过合适的计算机程序和数据库辅助数据处理和比较。之前在本文中所述的自动化允许在高通量方法中使用本发

明的方法。

此外，代谢物还可通过特定的化学或生物学测定法来测定。所述测定法包括允许特异性检测样品中至少一种代谢物的方法。优选，所述方法能够特异性识别代谢物的化学结构或能够基于其与其他化合物反应的能力或其在生物学读出系统中引起反应（例如，报告基因的诱导）的能力特异性鉴定代谢物。能够特异性识别代谢物化学结构的工具优选是抗体或与化学结构特异性相互作用的其他蛋白质，例如受体或酶。例如，特异性抗体可将代谢物用作抗原通过本领域技术人员熟知的方法来获得。本文中提及的抗体包括多克隆和单克隆抗体及其能够结合抗原或半抗原的片段，例如 Fv、Fab 和 F(ab)₂ 片段。本发明还包括人源化杂合体抗体，其中将展示期望的抗原特异性的非人供体抗体的氨基酸序列与人受体抗体的序列组合。此外，包括单链抗体。供体序列通常可包含供体的至少结合抗原的氨基酸残基，但同样也可包含供体抗体的其他结构性和/或功能性相关氨基酸残基。可通过本领域内熟知的几种方法制备此类杂合体。能够特异性识别代谢物的合适蛋白质优选是参与所述代谢物的代谢转化的酶。所述酶可以使用代谢物作为底物或可以将底物转化成代谢物。此外，所述抗体可以用作产生特异性识别代谢物的寡肽的基础。这些寡肽将例如包括用于所述代谢物的酶的结合结构域或口袋。基于合适的抗体和/或酶的测定法可以是 RIA(放射免疫测定法)、ELISA(酶联免疫吸附测定法)、夹心酶免疫检测、电化学发光夹心免疫测定法(ECLIA)、解离增强镧系荧光免疫分析(dissociation-enhanced lanthanide fluoro immuno assay, DELFIA)或固相免疫检测。此外，还可基于其与其他化合物反应的能力（即通过特定的化学反应）而鉴定代谢物。此外，由于代谢物在生物学读出系统中引起反应，可在样品中测定其。生物反应应当检测为表示由样品包含的代谢物的存在和/或量的读出值。生物反应可以是例如基因表达的诱导或细胞或生物体的表型反应。

此外，取决于用于测定代谢物量的技术，通过测定技术来测定的分析物可在其化学性质方面与样品中发现的代谢物不同。此类分析物包括通过

用于样品的预处理方法或通过这样的测定技术产生的代谢物的衍生物。然而应理解，定性或定量测定的代谢物的所述衍生物（即其为分析物）代表代谢物。关于上面提及的脱氧胞苷，如果基于质谱的技术，更优选本文中描述的 LC-MS 和/或 GC-MS 用作测定技术，胞嘧啶和/或 ribal (1,4-去水-2-脱氧-D-赤式-戊-1-enitol) 是适合的分析物。因此，为了诊断溶血性贫血或其素质，胞嘧啶和/或 ribal 的量可以优选作为脱氧胞苷的替代物而测定并且可将其与合适的参照相比较，由此，如本文中所提及的将诊断出溶血性贫血或其素质。如果在用嘧啶中 2% 的 O-甲基羟胺盐酸盐和然后 N-甲基-N-三甲基甲硅烷基三氟乙酰胺衍生后于 70eV 应用电子碰撞质谱的 GC/MS 分析进行检测时，已发现胞嘧啶和/或 ribal (本文下面也称为“MetID 407”) 为大鼠血浆样品的分析物。通过下列特征标称质量(相对比): 170(100+/-20%)、169 (90 +/-20 %)、155 (64 +/-20 %)、103 (34 +/-20 %)、127 (18 +/-20 %)来鉴定 Ribal。胞嘧啶和 ribal 的化学结构在本领域域内是熟知的；参见例如，Smar 1991, *Biochemistry* 30: 7908-7912。

术语“参照”是指可与溶血性贫血或其素质关联的代谢物的特征性质的值。优选从这样的样品获得此类参照结果，所述样品来源于(i)已与芳族胺类、脲类或羟胺类接触的受试者或(ii)患有血管外溶血性贫血或具有其素质的受试者。可通过各局部或全身性施用方式使受试者与芳族胺类、脲类或羟胺类接触，只要该芳族胺类、脲类或羟胺类是生物可利用的。如上文中所描述的，参照结果可测定为代谢物的量。备选地，然而也是优选的，参照结果可从来源于(i)未与芳族胺类、脲类或羟胺类接触的受试者或(ii)已知未患有血管外溶血性贫血或不具有其素质的受试者，即对于溶血性贫血和同样更优选其他疾病是健康的受试者的样品获得。此外，参照也优选地可以是经计算的参照，最优选，从个体的群体（包括待调查的受试者）产生的代谢物的相对或绝对量的平均值或中位数。然而，应理解待调查以测定经计算的参照的受试者群优选由表观健康的(例如未治疗的)的受试者组成或包括大到足以在统计学上抗因检测受试者存在于所述群体中而引起的显著的平均值或中位数的变化的众多表观健康的受试者。可如本文中其他

地方所指出的测量所述群体中个体代谢物的绝对或相对量。计算合适的参照值，优选平均值或中位数的方法在本领域内是熟知的。之前提及的受试者群体将包括多个受试者，优选至少 5、10、50、100、1,000 或 10,000 个受试者。应理解，通过本发明方法诊断的受试者和所述多个受试者的受试者是相同的物种。

更优选，参照结果即代谢物的至少一个特征性质的值将存储于合适的数据存储介质例如数据库中，从而可用于将来的诊断。这也允许有效地诊断疾病的素质，因为一旦确认（在将来）从其获得相应的参照样品的受试者（的确）发生溶血性贫血之后，可在数据库中鉴定到合适的参照结果。术语“比较”是指评估本文上面详细描述的结果（即代谢物的定性或定量测定结果）是否与参照结果相同或相似或与其不同。

如果参照结果获自来源于(i)已与芳族胺类、肟类或羟胺类接触的受试者或(ii)患有血管外溶血性贫血或具有其素质的受试者的样品，可基于从受试样品获得的试验结果与上述参照结果之间的同一性或相似性的程度，即基于与上述代谢物相比的相同或相似的定性或定量组成来诊断溶血性贫血或素质。在定量测定的情况下，如果特征性质的值和强度值是相同的，则受试样品的结果和参照结果是相同的。如果特征性质的值相同但强度值不同，那么所述结果是相似的。这样的差异优选是不显著的并且特征在于强度值在参照值的至少第 1 到 99 百分位数、第 5 到 95 百分位数、第 10 到 90 百分位数、第 20 到 80 百分位数、第 30 到 70 百分位数、第 40 到 60 百分位数的区间内，参照值的第 50、60、70、80、90 或 95 的百分位数。

如果从(i)未与芳族胺类、肟类或羟胺类接触的受试者或(ii)已知未患有血管外溶血性贫血或不具有其素质的受试者获得参照结果，可基于从受试样品获得的试验结果和上述参照结果之间的差异，即与上述代谢物相比定性或定量组成的差异来诊断溶血性贫血或素质。如果使用上面详述的经计算的参照，应用相同的诊断。差异可以是代谢物绝对量或相对量的增加(有时称为代谢物的上调；也参见实施例)或代谢物所述量的减少或缺少可检测量的代谢物(有时称为代谢物的下调；也参见实施例)。优选，相对或绝对

量的差异是显著的，即在参照值第 45 到第 55 百分位数、第 40 到 60 百分位数、第 30 到 70 百分位数、第 20 到 80 百分位数、第 10 到 90 百分位数、第 5 到 95 百分位数、第 1 到 99 百分位数区间之外。特别地，与从(i)未与芳族胺类、肟类或羟胺类接触的受试者或(ii)已知未患有血管外溶血性贫血或不具有其素质的受试者获得的参照或经计算的参照相比，脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 量的增加预示着溶血性贫血。此外，如果已另外测定所述至少一种肾上腺皮质类固醇(例如皮质醇、醛固酮、可的松、18-羟基皮质酮或 11-脱氧皮质醇)，与所述参照相比至少一种肾上腺皮质类固醇量的减少预示着溶血性贫血。

关于本说明书中提及的特定代谢物，在下列表 3 和下面的实施例中显示了相对量的变化(即“倍数”变化)的优选值或变化的类型(即导致更高或更低的相对和/或绝对量的“上”或“下”调)。如果在所述表中指出给定的代谢物在受试者中“上调”，那么相对和/或绝对量将增加，如果其“下调”，那么代谢物的相对量和/或绝对量将减少。此外，“倍数”变化表示增加或减少的程度，例如，2 倍增加是指与参照相比代谢物的量是 2 倍。

表 3:

代谢物	调控	相对对照的倍数变化 (雄性/雌性)
18-羟基皮质酮	下调	0.18* / 0.47*
11-脱氧皮质醇	下调	0.27* / 0.41*
胞嘧啶**	上调	1.71* / 1.38
ribal (1,4-无水-2-脱氧-D-赤式-戊-1-enitol) (=MetID 407)**	上调	1.82* / 1.59*

*: 对于 $p \leq 0.05$ ，统计学上是显著的 (Student 氏 t 检验)

**：其中分析物胞嘧啶和 ribal 代表代谢物脱氧胞苷

优选通过自动化技术辅助比较。例如，可使用包括用于两个不同数据

集（例如包括特征性质的值的数据集）比较的算法的合适计算机程序。此类计算机程序和算法在本领域内是熟知的。虽然如上，但还可手工进行比较。

用于代谢物测定的上述方法可在装置中实施。本文中所使用的装置将包括至少上述工具。此外，装置优选还包括用于代谢物经检测的特征性质且也优选经测定的信号强度的比较和评估的工具。装置的工具优选相互有效连接。如何以有效方式连接工具将取决于装置所包括工具的类型。例如，当使用用于自动地定性或定量测定代谢物的工具时，通过所述自动操作工具获得的数据可通过例如计算机程序处理以帮助诊断。优选在该情况下工具包含在单个装置中。所述装置因此可包括用于代谢物的分析单元和用于处理所获得数据以进行诊断的计算机单元。备选地，当工具例如测试条用于测定代谢物时，用于诊断的工具可包括对照条或表，其将测定的结果数据划分为上述已知伴随溶血性贫血或预示着健康受试者的结果数据。优选装置是可使用而无需专科临床医师的特殊知识的装置，例如只需要装载样品的测试条或电子装置。

备选地，用于测定代谢物的方法可以落实到包含若干装置的系统，优选地所述装置彼此间有效连接。特别地，必须以允许进行如上详述的本发明方法的方式连接工具。因此，本文中所使用的有效连接优选指功能性连接。取决于待用于本发明的系统的工具，所述工具通过允许数据在所述工具之间传送的方式（例如玻璃纤维电缆和用于高通量数据传送的其他线缆）将每一个工具与另一个工具连接来进行功能性连接。然而，本发明也考虑工具之间的无线数据传送，例如通过 LAN（包括无线 LAN、W-LAN）。优选系统包括用于测定代谢物的工具。本文中所使用的测定代谢物的工具包括用于分离代谢物的工具（例如色谱装置）和用于代谢物测定的工具（例如质谱装置）。合适的装置已在上面进行了详细描述。本发明系统中使用的用于化合物分离的优选工具包括色谱装置，更优选用于液相色谱、HPLC 和/或气相色谱的装置。用于化合物测定的优选装置包括质谱装置，更优选 GC-MS、LC-MS、直接输注质谱装置、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、

四极质谱装置、连续联合质谱装置(包括 MS-MS 或 MS-MS-MS)、ICP-MS、Py-MS 或 TOF。分离和测定工具优选相互联合。最优选, LC-MS 和/或 GC-MS 用于在本说明书的其他部分详细描述的本发明的系统中。进一步包括的是用于比较和/或分析从代谢物测定的工具所获得结果的工具。用于比较和/或分析结果的工具可包括至少一个数据库和执行用于结果比较的计算机程序。上述系统和装置的优选实施方案也在下面进行了详细描述。

有利地,在本发明基本的研究中发现,脱氧胞苷的量用作溶血性贫血,特别是用作由芳族胺类、肟类和羟胺类诱导的溶血性贫血的生物标记。除了上述代谢物外,可测定至少一种肾上腺皮质类固醇,由此将更大的改善方法的特异性和精确性。就这些特定的代谢物而言,代谢物组的定量和/定性组成的变化预示着溶血性贫血或其素质。目前用于诊断溶血性贫血的血液学参数与本发明提供的生物标记测定相比其特异性和灵敏性较低。归功于本发明,溶血性贫血可得到更有效和可靠的诊断——甚至在疾病的病状变得明显之前。此外,基于上述发现,筛选怀疑能够诱导溶血性贫血的化合物已成为可能,例如在毒理学评估中进行。此外,所述发现是用于治疗溶血性贫血药物的筛选测定法的基础。

因此,本发明还涉及测定化合物是否能够在受试者中诱导溶血性贫血的方法,该方法包括:

(a) 测定已与怀疑能够诱导溶血性贫血的化合物接触的受试者的样品中脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的量;和

(b) 将步骤(a)中测定的量与参照比较,由此测定化合物诱导溶血性贫血的能力。

此外,本发明还包括鉴定用于治疗溶血性贫血的物质的方法,该方法包括步骤:

(a) 测定已与用于治疗溶血性贫血的候选物质接触的患有溶血性贫血受试者的样品中脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的量;和

(b) 将步骤(a)中测定的量与参照比较,由此鉴定所述物质。

上面对术语的所有定义和解释加上必要的变更除了在下面另外指出用

于上述方法和下面进一步描述的所有其他实施方案。具体地，在鉴定用于治疗溶血性贫血的物质的方法的情况下，所述参照优选来源于(i)已与芳族胺类、脲类或羟胺类接触的受试者或(ii)患有血管外溶血性贫血的受试者。更优选，在受试者样品和参照中代谢物的不同量预示着对治疗溶血性贫血有用的物质。具体地，与参照相比，脱氧胞苷（或其分析物胞嘧啶和/或 ribal）量的减少是用于治疗溶血性贫血的药物的指示。此外，如果已另外测定所述至少一种糖皮质激素（例如皮质醇、可的松、醛固酮、18-羟基皮质酮或11-脱氧皮质醇），与所述参照相比至少一种糖皮质激素量的增加预示着对治疗溶血性贫血有用的物质。备选地，所述参照优选地可来源于(i)未与芳族胺类、脲类或羟胺类接触的受试者或(ii)已知未患有血管外溶血性贫血或其素质的受试者或可以是受试者群体中代谢物的经计算的参照。如果使用这样的参照，受试样品和参照中代谢物的相同或相似量预示着对治疗溶血性贫血有用的物质。

术语“用于治疗溶血性贫血的物质”是指可直接干扰在溶血性贫血期间诱导的溶血性级联反应（hemolytic cascade）的化合物。因此，可抑制溶血酶的活性。备选地，预期物质可通过例如调节溶血酶或溶血性贫血期间溶血所需的其他因子的表达而间接影响溶血性级联反应。本文上面提及的物质可起拮抗作用，即通过抵消溶血酶或其他因子的效应来起作用。有待通过本发明方法筛选的物质可以是有机和无机化学物质，例如小分子、多核苷酸、寡核苷酸、肽、包括抗体或其他人造或生物聚合物的多肽。优选，所述物质适合作为药物或前体药物或用于药物或前体药物开发的前导物质（lead substance）。

应理解，如果本发明的方法将用于鉴定治疗溶血性贫血的药物或用于化合物的毒理学评估（即确定化合物是否能够诱导溶血性贫血），那么出于统计学的原因可调查多个受试者的受试样品。优选，这样的受试者群体中的代谢物组应当尽可能相同以避免例如由除了待调查的化合物之外的因子引起的差异。用于所述方法的受试者优选是实验动物，例如啮齿类动物，更优选大鼠。还应理解，优选应当在完成本发明的方法后处死所述实验动

物。受试或参照动物组的所有受试者应当维持在相同的条件下以避免任何不同的环境影响。用于具有大体相同代谢物组的大鼠的优选条件可通过汇集大体上相同年龄的动物群体并在下列居住条件下维持所述动物群体足以适应的时间而提供，所述居住条件是：(i)恒温，(ii)恒湿，(iii)动物群体的动物的物理隔离，(iv)自由采食，其中喂饲的食物基本上不含化学或微生物污染物，(v)自由饮用液体，其中饮用的液体基本上不含化学或微生物污染物，(vi)恒定的光照时间，和在所述时间后提供动物群体。如上所提及的汇集是指从任何来源选择动物以建立将接受本发明方法的动物群体。因此，所述动物可以是相同母亲动物的后代或不同母亲动物的后代。如果一个母亲动物的单一后代用作来源，那么整个后代可用于汇集动物群体或可以使用经选择的后代动物。就动物的年龄进行本文中所使用的汇集，即群体的所有个体应当具有基本上相同的年龄，如下面详细描述。然而，可考虑其他特征。此外，例如体重、大小、性别、总体表现(例如仅可选择表现健康的动物)。基本上年龄相同是指具有相当的发育状态的动物，例如，动物可以是胚胎、幼年或成年动物。用于本发明方法的动物的优选年龄是青春期阶段，优选青春期早期的年龄。在实验开始时动物群体的动物优选具有 $X \pm 1$ 天的年龄范围，其中 X 是动物群体的期望年龄。换句话说，群体给定动物的年龄应当比动物群体的平均年龄最大 1 天或小 1 天。最优选，群体所有动物的年龄是 X 。可通过汇集一胎生下的后代动物(即同窝出生仔)或汇集来自同一天的不同胎生下的动物而提供这样的动物。如果使用胚胎，应理解基本上相同的年龄涉及它们的发育阶段。来自不同物种的胚胎的发育阶段通过本领域内熟知的技术来确定。它们可以例如基于受精的时间点来计算。此外，个体胚胎可根据已知的形态学特征来划分发育阶段。此外如果使用胚胎，还应理解怀有所述胚胎的怀孕母亲应当维持在本文中提及的条件下，如果本发明方法使用例如大鼠或小鼠作为实验动物，优选动物年龄为 $X \pm 1$ 天，其中 X 是出生后 1 至 3 个月。最优选， X 是出生后 64 天。对于狗，优选年龄(X)应当为 6 个月。根据本发明的方法所使用的维持，是指用于动物群体的动物上的特定居住、饲养、饮水和环境条件。

优选将动物维持在化学品监测 OECD 规范,第 407 号(OECD Guideline for the Testing of Chemicals No: 407) 中所示的条件下。此外,特定的条件描述如下。

i) 在相同的恒温下饲养动物群体的所有动物。应当细心地选择进行本发明方法的温度,所述温度不使动物产生应激。优选,温度应当是 $20-24 \pm 3^\circ\text{C}$, 更优选 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 最优选 22、23 或 24°C 。

ii) 此外,在相同的恒定湿度下饲养动物群体的所有动物。湿度应当是至少 30%, 但应当不超过 70%。然而,在罕见的例外情况下(例如在清扫居室或笼子的过程中)湿度可以甚至超过 70%。优选,湿度为 50-60%。

iii) 已发现动物群体的动物的物理隔离对于本发明方法也是很重要的。因此,动物群体的各动物必须维持在分离的空间例如分离的笼中。

iv) 动物群体的动物自由取食。使用的食物必须基本上不含有化学或微生物污染物。在 Fed. Reg. 第 44 卷, No. 91, 1979 年 5 月 9 日, 第 27354 页中规定了应用的标准。最优选,微生物污染物例如细菌低于 5×10^5 个细胞/克食物。这些食物可从瑞士 Provimi Kliba SA 购买,如 Ground Kliba 小鼠/大鼠饲料“GLP”食品。

v) 动物群体的动物自由饮用液体。优选,所述液体是水。然而也可使用基于水的其他液体。此类液体可包括例如动物所需的营养物、维生素或矿物质。如果水用作饮用液体,水应当不含有化学和微生物污染物,如欧洲饮用水管理(European Drinking Water Directive) 98/83/EG 中规定的。

vi) 最后,动物群体的每一个动物必须接受相同恒定的光照时间。恒定的光照优选通过人工照明(具有太阳光谱)来获得。光照时间是 12 小时光照然后进行 12 小时黑暗。然后再开始光照期。因此,优选光照期是 12 小时光照,例如从 6:00 至 18:00 点,和 12 小时黑暗,例如从 18:00 至 6:00 点。

可通过使用针对装有物理隔离的动物笼子的共同贮存空间来将上述居住条件用于动物。所述共同贮存空间可以是动物室或动物房。在相同房间

中维持群体的所有动物，恒定的湿度、温度和光照期可通过调节整个房间或房屋的这些参数来容易地获得。优选通过自动化技术来进行这些参数的调节，不断地监测所述参数。应理解在足以适应环境的第一时期下，必须将动物群体的动物维持在上述特定居住条件下一段允许动物的代谢活动同步化的时期，以便使动物适应并且具有大体上相同的代谢物组。具体地，所述第一时期应当足够长以使群体的所有个体能够采取相同的生理节律、食物消化节律或静止/活动期。此外，第一时期应当允许每一个动物调整其生物化学和生理参数以响应使用的环境条件，例如湿度和温度。优选，所述第一时期长度为5至10天，更优选6至8天，和最优选7天。

此外，本发明还涉及包括代谢物脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 的特征值的数据集合。

更优选，数据集合包括本文其他地方详述的至少一种肾上腺皮质类固醇的特征值。

术语“数据集合”是指可以通过物理上和/或逻辑上分组在一起的数据的集合。因此，可在单个数据存储介质中或在物理分离的彼此有效连接的数据存储介质中落实数据集合。优选，通过数据库的方式落实数据集合。因此，本文中所使用的数据库包括在合适的存储介质上的数据集合。此外，数据库优选进一步包括数据库管理系统。数据库管理系统优选是基于网络的分级的或面对对象数据库管理系统。此外，数据库可以是联合的或集成的数据库。更优选，数据库将以分布式（联合式）系统例如 Client-Server-系统的形式执行。更优选，这样构建数据库以允许搜索算法将试验数据集与数据集合包括的数据集进行比较。具体地，通过使用算法可以搜索数据库（例如查询搜索）得到指示溶血性贫血或其素质的相似或相同数据组。因此，如果在数据集合中鉴定到相同或相似数据集，那么所述试验数据集与溶血性贫血或其素质相关联。因此，基于从受试者获得的试验数据集从数据集合获得的信息可用于诊断溶血性贫血或其素质。

本发明也涉及包括上述本发明的数据集合的数据存储介质。

本文中所使用的术语“数据存储介质”包括基于单个物理实体例如

CD、CD-ROM、硬盘、光学存储介质或磁盘的数据存储介质。此外，所述术语还包括由物理分离的实体组成的数据存储介质，所述实体相互之间以提供上述数据集合的方式，优选以进行查询搜索的合适方式有效连接。

本发明还涉及系统，所述系统包括

- (a) 用于比较样品代谢物的特征值的工具，其有效连接到
- (b) 如上定义的数据存储介质。

本文中所使用的术语“系统”涉及相互之间有效连接的不同工具。所述工具可以在单个装置中行使功能或可在物理分离的相互之间有效连接的装置中行使功能。用于比较代谢物特征值的工具优选基于用于上述比较的算法而进行运作。数据存储介质优选包括上述数据集合或数据库，其中各存储的数据集预示着溶血性贫血或其素质。因此，本发明的系统允许鉴定试验数据集是否包括在存储于数据存储介质的数据集合中。因此，本发明的系统可用作诊断溶血性贫血或其素质的诊断工具。

在系统的优选实施方案中，包括用于测定样品代谢物的特征值的工具。

术语“用于测定代谢物特征值的工具”优选涉及用于代谢物测定的上述装置，例如质谱装置、NMR 装置或用于进行代谢物化学或生物学测定的装置。

本发明还包括诊断组合，包含脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 或用于测定其的工具。

在所述诊断组合的优选实施方案中，所述组合还包括至少一种本说明书中其他地方详述的肾上腺皮质类固醇。

此外，本发明还包括诊断装置，所述装置包括

- (a) 用于测定脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 特征值的工具；
- 和
- (b) 基于由(a)的工具测定的特征值用于诊断溶血性贫血或其素质的工具。

更优选，装置还包括用于测定至少一种本文中其他地方详述的肾上腺皮质类固醇特征值的工具。

术语“诊断工具”优选涉及本说明书其他地方详细说明了诊断装置、系统或生物学或化学测定。

表述“用于测定特征值的工具”指能够特异性识别代谢物的装置或试剂。合适的装置可以是光谱测定装置例如质谱、NMR 装置或用于进行代谢物化学或生物学测定的装置。合适的试剂可以是特异性检测代谢物的化合物。本文中所使用的检测可以是两步法，即化合物可首先与待检测代谢物特异性结合，其后产生可检测的信号，例如荧光信号、化学发光信号、放射性信号等。对于可检测信号的产生，可能需要其他化合物，其都包括在术语“用于检测一组代谢物特征值的工具”中。与代谢物特异性结合的化合物详细地描述于本说明书中其他地方，优选，包括酶、抗体、配体、受体或与代谢物特异性结合的其他生物分子或化学物质。

最后，本发明涉及脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 或用于测定其的工具在生产用于诊断受试者溶血性贫血的诊断装置或组合中的用途。

在所述用途的优选实施方案中，除了脱氧胞苷或其分析物胞嘧啶和/或 ribal 以外，使用至少一种本文中其他地方详述的肾上腺皮质类固醇。

上面提及的所有参考文献以其全部公开内容和上面描述中明确提及的它们的特定公开内容通过引用合并入本文。

下列实施例只用于举例说明本发明的目的。无论如何，它们不应当解释为以任何方式限制本发明的范围。

实施例：苯胺诱导型溶血性贫血的生物标记

用强饲法以 10 和 100 mg/kg 体重剂量每天一次对成组大鼠（雄性和雌性大鼠各 5 只）给药苯胺，进行 28 天。将另外的组（雄性和雌性动物各 5 只）用作对照。在开始处理期之前，使得当使用时 62 至 64 天龄的动物适应居住和环境条件，进行 7 天。将动物群体的所有动物维持在相同的恒定温度(20-24 ± 3 °C)和相同的恒定湿度(30-70 %)下。动物群体的每一只动物维持在物理隔离的笼中。动物群体的动物自由取食。使用的食物基本上不含化学或微生物污染物。动物也自由地饮用水。因此，水不含化学和微生

物污染物，如欧洲饮用水管理 98/83/EG 中所规定的。光照期是 12 小时光照，然后进行 12 小时黑暗（从 6:00 至 18:00 点的 12 小时光照，和从 18:00 至 6:00 点的 12 小时黑暗）。

在第 7、14 和 28 天早晨，从禁食麻醉的动物的眶后静脉丛采集血液。从每一只动物采集 1ml 血液，使用 EDTA 作为抗凝血剂。对样品进行离心以产生血浆。使用氮气覆盖所有血浆样品，然后于 -80°C 下贮存直至分析。

对于基于质谱的代谢物谱分析，提取血浆样品，获得极性和非极性部分。对于 GC-MS 分析，在酸性条件下水解非极性部分以产生脂肪酸甲酯。在分析前使用甲硅烷基化剂进一步衍生两种部分。在 LC-MS 分析中，在合适的溶剂混合物中重构两种部分。通过梯度洗脱在反相分离柱上进行 HPLC。对于质谱检测，使用 metanomics 专有技术，所述技术允许进行与完全筛选分析平行的靶和高灵敏性 MRM（多反应监测）谱分析。方法产生用于半定量分析的 215 种独特的分析物，其中大约 80 种已知的，大约 135 种是未知的。此外，产生样品指纹的数百种其他分析物包括在本方法中。

在全面分析确认步骤后，针对来自库样品的数据对每一种分析物的数据进行标准化。在整个过程中平行检测这些样品以解释方法的可变性。特别针对性别、剂量组和代谢物，处理组的值的显著性通过使用 Student 氏 t 检验将处理组的平均值与各自未处理对照组的平均值进行比较而测定。将标准化的处理组的值和它们的显著性加入数据库以进行进一步统计学和数据挖掘处理。

在用苯胺处理大鼠后预示着溶血性贫血的血浆代谢物组的变化示于下表中：

表 4：在使用强饲法以 100mg/kg 体重/天的剂量用苯胺处理雄性和雌性大鼠 28 天后观察到的预示着溶血性贫血的血浆代谢物组的变化：

代谢物	调控	相对对照的倍数变化(雄性/雌性)		
		第 7 天	第 14 天	第 28 天
18-羟基皮质酮	下调	0.34 / 0.43	0.33* / 0.71	0.18* / 0.47*
11-脱氧皮质醇	下调	0.47 / 0.39*	0.48* / 0.71	0.27* / 0.41*

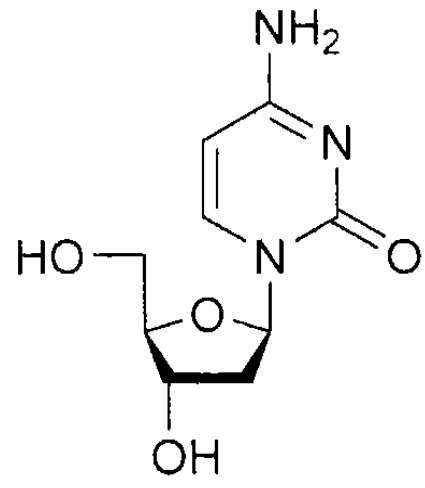
胞嘧啶	上调	1.50* / 1.81	1.17* / 1.18	1.71* / 1.38
ribal (1,4-去水-2-脱氧 -D-赤式-戊-1-enitol) (=MetID 407)	上调	1.68 / 1.79*	1.42* / 1.66*	1.82* / 1.59*

*:对于 $p \leq 0.05$ 统计学上是显著的 (Student 氏 t-检验)

专利名称(译)	用于诊断溶血性贫血的工具和方法		
公开(公告)号	CN101529249A	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200780039935.9	申请日	2007-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	梅坦诺米克斯有限及两合公司		
申请(专利权)人(译)	梅坦诺米克斯有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	梅坦诺米克斯有限公司		
[标]发明人	TB沃克 R洛塞 MM赫罗尔德 JC威尔莫 A普奥考汀 E莱博尔德 B范拉文兹韦 W梅勒特 G科埃略巴勒莫库尼亚 E法比安 V施特劳斯		
发明人	T·B·沃克 R·洛塞 M·M·赫罗尔德 J·C·威尔莫 A·普奥考汀 E·莱博尔德 B·范拉文兹韦 W·梅勒特 G·科埃略巴勒莫库尼亚 E·法比安 V·施特劳斯		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2500/04 G01N2800/22 G01N33/5308 Y10T436/14 Y10T436/145555		
代理人(译)	陈迎春		
优先权	2006119780 2006-08-30 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断溶血性贫血或其素质的方法。其还涉及测定化合物是否能够在受试者中诱导溶血性贫血的方法和涉及鉴定用于治疗溶血性贫血的药物的方法。此外，本发明还涉及包括代谢物特征值的数据集合、包括所述数据集合的数据存储介质以及用于诊断溶血性贫血的系统和装置。最后，本发明涉及一组代谢物或用于测定其的工具在制备用于诊断受试者溶血性贫血的诊断装置或组合中的用途。



(式 A)