



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101438148 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 22

(21) 申请号 200780016028. 2

(22) 申请日 2007. 03. 02

(30) 优先权数据

60/778, 483 2006. 03. 02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 11. 03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/005279 2007. 03. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/103124 EN 2007. 09. 13

(73) 专利权人 珀金埃尔默健康科学股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 布拉斯·瑟达

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 吴培善

(51) Int. Cl.

G01N 24/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

Jens Martens-Lobenhoffer et. Fast and Efficient Determination of Arginine, Symmetric Dimethylarginine, and Asymmetric Dimethylarginine in Biological Fluids by Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. 《Clinical Chemistry》. 2005, 第 52 卷 (第 3 期), 488-493.

Edzard Schwedhelm. Quantification of ADMA: analytical approaches. 《Vascular Medicine》. 2005, 第 10 卷 89-95.

审查员 鄢亚东

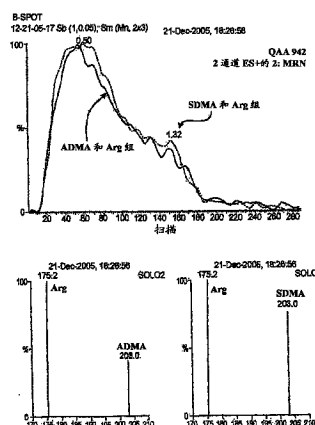
权利要求书3页 说明书16页 附图5页

(54) 发明名称

利用质谱判别异构体的方法

(57) 摘要

本发明公开了使用串联质谱判别二甲基精氨酸异构体的方法。该方法包括如下步骤：电离样品以产生离子；选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子；使所选择的离子碎裂以产生子离子；及通过检测在 ADMA 特有 m/z 下的子离子 m/z 信号和在 SDMA 特有 m/z 下的子离子 m/z 信号之一或二者，检测样品中的不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和对称二甲基精氨酸 (SDMA) 之一或二者。



1. 一种判别二甲基精氨酸异构体的方法,该方法包括:
电离样品以产生离子;
选择质荷比处于适于分离 ADMA 和 SDMA 离子的质荷比范围的离子;
使所选择的离子碎裂以产生子离子;及
通过检测在 ADMA 特有质荷比下的子离子质荷比信号和在 SDMA 特有质荷比下的子离子质荷比信号之一或二者,检测样品中的不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和对称二甲基精氨酸 (SDMA) 之一或二者。
2. 一种判别二甲基精氨酸异构体的方法,该方法包括:
电离样品以产生离子;
选择质荷比处于适于分离 ADMA 和 SDMA 离子的质荷比范围的离子;
使所选择的离子碎裂以产生子离子;及
检测在质荷比为约 46 时子离子质荷比信号的存在和在质荷比为约 172 时子离子质荷比信号的存在之一或二者,
其中在质荷比为约 46 时的子离子质荷比信号指示样品包含不对称二甲基精氨酸 (ADMA),在质荷比为约 172 时的子离子质荷比信号指示样品包含对称二甲基精氨酸 (SDMA)。
3. 一种检测对称二甲基精氨酸 (SDMA) 的方法,该方法包括:
电离样品以产生离子;
选择质荷比处于适于分离 ADMA 和 SDMA 离子的质荷比范围的离子;
使所选择的离子碎裂以产生子离子;及
通过检测在质荷比为约 172 时的子离子质荷比信号,检测样品中的对称二甲基精氨酸 (SDMA)。
4. 一种检测不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 的方法,该方法包括:
电离样品以产生离子;
选择质荷比处于适于分离 ADMA 和 SDMA 离子的质荷比范围的离子;
使所选择的离子碎裂以产生子离子;及
通过检测在质荷比为约 46 时的子离子质荷比信号,检测样品中的不对称二甲基精氨酸 (ADMA)。
5. 根据权利要求 1 ~ 4 中任一项的方法,其中所述质荷比约为 203。
6. 一种检测二甲基精氨酸异构体的方法,该方法包括:
提供包含一种或多种内标物的样品,其中至少一种内标物为含有至少一个重原子的二甲基精氨酸异构体;
电离该样品以产生离子;
选择具有与适于分离二甲基精氨酸异构体的范围相当的质荷比范围的离子,及选择处于一个或多个适于分离所述一种或多种内标物的其它质荷比范围的离子;
使所选择的离子碎裂以产生子离子;
通过利用子离子检测一个或多个只有 ADMA 才具有的子离子质荷比信号和 / 或一个或多个只有 SDMA 才具有的子离子质荷比信号,检测样品中的不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和 / 或对称二甲基精氨酸 (SDMA);及

检测所述一种或多种内标物。

7. 根据权利要求 6 的方法,其中所述与适于分离二甲基精氨酸异构体的范围相当的质荷比为约 203。

8. 根据权利要求 6 或 7 的方法,其中所述样品包含第一内标物和第二内标物,该第一内标物为具有至少一个重原子的 SDMA 异构体,该第二内标物为具有至少一个重原子的 ADMA 异构体,且其中 SDMA 和 ADMA 异构体具有不同的原子量。

9. 根据权利要求 6 或 7 的方法,其中所述样品包含第一内标物和第二内标物,该第一内标物为具有至少一个重原子的 SDMA 异构体,该第二内标物为具有至少一个重原子的 ADMA 异构体,且其中 SDMA 和 ADMA 异构体具有相同的原子量。

10. 根据权利要求 6-9 中任一项的方法,其中所述内标物包括含有至少一个重原子的二甲基精氨酸异构体。

11. 根据权利要求 6-9 中任一项的方法,其中所述内标物包括具有至少一个重原子的基准性 SDMA 异构体和具有至少一个重原子的基准性 ADMA 异构体,且其中基准性 SDMA 和 ADMA 异构体彼此具有不同的原子量。

12. 根据权利要求 1 ~ 11 中任一项的方法,还包括测量样品中 SDMA 的含量。

13. 根据权利要求 1 ~ 12 中任一项的方法,还包括测量样品中 ADMA 的含量。

14. 根据权利要求 1 ~ 12 中任一项的方法,还包括测量 SDMA 和 ADMA 的含量。

15. 根据权利要求 1 ~ 14 中任一项的方法,其中电离的样品为生物样品。

16. 根据权利要求 1 ~ 15 中任一项的方法,其中电离的样品除二甲基精氨酸之外还包含化合物。

17. 根据权利要求 1 ~ 16 中任一项的方法,其中电离的样品包含不在尺寸排阻色谱柱上共迁移的化合物。

18. 根据权利要求 1 ~ 16 中任一项的方法,其中检测一种或多种另外的分析物。

19. 根据权利要求 18 的方法,其中所述一种或多种另外的分析物为代谢的生物分子。

20. 根据权利要求 18 或 19 的方法,其中所述一种或多种另外的分析物为氨基酸。

21. 根据权利要求 18 或 19 的方法,其中所述一种或多种另外的分析物为酰基肉碱。

22. 根据权利要求 18 或 19 的方法,其中所述一种或多种另外的分析物选自:瓜氨酸,二甲胺,精氨酸,鸟氨酸,同型半胱氨酸,及肌酸。

23. 根据权利要求 18 ~ 22 中任一项的方法,其中测量所述一种或多种另外的分析物。

24. 根据权利要求 23 的方法,其中利用串联质谱测量所述一种或多种另外的分析物。

25. 根据权利要求 1 ~ 24 中任一项的方法,其中在电离样品之前,不化学改性该样品。

26. 根据权利要求 1 ~ 24 中任一项的方法,其中在电离样品之前,化学改性该样品。

27. 根据权利要求 1 ~ 26 中任一项的方法,其中在电离样品之前,向该样品中添加内标物。

28. 根据权利要求 1 ~ 27 中任一项的方法,其中测量质荷比约 46 时的信号水平和质荷比约 172 时的信号水平。

29. 根据权利要求 28 的方法,还包括确定取决于质荷比约 46 时的子离子质荷比信号及质荷比约 172 时的子离子质荷比信号的函数的结果。

30. 一种用于检测不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和对称二甲基精氨酸 (SDMA) 的试剂盒,

该试剂盒包括：

ADMA 和 SDMA 之一或二者，其中 ADMA 和 SDMA 之一或二者含有至少一个重原子同位素；
及

如何使用权利要求 1-4 任一项的方法检测 SDMA 和 ADMA 的说明书。

31. 根据权利要求 30 的试剂盒，还包括有机酸。

32. 根据权利要求 31 的试剂盒，其中所述有机酸为草酸。

33. 根据权利要求 30 ~ 32 中任一项的试剂盒，还包括用于检测 ADMA 和 SDMA 之一或二者的计算机软件。

利用质谱判别异构体的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

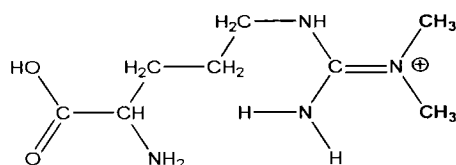
[0002] 本申请要求 2006 年 3 月 2 日提交的美国申请 60/778483 的优先权, 该申请的内容引入本文作为参考。

发明内容

[0003] 本发明涉及利用质谱判别分子异构体的方法, 等等。例如, 本公开涉及利用串联质谱检测二甲基精氨酸异构体之一或二者的方法。

[0004] 这些方法具有很多应用并且可用于检测样品 (例如来自合成的样品或来自受试者的样品) 中的二甲基精氨酸。在诊断情况下, 所述方法可用于获得受试者 (例如人) 的代谢分布图。代谢分布图是一种信息, 该信息包括有关代谢产物的一双异构体之一或二者状态的情报, 例如, 二甲基精氨酸的两个异构体: 不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和对称二甲基精氨酸 (SDMA) 之一或二者:

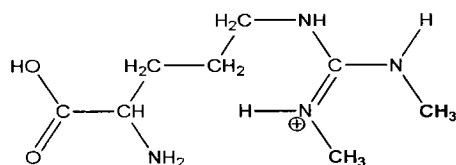
[0005]



[0006]

(ADMA), 及

[0007]



[0008]

(SDMA)。

[0009] 在一些实施方案中, 代谢分布图包括有关其它分子例如其它代谢产物的情报。所得代谢分布图可用于评估受试者 (例如人) 的健康状况, 例如是否存在诸如血管病症 (如心血管病症或高血压病症) 等病症。

[0010] 一方面, 本公开涉及判别二甲基精氨酸异构体的方法。该方法包括如下步骤: 电离样品以产生离子; 选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子; 使所选择的离子碎裂以产生子离子; 及通过检测在 ADMA 特有的 m/z 下的子离子 m/z 信号和在 SDMA 特有的 m/z 下的子离子 m/z 信号之一或二者, 检测样品中的不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和对称二甲基精氨酸 (SDMA) 之一或二者。

[0011] 另一方面, 本公开涉及一种判别二甲基精氨酸异构体的方法, 该方法包括如下步骤: 电离样品以产生离子; 选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子; 使所选择的离子碎裂以产生子离子; 及检测在 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的存在和在 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的存在之一或二者, 其中在 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号指示样品包含不对称二甲基精氨酸 (ADMA), 而在 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号则指示样品包含对称二甲基精氨酸 (SDMA)。

氨酸 (SDMA)。所述 m/z 范围可以为 m/z 约 203。

[0012] 另一方面,本公开涉及检测对称二甲基精氨酸 (SDMA) 的方法,该方法包括如下步骤:电离样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;及检测样品中的对称二甲基精氨酸 (SDMA),即检测在 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号。所述 m/z 范围可以为 m/z 约 203。

[0013] 另一方面,本公开涉及检测不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 的方法。该方法包括如下步骤:电离样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;及检测样品中的不对称二甲基精氨酸 (ADMA),即检测在 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号。所述 m/z 范围可以为 m/z 约 203。

[0014] 在上述任一方法的一些实施方案中,可在电离样品之前向样品中添加内标物。内标物可以是或者包含含有至少一个重原子的二甲基精氨酸异构体。内标物可以包含或可以为具有至少一个重原子的基准性 SDMA 异构体和具有至少一个重原子的基准性 ADMA 异构体,其中所述基准性 SDMA 和 ADMA 异构体彼此具有不同的原子量。

[0015] 另一方面,本公开涉及检测二甲基精氨酸异构体的方法,该方法包括如下步骤:提供包含一种或多种内标物的样品,其中至少一种内标物为包含至少一个重原子的二甲基精氨酸异构体;电离样品以产生离子;选择具有与适于分离二甲基精氨酸异构体(例如天然存在的异构体)的范围相当的 m/z 范围的离子,并选择处于一个或多个适于分离所述一种或多种内标物的其它 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;通过利用子离子检测一个或多个只有 ADMA 才具有的子离子 m/z 信号和/或一个或多个只有 SDMA 才具有的子离子 m/z 信号,检测样品中的不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和/或对称二甲基精氨酸 (SDMA);及检测所述一种或多种内标物。

[0016] 在一些实施方案中,所述与适于分离二甲基精氨酸异构体的范围相当 m/z 范围为 m/z 约 203。在一些实施方案中,样品可包含第一内标物和第二内标物,第一内标物为具有至少一个重原子的 SDMA 异构体,第二内标物为具有至少一个重原子的 ADMA 异构体,其中 SDMA 和 ADMA 异构体具有不同的原子量。在一些实施方案中,样品包含本身为具有至少一个重原子的 SDMA 异构体的第一内标物,及本身为具有至少一个重原子的 ADMA 异构体的第二内标物,且其中 SDMA 和 ADMA 异构体具有相同的原子量。

[0017] 在上述任一方法的一些实施方案中,该方法可进一步包括测量样品中 SDMA 和/或 ADMA 的含量的步骤。

[0018] 在上述任一方法的一些实施方案中,电离的样品可以是生物样品。该生物样品可以或也可以包含:血液,血清,血浆,淋巴,羊水,唾液,脑脊髓液,泪液,粘液,尿,痰,或者汗。

[0019] 在上述任一方法的一些实施方案中,电离的样品可以除二甲基精氨酸之外还包含化合物。电离的样品可以包含不在尺寸排阻色谱柱上共迁移 (co-migrate) 的化合物。

[0020] 在上述任一方法的一些实施方案中,可以检测一种或多种另外的分析物。所述一种或多种另外的分析物可以是代谢的生物分子。所述一种或多种另外的分析物可以是氨基酸或酰基肉碱 (acylcarnitine)。所述一种或多种另外的分析物选自:瓜氨酸,二甲胺,精氨酸,鸟氨酸 (ornithine),同型半胱氨酸,及肌酸。在一些实施方案中,可以利用例如串联质谱测量所述一种或多种另外的分析物。

[0021] 在上述任一方法的一些实施方案中,在电离样品之前不化学改性该样品。在上述

任一方法的一些实施方案中,在电离样品之前化学改性该样品。

[0022] 在上述任一方法的一些实施方案中,可以测量 m/z 约 46 时的信号水平和 m/z 约 172 时的信号水平,例如,通过测定取决于 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号和 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的函数的结果进行测量。

[0023] 另一方面,本公开涉及诊断以 ADMA 或 SDMA 含量的变化为特征的病症的方法,该方法包括:提供受试者的生物样品;电离该生物样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;及测量作为 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的函数的 ADMA 含量和作为 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的函数的 SDMA 含量,其中生物样品中 ADMA 和 SDMA 之一或二者的含量相对于基准样品中的含量的变化,表示受试者患有以 ADMA 或 SDMA 含量的变化为特征的病症或者存在患有这种病症的风险。所述病症可用 ADMA 含量的增加和 / 或 SDMA 含量的增加为特征。以 ADMA 或 SDMA 含量的变化为特征的病症可以是血管病症和 / 或高血压病症。高血压病症可以是先兆子痫 (preeclampsia)。所述 m/z 范围可以是 m/z 约 203。电离的生物样品除二甲基精氨酸之外还可以包含化合物。受试者可以是哺乳动物,例如人。血管病症可以是心血管病症或高血压病症。高血压病症可以是先兆子痫。心血管病症可以是动脉粥样硬化。血管病症可以是糖尿病,高胆固醇血症,肾机能不全,或者高血压。在一些实施方案中,可以测量在 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的水平和在 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的水平。基准样品可以来自受试者,该受试者不患有、不疑似患有心血管病症,或不存在患有这种病症的风险。生物样品可以是或者包含:血液,血清,血浆,淋巴,羊水,唾液,脑脊髓液,泪液,粘液,尿,痰,或者汗。

[0024] 在一些实施方案中,可以测量一种或多种另外的分析物。所述一种或多种另外的分析物可以是:瓜氨酸,二甲胺,精氨酸,鸟氨酸,同型半胱氨酸,及肌酸。所述一种或多种另外的分析物可以是氨基酸或酰基肉碱。可以例如利用质谱测量所述一种或多种另外的分析物。

[0025] 在一些实施方案中,可以在电离样品之前向生物样品中添加内标物。内标物可以是或者包含:含有至少一个重原子的二甲基精氨酸异构体。内标物可以是或者包含:具有至少一个重原子的 SDMA 异构体,及具有至少一个重原子的 ADMA 异构体,且其中 SDMA 和 ADMA 异构体具有不同的原子量。

[0026] 再一方面,本公开涉及诊断受试者血管病症的方法,该方法包括如下步骤:提供受试者的生物样品;电离该生物样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;及测量作为 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的函数的 ADMA 含量以及作为 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的函数的 SDMA 含量之一或二者,其中生物样品中 ADMA 和 SDMA 之一或二者的含量相对于基准样品中的含量的升高表明,受试者患有血管病症或者存在患有这种病症的风险。所述 m/z 范围可以为 m/z 约 203。电离的生物样品除二甲基精氨酸之外还可以包含化合物。受试者可以是哺乳动物,例如人。血管病症可以是心血管病症或高血压病症。高血压病症可以是先兆子痫。心血管病症可以是动脉粥样硬化。血管病症可以是糖尿病,高胆固醇血症,肾机能不全,或者高血压。在一些实施方案中,可测量在 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的水平和在 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的水平。基准样品可以来自受试者,该受试者不患有、不疑似患有心血管病症,或不存在患有这种病症的风险。

[0027] 在一些实施方案中,可以测量一种或多种另外的分析物。所述一种或多种另外的分析物可以是:瓜氨酸,二甲胺,精氨酸,鸟氨酸,同型半胱氨酸,及肌酸。所述一种或多种另外的分析物可以是氨基酸或酰基肉碱。可以例如利用质谱测量所述一种或多种另外的分析物。生物样品可以是或者包含:血液,血清,血浆,淋巴,羊水,唾液,脑脊髓液,泪液,粘液,尿,痰,或者汗。电离的生物样品除二甲基精氨酸之外还可以是或者包含化合物。

[0028] 在一些实施方案中,所述方法可以包括下列步骤:在诊断受试者患有血管病症或存在患有这种病症的风险之后,将一种或多种治疗剂给药于受试者。所述一种或多种治疗剂为一种或多种抗高血压药物,一种或多种降胆固醇药剂,或者一种或多种 β 阻断剂。所述一种或多种抗高血压药物可以是利尿剂,血管紧张素转化酶抑制剂,血管扩张剂,或者 α 阻断剂。所述一种或多种降胆固醇药剂可以是他汀类药物。

[0029] 在一些实施方案中,可以在电离样品之前向生物样品中添加内标物。内标物可以是或者包含:含有至少一个重原子的二甲基精氨酸异构体。内标物可以是或者包含:具有至少一个重原子的 SDMA 异构体,及具有至少一个重原子的 ADMA 异构体,且其中 SDMA 和 ADMA 异构体具有不同的原子量。

[0030] 另一方面,本公开提供诊断受试者先兆子痫的方法,该方法包括如下步骤:提供受试者的生物样品;电离该生物样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;及测量作为 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的函数的 ADMA 含量以及作为 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的函数的 SDMA 含量之一或二者,其中生物样品中 ADMA 和 SDMA 之一或二者的含量相对于基准样品中的含量的升高,表明受试者患有先兆子痫或者存在患有这种病症的风险。所述 m/z 范围可以为 m/z 约 203。受试者可以是哺乳动物,例如人。

[0031] 再一方面,本公开提供评价受试者对治疗剂的响应的方法。该方法包括如下步骤:提供经治疗剂治疗的受试者的生物样品;电离该生物样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;及测量作为 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的函数的 ADMA 含量以及作为 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的函数的 SDMA 含量之一或二者,其中如果该生物样品中 ADMA 和 SDMA 之一或二者的含量与得自治疗之前的受试者的生物样品中的含量相同或者升高,则表明受试者不响应该治疗;如果该生物样品中 ADMA 和 SDMA 之一或二者的含量较得自治疗之前的受试者的生物样品中的含量降低了,则表明受试者响应该治疗。所述 m/z 范围可以为 m/z 约 203。受试者可以是哺乳动物,例如人。在一些实施方案中,可以测量一种或多种另外的分析物。所述一种或多种另外的分析物可以是:瓜氨酸,二甲胺,精氨酸,鸟氨酸,同型半胱氨酸,及肌酸。所述一种或多种另外的分析物可以是氨基酸或酰基肉碱。可以例如利用质谱测量所述一种或多种另外的分析物。生物样品可以是或者包含:血液,血清,血浆,淋巴,羊水,唾液,脑脊髓液,泪液,粘液,尿,痰,或者汗。电离的生物样品除二甲基精氨酸之外还可以是或者包含化合物。受试者可以是患有或疑似患有血管病症的受试者。血管病症可以是高血压病症如先兆子痫。血管病症可以是心血管病症如动脉粥样硬化。血管病症可以是糖尿病,高胆固醇血症,肾机能不全,或者高血压。

[0032] 在一些实施方案中,可以测量 ADMA 含量和 SDMA 含量。在一些实施方案中,该方法还包括:如果受试者不响应治疗,则将一种或多种不同的治疗剂给药于受试者。所述一种

或多种治疗剂为一种或多种抗高血压药物,一种或多种降胆固醇药剂,或者一种或多种 β 阻断剂。所述一种或多种抗高血压药物可以是利尿剂,血管紧张素转化酶抑制剂,血管扩张剂,或者 α 阻断剂。所述一种或多种降胆固醇药剂可以是他汀类药物。

[0033] 在一些实施方案中,该方法可以包括:如果受试者响应治疗,则将相同的治疗剂连续地给药于受试者。

[0034] 另一方面,本公开涉及提供受试者的代谢分布图的方法,该方法包括:提供受试者的生物样品;电离该生物样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;检测在 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号以及在 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号之一或二者;及输出包括参数的受试者的代谢分布图,该参数为 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号及 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号之一或二者的函数。所述 m/z 范围可以为 m/z 约 203。受试者可以是哺乳动物,例如人。受试者可以是疑似患有心血管病症的受试者。在一些实施方案中,可以测量一种或多种另外的分析物。所述一种或多种另外的分析物可以是:瓜氨酸,二甲胺,精氨酸,鸟氨酸,同型半胱氨酸,及肌酸。所述一种或多种另外的分析物可以是氨基酸或酰基肉碱。可以例如利用质谱测量所述一种或多种另外的分析物。生物样品可以是或者包含:血液,血清,血浆,淋巴,羊水,唾液,脑脊髓液,泪液,粘液,尿,痰,或者汗。电离的生物样品除二甲基精氨酸之外还可以是或者包含化合物。受试者可以是患有或者疑似患有血管病症的受试者。血管病症可以是高血压病症如先兆子痫。血管病症可以是心血管病症如动脉粥样硬化。血管病症可以是糖尿病,高胆固醇血症,肾机能不全,或者高血压。

[0035] 在一些实施方案中,可以测量在 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的水平和在 m/z 约 172 时存在的子离子 m/z 信号的水平。

[0036] 在一些实施方案中,可以测量一种或多种另外的分析物。所述一种或多种另外的分析物可以是本文中所述的任意一种。可以利用质谱测量所述一种或多种另外的分析物。

[0037] 再一方面,本公开涉及通过下述方法得到的受试者的代谢分布图,该方法包括:提供受试者的生物样品;电离该生物样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;及测量作为 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的函数的 ADMA 含量以及作为 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的函数的 SDMA 含量之一或二者,以得到受试者的代谢分布图。所述 m/z 范围可以为 m/z 约 203。受试者可以是哺乳动物,例如人。受试者可以是疑似患有血管病症的受试者。在一些实施方案中,可以测量一种或多种另外的分析物。所述一种或多种另外的分析物可以是本文中所述的任意一种。可以利用质谱测量所述一种或多种另外的分析物。

[0038] 另一方面,本公开提供诊断受试者血管病症的方法,该方法包括:提供本文所述的代谢分布图;及将该代谢分布图中的 ADMA 含量和 SDMA 含量之一或二者与基准代谢分布图中的 ADMA 含量和 SDMA 含量进行比较,其中如果与基准代谢分布图中的含量相比,ADMA 和 SDMA 之一或二者的含量升高,则表明受试者患有血管病症或者存在患有这种病症的风险。

[0039] 另一方面,本公开提供评价化合物的方法,该方法包括:使细胞或者受试者与该化合物接触;电离来自细胞或受试者的样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于一种 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;及测量作为 m/z 约 46 时的子离子 m/z 信号的函数的 ADMA 含量以及作为 m/z 约 172 时的子离子 m/z 信号的函数的 SDMA 含量之一或二

者,其中,与未接触该化合物的细胞或受试者的样品中的含量相比,得自接触该化合物的细胞或受试者的样品中的 ADMA 含量和 SDMA 含量之一或二者的变化表明,该化合物是 ADMA 或 SDMA 含量的调节剂。所述细胞可以是哺乳动物细胞,例如人类细胞。所述细胞可以是内皮细胞。该细胞可以是表达 eNOS 的细胞。该细胞可以得自患有血管病症或存在患有这种病症的风险的受试者。

[0040] 在一些实施方案中,可以测量一种或多种另外的分析物。所述一种或多种另外的分析物可以是本文所述分析物中的任意一种。可以利用质谱测量所述一种或多种另外的分析物。

[0041] 另一方面,本公开涉及用于检测不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和对称二甲基精氨酸 (SDMA) 的试剂盒,该试剂盒包括:ADMA 和 SDMA 之一或二者,其中 ADMA 和 SDMA 之一或二者包含至少一个重原子同位素;以及任选的如何检测 SDMA 和 ADMA 的说明书。该试剂盒可包含有机酸如草酸。

[0042] 另一方面,本公开涉及不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和对称二甲基精氨酸 (SDMA) 的试剂盒,该试剂盒包括:ADMA 和 SDMA 之一或二者,其中 ADMA 和 SDMA 之一或二者包含至少一个重原子同位素;有机酸;及任选的如何检测 SDMA 和 ADMA 的说明书。所述有机酸可以是草酸。

[0043] 在本文所述任一试剂盒的一些实施方案中,试剂盒还可以包含用于检测 ADMA 和 SDMA 之一或二者的计算机软件。

[0044] 在本文所述任一试剂盒的一些实施方案中,试剂盒还可以包含一种或多种另外的内标物,用于检测本文所述的生物分子(例如代谢的生物分子)的一种或多种。

[0045] 本文所述的方法具有很多应用。例如,可用于评价样品的纯度,如化学合成产物或纯化产物的纯度。其可用于测定化学反应,例如,二甲基精氨酸异构体为反应物、中间产物或产物的反应。反应可以在体外(如,在无细胞体系或者在细胞中)进行,也可以在体内进行。

[0046] 本公开还涉及包含 ADMA 的组合物,该 ADMA 含有至少一个重原子同位素,纯度为至少 10, 20, 60, 80, 90, 95, 97, 98, 98, 99.5%。该组合物可具有大于约 1pM(例如大于约 1nM)的浓度。例如,该 ADMA 分子的原子量至少比天然存在的 ADMA 大 1, 2, 3, 4 原子单位。该组合物可基本不含质荷比约 203 的 ADMA。该组合物可用作内标物。例如,该组合物可添加到样品中。

[0047] 本公开还涉及包含 SDMA 的组合物,该 SDMA 含有至少一个重原子同位素,纯度为至少 10, 20, 60, 80, 90, 95, 97, 98, 98, 99.5%。该组合物可具有大于约 1pM(例如大于约 1nM)的浓度。例如,该 SDMA 分子的原子量至少比天然存在的 SDMA 大 1, 2, 3, 4 原子单位。该组合物可基本不含质荷比约 203 的 SDMA。该组合物可用作内标物。例如,该组合物可添加到样品中。

[0048] 本公开还涉及包含含有至少一个重原子同位素的 ADMA 和含有至少一个重原子同位素的 SDMA 的组合物。通常,二甲基精氨酸的这些重原子同位素异构体彼此具有不同的质荷比。该组合物可用作内标物。例如,该组合物可添加到样品中。在一种实施方案中,该组合物基本不含质荷比(m/z)约 203 的 ADMA。在另一实施方案中,该组合物还包含质荷比约 203 的 SDMA。

[0049] 很多质谱仪具有高分辨率的质量精度。例如,在单电荷离子(如单电荷的 ADMA 或 SDMA 离子)的情况下,该范围相当于 $0.6m/z$ 。在本公开中,二甲基精氨酸异构体的单正电荷离子具有 203 的标称 m/z 。因此,这类范围可用于本发明。例如,可利用范围为 202.7 ~ 203.3 的通道,选择质荷比 (m/z) 为约 203 的离子。应当理解,本文所述的方法还包括使用多电荷(如双电荷或三电荷)的二甲基精氨酸,该多电荷离子因而会影响质量精度和分辨率 amu 范围。例如,对于双电荷离子而言,该 amu 范围相当于 $0.3m/z$ 等等。质谱仪的小偏差(如校准偏差)会导致与本文中所述不一致的二甲基精氨酸异构体母离子和子离子 m/z 信号,但是通过例如补偿校准偏差,可以很容易地确认和使用与所公开的 m/z 信号相当的 m/z 信号。

[0050] 本文中提及的所有出版物、专利申请、专利及其它文献均整体地引作参考。本文所公开的材料、方法和实例仅是说明性的而非限制性的。

[0051] 通过下列说明、附图和权利要求,本发明的其它特征和优点会更加清楚。

附图说明

[0052] 图 1 是精氨酸、不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 和对称二甲基精氨酸 (SDMA) 的化学结构的示意图。

[0053] 图 2 是 SDMA 的串联质谱以及 SDMA 的碎裂和由该碎裂产生的碎片(电离的和中性的碎片)的示意图。“A”代表质荷比 (m/z) 为 203 的母离子 SDMA。“B”表示 SDMA 特有的 m/z 为 172 的子离子碎片。该质谱描述了在包含 SDMA 的样品碎裂之后检测到的子离子 m/z 信号,包括母离子 (m/z 203) 和 SDMA 特有的碎片 (m/z 172,如箭头所示)。X-轴代表质荷比 (m/z),Y-轴代表样品中各离子的相对丰度(百分数)。

[0054] 图 3 是 ADMA 的串联质谱以及 ADMA 的碎裂和由该碎裂产生的碎片(电离的和中性的碎片)的示意图。“A”代表质荷比 (m/z) 为 203 的母离子 ADMA。“B”表示 ADMA 特有的 m/z 为 46 的子离子碎片。该质谱描述了在包含 ADMA 的样品碎裂之后检测到的子离子 m/z 信号,包括母离子 (m/z 203) 和 ADMA 特有的碎片 (m/z 46,如箭头所示)。X-轴代表质荷比 (m/z),Y-轴代表样品中各离子的相对丰度(百分数)。

[0055] 图 4 是血液样品的串联质谱(即通称的多反应监测或 MRM),其示出了 SDMA 和 ADMA 的叠加总离子电流 (TIC) 时间分布图(顶部,多反应监测);及一对相关质谱,其示出了样品中的 ADMA(左)和 SDMA(右)相对于精氨酸(对照)的相对量。ADMA 和 SDMA 各自的 TIC 时间分布图如箭头所示(顶部)。TIC 分布图的 X-轴的单位为扫描数,Y-轴代表相对丰度。对于底部的两个质谱图,X-轴代表质荷比 (m/z),Y-轴代表样品中各离子的相对丰度(百分数)。

[0056] 图 5 是用于本发明方法的两种内标物的化学结构的示意图:氘-标记的对称二甲基精氨酸 (SDMA;左)和氘-标记的不对称二甲基精氨酸 (ADMA;右)。

具体实施方式

[0057] 本文所述的方法涉及以特异性确定各异构体的方式检测一种或多种形式的分子异构体。在一种实施方案中,该方法包括:电离样品以产生离子;选择质荷比 (m/z) 处于与异构体组相当的 m/z 范围的离子;使所选择的离子碎裂以产生子离子;及通过检测异构体

之一特有的子离子的至少一个 m/z 信号,检测一种、两种或多种异构体。在多数实施方案中,该方法能够同时检测异构体组的每个异构体。

[0058] 本文所述方法可用于判别(和测量)二甲基精氨酸异构体(SDMA和/或ADMA)。在这些方法的应用中,可得到受试者(例如人)的代谢分布图,该分布图至少反映不对称二甲基精氨酸(ADMA)和/或对称二甲基精氨酸(SDMA)的状况。所得代谢分布图可用于评价受试者(例如人)的健康状况,例如是否存在代谢病症或血管病症(如心血管病症或高血压病症)。

[0059] 质谱

[0060] 可以使用串联质谱判别和/或测量异构体。在串联质谱中,两个质量分析器通过碰撞室串联。第一质量分析器(MS-1)用于选择所关注的离子(例如,特定质荷比(m/z)的离子)。然后将所选择的离子转移至碰撞室,在碰撞室,它们通过与惰性气体碰撞而碎裂。该过程称为碰撞活化解离(CAD)。一旦母离子(有时称作前体)碎裂,即利用第二质量分析器(MS-2),或者扫描和检测所产生的全部子离子,或者检测特定的碎片离子。

[0061] 在实施例1(见下面)中,采用串联质谱分离ADMA和SDMA的前体离子,使该离子碎裂,及检测指示样品中存在这两种化合物的特定峰。SDMA和ADMA为异构体分子(参见图1),并且具有相同的分子量(参见图2和3)。然而,两个分子的不同之处在于它们的两个甲基的位置。如图1中所示,SDMA具有对称的甲基取代分布,每个可利用的胍基氮上具有一个甲基,而ADMA则包含两个位于同一胍基氮上的甲基。

[0062] 在一种通称为产物离子扫描类型的串联质谱中,在MS-1中选择母离子(这种情况下SDMA m/z 203或者ADMA m/z 203),并将其转移至它们发生碎裂的碰撞室中(例如参见图2和3中的示意图)。通过用MS-2扫描,检测各母离子产生的碎片,得到所选择的各母离子的产物离子(或子离子)扫描。图2示出了位于172 m/z 处相当于SDMA的特征峰,而图3则示出了位于46 m/z 处相当于ADMA的特征峰。因而,可以在一次分析中判别单一样品中的SDMA和ADMA。

[0063] 图4表明,利用多反应监测(MRM扫描),可以在一次分析中判别单一样品中的SDMA、ADMA和精氨酸。在通称为多反应监测(MRM)类型的串联质谱中,于MS-1中选择所关注的母离子,使其在碰撞室中碎裂,并于MS-2中选择由碰撞活化产生的特定碎片离子,最后进行检测。MS-1和MS-2分别用于选择相应的母离子和感兴趣的碎片离子对以预定的时间(几微秒)。该特定的母离子-产物离子转化可视为一种检测通道(detection channel)。如果需要检测其它分析物(analyte),则可以在实验中引入具有特定质量转化的其它检测通道。可以顺序地获得所有所选质量转化(通道)的数据,以得到所需要的信息。通过如下采用这些化合物中每个化合物的特定质量转化,可以实现混合物中SDMA和ADMA的检测和量化:对于ADMA,MS-1用于选择和传递位于 m/z 203的母离子,MS-2用于选择和传递位于 m/z 46的特定产物离子(通道1或者MRM转化1);对于SDMA,MS-1用于选择和传递位于 m/z 203的母离子,MS-2用于选择和传递位于 m/z 172的特定产物离子(通道2或者MRM转化2)。这两种MRM转化可由同一样品顺序地测量预定量的时间,以检测该样品中这些化合物的混合物的存在和/或浓度。在这种MRM实验中,检测实际存在的碎片离子(或者 m/z 46或者 m/z 172)。然而,在MRM光谱中记录的是相应母离子的 m/z 。

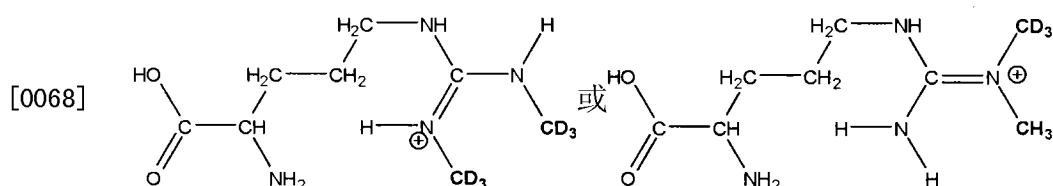
[0064] 由于在该实施例中SDMA和ADMA母离子具有相同的 m/z ,所以各通道产生其特有的

光谱,提供这两种异构体的完美分辨。如上述那样,得到图 4 中所示的光谱,然而,向每个通道中增加精氨酸特有的质量转化,以展示当母离子的 m/z 不同于该分析物的质量转化时,两个质量转化可以记录在同一光谱中。这些方法也可用于判别其它的分子异构体,条件是在碎裂时产生具有不同 m/z 比例的离子。

[0065] 精氨酸的同时检测(如图 4 中所示)表明,可以向样品中添加 ADMA 和 SDMS 之一或二者的稳定同位素标记的内标物,由此可以进行 ADMA 和 SDMA 的定量化。ADMA 和 SDMA 的这种稳定同位素标记导致质量偏移(mass shift),同时在标记和未标记的化合物之间保留极其相似的物理化学性质。

[0066] 一般地,可以向样品中添加一种或多种已知浓度的内标物,以为感兴趣的分析物(如 ADMA 和 / 或 SDMA)的定量化做准备。例如,对于利用串联质谱分析的样品,可以利用 ADMA、SDMA 及其相应内标物所产生的信号的比例确定这些化合物在样品中的量。也可以通过添加内标物来判别天然存在的(内源性)分子。可以在混合样品(如血液样品)和萃取液之前,制备内标物于萃取液中。作为选择,内标物可以添加至样品制备的任何步骤的混合物中,以保证这些内标物不会在样品处理过程中从该混合物中除去(例如在液-液萃取或固相萃取之后)。

[0067] 通过本文所述方法检测的异构体(或者其它分子如本文中所述的生物分子)的内标物或者基准分析物,可以是能够用质谱检测的异构体的任何变体或类似物。基准分析物可基于独特的物理特性,如独特的质量或质荷比,单独地从生物分子检测出来。如前面所述,质谱的常用内标物呈稳定同位素标记的形式或者为异构体的化学衍生物。例如,可以使用稳定同位素标记的类似物,利用分析物和内标物于同一样品中处置的称之为同位素稀释质谱的方法定量化 SDMA 和 ADMA。可以设计内标物,使得 1) 标记导致至少一个质量单位的质量偏移,及 2) 没有任何稳定同位素标记定位于不稳定的位置以防止交换。标记可以是任意组合的 ^2H (D)、 ^{15}N 、 ^{13}C 或 ^{18}O 。标记在分子上的实际位置可以变化,条件是必须满足要件 2(上面的)。而且,还可以利用标记的位置和碎片离子质量的潜在变化确认内标物和分析物的分离。可用于本文所述方法的潜在内标物的实例包括但不限于:



[0069] 现有几种类型的质谱仪,也可以制备具有各种结构的质谱仪,所有这些质谱仪均可用于本文所述的方法中。一般地,质谱仪具有下列主要部件:样品入口,离子源,碰撞室,质量分析器,检测器,真空系统,仪器控制系统,及数据系统。样品入口、离子源和质量分析器的差异通常界定仪器的类型及其能力。例如,入口可以是毛细管柱液相色谱源,也可以是直接探针或级(stage)如基质辅助的激光解吸中使用的。普通离子源为,例如,电喷雾,包括纳米喷雾、微米喷雾或基质辅助的激光解吸。普通质量分析器包括四极滤质器、飞行时间质量分析器(优选正交加速飞行时间质量分析器)、离子阱滤质器、扇形磁体分析器或者傅立叶变换离子回旋共振("FTICR")质量分析器。碰撞室可以是,例如,四极棒组(rod set)、六极棒组或者八极棒组。优选碰撞室除离子入口和离子出口之外,形成基本上气密的室。可以向碰撞室中引入碰撞气体如氦气、氩气、氮气、空气或甲烷。

[0070] 本文所述的具体实施例是利用串联质谱仪进行的（例如参见实施例 1）。

[0071] 适用于本文所述方法的样品包括任何生物流体、细胞、组织或其一部分，它们包含指示代谢状态的生物分子。样品可以是得自受试者（诸如人等哺乳动物）的样品，也可以是来源于该受试者的样品。例如，样品可以通过活组织检查得到的组织部分，也可以是置于或适于组织培养的细胞。因此，示例性的实例包括培养的成纤维细胞、培养的羊水细胞和绒毛膜绒毛取样。样品也可以是生物流体样品如尿，血液，血浆，血清，唾液，精液，痰，脑脊髓液，泪液，粘液，等等。如果需要，样品可以进一步分离成含有特定类型细胞的级分。例如，血液样品可以分离成血清或者分离成含有特定类型血细胞如红细胞或白细胞（白血球）的级分。如果需要，样品可以是得自受试者的样品的组合，如组织和流体样品的组合等。本领域的技术人员熟知保持样品中分子的活性或完整性的取样方法。这些方法包括采用适当的缓冲液和 / 或包括核酸酶、蛋白酶和磷酸酶抑制剂在内的抑制剂，用于保护样品中的分子或者使其变化最小化。这类抑制剂包括，例如，螯合剂如乙二胺四乙酸 (EDTA)、乙二醇二 (P- 氨基乙基醚) N, N, N1, N1- 四乙酸 (EGTA)，蛋白酶抑制剂如苯基甲基磺酰基氟化物 (PMSF)、抑肽酶、亮肽酶素、抗痛素等，以及磷酸酶抑制剂如磷酸盐、氟化钠、钒酸盐等。分离所述分子的适宜缓冲剂和条件是本领域的技术人员熟知的，并且可以依据例如要表征的分子的类型而变化（例如参见 Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999) ; Harlow and Lane, Antibodies : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988) ; Harlow and Lane, Using Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999) ; Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Burtis and Ashwood, eds. W. B. Saunders, Philadelphia, (1999))。还可以对样品进行处理，以消除存在的干扰物质或者使其存在最小化。就在本文所述方法中的使用而言，样品可以处于各种物理状态。例如，样品可以处于液态或固态，可以溶解或悬浮在液体中，可以呈乳液或凝胶状态，也可以吸附在材料上。作为非限定性实例，样品可以是液态血液样品，液态血清样品，液态白细胞样品，干燥的血液、血清或白细胞样品，也可以是吸附在纸或聚合物基质上的这些样品。

[0072] 在进行质谱之前，样品可用萃取液萃取萃取液（见下面）。对于本文所述方法而言，样品（如萃取过的样品）无需在利用串联质谱进行分析之前，进一步地化学修饰。例如，对于 ADMA 和 SDMA 特有的同时检测而言，无需特定的衍生步骤。然而，如果样品中其它分析物的检测需要某些类型的样品衍生，则在适当或合适的情况下这种衍生可应用于 SDMA 和 ADMA。此时，SDMA 和 ADMA 的母离子的质量会改变，但是得自 SDMA 和 ADMA 的产物离子的特定性质不会改变。例如，如果检测和测量分析物（如酰基肉碱或氨基酸）的基团需要酯化步骤，则 SDMA 和 ADMA 可以同样被酯化，这种酯化不会影响 ADMA 和 SDMA 或者其它分析物特有的同时检测。更具体地，如果所萃取的分析物需要转化成丁基酯，则 SDMA 和 ADMA 可以同样地转化成丁基酯。这种情况下，SDMA 和 ADMA 的质量以及由此导致的 m/z 会从 203 变成 259。然而，分别在 m/z 46 和 172 处产生的 ADMA 和 SDMA 的特征峰不会改变。因此，通过监测 MS-1 和 MS-2，可以检测衍生的 SDMA 和 ADMA，ADMA 的 MRM 通道为 259 ~ 46，SDMA 的 MRM 通道为 259 ~ 172。丁基化步骤可用于分析干燥于滤纸上的全血液样品（或其它样品）中存在的氨基酸和酰基肉碱。因此，可以利用质谱，从诸如氨基酸、酰基肉碱及其它分析物等样品中同时检测 SDMA 和 ADMA。

[0073] 在本文所述方法的一些其它应用中,可以向萃取液或直接向样品中添加有机酸如草酸。例如,在萃取的样品中,有机酸可添加至约 0.1% (例如约 0.01%、约 0.05%、约 0.15%、约 0.2%、约 0.25%、约 0.3%、约 0.4%、约 0.45%或约 0.5%) v/v 的终浓度。如果有有机酸在萃取之前加至样品中,则该条件可以使有机酸的损失最小化。在某些应用中,有机酸可以添加到在样品分析之后注入到机器中的溶液(如洗涤液或冲洗液)中。

[0074] 示例性的应用

[0075] 可以利用本文所述的方法得到样品的分子分布图(molecular profile)。该分布图可包括指示是否存特定分子异构体的信息,通常包括关于存在特定异构体组的每个异构体的信息(或者是定性的或者是定量的)。

[0076] 在这些质谱方法的一些应用中,可以得到受试者(例如人)的代谢分布图。例如,该分布图可包括受试者(例如病人)的 ADMA 和 / 或 SDMA 的含量。也可以利用串联质谱检测、量化和 / 或评价样品中的其它生物分子,包括例如 NMMA、鸟氨酸、瓜氨酸、同型半胱氨酸和肌氨酸酐中的一种或多种。可以利用所得信息(代谢分布图)评价受试者(如病人)的健康状态,例如,是否存在病症如代谢或血管病症(如高血压或心血管病症),也可以用于评价病症的危险性。

[0077] 受试者(例如哺乳动物如人)的代谢状态可通过例如体内氨基酸的出现、数量、比例和变型来反映。转译后的甲基化作用是氨基酸变型的例子,这可以指示代谢状态。在蛋白周转过程中产生的主要甲基化产物为 ADMA 和 SDMA。精氨酸的这些甲基化形式在有机体的正常功能中发挥作用,因而其数量的异常增加或降低会改变有机体内的生理功能。作为实例,已经知道 ADMA 以及另一种精氨酸衍生物 NMMA(一甲基精氨酸)是酶—内皮一氧化氮合酶(eNOS)的抑制剂。eNOS 具有调节内皮和心血管功能的作用(参见例如, King et al. (1995) Reprod. Fertil. Dev. 7(6):1581-1584 和 Jin et al. (1996) JCardiovasc. Pharmacol. 28(3):439-446)。当有机体的 ADMA 浓度增加时, eNOS 活性受到抑制,生理结果是内皮功能降低,这是在包括高血压、先兆子痫、糖尿病、肾机能不全和高胆固醇血症在内的很多疾病中出现的症状。SDMA 不抑制 eNOS,却具有与 ADMA 相同的细胞进入途径,因而会影响内皮功能。作为一个例子,若干研究表明患有肾脏病症的受试者的 SDMA 含量发生变化(参见例如, Lluch P. et al. (2006) Experimental Biology and Medicine 231:70-75 和 Kielstein J. T. et al. (2006) Nephrology Dialysis Transplantation 21(9):2446-2451)。

[0078] 其它氨基酸的数量和 / 或比例同样可以影响内皮功能的状态和相应的病症。例如,精氨酸转化成瓜氨酸和一氧化氮,其为另一种内皮功能调节剂。此外,ADMA 转化成瓜氨酸和二甲胺(DMA)。因而精氨酸和 / 或瓜氨酸的量可以揭示内皮细胞功能的状态。很多研究显示了 ADMA 及其它生物分子的含量与疾病状态的相互关系。例如, Millatt 等人((2003) Circulation 108(12):1420-1)给出的数据证实,大鼠慢性缺氧诱导的肺高血压模型与 NOS 抑制剂 ADMA 的肺部浓度增加有关。而且,肺高血压大鼠表明,其肺部表达和 ADMA 代谢酶 DDAH 的活性降低了。同型半胱氨酸和肌氨酸酐是在血管疾病中发挥作用的其它生物分子。例如,研究表明,测定同型半胱氨酸含量可以帮助评价高血压人口中心血管疾病的风险(参见例如, Bortolotto et al. (1999) Hypertension 34(4 Pt 2):837-42)。而且,研究还表明,当一氧化氮合酶受到抑制时,所产生的一氧化氮不够。一氧化氮是血管扩张剂;已经

表明,降低的一氧化氮含量与高血压有关。因此,这种生物分子的量的消息可以用作患有高血压或心血管病症风险的预报器 (predictor)。

[0079] 因此,单独或者与其它生物分子 (如代谢的生物分子) 一起判别二甲基精氨酸异构体 (ADMA 和 SDMA) 的能力,可用于评价受试者的健康状态。由此,例如,通过识别质谱分析中只有这种分子才具有的峰,可以同时检测样品中的其它氨基酸如 NMMA、精氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸和同型半胱氨酸,以及其它生物分子如肌氨酸酐。表 1 中非穷举地列出了可利用本文所述方法与 ADMA 和 / 或 SDMA 同时检出的分析物 (如生物分子)。

[0080] 表 1

[0081]

分析物名称	缩写
氨基酸	
丙氨酸	Ala
精氨酸	Arg
瓜氨酸	Cit
甘氨酸	Gly
亮氨酸	Leu
蛋氨酸	Met
鸟氨酸	Orn
苯基丙氨酸	Phe
酪氨酸	Tyr
缬氨酸	Val
肉碱	
游离肉碱	C0
乙酰肉碱	C2
丙酰肉碱	C3
肉碱	C3DC
丁酰肉碱	C4
3-羟基-丁酰肉碱	C4OH
异戊酰肉碱	C5
甲基巴豆酰肉碱	C5:1
戊二酰肉碱	C5DC
3-羟基-异戊酰肉碱	C5OH
己酰肉碱	C6
己二酰肉碱	C6DC
辛酰肉碱	C8
辛烯酰肉碱	C8:1
癸酰肉碱	C10
癸烯酰肉碱	C10:1

[0082] 通过本文所述方法得到的代谢分布图,可用于诊断或预测对各种代谢或血管 (如心血管或高血压) 病症的易感性,因为所检查的生化指示物 (如 SDMA 和 / 或 ADMA) 可以指示这类病症,无论该病症的生理或行为症候是否明显 (例如,疑似患有代谢或血管病症如心血管或高血压病症者)。本文所述的代谢分布图可用于监测受试者 (例如哺乳动物如人)

的代谢,例如经受代谢病症治疗的人。作为非限制性实例,该方法可用于判定具体治疗的治疗效果。根据该判定,可为受试者提供额外或可能的选择。代谢分布图还可用于评价患者对特定治疗方式如禁食的依从性。因此,本文所述方法可应用于筛分,诊断,预后,监测治疗和依从性,以及其中确定作为调查对象的两种或多种生物分子的存在和数量是有益的任何其它应用,例如 ADMA、SDMA、NMMA、精氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸、同型半胱氨酸和肌氨酸酐中的两种或多种。

[0083] 利用本文所述方法产生的代谢分布图,可利用各种生物样品得到。适宜的样品包括上面所述的样品。

[0084] 一方面,本文所述的代谢分布图可用于评估是否存在高血压病症。高血压病症是全世界范围内最普通的怀孕医学并发症,也是母亲和婴儿疾病和死亡的主要原因。它们包括至少两种不同的实体:一种(妊娠性高血压,PIH)是怀孕期间第一次出现并在分娩时消退的并发症。另一种(慢性高血压)是与怀孕无关但却与怀孕同时发生的在先存在的并发症,该并发症可能是怀孕期间第一次显现但不能通过分娩而消退。无论是怀孕或非怀孕状态,高血压在很多情况下均为小血管痉挛(血管收缩)的结果。因此,胎儿的主要危险起因于胎盘灌注的减少,导致胎儿生长和健康所需的氧气和营养的供给不足。母亲的危险包括主要器官如肾脏、肝脏和大脑的血流灌注不足。高血压病症包括,例如,先兆子痫,惊厥,妊娠高血压(HIP),Goldblatt 高血压,肾上腺缺血性高血压,恶性高血压,眼高压,肾性高血压,或者慢性高血压。高血压病症可导致脑或肾的水肿和出血以及中风。

[0085] 再一方面,本文所述的代谢分布图可用于评估是否存在心血管病症,如高同型半胱氨酸尿症(hyperhomocysteinemia),糖尿病,高胆固醇血症,高血糖症和胰岛素耐受性,冠心病,脑血管疾病,动脉粥样硬化,及末梢血管疾病。可以根据要检测的具体健康状况,选择利用本文所述方法进行检测的生物分子组。本领域的技术人员知道与 ADMA、SDMA、NMMA、精氨酸、瓜氨酸等有关的健康状况。例如,与 ADMA 及其它生物分子有关的健康状况记载在 Lin and Lin(2004)Acta Cardiol Sin 2:201-211 中。在某些情况下,例如,代谢分布图可以得自己已经确定患有心血管或高血压病症或者存在患有这些病症风险的受试者,以监测受试者的病症的状况、受试者对治疗方式的响应或者受试者对治疗方案的顺应性。

[0086] 所有年龄的受试者均可以感染采用本文所述代谢分布图诊断的代谢或血管病症。因此,用于本文所述方法的样品可以得自任何年龄的受试者(例如人),包括婴儿、新生儿、婴孩、儿童和成人,例如怀孕的女性。该方法还可以用于患有代谢或血管病症风险的个体。这种个体包括:(i) 具有这类病症(的遗传倾向)的家族史的个体,或者(ii) 具有一种或多种患有这类病症风险因素的个体。心血管或高血压病症的示例性风险因素包括:(情绪或身体)长期处于紧张状态,吸烟,高脂肪或胆固醇饮食,久坐的生活方式,或者一种或多种提升血压的药物。

[0087] 本文所述方法涉及同时判定至少两种生物分子(例如两种或更多种异构体)的存在或数量,其中每种生物分子的存在或数量,与是否存在代谢、心血管或高血压病症相关。需要时,本文所述方法可以定量地使用,以将试样的结果与特定分析物的已知的或者预定的标准数量进行比较(例如,通过采用上述的内标物)。在试样与基准样品进行比较时,也可以定量地使用该方法,所述基准样品可以是正常的基准或者代谢病症的基准。在这种格局下,生物分子的相对量可以作为代谢病症的指示。基准样品,例如,可以来自受试者,该受

试者患有或不疑似患有诸如代谢或血管病症等病症（如心血管或高血压病症），或者不存在患有这类病症的风险。

[0088] 一般地，给定生物分子的截止值 (cut-off value) 可以变化，而且对于本领域中经常试验的分析物和酶而言是已知的。可以利用本领域已知方法的常见调整方案，为不经常试验的分析物建立截止值。截止值通常为生物分子的数量或者与另外生物分子的比值，高于或者低于该截止值被视为患有代谢病症或者再测验的原因。因而，根据本文所述方法，将至少一种生物分子在特定类型样品中的基准性含量视为截止值，高于该截止值，则在所述至少一种生物分子的存在与代谢病症的存在（或不存在）之间存在显著的相关性。应当理解，生物分子组 (panel) 可以整体地、逐部分地或者以逐个分析物为基础地进行解释。

[0089] 本领域的技术人员应当认识到，一些截止值不是绝对的，临床相关性在截止值的任何一侧的一定数值范围内也是显著的；然而，对于特定类型的样品的生物分子，可以选择其最佳的截止值（例如改变 H- 分数等）。通常，将为用于本文所述方法而测定的截止值与出版的范围进行比较，而且可以使之针对所用方法和患者群体个性化。应当理解，最佳截止值的改进取决于所用统计方法的完善度 (sophistication)，并且取决于测定不同生物分子和样品类型的基准含量值所使用的样品的数目和来源。因此，所确立的截止值，可以根据方法中周期性的再求值或变化或者根据总体分布，向上或者向下调整。另外，如果需要，可以使用仪器特有的 (instrument-specific) 截止值，例如，在仪器交互性能可比性 (inter-instrument performance comparability) < 10% 时。

[0090] 基准含量可通过各种方法测定，条件是所得基准含量准确地提供各生物分子的数量，在该基准含量之上是第一组受试者（例如人），其代谢病症的概率不同于第二组受试者，该第二组受试者的代谢分析物或酶活性的量低于基准含量。基准含量可通过比较具有相同代谢病症的受试者群体（例如患者）的生物分子数量来确定。其可以通过例如图示整群患者的柱状图分析来完成，其中第一坐标轴代表生物分子的数量，第二坐标轴代表受试者群中其样品中包含给定量的一种或多种生物分子的受试者的数目。通过鉴定具有相同或相似含量生物分子的受试者群的总体子集，可以确定两个或多个独立组的受试者。然后可根据最好地区分这些独立组的量，确定基准含量。基准含量可以是等同适用于每个受试者的单一数量 (single number)，或者基准含量也可以根据受试者的具体人口分组而变化。例如，对于同样的代谢病症，年长的受试者可具有不同于年轻受试者的基准含量。另外，病情更严重的受试者（例如更严重的心血管病症）可具有不同于病情轻微者的基准值。

[0091] 调节 ADMA 和 SDMA 含量的化合物的鉴定方法

[0092] 本文还提供鉴定调节（例如降低）细胞中 ADMA 和 / 或 SDMA 含量的化合物的方法。由于这两种代谢产物的误调节含量 (disregulagted level) 与某些病症（如心血管和高血压病症）的风险增加有关，因而如此鉴定的化合物可用于治疗心血管和高血压病症。可以与候选化合物接触的细胞可以是任何种类的细胞，使得这些细胞（或者是合成地或者是天然地）产生 ADMA 或 SDMA。所述细胞可以是原发细胞或细胞系，并且可以是组织学上的任何类型细胞，例如，其可以无限制地为上皮细胞，成纤维细胞，淋巴样细胞，巨噬细胞 / 单核细胞，粒细胞，角质化细胞，神经细胞，或者肌细胞。所述细胞可以在培养皿中培养。通常优选在多孔分析板（例如 96 孔或 384 孔分析板）中培养细胞，使得可以一次评价多个候选化合物。候选化合物（任选处于各种浓度范围如 0.001nM 至 10mM）可以加到含有所述细胞的溶

液（如培养基）中，或者在化合物为蛋白质的情况下，细胞可以重组地表达该化合物。在培养表达 ADMA 和 / 或 SDMA 的细胞之后，可以利用本文所述的质谱法测定 ADMA 和 / 或 SDMA 的存在或含量。在检测之前，可以在允许制备适应串联质谱的样品的条件下溶解细胞。通常可以将对照化合物加到一组细胞中，作为阳性或阴性对照。例如，可以将已知增加或降低 ADMA 或 SDMA 量的化合物加到一组细胞中（例如，抑制蛋白质精氨酸转甲基酶的化合物；参见例如，Leiper et al. (2005) Eur. J Clin. Pharma. 62 (Suppl) :33-35）。也可以将已知不调节 ADMA 或 SDMA 含量的化合物加到一组细胞中。

[0093] 于本文所述的任何方法中鉴定的化合物包括各种类别的化学物质。该化合物可以是生物分子，包括但不限于肽、多肽、拟肽（如类肽）、氨基酸、氨基酸类似物、糖类、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、它们的衍生物或结构类似物、多核苷酸和多核苷酸类似物。该化合物可以是小分子化合物或者大分子化合物。

[0094] 通过利用本文所述各种数据库鉴定试验化合物，允许随后修正试验化合物“命中 (hit)”或“引导 (lead)”，优化“命中”或“引导”的能力，进而调节细胞中 ADMA 和 / 或 SDMA 的含量。

[0095] 应当理解，不实质性影响本发明各实施方案的活动的修改，同样包括在本发明所定义的范围内。因此，下面的实施例是为了说明而不是限制本发明。

[0096] 实施例 1

[0097] 该实施例描述了利用质谱判别存在单一样品中的 ADMA 和 SDMA 的实验。该样品是通过将大约等摩尔浓度的 ADMA 和 SDMA 加到全血中而制备的。同时将精氨酸加到血液的相同等分试样中，以充当相对浓度基准 (relative intensity reference)。然后将血液分配在滤纸上，并使之在室温干燥 24 小时。自干燥的血液样品上切下小的冲压片（每个 1/8”），并将其分配在微滴定板的板孔中。然后在微滴定板中，用甲醇水溶液（含 80% 甲醇、20% 水和 0.1% 乙酸）萃取血液点式冲压片大约 30 分钟。借助于自动取样器，将萃取液直接注入到质谱仪中，无需进一步化学修饰，也无需提前进行色谱分离（例如初级 HPLC）。实验采用 Sciex API 2000 三重四极质谱仪或者 Waters Quattro Micro 三重四极质谱仪。两种质谱仪均装有电喷雾离子源。

[0098] 样品的串联质谱分析由两组多反应监测 (MRM) 通道构成。在一组通道中，监测下列的质量转化： m/z 175 至 m/z 70，及 m/z 203 至 m/z 46（参见图 2 和图 3）。第一次质量转化对应于精氨酸特有的碎裂，第二次质量转化对应于 ADMA 特有的碎裂。在第二组 MRM 通道中，分别通过 m/z 175 至 m/z 70 的质量转化监测精氨酸和 SDMA，及通过 m/z 203 至 m/z 172 的质量转化监测精氨酸和 SDMA。精氨酸的转化相当于 105 个原子质量单位 (amu) 的中性损失，并表示质子化离子名义上损失了羧基和胍基。ADMA 特有的转化表示由质子化的 ADMA 形成二甲基铵离子，及 SDMA 特有的转化表示 31amu 的中性损失，这相当于损失了中性的甲基胺。

[0099] 即使不是绝对的量化，通过检查 ADMA 和 SDMA 相对于精氨酸的浓度也可以区分这两种异构体的离子。在该实施例中可以看出，SDMA 相对于精氨酸的浓度高于 ADMA 相对于精氨酸的浓度。这种倾向表明，这两种异构体在串联质谱实验中的灵敏度确实具有差别。精氨酸、SDMA 和 ADMA 的测量会受到质谱仪中残余（携带）的分析物分子（如 ADMA 或 SDMA）的影响。在样品制备中添加草酸，显著地减少观测到的携带作用。图 4 示出了上述实施例

的 MRM 光谱。

[0100] 尽管已经参照其具体实施方案描述了本发明,但是本领域的技术人员应当理解,在不脱离本发明的真正构思和范围的情况下,可以对其作出各种改变和等价替换。另外,还可以对本发明的目的、构思和范围作出许多修改,以适应具体的情况、材料、物质的组合、方法、方法的一个或多个步骤。所有这些修改均包括在本发明的范围内。

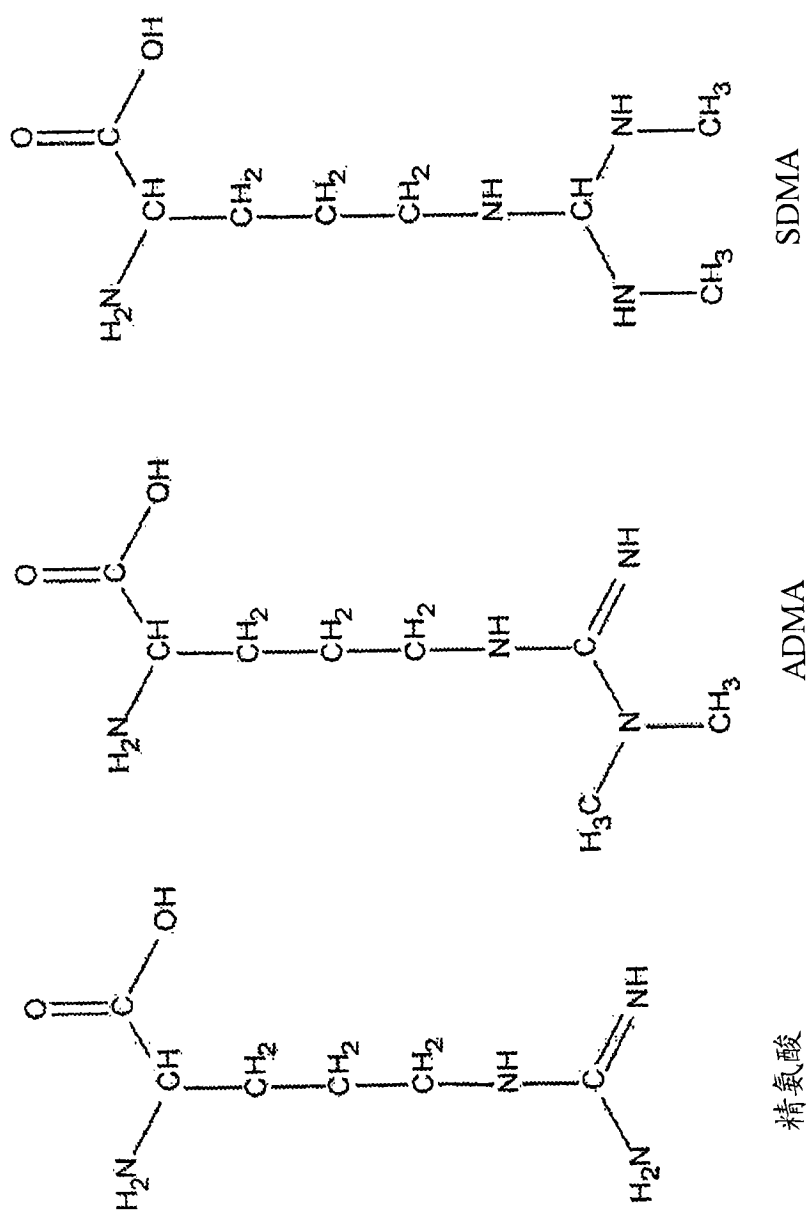


图 1

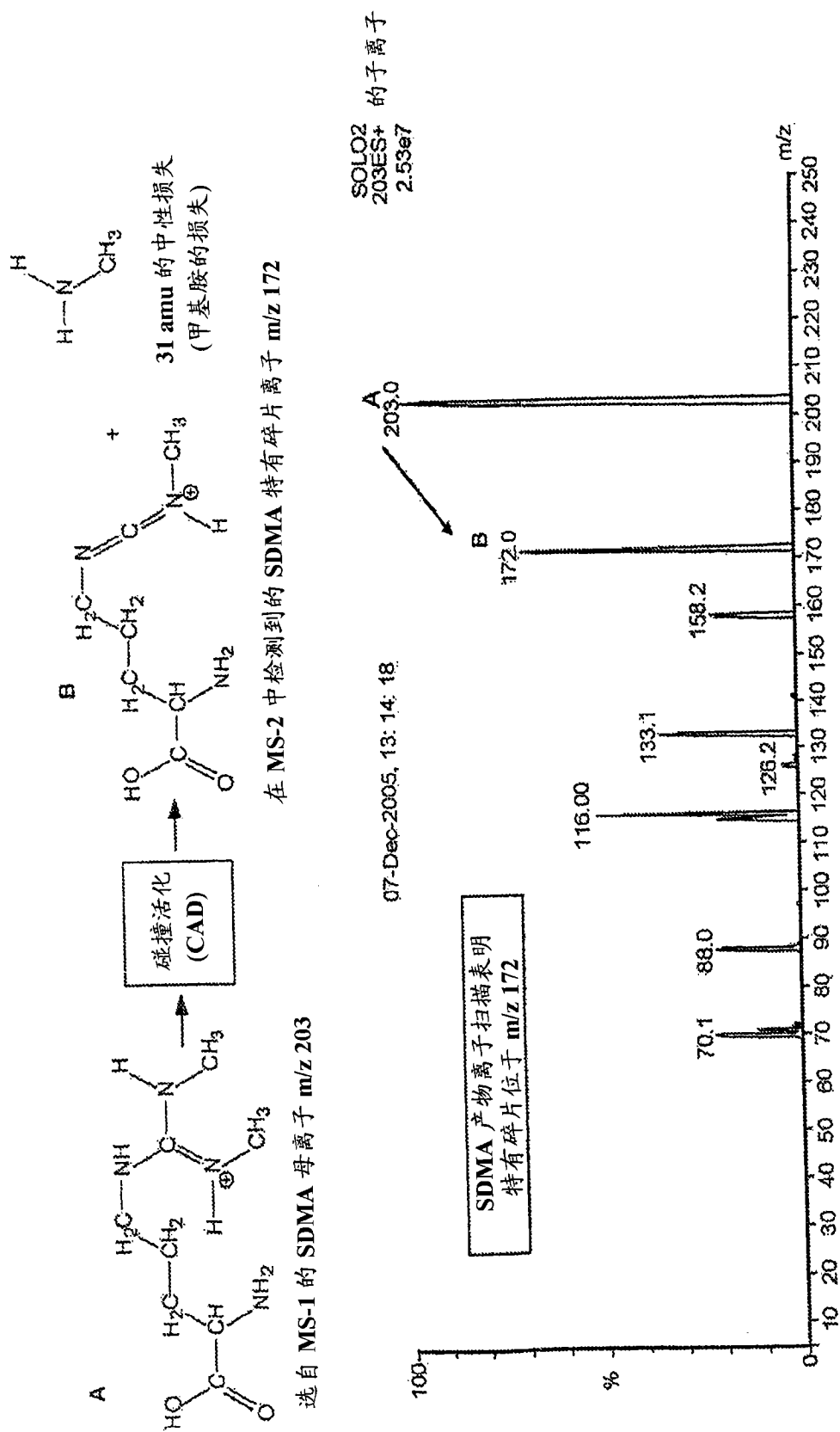


图 2

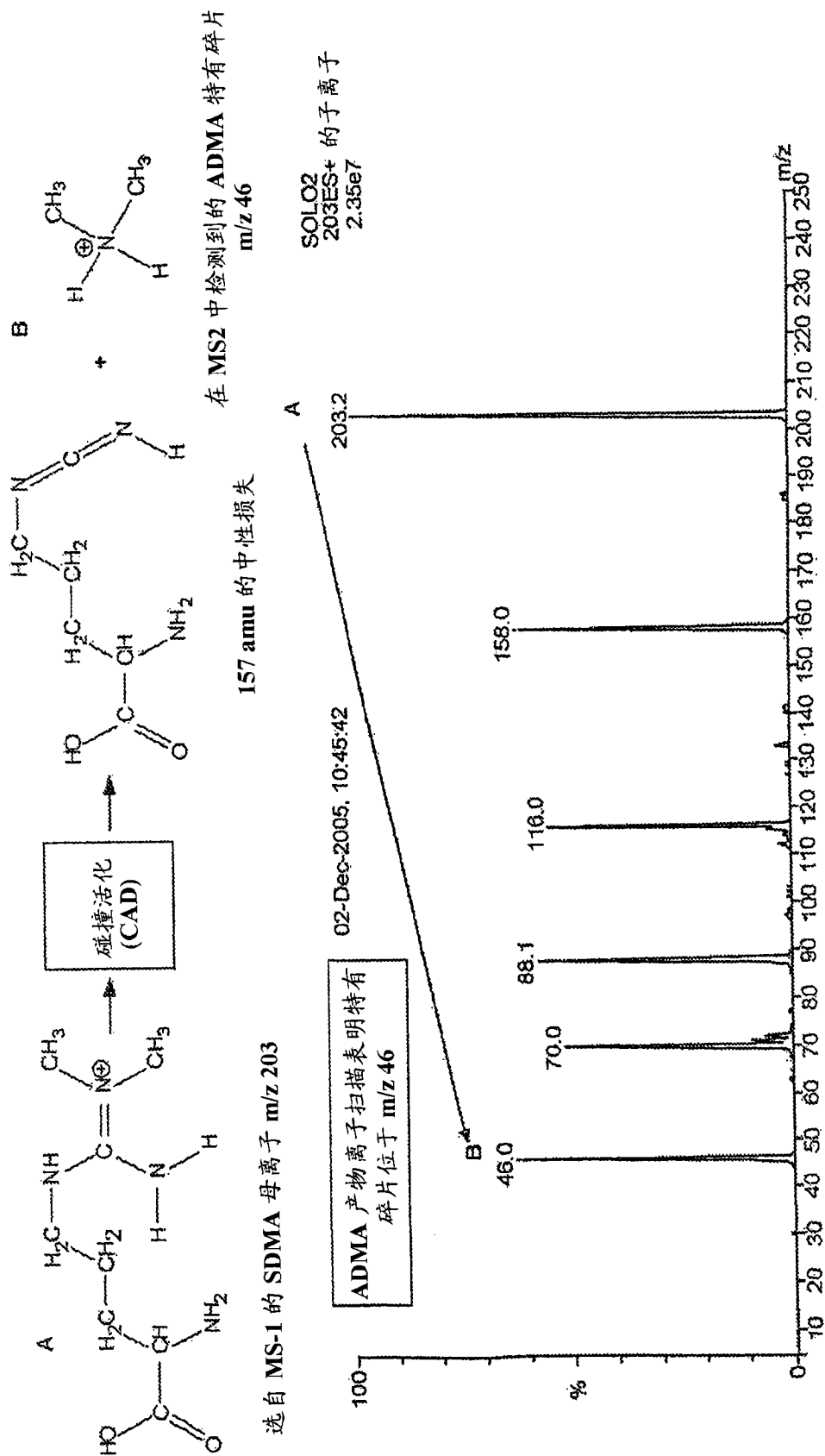


图 3

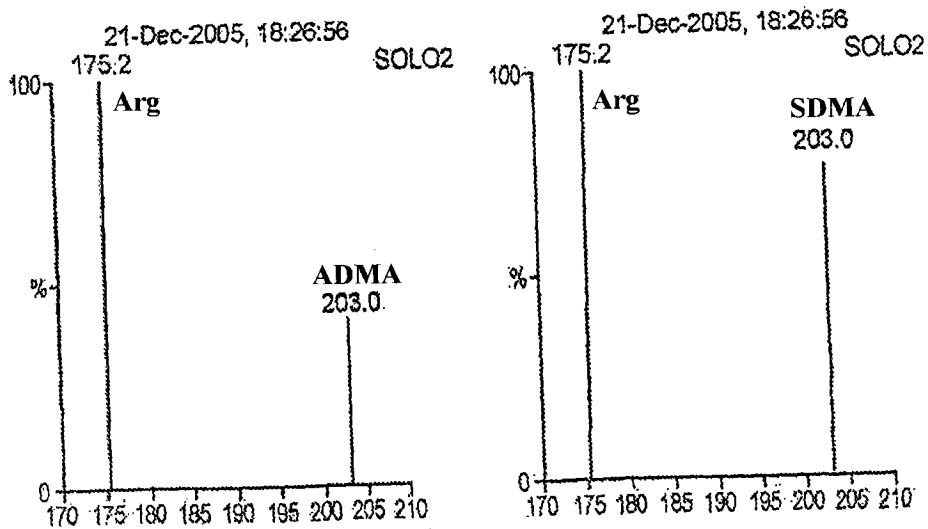
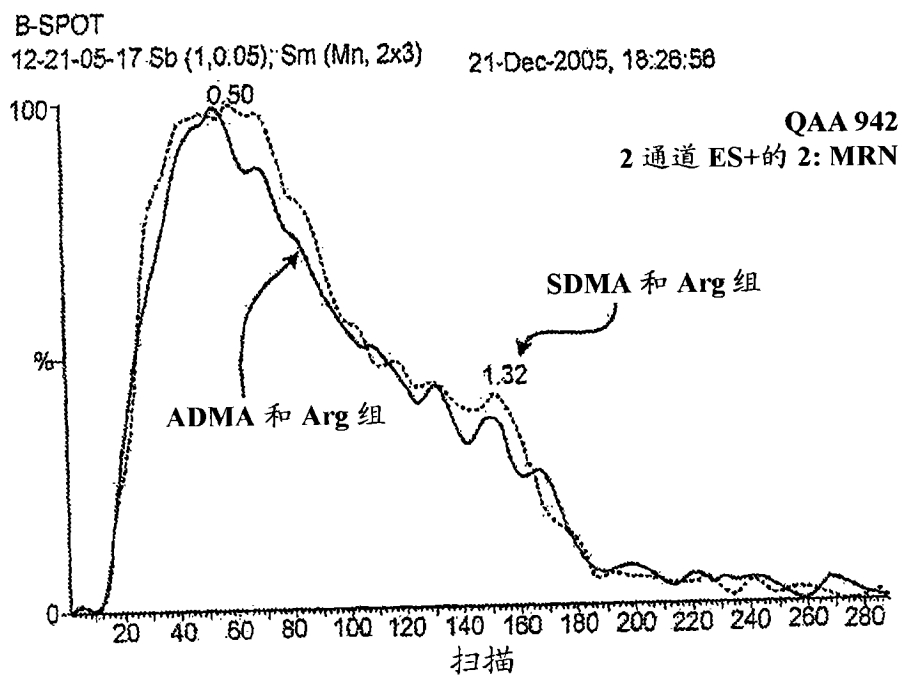


图 4

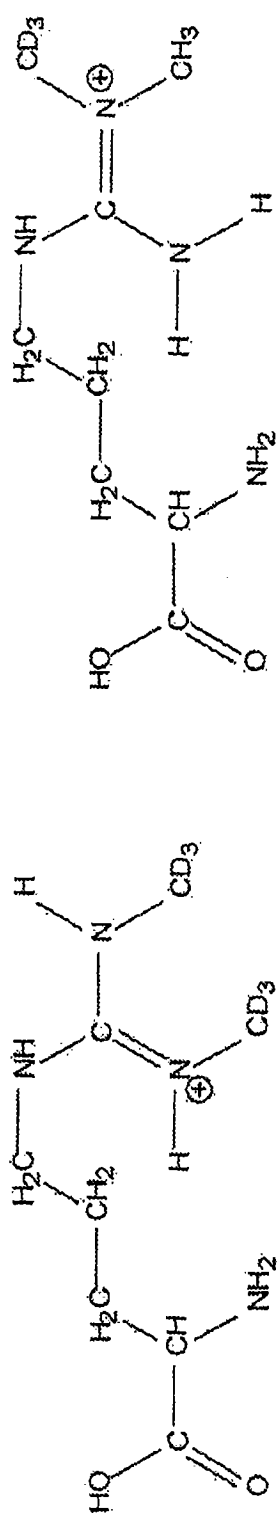


图 5