



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102893157 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 23

(21) 申请号 201080064533. 6

G01N 33/574 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 22

(30) 优先权数据

61/289206 2009. 12. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/061811 2010. 12. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02011/087845 EN 2011. 07. 21

(71) 申请人 密执安大学评议会

地址 美国密执安州

(72) 发明人 A. M. 钱奈延 T. 拉詹迪兰

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 孔青 李进

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 49 页 附图 33 页

(54) 发明名称

前列腺癌的代谢特征

(57) 摘要

本发明涉及癌症标志物。特别地,本发明提供在癌症(例如,前列腺癌或乳腺癌)中差别存在的代谢物和代谢物组。

1. 一种诊断前列腺癌的方法,包括:
 - a) 检测受试者的尿液样本中肌氨酸、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的水平 ;和
 - b) 当肌氨酸、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的水平比非癌症受试者中的水平更高时,诊断前列腺癌。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述方法进一步包括检测一种或多种代谢物水平的步骤,所述代谢物选自由乙酰氨基葡萄糖、犬尿胺酸、尿嘧啶、高半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、牙精胺、精胺、2- 氨基己二酸、亮氨酸、脯氨酸、苏氨酸、马来酸盐、组氨酸、瓜氨酸、腺苷和肌苷组成的组中。
3. 一种诊断乳腺癌的方法,包括:
 - a) 检测受试者样本中一种或多种癌症特异性代谢物的存在或缺失,所述癌症特异性代谢物选自由哌可酸、丝氨酸、聚胺和脂肪酸组成的组 ;和
 - b) 基于所述一种或多种癌症特异性代谢物的存在或缺失诊断乳腺癌。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述聚胺选自由腐胺、牙精胺和精胺组成的组中。
5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述脂肪酸选自由肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸和油酸组成的组中。
6. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述样本选自由组织样本、血液样本、血清样本和尿液样本组成的组中。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述组织样本是活检样本。
8. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述一种或多种癌症特异性代谢物存在于癌症样本中,但不存在于非癌症样本中。
9. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述一种或多种癌症特异性代谢物不存于癌症样本中,但存在于非癌症样本中。
10. 根据权利要求 3 所述的方法,包括同时检测 一种以上所述癌症特异性代谢物的存在或缺失。
11. 一种断前列腺癌的方法,包括:
 - a) 检测受试者尿液样本中一种或多种癌症特异性代谢物的存在或缺失,所述癌症特异性代谢物选自由哌可酸、丝氨酸、聚胺和脂肪酸组成的组 ;和
 - b) 基于在所述尿液样本中的所述癌症特异性代谢物的存在或缺失诊断前列腺癌。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述聚胺选自由腐胺、牙精胺和精胺组成的组。
13. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述脂肪酸选自由肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸和油酸。
14. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述尿液样本是尿沉渣样本。
15. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述一种或多种癌症特异性代谢物存在于癌症样本中,但不存在于非癌症样本。
16. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述一种或多种癌症特异性代谢物不存在于癌症样本中,但存在于非癌症样本中。
17. 根据权利要求 11 所述的方法,包括一种以上所述癌症特异性代谢物的存在或缺

失的同时检测。

前列腺癌的代谢特征

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 12 月 22 日递交的申请号为 61/289,206 的美国申请的优先权。

[0003] 关于联邦资助的调查或研究的说明

[0004] 本发明在国立卫生研究院的授权号为 U01 CA111275 的政府资助下完成。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及癌症标志物。特别地,本发明提供在癌症(例如,前列腺癌或乳腺癌)中差别存在的代谢物和代谢物组。

背景技术

[0006] 前列腺癌 (PCA) 已经成为男性癌症致死的顶级杀手,仅次于肺癌,65 岁以上男性罹患前列腺癌的概率高达 1/9 (Abate-Shen 和 Shen, Genes Dev 14:2410 [2000]; Ruijter 等 Endocr Rev, 20:22 [1999])。美国癌症协会估计,2001 年大约有 184,500 的美国男性会诊断出前列腺癌,大约 39,200 患者会因前列腺癌死亡。

[0007] 通常使用直肠指诊和 / 或前列腺特异性抗原 (PSA) 筛查来诊断前列腺癌。升高的血清 PSA 水平能够表明存在 PCA。所以将 PSA 作为前列腺癌标志物使用,因为其只由前列腺细胞分泌。健康的前列腺会产生稳定的 PSA 量 - 通常低于每毫升 4 毫微克,或“4”或更低的 PSA 读数 - 而癌症细胞则产生与癌症严重性相关的升高的 PSA 量。PSA 水平达到 4 至 10 之间时,医生会认为患者疑似罹患前列腺癌,而 PSA 量高于 50 则可能表明肿瘤已经扩散到身体其他部位。

[0008] 当 PSA 或直肠检测表明癌症有很大可能存在时,使用经直肠超声 (TRUS) 绘制前列腺图像并显示任何可疑之处。使用前列腺多部位活检来确定是否存在前列腺癌。治疗选择取决于癌症的发展阶段。对有 10 年或更短存活期的男性患者,其具有低格里森指数并且肿瘤未扩散到前列腺之外,通常采用观察治疗 (不治疗)。对较高侵入性癌症的治疗选择包括外科治疗,诸如根治性前列腺切除术 (RP),这种治疗将完全切除前列腺 (采用或不采用神经保留技术),和放射治疗,通过使用从体外直接向前列腺照射剂量的外束或通过植入前列腺内的低剂量放射性粒子来局部杀灭癌细胞。也采用抗雄激素治疗,单独使用或与外科治疗或放射治疗联合使用。激素治疗使用黄体生成素释放激素 (LH-RH) 类似物,其阻碍脑垂体产生激素刺激睾酮的产生。患者必须终生注射 LH-RH 类似物。

[0009] 外科治疗和激素治疗通常对局部 PCA 有效,但对进展恶化的疾病没有实质性作用。雄激素切除术是治疗进展恶化的 PCA 最常用的疗法,其导致依赖雄激素的恶性癌细胞的大量细胞凋亡和暂时的肿瘤退化。然而在大多数实例中,肿瘤会报复性重现,而且能够不依赖雄激素的信号独立增殖。

[0010] 前列腺特异性抗原 (PSA) 筛查已经实现了 PCA 的较早期诊断并极大地降低了 PCA 相关的死亡数量。然而,还未有前瞻性随机报告研究结果显示 PSA 筛查对癌症特异性死亡

率的影响 (Etzioni 等 J. Natl. Cancer Inst., 91 :1033[1999] ;Maattanen 等 Br. J. Cancer 79 :1210[1999] ;Schroder 等 J. Natl. Cancer Inst., 90 :1817[1998])。血清 PSA 检验的主要局限是特别在 PSA 检测的中间范围 (4 至 10ng/ml) 缺乏对前列腺癌敏感度和特异性。在诸如前列腺良性增生 (BPH) 和前列腺炎这样的非恶性病状的患者体内,经常检测到升高的血清 PSA 水平,而且无法得知检测到的癌症的侵入性。与增加的血清 PSA 检测一致,实施前列腺穿刺活检数量也显著增加了 (Jacobsen 等 JAMA 274 :1445[1995])。这导致大量模糊的前列腺穿刺活检结果产生 (Epstein 和 Potter J. Urol., 166 :402[2001])。因此,需要研究出其他的血清和组织的生物标志物来完善 PSA 筛查。

发明内容

[0011] 本发明涉及癌症标志物。特别地,本发明提供在癌症 (例如,前列腺癌或乳腺癌) 中差别存在的代谢物和代谢物组。

[0012] 例如,在某些实施方案中,本发明提供诊断前列腺癌或乳腺癌的方法,包括:检测受试者的样本 (例如,组织 (例如,活检) 样本、血液样本、血清样本或尿液样本) 中的一种或多种 (例如,2 种或多种、3 种或多种、5 种或多种、10 种或多种等。以多重或组形式一起测量) 的癌症特异性代谢物 (例如,哌可酸或脂肪酸 (包括但不限于肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸、油酸) 或聚胺 (例如,腐胺、牙精胺、精胺)) 的存在或缺失;和基于癌症特异性代谢物的存在或缺失诊断前列腺癌或乳腺癌。在某些实施方案中,癌症特异性代谢物在癌症样本中存在,而在非癌症样本中缺失。在某些实施方案中,癌症特异性代谢物在癌症样本中缺失,而在非癌症样本中存在。在某些实施方案中,检测一种或多种其他的癌症标志物 (例如,以组或多重形式) 和癌症特异性代谢物。

[0013] 在某些实施方案中,本发明提供一种诊断前列腺癌的方法,包括:检测受试者的尿液样本中的肌氨酸、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的水平;和当肌氨酸、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的水平相对于非癌症受试者升高时诊断前列腺癌。在某些实施方案中,该方法还包含检测一种或多种代谢物水平的步骤,该代谢物选自例如,乙酰氨基葡萄糖、犬尿胺酸、尿嘧啶、高半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、牙精胺、精胺、2-氨基己二酸、亮氨酸、脯氨酸、苏氨酸、马来酸盐、组氨酸、瓜氨酸、腺苷和肌苷。

[0014] 本发明进一步提供鉴定前列腺癌或乳腺癌的方法,包括:检测诊断出癌症的受试者样本 (例如,组织样本、血液样本、血清样本、尿液样本、尿沉渣样本) 中的升高水平的癌症特异性代谢物 (例如,哌可酸或脂肪酸 (包括但不限于肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸、油酸) 或聚胺 (例如,腐胺、牙精胺、精胺)) 的存在或缺失;并基于癌症特异性代谢物的存在或缺失鉴定前列腺癌或乳腺癌。在某些实施方案中,在样本中升高水平的脂肪酸 (例如,到肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸、油酸) 的存在表明受试者体内存在侵入性前列腺癌。在某些实施方案中,在样本中升高水平的哌可酸的存在表明受试者体内存在侵入性前列腺癌。在某些实施方案中,在前列腺组织样本 (例如,前列腺活检样本) 中降低水平的一种或多种聚胺 (例如,腐胺、牙精胺、精胺) 的存在显示存在前列腺癌。在某些实施方案中,尿液样本中升高水平的一种或多种聚胺 (例如,腐胺、牙精胺、精胺) 的存在表明存在前列腺癌。

[0015] 在指定实施方案中,本发明提供一种诊断乳腺癌的方法,包括:检测受试者的样本

中一种或多种癌症特异性代谢物,诸如哌可酸、丝氨酸、聚胺和脂肪酸的存在或缺失;基于癌症特异性代谢物的存在或缺失诊断乳腺癌。在某些实施方案中,聚胺是诸如腐胺、牙精胺和精胺的聚胺。在某些实施方案中,脂肪酸类型诸如肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸和油酸。在某些实施方案中,样本类型是诸如组织样本、血液样本、血清样本和尿液样本。在某些实施方案中,组织样本是活检样本。在某些实施方案中,一种或多种癌症特异性代谢物在癌症样本中存在,而在非癌症样本中缺失。在某些实施方案中,一种或多种癌症特异性代谢物在癌症样本中缺失,但在非癌症样本中存在。在某些实施方案中,该方法包括同时检测一种以上的所述癌症特异性代谢物的存在或缺失。

[0016] 在某些实施方案中,本发明提供一种鉴定乳腺癌的方法,包括:在受试者的样本中检测一种或多种癌症特异性代谢物诸如哌可酸、丝氨酸、聚胺和脂肪酸的存在或缺失;和基于癌症特异性代谢物的存在或缺失鉴定乳腺癌。在某些实施方案中,聚胺是诸如腐胺、牙精胺和精胺的聚胺。在某些实施方案中,脂肪酸是诸如肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸和油酸的脂肪酸。在某些实施方案中,样本类型诸如组织样本、血液样本、血清样本和尿液样本。在某些实施方案中,组织样本是活检样本。在某些实施方案中,样本中一种或多种升高水平的癌症特异性代谢物的存在表明受试者体内存在乳腺癌。在某些实施方案中,样本中一种或多种降低水平的癌症特异性代谢物的存在表明受试者体内存在乳腺癌。在某些实施方案中,方法包括同时检测一种以上的癌症特异性代谢物的存在或缺失。

[0017] 在指定实施方案中,本发明提供一种诊断前列腺癌的方法,包括:检测受试者的尿液样本中一种或多种癌症特异性代谢物诸如哌可酸、丝氨酸、聚胺和脂肪酸的存在或缺失;和基于在尿液样本中的癌症特异性代谢物的存在或缺失诊断前列腺癌。在某些实施方案中,聚胺是诸如腐胺、牙精胺和精胺的聚胺。在某些实施方案中,脂肪酸是诸如肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸和油酸的脂肪酸。在某些实施方案中,尿液样本是尿沉渣样本。在某些实施方案中,一种或多种癌症特异性代谢物在癌症样本中存在,而在非癌症样本中缺失。在某些实施方案中,一种或多种癌症特异性代谢物在癌症样本中缺失,而在非癌症样本中存在。在某些实施方案中,该方法包括同时检测一种以上癌症特异性代谢物的存在或缺失。

[0018] 在指定实施方案中,本发明提供一种诊断前列腺癌的方法,包括:检测前列腺组织样本中一种或多种降低水平的聚胺;和基于在前列腺组织样本中一种或多种降低水平的聚胺诊断前列腺癌。在某些实施方案中,前列腺组织样本是活检样本。在某些实施方案中,聚胺类型诸如腐胺、牙精胺和精胺。

[0019] 在指定实施方案中,本发明提供一种诊断前列腺癌的方法,包括:检测尿液样本中一种或多种升高水平的聚胺;和基于在尿液样本中一种或多种降低水平的聚胺诊断前列腺癌。在某些实施方案中,尿液样本是尿沉渣样本。在某些实施方案中,聚胺类型诸如腐胺、牙精胺和精胺。

[0020] 在另一些实施方案中,本发明提供用于检测代谢物的水平的组合物、试剂盒和系统。在某些实施方案中,试剂盒和系统包含必要组件,其足以或有效检测出代谢物的水平。

[0021] 本发明的其他实施方案在以下说明和实验部分详细描述。

附图说明

[0022] 图 1 示出了谷氨酸的水平在局部癌症和转移性前列腺癌组织样本中比在良性前列腺组织中更高。

[0023] 图 2 示出了甘氨酸的水平在局部癌症和转移性前列腺癌组织样本中比在良性前列腺组织中更高。

[0024] 图 3 示出了半胱氨酸的水平在局部癌症和转移性前列腺癌组织样本中比在良性前列腺组织中更高。

[0025] 图 4 示出了胸腺嘧啶的水平在转移性前列腺癌组织样本中比在良性前列腺组织中更高。

[0026] 图 5 示出了哌可酸的水平在转移性前列腺癌组织样本中比在良性前列腺组织中更高。

[0027] 图 6 示出了尿嘧啶的水平在局部癌症和转移性前列腺癌组织样本中比在良性前列腺组织中更高。

[0028] 图 7 示出了丝氨酸的水平在良性、局部癌症和转移性前列腺癌组织样本中没有变化。

[0029] 图 8 示出了哌可酸的水平在侵入性前列腺癌细胞系 (VCAP、Du145 和 2RVV1) 中比非侵入性前列腺癌细胞系 (RWPE) 中更高。

[0030] 图 9 示出了侵入性前列腺癌细胞系 (LnCaP、Du145、PC3、2RVV1) 比非侵入性前列腺癌细胞系 (RWPE) 具有更高水平的尿嘧啶。

[0031] 图 10 示出了前列腺活检阳性患者的尿沉渣样本显示比来自前列腺活检阴性患者的尿沉渣样本具有更高的肌氨酸水平。

[0032] 图 11 示出了前列腺活检阳性患者的尿沉渣样本显示比来自前列腺活检阴性患者的尿沉渣样本具有更高的谷氨酸水平。

[0033] 图 12 示出了前列腺活检阳性患者的尿沉渣样本显示比来自前列腺活检阴性患者的尿沉渣样本具有更高的甘氨酸水平。

[0034] 图 13 示出了前列腺活检阳性患者的尿沉渣样本显示比来自前列腺活检阴性患者的尿沉渣样本具有更高的半胱氨酸水平。

[0035] 图 14 示出了前列腺活检阳性患者的尿沉渣样本显示与来自前列腺活检阴性患者的尿沉渣样本具有同等的甲硫氨酸水平。

[0036] 图 15 示出了表明在前列腺活检阳性的尿沉渣样本中的谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的水平比前列腺活检阴性对照更高的箱线图。

[0037] 图 16 示出了转移性前列腺组织样本比良性和局部前列腺癌样本具有更低的精胺水平。

[0038] 图 17 示出了转移性前列腺组织样本比良性和局部前列腺癌样本具有更低的腐胺水平。

[0039] 图 18 示出了转移性前列腺组织样本比良性和局部前列腺癌样本具有更低的牙精胺水平。

[0040] 图 19 示出了在良性、局部癌症和转移性前列腺癌组织样本中精胺、腐胺和牙精胺水平的箱线图。

[0041] 图 20 示出了非侵入性前列腺癌细胞系 (RWPE) 显示比侵入性前列腺癌细胞系 (VCAP、

LnCaP、DU145、PC3 和 2RVV1) 更高的精胺、腐胺和牙精胺水平。

[0042] 图 21 示出了精胺 / 甲硫氨酸之比在活检阳性前列腺癌患者的尿沉渣样本中比活检阴性对照中更高。

[0043] 图 22 示出了牙精胺 / 甲硫氨酸之比在活检阳性前列腺癌患者的尿沉渣样本中比活检阴性对照中更高。

[0044] 图 23 示出了在活检阳性前列腺癌患者和活检阴性对照的尿沉渣样本中精胺 / 甲硫氨酸和牙精胺 / 甲硫氨酸之比的箱线图。

[0045] 图 24 示出了肉豆蔻酸的水平在局部和转移性前列腺癌组织样本中比在良性对照中更高。

[0046] 图 25 示出了棕榈酸的水平在局部和转移性前列腺癌组织样本中比在良性对照中更高。

[0047] 图 26 示出了花生四烯酸的水平在局部和转移性前列腺癌组织样本中比在良性对照中更高。

[0048] 图 27 示出了硬脂酸的水平在转移性前列腺癌组织样本中比在良性对照中更高。

[0049] 图 28 示出了月桂酸的水平在转移性前列腺癌组织样本中比在良性对照中更高。

[0050] 图 29 示出了油酸的水平在转移性前列腺癌组织样本中比在良性对照中更高。

[0051] 图 30 示出了表明棕榈酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、花生四烯酸、油酸和月桂酸在良性、局部癌症和转移性前列腺癌组织样本中的水平箱线图。

[0052] 图 31 示出了在乳腺癌组织样本中比在良性组织样本中具有更高的水平。

[0053] 图 32 示出了侵入性乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231、BT-549、T578、SVM-245) 具有比非侵入性细胞系 (HME) 更高的肌氨酸水平。

[0054] 图 33 示出了侵入性乳腺癌细胞系 (MCF7、MDA-MB-231、T470、SKBR3) 具有比非侵入性细胞系 (MCF10A) 更高的腐胺、牙精胺和精胺水平。

[0055] 图 34 示出了显示在 70 个指诊后尿沉渣中 (35Bx-ve 和 35Bx+ve) 基于 GC-MS 分析的代谢物 (肌氨酸、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸) 水平的箱线图。

[0056] 图 35 示出了在包含 4 种代谢物 (肌氨酸、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸) 的 70 个尿沉渣训练集上使用回归分析发展的多重组的 ROC 曲线。

[0057] 图 36 示出了显示基于前列腺癌组织中的 GC-MS 分析的代谢物水平的箱线图。

[0058] 图 37 示出了前列腺癌组织显示较高的亮氨酸水平。

[0059] 图 38 示出了前列腺癌组织显示较高的天冬酰胺水平。

[0060] 图 39 示出了前列腺癌组织显示较高的色氨酸水平。

[0061] 图 40 示出了前列腺癌组织显示较高的犬尿胺酸水平。

[0062] 图 41 示出了前列腺癌组织显示较高的 3-氨基丁酸水平。

[0063] 图 42 示出了活检阳性尿沉渣显示升高的肌氨酸水平。

[0064] 图 43 示出了活检阳性尿沉渣显示较高的尿嘧啶水平 (尿嘧啶 / 丙氨酸的比)。

[0065] 图 44 示出了肌氨酸的再生性 (独立制备)。

[0066] 图 45 示出了肌氨酸的再生性 (复制)。

[0067] 图 46 示出了在指诊后尿沉渣中肌氨酸的稳定性。

[0068] 图 47 示出了在两次独立制备中谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的可再生性。

[0069] 定义

[0070] 为了便于理解本发明,以下限定一些术语和短语:

[0071] “前列腺癌”是指癌症发生在前列腺部位的疾病,前列腺是指男性生殖系统中的腺体。“低级”或“较低级”的前列腺癌是指非转移性前列腺癌,包括低转移潜力的恶性肿瘤(例如,认为是具有低侵入性的前列腺癌)。“高级”或“较高级”前列腺癌是指在受试者体内已经转移的前列腺癌,包括高转移潜力的恶性肿瘤(认为是具有侵入性的前列腺癌)。

[0072] 如本文所使用的,术语“癌症特异性代谢物”是指在癌症细胞中与在非癌症细胞中相比差别存在的代谢物。例如,在某些实施方案中,癌症特异性代谢物在癌症细胞中存在,而在非癌症细胞中缺失。在其他的实施方案中,癌症特异性代谢物在癌症细胞中缺失,但在非癌症细胞中存在。在更进一步的实施方案中,癌症特异性代谢物在癌症细胞中与在非癌症细胞中相比差别存在。例如,癌症特异性代谢物可能以任何水平差别存在,但一般以升高至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 100%、至少 110%、至少 120%、至少 130%、至少 140%、至少 150%或更多的水平存在,或一般以降低至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或 100%(例如,缺失)的水平存在。癌症特异性代谢物优选地以统计性显著(例如,通过使用 Welch 的 T 检验或 Wilcoxon 的秩和检验确定的 p 值小于 0.05 和 / 或 q 值小于 0.10)的水平差别存在。典型的癌症特异性代谢物在以下说明和实验部分详细描述。

[0073] 如本文所使用的,术语“样本”以其最广义的含义使用。在一个含义中,其是指包括标本或从任何源获得的培养物,以及生物学和环境样本。生物学样本可以从动物(包括人类)中获得,而且包括流体、液体、组织和气体。生物学样本包括血液制品,诸如血浆、血清等等。然而,这种实例不能解释为限制本发明可用的样本类型。

[0074] 生物学样本可以是动物(包括人类)、流体、液体(例如,粪便)或组织,以及液体和固体食物和饲料产品,以及配料诸如乳品项目、蔬菜、肉类和肉类副产品以及废料。生物学样本可以从全部家族种类的家畜以及野化和野生动物中获得,这些动物包括但不限于诸如蹄类动物、熊、鱼、兔类动物、啮齿动物等。生物学样本可以含有任何适合检测所需生物标志物的生物学材料,而且可以包含来自受试者的细胞和 / 或非细胞的材料。该样本能够从任何适合的生物学组织或流体,例如,前列腺组织、血液、血浆、尿液或脑脊髓液(CSF)中分离。

[0075] 代谢物的“参考水平”是指显示特殊疾病状态、表型或其缺陷,以及疾病状态、表型或其缺陷的组的代谢物水平。代谢物的“阳性”参考水平是指显示特殊疾病状态或表型的水平。代谢物的“阴性”参考水平是指显示缺乏特殊疾病状态或表型的水平。例如,代谢物的“前列腺癌阳性参考水平”是指显示受试者体内前列腺癌的阳性诊断的代谢物水平,而且代谢物的“前列腺癌阴性参考水平”是指显示受试者体内前列腺癌阴性诊断的水平。代谢物的“参考水平”可以是代谢物的绝对或相对量或浓度、代谢物的存在或缺失、代谢物的量或浓度范围、代谢物的最小和 / 或最大量或浓度、代谢物的平均量或平均浓度,和 / 或代谢物的中值量或中值浓度;而且,此外,代谢物的组的“参考水平”还可以是两种或多种代

代谢物彼此的绝对或相对量的比例。对特殊疾病状态、表型或其缺陷的代谢物的适当阳性和阴性参考水平可以通过在一种或多种适当受试者体内测量所需代谢物的水平来确定,而且这种参考水平可以根据受试者具体群体来调整(例如,参考水平可以与年龄匹配以便可以在特定年龄的受试者样本中的代谢物水平和对特定年龄群的特殊疾病状态、表型或其缺陷的参考水平之间作比较)。这种参考水平还可以根据用于测量生物学样本(例如,LC-MS、GC-MS等)的代谢物水平的具体技术来调整,其中代谢物的水平可以根据使用的具体技术而不同。

[0076] 如本文所使用的,术语“细胞”是指任何真核或原核细胞(例如,细菌细胞诸如大肠杆菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、禽细胞、两栖类动物细胞、植物细胞、鱼细胞核昆虫细胞),不论是位于体外或体内。

[0077] “质谱测定法”(MS)是测量和分析分子的技术,其包括分割靶分子,然后基于它们的质荷比分析碎片以产生质谱,作为“分子指纹”。通过确定波长的方式确定对象的质荷比,其中由该对象吸收电磁能量。有几种确定离子质荷比的常用方法,某些方法使用电磁波测量离子轨道的相互作用,其他方法测量离子行进特定距离的时间,或两者都有。能够在数据库中查询来自这些碎片质量测量的数据以获得靶分子的确切鉴定。质谱测定法还广泛应用于化学的其他领域,诸如石油化学或药品质量控制等其他领域。

[0078] 术语“代谢”是指在有机体组织内发生的化学变化,包括“合成代谢”和“分解代谢”。合成代谢是指分子的生物合成或聚集,而分解代谢是指分子断裂。

[0079] “代谢物”是中间的或源自代谢的产物。代谢物通常是指“小分子”。

[0080] 术语“代谢学”是指分子代谢物研究。

[0081] “生物聚合物”是一种或多种类型的重复单位的聚合物。生物聚合物通常在生物系统中出现,特别包括多糖(诸如碳水化合物)和多肽(其术语用于包括多肽和蛋白质)和多核苷酸及其类似物,诸如那些由氨基酸类似物或非氨基酸基团,或核苷酸类似物或非核苷酸基团组成,或包含这些产物的化合物。这包括多核苷酸,其中常规主链由非天然产生或合成主链替代,和核酸(或合成或天然产生的类似物),其中一种或多种常规碱基已经由能够参与Watson-Crick型氢键相互作用的基团(天然或合成的)替代。多核苷酸包括单链或多链配置,其中一条或多条链可以或可以不是彼此完全排成一列的。

[0082] 如本文所使用的,术语“术后组织”是指已经在外科流程中从受试者体内移除的组织。术后组织的实例包括但不限于活检样本、切除的器官和切除的器官部分。如本文所使用的,术语“检测(detect)”、“检测(detected)”或“检测(detection)”可以描述为发现或鉴定的一般行为,或可检测标记成分的具体观察。

[0083] 如本文所使用的,术语“临床失败”是指前列腺切除术之后的负面结果。与临床失败相关的结果实例包括但不限于前列腺切除术之后的PSA水平升高(例如,上升至至少0.2ng/ml)或疾病复发(例如,转移性前列腺癌)。

[0084] 如本文所使用的,术语“多重”是指同时检测样本中一种以上的物质(例如,分析物、代谢物、化合物)。

[0085] 发明详述

[0086] 本发明涉及癌症标志物。特别地实施方案,本发明提供在癌症(例如,前列腺癌或乳腺癌)中差别存在的代谢物。在研究本发明实施方案过程中操作的实验辨识出,例

如,肌氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、亮氨酸、乙酰氨基葡萄糖、高半胱氨酸、脯氨酸、苏氨酸、组氨酸、正乙酰天门冬氨酸、马来酸盐、瓜氨酸、肌苷、肌醇、腺苷、牛磺酸、肌酸、尿酸、谷胱甘肽、尿嘧啶、犬尿氨酸、甘油-3-磷酸、甘氨酸、辛二酸、胸腺嘧啶、谷氨酸、丝氨酸、尿嘧啶、黄苷、4-乙酰氨基丁酸、哌可酸、棕榈酸、硬脂酸、月桂酸、油酸、花生四烯酸、甲硫氨酸、精胺、色氨酸、2-氨基己二酸、3-氨基异丁酸、牙精胺、腐胺、肉豆蔻酸和胸腺嘧啶差别存在于罹患癌症的受试者体内。其他标志物在本文中和 WO 2009/026152 以及 WO2008/036691 中描述,它们的全部内容通过引用纳入本文。

[0087] 公开的标志物作为诊断、调查、筛查和治疗目的使用。在某些实施方案中,本发明提供诊断癌症(例如,前列腺癌或乳腺癌)的组合物和方法。在某些实施方案中,本发明提供基于升高水平的代谢物的存在鉴定侵入性癌症(例如,侵入性前列腺癌、侵入性乳腺癌)的方法。

[0088] 本发明的实施方案提供组(例如,包含2种或多种、5种或多种、10种或多种、25种或多种或50种或多种)标志物用于诊断、预测、筛查或治疗应用

[0089] 诊断和筛查应用

[0090] 在某些实施方案中,本发明提供诊断和筛查癌症(例如,前列腺癌或乳腺癌)的方法和组合物,包括但不限于基于癌症特异性代谢物或其衍生物、前提、代谢物等的存在,鉴定或诊断癌症风险、癌症阶段的存在或缺失、转移的风险或存在、癌症的侵入性等。典型的诊断方法描述如下。

[0091] 样本

[0092] 根据本文的方法测验任何疑似含有癌症特异性代谢物的患者样本。通过非限制性的实施例,该样本可以是组织(例如,前列腺或乳腺活检样本或术后组织)、血液、尿液或其部分(例如,血浆、血清、尿上清液、尿细胞沉淀、尿沉渣或前列腺细胞)。在某些实施方案中,样本是从活检或手术后(例如,前列腺活检)获得的组织样本。尿液样本优选地在留意的直肠指检(DRE)后立即收集,其使得前列腺细胞从前列腺腺体流进尿道中。

[0093] 在某些实施方案中,患者样本经过用于对癌症特异性代谢物或含有癌症特异性代谢物的细胞分离或培养样本的预处理。可以使用对本领域一般技术人员已知的多种技术达到此目的,这些技术包括但不限于:离心、免疫捕捉和细胞裂解。

[0094] 代谢物的检测

[0095] 可以使用任何合适的方法检测代谢物,这些方法包括但不限于液相和气相色谱法、单独或耦合进行质谱测定法(参见例如,以下实验部分)、NMR(参见例如,美国专利公开文本 20070055456,通过引用纳入本文)、免疫测定、化学测定、分光镜检查诸如此类。在某些实施方案中,使用色谱法和 NMR 分析的商业系统。

[0096] 在其他的实施方案中,使用光学成像技术检测代谢物(例如,生物标志物及其衍生物),诸如磁共振波谱(MRS)、磁共振成像(MRI)、CAT 扫描、超声、基于 MS 的组织成像或 X 射线检测方法(例如,能量色散 X 射线荧光检测)。

[0097] 可以使用任何合适的方法分析生物学样本以确定样本中一种或多种代谢物的存在、缺失或水平。合适的方法包括色谱法(例如,HPLC、气相色谱法、液相色谱法)、质谱测定法(例如,MS、MS-MS)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、抗体连接、其他免疫化学技术、生物化学或酶促反应或测定及其组合。此外,可以间接测量一种或多种代谢物的水平,例如通过使

用测量与所需测量的生物标志物水平相关的化合物（或化合物）水平测定。

[0098] 可以使用本发明的方法确定一种或多种列举的代谢物水平。例如，可以使用这些方法确定一种代谢物、2种或多种代谢物、3种或多种代谢物、4种或多种代谢物、5种或多种代谢物、6种或多种代谢物、7种或多种代谢物、8种或多种代谢物、9种或多种代谢物、10种或多种代谢物等的水平，包括本文所述的某些或全部代谢物的组合的水平。确定代谢物组合的水平可以允许方法中存在更多敏感度和特异性，诸如诊断前列腺癌和辅助诊断前列腺癌，而且可以允许更好的鉴别或鉴定前列腺癌，使之与前列腺其他疾病（例如良性前列腺增生（BPH）、前列腺炎等）或可能与前列腺癌具有相似或重叠代谢物的其他癌症（比较未罹患前列腺癌的受试者）区分开。例如，生物学样本中特定代谢物水平比例可以允许在诊断前列腺癌和辅助诊断前列腺癌的过程中具有更大敏感度和特异性，并允许更好地鉴别或鉴定前列腺癌，使之与前列腺其他疾病或可能与前列腺癌具有相似或重叠代谢物的其他癌症（比较未罹患前列腺癌的受试者）区分开。在某些实施方案中，发现一种或多种代谢物（例如，哌可酸或脂肪酸（包括但不限于肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸、油酸））的水平用于鉴定或鉴别乳腺癌。

[0099] 数据分析

[0100] 在某些实施方案中，使用基于计算机的分析程序将由检测试验生成的原始数据（例如，癌症特异性代谢物的存在、缺失或量）为临床医师解释成预测值数据。临床医师能够使用任何合适的方法访问预测数据。因此，在某些实施方案中，本发明具有进一步优势，未经过代谢物分析训练的临床医师不需要理解原始数据。数据以其最有效的形式直接显示给临床医师。然后临床医师能够立刻使用信息以优化对受试者的治疗方案。

[0101] 本发明考虑到任何能够接收、处理和传输信息的方法，这些信息来自实验室进行分析的信息、提供的信息、来自医务人员和受试者的信息。例如，在本发明的某些实施方案中，样本（例如，活检或血液、尿液或血清样本）从受试者体内获得并提交到分析系统中（例如，医疗设施的临床实验室等。），其位于世界的任何地方（例如，位于与受试者居住国家不同的国家或信息最终使用的国家）以生成原始数据。如果样本包含组织或其他生物学样本，受试者可以去医疗中心获取样本并发送到分析中心，或受试者可以自己收集样本（例如，尿液样本）并直接发送到分析中心。如果样本包含之前确定的生物学信息，受试者可以直接发送信息到分析中心（例如，含有信息的信息卡可以通过计算机扫描，并使用电子通讯系统将数据传输到分析中心的计算机上）。一旦分析中心接收信息，处理样本，产生特异于受试者所需的诊断或预后信息的分析文件（例如，代谢特征）。

[0102] 然后由治疗的临床医师将分析数据制成适合转译的格式。例如，并非提供原始数据，制成的格式可以表现出对受试者的诊断或风险评估（例如，存在癌症的可能性），以及对特别治疗选择的建议。数据可以通过任何合适的方法显示给临床医师。例如，在某些实施方案中，分析系统产生报告，由临床医师（例如，在治疗点上）打印或系统显示给计算机监控的临床医师。

[0103] 在某些实施方案中，信息在治疗点上或在局部设施上首先分析。然后将原始数据发送到中央处理设施以作进一步分析和/或以将原始数据转换成对临床医师或患者有用的信息。中央处理设施具有隐私保密（所有数据按照统一的安全协议存储在中央设施中）、速度和数据分析一致性的优势。然后中央处理设施在治疗受试者之后能够控制的命运。例

如,使用电子通讯系统,中央处理设施能够提供数据给临床医师、受试者或研究者。

[0104] 在某些实施方案中,受试者能够使用电子通讯系统直接获取数据。受试者可以根据结果选择进一步干预或咨询。在某些实施方案中,数据用于调查使用。例如,数据可以用于进一步优化包含或清除作为疾病的特殊状况或阶段的有效指示物的标志物。

[0105] 在某些实施方案中,代谢物升高或降低的水平(例如,相对于在正常前列腺细胞中的水平、相对于先前时间点水平上升、相对于预先建立的阈水平上升等。)表明样本中存在癌症。

[0106] 当确定样本中一种或多种代谢物的量或水平时,这种量或水平可以与癌症代谢物参考水平比较,诸如癌症阳性和/或癌症阴性参考水平,以便辅助诊断或诊断受试者是否罹患癌症。样本中一种或多种代谢物的水平对应于癌症阳性参考水平(例如,与参考水平相同的水平、与参考水平大体上相同的水平、高于和/或低于最小和/或最大参考水平的水平、和/或在参考水平范围内的水平)表明受试者体内存在癌症的诊断。样本中一种或多种代谢物的水平对应于癌症阴性参考水平(例如,与参考水平相同的水平、与参考水平大体上相同的水平、高于和/或低于最小和/或最大参考水平的水平、和/或在参考水平范围内的水平)表明受试者体内没有癌症的诊断。此外,样本中差别存在的一种或多种代谢物的水平(特别在统计上显著的水平上)与癌症阴性参考水平相比,表明受试者体内存在癌症的诊断。样本中差别存在的一种或多种代谢物的水平(特别在统计上显著的水平上)与癌症阳性参考水平相比,表明受试者体内没有癌症的诊断。

[0107] 使用多种技术,一种或多种代谢物的水平与癌症阳性和/或前列腺癌阴性参考水平比较,包括在生物学样本中一种或多种代谢物水平与癌症阳性和/或癌症阴性参考水平的简单比较(例如,手动比较)。还可以使用一种或多种统计分析(例如,t检验、Welch的T检验、Wilcoxon的秩和检验、随机森林)比较在生物学样本中一种或多种代谢物水平与癌症阳性和/或癌症阴性参考水平。

[0108] 组合物 & 试剂盒

[0109] 用于(例如,足以用于、必须用于或有效用于)本发明的某些实施方案的诊断、调查或筛查方法的组合物包括必须、足以或有效用于检测癌症特异性代谢物存在或缺失的试剂。所有这些组合物,单独或与本发明的其他组合物结合,可以以试剂盒的形式提供。试剂盒还可以包含适当的控制器和/或检测试剂。

[0110] 组

[0111] 本发明的实施方案提供同时检测一种或多种本发明标志物(例如,肌氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、亮氨酸、脯氨酸、苏氨酸、组氨酸、正乙酰天门冬氨酸、肌苷、肌醇、腺苷、牛磺酸、肌酸、尿酸、谷胱甘肽、尿嘧啶、犬尿氨酸、甘油-3-磷酸、甘氨酸、辛酸、胸腺嘧啶、谷氨酸、黄苷、4-乙酰胺基丁酸、正乙酰酪氨酸和胸腺嘧啶、哌可酸、脂肪酸(包括但不限于肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸、油酸)或聚胺(包括但不限于腐胺、牙精胺、精胺))的多重或组测定,检测包括单独检测上述标志物,或与本领域已知的其他癌症标志物结合检测。例如,在某些实施方案中,提供组或结合测定在单独测定中检测2种或多种、3种或多种、4种或多种、5种或多种、6种或多种、7种或多种、8种或多种、9种或多种、10种或多种、15种或多种或20种或多种的标志物。在某些实施方案中,测定是自动化或高流通量的。

[0112] 在某些实施方案中,组包含肌氨酸、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸。实验在本发明实施例的研究过程中施行,确定肌氨酸、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的组显示比任何单个标志物更高的曲线下面积,因此在检测前列腺癌症中更具敏感性。在某些实施方案中,检测前列腺癌的组进一步包含一种或多种乙酰氨基葡萄糖、犬尿胺酸、尿嘧啶、高半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、牙精胺、精胺、2-氨基己二酸、亮氨酸、脯氨酸、苏氨酸、马来酸盐、组氨酸、瓜氨酸、腺苷或肌苷。

[0113] 在某些实施方案中,其他癌症标志物包括在多重或组测定中。标志物选自其单独的或与本文所述的代谢标志物结合的预测值。典型的前列腺癌标志物包括但不限于:AMACR/P504S(美国专利号 6,262,245);PCA3(美国专利号 7,008,765);PCGEM1(美国专利号 6,828,429);prostein/P501S、P503S、P504S、P509S、P510S、前列腺/P703P、P710P(美国公开号 20030185830);和那些在美国专利号 5,854,206 和 6,034,218 以及美国公开号 20030175736 中公开的信息,它们的全部内容通过引用纳入本文。也考虑到到其他癌症、疾病、感染和代谢状况的标志物,将其包括在多重或组形式中。

[0114] 治疗方法

[0115] 在某些实施方案中,本发明提供一种治疗方法(例如,靶定本文所述癌症特异性代谢物)。在某些实施方案中,该治疗方法靶定本文所述癌症特异性代谢物的酶或通路的组成部分。

[0116] 例如,在某些实施方案中,本发明提供靶定本发明的癌症特异性代谢物的化合物。化合物可以通过,例如干扰癌症特异性代谢物或其前体或代谢物的合成(例如,通过阻碍代谢物合成中涉及的酶转录或转译、通过钝化代谢物合成中涉及的酶(例如,通过转译后修饰或与不可逆抑制剂结合)或除此之外通过抑制代谢物合成中涉及的酶活性)、通过结合抑制癌症特异性代谢物的功能、通过结合到靶癌症特异性代谢物(例如,竞争性或非竞争性抑制剂)或通过增加代谢物的断裂或廓清率来降低癌症特异性代谢物的水平。化合物可以通过例如,抑制癌症特异性代谢物的断裂或廓清率(例如,通过抑制代谢物断裂中涉及的酶),通过增加癌症特异性代谢物的前体水平或通过增加代谢物对其目标的亲和力来提高癌症特异性代谢物的水平。典型的治疗靶标包括但不限于甘氨酸-N-甲基转移酶(GNMT)和肌氨酸。

[0117] 代谢途径

[0118] 典型的癌症特异性代谢物的代谢途径描述如下。本发明考虑到其他代谢物用于本发明的组合和方法,并在如以下实验部分中描述。

[0119] 肌氨酸代谢

[0120] 例如,肝内胆碱代谢中涉及肌氨酸。在哺乳动物的肝内胆碱转化成甘氨酸的氧化降解反应在线粒体中发生,其中其通过特异性转运蛋白进入。此代谢途径中的最后两步由二甲基甘氨酸脱氢酶(Me2GlyDH)催化,该酶将二甲基甘氨酸转化成肌氨酸和肌氨酸脱氢酶(SarDH),其将肌氨酸(正甲基甘氨酸)转化成甘氨酸。两种酶位于线粒体基质中。因此,在某些实施方案中,治疗组合物靶定 Me2GlyDH 和/或 SarDH。通过使用本文所述的药物筛选方法鉴定典型的化合物。

[0121] 羟基乙酸代谢

[0122] 胆固醇利用的最终产物是在肝内合成的胆汁酸。胆汁酸的合成是排泄多余胆固醇

的主要机制。然而,胆固醇以胆汁酸形式排泄不足以补偿胆固醇的过量摄入。在人类胆内最丰富的胆汁酸是鹅胆酸(45%)和胆酸(31%)。在胆汁酸分泌到毛细胆管中之前,其羧基通过酰胺键与甘氨酸或牛磺酸共轭。这种共轭反应分别得到甘氨胆酸和牛磺胆酸。毛细胆管与胆小管结合,然后形成胆管。胆汁酸从肝中通过这些管道运载到胆囊中,在其中储藏胆汁酸以备后用。胆汁酸的最终归宿是分泌到肠中,其中它们辅助对饮食中脂肪乳化。在肠道中,移除甘氨酸和牛磺酸残渣并将胆汁酸排泄(仅有的很小百分比)或通过肠道再吸收返回到肝中。把这个过程称为肠肝循环。

[0123] 辛二酸代谢

[0124] 辛二酸,也称为氨基辛二酸,是具有分子式 $C_6H_{12}(COOH)_2$ 的二羧酸。二羧酸的过氧化物酶代谢导致排泄到尿液中的中链二羧酸己二酸、辛二酸和癸二酸的产生。

[0125] 黄苷代谢

[0126] 在嘌呤核苷代谢中涉及黄苷。特别地,黄苷是肌苷转化成鸟苷的中间产物。黄苷酸能够用于嘌呤代谢中肌苷酸脱氢酶活性的定量测量,推荐使用以确保对罹患急性淋巴细胞白血病的(ALL)的儿童施行最佳的硫唑嘌呤治疗。

[0127] 聚胺代谢

[0128] 聚胺具有两个或多个伯氨基,而且是真核细胞和原核细胞中的基本分子。尽管已知聚胺通过高调节通路在细胞中合成,它们的实际功能并不完全清楚。作为阳离子,它们以定期间隔的时间间隔与DNA结合。

[0129] 如果抑制细胞聚胺合成,细胞生长将停止或严重延缓。外源性聚胺的供应恢复了这些细胞的生长。大多数真核细胞在其细胞膜上具有聚胺转运蛋白系统,能够促进外源性聚胺的内在化。这种系统在快速增殖细胞中具有高活性,并且是某些化学疗法(例如,DMFO、MGBG、BCNU及其类似物)的目标。

[0130] 聚胺还是多种离子通道的重要调制器,包括NMDA受体和AMPA受体。它们阻碍内向整流钾通道,从而保存细胞能量(跨细胞膜的 K^+ 离子梯度)。

[0131] 聚胺的实例包括但不限于腐胺、尸胺、精胺和牙精胺。腐胺通过从精氨酸起始的两种不同通路合成。在一个通路中,精氨酸通过酶精氨酸脱羧酶(ADC)催化的反应转化成胍丁胺;然后胍丁胺通过胍丁胺亚胺羟化酶(AIH)转化成氨甲酰腐胺。最终,氨甲酰腐胺转化成腐胺。在第二个通路中,精氨酸转化成鸟氨酸,然后鸟氨酸通过鸟氨酸脱羧酶(ODC)转化成腐胺。使用赖氨酸脱羧酶(LDC)在一步反应中从赖氨酸中合成尸胺。使用来自脱羧S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的氨丙基基团从腐胺合成牙精胺。通过牙精胺合酶催化该反应。在酶精胺合酶存在下使用SAM从牙精胺反应中合成精胺。

[0132] 脂肪酸代谢

[0133] 脂肪酸包含通常具有无支链的脂肪族尾状物(链)的饱和或不饱和的羧酸。脂肪酸的实例包括但不限于肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸(也称为正十二烷酸)和油酸。

[0134] 肉豆蔻酸,也称为十四酸或14:0,是分子式为 $CH_3(CH_2)_{12}COOH$ 的常见饱和脂肪酸。肉豆蔻酸盐是肉豆蔻酸的盐或酯。肉豆蔻酸以豆蔻核仁(肉豆蔻)为名。肉豆蔻酯是75%三肉豆蔻酸甘油酯,肉豆蔻酸的甘油三酯。除豆蔻核仁之外,肉豆蔻酸也在棕榈油、椰子油、乳脂和鲸油,即来自抹香鲸油脂的结晶分数。肉豆蔻酸还以协同转译的方式普遍加入到倒

数第二个氮末端,受体相关激酶中的甘氨酸中以赋予酶的膜定位。肉豆蔻酸具有充分的高疏水性,能够纳入真核细胞的血浆膜双层磷脂的脂肪酰基核心中。肉豆蔻酸以这种方式充当生物膜中的脂质锚发挥作用。

[0135] 棕榈酸, IUPAC 命名中的 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ 或十六酸,是在动植物中最常见的饱和脂肪酸之一,也是来自棕榈树油脂(棕榈油和棕榈仁油)的主要成分。棕榈一词源自法语“棕榈(palmitique)”,即棕榈树的髓。棕榈酸是脂肪生成(脂肪酸合成)过程中产生的第一种脂肪酸,从中能够产生较长的脂肪酸。棕榈酸盐在乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)上阴性反馈,该 ACC 负责将乙酰辅酶 A 转化成丙二酰辅酶 A,将其加入到生长酰基链从而阻碍棕榈酸盐的进一步生成。

[0136] 花生四烯酸(也称为 AA 或 ARA)是 $\omega-6$ 脂肪酸 $20:4(\omega-6)$ 。其对应于花生油中的饱和花生酸(落花生属-花生)。花生四烯酸是具有 20 个碳链和 4 个顺式双键的羧酸;第一个双键位于 ω 端的第 6 个碳上。“花生四烯酸”偶尔用于指定任何一种二十碳四烯酸。然而,术语普遍限于所有-顺式 5、8、11、14-二十碳四烯酸。花生四烯酸通过酶磷脂酶 A2(PLA_2)从磷脂分子中释放,其使脂肪酸断裂,但还能够通过 DAG 脂肪酶从 DAG 中生成。为了发信号的目的而生成的花生四烯酸好像是通过磷脂酰胆碱特异性胞浆型磷脂酶 A2(cPLA_2 , 85kDa)的作用获得,而炎性的花生四烯酸通过低分子量分泌的 PLA_2 (sPLA_2 , 14-18kDa)的作用生成。花生四烯酸在类二十烷酸产生过程中是前体:1) 酶环加氧酶和过氧化物酶导致前列腺素 H_2 的产生,其反过来用于产生前列腺素、环前列腺素和凝血烷;2) 酶 5-脂氧合酶导致 5-HPETE 的产生,其反过来用于产生白细胞三烯;3) 花生四烯酸还用于大麻素的生物合成;和 4) 某些花生四烯酸通过表氧化酶转化成羟基二十碳四烯酸(HETEs)和环氧二十碳三酸(EETs)。这些衍生物的产生及其在体内的作用统称为花生四烯酸级联。

[0137] 硬脂酸或 $18:0$ 是饱和脂肪酸。其是具有化学式 $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ 或 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ 的蜡状固体。硬脂酸经历饱和羧酸的典型反应、向硬脂醇的显著还原和与一系列乙醇产生的酯化反应。在人类体内标记的同位素(Emken 等(1994)Am. J. Clin. Nutr. 60:1023S-1328S)表明氧化性去饱和成油酸的膳食硬脂酸部分比类似转化成十六烯酸的棕榈酸部分高 2.4 倍。而且,硬脂酸不大可能纳入胆固醇酯中。

[0138] 油酸是在多种动植物源中出现的单不饱和 $\omega-9$ 脂肪酸,而且是人类脂肪组织中具有最高丰度的脂肪酸。其具有分子式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ 。油酸的反式异构体称为反油酸。

[0139] 小分子治疗

[0140] 在某些实施方案中使用小分子治疗。在某些实施方案中,小分子治疗靶定癌症特异性代谢物。在某些实施方案中使用如本发明的药物筛选方法来鉴定小分子治疗。

[0141] 基于核酸的治疗

[0142] 在其他的实施方案中使用基于核酸的治疗。典型的基于核酸的治疗包括但不限于反义 RNA、siRNA 和 miRNA。在某些实施方案中,基于核酸的治疗靶定癌症特异性代谢物(如上所述)的代谢途径中的酶表达。

[0143] 在某些实施方案中,基于核酸的治疗是反义的。将 siRNA 作为基因特异性治疗剂使用(Tuschl 和 Borkhardt, Molecular Intervent. 2002;2(3):158-67,其内容通过引用纳入本文)。siRNA 转染到动物细胞中结果得到有力而长久持续的特异性基因转录后沉

默 (Caplen 等, Proc Natl Acad Sci U. S. A. 2001 ;98 :9742-7 ;Elbashir 等 Nature. 2001 ;411 :494-8 ;Elbashir 等 Genes Dev. 2001 ;15 :188-200 ;和 Elbashir 等 EMBO J. 2001 ;20 :6877-88, 它们的全部内容通过引用纳入本文)。在例如美国专利号 6,506,559 中描述了使用 siRNA 施行 RNA 干扰的方法和组合物, 其内容通过引用纳入本文。

[0144] 在其他的实施方案中, 使用反义化合物操纵癌症特异性代谢物的代谢途径中涉及的基因表达, 该反义化合物与一种或多种编码酶的核酸特异性杂交 (参见例如, Georg Sczakiel, Frontiers in Bioscience 5, d194-201 January 1, 2000 ;Yuen 等 Frontiers in Bioscience d588-593, June 1, 2000 ;Antisense Therapeutics, Second Edition, Phillips, M. Ian, Humana Press, 2004 ;它们的全部内容通过引用纳入本文)。

[0145] 基因治疗

[0146] 本发明考虑到了用于本文所述的癌症特异性代谢物的代谢途径中涉及的酶表达的任何基因操纵的用途。基因操纵的实例包括但不限于, 基因敲除 (例如, 使用如重组方式从染色体中移除基因)、具有或不具有导入型启动子的反义结构表达, 诸如此类。可以使用任何合适的方法实施核酸结构向体外或体内细胞的递送。合适的方法是将核酸结构引入到细胞中以发生所需事件 (例如, 反义结构的表达)。基因疗法还可以用于递送 siRNA 或在体内表达的其他干扰分子 (例如, 根据导入型启动子的刺激)。

[0147] 通过任何方法完成运载基因信息导入到细胞中的分子中, 这些方法包括但不限于裸 DNA 结构的定向注射、使用所述结构装载的金颗粒轰击和大分子使用例如脂质体、生物聚合物等等调节基因转移。优选的方法使用来源于细菌的基因递送负载体, 这种细菌包括但不限于腺病毒、逆转录病毒、牛痘病毒和腺相关病毒。来源于腺病毒的载体由于具有比逆转录病毒更高的效率, 成为将核酸分子转移到体内宿主细胞的优选基因递送负载体。已经显示出腺病毒载体能够非常有效地将体内基因转移到动物模型的多种实体瘤中, 而且转移到免疫缺陷小鼠的人类实体瘤异种移植中。腺病毒载体的实例和基因转移的方法在 PCT 公开号 WO 00/12738 和 WO 00/09675 以及美国专利申请号 6,033,908、6,019,978、6,001,557、5,994,132、5,994,128、5,994,106、5,981,225、5,885,808、5,872,154、5,830,730 和 5,824,544 中描述, 它们的全部内容通过引用纳入本文。

[0148] 载体可以以多种方式施用于受试者。例如, 在本发明的某些实施方案中, 使用直接注射的方法向肿瘤或肿瘤相关组织施用载体。在其他的实施方案中, 通过血液或淋巴循环进行施用 (参见例如, PCT 公开号 99/02685, 它的全部内容通过引用纳入本文)。腺病毒载体的典型剂量水平优选为添加到灌流中的 10^8 至 10^{11} 载体颗粒。

[0149] 抗体治疗

[0150] 在某些实施方案中, 本发明提供靶定癌症特异性代谢物或在其代谢途径中涉及的酶的抗体。可以在本文所公开的治疗方法中使用任何合适的抗体 (例如, 单克隆、多克隆和合成的抗体)。在优选的实施方案中, 用于癌症治疗的抗体是人化抗体。人化抗体的方法在本领域众所周知 (参见例如, 美国专利号 6,180,370、5,585,089、6,054,297 和 5,565,332 ; 每种内容通过引用纳入本文)。

[0151] 在某些实施方案中, 基于治疗的抗体配制成如下所述的药物组合物。在优选的实施方案中, 施用本发明的抗体组合物会得到可预见地降低癌症的效果 (例如, 减少或根除肿瘤)。

[0152] 药物组合物

[0153] 本发明进一步提供药物组合物（例如，包含调节癌症特异性代谢物的水平或活性的药剂。本发明的某些实施方案中的药物组合物可以以很多方式施用，其取决于是否需要局部或全身治疗和/或治疗部位。施用可以是局部的（包括眼的和包括鞘内的以及直肠递送到粘膜）、肺的（例如，通过粉末或气溶胶吸入或吹入，包括通过喷雾剂；通过气管内的、鼻内的、表皮的和经皮的）、口服或肠胃外的方式。肠胃外施用包括静脉、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉注射或注入；或颅内的，例如，鞘内或心室内施用。

[0154] 局部施用的药物组合物和制剂可以包括经皮贴剂、软膏、洗剂、膏状物、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾、液体和粉末。常规药物载体、水性、粉末或油性基、增稠剂等等是必要或理想的。

[0155] 口服施用的组合物和制剂包括粉末或颗粒、在水或非水介质中的悬浮液或溶液、胶囊、小袋或片剂。增稠剂、矫臭剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂是理想的。

[0156] 肠胃外、鞘内或心室内施用的组合物和制剂可以包括无菌水溶液，其还可以包含缓冲液、稀释剂和其他合适的添加剂，例如但不限于穿透增强剂、载体化合物和其他药理上接受的载体或赋形剂。

[0157] 本发明的药物组合物包括但不限于溶液、乳剂和含有脂质体的制剂。这些组合物可以从多种成分中生成，这些成分包括但不限于预制液体、自乳化固体和自乳化半固体。

[0158] 可以以单位剂量形式便宜存在的本发明的药物制剂可以根据工业制药领域众所周知的常规技术来制备。这种技术包括使用药物载体或赋形剂建立活性成分缔合的步骤。一般地，通过使用液体载体或细分的固体载体或两者都有来统一而密切地建立活性成分的缔合，然后如有必要，使产物成型来制备制剂。

[0159] 本发明的组合物可以配制成任何可能的剂量形式，例如但不限于片剂、胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物还可以配制成水性、非水性或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步包含增加悬浮液粘性的物质，包括例如，羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液还可以包含稳定剂。

[0160] 在本发明的一个实施方案中，药物组合物可以配制成并用作泡沫。药物泡沫包括制剂，例如但不限于乳剂、微型乳剂、膏状物、凝胶剂和脂质体。虽然这些制剂的性质基本相似，但它们在成分和最终产物的稠度方面不同。

[0161] 在细胞水平上增强寡核苷酸摄取的试剂还可以加入到本发明的药物和其他组合物中。例如，阳离子脂质体，诸如脂质转染（美国专利号 5,705,188）、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子，诸如聚赖氨酸（W097/30731），也增强细胞的寡核苷酸的摄取。

[0162] 发明的组合物可以另外含有在药物组合物中常见的其他辅助成分。因此，例如，组合物可以含有其他的、配伍的、具有药理活性的材料，例如，止痒药、止血剂、局部麻醉剂或消炎剂，或者可以含有能够实际配制成本发明组合物的多种剂量形式的其他材料，诸如染色剂、矫臭剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂、和稳定剂。然而，当加入这些材料时，它们不应过度干扰本发明组合物成分的生物活性。如有需要，制剂可以进行无菌处理，并与辅助试剂混合，这些辅助试剂诸如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色剂、调味剂和/或芳香物质等不会与制剂的核酸相互作用产生有害物质的试剂。

[0163] 本发明的指定实施方案提供了药物组合物,含有(a)一种或多种核酸化合物和(b)一种或多种以不同机制发挥功能的其他化疗剂。这种化疗剂的实例包括但不限于抗癌药,诸如柔红霉素、放线菌素 D、阿霉素、博来霉素、丝裂霉素、氮芥、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、环磷酰胺、6- 巯基嘌呤、6- 巯鸟嘌呤、阿糖胞苷 (CA)、5- 氟尿嘧啶 (5-FU)、5- 氟去氧尿苷 (5-FUdR)、氨甲蝶呤 (MTX)、秋水仙素、长春新碱、长春花碱、表鬼臼毒、表鬼臼毒噻吩糖苷、顺氯氨铂和己烯雌酚 (DES)。抗炎药包括但不限于非类固醇抗炎药和皮质类固醇,而且抗病毒药物包括但不限于病毒唑、阿糖腺苷、无环鸟苷和 9-(1,3- 二羟-2- 丙氧甲基) 鸟嘌呤,还可以与本发明的组合物结合。其他非反义化疗剂也在本发明范围内。两个或多个结合的化合物可以同时或顺序使用。

[0164] 定量取决于待治疗病状的严重程度和应答性,疗程持续几天至几个月,或直到出现治疗效果或病状减轻的情况。能够通过测量患者体内的药物累积量来计算最佳定量安排。施用医生能够轻易确定最佳的剂量、定量方法和重复率。最佳剂量可以随单个寡核苷酸的相对效率而变化,而且一般可以基于在动物模型的体外或体内有效用的 EC_{50} 或基于本文所述的实例来估计。一般地,剂量是每公斤体重的 $0.01 \mu g$ 至 $100g$,而且可以每天、每周、每月以及每年给药一次或多次。治疗医生能够基于测量的停留时间和体液或组织中的药物浓度来估计定量的重复率。成功治疗后,理想的情况是使受试者接受维持治疗以避免病状复发,其中以每公斤体重的 $0.01 \mu g$ 至 $100g$ 维持剂量施用药物组合物,每天一次或多次至每 20 年一次。

[0165] 药物筛选应用

[0166] 在某些实施方案中,本发明提供药物筛选测定(例如,针对抗癌药进行筛选)。本发明的筛选方法使用本文所述的癌症特异性代谢物。如上所述,在某些实施方案中,测试化合物是小分子、核酸或抗体。在某些实施方案中,测试化合物直接靶定癌症特异性代谢物。在其他的实施方案中,它们靶定癌症特异性代谢物的代谢途径中涉及的酶。

[0167] 在优选的实施方案中,药物筛选方法是高通量药物筛选方法。高通量筛选的方法在本领域内众所周知,而且包括但不限于那些在美国 6468736、W006009903 和 5972639 文献中所描述的方法,它们的全部内容通过引用纳入本文。

[0168] 通过使用本领域已知的任何一种组合库方法的许多途径得到本发明的某些实施方案的测试化合物,这种组合库包括生物库;类肽库(具有肽的功能,但具有新颖的非肽主链的分子库,其对酶降解耐受但仍然保持生物活性;参见例如, Zuckermann 等 J. Med. Chem. 37 :2678-85[1994]);空间可编址的并行固态相或液态相库;需要退褶合的合成库方法;“一珠一化合物”库方法;和使用亲和性色谱法选择的合成库方法。生物库和类肽库途径优选地用于肽库,而其他四种途径可用于肽、非肽寡聚体或化合物的小分子库 (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12 :145)。

[0169] 分子库合成方法的实例可以在本领域中,例如在:DeWitt 等 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 :6909[1993];Erb 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :11422[1994];Zuckermann 等 J. Med. Chem. 37 :2678[1994];Cho 等 Science 261 :1303[1993];Carrell 等 Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33. 2059[1994];Carell 等 Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33 :2061[1994];和 Gallop 等 J. Med. Chem. 37 :1233[1994] 发现。

[0170] 化合物库可以存在于溶液(例如, Houghten, Biotechniques 13 :412-421[1992])

或珠 (Lam, Nature 354:82-84[1991])、片 (Fodor, Nature 364:555-556[1993])、细菌或孢子 (美国专利号 5,223,409,其内容通过引用纳入本文)、质粒 (Cull 等 Proc. Nad. Acad. Sci. USA 89:1865-1869[1992]) 或噬菌体 (Scott 和 Smith, Science 249:386-390[1990];Devlin Science 249:404-406[1990];Cwirla 等 Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382[1990];Felici, J. Mol. Biol. 222:301[1991]) 中。

[0171] 在某些实施方案中,本文所述的标志物用于产生鉴别癌症治疗剂的模型系统。例如,癌症特异性生物标志物的代谢物 (例如,活化细胞增殖的肌氨酸) 能够加入到细胞系中增强细胞系的癌症侵入性。细胞系会具有改善的用于抗癌剂筛选的应答 (例如,‘读出’) 动态范围。当描述体外实例时,模型测定系统可以是在体外、体内或来自体内的。

[0172] 转基因动物

[0173] 本发明考虑到包含外源基因 (例如,从改变的癌症特异性代谢物水平得到的) 的转基因动物的生成。在优选的实施方案中,与野生型动物相比,转基因动物显示出改变的表型 (例如,代谢物的增加或减少)。分析这种表型的存在或缺失的方法包括但不限于那些在本文中公开的内容。在某些优选的实施方案中,转基因动物还显示出增加或减少的肿瘤生长或癌症迹象的发展。

[0174] 本发明的转基因动物用于药物 (例如,癌症治疗药物) 筛选。在某些实施方案中,将测试化合物 (例如,疑似用于治疗癌症的药物) 和对照化合物 (例如,安慰剂) 施用于转基因动物和对照动物,并评估它们的效果。

[0175] 转基因动物能够通过多种方法生成。在某些实施方案中,将不同发育阶段的胚胎细胞用于导入转基因动物产生的转基因。根据胚胎细胞的发育阶段使用不同方法。受精卵是微量注射的最佳靶。在小鼠体内,雄性核的直径达到大概 20 微米的尺寸,允许 1-2 皮升 (p1) DNA 溶液的可重复注射。将受精卵做为基因转移靶使用的主要优势在于,在大多数情况下,注射的 DNA 在第一次裂解前会纳入到宿主基因组内 (Brinster 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442[1985])。结果,转基因非人类动物的所有细胞将携带纳入的转基因。一般地,这还会通过转基因的有效传输反射到创立者的后代中,因为 50% 的生殖细胞将存有转基因。美国专利号 4,873,191 描述了微量注射受精卵的方法。该专利公开的全部内容纳入本文。

[0176] 在其他的实施方案中,使用逆转录病毒感染将转基因导入如非人类动物中。在某些实施方案中,通过将逆转录病毒载体注射到卵母细胞的卵周隙内来使用逆转录病毒载体转染卵母细胞 (美国专利号 6,080,912,其内容通过引用纳入本文)。在其他的实施方案中,发育中的非人类胚胎能够在体外培养成胚泡阶段。在此时期中,卵裂球成为逆转录病毒感染的目标 (Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260[1976])。通过酶处理得到卵裂球的有效感染以移除透明带 (Hogan 等 in Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. [1986])。用于导入转基因的病毒载体系统是典型的携带转基因的复制缺陷逆转录病毒 (Jahner 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927[1985])。通过在产生病毒细胞的单层上培养卵裂球轻易且有效地获得转染 (Stewart, 等 EMBO J., 6:383[1987])。可选地,在后期施行感染。病毒或产生病毒的细胞能够注射到胚泡腔内 (Jahner 等 Nature 298:623[1982])。大多数创立者会成为转基因的嵌合体,因为纳入只在形成转基因动物的细胞子集内产生。此外,创立者可以在基因组的不

同位置含有转基因的多种逆转录病毒嵌入,其一般会在后代中分离。另外,还可能通过妊娠中期胚胎的子宫内逆转录病毒感染将转基因导入入种系中,尽管这是低效率的(Jahner等,如上所述[1982])。本领域已知的使用逆转录病毒或逆转录病毒载体产生转基因动物的其他方法包含逆转录病毒粒子或丝裂霉素C处理细胞(产生逆转录病毒进入受精卵或早期胚胎)的微量注射(PCT国际申请W090/08832[1990],和Haskell和Bowen,Mol. Reprod. Dev., 40 :386[1995])。

[0177] 在其他的实施方案中,将转基因导入入胚胎干细胞内,并使用转染的干细胞形成胚胎。通过在适当的条件下体外培养植入前胚胎获得ES细胞(Evans等Nature 292 :154[1981];Bradley等Nature 309 :255[1984];Gossler等Proc. Acad. Sci. USA 83 :9065[1986];和Robertson等Nature 322 :445[1986])。通过本领域已知的多种方法进行DNA转染使得转基因能够有效导入ES细胞中,这些方法包括磷酸钙共同沉淀、原生质体或原生质球融合、脂质转染和DEAE-葡聚糖介导转染。还可以通过逆转录病毒介导转导或通过微量注射将转基因导入ES细胞中。这种转染的ES细胞在其导入到胚泡阶段胚胎的囊胚腔内以后能够殖民胚胎,并有助于得到的嵌合体动物的种系(参考参见Jaenisch,Science 240 :1468[1988])。在将转染的ES细胞导入到囊胚腔之前,转染的ES细胞可以在多种选择协议下补养ES细胞,假定转基因提供了这种选择的方式,这种ES细胞已经合并了转基因。可选地,可以使用聚合酶链反应筛选已经合并转基因的ES细胞。这种技术消除了在转染的ES细胞转移入囊胚腔前在适当的选择条件下生长的需求。

[0178] 在还其他的实施方案中,使用同源重组敲除基因功能或产生缺失突变体(例如,截断突变体)。同源重组的方法在美国专利号5,614,396中描述,其内容通过引用纳入本文。

具体实施方式

[0179] 提供以下实施例以说明并进一步阐述指定优选的实施方案和本发明的方面,并不旨在限制本发明的范围。

[0180] 实施例1

[0181] 尿液中发现的生物标志物

[0182] 一般方法

[0183] 对前列腺癌的代谢特征的鉴定

[0184] 分析每个样本以确定几百种代谢物的浓度。实用分析技术诸如GC-MS(气相色谱-质谱测定法)和UHPLC-MS(超高效液相色谱-质谱测定法)来分析代谢物。同时并联分析多种等份并在适当的质量管理(QC)后,重组从每个分析中得到的信息。根据最终归结为几百种化学物种的几千种特性给予每个样本特征。使用的技术能够鉴定新的化学上未命名的化合物。

[0185] 统计分析

[0186] 使用t检验分析数据以鉴定分子(已知命名的代谢物或未命名的代谢物),其以不同水平存在于可限定的群体或亚群体(例如,与对照生物学样本相比,前列腺癌生物学样本的生物标志物)中,用于区别可限定群体(例如,前列腺癌和对照,低级前列腺癌和高级前列腺癌)。也鉴定在可限定群体或亚群体中的其他分子(已知命名的代谢物或未命名的

代谢物)。在某些分析中,根据样本中的肌酐水平标准化数据,而在其他分析中未标准化样本。两种分析的结果都包括在内。

[0187] 生物标志物的鉴定

[0188] 在分析(例如 GC-MS、UHPLC-MS、MS-MS)中鉴定的不同峰值包括那些鉴定为统计性显著的峰值进行以化学鉴定过程为基础的质谱测定法。通过(1)分析来自不同组人类受试者的尿液样本以确定样本中代谢物的水平,然后(2)统计性分析结果以确定在两组中差别存在的那些代谢物来发现生物标志物。

[0189] 区分癌症和非癌症的生物标志物:

[0190] 用于分析的尿液样本来自 51 个具有前列腺癌阴性活检的对照个体和 59 个罹患前列腺癌的个体。在确定代谢物的水平后,使用 Wilcoxon 检验分析数据以确定在两个群体(例如,前列腺癌 vs. 对照)中代谢物平均水平的不同。

[0191] 如下表 1 所列出的,发现了从罹患前列腺癌的受试者和具有前列腺活检(例如,未诊断出前列腺癌)的受试者中取得的血浆样本中差别存在的生物标志物。

[0192] 针对每个列出的生物标志物,表 1 包括在与生物标志物相关数据的统计分析中确定的 p 值、用于追踪化学数据库和分析平台中的化合物的化合物 ID,其用于鉴别化合物(GC 是指 GC/MS,而且 LC 是指 UHPLC/MS/MS2)。以 0.000 列出的 P 值在 $p < 0.0001$ 处是显著的。LC 阳和 LC 阴是指使用缓冲液和分别检测阳性离子或阴性离子的优化的参数的 UHPLC 离析。

[0193] 表 1. 用于区别癌症和非癌症的生物标志物。

[0194]

化 合 物 ID	化合物	LIB_I D	P 值	PCA 中的 变化%
34404	1,3-7-三甲基尿酸	LC 阴	0.0457	-61.6700
32391	1,3-二甲基尿酸盐	GC	0.0188	264.8018
34400	1-7-二甲基尿酸盐	LC 阴	0.0442	-55.8508
15650	1-甲基腺苷	LC 阳	0.0156	61.7971
31609	1-甲基鸟苷	LC 阳	0.0181	10.9223
34395	1-甲基尿酸盐	LC 阳	0.047	-30.4105
22030	2-羟基异丁酸盐	GC	0.0039	62.9593
1432	2-羟基苯乙酸甲酯	LC 阴	0.0344	59.6277
32776	2-甲基丁酰肉碱-	LC 阳	0.0444	72.8112
1431	3-(4-羟基苯基)乳酸	GC	0.003	33.8077
18296	3-4-二羟基苯乙酸甲酯	GC	0.001	147.8039
1566	3-氨基-异丁酸	GC	0.0167	272.4645
32654	3-脱氢肉碱-	LC 阳	0.0188	56.2816
32397	3-羟基-2-丙酸乙酯	GC	0.0477	40.3754

[0195]

531	3-羟基-3-甲基戊二酸	GC	4.03E-05	37.8097
15673	3-羟苯酸酯	LC 阴	3.00E-04	196.7772
12017	3-甲氧基酪氨酸	LC 阳	0.0069	95.6504
31940	3-甲基巴豆酰甘氨酸	LC 阳	0.0102	62.5089
1557	3-甲基戊二酸	GC	0.0134	36.0177
15677	3-甲基组氨酸	LC 阴	0.0203	-42.0713
3155	3-脲基丙酸	LC 阳	0.0056	68.9399
1558	4-乙酰氨基丁酸	LC 阳	0.0143	77.3732
22115	4-乙酰苯基-硫酸	LC 阴	0.0467	100.8052
21133	4-羟苯酸酯	GC	0.0049	62.6825
1568	4-羟基扁桃酸	GC	0.0091	120.1023
541	4-羟苯基乙酸	GC	0.0036	85.2767
22118	4-脲基丁酸盐	LC 阳	0.0134	67.8751
1418	5,6-二氢胸腺嘧啶	GC	0.0057	140.1535
1559	5,6-二氢尿嘧啶	GC	0.004	80.4881
437	5-羟吡啶乙酸	GC	1.00E-04	61.2357
1419	5-甲硫腺苷(MTA)	LC 阳	5.00E-04	20.5901
1494	5-氧脯氨酸	LC 阳	0.0047	17.9299
31580	7-甲基鸟苷	GC	1.00E-04	75.7087
554	腺嘌呤	GC	1.00E-04	46.4734
555	腺苷	LC 阳	0.0011	30.8684
2831	腺苷-3',5'-环单磷酸(cAMP)	LC 阳	0.0038	75.5601
1126	丙氨酸 QUM	GC	0.0419	66.0477
22808	尿囊素	GC	0.0085	47.1337
15142	别苏氨酸	GC	0.0148	198.5838

[0196]

31591	硫酸雄酮	LC 阴	0.016	96.0684
575	阿拉伯糖	GC	2.00E-04	67.9778
15964	阿糖醇	GC	7.00E-04	46.2583
1640	抗坏血酸(维生素 C)	GC	0.0327	55.6234
18362	壬二酸盐(壬二酸)	LC 阴	0.0478	118.3270
3141	内铵盐	LC 阳	0.0093	91.2635
569	咖啡因	LC 阳	0.0179	-70.6204
15506	胆碱	LC 阳	0.0016	45.0093
12025	顺乌头酸	LC 阳	0.0364	22.2510
22158	柠平酸	GC	4.00E-04	59.4381
1564	柠檬酸	GC	0.0019	139.2617
2132	瓜氨酸	GC	4.00E-04	93.6606
27718	肌酸	LC 阳	4.00E-04	43.7043
20700	氰尿酸	GC	0.0139	0.0000
31454	胱氨酸	GC	0.0026	170.2201
32425	脱氢表雄酮硫酸(DHEA-S)	LC 阴	0.0291	162.9464
15743	二甲基精氨酸	LC 阳	2.00E-04	42.3710
5086	二甲基甘氨酸	GC	0.0294	105.5877
32511	乙二胺四乙酸 (EDTA)	LC 阴	0.005	-10.4294
20699	赤藓糖醇	GC	2.45E-05	54.8561
33477	赤藓糖酸	GC	3.10E-05	34.5359
577	果糖	GC	0.0373	152.8917
1643	延胡索酸	GC	3.81E-05	61.1976
1117	半乳糖醇-卫矛醇-	GC	0.049	-30.9639
34456	γ -谷氨酰异亮氨酸	LC 阳	0.0032	12.7695

[0197]

18369	γ -谷氨酰亮氨酸	LC 阳	5.00E-04	202.0740
33422	γ 谷氨酰苯丙氨酸	LC 阳	0.0013	170.8455
2734	γ -谷氨酰酪氨酸	LC 阳	6.00E-04	199.6524
18280	龙胆酸盐	LC 阴	0.0254	84.1857
1476	葡萄糖二酸盐(糖酸盐)	GC	0.0163	93.0656
587	葡糖酸	GC	1.00E-04	49.6957
18534	葡糖胺	GC	1.00E-04	56.1753
20488	葡萄糖	GC	1.00E-04	57.0890
15443	葡糖栓酸	GC	6.00E-04	49.1315
57	谷氨酸	GC	0.0332	15.2177
32393	谷氨酰缬氨酸	LC 阳	7.00E-04	82.6082
15990	甘油磷酰胆碱(GPC)	LC 阳	0.0092	22.5740
11777	甘氨酸 QUM	GC	0.01	47.6937
15737	羧乙酸(羧乙酸)	GC	0.0125	115.3677
22171	甘氨酰脯氨酸	LC 阳	0.0156	64.5671
12359	胍基乙酸盐	GC	3.00E-04	186.4843
418	鸟嘌呤	GC	0.0129	80.4718
33454	古洛糖酸-1-4-内酯	GC	5.00E-04	39.8172
15753	马尿酸盐	LC 阳	0.032	50.4495
1101	高香兰酸(HVA)	GC	0.0044	34.8863
3127	次黄嘌呤	LC 阳	0.0266	25.2729
15716	咪唑乳酸	LC 阳	4.00E-04	47.0735
33846	吲哚乙酸	LC 阳	0.0345	88.8776
18349	吲哚乳酸	GC	0.0038	132.9586
33441	异丁酰肉碱	LC 阳	0.0017	75.8028

[0198]

1125	异亮氨酸	LC 阳	0.0036	27.0710
34407	异戊酰肉碱	LC 阳	0.0046	42.2654
1417	犬尿喹啉酸	LC 阴	0.025	39.6023
15140	犬尿氨酸	LC 阳	0.0095	141.9643
11454	乳糖	GC	0.0075	125.7434
60	亮氨酸	LC 阳	0.0088	26.6660
584	甘露糖	GC	0.0294	177.4984
18493	中康酸盐(甲基延胡索酸)	GC	0.008	85.1195
1302	甲硫氨酸	GC	0.002	64.4250
34285	单乙醇胺	GC	0.0024	52.3196
33953	正乙酰精氨酸	LC 阴	0.0014	116.6228
33942	正乙酰天冬酰胺	LC 阳	0.0134	79.3354
32195	正乙酰天冬氨酸(NAA)	GC	0.0011	69.7707
15720	正乙酰谷氨酸	LC 阳	0.009	41.1751
33943	正乙酰谷酰胺	LC 阴	0.0294	65.6816
33946	正乙酰组氨酸	LC 阴	0.0046	81.9682
33967	正乙酰异亮氨酸	LC 阳	0.0055	36.8144
1587	正乙酰亮氨酸	LC 阳	0.0042	107.1016
1592	正乙酰神经氨酸	GC	0.0028	149.4873
33950	正乙酰苯丙氨酸	LC 阳	0.0012	76.0267
33939	正乙酰苏氨酸	LC 阳	0.026	89.8599
32390	正乙酰酪氨酸	LC 阳	3.00E-04	148.0601
1591	正乙酰缬氨酸	GC	0.0035	148.2682
31850	正丁酰甘氨酸	LC 阴	0.0356	46.9738
1598	正巴豆酰甘氨酸	LC 阳	0.0186	36.7886

[0199]

33936	辛酰肉碱	LC 阳	0.0063	32.2576
1505	乳清酸盐	GC	1.00E-04	57.3419
32558	对甲酚硫酸	LC 阴	0.0203	67.1842
32718	苯乙酰谷酰胺-	LC 阳	0.0177	42.1472
33945	苯乙酰甘氨酸	LC 阳	0.0049	102.7455
64	苯丙氨酸	LC 阳	0.0137	70.3716
11438	磷酸盐	GC	0.0112	66.4883
1512	吡啶甲酸	GC	0.0401	23.7291
1898	脯氨酸	GC	0.0084	49.8421
33442	假尿苷	LC 阳	0.0069	18.3476
1651	吡哆醛	LC 阳	0.0212	77.6885
599	丙酮酸盐	GC	0.0104	68.1170
18335	奎尼酸	GC	0.0412	40.7535
1899	喹啉酸	LC 阳	0.0068	81.2769
27731	核糖酸	GC	4.00E-04	61.5332
15948	S-腺苷高半胱氨酸(SAH)	LC 阳	0.0108	84.3170
1516	肌氨酸 QUM	GC	0.0073	103.7037
32379	鲨肌醇	GC	0.0435	154.8068
1648	丝氨酸	GC	3.00E-04	49.1580
485	牙精胺	LC 阳	0.0459	-81.3755
2125	牛胆碱	GC	0.0334	172.8511
12360	四氢生物蝶呤	GC	0.0116	69.2047
27738	苏糖酸	GC	0.0012	51.7428
1284	苏氨酸	GC	0.0056	139.5883
604	胸腺嘧啶	GC	0.0034	161.2888

[0200]

6104	色胺	LC 阳	0.0372	62.1316
54	色氨酸	LC 阳	0.0091	70.7395
1603	酪胺	LC 阳	0.0493	35.8870
1299	酪氨酸	GC	0.0011	58.4261
605	尿嘧啶	GC	0.0015	129.5276
607	尿刊酸酯	LC 阳	0.0072	68.0070
34406	戊酰肉碱	LC 阳	0.0306	120.0406
1649	缬氨酸	LC 阳	2.00E-04	54.9329
1567	香草基扁桃酸-VMA-	LC 阴	0.0443	49.0489
3147	黄嘌呤	LC 阳	0.0331	44.5844
15136	黄苷	LC 阳	0.0156	85.5165
15679	黄尿酸	LC 阳	0.0077	27.7713
15835	木糖	GC	0.0137	81.6462
32735	X-01911_200	LC 阳	0.0143	234.5459
33009	X-01981_200	LC 阳	0.0017	48.0588
32550	X-02272_201	LC 阴	0.0247	51.0244
32672	X-02546_200	LC 阳	5.00E-04	79.4250
32709	X-03056_200	LC 阳	0.0142	15.1147
32653	X-03249_200	LC 阳	0.0051	100.7635
32675	X-03951_200	LC 阳	6.00E-04	22.8452
32937	X-03951_201	LC 阴	4.00E-04	27.1295
32557	X-06126_201	LC 阴	0.023	106.4585
24332	X-10128	GC	2.00E-04	52.5090
24469	X-10266	GC	0.0032	38.3625
25401	X-10359	GC	0.0024	33.6027

[0201]

25402	X-10360	GC	0.0262	44.6591
25449	X-10385	GC	0.0136	49.8885
25607	X-10437	GC	0.0474	86.7596
33014	X-10457_200	LC 阳	0.0476	22.6361
27883	X-10604	GC	0.0077	43.5902
27884	X-10605	GC	3.00E-04	40.8850
30275	X-10738	GC	0.0049	55.5093
30276	X-10739	GC	0.0034	82.2508
31022	X-10831	GC	7.00E-04	67.9439
31041	X-10835	GC	0.0051	108.0205
31053	X-10841	GC	0.007	66.8101
31203	X-10850	GC	0.0224	96.3934
31489	X-10914	GC	0.0041	33.6270
31750	X-11011	GC	1.00E-04	51.1781
31751	X-11012	GC	1.00E-04	42.1647
31754	X-11015	GC	0.002	43.7399
31757	X-11018	GC	0.0188	209.6372
32026	X-11072	GC	0.038	167.5549
32120	X-11096	GC	0.0025	258.5659
32127	X-11103	GC	0.026	288.9233
32562	X-11245	LC 阴	0.0419	116.4416
32578	X-11261	LC 阳	0.0357	53.5881
32599	X-11282	LC 阴	0.0211	124.6693
32649	X-11332	LC 阳	0.0303	-41.3196
32650	X-11333	LC 阳	0.0359	53.6853

[0202]

32664	X-11347	LC 阳	1.00E-04	30.8069
32665	X-11348_200	LC 阳	6.00E-04	37.7556
32669	X-11352	LC 阳	0.0163	51.3693
32674	X-11357	LC 阳	0.0314	55.2106
32714	X-11397	LC 阳	0.038	126.7154
32738	X-11421	LC 阳	0.0318	69.8841
32740	X-11423	LC 阴	0.0151	15.7989
32761	X-11444	LC 阴	3.00E-04	33.3214
32767	X-11450	LC 阴	0.0461	86.9345
32769	X-11452	LC 阴	0.0055	95.2700
32781	X-11464	LC 阳	0.0435	53.2915
32787	X-11470	LC 阴	0.027	13.3518
32792	X-11475	LC 阴	0.0032	292.2009
32807	X-11490	LC 阴	0.0092	91.7365
32881	X-11564	LC 阴	8.00E-04	31.9184
32910	X-11593	LC 阴	0.0435	45.1354
32957	X-11640	LC 阴	0.0209	111.1731
32996	X-11668	LC 阴	0.0196	39.8008
33031	X-11687	LC 阳	0.0016	27.7502
33033	X-11689	LC 阳	0.0199	46.8620
33090	X-11745	GC	0.0318	35.4414
33094	X-11749	GC	0.0082	63.4649
33100	X-11755	GC	0.0023	48.7368
33103	X-11758	GC	0.0157	30.5194
33106	X-11761	GC	0.0034	61.6069

[0203]

33127	X-11782	GC	0.0083	314.9654
33171	X-11826	LC 阴	0.0042	178.7640
33188	X-11843	LC 阴	0.0076	460.0511
33195	X-11850	LC 阴	0.0394	210.3870
33280	X-11935	LC 阳	0.0016	19.1957
33281	X-11936	LC 阳	0.0151	12.3351
33290	X-11945	LC 阳	0.0012	32.5289
33291	X-11946	LC 阳	0.0439	90.4452
33325	X-11979	LC 阳	0.0052	22.8598
33347	X-12001	LC 阴	0.0019	170.7811
33352	X-12006	LC 阴	2.00E-04	25.9733
33356	X-12010	LC 阴	0.0078	72.4838
33359	X-12013	LC 阴	0.022	405.5324
33393	X-12042	LC 阴	0.0095	93.4761
33398	X-12047	LC 阳	0.0046	48.5667
33405	X-12053	LC 阳	0.0276	70.0004
33511	X-12096	LC 阳	0.0266	38.6810
33512	X-12097	LC 阳	0.0333	58.4217
33514	X-12099	LC 阳	0.0072	47.4618
33515	X-12100	LC 阳	0.0089	21.6757
33516	X-12101	LC 阳	1.00E-04	83.2818
33519	X-12104	LC 阳	0.0177	11.4120
33523	X-12108	LC 阳	0.026	44.2185
33528	X-12113	LC 阳	0.025	146.1043
33532	X-12117	LC 阳	0.0483	21.8348

[0204]

33537	X-12122	LC 阳	0.0029	66.5031
33539	X-12124	LC 阳	9.00E-04	29.0229
33542	X-12127	LC 阳	0.0068	123.3782
33543	X-12128	LC 阳	0.0167	43.0535
33546	X-12131	LC 阳	0.0086	0.0000
33590	X-12170_200	LC 阳	0.003	23.1150
33594	X-12173	LC 阳	0.0417	-52.8764
33609	X-12188	LC 阴	0.0277	80.8620
33614	X-12193	LC 阳	0.0114	140.4048
33620	X-12199	LC 阳	0.0109	195.2826
33627	X-12206	LC 阴	0.0095	15.5730
33632	X-12211	LC 阴	0.0038	217.1225
33633	X-12212	LC 阴	0.0361	220.1253
33638	X-12217	LC 阴	0.0266	42.5603
33646	X-12225	LC 阳	6.00E-04	20.7575
33658	X-12236	LC 阴	0.0258	109.4350
33669	X-12247	LC 阴	0.0156	38.0283
33676	X-12254	LC 阴	0.0315	229.5867
33683	X-12261	LC 阴	0.0224	215.2098
33704	X-12282	LC 阳	0.0032	78.5452
33728	X-12306	LC 阴	0.0356	115.0007
33745	X-12323	LC 阴	0.0191	36.7940
33764	X-12339	LC 阳	0.023	50.4166
33765	X-12340	LC 阳	0.0386	131.2436
33786	X-12358	LC 阳	0.0019	39.9305

[0205]

33787	X-12359	LC 阳	0.0022	108.4776
33792	X-12364	LC 阳	0.015	52.5728
33804	X-12376	LC 阳	0.0037	52.2176
33807	X-12379	LC 阳	0.0335	84.0021
33814	X-12386	LC 阴	0.0028	79.8037
33835	X-12407	LC 阴	0.0419	102.2921
33839	X-12411	LC 阴	0.0469	181.1927
33903	X-12458	LC 阳	0.0454	3.8204
34041	X-12511	LC 阳	0.014	67.0961
34094	X-12534	GC	0.0114	23.0764
34123	X-12556	GC	0.0014	38.9741
34124	X-12557	GC	0.0069	133.5437
34137	X-12570	GC	6.00E-04	23.4172
34146	X-12579	GC	0.0166	36.6870
34197	X-12603	LC 阴	0.0486	93.9915
34200	X-12606	LC 阴	0.0239	84.7583
34205	X-12611	LC 阳	0.0024	36.6540
34206	X-12612	LC 阳	0.0403	100.6866
34223	X-12629	LC 阳	0.0228	64.2063
34229	X-12632	LC 阳	0.0345	65.5474
34231	X-12634	LC 阳	0.0339	74.2212
34235	X-12636	LC 阳	0.0113	30.6322
34253	X-12650	LC 阳	0.0228	70.5815
34268	X-12663	GC	0.0186	149.0884
34289	X-12680	LC 阳	0.0249	116.7362

[0206]

34290	X-12681	LC 阳	0.0345	53.3469
34291	X-12682	LC 阳	0.0266	25.1312
34292	X-12683	LC 阳	0.0025	36.9150
34294	X-12685	LC 阳	0.0474	70.8178
34295	X-12686	LC 阳	0.0052	15.6282
34297	X-12688	LC 阳	0.0029	124.9182
34298	X-12689	LC 阳	0.0256	20.8243
34299	X-12690	LC 阳	0.0019	16.8796
34300	X-12691	LC 阳	0.016	81.0894
34304	X-12694	LC 阴	0.0292	30.3117
34305	X-12695	LC 阴	0.0083	51.2191
34310	X-12700	LC 阴	0.005	85.1265
34311	X-12701	LC 阴	0.0451	63.6861
34314	X-12704	LC 阴	0.0252	243.6844
34316	X-12706	LC 阴	0.0413	156.8494
34318	X-12708	LC 阴	0.015	79.9730
34322	X-12712	LC 阴	0.0487	79.2438
34325	X-12715	LC 阴	0.0049	55.2094
34327	X-12717	LC 阴	0.012	203.4073
34336	X-12726	LC 阴	0.0146	66.2239
34339	X-12729	LC 阴	0.0299	117.3626
34343	X-12733	LC 阴	0.0108	43.8603
34349	X-12739	LC 阴	0.0014	89.0934
34350	X-12740	LC 阴	0.0282	405.1284
34352	X-12742	LC 阴	0.0199	70.2457

[0207]

34353	X-12743	LC 阴	6.38E-06	70.0243
34355	X-12745	LC 阴	0.0045	1230.4546
34358	X-12748	LC 阳	1.09E-05	68.9382
34359	X-12749	LC 阳	0.0196	14.6434
34360	X-12750	LC 阳	0.0452	34.9301
34362	X-12752	LC 阳	0.002	28.4767
34370	X-12760	LC 阳	0.007	41.6076
34375	X-12765	LC 阳	0.0016	57.1255
34485	X-12802	LC 阳	0.0031	47.2186
34497	X-12814	LC 阴	0.0349	216.9783
34498	X-12815	LC 阴	0.0497	98.1436
34503	X-12820	LC 阴	0.0467	348.8805
34505	X-12822	LC 阴	0.012	64.5382
34511	X-12828	LC 阴	0.0107	74.3241
34524	X-12841	LC 阴	0.0049	165.1258
34526	X-12843	LC 阴	0.0018	432.1185
34527	X-12844	LC 阴	0.0029	30.9475
34528	X-12845	LC 阴	0.0161	162.3770
34529	X-12846	LC 阴	0.0306	27.5410
34530	X-12847	LC 阴	0.0306	254.3334
34531	X-12848	LC 阴	0.0147	259.3802
34532	X-12849	LC 阴	0.022	232.6990
34533	X-12850	LC 阴	0.0106	152.3123
12603	X-2980	GC	0.0435	150.0623
12770	X-3090	GC	0.047	49.3716

[0208]

16062	X-4015	GC	5.00E-04	97.5835
16821	X-4498	GC	5.00E-04	59.0953
16822	X-4499	GC	2.00E-04	65.9952
16829	X-4503	GC	0.0389	448.9493
16831	X-4504	GC	0.0017	34.7506
16837	X-4507	GC	0.0104	33.7584
16866	X-4523	GC	2.00E-04	163.4988
16984	X-4599	GC	0.0033	76.7293
17050	X-4618	GC	0.0085	32.9874
17064	X-4624	GC	0.0052	55.2961
17072	X-4628	GC	0.0075	272.1564
17074	X-4629	GC	1.00E-04	57.5233
17086	X-4637	GC	6.00E-04	181.6876
17088	X-4639	GC	0.0064	88.5308
18232	X-5403	GC	0.0032	32.1164
18251	X-5409	GC	0.0042	39.1551
18253	X-5410	GC	0.017	355.5448
18257	X-5412	GC	0.0104	48.5322
18264	X-5414	GC	0.0032	135.2663
18265	X-5415	GC	0.0171	40.2508
18271	X-5418	GC	3.00E-04	65.0484
18272	X-5419	GC	0.0082	49.3174
18273	X-5420	GC	2.00E-04	50.7034
18307	X-5431	GC	0.0046	267.5213
18309	X-5433	GC	0.0094	131.5460

[0209]

18316	X-5437	GC	0.0075	142.7695
18388	X-5491	GC	4.19E-05	58.3225
18390	X-5492	GC	8.00E-04	46.4359
18419	X-5506	GC	0.027	65.4907
18430	X-5511	GC	0.0199	107.8683
18438	X-5518	GC	0.0117	1692.6298
18442	X-5522	GC	0.002	45.8239
19954	X-6906	GC	1.00E-04	34.3189
19960	X-6912	GC	0.0031	36.2744
19965	X-6928	GC	0.0191	38.2332
19969	X-6931	GC	0.0136	225.7159
19973	X-6946	GC	0.003	126.2096
19984	X-6956	GC	4.00E-04	77.8832
19990	X-6962	GC	0.0149	42.7975
19997	X-6969	GC	0.0037	545.8663
20014	X-6985	GC	0.0474	106.4077
20020	X-6991	GC	0.015	49.2941
22308	X-8886	GC	0.0452	118.3757
22494	X-8994	GC	0.017	567.8661
22548	X-9026	GC	0.002	125.0265
22570	X-9033	GC	0.0329	85.2545
22881	X-9287	GC	0.0101	85.5217
24074	X-9706	GC	0.0042	46.6887
24076	X-9726	GC	0.0331	50.6677

[0210] 使用生物标志物肌氨酸和正乙酰酪氨酸确定单个受试者的癌症状态（例如，非癌症或癌症）。使用这两种标志物合并得到 83% 敏感度和 49% 特异性的癌症诊断结果。假定在 PSA 阳性群体中有 30% 的癌症患病率，这些生物标志物提供 87% 的阴性预测值 (NPV) 和 41% 的阳性预测值 (PPV)。

[0211] 区别较低侵入性癌症和较高侵入性癌症的生物标志物：

[0212] 用于分析的尿液样本从诊断出前列腺癌的个体中获得,其活检分数为GS严重3或GS严重4及以上。GS严重3表示具有典型较低侵入性的低级癌症,而GS严重4表示具有典型较高侵入性的高级癌症。在分析中,GS严重3受试者(N = 45)与GS严重4(N = 13)受试者比较。在确定代谢物的水平后,使用Wilcoxon检验分析数据以确定两种群体(例如,前列腺癌 vs. 对照)中代谢物平均水平的不同。

[0213] 如下表2中所列出的,发现了从较低侵入性/低级前列腺癌受试者和较高侵入性/高级前列腺癌受试者体内获得的尿液样本差别存在的生物标志物。

[0214] 针对每个列出的生物标志物,表2包括在与生物标志物相关数据的统计分析中确定的p值、用于追踪化学数据库和分析平台中的化合物的化合物ID,其用于鉴别化合物(GC是指GC/MS,而且LC是指UHPLC/MS/MS2)。以0.000列出的P值在 $p < 0.0001$ 处是显著的。LC阳和LC阴是指使用缓冲液和分别检测阳性离子或阴性离子的优化的参数的UHPLC离析。

[0215] 表2. 区分较低侵入性和较高侵入性的前列腺癌的生物标志物。

[0216]

化合物 ID	化合物	平台	P 值	侵入性 PCA 的变化%
34404	1,3-7-三甲基尿酸	LC 阴	0.0057	-66.55113998
34400	1-7-二甲基尿酸盐	LC 阴	0.001	-62.28917254
15650	1-甲基腺苷	LC 阳	0.0254	43.02217774
34395	1-甲基尿酸盐	LC 阳	4.00E-04	-49.79665561

[0217]

34389	1-甲基黄嘌呤	LC 阳	0.0138	-67.90592259
15667	2-异丙基苹果酸	LC 阴	0.0469	166.2876883
18296	3-4-二羟基苯乙酸	GC	0.0014	123.2216303
27672	3-硫酸吲哚酚	LC 阴	0.0138	-23.7469546
12017	3-甲氧基酪氨酸	LC 阳	0.0113	86.24357623
15677	3-甲基组氨酸	LC 阴	0.0059	102.3968054
32445	3-甲基黄嘌呤	LC 阳	0.0132	-72.50497601
3155	3-脲基丙酸	LC 阳	0.022	27.56547555
1558	4-乙酰氨基丁酸	LC 阳	0.0166	59.98174305
15681	4-胍丁酸	LC 阳	0.0297	174.6765122
21133	4-羟基苯酸酯	GC	0.01	71.09064956
1568	4-羟基扁桃酸	GC	0.0208	89.80468995
22118	4-脲基丁酸	LC 阳	0.017	60.30878737
437	5-羟吲哚乙酸	GC	0.0226	84.94805375
1494	5-氧脯氨酸	LC 阳	0.0056	-29.70497615
31580	7-甲基鸟苷	GC	0.0347	84.95194026
555	腺苷	LC 阳	0.0111	79.86819651
2831	腺苷 -3',5'- 环单磷酸 (cAMP)	LC 阳	0.0136	53.42430461
15142	别苏氨酸	GC	5.00E-04	307.6014316
575	阿拉伯糖	GC	0.0079	148.4557
15964	阿糖醇	GC	0.0441	98.60829547
1640	抗坏血酸(维生素 C)	GC	0.045	175.9986664
18362	壬二酸盐(壬二酸)	LC 阴	0.0186	207.3082051
3141	内铵盐 QUM	LC 阳	0.0019	111.1077205

[0218]

569	咖啡因	LC 阳	0.0075	-81.71522011
12025	顺乌头酸	LC 阳	0.0369	-25.83372809
1564	柠檬酸	GC	0.0153	159.3164801
27718	肌酸	LC 阳	0.0062	239.6294824
513	肌酐	LC 阳	0.0291	77.95100223
32425	脱氢表雄酮硫酸(DHEA-S)	LC 阴	0.0272	153.7895042
5086	二甲基甘氨酸	GC	0.0084	89.87003058
1643	延胡索酸	GC	0.023	-27.15601216
1117	半乳糖醇-卫矛醇-	GC	0.0036	352.7349757
34456	γ -谷氨酰异亮氨酸*	LC 阳	0.0198	83.47303345
18369	γ -谷氨酰亮氨酸	LC 阳	8.00E-04	100.8835487
33422	γ 谷氨酰苯丙氨酸	LC 阳	8.00E-04	116.4623197
2734	γ -谷氨酰酪氨酸	LC 阳	0.0018	199.6523546
1476	葡萄糖二酸盐(糖酸盐)	GC	0.0413	78.73546464
587	葡糖酸	GC	0.0337	135.3595762
15443	普糖醛酸	GC	0.048	79.98123372
32393	谷氨酰缬氨酸	LC 阳	0.005	53.61399238
15365	甘油-3-磷酸(G3P)	GC	0.0095	96.65755153
15990	甘油磷酰胆碱(GPC)	LC 阳	0.043	-30.99560024
11777	甘氨酸	GC	0.0047	51.51603573
15737	羧乙酸盐(羧乙酸)	GC	0.0219	103.7720467
22171	甘氨酰脯氨酸	LC 阳	0.0081	81.31832313
12359	胍乙酸盐	GC	0.0015	163.1261154
33454	古洛糖酸-1-4-内酯	GC	0.0413	61.59491649

[0219]

1101	高香兰酸(HVA)	GC	0.0081	87.32242401
21025	亚氨基二乙酸盐-IDA-	GC	0.021	44.48398584
33846	吡啶乙酸	LC 阳	0.0362	105.8783175
18349	吡啶乳酸	GC	0.0332	101.7860312
33441	异丁酰肉碱	LC 阳	0.0279	55.35226019
12110	异柠檬酸盐	LC 阳	0.0422	-41.41198939
1125	异亮氨酸	LC 阳	0.0208	54.70179416
15140	犬尿氨酸	LC 阳	0.0191	132.392076
527	乳酸	GC	0.0337	-29.28603115
11454	乳糖	GC	0.0117	108.8417975
60	亮氨酸	LC 阳	0.0332	44.16653491
584	甘露糖	GC	0.0158	108.0495974
18493	中康酸盐(甲基延胡索酸)	GC	0.0452	-48.02028356
1302	甲硫氨酸	GC	0.01	93.23111101
34285	单乙醇胺	GC	0.0363	159.4495524
33953	正乙酰精氨酸	LC 阴	0.0317	85.9617038
32195	正乙酰天冬氨酸(NAA)	GC	0.0379	94.62417064
33946	正乙酰组氨酸	LC 阴	0.0058	59.11465726
1587	正乙酰亮氨酸	LC 阳	0.0227	85.37871881
33950	正乙酰苯丙氨酸	LC 阳	0.0095	66.64423652
33939	正乙酰苏氨酸	LC 阳	0.0332	78.16412969
32390	正乙酰酪氨酸	LC 阳	0.0057	133.7952527
1591	正乙酰缬氨酸	GC	0.0463	66.01491718
18254	副黄嘌呤	LC 阳	0.0219	-63.90495686
33945	苯乙酰甘氨酸	LC 阳	0.006	90.17463794

[0220]

64	苯丙氨酸	LC 阳	0.0254	57.32016167
33442	假尿苷	LC 阳	0.0231	54.52078056
1651	吡哆醛	LC 阳	0.0268	54.86441025
599	丙酮酸盐	GC	0.0071	62.1494331
1899	喹啉酸	LC 阳	0.006	61.91679621
27731	核糖酸	GC	0.0394	100.3888599
15948	S-腺苷高半胱氨酸(SAH)	LC 阳	0.0344	62.81234124
1516	肌氨酸	GC	0.0021	89.65517241
1648	丝氨酸	GC	0.0337	80.59915169
603	精胺	LC 阳	0.0247	-78.26667362
18392	可可碱	LC 阳	0.0165	-80.1429027
27738	苏糖酸	GC	0.0396	94.31081416
1284	苏氨酸	GC	0.0118	77.88106938
604	胸腺嘧啶	GC	0.0157	71.13143504
54	色氨酸	LC 阳	0.0162	80.30828074
1299	酪氨酸	GC	0.008	99.33740457
605	尿嘧啶	GC	0.0318	75.86987921
32701	尿酸-	LC 阳	0.0482	-49.86065084
607	尿刊酸酯	LC 阳	0.0219	55.53807526
1649	缬氨酸	LC 阳	0.0266	132.4327688
15835	木糖	GC	0.0219	79.58039821
32672	X-02546_200	LC 阳	0.0124	39.92995063
32653	X-03249_200	LC 阳	0.0347	50.52155844
32675	X-03951_200	LC 阳	0.0461	77.31945011
32937	X-03951_201	LC 阴	0.0404	84.92252578

[0221]

24469	X-10266	GC	0.0276	73.92296217
25402	X-10360	GC	0.0347	79.71371779
33014	X-10457_200	LC 阳	0.0369	26.87901527
27884	X-10605	GC	0.0379	117.0583917
31751	X-11012	GC	0.0266	126.3470402
31754	X-11015	GC	0.0396	60.66427028
32026	X-11072	GC	0.0204	111.0816308
32120	X-11096	GC	0.002	246.5355958
32562	X-11245	LC 阴	0.022	147.5795427
32631	X-11314	LC 阳	0.0347	-38.84300738
32649	X-11332	LC 阳	0.0059	104.0484707
32651	X-11334	LC 阳	0.0321	69.54121645
32652	X-11335	LC 阳	0.0379	65.56679429
32665	X-11348_200	LC 阳	0.0369	71.33451227
32714	X-11397	LC 阳	0.0277	-67.48708723
32754	X-11437	LC 阴	0.0047	1257.122467
32767	X-11450	LC 阴	0.0363	79.38640823
32792	X-11475	LC 阴	0.0031	366.4908828
32807	X-11490	LC 阴	0.0466	84.13891831
32827	X-11510	LC 阴	0.015	137.5062988
32878	X-11561	LC 阴	0.0347	39.08827189
32978	X-11656	LC 阳	0.045	-55.75256194
33171	X-11826	LC 阴	0.0064	144.2554847
33280	X-11935	LC 阳	0.0293	61.44828759
33281	X-11936	LC 阳	0.0266	53.18088504

[0222]

33290	X-11945	LC 阳	0.0461	51.88262935
33291	X-11946	LC 阳	0.0433	57.82662663
33295	X-11949	LC 阳	0.0321	-26.25001217
33325	X-11979	LC 阳	0.0278	48.01647625
33352	X-12006	LC 阴	0.0304	73.56750455
33356	X-12010	LC 阴	0.0083	233.0064131
33361	X-12015	LC 阴	0.0158	106.0732039
33393	X-12042	LC 阴	0.0173	74.91590711
33398	X-12047	LC 阳	0.0219	55.34246459
33514	X-12099	LC 阳	0.0129	47.01102723
33516	X-12101	LC 阳	0.0103	-36.00760478
33530	X-12115	LC 阳	0.0441	-33.02940864
33537	X-12122	LC 阳	0.0253	49.52870476
33539	X-12124	LC 阳	0.0347	46.14882349
33542	X-12127	LC 阳	0.0254	89.89660466
33543	X-12128	LC 阳	0.0034	-55.28552444
33609	X-12188	LC 阴	0.0071	-77.72107587
33614	X-12193	LC 阳	0.0063	116.7744629
33620	X-12199	LC 阳	0.0254	161.7656256
33632	X-12211	LC 阴	0.0216	203.3196007
33633	X-12212	LC 阴	0.033	280.5910199
33637	X-12216	LC 阴	0.0118	-52.22252608
33638	X-12217	LC 阴	0.0482	-39.44206727
33646	X-12225	LC 阳	0.0075	59.98551337
33665	X-12243	LC 阳	0.0253	-47.60623384

[0223]

33676	X-12254	LC 阴	0.0191	415.8798474
33704	X-12282	LC 阳	0.0059	58.42472716
33764	X-12339	LC 阳	0.0413	40.70759506
33774	X-12349	LC 阴	0.0198	-25.18575014
33787	X-12359	LC 阳	0.0111	93.83073384
33804	X-12376	LC 阳	0.0124	58.66527499
33814	X-12386	LC 阴	0.0136	108.2300401
33835	X-12407	LC 阴	0.0489	55.24997178
33839	X-12411	LC 阴	0.019	87.92801957
33910	X-12465	LC 阳	0.0218	0
34041	X-12511	LC 阳	0.0179	89.02312659
34094	X-12534	GC	0.0369	15.74666369
34123	X-12556	GC	0.0386	55.12702293
34137	X-12570	GC	0.029	72.94401006
34138	X-12571	LC 阳	0.0461	-51.97060823
34170	X-12602	LC 阳	0.0327	33.15918309
34268	X-12663	GC	0.0265	82.0191453
34289	X-12680	LC 阳	0.045	93.83428843
34290	X-12681	LC 阳	0.0431	67.59059032
34292	X-12683	LC 阳	0.0468	76.11571819
34294	X-12685	LC 阳	0.0128	114.0988325
34295	X-12686	LC 阳	0.0461	54.50094449
34297	X-12688	LC 阳	0.0084	100.1303934
34299	X-12690	LC 阳	0.0353	74.54432605
34300	X-12691	LC 阳	0.0325	67.30133053

[0224]

34305	X-12695	LC 阴	0.0321	52.64061636
34310	X-12700	LC 阴	0.0073	102.1108558
34311	X-12701	LC 阴	0.0428	159.9798899
34322	X-12712	LC 阴	0.0362	107.510855
34323	X-12713	LC 阴	0.0253	141.1585404
34332	X-12722	LC 阴	0.0181	120.1175671
34339	X-12729	LC 阴	0.0428	210.5959332
34343	X-12733	LC 阴	0.0037	-57.78309079
34349	X-12739	LC 阴	0.0198	-37.87433792
34350	X-12740	LC 阴	0.0158	441.3133411
34352	X-12742	LC 阴	0.0307	-48.53620833
34353	X-12743	LC 阴	0.0138	155.1605436
34355	X-12745	LC 阴	0.0354	471.2309818
34358	X-12748	LC 阳	0.0461	-13.09684771
34359	X-12749	LC 阳	0.0242	-23.31492948
34360	X-12750	LC 阳	0.0297	26.42009682
34372	X-12762	LC 阳	0.0412	178.3117468
34497	X-12814	LC 阴	0.04	170.9153319
34498	X-12815	LC 阴	0.0242	98.14355773
34505	X-12822	LC 阴	0.0325	43.0072576
34524	X-12841	LC 阴	0.0182	189.4742509
34526	X-12843	LC 阴	0.0066	118.568709
34528	X-12845	LC 阴	0.023	162.3770256
34532	X-12849	LC 阴	0.0143	173.837207
34533	X-12850	LC 阴	0.0233	138.2604803

[0225]

12785	X-3103	GC	0.0482	-47.31496658
16062	X-4015	GC	0.0037	43.60275909
16831	X-4504	GC	0.0321	120.6164818
17086	X-4637	GC	0.0028	281.0902182
18251	X-5409	GC	0.0191	71.87489485
18264	X-5414	GC	0.015	90.0100388
18265	X-5415	GC	0.0413	101.7549199
18316	X-5437	GC	0.0053	128.193364
18388	X-5491	GC	0.023	-31.91685364
19960	X-6912	GC	0.0242	129.4486593
19965	X-6928	GC	0.0317	125.0950831
19969	X-6931	GC	0.0278	180.8662725
19973	X-6946	GC	0.0061	149.537457
19990	X-6962	GC	0.0413	34.36068338
19997	X-6969	GC	0.0145	545.8663231
22320	X-8889	GC	0.0441	41.201698
22494	X-8994	GC	0.0236	805.8059769
22570	X-9033	GC	0.0219	-94.82653652
24074	X-9706	GC	0.0482	35.47108011

[0226] 实施例 2

[0227] 前列腺癌组织、细胞系和尿沉渣中多种代谢物的验证

[0228] 材料和方法：

[0229] 从 Sigma 公司 (St. Louis, MO, 美国) 购得氨基酸。从 Isotec 公司 (Miamisburg, OH, 美国) 购得对应标记的版本。从 Sigma 公司购得异丁醇、氯仿、甲基氰、二甲基甲酰胺、乙酸乙酯。分析的所有其它化学制品 - 试剂等级和从 Fluka 和 Sigma 公司购得。从 Regis Technologies Inc, IL, 美国购买正甲基 -N-(叔丁基甲基硅烷三氟乙酰胺 (MtBSTFA)+1% 叔丁基 - 二甲基氯硅烷和七氟丁酞酸酐。

[0230] 临床样本

[0231] 在美国密歇根大学医院从根治性前列腺切除术系列中获得良性前列腺和局部前列腺癌组织, 并从快速尸检程序中获得转移性前列腺癌生物标本, 它们都是密歇根大学前列腺癌卓越研究专用项目 (S. P. O. R. E) 组织核心的部分。在密歇根大学的通告许可和前机

构审查委员会批准下收集样本。另外,在直肠指检后和活检前收集匹配的尿液样本。这包括活检阳性 / 阴性患者以及非癌症相关的前列腺病理状况的患者。所有样本在 -80°C 下保存直至使用。

[0232] 使用 GC-MS 进行样本制备和临床标本中的多种代谢物的验证

[0233] 在掺入标记的内标物后,将生物学样本(组织、尿液和细胞系)在甲醇中搅匀并在 4°C 下震荡过夜。室温下使用 1 : 1 摩尔比的水 / 氯仿进行提取持续 30 分钟。收集水性甲醇层并在氮条件下完全干燥。在使用 MtBSTFA 进行衍生作用后通过 GC-MS 进一步分析干燥的含有代谢物的甲醇提取物。干燥的甲醇氨基酸残留物通过加入 $100\ \mu\text{L}$ 二甲基甲酰胺(DMF)、涡流然后在真空离心蒸发浓缩器中干燥 30 分钟,共沸混合物两次。将 $100\ \mu\text{L}$ 的 DMF 和正甲基-N-(叔丁基甲基硅烷三氟乙酰胺(MtBSTFA))+1%叔丁基二甲基氯硅烷加入到干燥的样本中,盖上瓶盖, 60°C 下培养 1 小时,然后用乙酸乙酯再悬浮并注射到 GC-MS 中。

[0234] 使用选择离子检测(SIM)定量。通过测量天然代谢物的峰面积到同位素标记的内标物的峰面积来计算样本中代谢物的量。

[0235] 通过气相色谱-质谱测定法进行样本制备和组织中的聚胺验证

[0236] 在掺入标记的内标物后使用甲醇裂解组织并在 4°C 下震荡过夜。在室温下使用 1 : 1 摩尔比的水 / 氯仿进行提取。收集并干燥含有聚胺的水层。在使用 HFBA 进行衍生作用后通过 GC-MS 进一步分析含有聚胺的干燥的提取物。将 $200\ \mu\text{L}$ 的甲基氰和 $100\ \mu\text{L}$ 的 HFBA 加入到干燥的残留物中。盖上瓶盖并在 65°C 下加热 60 分钟。然后在氮气流下将反应混合物蒸发至干燥,接着在 1mL 的乙醚中再溶解。用同等量的饱和碳酸钠溶液对乙醚溶液清洗一次。离心后,丢掉水相并获取 $1\ \mu\text{L}$ 的乙醚相以进行 GC-MS 分析。使用选择离子检测(SIM)定量。通过测量天然聚胺的峰面积到同位素标记的内标物的峰面积来计算样本中聚胺的量。

[0237] 通过气相色谱-质谱测定法进行样本制备和尿液中的聚胺验证

[0238] 使用报道肌氨酸的修饰方法进行同位素稀释法 GC/MS 分析。通过液-液提取($\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{CHCl}_3$, 1 : 1 : 1 比例)从生物学样本中提取聚胺。在纯氮气流下将含有聚胺的甲醇层蒸发至干燥。将 $300\ \mu\text{L}$ 的异丁醇 / 3N HCl 加入到干燥的甲醇提取物中。将反应混合物导入到 Pyrex 试管中并用特氟隆隔膜盖住螺丝帽封闭。在 110°C 下将试管在沙浴中加热 30 分钟,用柔和的氮气流将样本冷却并干燥。然后,在加入 $150\ \mu\text{L}$ 的甲基氰以清除残留水分后第二次干燥样本。加入甲基氰($200\ \mu\text{L}$)和 $100\ \mu\text{L}$ 七氟丁酰酸酐(HFBA)并在 125°C 下将试管封闭加热 20 分钟以产生七氟丁酰衍生物。通过 GC-MS 分析衍生的样本。使用 SIM 分析通过测量天然聚胺的峰面积到同位素标记的内标物的峰面积来定量聚胺。将甲硫氨酸作为内部对照用于标准化尿浓缩。

[0239] 使用气相色谱-质谱测定法进行样本制备和组织中脂肪酸的验证:

[0240] 在掺入标记的内标物后将生物学样本在甲醇中搅匀并在 4°C 下震荡过夜。在室温下使用 1 : 1 摩尔比的水 / 氯仿进行提取持续 30 分钟。在氮条件下收集并干燥有机脂肪层。在使用 MtBSTFA 进行衍生作用后通过 GC-MS 进一步分析干燥的含有代谢物(脂肪酸)的氯仿。通过加入 $100\ \mu\text{L}$ 二甲基甲酰胺(DMF)、涡流然后在真空离心蒸发浓缩器中干燥 30 分钟,反复两次得到干燥的有机脂肪酸残留物,共沸混合物。将 $100\ \mu\text{L}$ 的 DMF 和正甲基-N-(叔丁基甲基硅烷三氟乙酰胺(MtBSTFA))+1%叔丁基二甲基氯硅烷加入到干燥的样

本中, 盖上瓶盖, 60℃下培养 1 小时, 然后用乙酸乙酯再悬浮并注射到 GC-MS 中。

[0241] 结果

[0242] 使用前列腺特异性代谢物的多组研究

[0243] 在本发明的某些实施方案过程中进行的实验中发现升高水平的肌氨酸, 表明肌氨酸是癌症(例如, 前列腺癌)的预后标志。在本发明的某些实施方案中, 组织源的前列腺癌特异性物质作为多重生物标志物用于此疾病的早期检测。

[0244] 组织中多种代谢物的验证:

[0245] 局部前列腺癌相关的代谢物诸如谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、胸腺嘧啶、哌可酸、尿嘧啶和丝氨酸在前列腺源的组织标本中定量。使用稳定同位素稀释法(SID)选择离子检测(SIM)GC-MS, 我们将靶代谢物定量。首先, 将样本修改成其叔丁基二甲基硅烷衍生物, 并用 Agilent 5975 MSD 质量检测器通过电子碰撞(EI)离子化进行分析。在 52 个前列腺源的样本中定量了谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸和胸腺嘧啶。这包括 13 个良性相邻(良性)、26 个局部前列腺癌(PCA)和 13 个转移性样本(Mets)。对 SIM 分析, 对多种靶代谢物的天然和同位素标记分子峰值的 m/z 是: 406 和 407(半胱氨酸)、432 和 437(谷氨酸)、218 和 219(甘氨酸)、297 和 301(胸腺嘧啶)、198 和 207(哌可酸)($n = 30$)、283 和 285(尿嘧啶)($n = 30$)和 390 和 392(丝氨酸)($n = 30$)。代谢物的水平标准化到组织重量。谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、胸腺嘧啶、哌可酸和尿嘧啶的水平在局部 PCA 中与在良性前列腺组织中比较, 全部升高了(图 1 至 6)。丝氨酸的水平没有变化, 其在癌症发展过程中不改变(图 7)。

[0246] 还将前列腺癌细胞系用于验证组织数据。侵入性前列腺癌细胞系(LnCaP、Du145、PC3 和 2RVV1)显示出比非侵入性前列腺细胞系(RWPE)更高的哌可酸(图 8)和尿嘧啶(图 9)的水平。

[0247] 尿液中多种代谢物的验证:

[0248] 为了调查多种代谢物作为非侵入性前列腺癌标志的潜力, 使用组织特异性代谢物在活检阳性和活检阴性尿沉渣中进行验证。研究了 GC/MS 方法以测量其他代谢物诸如谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸。然后在活检阳性和活检阴性尿沉渣中分析这些代谢物的水平。水平报道为肌氨酸/丙氨酸、谷氨酸/丙氨酸、甘氨酸/丙氨酸、半胱氨酸/丙氨酸和甲硫氨酸/丙氨酸之比。使用丙氨酸作为内部对照来标准化尿液中肌氨酸、谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸的水平。活检阳性尿沉渣中的肌氨酸/丙氨酸之比、谷氨酸/丙氨酸之比(Wilcoxon $P = .0003$)、甘氨酸/丙氨酸之比(Wilcoxon $P = .0279$)和半胱氨酸/丙氨酸之比(Wilcoxon $P = .0133$)显示出比对应的活检阴性尿沉渣更高的水平(图 10 至 13)。甲硫氨酸的水平没有变化, 其在癌症发展过程中不改变(图 14)。箱线图示出了在活检阳性尿沉渣中的谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的水平比活检阴性对照中高(图 15)。

[0249] 聚胺: 侵入性前列腺癌的组织生物标志物

[0250] 研究同时确定组织、细胞系和尿液中的聚胺(腐胺、亚精胺和精胺)的简单而敏感度高度的方法。通过使用选择离子检测(SIM)模式中的 GC-MS 将聚胺转化成正七氟丁酰衍生物来定量。将样本修改成其七氟丁酰衍生物, 并用 Agilent 5975 MSD 质量检测器通过电子碰撞离子化进行分析。聚胺在 30 个前列腺源的样本中初始定量。这包括 10 个良性相邻(良性)、10 个局部前列腺癌(PCA)和 10 个转移性样本(Mets)。

[0251] 对 SIM 分析, 使用对多种靶代谢物的天然和标记的碎片离子峰值的 m/z 定量。选

择的值是腐胺 267 和 269、牙精胺 323 和 331 和 and 576 精胺 584。通过测量天然和标记离子的峰面积来标准化水平。将腐胺、牙精胺和精胺的水平标准化到组织重量。与局部前列腺癌和转移性前列腺癌组织比较,良性前列腺组织具有更高水平的精胺 (PCA vs. 良性 $P = .0018$; PCA vs. 转移性, $P = .0059$; 转移性 vs. 良性, $P = 5.3 \times 10^{-4}$)、腐胺 (PCA vs. 良性, $P = .0018$; PCA vs. 转移性, 3.9×10^{-6} $P = .0059$; 转移性 vs. 良性, $P = .3 \times 10^{-4}$) 和牙精胺 (PCA vs. 良性, $P = .0731$; PCA vs. 转移性 $P = 1.3 \times 10^{-5}$; 转移性 vs. 良性 $P = 8.5 \times 10^{-5}$)。箱线图示出了在癌症发展进程中降低的聚胺水平 (图 19)。使用双面 Welch 两样本 T 检验计算 P 值来比较组。在癌症发展进程中,与很多其他癌症组织 (例如,乳腺) 中聚胺代谢物随着较高侵入性癌症而升高的状况相比,前列腺癌组织中的聚胺水平降低了。在人类前列腺的良性和恶性组织中聚胺水平的比较显示,良性增生的前列腺组织比肿瘤组织,特别是在具有移位变化的前列腺癌具有更高水平的精胺。因此,前列腺精胺含量的大量减少表明前列腺组织从良性状态到恶性状态的表型转化。因此,在本发明的某些实施方案研究过程中进行的实验显示,将聚胺作为前列腺癌恶性行为的生物标志物。在本发明的某些实施方案中,基于 GC-MS 的聚胺验证形成了体内检测前列腺癌组织中聚胺的强有力的、非侵入性的方法。

[0252] 细胞系数据验证了组织样本取得的观察。侵入性 (例如,转移性) 前列腺癌细胞系 (LNCaP、VCaP、DU145、PC3 和 2RVV1) 显示出比正常前列腺细胞系 (RWPE) 更低水平的聚胺 (图 20)。因此,在侵入性前列腺癌中降低水平的聚胺显示出聚胺作为前列腺标志物的应用。

[0253] 聚胺:尿液中前列腺癌的非侵入性代谢物标志物

[0254] 研究出基于 GC-MS 的方法来定量组织 (如上所述) 中聚胺的水平。还研究出修饰的 GC/MS 验证测定用于分析活检阳性和活检阴性尿沉渣中的聚胺水平。起初,通过用异丁醇处理代谢物将其转化成异丁酯,然后变成七氟丁酰酯。衍生并定量内源性甲硫氨酸和聚胺。将甲硫氨酸作为对照使用以标准化聚胺。使用基于 GC-MS 的靶代谢物测定来量化尿沉渣中的水平。起初,使用 20 个尿沉渣 (每类 10 个:活检阳性和活检阴性) 定量。水平报道为牙精胺 / 甲硫氨酸之比和精胺 / 甲硫氨酸之比。精胺 / 甲硫氨酸的平均比 (Wilcoxon $P = .003$) 和牙精胺 / 甲硫氨酸 (Wilcoxon $P = .002$) 的平均比在活检阳性前列腺癌患者 ($n = 10$) 的尿液中明显高于活检阴性对照 ($n = 10$) (图 21 至 22)。箱线图示出了在活检阳性单个的尿沉渣中精胺和牙精胺的水平比活检阴性个体更高 (图 23)。然而本发明并不限于任何特殊的机制,而且了解机制并不是实施本发明的必要条件,本发明认为这是由于在癌症发展进程中聚胺从前列腺组织分泌进入尿液中。这些结果表明聚胺作为非侵入性标志物用于检测前列腺癌。

[0255] 组织中脂肪酸的验证:

[0256] 使用选择离子检测 (SIM) GC-MS 也在前列腺源组织标本中定量脂肪酸 (肉豆蔻酸、硬脂酸、棕榈酸、油酸、花生四烯酸和月桂酸)。首先,将游离脂肪酸变成其叔丁基二甲基硅烷衍生物,并用 Agilent 5975 MSD 质量检测器通过电子碰撞 (EI) 离子化进行分析。脂肪酸在 30 个前列腺源样本 (10 个良性相邻 (良性)、10 个局部前列腺癌 (PCA) 和 10 个转移性样本 (Mets) 中定量。对 SIM 分析,对多种靶代谢物的天然和同位素标记的分子峰值的 m/z 是:285 和 288 (肉豆蔻)、313 和 322 (棕榈酸)、341 和 359 (硬脂酸)、339 和 341 (油酸)、

369 和 372(花生四烯酸)和 257 和 260(月桂酸)。代谢物的水平标准化到组织重量。在癌症发展进程中肉豆蔻酸、棕榈酸、花生四烯酸、硬脂酸、月桂酸和油酸的水平全部升高了(图 24 至 29)。箱线图示出了在前列腺癌发展进程中脂肪酸的升高水平(图 30)。图 34 至 47 示出了用于本发明的实施方案中的标志物和标志物组的其他验证和特征。

[0257] 表 3 显示本发明实施方案的单个标志物和标志物组的 AUC。

[0258] 表 3

[0259]

代谢物	AUC
肌氨酸	0.76
谷氨酸	0.74
甘氨酸	0.79
半胱氨酸	0.73
多组	0.88

[0260] 实施例 3

[0261] 乳腺癌组织和细胞系中代谢物的验证

[0262] 乳腺癌组织中肌氨酸的验证：

[0263] 肌氨酸被鉴定为在前列腺癌发展进程中水平很高的差别代谢物。GC-MS 研究表明在癌症发展进程中，从良性到局部，接着到转移性病症的过程中。很多代谢物的水平升高。使用细胞系的分析支持这种观察。同样的方式应用于乳腺癌样本中。分析 19 个组织样本(10 个良性、8 个局部和 1 个转移性乳腺癌组织)。乳腺癌组织显示出比对应良性组织更高的肌氨酸水平(图 31)。

[0264] 在侵入性和非侵入性乳腺癌细胞系中的肌氨酸验证：

[0265] 使用一系列侵入性(MDA-MB-231、BT-549、T578、SVM-245)和非侵入性(HME)乳腺癌细胞系进行肌氨酸验证。侵入性细胞系显示出比对应的非侵入性细胞系更高的肌氨酸水平(图 32)。

[0266] 乳腺癌细胞系中的聚胺验证：

[0267] 研究出 GC-MS 方法验证一组乳腺癌细胞系中的聚胺(腐胺、牙精胺和精胺)。侵入性细胞系(MCF7、MDA-MB-231、T470、SKBR3)显示出比对应的正常细胞系(MCF 10A)更高的腐胺、牙精胺和精胺水平(图 33)。

[0268] 在上述说明中提到的所有公开、专利、专利申请和登陆号的全部内容通过引用纳入本文。尽管本发明已经对具体实施方案进行了描述，应该理解的是本发明所要求的权利不应该限于这种具体的实施方案。实际上，本发明所述的组合物和方法的多种修饰和变化对本领域一般技术人员是显而易见的，并且试图将它们包含在以下权利要求的范围内。

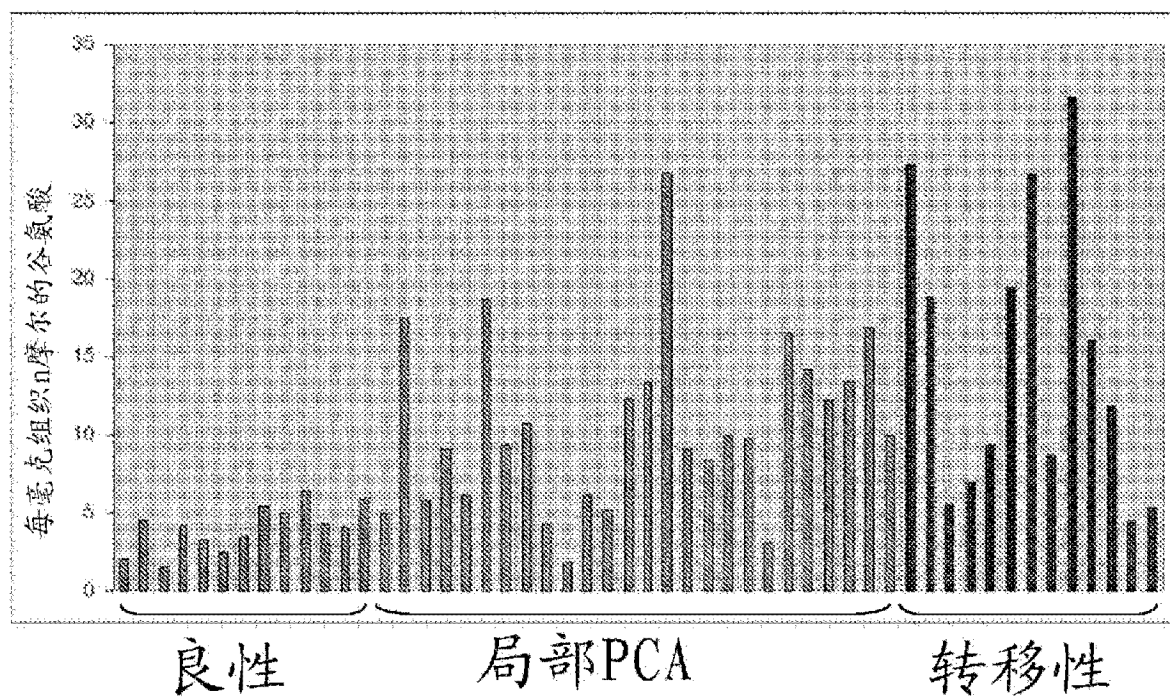


图 1

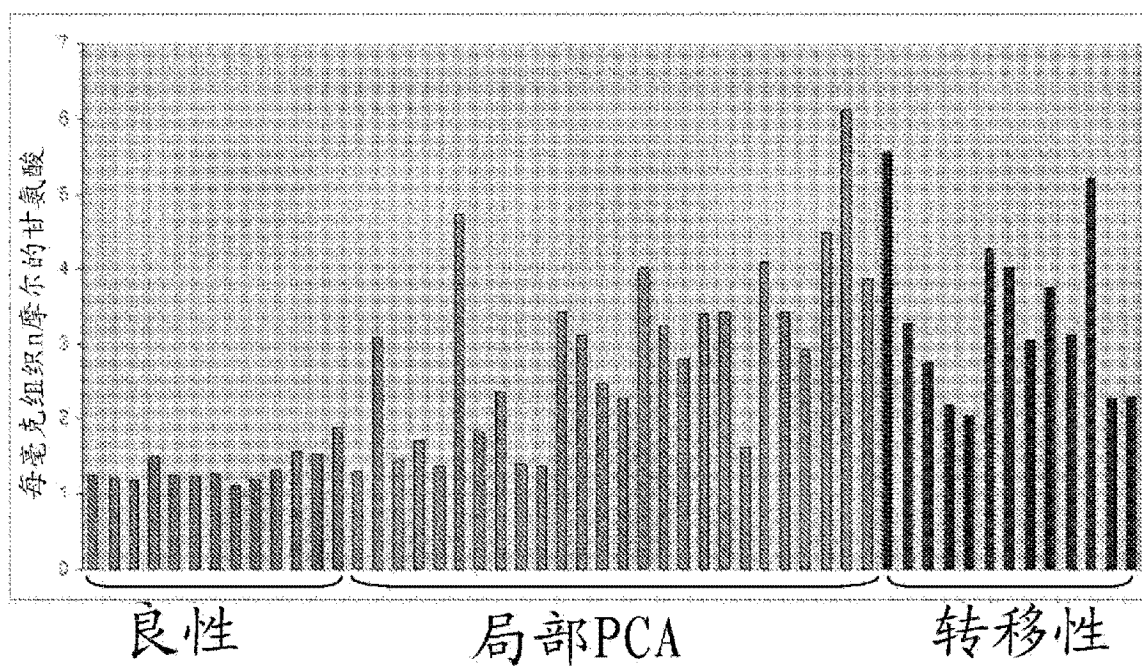


图 2

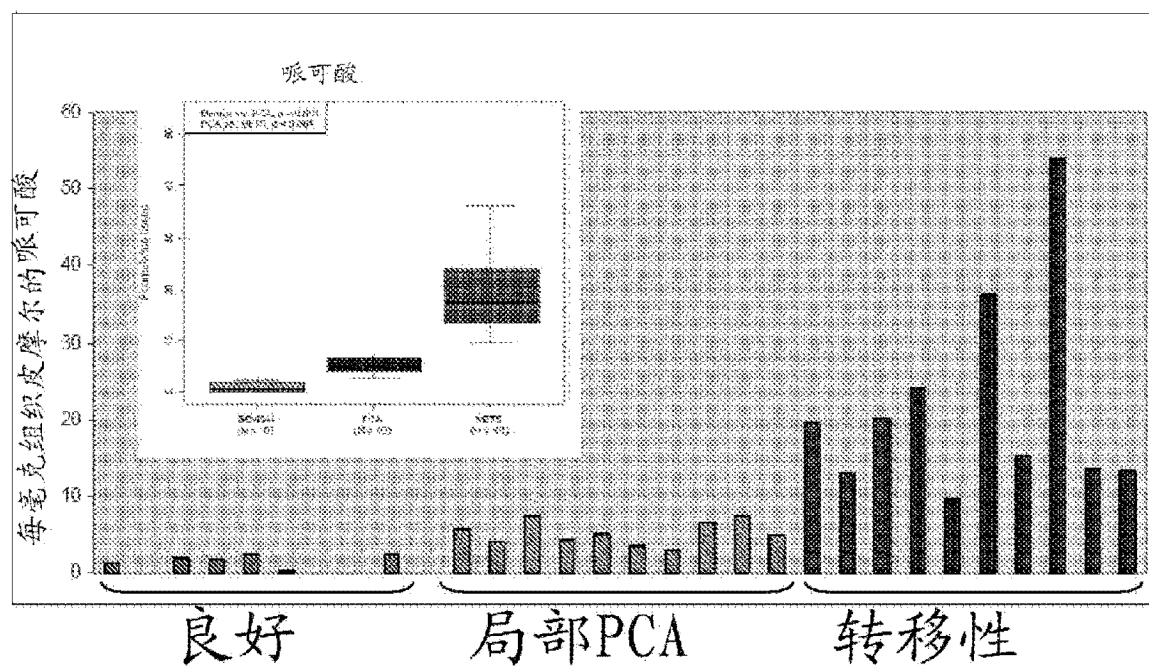


图 5

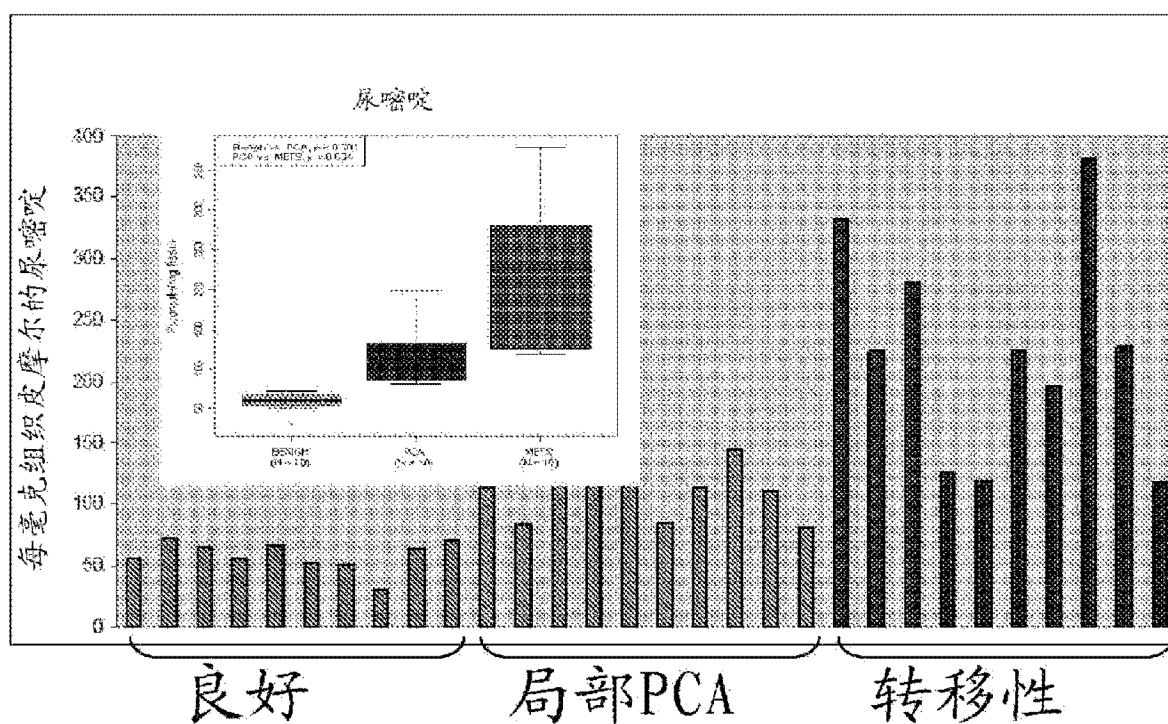


图 6

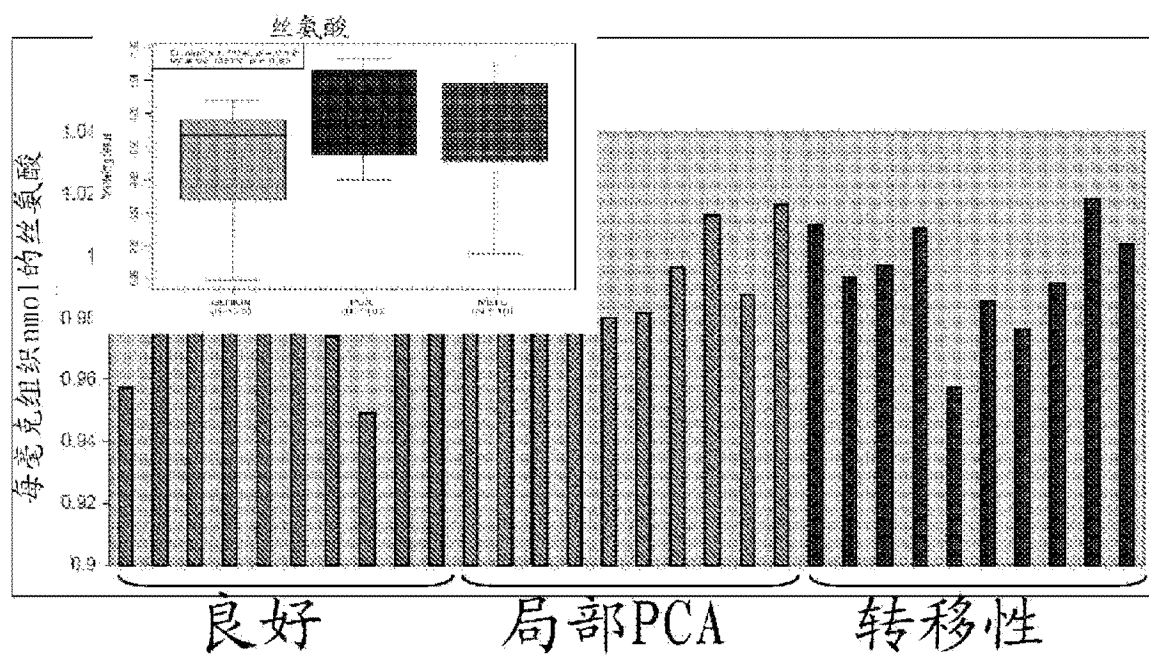


图 7

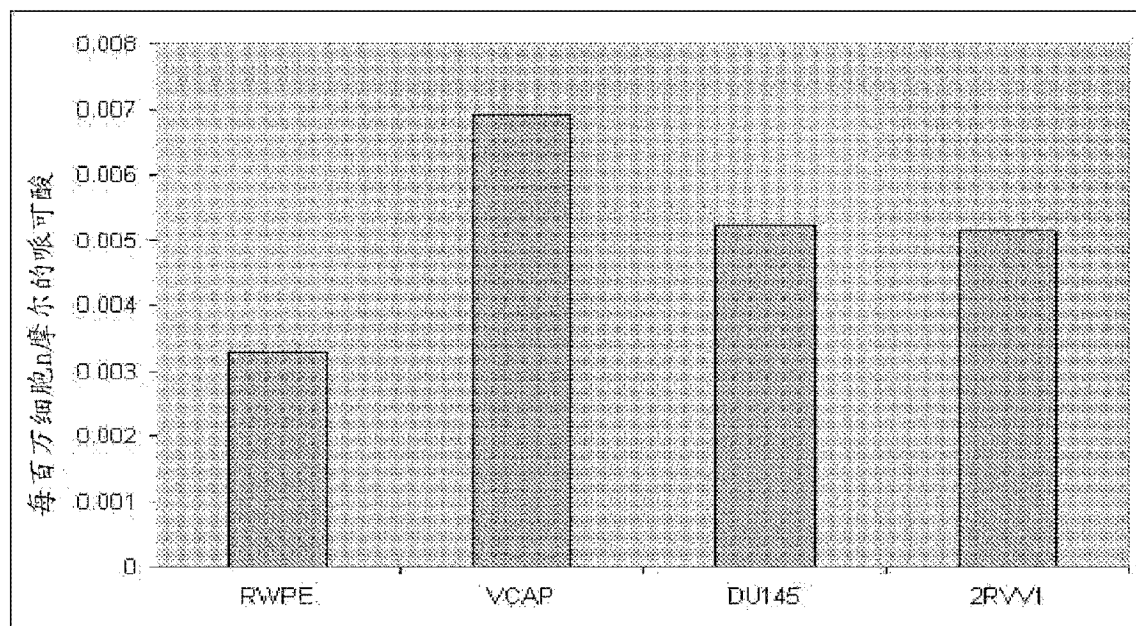


图 8

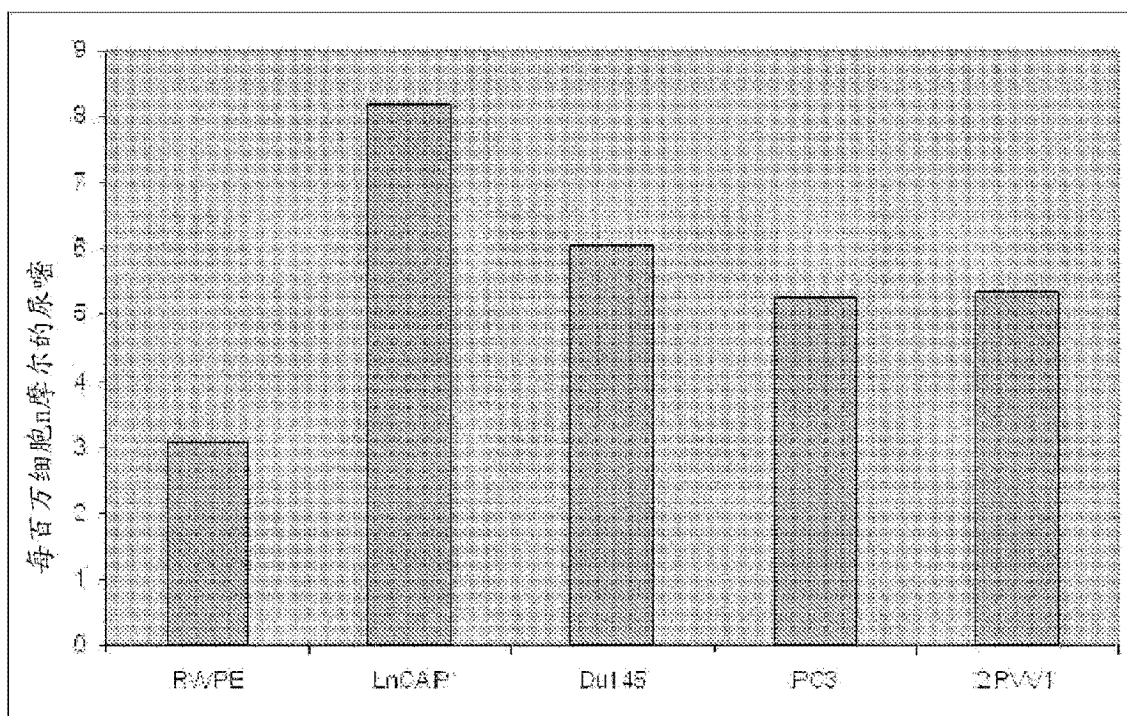


图 9

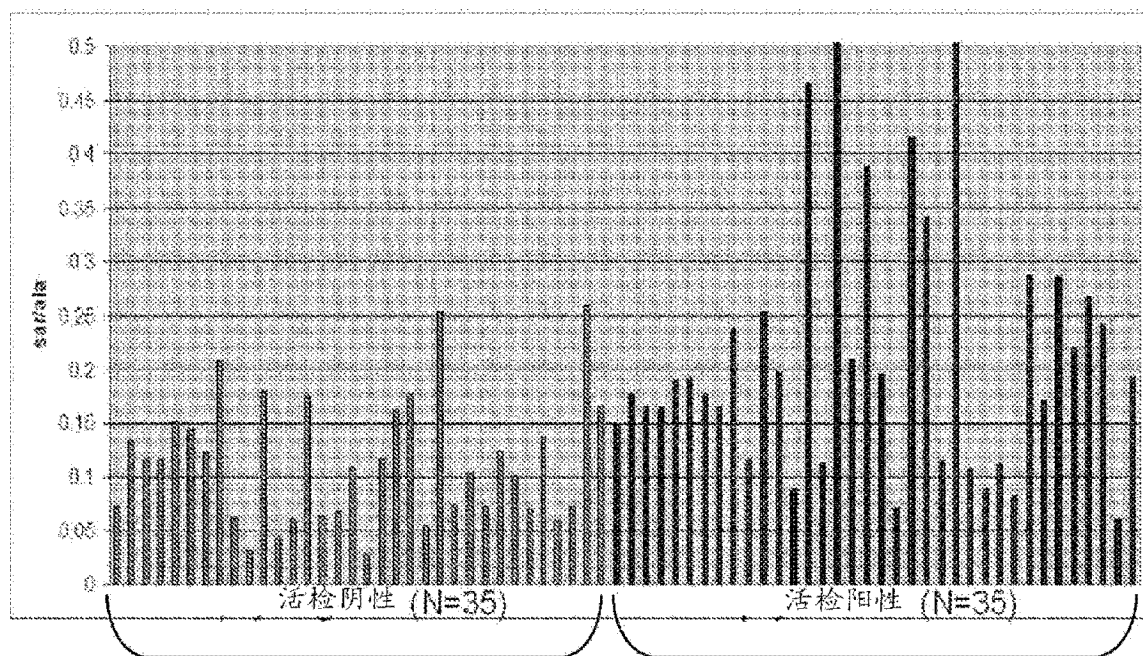


图 10

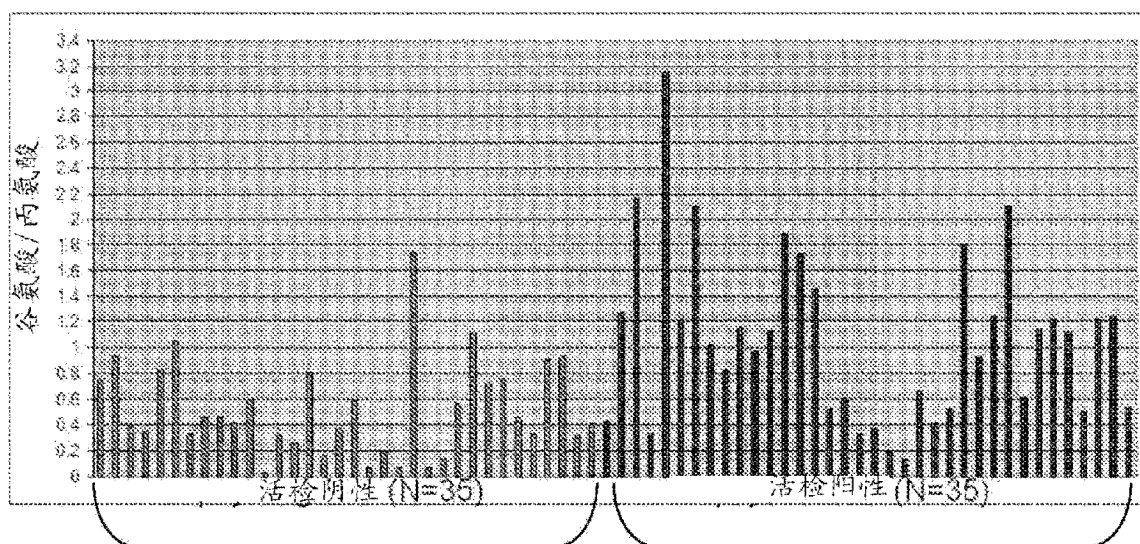


图 11

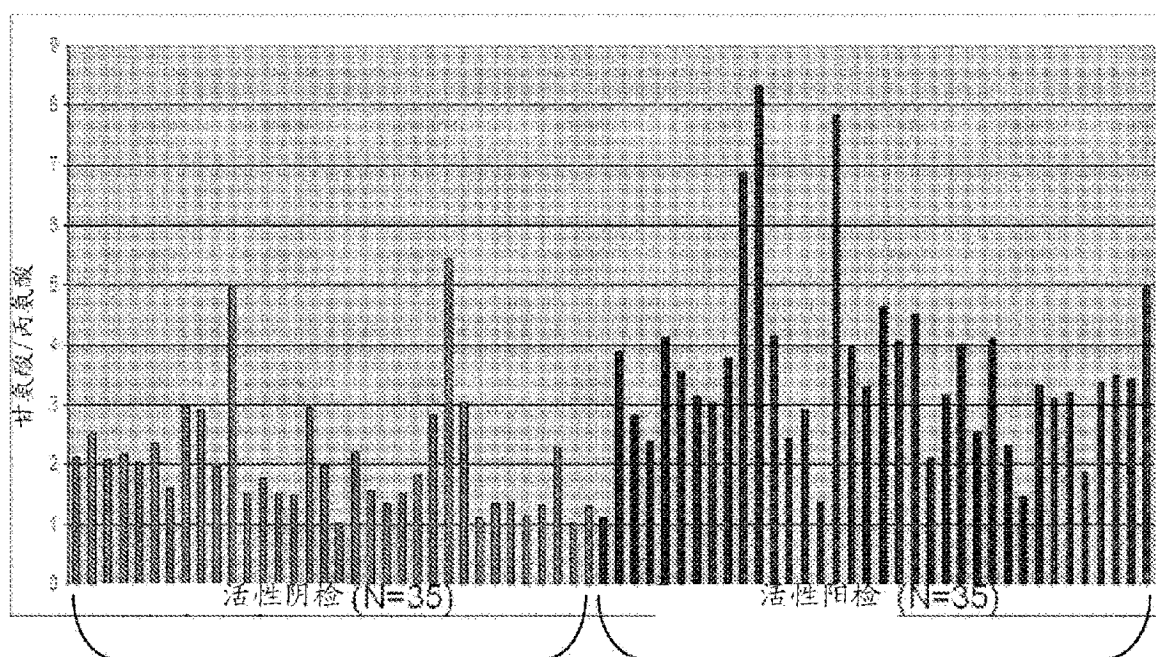


图 12

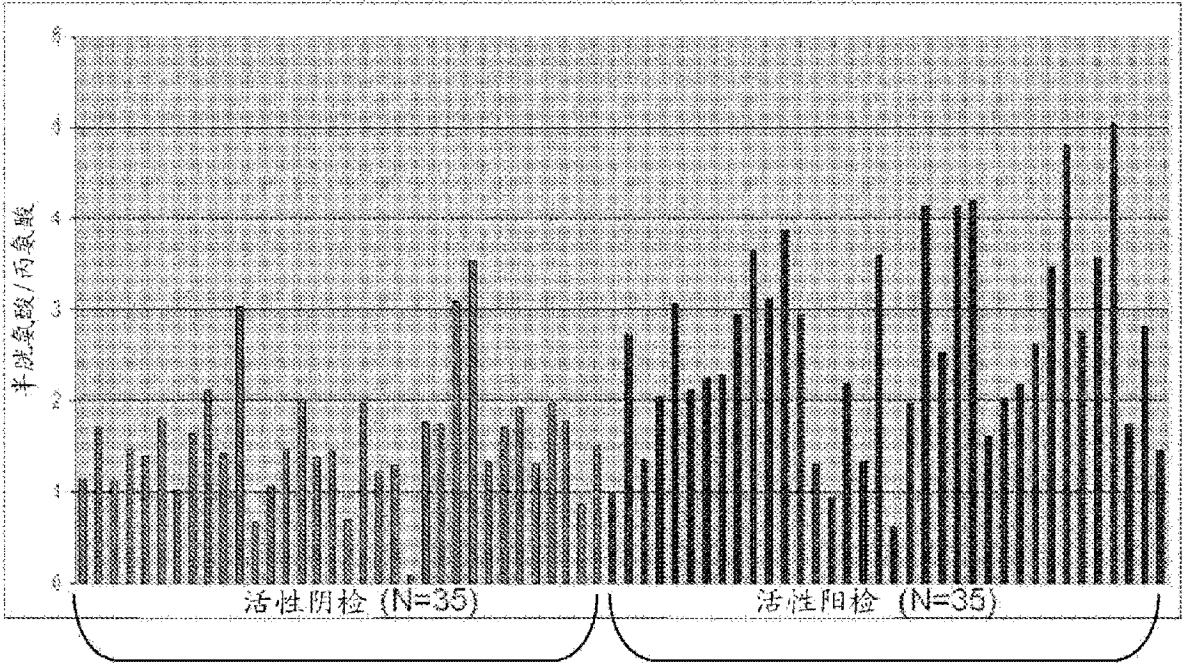


图 13

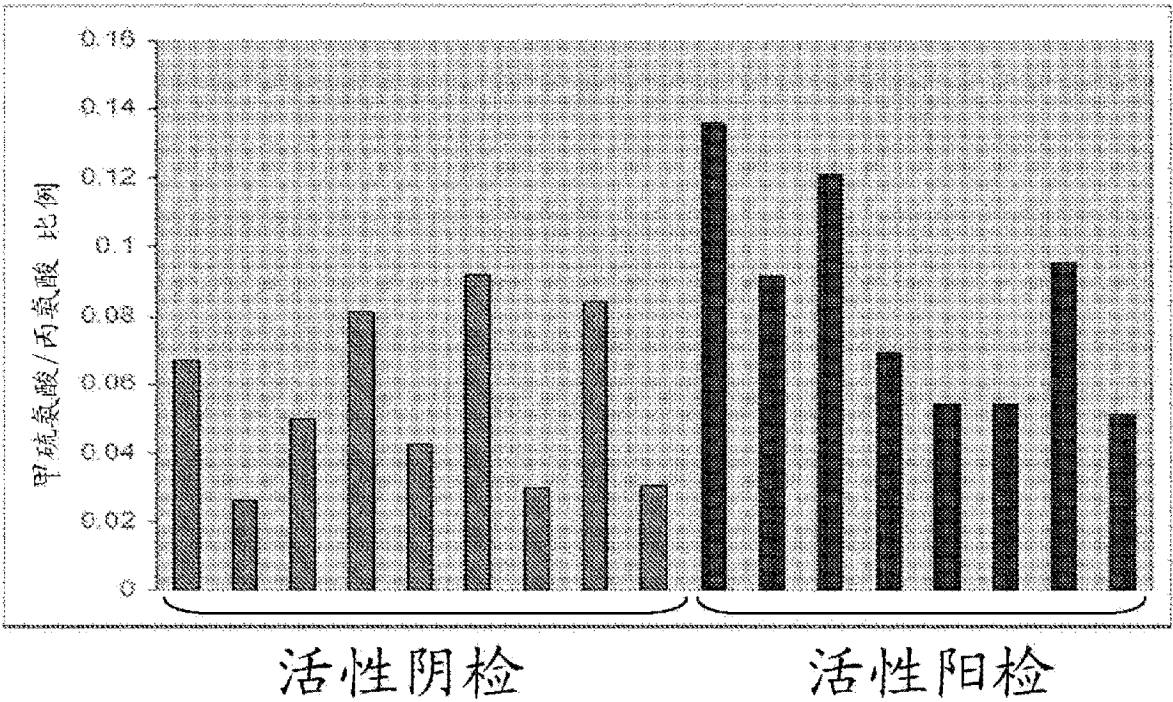


图 14

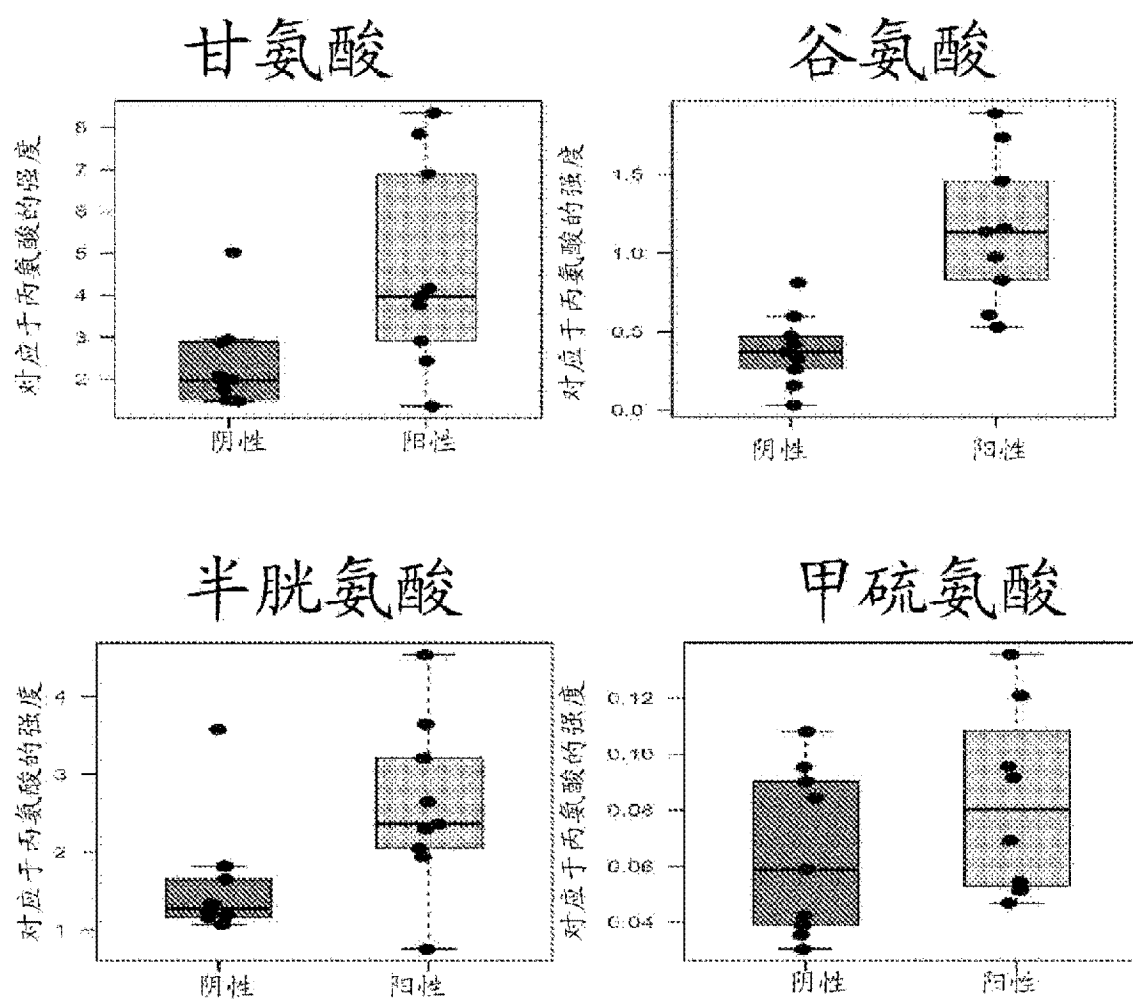


图 15

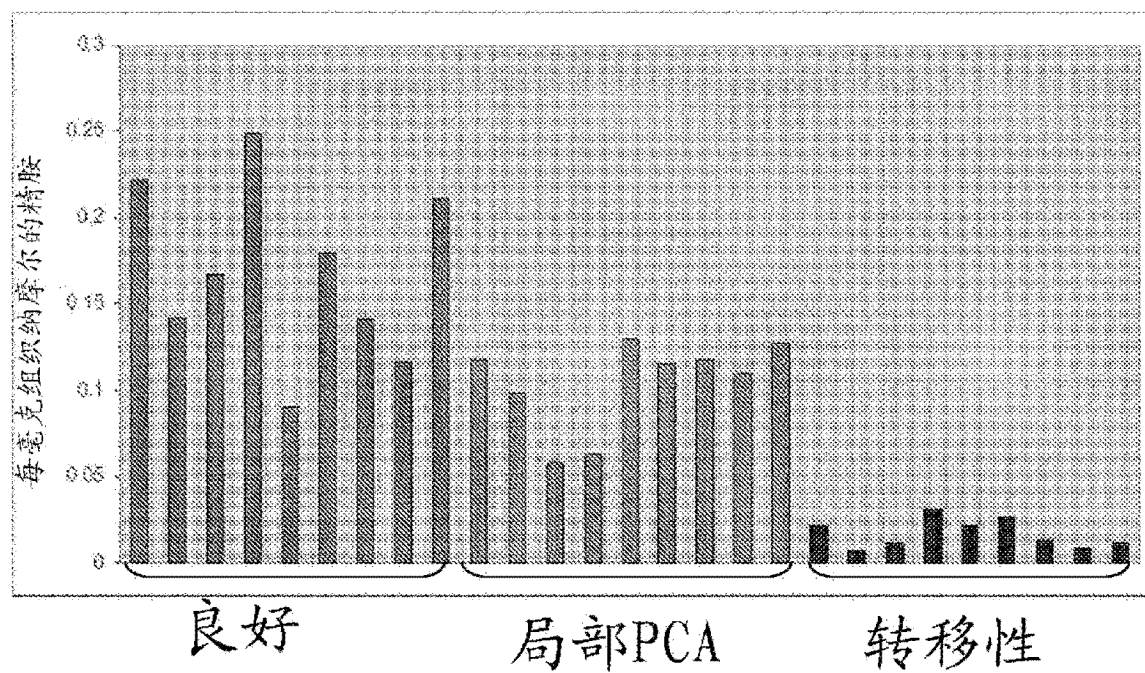


图 16

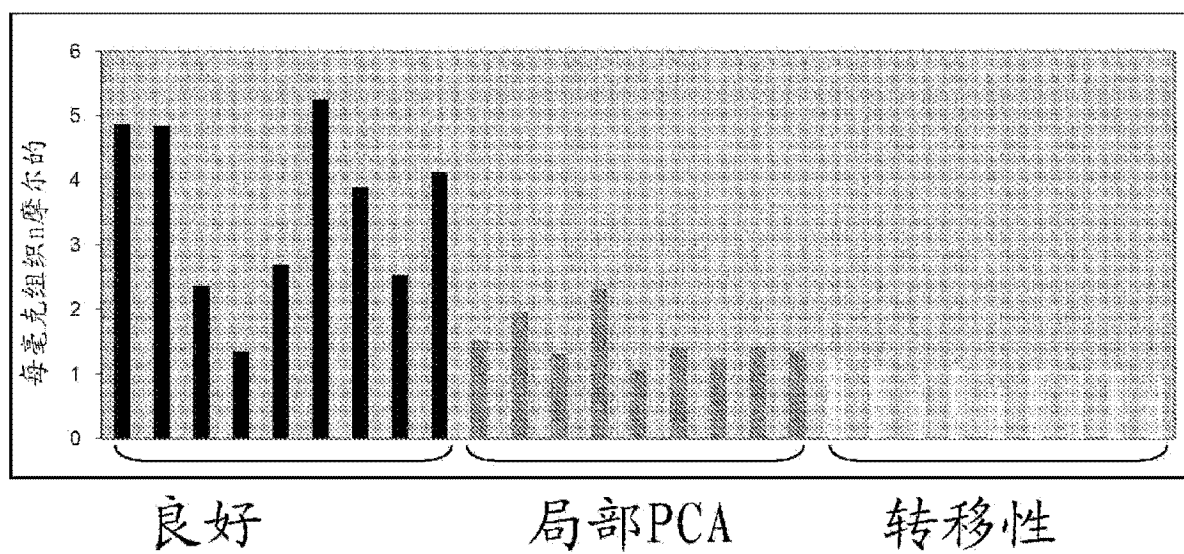


图 17

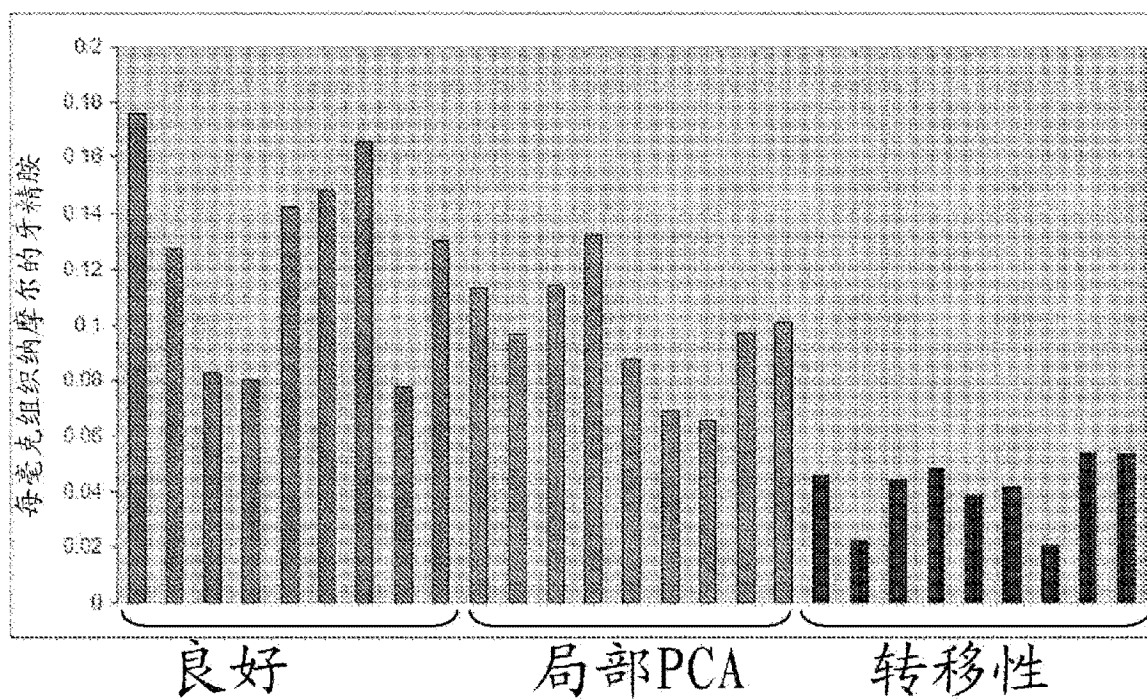
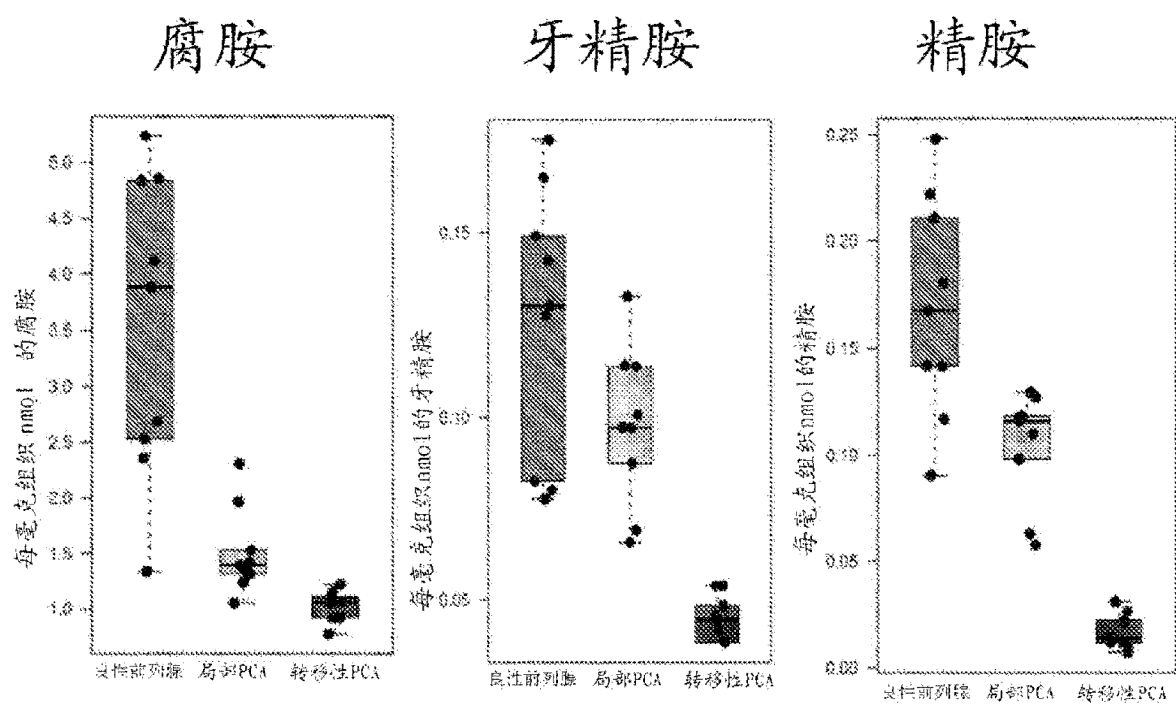


图 18



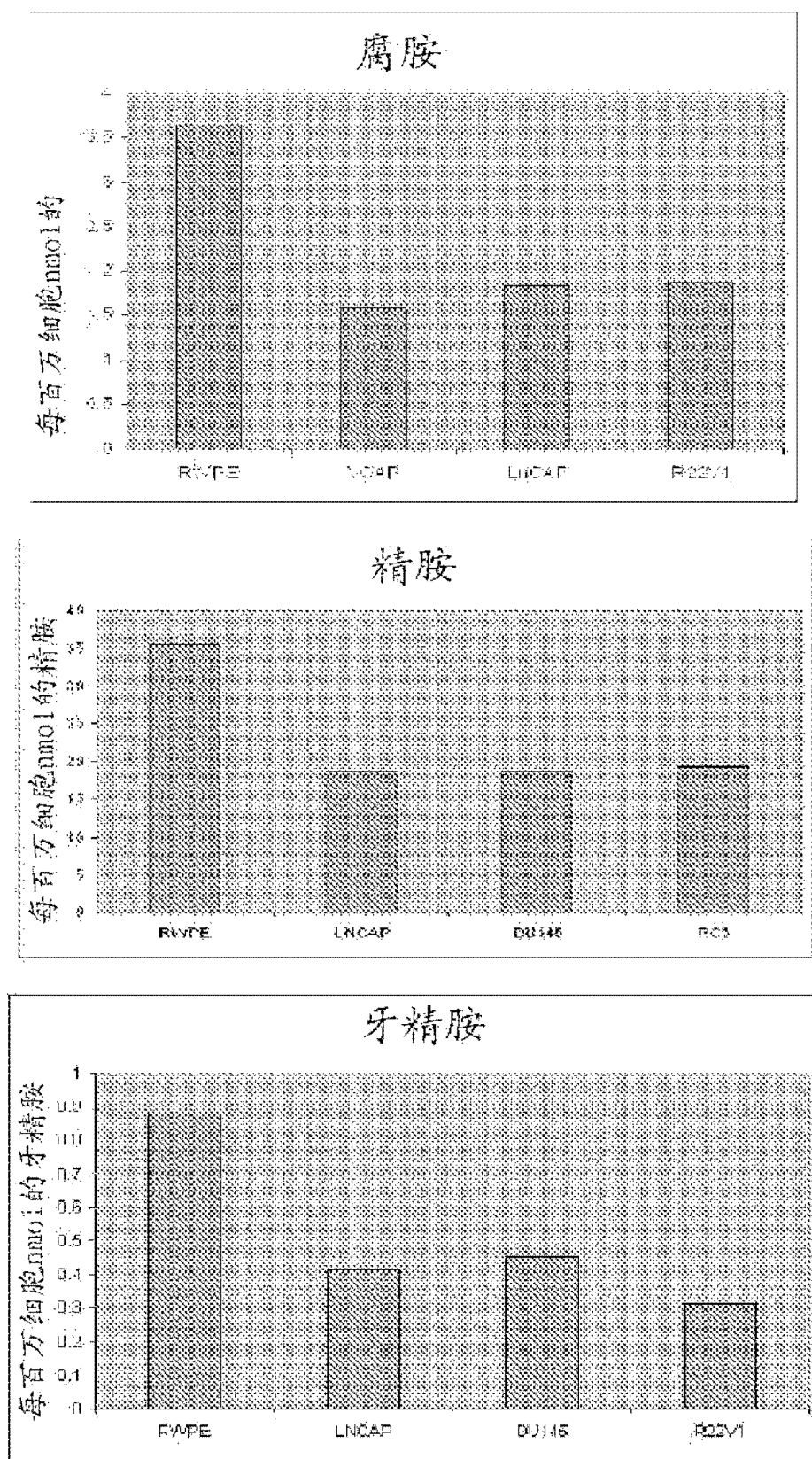


图 20

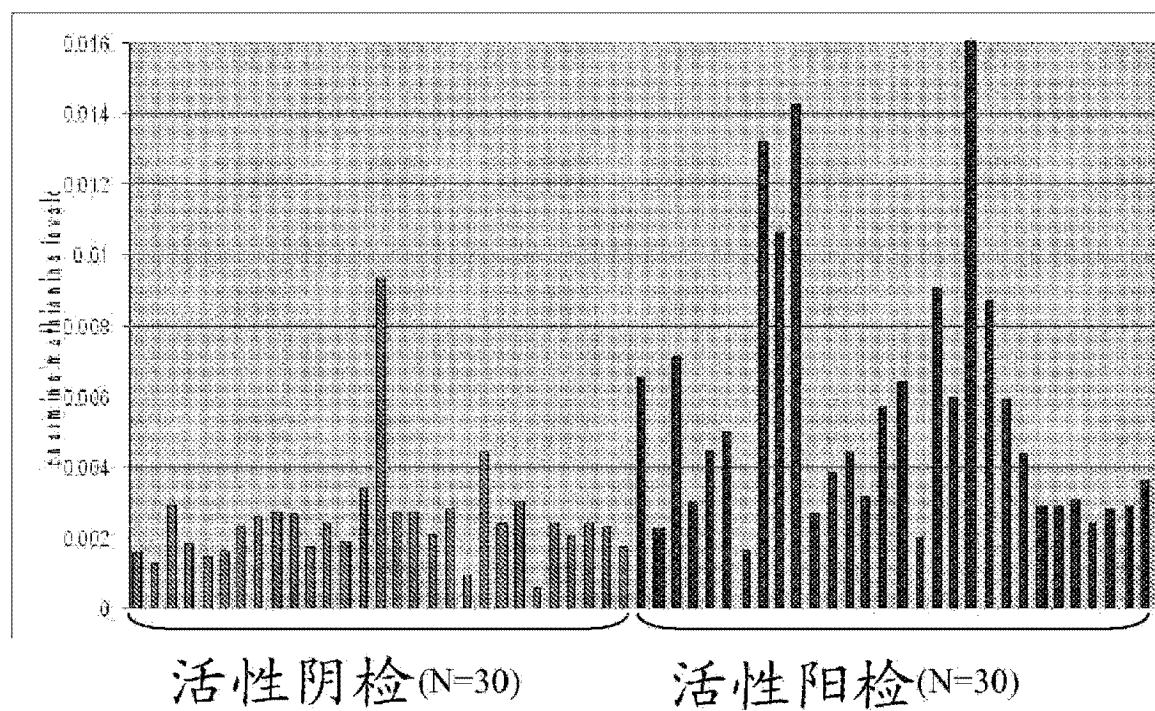


图 21

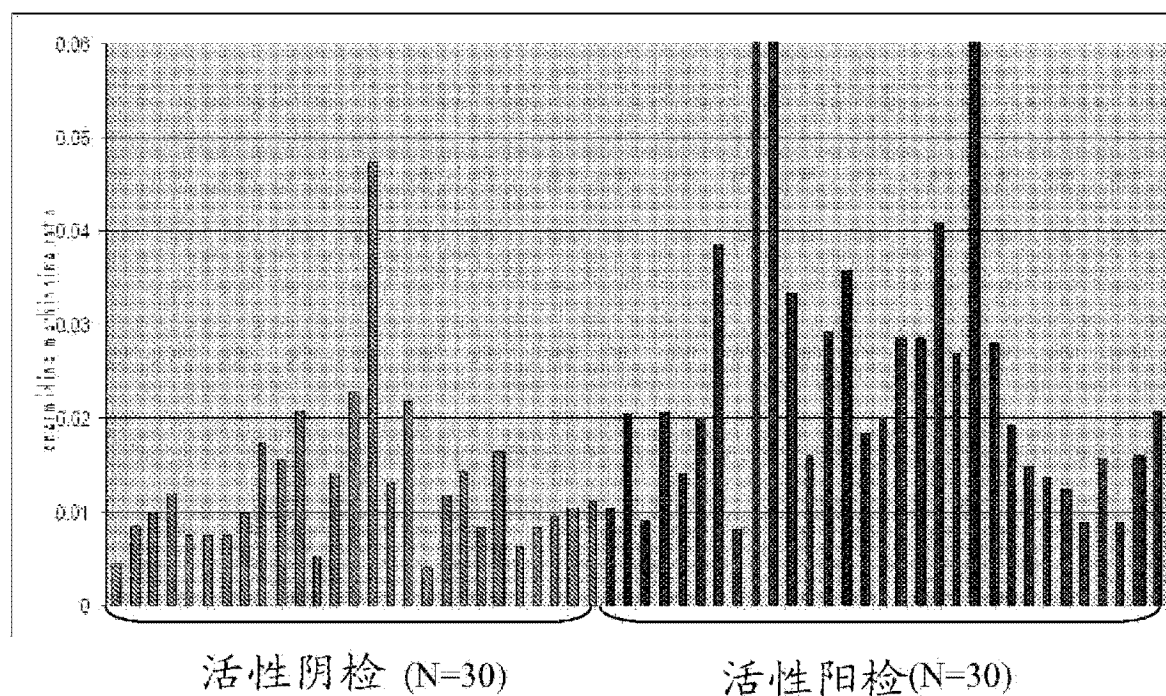


图 22

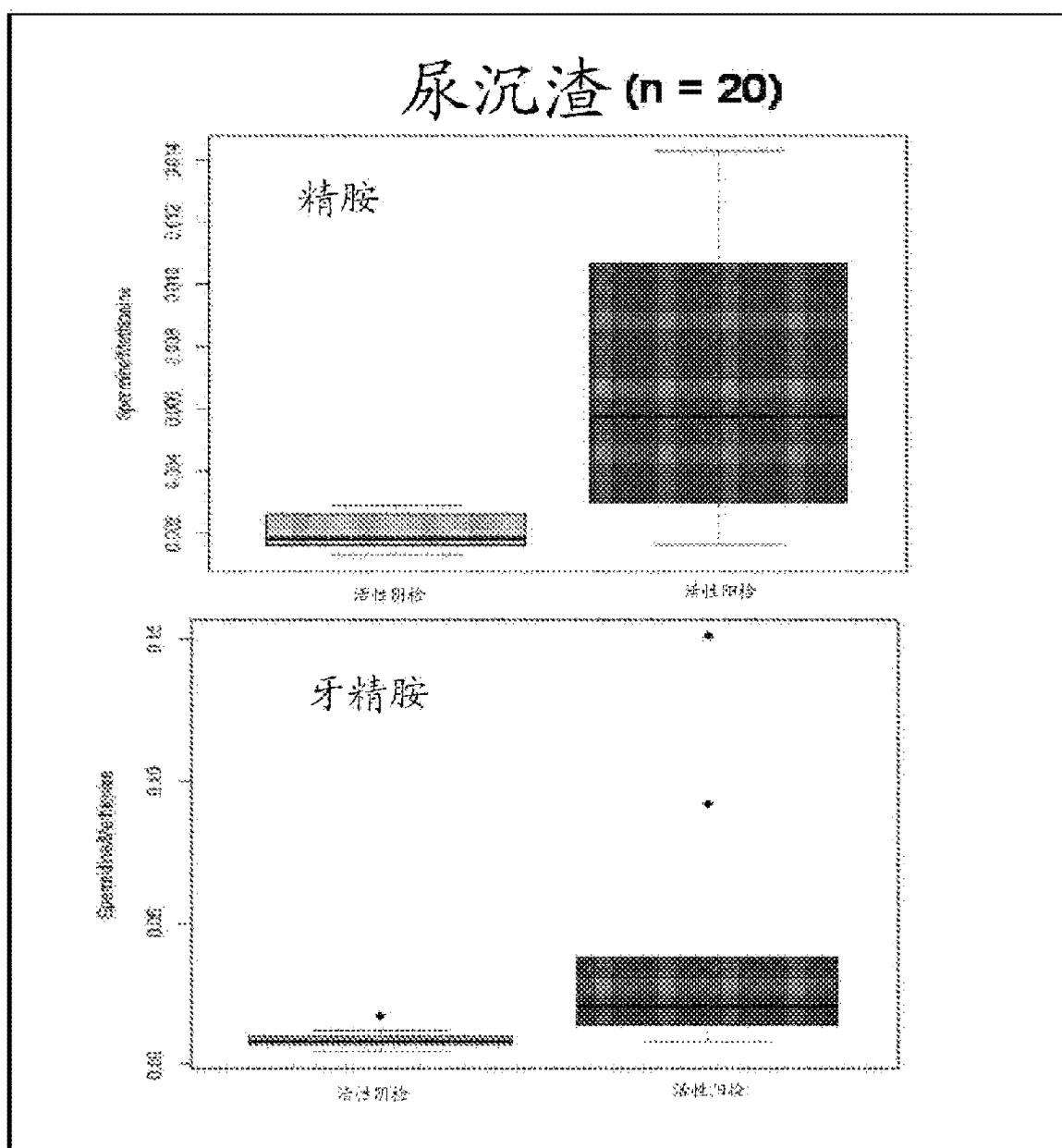


图 23

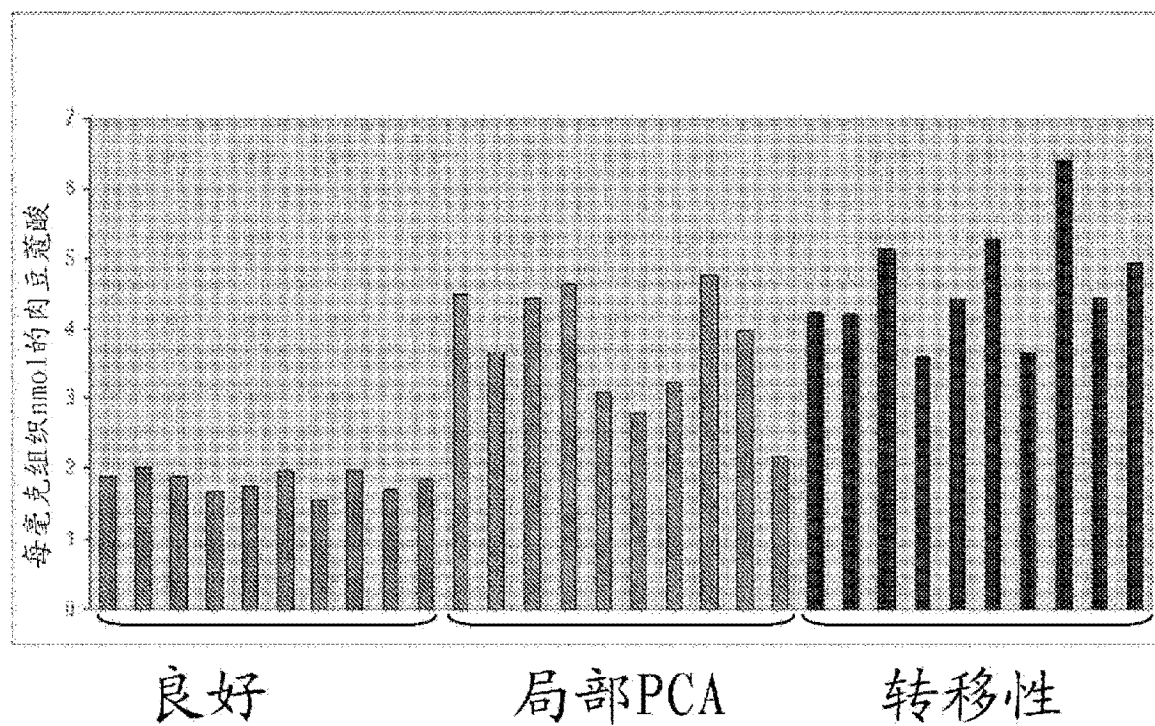


图 24

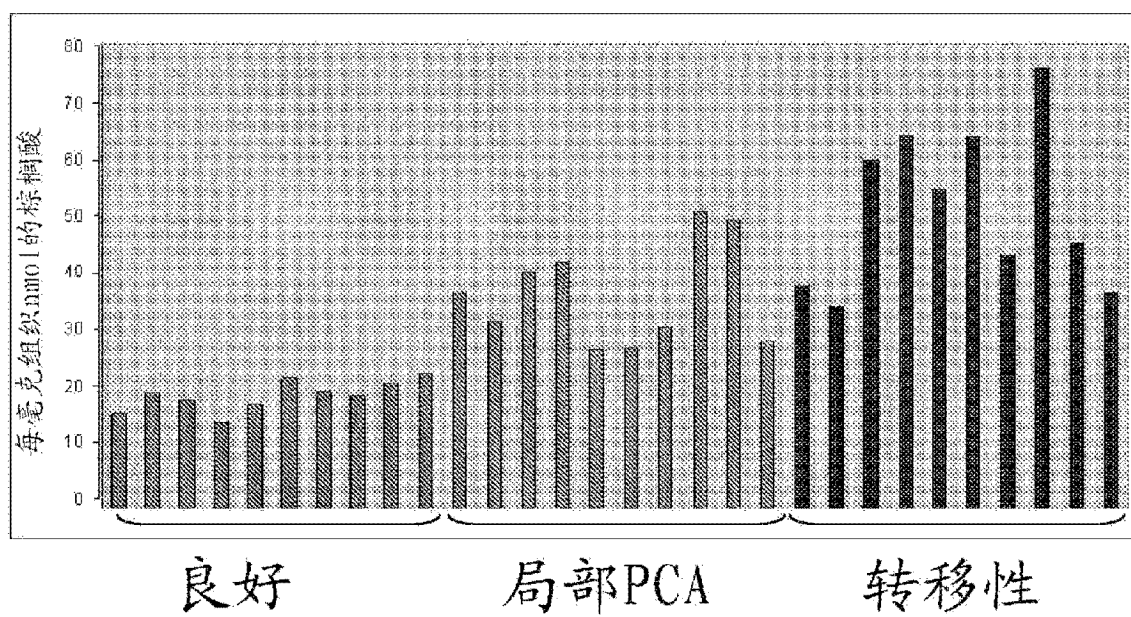


图 25

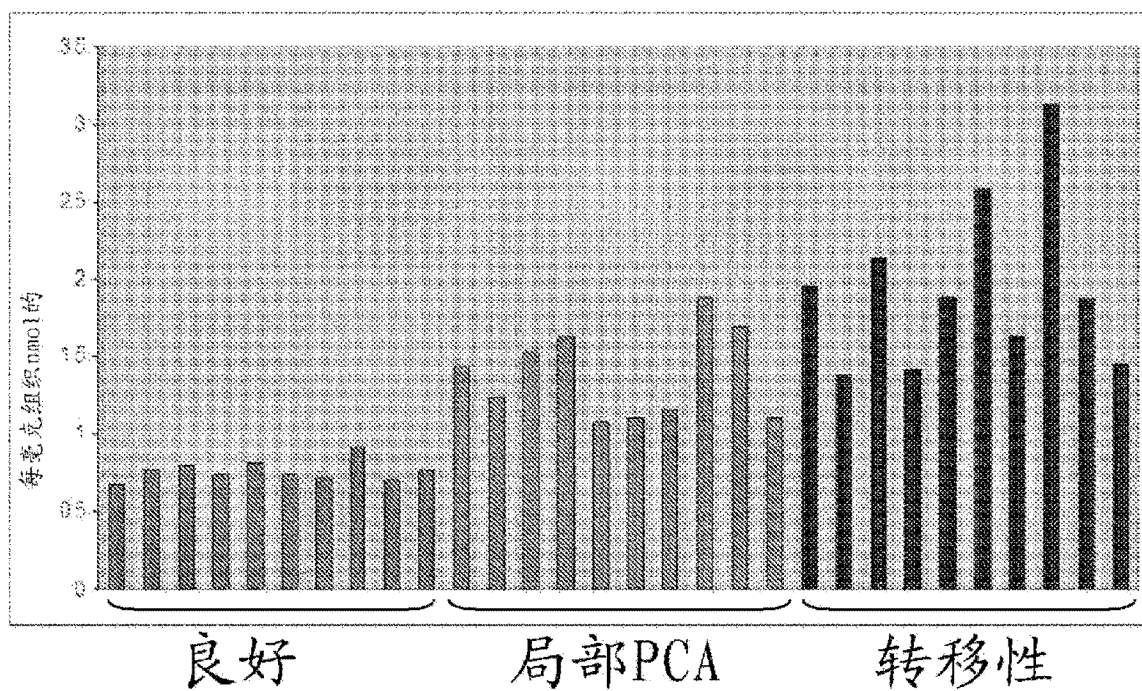


图 26

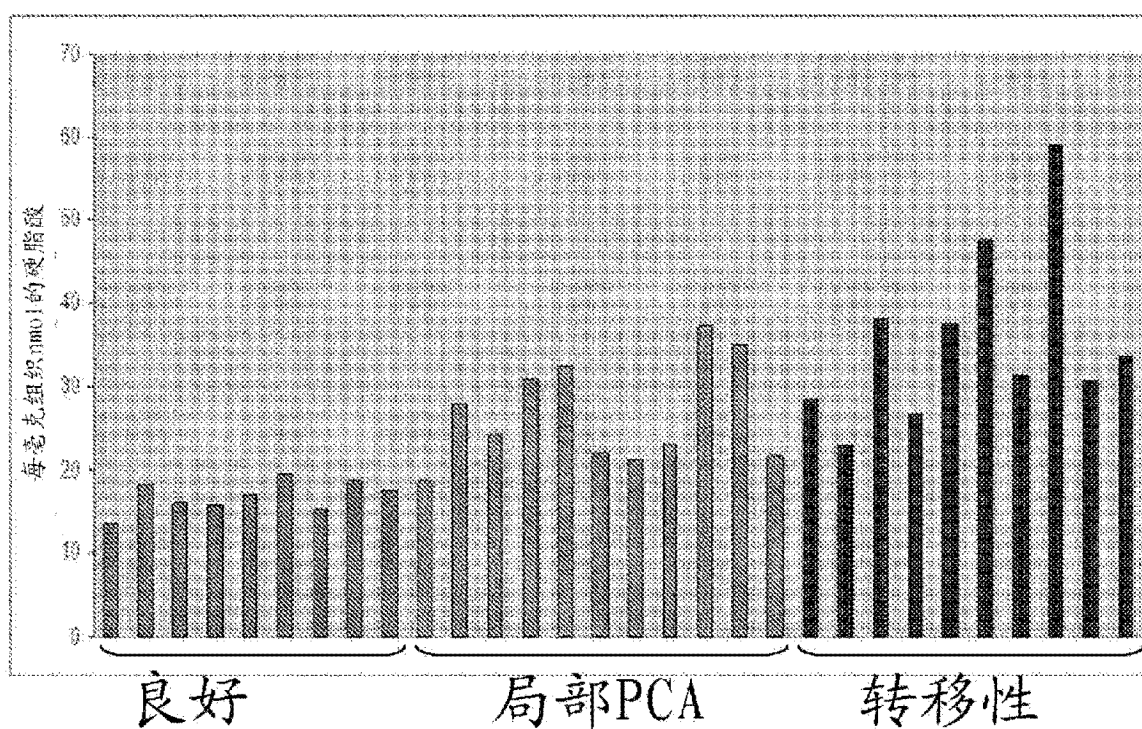


图 27

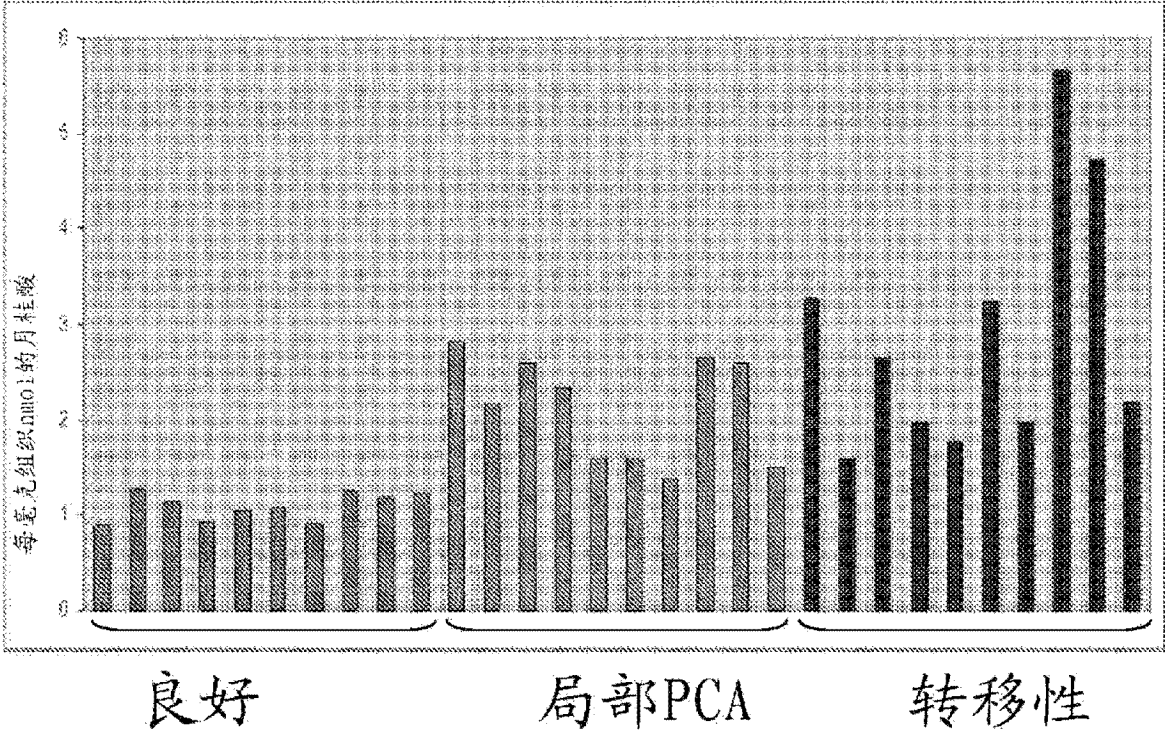


图 28

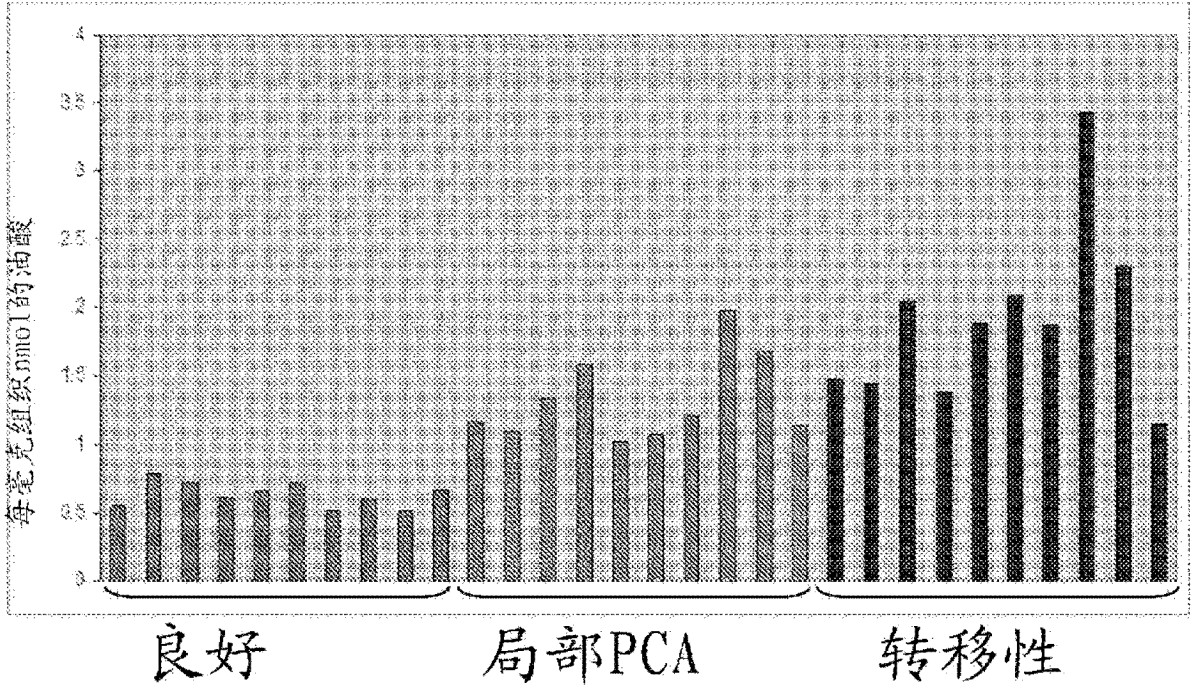


图 29

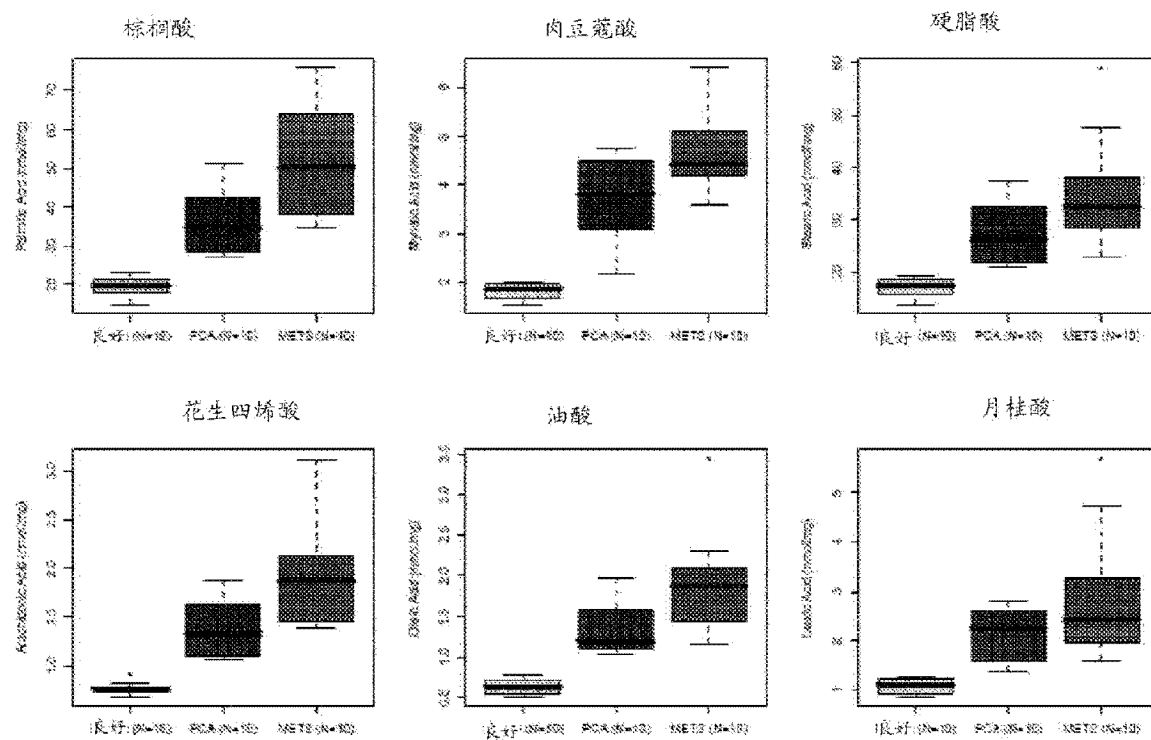


图 30

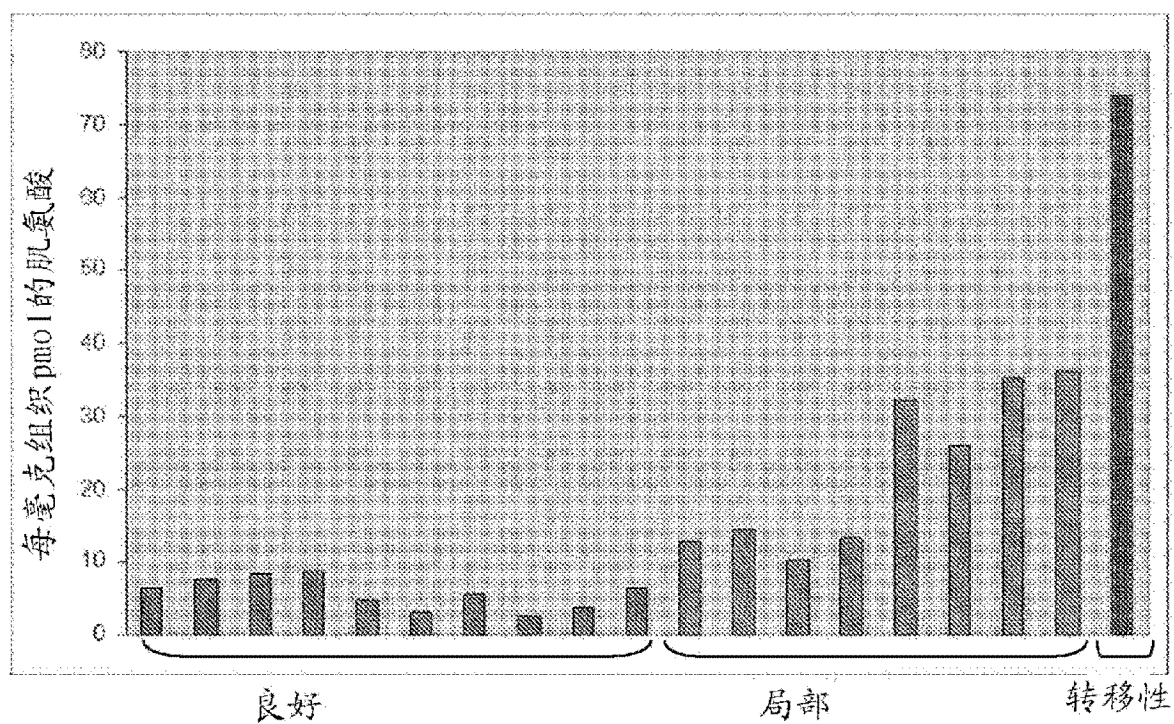


图 31

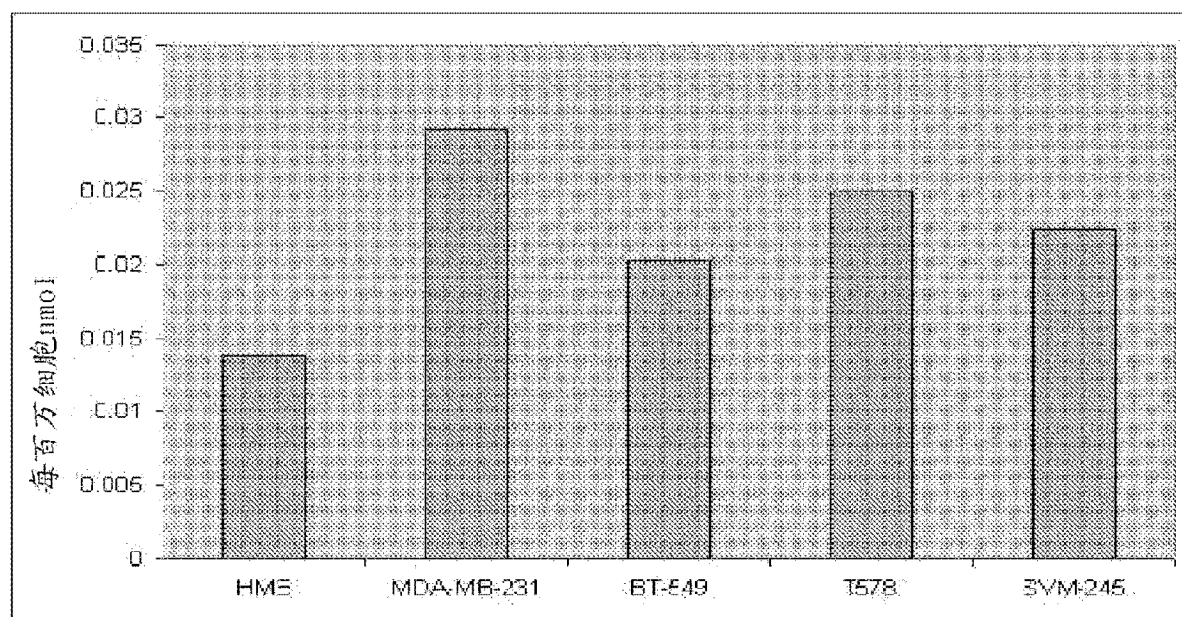


图 32

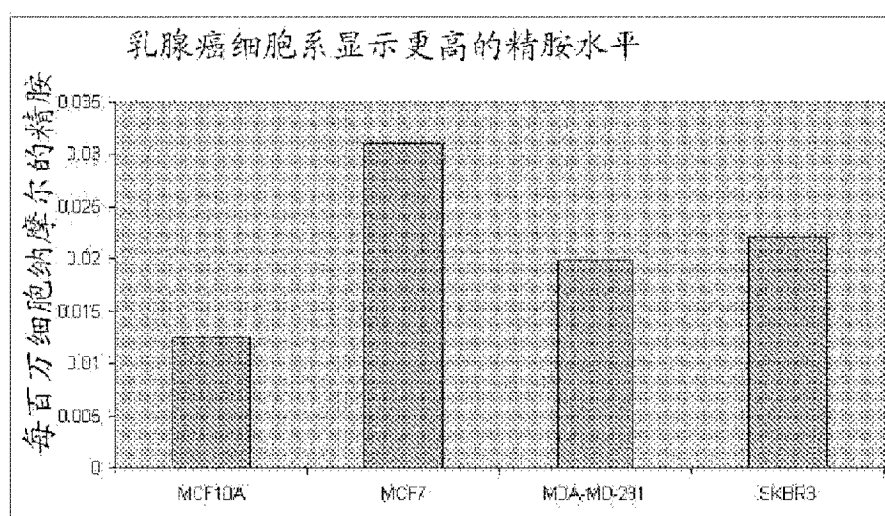
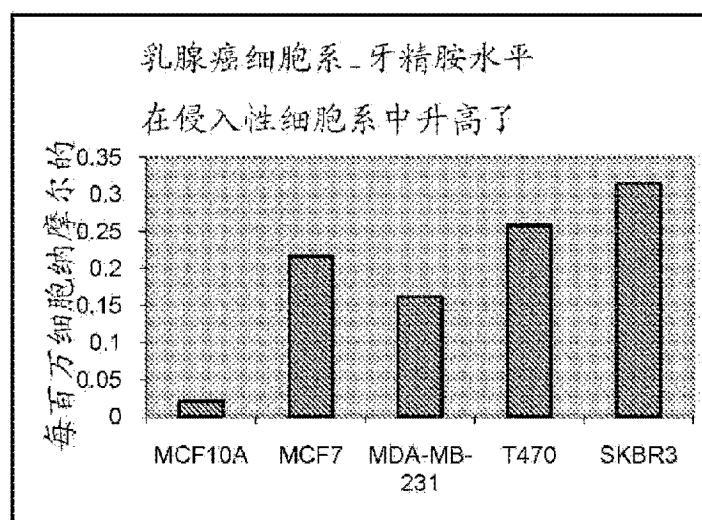
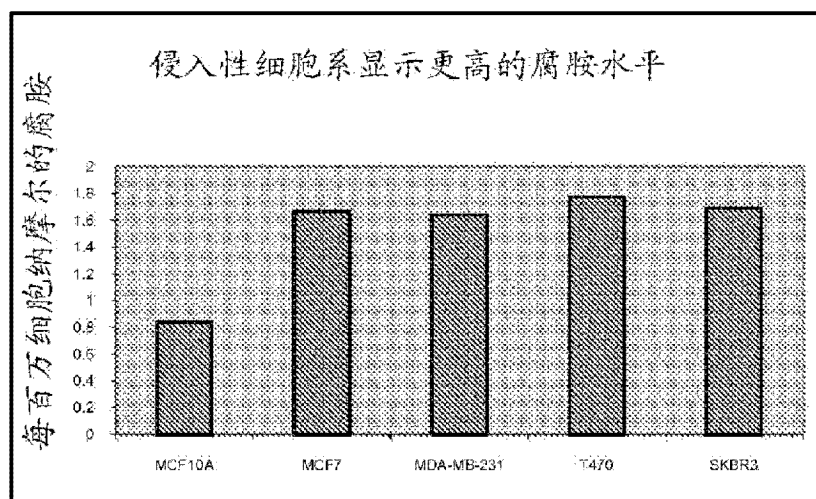


图 33

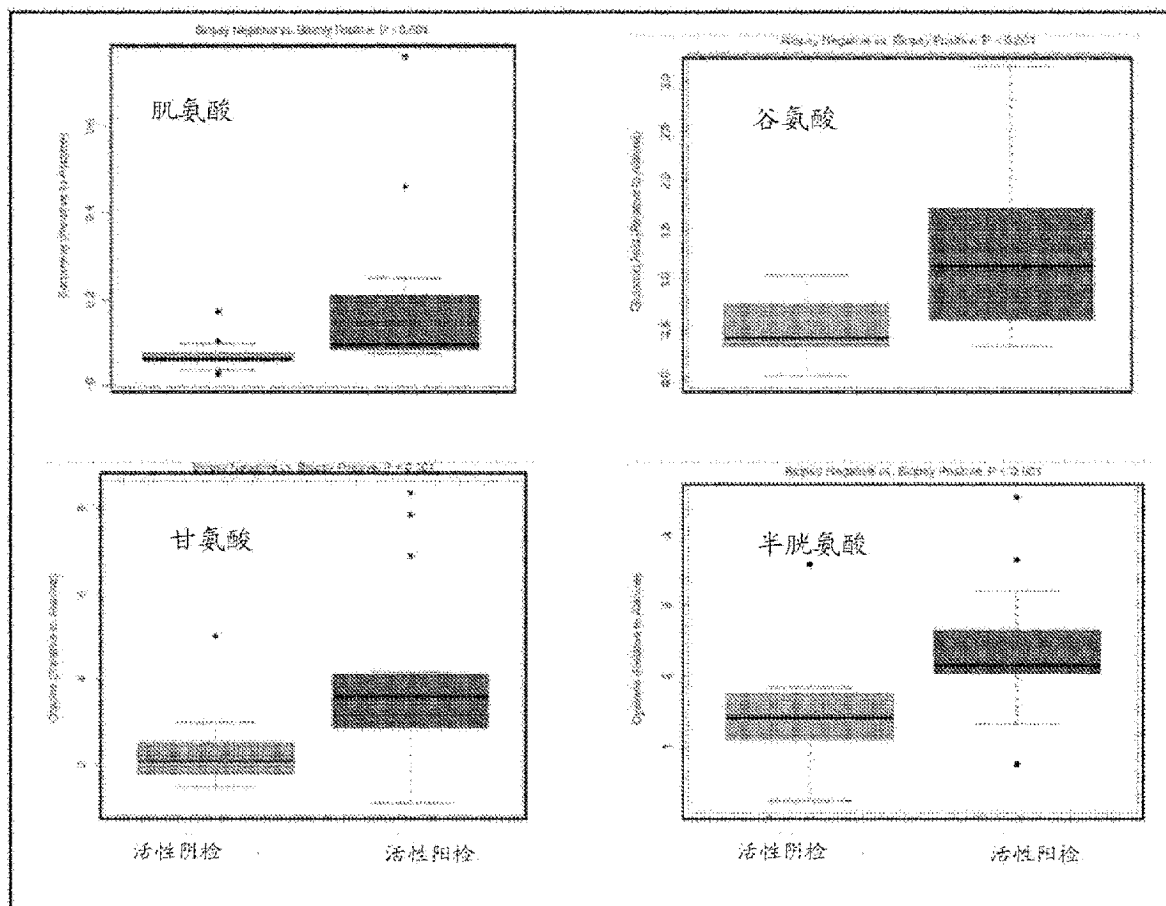


图 34

训练集的曲线下面积

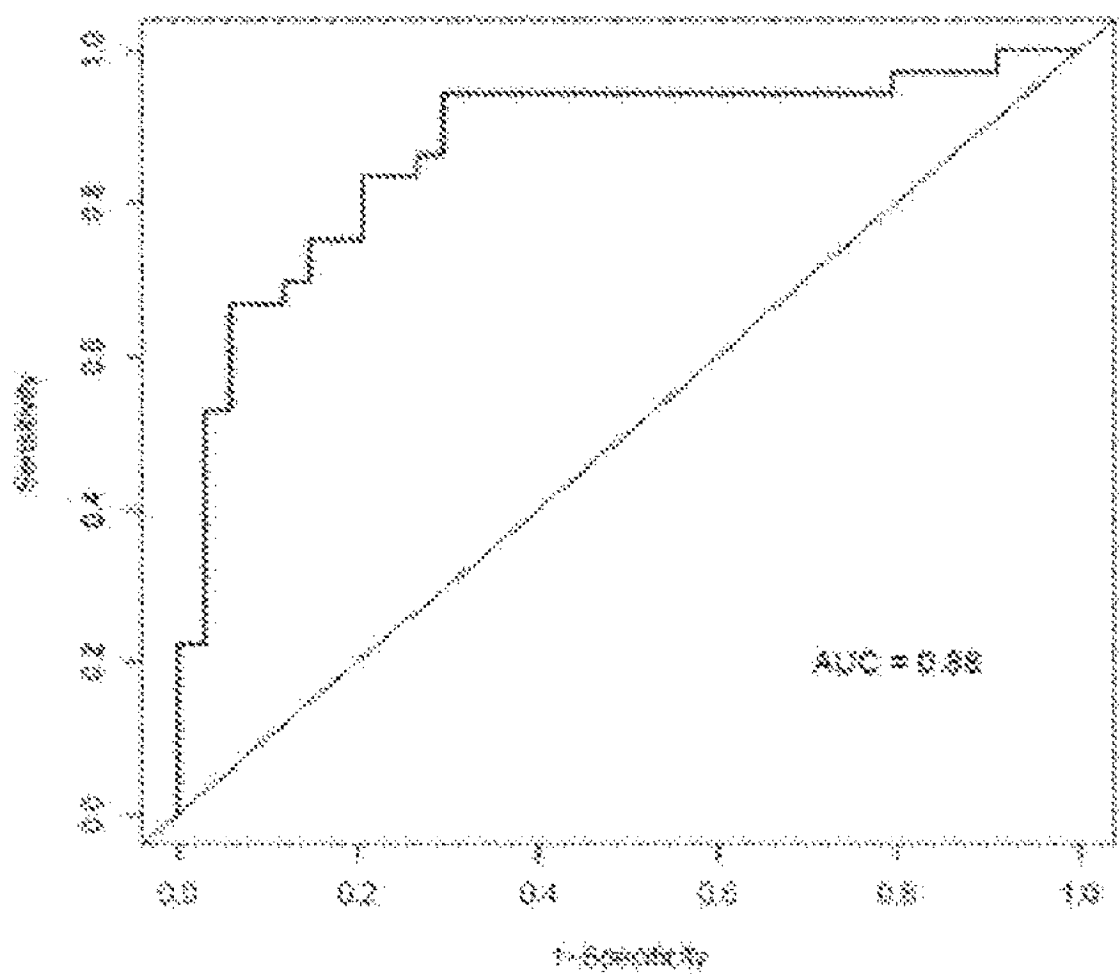


图 35

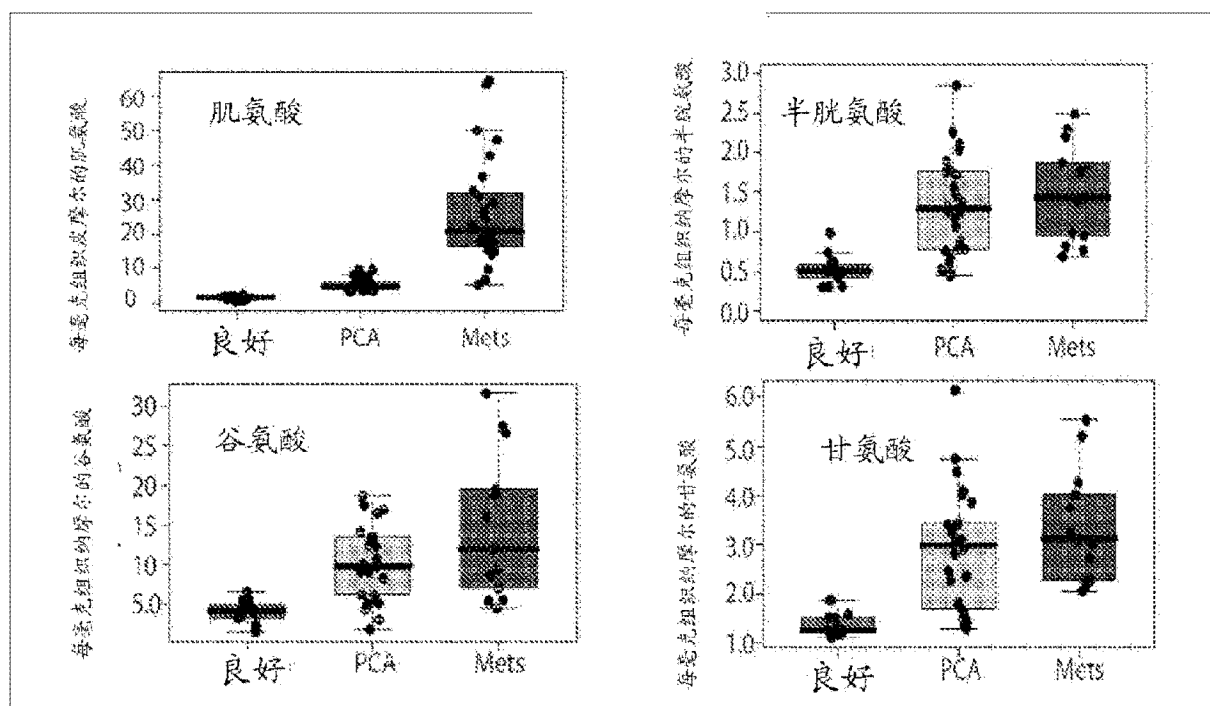


图 36

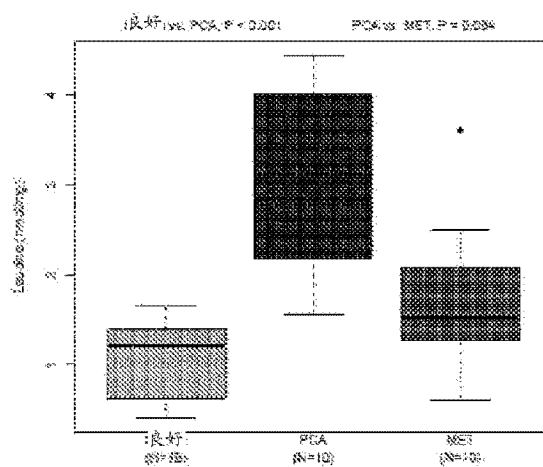
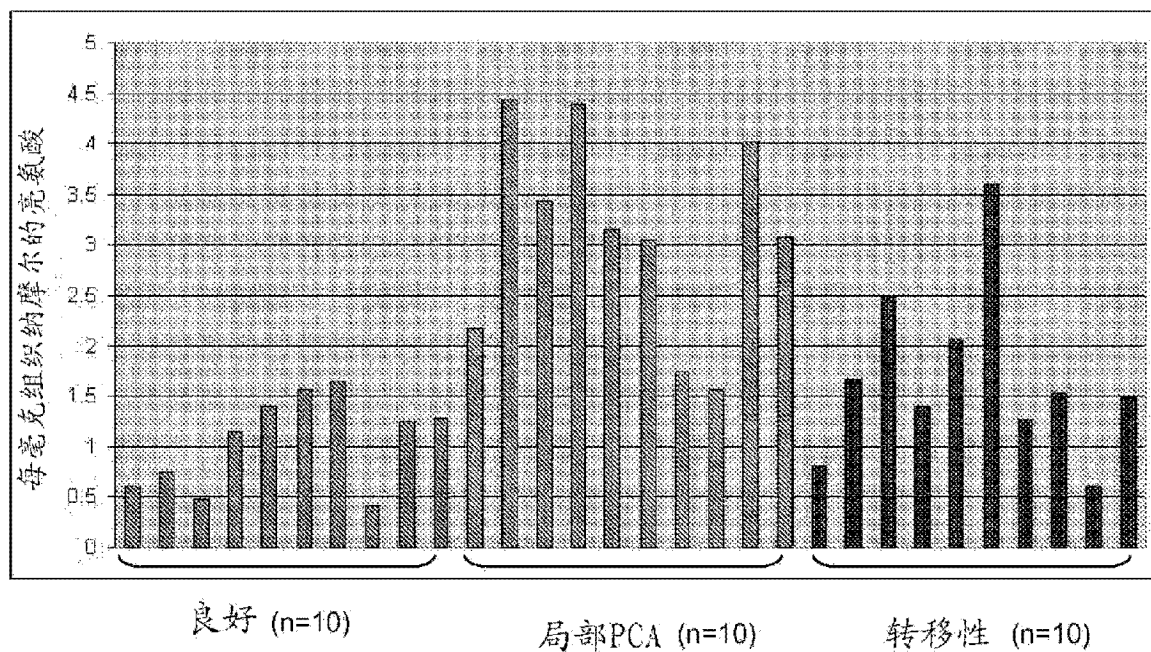


图 37

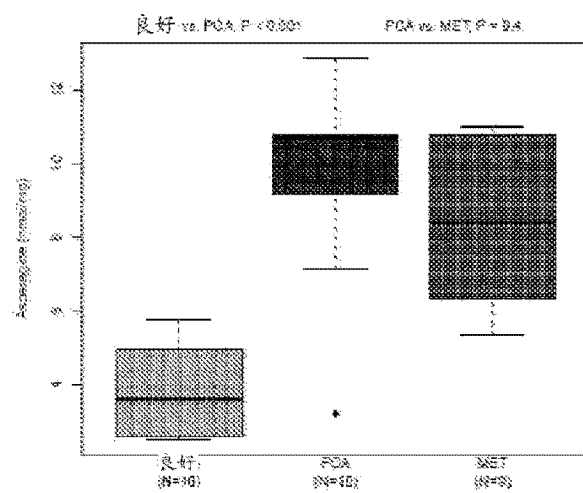
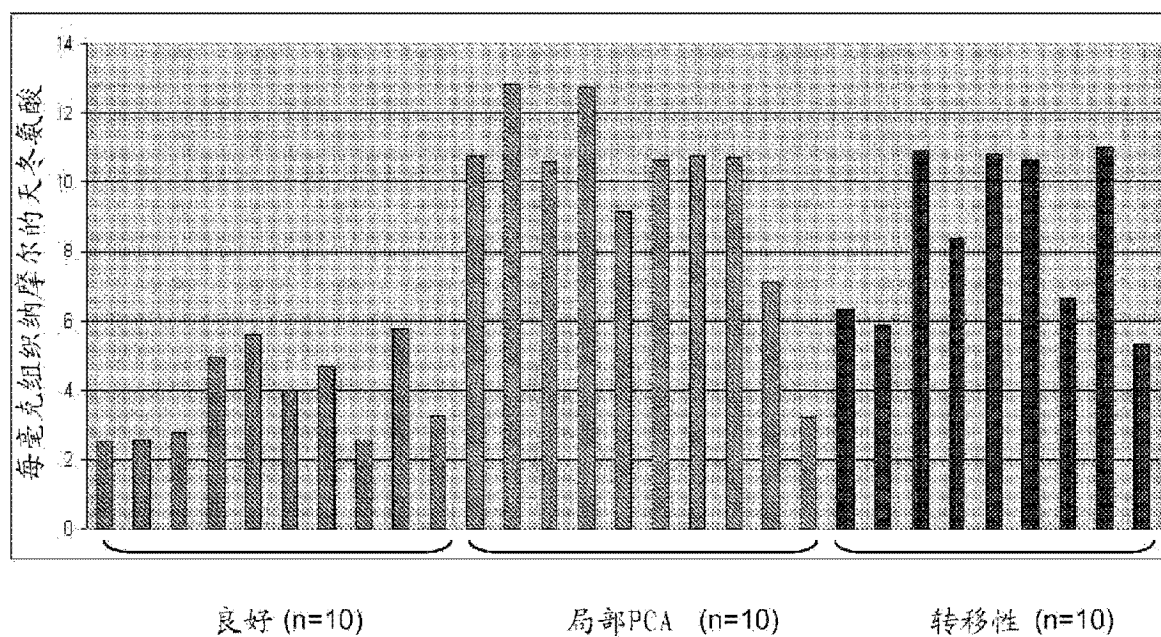


图 38

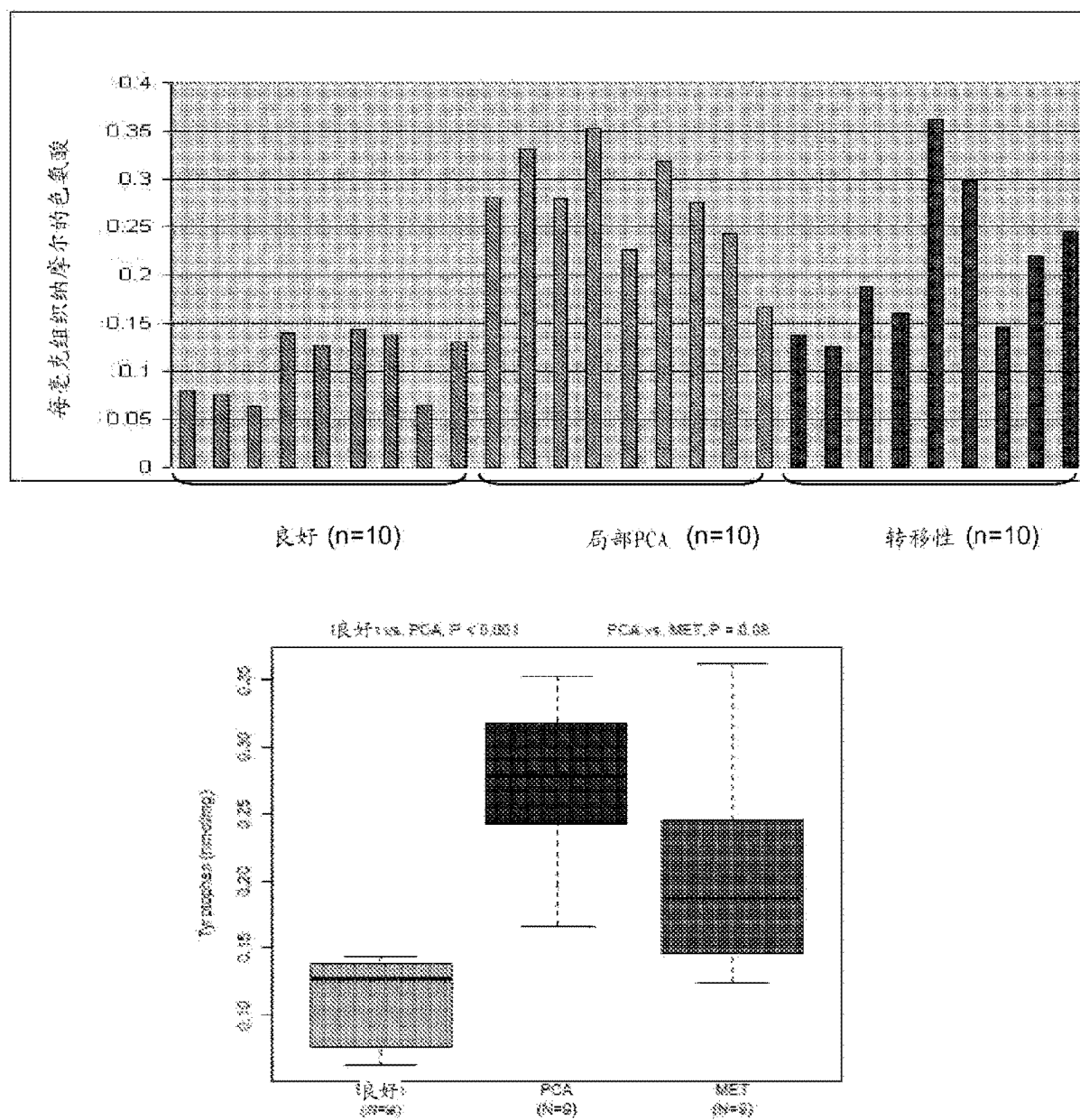


图 39

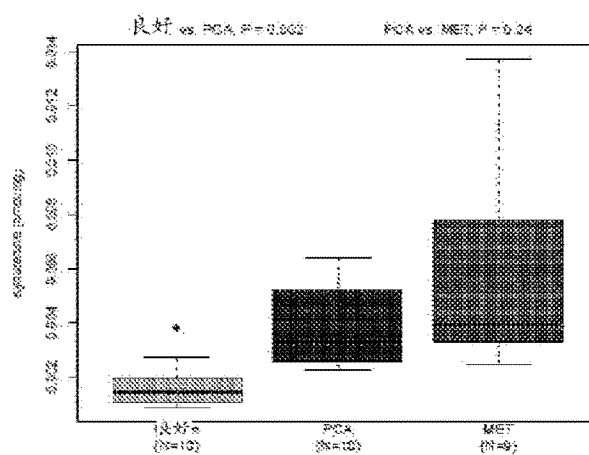
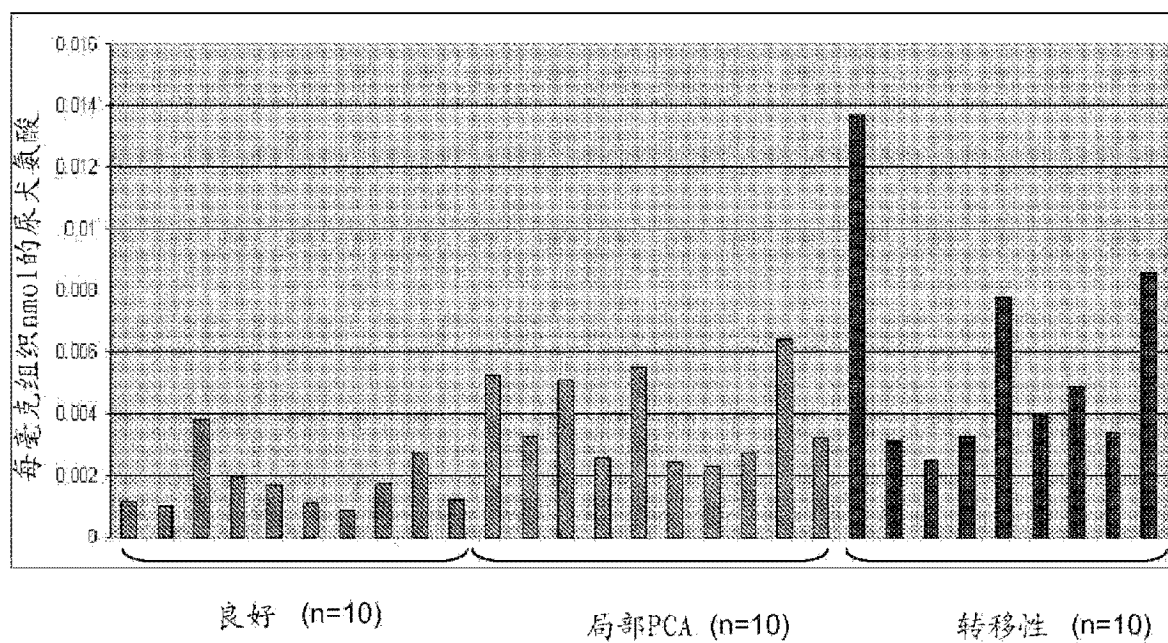


图 40

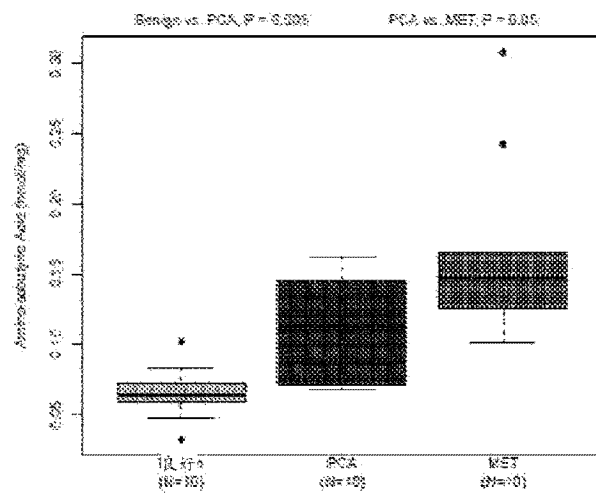
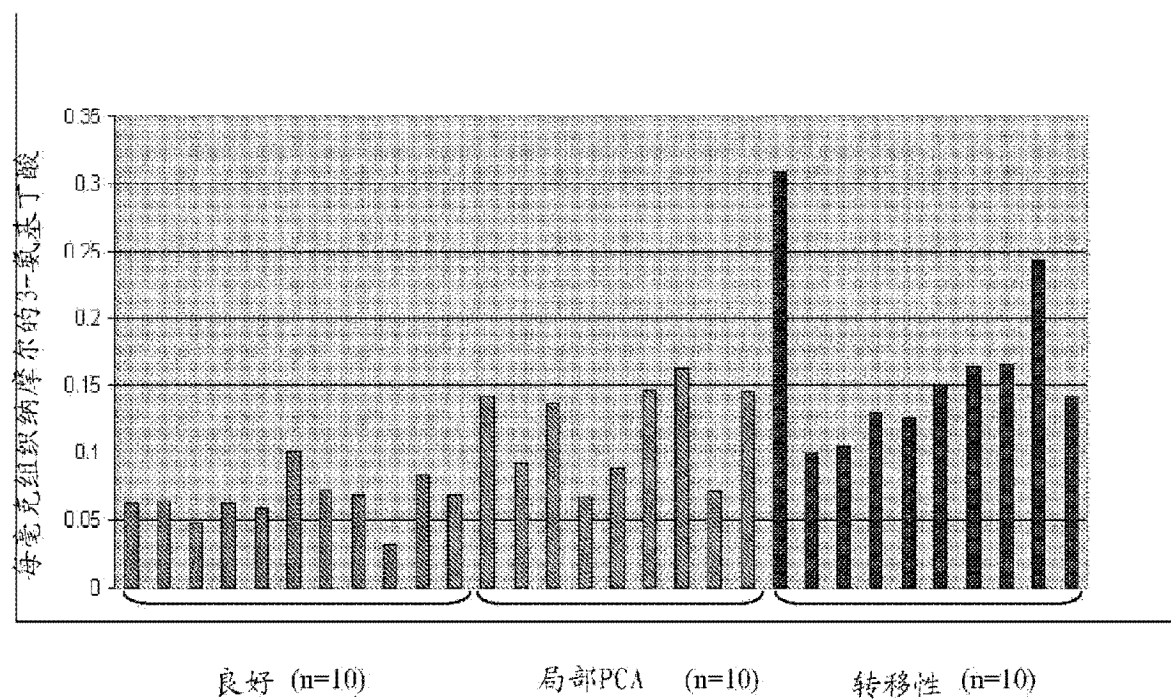


图 41

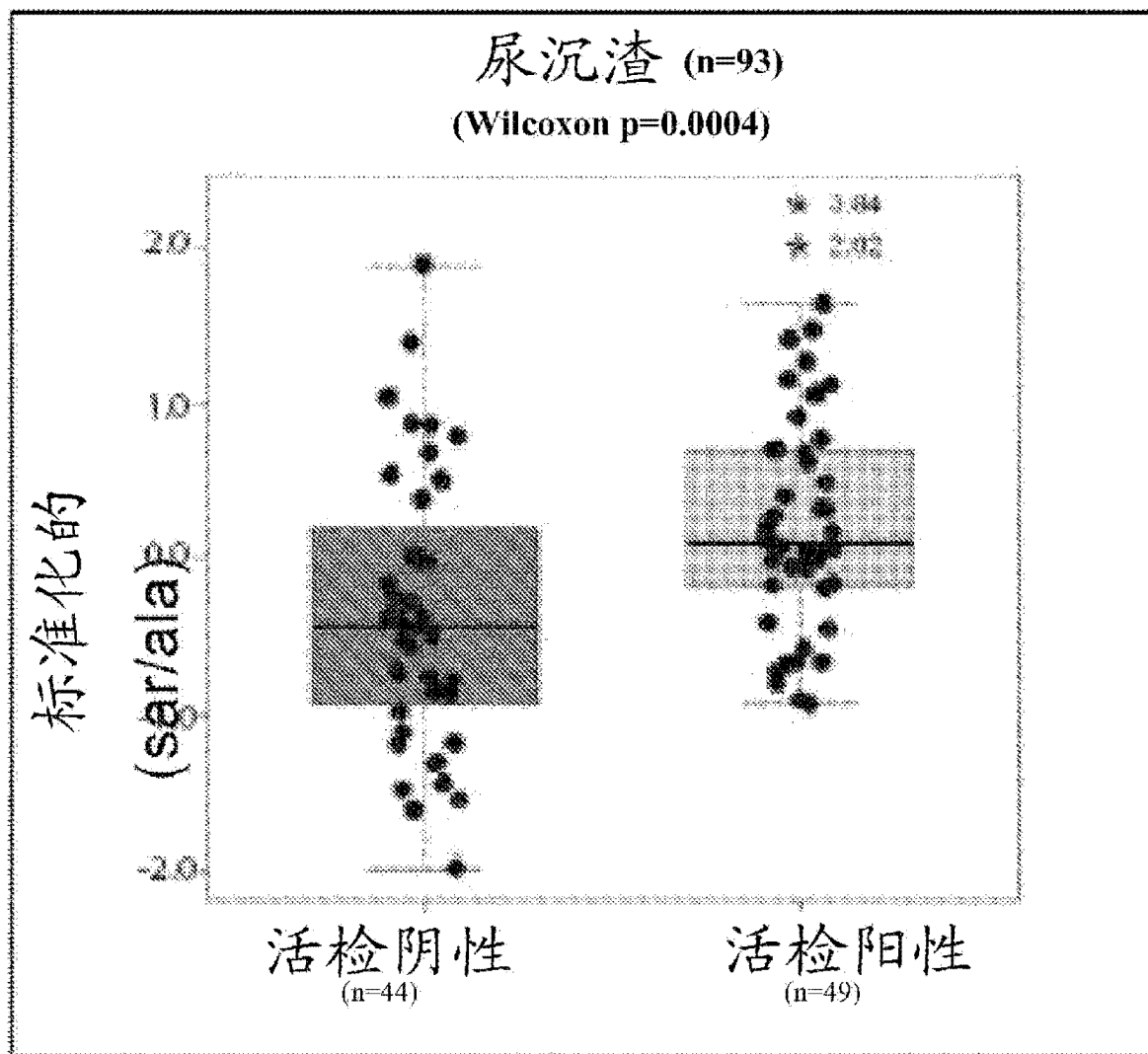


图 42

肌氨酸的再生性：独立制备

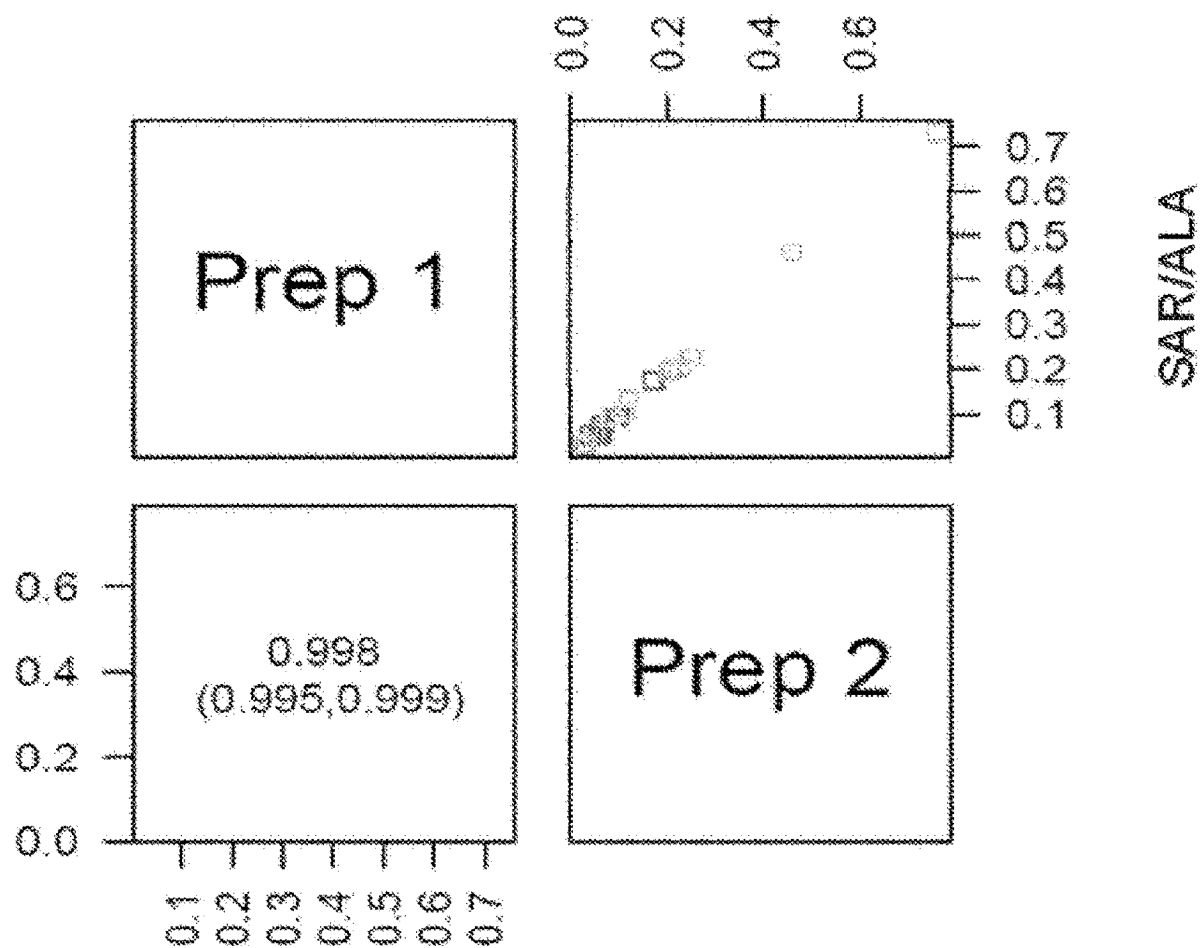


图 44

肌氨酸的再生性：复制

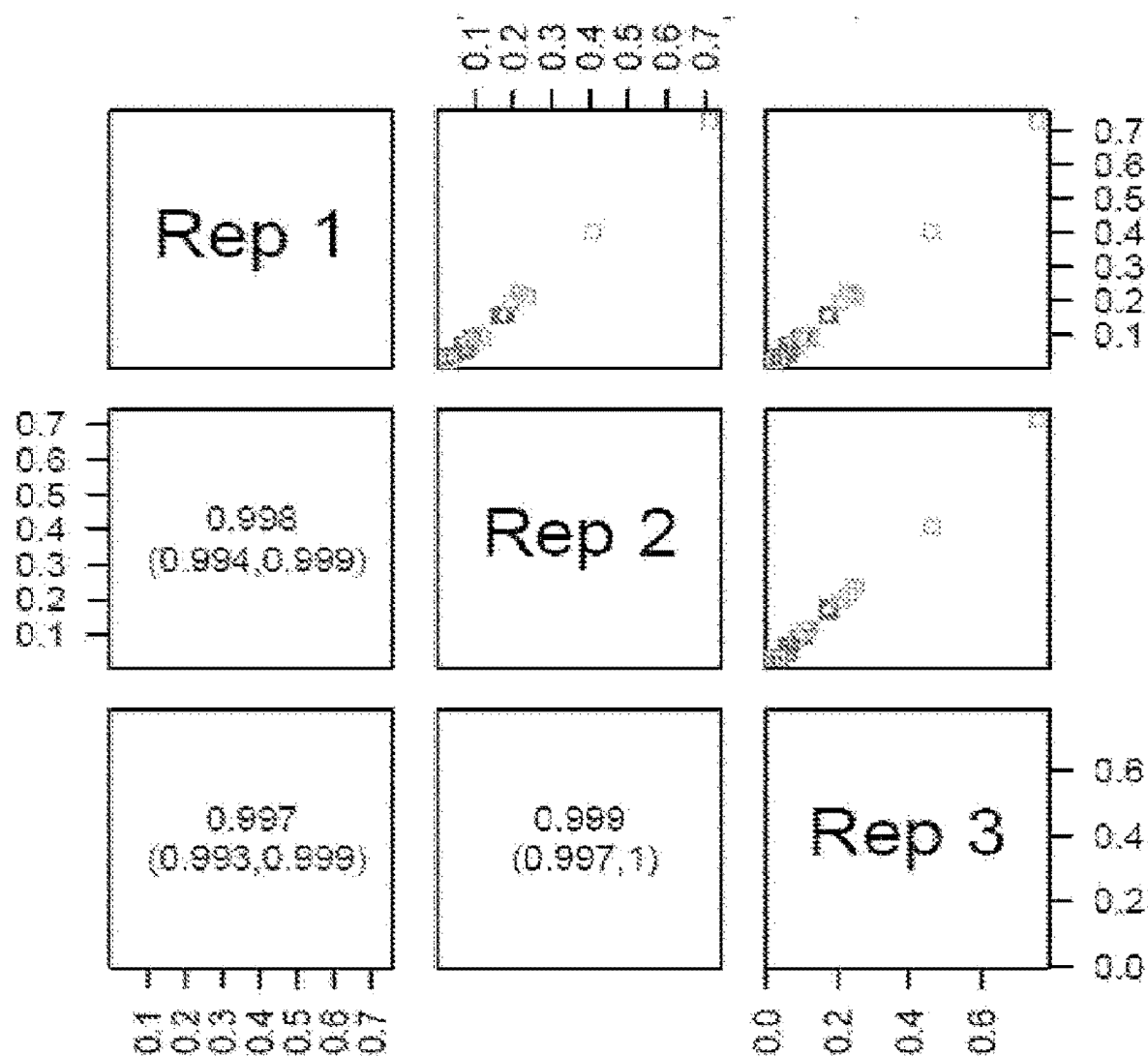


图 45

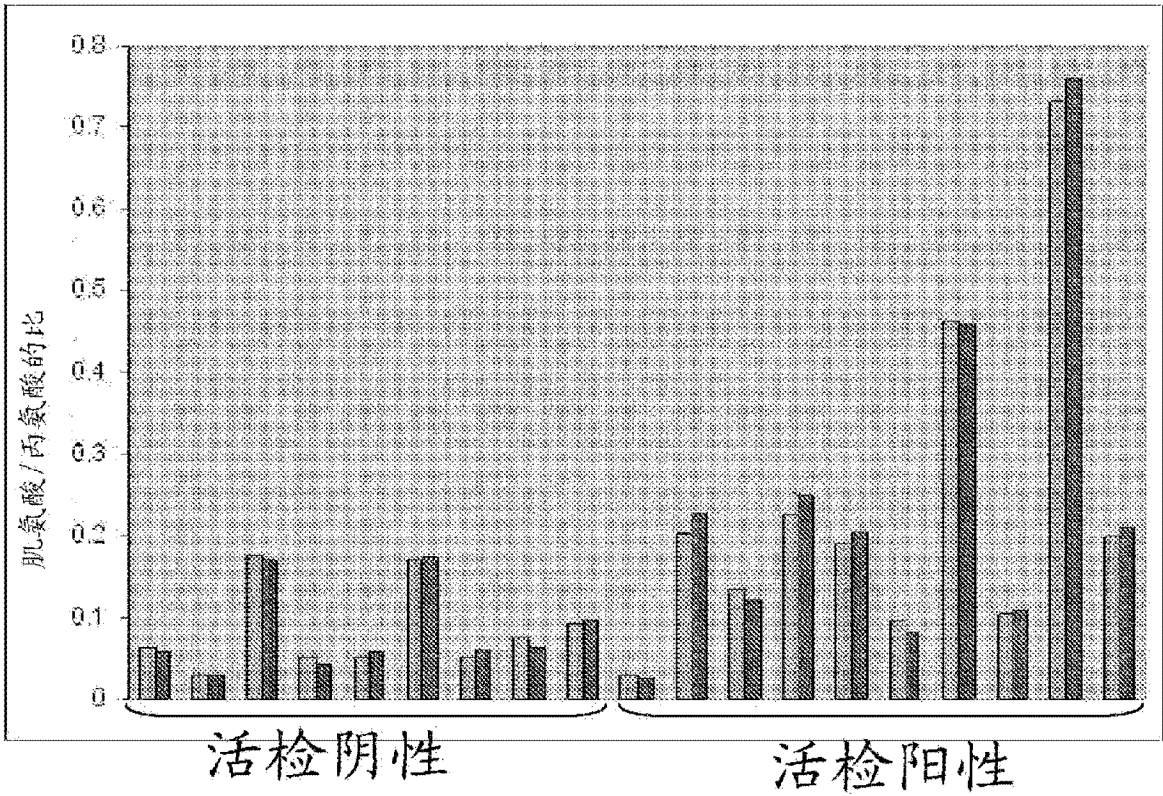


图 46

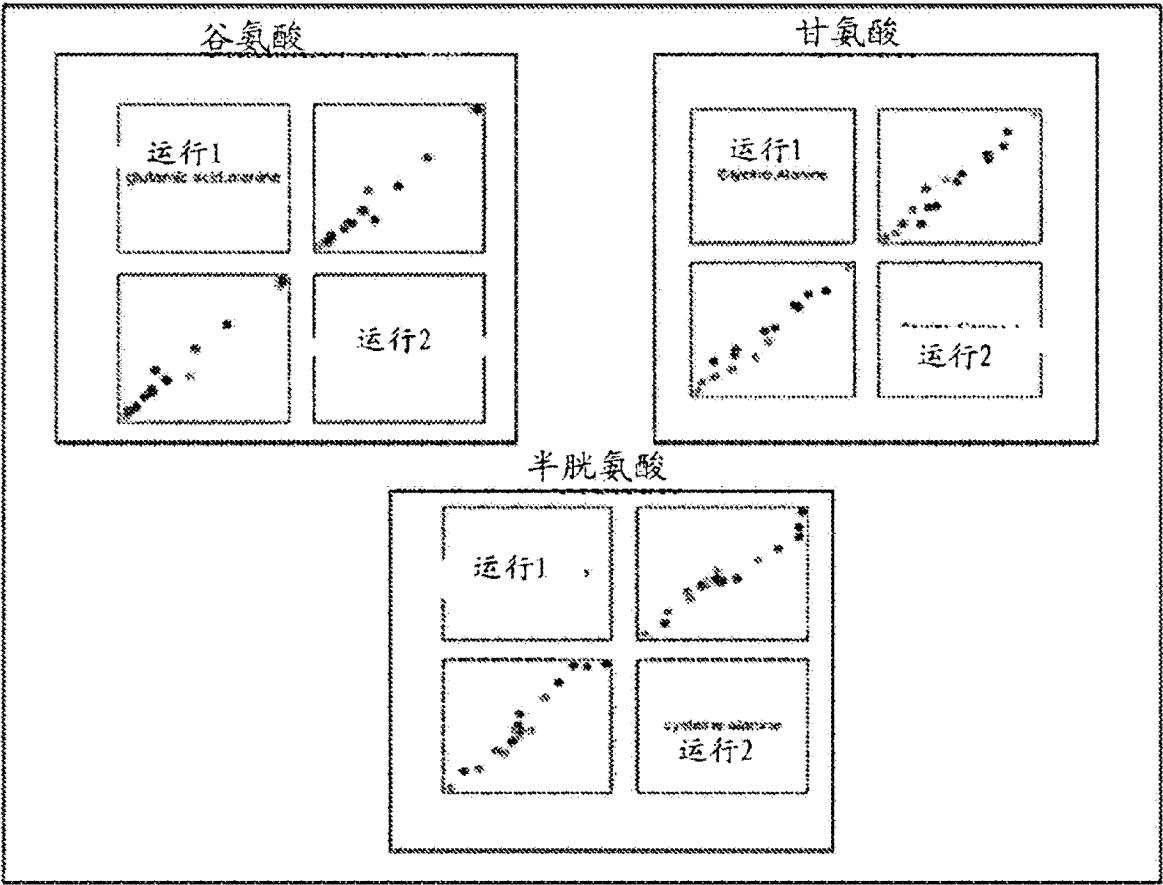


图 47