



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106053832 A

(43)申请公布日 2016.10.26

(21)申请号 201610422742.2

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2012.09.12

代理人 黄革生 林柏楠

(30)优先权数据

11181156.8 2011.09.13 EP

61/533,867 2011.09.13 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

(62)分案原申请数据

201280044690.X 2012.09.12

(71)申请人 巴斯夫欧洲公司

地址 德国路德维希港

(72)发明人 T·B·沃克 B·范拉文兹韦

W·梅勒特 E·法比安

V·施特劳斯 H·坎普

J·C·维默尔 R·洛塞

M·M·赫罗尔德 A·普奥考汀

权利要求书3页 说明书66页

(54)发明名称

评估造血毒性的工具和方法

(57)摘要

诊断造血毒性的方法,所述方法包括:(a)在疑为罹患造血毒性的对象的测试样品中测定至少一种生物标记物的量,和(b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此诊断造血毒性。也公开了测定化合物是否能够在对象中诱导这样的造血毒性的方法,鉴定用于治疗造血毒性的药物的方法,用于诊断造血毒性的设备和试剂盒。

1. 诊断造血毒性的方法,所述方法包括:

(a)在疑为罹患造血毒性的对象的测试样品中测定选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的量,和

(b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此诊断造血毒性。

2. 权利要求1的方法,其中所述对象已接触疑为能够诱导造血毒性的化合物。

3. 测定化合物是否能够在对象中诱导造血毒性的方法,所述方法包括:

(a)在已接触疑为能够诱导造血毒性的化合物的对象的样品中测定选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的量,和

(b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此测定化合物诱导造血毒性的能力。

4. 权利要求2或3的方法,其中所述化合物为选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物。

5. 权利要求1至4中任一项的方法,其中所述参考来源于(i)罹患造血毒性的对象或对象组或(ii)已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组。

6. 权利要求5的方法,其中测试样品中的生物标记物的量与参考基本相同指示造血毒性。

7. 权利要求1至4中任一项的方法,其中所述参考来源于(i)已知未罹患造血毒性的对象或对象组或(ii)未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组。

8. 权利要求1至4中任一项的方法,其中所述参考是对于对象群体的生物标记物的计算的参考。

9. 权利要求7或8的方法,其中测试样品中的生物标记物的量相比参考不同指示造血毒性。

10. 鉴定用于治疗造血毒性的物质的方法,所述方法包括以下步骤:

(a)在已接触疑为能够治疗造血毒性的候选物质的罹患造血毒性的对象的样品中测定选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的量;和

(b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此鉴定能够治疗造血毒性的物质。

11. 权利要求10的方法,其中所述参考来源于(i)罹患造血毒性的对象或对象组或(ii)

已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酸胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组。

12. 权利要求11的方法,其中生物标记物的量在测试样品与参考中不同指示能够治疗造血毒性的物质。

13. 权利要求10的方法,其中所述参考来源于(i)已知未罹患造血毒性的对象或对象组或(ii)未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酸胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组。

14. 权利要求10的方法,其中所述参考是在对象群体中的生物标记物的计算的参考。

15. 权利要求13或14的方法,其中生物标记物的量在测试样品和参考中基本相同指示能够治疗造血毒性的物质。

16. 选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物或所述生物标记物的检测剂用于在对象样品中诊断造血毒性的用途。

17. 设备,其用于在疑为罹患造血毒性的对象的样品中诊断造血毒性,所述设备包含:

(a)分析单元,其包含选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的检测剂,所述分析单元允许测定样品中存在的所述生物标记物的量;和与其有效连接的

(b)评估单元,其包含储存的参考和数据处理器,所述评估单元允许比较由分析单元测定的所述至少一种生物标记物的量和储存的参考,由此诊断造血毒性。

18. 权利要求17的设备,其中所述储存的参考是来源于已知罹患造血毒性的对象或对象组或已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酸胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较由分析单元测定的至少一种生物标记物的量和储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考基本相同指示存在造血毒性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示不存在造血毒性。

19. 权利要求17的设备,其中所述储存的参考是来源于已知未罹患造血毒性的对象或对象组或未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酸胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较由分析单元测定的至少一种生物标记物的量和储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示存在造血毒

性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考基本相同指示不存在造血毒性。

20. 试剂盒,其用于诊断造血毒性,所述试剂盒包含选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的检测剂,和至少一种生物标记物的标准物,所述标准物的浓度来源于(i)已知罹患造血毒性的对象或对象组或已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组,或来源于(ii)已知未罹患造血毒性的对象或对象组或未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组。

评估造血毒性的工具和方法

[0001] 本申请为2012年9月12日提交的、发明名称为“评估造血毒性的工具和方法”的PCT申请PCT/IB2012/054731的分案申请,所述PCT申请进入中国国家阶段的日期为2014年3月13日,申请号为201280044690.X。

[0002] 本发明涉及化学化合物的造血毒性的诊断和用于风险分层的毒理学评估领域。具体地,其涉及诊断造血毒性的方法。其也涉及测定化合物是否能够在对象中诱导这样的造血毒性的方法和鉴定用于治疗造血毒性的药物的方法。此外,本发明涉及诊断造血毒性的设备和试剂盒。

[0003] 骨髓是身体内最大的器官且是化学品暴露的重要的潜在靶器官。骨髓存在于中轴骨和长骨的中央腔内。其由被散布在小梁骨网状组织中的血管窦包围的造血组织岛和脂肪细胞组成。骨髓是主要的造血器官和初级淋巴组织,负责产生红细胞、粒细胞、单核细胞、淋巴细胞和血小板。骨髓内表面和腔内松质骨骨针的外表面由骨内膜衬覆盖,骨内膜衬由受网状结缔组织薄层支持的单层扁平“骨衬细胞”组成;在骨内膜衬中也存在成骨细胞和破骨细胞。在长骨中,一根或多根营养管穿过皮质骨,蜿蜒进入骨髓腔。在扁平骨中,骨髓由通过大和小营养管进入骨髓的大量大小不同的血管供养。

[0004] 骨髓具有大量的血液供给。并且,似乎营养动脉来源的毛细血管延伸进哈弗斯(Haversian)管,返回骨髓腔然后开放进入静脉窦。因此,在骨髓腔内存在循环的血流模式,从骨髓腔中心朝向骨髓腔外周,然后返回中心。在长骨和扁平骨中,骨和骨髓的血液供给通过血管的骨内膜网络连通。

[0005] 骨髓的神经分布以通过营养管进入的有髓鞘和无髓鞘的神经的形式存在。一些神经分布也通过骺和干骺端的小孔存在。神经束伴随供养血管平滑肌的小动脉分支,或偶尔终止在造血细胞中的造血组织中。

[0006] 造血组织由多种细胞类型组成,包括血细胞及其前体、外膜/屏障细胞、脂肪细胞和巨噬细胞。造血组织细胞不是随机排列的,而是在组织内展示了特定的结构。造血作用必须得到微环境的支持,所述微环境能够识别和维持造血干细胞和提供支持干细胞朝向谱系增殖、分化和成熟所需的因子。

[0007] 造血作用是在造血组织内的区室化的过程,红细胞生成发生在成红细胞岛中;粒细胞生成发生在不太清楚的焦点,巨核细胞生成发生在窦内皮附近。成熟后,受屏障细胞调控的造血细胞穿过静脉窦壁进入血流;血小板从穿过窦壁进入窦腔的巨核细胞的胞质突直接释放进血液。

[0008] 血细胞的生成、分化和成熟受体液因子调控。一些因子作用于较原始的细胞并具有一般作用,而其他因子(例如,红细胞生成素)作用于特定细胞系的后来的祖先。造血因子的来源不同。

[0009] 造血作用是连续的过程,但可分为不同的阶段。第一阶段包括骨髓中包含的未定型(多能)干细胞。这些多能细胞具有2个主要功能。首先,它们通过自我更新的过程维持其数量,第二,它们具有产生所有造血细胞的能力。它们也似乎以较多的数量存在于中心轴的外周,靠近骨衬细胞。

[0010] 淋巴细胞生成发生在成年哺乳动物的骨髓微环境中。可根据细胞大小的相继变化和免疫球蛋白链的表达鉴定来源于骨髓的B谱系细胞。B淋巴细胞生成增殖/成熟的顺序受可溶性调控并对骨髓毒性化学品的破坏敏感。例如,据显示苯的多羟基代谢物(例如氢醌)影响B-淋巴细胞生成。

[0011] 暴露于多种药物和毒素诱导骨髓损伤和改变造血作用。由于骨髓具有高储备能力,只有广泛和严重的骨髓损伤导致外周血中细胞计数的改变。对大多数毒剂,骨髓损伤的发病机理仍然不清楚。尽管一些活性剂,最主要是化学治疗剂,诱导快速增殖的骨髓前体的可预测的、剂量依赖性毒性,许多活性剂产生特应性骨髓损伤。直接的骨髓损伤可干扰骨髓产生适当的全身响应的能力。备选地,骨髓损伤可通过任意或所有增殖骨髓细胞系中的成熟异常反映。这进而可以导致多种外周血畸变和骨髓中的形态学异常。另一方面,当骨髓是主要的效应器官时,一种或多种细胞系中的增殖响应可反映适当的直接的化合物相关效应,而不是对全身性问题的补偿反应。

[0012] 在毒理学设定中对骨髓变化的解释可能是非常复杂的并可能涉及毒性和/或药理学响应的局部和全身性表现。一般地,骨髓变化可分为定量或定性的。定量异常包括增殖细胞系的多种增生和发育不全,并且需要同时评估外周血数据以进行适当的解释。定性异常指骨髓前体的形态学畸变(骨髓发育异常)和例如骨髓坏死、巨噬细胞增生和浆细胞增多的变化。

[0013] 骨髓毒性是特殊类型的成熟停止,其中可影响细胞质和细胞核。全身毒血症可影响所有增殖细胞系的细胞发育;然而,在晚期粒细胞前体(晚幼粒细胞、带状细胞(band cell)和成熟的中性粒细胞)中最容易识别出毒性。骨髓毒性可为药物诱导的,在严重感染的情况下与循环细菌毒素有关,或由从广泛组织坏死位点释放的循环毒素导致。

[0014] 由于可能的作用的多样性,评估有关抑制和矿质化的骨髓毒性是相当复杂的过程。现有方法通常包括血液学研究,病理学和组织病理学研究以及生化分析。然而,生物标记物的调控相当复杂,并且有时甚至可在相当晚的进展阶段出现变化。组织病理学评估的主要缺点是,其是侵入性的,且即使当与临床病理学/血液学测量组合时,其也较不可信,因为其是部分基于进行研究的毒理学家的个体解释(见,例如,Andrews CM(1998)The haematopoietic system,见:Target organ pathology,a basic text,Turton J和Hooson J(编)Taylor&Francis,London,United Kingdom,1998;Heaney RP,Whedon GD(2010)Bone morphology,见:Encyclopedia Britannica.2010年10月26日从Encyclopedia Britannica Online检索:<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/72869/bone/41883/Bone-morphology>;Rebar 1993,Toxicol.Pathol.21:118-129;Travlos 2006,Toxicol.Pathol.35:548-565;Weiss 1993,Toxicol.Pathol.21:135-140)。

[0015] 尚未有有效和可信地测定骨髓毒性,特别是其早期发作的灵敏和特异的方法,然而却非常需要这样的方法。如果考虑到其对包括淋巴细胞生成的造血作用的影响,骨髓毒性的重要性将变得显而易见。此外,在欧共体的任意工业类型中使用的化学化合物,例如,现在将需要依从REACH(化学品的登记、评估和批准(Registration,Evaluation and Authorisation of Chemicals))。应当理解,化学化合物诱导有关抑制和矿质化的骨髓毒性的潜能将被视为此化合物的高风险,并因此,此化合物仅可用于有限的应用并当应用时依照高安全标准。

[0016] 可能会受造血毒性影响的另一个重要的造血器官是血液。血液是身体内最大的器官之一且是化学品暴露的重要的潜在靶器官。血液是快速分裂组织,血液形成能力具有高扩张潜能。在人中,血细胞的更新是相当快的,在每天 $2-3 \times 10^{11}$ 个细胞的数量级。骨髓是主要的造血器官,负责产生红细胞、粒细胞、单核细胞、淋巴细胞和血小板。造血作用是在造血组织内的区室化的过程,红细胞生成发生在成红细胞岛中;粒细胞生成发生在不太清楚的焦点,巨核细胞生成发生在窦内皮附近。成熟后,受屏障细胞调控的造血细胞穿过静脉窦壁进入血流;血小板从穿过窦壁进入窦腔的巨核细胞的胞质突直接释放进血液。血细胞的生成、分化和成熟受体液因子调控。除了红细胞以外,其他细胞类型前往需要其功能的位置。所有细胞类型不断地离开循环并以不同的速度被替换。

[0017] 红细胞构成循环血容量的40-45%,并作为氧气从肺运输至外周组织的主要载体。此外,红细胞参与二氧化碳从组织至肺的运输和维持血液中的恒定pH。红细胞帮助调节炎症响应和/或是药物和毒素的储存库。红细胞产生是依赖于频繁的细胞分裂和高速率的血红蛋白合成的连续过程。血红蛋白的合成依赖于球蛋白链和血红素部分的协调的生产。血红素的合成需要将铁掺入卟啉环。铁缺乏通常是饮食缺乏或失血增加的结果。有助于失血的任意药物,例如非甾族抗炎剂,由于其增加的胃肠道溃疡和出血风险,可增加发展出缺铁性贫血的风险。血红素卟啉环合成的缺陷可导致成高铁红细胞性贫血,其特征是骨髓成红细胞中的铁积累。

[0018] 药物诱导的再生障碍性贫血可代表对异生物质的可预测的或特应性反应。此威胁生命的疾病的特征在于外周血全血细胞减少、网状细胞减少和骨髓发育不全。活性剂例如苯和辐射对造血祖细胞具有可预测的效果,并且导致的再生障碍性贫血对应于对这些活性剂的暴露量级。相反地,特应性再生障碍性贫血似乎与启动过程的活性剂的剂量无关。许多活性剂与再生障碍性贫血的发展相关,其中许多仅在一些患者中报导。再生障碍性,或非再生性贫血是与骨髓衰竭相关的综合征,其特征是贫血、全血细胞减少和不同程度的骨髓细胞减少。取决于其发作是否可归因于已知原因,例如电离辐射、药物或化学品暴露,可将再生障碍性贫血分为特发性或继发性的。再生障碍性贫血是干细胞调控失调,由于数量耗尽或分化缺陷不能重现血细胞。基质细胞缺陷也可在慢性骨髓衰竭中起重要作用。在这样情况中,有证据支持再生障碍性贫血的克隆起源。再生障碍性贫血的动物模型相对较少,且大部分局限于由病毒、白消安(busulfan)、辐射或苯诱导的贫血。早就知道在包括狗、猴子和小鼠的许多物种中骨髓特别易受辐射诱导的再生障碍性贫血。再生障碍性贫血有时也与药物暴露相关,所述药物包括氯霉素、卡马西平(carbamazepine)、非尔氨酯(felbamate)、苯妥英(phenytoin)、奎宁和保泰松(phenylbutazone)。

[0019] 铅具有多种血液学影响,其特别地降低亚铁螯合酶活性。此酶催化亚铁离子掺入卟啉环结构。铁插入原卟啉的失败导致血红素形成受抑制。过量的原卟啉占据了血红蛋白分子中血红素的位置,随着包含原卟啉的红细胞在循环,锌被螯合在分子中心通常由铁占据的位点。包含锌-原卟啉的红细胞具有强烈的荧光,可用于诊断铅毒性。认为受抑制的血红素合成是增加血红素合成途径中第一步活性的速率的刺激。

[0020] 止血作用是负责避免血液从血管损伤位点损失和维持循环血液处于流动态的多组分系统。止血系统的主要成分包括循环血小板、多种血浆蛋白质和血管内皮细胞。血小板对响应血管损伤形成稳定的止血栓至关重要。其从成熟的巨核细胞,多倍体细胞中形成。血

小板的释放机制不清楚,但似乎是通过细胞质的破碎。细胞因子血小板生成素刺激巨核细胞增殖、血小板产生和从普通干细胞的分化。血小板的寿命在物种之间不同:在人中为10天,在狗中为8天,在大鼠中为4.5天和在小鼠中为4天。类似地,啮齿类中的平均血小板体积比人小(血小板计数比人多);狗和猫中的血小板体积比人大。血小板首先通过von Willebrand因子(vWF)与血小板糖蛋白Ib/IX/V(GP Ib/IX/V)受体复合物的结合粘附在损伤的壁上。

[0021] 异生物物质可干扰血小板响应(通过引起血小板减少)或干扰血小板功能;一些活性剂能够影响血小板的数量和功能。血小板功能依赖于若干生化响应途径的协调的相互作用。已发现多种药物和食物可抑制血小板功能。影响血小板功能的主要药物类型包括非甾体抗炎剂、含 β -内酰胺的抗生素、心血管药物,特别是 β 阻断药、精神药物、麻醉药、抗组胺药和一些化学治疗剂。凝血是促进凝血酶形成的一系列丝氨酸蛋白酶的顺序活化的结果。凝血酶是多功能酶,其将纤维蛋白原转化为纤维蛋白;激活因子V,VIII,XI,XIII,蛋白质C和血小板;且与多种细胞相互作用。异生物物质对纤维蛋白凝块形成的最常见的毒性作用涉及对此过程必需的一种或多种关键蛋白质的降低的水平。凝血因子活性的降低可能是由于蛋白质合成的降低或从循环中清除的增加。参与凝血级联的大多数蛋白质在肝中合成。因此,损害肝功能的任意活性剂可导致凝血因子生产减少。

[0022] 暴露于多种药物和毒素诱导特征特别地为再生障碍性贫血,血小板聚集抑制和卟啉合成抑制的血液毒性。由于可能的作用的多样性,评估血液毒性是相当复杂的过程。现有方法通常包括血液学研究,病理学和组织病理学研究以及生化分析。然而,生物标记物的调控相当复杂,有时甚至可在相当晚的进展阶段出现变化。组织病理学评估的主要缺点是,其是侵入性的,且即使当与临床病理学/血液学测量组合时,其也较不可信,因为其是部分基于进行研究的毒理学家的个体解释。(见,例如,Aksoy 1989,Environ.Health Perspect.82:193-197;Andrews CM(1998)The haematopoietic system,见:Target organ pathology,a basic text,Turton J和Hooson J(编)Taylor&Francis,London,United Kingdom,1998;Bloom JC,Brandt JT(2008)第11章,Toxic responses of the blood,见:Casarett&Doull's Toxicology,The basic science of poisons,Klaassen CD(编),McGraw-Hill P,第7修订版,New York(2008);Haschek WM,Wallig MA,Rousseaux (2010)Fundamentals of toxicologic pathology,第2版,Academic Press,Elsevier,London,UK)。

[0023] 尚未有有效和可信地测定有关再生障碍性贫血、血小板聚集抑制和卟啉合成抑制的血液毒性,特别是其早期发作的灵敏和特异的方法,然而却非常需要这样的方法。如果考虑到其对例如再生障碍性贫血、血小板聚集抑制和卟啉合成抑制的影响,血液毒性的重要性将变得显而易见。此外,在欧共体的任意工业类型中使用的化学化合物,例如,现在将需要依从REACH(化学品的登记、评估和批准(Registration,Evaluation and Authorisation of Chemicals))。应当理解,化学化合物诱导血液毒性,特别是再生障碍性贫血、血小板聚集抑制和卟啉合成抑制的潜能将被视为此化合物的高风险,因此,此化合物仅可用于有限的应用并依照高安全标准应用。

[0024] 尚未有以有效和可信的方式评估化学化合物的毒理学性质,特别是造血毒性的灵敏和特异的方法,然而却非常需要这样的方法。

[0025] 因此,本发明所代表的技术问题可被视为提供满足上述需要的工具和方法。所述技术问题通过权利要求中表征的和在下文描述的实施方案解决。

[0026] 因此,本发明涉及诊断造血毒性的方法,所述方法包括:

[0027] (a)在疑为罹患造血毒性的对象的测试样品中测定选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b或9中任一个的至少一种生物标记物的量,和

[0028] (b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此诊断造血毒性。

[0029] 在上述方法的优选实施方案中,所述对象已接触疑为能够诱导造血毒性的化合物。

[0030] 本发明也涉及测定化合物是否能够在对象中引起造血毒性的方法,所述方法包括:

[0031] (a)在已接触疑为能够诱导造血毒性的化合物的对象的样品中测定选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b或9中任一个的至少一种生物标记物的量;和

[0032] (b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此测定化合物引起造血毒性的能力。

[0033] 在上述方法的优选实施方案中,所述化合物为选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺(Saflufenacil),环孢菌素A,氟环唑(Epoxiconazole),氟他胺(Flutamide),三水合醋酸铅,利谷隆(Linuron),石胆酸,甲巯咪唑(Methimazole),甲基强的松龙(Methylprednisolone),奥沙利铂(Oxaliplatin),丙磺舒(Probenecid),他克莫司(Tacrolimus),三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷(Cytarabin)和布洛芬(Ibuprofen)的中至少一种化合物。

[0034] 在本发明的方法的另一个优选实施方案中,所述参考来源于(i)罹患造血毒性的对象或对象组或(ii)已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,测试样品中的生物标记物的量与参考基本相同指示造血毒性。

[0035] 在本发明的方法的另一个优选实施方案中,所述参考来源于未罹患造血毒性的对象或对象组或(ii)未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,测试样品中的生物标记物的量相比参考不同指示造血毒性。

[0036] 在本发明的方法的另一个实施方案中,所述参考是对于对象群体的生物标记物的计算的参考。在所述方法的更优选的实施方案中,测试样品中的生物标记物的量相比参考不同指示造血毒性。

[0037] 本发明也设想鉴定用于治疗造血毒性的物质的方法,所述方法包括以下步骤:

[0038] (a)在已接触疑为能够治疗造血毒性的候选物质的罹患造血毒性的对象的样品中测定选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的量;和

[0039] (b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此鉴定能够治疗造血毒性的物质。

[0040] 在上述方法的优选实施方案中,所述参考来源于(i)罹患造血毒性的对象或对象组或(ii)已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中不同指示能够治疗造血毒性的物质。

[0041] 在上述方法的另一个优选实施方案中,所述参考来源于(i)已知未罹患造血毒性的对象或对象组或(ii)未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中基本相同指示能够治疗造血毒性的物质。

[0042] 在上述方法的另一个优选实施方案中,所述参考是在对象群体中的生物标记物的计算的参考。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中基本相同指示能够治疗造血毒性的物质。

[0043] 本发明也涉及选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物或所述生物标记物的检测剂用于在对象样品中诊断造血毒性的用途。

[0044] 此外,本发明涉及用于在疑为罹患造血毒性的对象的样品中诊断造血毒性的设备,其包含:

[0045] (a)分析单元,其包含选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的检测剂,所述分析单元允许测定样品中存在的所述生物标记物的量;和与其有效连接的

[0046] (b)评估单元,其包含储存的参考和数据处理器,所述评估单元允许比较由分析单元测定的所述至少一种生物标记物的量和储存的参考,由此诊断造血毒性。

[0047] 在发明的设备的优选实施方案中,所述储存的参考是来源于已知罹患造血毒性的对象或对象组或已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较由分析单元测定的至少一种生物标记物的量和

储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考基本相同指示存在造血毒性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示不存在造血毒性。

[0048] 在发明的设备的另一个优选实施方案中,所述储存的参考是来源于已知未罹患造血毒性的对象或对象组或未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧啶草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较由分析单元测定的至少一种生物标记物的量和储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示存在造血毒性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考基本相同指示不存在造血毒性。

[0049] 此外,本发明涉及用于诊断造血毒性的试剂盒,其包含选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的检测剂,和至少一种生物标记物的标准物,所述标准物的浓度来源于已知罹患造血毒性的对象或对象组或来源于已知未罹患造血毒性的对象或对象组。

[0050] 特别地,本发明涉及诊断骨髓毒性的方法,所述方法包括:

[0051] (a)在疑为罹患骨髓毒性的对象的测试样品中测定选自表1a,1b,1c,1d,1e或1f中任一个的至少一种生物标记物的量,和

[0052] (b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此诊断骨髓毒性。

[0053] 在上述方法的优选实施方案中,所述对象已接触疑为能够诱导骨髓毒性的化合物。

[0054] 本发明也涉及测定化合物是否能够在对象中诱导骨髓毒性的方法,其包括:

[0055] (a)在已接触疑为能够引起骨髓毒性的化合物的对象的样品中测定选自表1a,1b,1c,1d,1e或1f中任一个的至少一种生物标记物的量;和

[0056] (b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此测定化合物诱导骨髓毒性的能力。

[0057] 在上述方法的优选实施方案中,所述化合物为选自盐酸阿霉素,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷,布洛芬和奥沙利铂的至少一种化合物。

[0058] 在本发明的方法的另一个优选实施方案中,所述参考来源于(i)罹患骨髓毒性的对象或对象组或(ii)已接触选自盐酸阿霉素,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷,布洛芬和奥沙利铂的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中基本相同指示骨髓毒性。

[0059] 在本发明的方法的另一个优选实施方案中,所述参考来源于(i)已知未罹患骨髓毒性的对象或对象组或(ii)未接触选自盐酸阿霉素,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷,布洛芬和奥沙利铂的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,在测试样品中生物标记物的量相比参考不同指示骨髓毒性。

[0060] 在本发明的方法的另一个实施方案中,所述参考是对于对象群体的生物标记物的计算的参考。在所述方法的更优选的实施方案中,测试样品中生物标记物的量相比参考不

同指示骨髓毒性。

[0061] 本发明也设想了鉴定用于治疗骨髓毒性的物质的方法,其包括以下步骤:

[0062] (a)在已接触疑为能够治疗骨髓毒性的候选物质的罹患骨髓毒性的对象的样品中测定选自表1a,1b,1c,1d,1e或1f中任一个的至少一种生物标记物的量;和

[0063] (b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此鉴定能够治疗骨髓毒性的物质。

[0064] 在上述方法的优选实施方案中,所述参考来源于(i)罹患骨髓毒性的对象或对象组或(ii)已接触选自盐酸阿霉素,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷,布洛芬和奥沙利铂的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中不同指示骨髓毒性。

[0065] 在上述方法的另一个优选实施方案中,所述参考来源于(i)已知未罹患骨髓毒性的对象或对象组或(ii)未接触选自盐酸阿霉素,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷,布洛芬和奥沙利铂的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中基本相同指示能够治疗骨髓毒性的物质。

[0066] 在上述方法的另一个优选实施方案中,所述参考是在对象群体中的生物标记物的计算的参考。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中基本相同指示能够治疗骨髓毒性的物质。

[0067] 本发明也涉及选自表1a,1b,1c,1d,1e或1f中任一个的至少一种生物标记物或所述生物标记物的检测剂用于在对象样品中诊断骨髓毒性的用途。

[0068] 此外,本发明涉及用于在疑为罹患骨髓毒性的对象的样品中诊断骨髓毒性的设备,其包含:

[0069] (a)分析单元,其包含选自表1a,1b,1c,1d,1e或1f中任一个的至少一种生物标记物的检测剂,所述分析单元允许测定样品中存在的所述生物标记物的量;和与其有效连接的

[0070] (b)评估单元,其包含储存的参考和数据处理器,所述评估单元允许比较由分析单元测定的所述至少一种生物标记物的量和储存的参考,由此诊断骨髓毒性。

[0071] 在发明的设备的优选实施方案中,所述储存的参考是来源于已知罹患骨髓毒性的对象或对象组或已接触选自盐酸阿霉素,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷,布洛芬和奥沙利铂的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较由分析单元测定的至少一种生物标记物的量和储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考基本相同指示存在骨髓毒性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示不存在骨髓毒性。

[0072] 在发明的设备的另一个优选实施方案中,所述储存的参考是来源于已知未罹患造血毒性的对象或对象组或未接触选自盐酸阿霉素,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷,布洛芬和奥沙利铂的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较由分析单元测定的至少一种生物标记物的量和储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示存在骨髓毒性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考基本相同指示不存在骨髓毒性。

[0073] 此外,本发明涉及用于诊断骨髓毒性的试剂盒,其包含选自表1a,1b,1c,1d,1e或1f中任一个的至少一种生物标记物的检测剂和至少一种生物标记物的标准物,所述标准物

的浓度来源于已知罹患骨髓毒性的对象或对象组或来源于已知未罹患骨髓毒性的对象或对象组。

[0074] 特别地,本发明涉及诊断血液毒性的方法,其包括:

[0075] (a)在疑为罹患血液毒性的对象的测试样品中测定选自表2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的量,和

[0076] (b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此诊断血液毒性。

[0077] 在上述方法的优选实施方案中,所述对象已接触疑为能够诱导血液毒性的化合物。

[0078] 本发明也涉及测定化合物是否能够在对象中诱导血液毒性的方法,其包括:

[0079] (a)在已接触疑为能够诱导血液毒性的化合物的对象的样品中测定选自表2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的量;和

[0080] (b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此测定化合物引起血液毒性的能力。

[0081] 在上述方法的优选实施方案中,所述化合物为选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司和三乙醇胺的至少一种化合物。

[0082] 在本发明的方法的另一个优选实施方案中,所述参考来源于(i)罹患血液毒性的对象或对象组或(ii)已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司和三乙醇胺的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中基本相同指示血液毒性。

[0083] 在本发明的方法的另一个优选实施方案中,所述参考来源于(i)已知未罹患血液毒性的对象或对象组或(ii)未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司和三乙醇胺的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,在测试样品中生物标记物的量相比参考不同指示血液毒性。

[0084] 在本发明的方法的另一个实施方案中,所述参考是对于对象群体的生物标记物的计算的参考。在所述方法的更优选的实施方案中,在测试样品中生物标记物的量相比参考不同指示血液毒性。

[0085] 本发明也设想鉴定用于治疗血液毒性的物质的方法,其包括以下步骤:

[0086] (a)在已接触疑为能够治疗血液毒性的候选物质的罹患血液毒性的对象的样品中测定选自表2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的量;和

[0087] (b)比较在步骤(a)中测定的量和参考,由此鉴定能够治疗血液毒性的物质。

[0088] 在上述方法的优选实施方案中,所述参考来源于(i)罹患血液毒性的对象或对象

组或(ii)已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司和三乙醇胺的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中不同指示能够治疗血液毒性的物质。

[0089] 在上述方法的另一个优选实施方案中,所述参考来源于(i)已知未罹患血液毒性的对象或对象组或(ii)未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司和三乙醇胺的至少一种化合物的对象或对象组。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中基本相同指示能够治疗血液毒性的物质。

[0090] 在上述方法的另一个优选实施方案中,所述参考是在对象群体中的生物标记物的计算的参考。在所述方法的更优选的实施方案中,生物标记物的量在测试样品与参考中基本相同指示能够治疗血液毒性的物质。

[0091] 本发明也涉及选自表2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物或所述生物标记物的检测剂用于在对象样品中诊断血液毒性的用途。

[0092] 此外,本发明涉及用于在疑为罹患血液毒性的对象的样品中诊断血液毒性的设备,其包含:

[0093] (a)分析单元,其包含选自表2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的检测剂,所述分析单元允许测定样品中存在的所述生物标记物的量;和与其有效连接的

[0094] (b)评估单元,其包含储存的参考和数据处理器,所述评估单元允许比较由分析单元测定的所述至少一种生物标记物的量和储存的参考,由此诊断血液毒性。

[0095] 在发明的设备的优选实施方案中,所述储存的参考是来源于已知罹患血液毒性的对象或对象组或已接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司和三乙醇胺的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较由分析单元测定的至少一种生物标记物的量和储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考基本相同指示存在血液毒性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示不存在血液毒性。

[0096] 在发明的设备的另一个优选实施方案中,所述储存的参考是来源于已知未罹患血液毒性的对象或对象组或未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司和三乙醇胺的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较由分析单元测定的至少一种生物标记物的量和储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示存在血液毒性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相

比参考基本相同指示不存在血液毒性。

[0097] 此外,本发明涉及用于诊断血液毒性的试剂盒,其包含选自表2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的至少一种生物标记物的检测试剂和至少一种生物标记物的标准物,所述标准物的浓度来源于已知罹患血液毒性的对象或对象组或来源于已知未罹患血液毒性的对象或对象组。

[0098] 特别地,本发明还设想以下具体方法、用途、设备和试剂盒。

[0099] 以下定义和解释应用必要的变更适用于本发明所有前面的实施方案和下面描述的实施方案。

[0100] 依照本发明提及的方法可基本由上述步骤组成或可包括其他步骤。其他步骤可涉及样品预处理或评估通过所述方法得到的诊断结果。优选的其他评估步骤在本文别处描述。方法可部分或全部通过自动化辅助。例如,涉及测定生物标记物的量的步骤可通过机器人和自动化阅读设备自动化。同样地,涉及量的比较的步骤可通过合适的数据处理设备(例如包含在执行时自动实施比较的程序代码的计算机)自动化。在这种情况下将从储存的参考,例如从数据库提供参考。应当理解,所述方法优选地是对对象样品离体实施的方法,即不在人或动物体上实践。

[0101] 本文中使用的术语“诊断”指评估对象罹患病症,例如本文提及的中毒、疾病或失调,或具有这样的病症倾向(predisposition)的概率。有时将倾向的诊断称为预后,或预测对象在未来预定义的时间框内将患上病症的可能性。本领域技术人员应当理解,这样的评估不一定对待诊断的对象100%正确,尽管优选100%正确。但是,术语要求可将统计上显著的部分的对象鉴定为罹患病症或具有病症倾向。使用多种熟知的统计学评估工具,例如测定置信区间、测定p值、Student t检验、Mann-Whitney检验等等,本领域技术人员可不费周折地测定一部分是否是统计上显著的。细节可见Dowdy和Wearden,Statistics for Research,John Wiley&Sons,New York 1983。优选的置信区间是至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%或至少95%。p值优选为0.2,0.1,0.05。

[0102] 根据本发明的诊断也包括对病症或其症状及其倾向的监控、确认和分类。监控指对已诊断的病症或倾向保持追踪。监控包括,例如,测定病症或倾向的进展,测定特定治疗对病症进展的影响或预防措施例如预防治疗或饮食对具有倾向的对象中的病症发展的影响。确认涉及使用其他指示物或标记物强化或证实已测定的病症或病症倾向的诊断。分类涉及(i)将病症分为不同的类型,例如对应伴随病症的症状的强度,或(ii)区分在不同阶段伴随病症的疾病或失调。病症倾向可基于风险的程度分类,即对象后来患上病症的概率。此外,分类也优选地包括分配将用本发明的方法检测的化合物的作用方式。具体地,本发明的方法允许测定化合物的特定作用方式,其中所述化合物的作用方式尚不清楚。这优选地通过比较对所述化合物测定的至少一种生物标记物的量或生物标记物代表性谱和对作为参考的作用方式已知的化合物测定的生物标记物的量或生物标记物谱实现。作用方式的分类允许更可信地评估化合物的毒性,因为鉴定了化合物的分子靶。

[0103] 本文使用的术语“造血毒性”涉及导致造血功能受损,特别地,造血作用受损或红细胞或免疫系统细胞例如白细胞的功能受损的造血系统器官或细胞的任意损害或损伤。优选地,造血毒性影响骨髓中的造血作用或免疫系统的功能。因此,本文使用的术语造血毒性大体上涵盖骨髓毒性和血液毒性。优选地,本文使用的造血毒性是由化学化合物或药物的

施用诱导的或导致的,即所谓的毒素诱导的造血毒性。

[0104] 造血毒性的上述表现的症状和临床症状是本领域技术人员熟知的并在毒理学的典范性著作中详细描述,例如H.Marquardt,S.G.**Schäfer**,R.O.McClellan,F.Welsch(编),“Toxicology”,第13章:The Liver,1999,Academic Press,London。

[0105] 本文中使用的骨髓毒性优选地指骨髓功能的损伤。优选地,骨髓毒性伴随骨髓中多能干细胞的减少的增殖或分化(淋巴细胞生成)。骨髓毒性可优选地伴随快速增殖的骨髓前体的毒性或特应性骨髓损伤。直接的骨髓损伤可干扰骨髓发动适当的全身响应的能力。或者,骨髓损伤可通过任意或所有增殖骨髓细胞系的成熟异常反映。这可进而导致多种外周血畸变和骨髓中的形态学异常。另一方面,当骨髓是主要的效应器官时,一种或多种细胞系中的增殖响应可反映适当的直接的化合物相关效应,而不是对全身性问题的补偿响应。一般地,骨髓毒性和伴随的骨髓变化可分为定量或定性的。定量异常包括增殖细胞系的多种增生和发育不全,并且需要同时评估外周血数据以进行适当的解释。定性异常指骨髓前体的形态学畸变(骨髓发育异常)和例如骨髓坏死、巨噬细胞增生和浆细胞增多的变化。骨髓毒性可被视为特殊类型的成熟停止,其中可影响细胞质和细胞核二者。全身毒血症可影响所有增殖细胞系的细胞发育;然而,在晚期粒细胞前体(晚幼粒细胞、带状细胞和成熟的中性粒细胞)中最容易识别出毒性。骨髓毒性可为药物诱导的,在严重感染的情况下与循环细菌毒素有关,或由广泛组织坏死位点释放的循环毒素导致。

[0106] 优选地,如果造血毒性是骨髓毒性,将通过本发明的方法测定的至少一种生物标记物选自表1a,1b,1c,1d,1e或1f中的任一个。更优选地,所述骨髓毒性是骨髓抑制,更优选地,可由铂类化合物,例如奥沙利铂诱导的骨髓抑制。

[0107] 本文使用的血液毒性优选地指血液功能的损伤。优选地,可损伤红细胞功能和/或白细胞功能。优选地,血液毒性包括药物诱导的再生障碍性贫血,其特征不在于外周血全血细胞减少、网状细胞减少和骨髓发育不全。活性剂例如苯和辐射对造血祖细胞具有可预测的效果,且导致的再生障碍性贫血对应于这些活性剂的暴露量级。相反地,特应性再生障碍性贫血似乎与启动过程的活性剂的剂量无关。许多活性剂与再生障碍性贫血的发展相关,其中许多仅在一些患者中报导。再生障碍性,或非再生性贫血是与骨髓衰竭相关的综合征,其特征不在于贫血、全血细胞减少和不同程度的骨髓细胞减少。取决于其发作是否可归因于已知原因,例如电离辐射、药物或化学品暴露,可将再生障碍性贫血分为特发性或继发性的。再生障碍性贫血是干细胞调控失调,由于数量耗尽或分化缺陷使干细胞不能重现血细胞。基质细胞缺陷也可在慢性骨髓衰竭中起重要作用。在一些这样的情况中,有证据支持再生障碍性贫血的克隆起源。再生障碍性贫血的动物模型相对较少,且大部分局限于由病毒、白消安、辐射或苯诱导的贫血。早就知道在包括狗、猴子和小鼠的许多物种中骨髓特别易受辐射诱导的再生障碍性贫血。再生障碍性贫血有时也与药物暴露相关,所述药物包括氯霉素、卡马西平、非尔氨酯、苯妥英、奎宁和保泰松。术语血液毒性也包括铅毒性。铅具有多种血液学影响,其特别地降低亚铁螯合酶活性。此酶催化亚铁离子掺入卟啉环结构。铁插入原卟啉的失败导致血红素形成受抑制。过量的原卟啉占据了血红蛋白分子中血红素的位置,随着包含原卟啉的红细胞在循环,锌被螯合在分子中心通常由铁占据的位点。包含锌-原卟啉的红细胞具有强烈的荧光,可用于诊断铅毒性。认为受抑制的血红素合成是增加血红素合成途径中第一步活性的速率的刺激。此外,血液毒性可优选地影响血小板和/或血小板功能。

特别地,血液毒性可通过导致血小板减少或干预血小板功能导致受损的血小板响应;一些活性剂能够影响血小板数量和功能二者。可优选地通过用于测定血小板凝血功能的凝血测定法测定血小板功能。因此,本文使用的血液毒性优选地包括再生障碍性贫血、铅毒性、血小板聚集抑制和/或卟啉合成抑制。

[0108] 优选地,如果造血毒性是血液毒性,将通过本发明的方法测定的至少一种生物标记物选自表2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中的任一个。

[0109] 更优选地,如果至少一种生物标记物选自表2a,2b,12a或12b中所示的生物标记物,所述血液毒性由贫血表征。特别地,发现表12a和/或12b的生物标记物是贫血的早期指示物。如果在本发明的方法中使用大鼠作为对象,所述生物标记物早在用2-氯苯胺,苯胺或4-氯-3-硝基苯胺中的任一种刺激7天后发生改变。

[0110] 更优选地,如果至少一种生物标记物是选自表3a,3b,3c,3d,3e,3f或3g中所示的生物标记物,所述血液毒性由卟啉合成抑制表征。

[0111] 还更优选地,如果至少一种生物标记物是选自表4a,4b,4c或4d中所示的生物标记物,所述血液毒性的特征在于受损的高铁血红蛋白水平。

[0112] 更优选地,如果至少一种生物标记物是选自表5a,5b,5c或5d中所示的生物标记物,所述血液毒性由脾含铁血黄素沉着症表征。

[0113] 更优选地,如果至少一种生物标记物是选自表6a或6b中所示的生物标记物,所述血液毒性由造血系统细胞的全身性受损的(抗)增殖表征。

[0114] 更优选地,如果至少一种生物标记物是选自表7a或7b中所示的生物标记物,所述血液毒性由血液再生障碍性贫血表征。

[0115] 更优选地,如果至少一种生物标记物是选自表8a或8b中所示的生物标记物,所述血液毒性由免疫抑制表征。

[0116] 更优选地,如果至少一种生物标记物是选自表9中所示的生物标记物,所述血液毒性由脾造血作用表征。

[0117] 依照本发明发现表中所列的多于一种生物标记物的组合进一步加强了诊断,因为每一种生物标记物显然是统计上独立的诊断预测物。此外,也显著增加了造血毒性的特异性,因为抵消了其他组织对标记物丰度的影响。因此,本文使用的术语“至少一种”优选地指在任一个附带的表中提及的至少2种,至少3种,至少4种,至少5种,至少6种,至少7种,至少8种,至少9种或至少10种生物标记物的组合。优选地,依照本发明的方法,组合测定在任一个表中引述的所有生物标记物。

[0118] 来自单个表的用于造血毒性和用于在表中提及的指征的优选的生物标记物组或组合如下:

[0119] 表1a,1b:孕酮,4-羟基苯丙酮酸,21-羟基孕酮(11-去氧皮质酮),18-羟基-11-去氧皮质酮或柠檬酸盐;

[0120] 表1c,1d:胆碱缩醛磷脂No. 02,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸或酮亮氨酸(ketoleucine)

[0121] 表1e,1f:色氨酸,鸟氨酸,14-甲基十六烷酸,葡萄糖-6-磷酸或18-羟基-11-去氧皮质酮

- [0122] 表2a, 2b: Ribal, 胞嘧啶, 18-羟基-11-去氧皮质酮, TAG(C16:0, C18:2)或TAG No 02
- [0123] 表3a, 3b: 缬氨酸, 尿素, 苯丙氨酸, 组氨酸或TAG(C16:0, C18:1, C18:3)
- [0124] 表3c, 3d: 赖氨酸, 鞘磷脂(d18:2, C18:0), 苹果酸盐, DAG(C18:1, C18:2)或异亮氨酸
- [0125] 表3e, 3f: 异亮氨酸, 甲硫氨酸, 亮氨酸, 丝氨酸或苏糖酸
- [0126] 表3g: 异亮氨酸, 甲硫氨酸, 苯丙氨酸, 亮氨酸或缬氨酸
- [0127] 表4a, 4b: 丝氨酸, Ribal, 胞嘧啶, 苏氨酸或二十二碳六烯酸(C22: 顺[4, 7, 10, 13, 16, 19]6)
- [0128] 表4c, 4d: 苏氨酸, 丝氨酸, 尿素, 棕榈油酸(C16: 顺[9]1)或甘氨酸
- [0129] 表5a, 5b: 亚油酸(C18: 顺[9, 12]2), 二十二碳六烯酸(C22: 顺[4, 7, 10, 13, 16, 19]6), 十七酸(C17:0), 植物鞘氨醇或胞嘧啶
- [0130] 表5c, 5d: Ribal, 二十二碳六烯酸(C22: 顺[4, 7, 10, 13, 16, 19]6), 胞嘧啶, 苏糖酸或棕榈油酸(C16: 顺[9]1)
- [0131] 表6a, 6b: 辅酶Q9, 辅酶Q10, 胞嘧啶, 甘露糖或Ribal
- [0132] 表7a, 7b: γ -亚麻酸(C18: 顺[6, 9, 12]3), 鞘磷脂(d18:1, C24:0), 组氨酸, 胆碱缩醛磷脂No 01或胞嘧啶
- [0133] 表8a, 8b: 胆固醇酯No 01, 酮亮氨酸, 谷氨酸, 天冬氨酸或18-羟基-11-去氧皮质酮
- [0134] 表9a, 9b: 尿酸, 胞嘧啶, 尿嘧啶, 抗坏血酸或Ribal
- [0135] 因此, 优选地, 至少一种生物标记物是选自上述组的至少一种生物标记物或至少一种生物标记物是由上述生物标记物组组成的或包含上述生物标记物组的生物标记物组合。如在附带的实施例中更详细描述地, 已将上述生物标记物和生物标记物组合鉴定为具有特别高的诊断价值的关键生物标记物。
- [0136] 此外, 仍然可另外测定其他生物标记物或临床参数, 包括已知的代谢物、基因突变、转录物和/或蛋白质量或酶活性。依照本发明的方法可测定的这样的其他临床或生化参数是本领域熟知的。
- [0137] 本文中使用的术语“生物标记物”指化学化合物, 其在样品中的存在或浓度指示病症, 优选地, 本文提及的造血毒性的存在或不存在, 或强度。化学化合物优选地是代谢物或其衍生的分析物。分析物可为与在生物中发现的实际代谢物相同的化学化合物。但是, 术语也包括这样的代谢物的衍生物, 其为内源产生的, 或在分离或样品预处理中产生或为实施本发明的方法的结果, 例如在纯化和/或测定步骤中产生。在特定情况下, 通过化学性质例如溶解度进一步表征分析物。由于所述性质, 分析物可存在于在纯化和/或测定方法中得到的极性脂质级分中。因此, 化学性质和, 优选地, 溶解度将导致分析物在纯化和/或测定方法中得到的极性脂质级分中存在。因此, 由于分析物在纯化和/或测定方法中得到的极性脂质组分中的存在考虑的所述化学性质, 特别是溶解度应进一步表征所述分析物并帮助其的鉴定。如何测定这些化学性质和考虑的细节可见下述附带的实施例。优选地, 分析物以定性和定量的方式代表代谢物, 并因此不可避免地允许推断对象中, 或至少在所述对象的测试样品中代谢物的存在或不存在, 或代谢物的量。本文中以单数形式提及生物标记物、分析物和代谢物, 但也包括术语的复数形式, 即指相同分子种类的生物标记物、分析物或代谢物

的复数。此外,根据本发明的生物标记物不一定对应一种分子种类。更确切地说,生物标记物可包含化合物的立体异构体或对映体。此外,生物标记物也可代表生物类别的同分异构分子的同分异构体的总和。所述同分异构体在有些情况下应展示相同的分析特征,并因此不能被多种分析方法(包括在下述附带的实施例中应用的方法)所区分。然而,同分异构体应共有至少相同的总式参数,因此在例如脂的情况下,在脂肪酸和/或鞘(sphingo)基部分中共有相同的链长和相同的双键数。

[0138] 本文使用的术语“测试样品”指将用于通过本发明的方法诊断造血毒性的样品。优选地,所述测试样品是生物样品。来自生物来源的样品(即生物样品)通常包含多种代谢物。将在本发明的方法中使用的优选的生物样品是来自体液,优选地,血液、血浆、血清、唾液、胆汁、尿或脑脊液的样品,或例如通过活检源自细胞、组织或器官,优选来自肝的样品。更优选地,样品是血液、血浆或血清样品,最优选地,血浆样品。生物样品来源于在本文别处说明的对象。得到上述不同类型生物样品的技术是本领域熟知的。例如,可通过采血得到血液样品,而例如通过活检得到组织或器官样品。

[0139] 优选地,在其用于本发明的方法以前预处理上述样品。如下文更详细描述地,所述预处理可包括释放或分离化合物或去除过量材料或废物所必需的处理。合适的技术包括离心、提取、分级、超滤、蛋白质沉淀随后过滤和纯化和/或化合物的富集。此外,实施其他预处理以提供形式或浓度适于化合物分析的化合物。例如,如果在本发明的方法中使用气相色谱-质谱联用,需要在所述气相色谱以前衍生化化合物。合适和必要的预处理取决于用于实施本发明的方法的工具并且这是本领域技术人员熟知的。依照本发明使用的术语“样品”也包含前述预处理的样品。

[0140] 本文使用的术语“对象”涉及动物,优选哺乳动物,例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、仓鼠、猪、绵羊、狗、猫、马、猴子或牛,也优选人。更优选地,对象是啮齿类,和最优选地是大鼠。可应用本发明的方法诊断的其他动物是鱼、鸟或爬行类。优选地,所述对象曾接触或已接触了疑为能够诱导造血毒性的化合物。已接触了疑为诱导造血毒性的化合物的对象可为,例如实验室动物,例如用于例如化合物毒性的筛选测定法的大鼠。疑为已经接触了能够诱导造血毒性的化合物的对象也可为了选择合适的疗法待诊断的对象。优选地,本文使用的能够诱导造血毒性的化合物是1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧啶草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷或布洛芬。

[0141] 优选地,如果对象是雌性,将通过本发明的方法测定的至少一种生物标记物选自表1a,1b,2a,2b,3a,3b,3c,3d,4a,4b,5a,5b,6a或6b中的任一个。在雌性对象中造血毒性的优选的生物标记物组或组合是:18-羟基-11-去氧皮质酮,21-羟基孕酮(11-去氧皮质酮),4-羟基苯丙酮酸,柠檬酸盐,辅酶Q10,辅酶Q9,胞嘧啶,DAG(C18:1,C18:2),二十二碳六烯酸(C22:顺[4,7,10,13,16,19]6),十七酸(C17:0),组氨酸,异亮氨酸,亚油酸(C18:顺[9,12]2),赖氨酸,苹果酸盐,甘露糖,苯丙氨酸,植物鞘氨醇,孕酮,Ribal,丝氨酸,鞘磷脂(d18:2,C18:0),TAG(C16:0,C18:1,C18:3),TAG(C16:0,C18:2),TAG No 02,苏氨酸,尿素和缬氨酸。

[0142] 优选地,如果对象是雄性,将通过本发明的方法测定的至少一种生物标记物选自表1c,1d,1e,1f,3e,3f,3g,4c,4d,5c,5d,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中的任一个。在雄性中

造血毒性的优选的生物标记物组或组合是:14-甲基十六烷酸,18-羟基-11-去氧皮质酮,抗坏血酸,天冬氨酸,胆固醇酯No01,胆碱缩醛磷脂No 01,胆碱缩醛磷脂No 02,胞嘧啶,二十二碳六烯酸(C22:顺[4,7,10,13,16,19]6), γ -亚麻酸(C18:顺[6,9,12]3),葡萄糖-6-磷酸,谷氨酸,甘氨酸,组氨酸,异亮氨酸,酮亮氨酸,亮氨酸,甲硫氨酸,鸟氨酸,棕榈油酸(C16:顺[9]1),苯丙氨酸,Rib1,丝氨酸,鞘磷脂(d18:1,C24:0),苏糖酸,苏氨酸,色氨酸,尿嘧啶,尿素,尿酸和缬氨酸。

[0143] 本文使用的术语“测定量”指测定生物标记物,即代谢物或分析物的至少一种特性特征。依照本发明的特性特征是表征生物标记物的物理和/或化学性质,包括生化性质的特征。这样的性质包括例如分子量、粘度、密度、电荷、自旋、旋光性、颜色、荧光、化学发光、元素组成、化学结构、与其他化合物反应的能力、引起生物读出系统响应(例如诱导报告基因)的能力等等。所述性质的值可作为特性特征并可通过本领域熟知的技术测定。此外,特性特征可为通过标准运算,例如数学计算,例如乘法、除法或对数微积分从生物标记物的物理和/或化学性质值得到的任意特征。最优选地,至少一种特性特征允许测定和/或化学鉴定生物标记物及其量。因此,特征值优选地也包含涉及生物标记物丰度的信息,从其得到特征值。例如,生物标记物的特征值可为质谱中的峰。这样的峰包含生物标记物的特征信息,即 m/z (质荷比)信息,以及与样品中所述生物标记物的丰度(即其量)相关的强度值。

[0144] 如上讨论地,优选地,可定量或半定量测定待依照本发明的方法测定的至少一种生物标记物。对于定量测定,基于上文提及的(一种或多种)特性特征测定的值测定生物标记物的绝对或精确量或测定生物标记物的相对量。在不能或不应测定生物标记物的精确量的情况下可测定相对量。在所述情况中,可测定存在的生物标记物的量相对包含第二种量的所述生物标记物的第二样品是增加还是减少。因此定量分析生物标记物也包括有时被称为生物标记物的半定量分析。

[0145] 此外,在本发明的方法中使用的测定优选地包括在上文提及的分析步骤前使用化合物分离步骤。优选地,所述化合物分离步骤得到样品中包含的至少一种生物标记物的时间分辨分离。因此,依照本发明优选使用的用于分离的合适技术包括所有色谱分离技术,例如液相色谱(LC),高效液相色谱(HPLC),气相色谱(GC),薄层色谱,大小排阻或亲和色谱。这些技术是本领域熟知的,本领域技术人员可不费周折地应用。最优选地,本发明的方法设想的LC和/或GC是色谱技术。用于这样测定生物标记物的合适设备是本领域熟知的。优选地,特别在气相色谱质谱(GC-MS),液相色谱质谱(LC-MS),直接注入质谱或傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR-MS),毛细管电泳质谱(CE-MS),高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS),四级质谱,任意相继偶联质谱,例如MS-MS或MS-MS-MS,电感耦合等离子体质谱(ICP-MS),热解质谱(Py-MS),离子迁移率质谱或飞行时间质谱(TOF)中使用质谱。最优选地,如下详细描述使用LC-MS和/或GC-MS。所述技术在例如Nissen 1995, Journal of Chromatography A, 703:37-57, US 4,540,884或US 5,397,894中公开,其公开内容在此引入作为参考。作为替代方案或除了质谱技术以外,可使用以下技术用于化合物测定:核磁共振(NMR),磁共振成像(MRI),傅里叶变换红外分析(FT-IR),紫外(UV)光谱,折射率(RI),荧光检测,放射化学检测,电化学检测,光散射(LS),色散型拉曼光谱或或火焰电离检测(FID)。这些技术是本领域技术人员熟知的,可不费周折地应用。本发明的方法将优选地通过自动化辅助。例如,可通过机器人自动化样品处理或预处理。优选地,通过合适的计算机程序和数据库辅助数据处

理和比较。如上文描述的自动化允许以高通量方法使用本发明的方法。

[0146] 此外,也可通过特定的化学或生物学测定法测定生物标记物。所述测定法应包括允许特异性测试样品中的生物标记物的工具。优选地,所述工具能够特异性识别生物标记物的化学结构或能够基于生物标记物与其他化合物反应的能力或生物标记物引起生物读出系统响应(例如诱导报告基因)的能力特异性鉴定生物标记物。能够特异性识别生物标记物的化学结构的工具优选地是特异性结合生物标记物的检测剂,更优选地是抗体或与化学结构例如受体或酶,或适体特异性相互作用的其他蛋白质。例如,可通过本领域熟知的方法使用生物标记物作为抗原得到特异性抗体。本文提及的抗体包括多克隆和单克隆抗体二者,及其片段,例如能够结合抗原或半抗原的Fv,Fab和F(ab)₂片段。本发明也包括人源化杂种抗体,其中组合展示期望的抗原特异性的非人供体抗体的氨基酸序列和人受体抗体的序列。此外,包含单链抗体。供体序列通常将至少包括供体的抗原结合氨基酸残基,但也可包括供体抗体的其他结构和/或功能相关的氨基酸残基。可通过本领域熟知的若干方法制备这样的杂种。能够特异性识别代谢物的合适的蛋白质优选地是参与所述生物标记物的代谢转化的酶。所述酶可使用生物标记物,例如代谢物,作为底物,或可将底物转化为生物标记物,例如代谢物。此外,可使用所述抗体作为基础生成特异性识别生物标记物的寡肽。这些寡肽应例如包含所述生物标记物的酶的结合结构域或口袋。基于合适抗体和/或酶的测定法可为RIA(放射免疫测定法),ELISA(酶联免疫吸附测定法),夹心酶免疫测试,电化学发光夹心免疫测定法(ECLIA),解离放大镧系荧光免疫测定法(DELFIA)或固相免疫测试。可通过本领域熟知的方法产生特异性结合生物标记物的适体(Ellington 1990,Nature 346:818-822;Vater 2003,Curr Opin Drug Discov Devel 6(2):253-261)。此外,也可基于其和其他化合物反应的能力鉴定生物标记物,即通过特定化学反应。此外,可基于其引起生物读出系统的响应的能力测定样品中的生物标记物。应以指示样品包含的代谢物的存在和/或量的读出的形式检测生物响应。生物响应可为,例如诱导基因表达或细胞或生物的表型响应。

[0147] 术语“参考”指至少一种生物标记物的特性特征值,优选地,指示可与造血毒性相关的所述生物标记物的量的值。

[0148] 这样的参考优选地从来源于罹患造血毒性的对象或对象组的样品或来源于已接触1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷或布洛芬的对象或对象组的样品得到。可通过每种局部或全身施用模式使对象或对象组接触所述化合物,只要所述化合物变得可生物利用。

[0149] 优选地,如在附带的实施例和下表中描述地,可对从中得到参考的对象或对象组的个体施用上述化合物。

[0150] 特别地,本文提及的盐酸阿霉素,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷,布洛芬和奥沙利铂是能够诱导骨髓毒性的化合物,而1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司或三乙醇胺应能够诱导血液毒性。

[0151] 可选地,但也优选地,所述参考可从来源于已接触1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,

2-丁氧基乙醇, 2-氯苯胺, 环己酮肟(CHO), 4-氯-3-硝基苯胺, 盐酸阿霉素, 苯胺, 苯嘧磺草胺, 环孢菌素A, 氟环唑, 氟他胺, 三水合醋酸铅, 利谷隆, 石胆酸, 甲巯咪唑, 甲基强的松龙, 奥沙利铂, 丙磺舒, 他克莫司, 三乙醇胺, 卡铂, 顺铂, 环磷酰胺一水合物, 阿糖胞苷或布洛芬的对象或对象组或关于造血毒性, 和更优选地, 也关于其他疾病的健康的对象或这样的对象组的样品得到。

[0152] 可如有关生物标记物的量的上文描述测定参考。特别地, 优选通过单独测定来自对象组的每个个体的样品中的至少一种生物标记物的每一种的相对或绝对量, 随后使用本文别处提及的统计学技术测定所述相对或绝对量或从其衍生的任意参数的中位数或平均值, 从本文提及的对象组的样品中得到参考。可选地, 可优选地通过测定来自本文提及的对象组的样品混合物的样品中的至少一种生物标记物的每一种的相对或绝对量得到参考。这样的混合物优选地由从所述组的每个个体得到的样品的等量部分组成。

[0153] 此外, 参考也可优选地为计算的参考, 最优选地为来源于个体的群体的至少一种生物标记物的每一种的相对或绝对量的平均值或中位数。所述个体的群体是来源于将通过本发明的方法研究的个体的群体。然而, 应当理解, 为了测定计算的参考, 待研究的对象的群体优选地由明显健康的对象(例如, 未经治疗的)组成, 或包含若干明显健康的对象, 对象的数量足够大, 以致在统计上可抵抗由于在所述群体中存在测试对象的显著的平均值或中位数的变化。可根据本文别处说明的测定所述群体的个体的至少一种生物标记物的绝对或相对量。如何计算合适的参考值, 优选地平均值或中位数是本领域熟知的。用于计算合适参考的其他技术包括使用接受者工作特征(ROC)曲线计算优化, 这也是本领域熟知的, 可不费周折的用于基于给定对象群的具有给定特异性和灵敏度的测定系统。上面提及的对象群体或组应包括多位对象, 优选地, 至少5, 10, 50, 100, 1,000或10,000位对象多至整个群体。更优选地, 在此上下文中提及的对象组是对于给定群体具有统计代表性大小的对象组, 即统计代表性样本。应当理解, 将通过本发明的方法诊断的对象和所述多位对象的对象是相同物种, 优选地, 是相同性别。

[0154] 更优选地, 参考将储存在合适的数据储存介质, 例如数据库中, 因此也可用于未来的诊断。这也允许有效诊断造血毒性倾向, 因为一旦(在未来)确认了得到对应参考样品的对象(的确)产生了造血毒性, 可在数据库中鉴定合适的参考结果。

[0155] 术语“比较”指评估至少一种生物标记物的定性或定量测定的量是否与参考相同或与其不同。

[0156] 如果参考结果从来源于罹患造血毒性的对象或对象组或已接触1,3-二硝基苯, 1,4-二硝基苯, 2-丁氧基乙醇, 2-氯苯胺, 环己酮肟(CHO), 4-氯-3-硝基苯胺, 苯胺, 苯嘧磺草胺, 环孢菌素A, 氟环唑, 氟他胺, 三水合醋酸铅, 利谷隆, 石胆酸, 甲巯咪唑, 甲基强的松龙, 奥沙利铂, 丙磺舒, 他克莫司, 三乙醇胺, 盐酸阿霉素, 卡铂, 顺铂, 环磷酰胺一水合物, 阿糖胞苷或布洛芬的对象或对象组的样品中得到, 可基于从测试样品得到的量和上述参考之间的相同或相似性程度, 即基于有关至少一种生物标记物的相同的定性或定量成分, 诊断造血毒性。相同的量包括没有显著统计差异的量, 并且优选地, 至少在参考的第1和第99百分位, 第5和第95百分位, 第10和第90百分位, 第20和第80百分位, 第30和第70百分位, 第40和第60百分位之间的间隔内, 更优选地, 参考的第50, 60, 70, 80, 90或95百分位。从来源于罹患造血毒性的对象或对象组或已接触1,3-二硝基苯, 1,4-二硝基苯, 2-丁氧基乙醇, 2-氯苯

胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,苯胺,苯嘧啶草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,盐酸阿霉素,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷或布洛芬的对象或对象组的样品中得到的参考可用于本发明的方法,以诊断造血毒性或用于测定化合物是否能够在对象中诱导造血毒性。在这样的情况下,优选地,与参考基本相同的至少一种生物标记物的量将指示存在造血毒性或能够诱导造血毒性的化合物,而与参考不同的至少一种生物标记物的量将指示不存在造血毒性或不能诱导造血毒性的化合物。

[0157] 此外,从来源于罹患造血毒性的对象或对象组或已接触1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧啶草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷或布洛芬的对象或对象组的样品中得到的参考可用于鉴定用于治疗造血毒性的物质。在这样的情况下,优选地,与参考不同的至少一种生物标记物的量将指示适于治疗造血毒性的物质,而与参考基本相同的至少一种生物标记物的量将指示不能治疗造血毒性的物质。

[0158] 如果参考结果是从未接触1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧啶草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷或布洛芬或未罹患造血毒性的对象或对象组的样品中得到,可基于从测试样品得到的测试量和上述参考之间的差异,即基于有关至少一种生物标记物的定性或定量成分的差异诊断所述造血毒性。

[0159] 如果使用上文说明的计算的参考,这也同样适用。

[0160] 差异可为至少一种生物标记物的绝对或相对量的增加(有时称为生物标记物的上调;又见实施例)或所述量的减少或没有可检测到的量的生物标记物(有时称为生物标记物的下调;又见实施例)。优选地,相对或绝对量的差异是显著的,即在参考的第45和第55百分位,第40和第60百分位,第30和第70百分位,第20和第80百分位,第10和第90百分位,第5和第95百分位,第1和第99百分位之间的间隔以外。

[0161] 从未接触1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧啶草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷或布洛芬或未罹患造血毒性的对象或对象组的样品中得到的参考可用于本发明的方法,以诊断造血毒性或用于测定化合物是否能够在对象中诱导造血毒性。在这样的情况下,优选地,与参考不同的至少一种生物标记物的量将指示存在造血毒性或能够诱导造血毒性的化合物,而与参考基本相同的至少一种生物标记物的量将指示不存在造血毒性或不能诱导造血毒性的化合物。此外,从未接触1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧啶草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物或阿糖胞苷或未罹患造血毒性的对象或对象组的样品中得到的参考可用于鉴定用于治疗造血毒性的物质。在这样的情况下,优选地,与参考基本相同的至少一种生物标记物的量将

指示适于治疗造血毒性的物质,而与参考不同的至少一种生物标记物的量将指示不适于治疗造血毒性的物质。

[0162] 优选的参考是在附带的表中提及的参考,或可遵照附带的实施例产生的参考。此外,相对差异,即各个生物标记物的量的增加或减少优选地是在下表中陈述的那些。此外,优选地,观察到的差异,即增加或减少的程度优选地是根据下表中显示的因素的增加或减少。

[0163] 优选地,当选自表1a,1c,1e,2a,3a,3c,3e,4a,4c,5a,5c,6a,7a,8a或12b时,至少一种生物标记物相对参考增加,所述参考如在所述表中显示的从来源于未接触1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷或布洛芬的对象或对象组的样品或从健康对象或对象组的样品中得到。

[0164] 优选地,当选自表1b,1d,1f,2b,3b,3d,3f,3g,4b,4d,5b,5d,6b,7b,8b,9或12a时,至少一种生物标记物相对参考减少,所述参考如在所述表中显示的从来源于未接触1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷或布洛芬的对象或对象组的样品或从健康对象或对象组的样品中得到。

[0165] 比较优选地通过自动化辅助。例如,可使用包含用于比较2个不同数据集(例如,包含(一种或多种)特性特征值的数据集)的算法的合适的计算机程序。这样的计算机程序和算法是本领域熟知的。尽管如此,也可手动进行比较。

[0166] 术语“用于治疗造血毒性的物质”指可直接干扰诱导在本说明书别处提及的造血毒性的生物学机制的化合物。可选地,但也优选地,化合物可干扰与造血毒性相关的症状的发展或进展。将通过本发明的方法鉴定的物质可为有机和无机化学品,例如小分子、多核苷酸、包括siRNA、核酶或微小RNA分子的寡核苷酸、肽、包括抗体的多肽或其他人工或生物聚合物,例如适体。优选地,所述物质适合作为药物、药物前体或用于开发药物或药物前体的先导物质。

[0167] 应当理解,如果本发明的方法用于鉴定用于治疗造血毒性的药物或用于化合物的毒理学评估(即测定化合物是否能够诱导造血毒性),为了统计原因可研究多位对象的测试样品。优选地,在这样的测试对象组群中的代谢组应尽可能的相似,以避免例如由研究的化合物以外的因素导致的差异。用于所述方法的对象优选地为实验室动物,例如啮齿类,更优选地为大鼠。还应当理解,优选地在本发明的方法的完成后应处死所述实验室动物。应在相同的条件下维持测试和参考动物组群的所有对象,以避免任何不同的环境影响。提供这些动物的合适的条件和方法在W02007/014825中详细描述。所述条件在此引入作为参考。

[0168] 本发明的方法可优选地通过本发明的设备实施。本文使用的设备应至少包括上述单元。设备的单元彼此有效连接。如何以有效的方式连接单元将取决于设备包括的单元的类型。例如,当在分析单元中应用自动定性或定量测定至少一种生物标记物的工具时,所述自动运行单元得到的数据可通过评估单元,例如通过在作为数据处理器的计算机上运行的计算机程序处理以帮助诊断。优选地,在这样的情况下所述单元包含在单个设备中。然而,

分析单元和评估单元也可为物理分离的。在这样的情况下,有效连接可通过允许数据传输的单元间的有线和无线连接实现。无线连接可使用无线LAN(WLAN)或因特网。有线连接可通过单元间的光缆或非光缆连接实现。用于有线连接的电缆优选地,适于高通量数据传输。

[0169] 用于测定至少一种生物标记物的优选的分析单元包含检测剂,例如特异性识别在本文别处说明的至少一种生物标记物的抗体、蛋白质或适体,和使所述检测剂与待测样品接触的区域。检测剂可固定在用于接触的区域或可在加载了样品后应用于所述区域。分析单元应优选地适于定性和/或定量测定检测剂和至少一种生物标记物的复合物的量。应当理解,在检测剂与至少一种生物标记物结合后,至少一种生物标记物、检测剂或二者的至少一种可测量的物理或化学性质将改变,使得所述改变可通过检测器测量,所述检测器优选地包含在分析单元中。然而,当使用例如检测条的分析单元时,检测器和分析单元可为分离的组件,仅用于测量时被放在一起。如本文别处说明的,基于在至少一种可测量的物理或化学性质中的检测到的改变,分析单元可计算至少一种生物标记物的强度值。然后可将所述强度值转移至评估单元以进一步处理和评估。最优选地,可通过基于ELISA,EIA或RIA的技术使用如本文别处说明的检测剂测定至少一种生物标记物的量。可选地,本文提及的分析单元优选地包含用于分离生物标记物的工具,例如色谱设备,和用于生物标记物测定的工具,例如光谱设备。合适的设备已在上文详细描述。将在本发明的系统中使用的用于化合物分离的优选的工具包括色谱设备,更优选地用于液相色谱,HPLC,和/或气相色谱的设备。用于化合物测定的优选的设备包含质谱设备,更优选地,GC-MS,LC-MS,直接注入式质谱,FT-ICR-MS,CE-MS,HPLC-MS,四级质谱,相继偶联的质谱(包括MS-MS或MS-MS-MS),ICP-MS,Py-MS或TOF。分离和测定工具优选地彼此偶联。最优选地,在依照本发明提及的分析单元中使用LC-MS和/或GC-MS。

[0170] 本发明的设备的评估单元优选地包含数据处理设备或计算机,其适于执行如本文别处说明的比较规则。此外,评估单元优选地包含具有储存的参考的数据库。本文使用的数据库包含在合适的储存介质上的数据收集。此外,数据库优选地还包含数据库管理系统。数据库管理系统优选地是基于网络的,分层或面向对象的数据库管理系统。此外,数据库可为联合(federal)或综合数据库。更优选地,以分布式(联合)系统的形式应用数据库,例如,以客户-服务器-系统的形式。更优选地,数据库是结构化的,以允许搜索算法比较测试数据集和数据收集包含的数据集。具体地,通过使用这样的算法,可搜索数据库中相似或相同的指示造血毒性的数据集(例如查询搜索)。因此,如果可在数据收集中鉴定相同或相似的数据集,测试数据集将与造血毒性相关。评估单元也可优选地包含或与其他数据库有效连接,所述其他数据库具有基于确诊的造血毒性的治疗或预防干预或生活方式改变的提议。可优选地使用由评估单元得到的诊断结果自动搜索所述其他数据库以鉴定对从中得到测试样品的对象的合适的建议,以治疗或预防造血毒性。

[0171] 在本发明的设备的优选实施方案中,所述储存的参考是来源于已知罹患造血毒性的对象或对象组或已接触了选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯噻磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较通过分析单元测定的至少一种生物标记物

的量和储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考基本相同指示存在造血毒性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示不存在造血毒性。

[0172] 在本发明的设备的另一个优选实施方案中,所述储存的参考是来源于已知未罹患造血毒性的对象或对象组或未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,苯嘧磺草胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组的参考,并且所述数据处理器执行比较通过分析单元测定的至少一种生物标记物的量和储存的参考的指令,其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考不同指示存在造血毒性,或其中在测试样品中至少一种生物标记物的量相比参考基本相同指示不存在造血毒性。

[0173] 因此医疗或实验室人员或患者也可使用所述设备,无需特殊的医疗知识,特别是当包括提出建议的专家系统时。所述设备也适于近患者(near-patient)应用,因为所述设备可改造为便携式的。

[0174] 术语“试剂盒”指上述组件的集合,优选地,单独提供或在单个容器中提供。所述容器也包含用于实施本发明的方法的指令。这些指令可为手册的形式,或可通过计算机程序代码提供,当在计算机或数据处理设备中执行时,所述代码能够实施在本发明的方法中提及的比较并由此建立诊断。可在数据储存介质或设备,例如光或磁储存介质(例如光盘(CD),CD-ROM,硬盘,光储存介质或磁盘)上提供计算机程序代码,或在计算机或数据处理设备上直接提供所述代码。有关本发明的试剂盒中提及的“标准物”是至少一种生物标记物的量,其当在溶液中存在或在预定体积的溶液中溶解时与存在于(i)已知罹患造血毒性的对象或对象组或已接触了选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组或(ii)来源于已知未罹患造血毒性的对象或对象组或未接触选自1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬的至少一种化合物的对象或对象组的至少一种生物标记物的量类似。

[0175] 有利地,在本发明相关研究中已发现,如本文说明的至少一种生物标记物的量允许诊断造血毒性,特别是由1,3-二硝基苯,1,4-二硝基苯,2-丁氧基乙醇,2-氯苯胺,环己酮肟(CHO),4-氯-3-硝基苯胺,盐酸阿霉素,苯胺,环孢菌素A,氟环唑,氟他胺,三水合醋酸铅,利谷隆,石胆酸,甲巯咪唑,甲基强的松龙,奥沙利铂,丙磺舒,他克莫司,三乙醇胺,卡铂,顺铂,环磷酰胺一水合物,阿糖胞苷和布洛芬诱导的造血毒性。通过测定增加的数目或甚至全部的上述生物标记物将进一步改进方法的特异性和准确性。与这些特定生物标记物有关的代谢组的定量和/或定性成分的改变指示造血毒性,甚至在所述毒性的其他迹象临床显现之前。目前用于诊断造血毒性的形态学、生理学以及生化参数相比本发明提供的生物标记

物测定较不特异和较不灵敏。多亏了本发明,可更有效和可信地评估化合物的造血毒性。此外,基于上述发现,用于治疗造血毒性的药物的筛选测定法是可行的。一般地,本发明设想选自表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个的对象的样品中的至少一种生物标记物或所述生物标记物的检测剂用于诊断造血毒性,用于测定化合物是否能够诱导造血毒性或用于鉴定能够治疗造血毒性的物质的用途。此外,本发明一般地设想对象的样品中的至少一种生物标记物或其检测剂用于鉴定易受造血毒性的治疗的对象用途。在本发明的上下文中使用的优选的检测剂是在本文别处提及的检测试剂。此外,本发明的方法可有利地在设备中实施。此外,可提供允许实施所述方法的试剂盒。

[0176] 本发明也涉及数据收集,其包含在表1a,1b,1c,1d,1e,1f,2a,2b,3a,3b,3c,3d,3e,3f,3g,4a,4b,4c,4d,5a,5b,5c,5d,6a,6b,7a,7b,8a,8b,9,12a或12b中任一个引述的生物标记物的特征值。术语“数据收集”指可物理和/或逻辑分组在一起的数据收集。因此,可在单个数据储存介质或在彼此有效连接的物理分离的数据储存介质上实施数据收集。优选地,通过数据库的方式实施数据收集。因此,本文使用的数据库包括在合适的储存介质上的数据收集。此外,数据库优选地还包含数据管理系统。数据库管理系统优选地是基于网络的分层或面向对象的数据库管理系统。此外,数据库可为联合(federal)或综合数据库。更优选地,以分布式(联合)系统的形式应用数据库,例如,以客户-服务器-系统的形式。更优选地,数据库是结构化的,以允许搜索算法比较测试数据集和数据收集包含的数据集。具体地,通过使用这样的算法,可搜索数据库中相似或相同的指示造血毒性的数据集(例如查询搜索)。因此,如果可在数据收集中鉴定相同或相似的数据集,测试数据集将与造血毒性相关。因此,从数据收集得到的信息可用于基于从对象得到的测试数据集诊断造血毒性。

[0177] 此外,本发明涉及数据储存介质,其包含所述数据收集。本文使用的术语“数据储存介质”包括基于单个物理实体的数据储存介质,例如CD,CD-ROM,硬盘,光储存介质或磁盘。此外,术语还包括由物理分离的实体组成的数据储存介质,所述物理分离的实体以为了提供上述数据收集的方式,优选地,以适于查询搜索的方式彼此有效连接。

[0178] 本发明也涉及系统,其包含

[0179] (a)用于比较样品的至少一种生物标记物的特征值的工具,其有效连接于

[0180] (b)本发明的数据储存介质。

[0181] 本文使用的术语“系统”涉及彼此有效连接的不同工具。所述工具可在单个设备中实施或可在彼此有效连接的物理分离的设备上实施。用于比较生物标记物的特征值的工具优选地基于上述用于比较的算法运行。数据储存介质优选地包含上述数据收集或数据库,其中每个储存的数据集指示造血毒性。因此,本发明的系统允许鉴定测试数据集是否包含在数据储存介质中储存的数据收集中。因此,本发明的系统可作为诊断造血毒性的诊断工具应用。在系统的优选实施方案中,包含用于测定样品的生物标记物的特征值的工具。术语“用于测定生物标记物的特征值的工具”优选地涉及上述用于测定生物标记物的设备,例如质谱设备、ELISA设备、NMR设备或用于实施分析物的化学或生物测定法的设备。

[0182] 将上文提及的所有参考关于其整体公开内容以及在上面的说明书中明确提及的其特定公开内容在此引入作为参考。

[0183] 图

[0184] 以下实施例仅是为了说明本发明。其无论如何不应被视为在任何方面限制本发明的范围。

实施例

[0185] 实施例：与造血毒性相关的生物标记物

[0186] 每组5只雄性和雌性大鼠的组每日一次服用指示的化合物(化合物、应用剂量和施用的细节见下表10),持续28天。

[0187] 研究中的每个剂量组由每种性别各5只大鼠组成。将每组5只雄性动物和5只雌性动物的另外的组作为对照。在处理期开始前,使动物适应饲养和环境条件7天,提供时动物为62-64天龄。在相同的恒温($20-24 \pm 3^{\circ}\text{C}$)和相同的恒湿(30-70%)条件下维持动物群体的所有动物。随意喂养动物群体的动物。使用的食物基本不含化学或微生物污染。也随意提供饮用水。相应地,水不含在欧洲饮用水指导98/83/EG中制定的化学和微生物污染。光照周期是12小时光照,接着12小时黑暗(12小时光照,从6:00至18:00和12小时黑暗,从18:00至6:00)。依照德国动物福利法案和欧洲委员会指导86/609/EE在AAALAC批准的实验室中进行研究。根据OECD 407指南安排测试系统,用于在啮齿类中测试化合物的重复剂量28天经口毒性研究。服用在下表1-9中的测试物质(化合物)并根据上表10所述施用。

[0188] 在第7,14和28天早晨,从禁食麻醉动物的眶后静脉丛取血。从每只动物收集1ml血液,使用EDTA作为抗凝血剂。离心样品以产生血浆。用氮气覆盖所有血浆样品,然后储存在 -80°C 直至分析。

[0189] 用于基于质谱的代谢物谱分析,提取血浆样品,得到极性和非极性(脂类)组分。用于GC-MS分析,在酸性条件下用甲醇处理非极性级分以得到脂肪酸甲酯。在分析前两种组分都进一步用O-甲基-羟胺盐酸和吡啶衍生化以将氧代基转化为O-甲基肟,并随后用甲硅烷基化剂衍生化。在LC-MS分析中,在合适的溶剂混合物中重构两种组分。在反相分离柱上通过梯度洗脱进行HPLC。如WO2003073464中描述的应用质谱检测,所述质谱检测允许与靶和高灵敏度MRM(多反应监测)制谱平行的全屏幕分析。

[0190] 通过在线SPE-LC-MS(固相提取-LC-MS)测量类固醇及其代谢物。通过如Yamada等人描述的在线SPE-LC-MS(Yamada 2002,Journal of Analytical Toxicology,26(1):17-22))测量儿茶酚胺及其代谢物。

[0191] 在复杂的分析验证步骤后,将每种分析物的数据针对样品池的数据标准化。这些样品在全过程中平行运行以说明过程变异性。通过使用WELCH检测比较受处理的组的平均值和各自的未处理的对照组的平均值,测定性别、处理持续时间和代谢物特异性的受处理组的值的显著性,并用相对对照的处理比例和p值定量。

[0192] 通过对下表中的分析物分级对每种毒性模式中最重要生物标记物进行鉴定。因此,将给定图式(在表中显示)的参考处理下的代谢变化与在其他无关处理下的相同代谢物的变化相比较。对每种代谢物得到参考和对照处理的T值并通过Welch检测比较以评估这两组是否显著不同。采用各个T值的最大绝对值指示该图式中最重要代谢物。

[0193] 在大鼠处理后指示造血毒性的血浆代谢物组的变化显示在下表中:

[0194]

表 1a: 雌性大鼠中血液毒性的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值≤0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。以低剂量施用诱导骨髓抑制的奥沙利铂。

	卡铂	顺铂	布洛芬	奥沙利铂
代谢物	f28	f28	f28	f28
亮氨酸	1.27 *	1.3 *	1.25 *	1.35 *
异亮氨酸	1.18 *	1.28 *	1.22 *	1.39 *
缬氨酸	1.13 *	1.23	1.23 *	1.22 *
天冬氨酸	1.58 *	1.14	1.08 *	2.09 *
磷酸盐 (无机和有机磷酸盐)	1.57 *	1.25 *	1.58 *	1.53 *
甘油-3-磷酸, 极性级分	1.94 *	1.2 *	1.27 *	1.28 *
磷脂酰胆碱 (C18:0,C18:2)#	1.22 *	1.04 *	0.93	1 *
蔗糖酸	1.51 *	1.13 *	1.11	0.95

[0195]

表 1b: 雌性大鼠中血液毒性的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值≤0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。以低剂量施用诱导骨髓抑制的奥沙利铂。

	卡铂	顺铂	布洛芬	奥沙利铂
代谢物	f28	f28	f28	f28
孕酮	0.49 *	0.53 *	0.41 *	0.69 *
4-羟基苯丙酮酸	0.39 *	0.76 *	0.84 *	0.75 *
21-羟基孕酮 (11-去氧皮质酮)	0.09 *	0.26 *	0.19 *	0.16 *
18-羟基-11-去氧皮质酮	0.33 *	0.46 *	0.24 *	0.37 *
柠檬酸盐	0.78 *	0.87 *	0.94 *	0.82 *
皮质酮	0.31 *	0.49 *	0.32 *	0.43 *

[0196]

表 1c: 雄性大鼠中血液毒性的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值 ≤ 0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

	环磷酸胺一水合物	盐酸阿霉素	阿糖胞苷
代谢物	m28	m28	m28
胆碱缩醛磷脂 No 02#	1.13 *	1.18 *	1.11 *
缬氨酸	1.25 *	1.21 *	1.1 *
亮氨酸	1.33 *	1.4 *	1.12 *
异亮氨酸	1.23 *	1.35 *	1.1 *
牛磺酸	1.21 *	1.39 *	1.27 *
二十三酸 (C23:0)	1.44 *	2.14 *	1.3
二十四酸 (C24:0)	1.29 *	2.04 *	1.31 *

[0197]

表 1d: 雄性大鼠中血液毒性的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值≤0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

	环磷酸胺一水合物	盐酸阿霉素	阿糖胞苷
代谢物	m28	m28	m28
酮亮氨酸	0.88 *	0.69 *	0.75 *
柠檬酸盐	0.78 *	0.86	0.81 *
18-羟基-11-去氧皮质酮	0.16 *	0.44 *	0.13 *
3-羟基丁酸	0.75 *	0.66 *	0.53 *

表 1e: 雄性大鼠中血液毒性的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值≤0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

	顺铂	卡铂
代谢物	m28	m28
色氨酸	1.27 *	1.17 *
鸟氨酸	1.16 *	1.11 *
葡萄糖-6-磷酸	1.32 *	2.2 *

[0198]

苯丙氨酸	1.17 *	1.2 *
牛磺酸	1.29 *	1.47 *
吡啶-3-乳酸	1.27 *	1.13 *
果糖-6-磷酸	1.05 *	1.74 *
天冬氨酸	1.18 *	1.45 *
组氨酸	1.12 *	1.17 *
缬氨酸	1.16 *	1.29 *
亮氨酸	1.36 *	1.41 *
异亮氨酸	1.26 *	1.3 *
甘油-3-磷酸，极性级分	1.3 *	2.21 *

表 1f: 雄性大鼠中血液毒性的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值≤0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

	顺铂	卡铂
代谢物	m28	m28
14-甲基十六烷酸	0.83 *	0.72 *

[0199]

18-羟基-11-去氧皮质酮	0.42 *	0.18 *
胆碱缩醛磷脂 (C18,C20:4)	0.89 *	0.89 *
3-羟基丁酸	0.73 *	0.74 *
柠檬酸盐	0.71 *	0.76 *
抗坏血酸	0.83 *	0.84 *

表 2a: 雌性大鼠中血液毒性 (贫血) 的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值 ≤ 0.15)。对有些代谢物 (用# 标记), 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	4-氯-3-硝基苯胺			苯胺			2-氯苯胺		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
Ribal	1.36 *	1.36 *	1.48 *	1.67 *	1.16 *	1.7 *	1.87 *	1.26 *	1.22 *
胞嘧啶	1.57 *	1.14 *	1.54 *	1.8 *	1.3 *	1.37 *	1.82 *	1.28 *	1.22 *
TAG (C16:0,C18:2)#	2.71 *	2 *	3.13 *	2.24 *	3.58 *	4.71 *	1.89 *	1.67 *	2.19 *
TAG (C18:2,C18:2)#	3.38 *	1.67	4.93 *	1.97 *	3.29 *	5.17 *	1.67	1.84 *	2.12 *

[0200]

TAG												
(C16:0,C18:1,C18:3)#	2.05 *	1.92	3.93 *	2.25 *	3.59 *	5.33 *	1.9 *	2.27 *	1.74 *			
TAG No 05#	1.79	2.34 *	5.86 *	2.17 *	2.59 *	4.41 *	1.44 *	1.33 *	1.74 *			
TAG (C18:1,C18:2)#	3.13 *	1.75 *	3.36 *	1.56	2.87 *	3.77 *	1.64	1.32 *	1.59 *			
TAG (DAG-片段)#	3.64 *	1.86 *	3.77 *	1.78	3.18 *	5.12 *	1.72 *	1.39 *	1.95 *			

表 2b: 雌性大鼠中血液毒性 (贫血) 的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值≤0.15)。对有些代谢物 (用# 标记), 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	4-氯-3-硝基苯胺			苯胺			2-氯苯胺		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
18-羟基-11-去氧皮质酮	0.25 *	0.5 *	0.75 *	0.4 *	0.63 *	0.49 *	0.7 *	0.77	0.5 *
TAG No 02#	0.65 *	0.85 *	0.72 *	0.67 *	0.71 *	0.55 *	0.78 *	0.85 *	0.95
酮亮氨酸	0.87	0.7 *	0.88 *	0.84 *	0.83	0.86 *	0.73 *	1.07	0.79 *
乳酸盐	0.83	0.43 *	0.58 *	0.98	0.7	0.73 *	0.91	0.75	0.84 *
丙酮酸盐	1.35	0.49 *	0.45 *	0.79 *	0.84	0.59 *	0.94	0.81	0.54 *

[0201]

表 3a: 雌性大鼠中血液毒性 (血液叶啉抑制) 的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值≤0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	苯噻磺草胺				三水合醋酸铅			
	f7	f14	f28		f7	f14	f28	
尿素	1.35 *	1.63 *	1.06		1.22 *	1.32 *	1.13 *	
TAG (C16:0,C18:1,C18:3)#	1.74 *	2.17 *	2 *		1.42 *	1.64	1.46 *	
磷脂酰胆碱 (C16:0,C16:0)#	1.11 *	1.08	1.2 *		1.28 *	1.19	1.22 *	
肌酸酐	1.47 *	0.96	0.88		1.2 *	1.09	1.02	
溶血磷脂酰胆碱 (C17:0)#	1.18 *	1.04	1.19		1.21 *	1.18 *	0.91	
磷脂酰胆碱 No 02#	0.98	1.16 *	1.19		1.13	1.15 *	1.23	
天冬氨酸	NA	1.13	1.46		1.24 *	1.06	1.3 *	
DAG (C18:1,C18:2)#	1.49	1.3	1.38 *		1.5 *	1.07	1.27 *	
TAG No 07#	1.43 *	2.07 *	1.89 *		1.77 *	1.33	0.97	
神经酰胺 (d18:1,C24:1)	1.58 *	0.77	1.39		1.07	1.07 *	1.25 *	
TAG No 05#	1.29 *	1.95 *	2.03 *		1.32 *	1.53	1.38 *	
亚油酸 (C18:顺[9,12]2)	1.12	1.22 *	1.27 *		1.02	1.18 *	1.1	

[0202]

TAG (C16:0,C18:2)#	1.59 *	1.83 *	1.77 *	1.58 *	1.31	1.41 *
TAG (C18:2,C18:3)#	1.84 *	1.49	1.27 *	1.49 *	1.48	1.3
甘油, 脂级分	1.11	1.26	1.02 *	1.23 *	0.93	1.2 *
TAG (DAG-片段)#	1.4	1.49	1.63 *	1.71 *	1.19	1.38 *
TAG No 059#	1.57 *	1.59 *	1.4 *	1.69 *	1.17	1.25 *

表 3b: 雌性大鼠中血液毒性 (血液卟啉抑制) 的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值≤0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	苯噻磺草胺			三水合醋酸铅		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28
缬氨酸	NA	0.8 *	0.71 *	0.89 *	0.91	0.76 *
苯丙氨酸	1.01	0.83 *	0.78 *	0.84 *	0.94 *	0.91 *
组氨酸	NA	0.83 *	0.79 *	0.92	0.99	0.77 *
TAG No 02#	0.78 *	0.78 *	0.8 *	0.95 *	0.92 *	0.88
酮亮氨酸	0.98	0.76 *	0.73 *	1.04	0.84 *	0.63 *
赖氨酸	NA	0.73 *	0.8 *	1.15	1.05	0.82 *

[0203]

表 3c: 雌性大鼠中血液毒性 (血液叶啉抑制) 的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值 ≤ 0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	方向	苯噻磺草胺	三水合醋酸铅
鞘磷脂 (d18:2,C18:0)#	上	f28	f28
DAG (C18:1,C18:2)#	上	1.11 *	1.09 *
磷脂酰胆碱 (C16:0,C16:0)#	上	1.38 *	1.27 *
TAG No 05#	上	1.2 *	1.22 *
TAG (C16:0,C18:2)#	上	2.03 *	1.38 *
TAG (C16:0,C18:1,C18:3)#	上	1.77 *	1.41 *
甘油, 脂级分	上	2 *	1.46 *
胆固醇酯 No 01#	上	1.02 *	1.2 *
磷脂酰胆碱 (C16:0,C18:2)#	上	1.12 *	1.28 *
TAG (C18:2,C18:2)#	上	1.01 *	1.06 *
TAG No 01#	上	1.67 *	1.48 *
	上	1.29 *	1.5 *

[0204]

TAG (C18:1,C18:2)#	上	1.3 *	1.33 *
TAG (DAG-片段)#	上	1.63 *	1.38 *
TAG No 059#	上	1.4 *	1.25 *

表 3d: 雌性大鼠中血液毒性 (血液叶啉抑制) 的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值≤0.2)。 对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

			苯嘧磺草胺	三水合醋酸铅
代谢物	方向	f28	f28	f28
赖氨酸	下	0.8 *	0.82 *	0.82 *
苹果酸盐	下	0.77 *	0.73 *	0.73 *
异亮氨酸	下	0.74 *	0.72 *	0.72 *
缬氨酸	下	0.71 *	0.76 *	0.76 *
酮亮氨酸	下	0.73 *	0.63 *	0.63 *
亮氨酸	下	0.76 *	0.72 *	0.72 *
苯丙氨酸	下	0.78 *	0.91 *	0.91 *
脯氨酸	下	0.85 *	0.91 *	0.91 *

[0205]

甲硫氨酸	下	0.84 *	0.89 *
丙氨酸	下	0.8 *	0.81 *
18-羟基-11-去氧皮质酮	下	0.57 *	0.4 *

表 3e: 雄性大鼠中血液毒性（血液叶啉抑制）的标记物；标记(*)了显著的上调变化（p 值≤0.2）。对有些代谢物（用#标记），在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	苯噻磺草胺			三水合醋酸铅		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28
胆碱缩醛磷脂 No 03#	1.21 *	1.21 *	1.23 *	1.11 *	1.05	0.94
胆碱缩醛磷脂 No 02#	1.1 *	1.42 *	1.15 *	1.05	1.16 *	0.93

表 3f: 雄性大鼠中血液毒性（血液叶啉抑制）的标记物；标记(*)了显著的下调变化（p 值≤0.2）。对有些代谢物（用#标记），在表 11 中提供了额外信息。

	苯噻磺草胺	三水合醋酸铅
--	-------	--------

[0206]

代谢物	m7	m14	m28	m7	m14	m28
异亮氨酸	0.87 *	0.89 *	0.89 *	0.86 *	0.94 *	0.87 *
甲硫氨酸	0.86 *	0.86 *	0.86 *	0.95 *	0.96 *	0.89 *
亮氨酸	0.84 *	0.82 *	0.8 *	0.87 *	0.91 *	0.82 *
丝氨酸	0.86 *	0.92 *	0.98 *	0.85 *	0.85 *	0.9 *
苏糖酸	0.5 *	0.62 *	0.61 *	0.67 *	0.68 *	0.77
缬氨酸	0.82 *	0.85 *	0.87 *	0.88 *	0.93 *	0.87 *
丙氨酸	0.68 *	0.83 *	0.83 *	0.68 *	0.8 *	0.77 *
尿酸	0.65 *	0.67 *	0.83 *	0.64 *	0.86	0.76 *
苯丙氨酸	0.91 *	0.91 *	0.8 *	0.83 *	0.89 *	0.87 *
5-氧代脯氨酸	0.84 *	0.84 *	0.74 *	0.88 *	0.93 *	0.93
谷氨酰胺	0.81 *	0.84 *	0.79 *	0.83 *	0.85 *	0.92 *
酮亮氨酸	0.74 *	0.76 *	0.86 *	0.66 *	0.89 *	0.73 *
苹果酸盐	0.36 *	0.46 *	0.42 *	0.69 *	1.08	0.75 *
18-羟基-11-去氧皮质酮	0.47 *	0.49 *	0.3 *	0.73	0.46 *	0.67
反-4-羟脯氨酸	0.93 *	0.98	0.92 *	0.81	0.82 *	0.97
肌醇	0.77 *	1.06	0.77 *	0.72 *	0.93	1.16

[0207]

表 3g: 雄性大鼠中血液毒性 (血液叶啉抑制) 的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值 ≤ 0.2)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

	苯噻磺草胺	三水合醋酸铅
代谢物	m28	m28
异亮氨酸	0.89 *	0.87 *
甲硫氨酸	0.86 *	0.89 *
苯丙氨酸	0.8 *	0.87 *
亮氨酸	0.8 *	0.82 *
缬氨酸	0.87 *	0.87 *
丝氨酸	0.98 *	0.9 *
葡萄糖	0.82 *	0.91
尿酸	0.83 *	0.76 *
酮亮氨酸	0.86 *	0.73 *
丙氨酸	0.83 *	0.77 *
谷氨酰胺	0.79 *	0.92 *
苹果酸盐	0.42 *	0.75 *

[0208]

5-氧代脯氨酸	0.74 *	0.93
脯氨酸	0.87 *	0.82 *

表 4a: 雌性大鼠中血液毒性（脾高铁血红蛋白）的标记物；标记(*)了显著的上调变化（p 值≤0.1）。对有些代谢物（用#标记），在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	4-氯-3-硝基苯胺			石胆酸			1,3-二硝基苯			1,4-二硝基苯		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
丝氨酸	1.18	1.43 *	1.42 *	1.2 *	1.29 *	1.97 *	1.22 *	1.14 *	1.22 *	1.23 *	1.35 *	1.27 *
Ribal	1.88 *	1.58 *	1.52 *	1.17 *	1.05	1.19 *	1.69 *	1.34 *	1.69 *	2.42 *	1.55 *	2.3 *
胞嘧啶	1.69 *	1.38 *	1.49 *	1.23 *	1.1	1.26 *	1.75 *	1.44 *	1.75 *	2.57 *	1.66 *	2.1 *
苏氨酸	1.55 *	1.95 *	2.05 *	1.26 *	1.25 *	2.4 *	1.59 *	1.22 *	1.59 *	1.47 *	1.24 *	1.67 *
二十二碳六烯酸 (C22: 顺[4,7,10,13,16,19]6)	1.31 *	1.71 *	1.43 *	1.09 *	1.05	1.39	1.26	1.58 *	1.26	1.28 *	1.29 *	1.22 *
3-甲氧基酪氨酸	NA	NA	NA	1.32 *	1.22 *	1.36 *	1.61 *	1.2 *	1.61 *	1.46 *	1.36 *	1.47 *
植物鞘氨醇	1.45 *	1.66 *	1.81 *	1.34 *	1.1	1.44 *	1.31 *	1.49 *	1.31 *	1.27 *	1.08 *	1.34 *
亚油酸 (C18:顺[9,12]2)	1.26	1.58 *	1.59 *	1.61 *	1.29 *	2 *	1.34	1.37 *	1.34	1.44 *	1.67 *	1.72 *

[0209]

苏糖酸	1.25 *	1.45 *	1.25 *	1.35	1.24 *	1.45 *	0.92	1.22 *	1.3 *	1.67 *	1.28 *
-----	--------	--------	--------	------	--------	--------	------	--------	-------	--------	--------

表 4b: 雌性大鼠中血液毒性（脾高铁血红蛋白）的标记物；标记(*)了显著的下调变化（p 值≤0.1）。对有些代谢物（用#标记），在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	4-氯-3-硝基苯胺			石胆酸			1,3-二硝基苯			1,4-二硝基苯		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f7	f14	f28	f28
酮亮氨酸	0.55 *	0.44 *	0.65 *	1.03	0.94	0.88 *	0.83	0.78 *	0.81 *	0.72 *	0.71 *	0.71 *
乳酸盐	1.04	0.51 *	0.61 *	0.96	0.62 *	0.86 *	0.69 *	0.65 *	1.09	0.79 *	0.66 *	0.66 *

表 4c: 雄性大鼠中血液毒性（脾高铁血红蛋白）的标记物；标记(*)了显著的上调变化（p 值≤0.1）。对有些代谢物（用#标记），在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	4-氯-3-硝基苯胺			氟他胺			1,3-二硝基苯			1,4-二硝基苯		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m7	m14	m28	m28
苏氨酸	1.46 *	1.58 *	1.68 *	1.33 *	1.24 *	1.22 *	1.32 *	1.39	1.58 *	1.37 *	1.32 *	1.32 *

[0210]

丝氨酸	1.57 *	1.77 *	1.48 *	1.47 *	1.52 *	1.2 *	1.22 *	1.38 *	1.39 *	1.39 *	1.39 *
甘氨酸	1.4 *	1.42 *	1.34 *	1.22	1.25 *	1.17 *	1.19 *	1.13 *	1.34 *	1.24 *	1.2 *
血清素 (5-HT)	9.5 *	3.45 *	4.88 *	2.29 *	1.88 *	1.56 *	1.8	2.92 *	3.51 *	4.53 *	2.57 *
3-甲氧基酪氨酸	1.9 *	2.05 *	2.23 *	1.97 *	1.47 *	1.55 *	1.43 *	1.8 *	1.75 *	1.67 *	1.52 *
脯氨酸	1.28 *	1.43 *	1.41 *	1.18 *	1.37 *	1.13	1.05	1.1 *	1.28 *	1.29 *	1.27 *
二十酸 (C20:0)	1.32 *	1.55 *	1.75 *	2.11 *	1.84 *	1.93	1.23 *	1.44 *	1.71 *	1.98 *	2.14 *
Ribal	1.89 *	1.93 *	1.74 *	0.62 *	0.76	0.86	1.43 *	1.29 *	1.61 *	1.43 *	1.98 *

表 4d: 雄性大鼠中血液毒性 (脾高铁血红蛋白) 的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值≤0.1)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	4-氯-3-硝基苯胺			氟他胺			1,3-二硝基苯		1,4-二硝基苯		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m7	m14	m28
尿素	0.89	0.7 *	0.89	0.82 *	0.82	0.73	0.79 *	0.63 *	0.81 *	0.81 *	0.82 *
棕榈油酸 (C16:顺[9]1)	0.63 *	0.51 *	0.49 *	0.77 *	0.68 *	0.6 *	0.42 *	0.22 *	0.92	0.55 *	0.38 *
3,4-二羟基苯乙酸 (DOPAC)	0.23 *	0.16 *	0.19 *	0.6 *	0.67 *	0.47 *	0.71 *	0.67 *	0.84 *	0.94	0.54 *

[0211]

反油酸 (C18:反[9]1)	0.77 *	0.77 *	0.79 *	0.97	0.8 *	0.6 *	0.6 *	0.7 *	0.83 *	0.68	0.58 *
-----------------	--------	--------	--------	------	-------	-------	-------	-------	--------	------	--------

表 5a: 雌性大鼠中血液毒性 (脾含铁血黄素沉着症) 的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值≤0.2) 。对一些代谢物 (用#标记) , 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	环己酮肟(CHO)			1,4-二硝基苯			4-氯-3-硝基苯胺		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
亚油酸 (C18:顺[9,12]2)	1.46 *	1.21 *	1.13 *	1.44 *	1.67 *	1.72 *	1.26	1.58 *	1.59 *
二十二碳六烯酸 (C22: 顺[4,7,10,13,16,19]6)	1.72 *	1.55 *	1.6 *	1.28 *	1.29 *	1.22 *	1.31 *	1.71 *	1.43 *
十七酸 (C17:0)	1.14 *	1.34 *	1.32 *	1.15	1.19 *	1.24 *	1.07	1.42 *	1.38 *
植物鞘氨醇	1.33 *	1.27 *	1.31 *	1.27 *	1.08 *	1.34 *	1.45 *	1.66 *	1.81 *
胞嘧啶	1.31 *	1.13 *	1.45 *	2.57 *	1.66 *	2.1 *	1.69 *	1.38 *	1.49 *
Ribal	1.15 *	1.16	1.38 *	2.42 *	1.55 *	2.3 *	1.88 *	1.58 *	1.52 *
3-甲氧基酪氨酸	NA	NA	NA	1.46 *	1.36 *	1.47 *	NA	NA	NA
棕榈酸 (C16:0)	1.45 *	1.28 *	1.22 *	1.19 *	1.24 *	1.42 *	1.12	1.34 *	1.34 *
苏氨酸	1.22 *	1.53 *	1.47 *	1.47 *	1.24 *	1.67 *	1.55 *	1.95 *	2.05 *

[0212]

3-羟基吲哚	1.59 *	1.55 *	0.75	1.55 *	1.79 *	1.63 *	1.76 *	1.97 *	2.79 *
血清素 (5-HT)	NA	NA	NA	1.46	2.66 *	3.09 *	NA	NA	NA
甘油, 脂级分#	1.12 *	1.11 *	1.49 *	1.41 *	1.86 *	2.17 *	1.07	1.45 *	1.56 *
磷酸盐 (无机和有机磷酸盐)	1.24 *	1.31 *	1.09	1.11	1.2 *	1.22 *	0.92 *	1.11 *	1.21 *
雄烯二酮	NA	NA	NA	0.9	1.97 *	2.34 *	NA	NA	NA
葡萄糖醛酸	0.96	1.2 *	1.22 *	1.97 *	1.86 *	1.66 *	2.62 *	2.29 *	1.52 *
谷氨酸	1.12	1.15 *	1.27 *	1.36 *	1.52 *	1.22 *	1.13 *	1.3 *	1.46 *

表 5b: 雌性大鼠中血液毒性 (脾含铁血黄素沉着症) 的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值≤0.2)。对一些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	环己酮肟(CHO)			1,4-二硝基苯			4-氯-3-硝基苯胺		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
高香草酸 (HVA)	NA	NA	NA	1.23	0.79 *	0.52 *	NA	NA	NA
丙酮酸盐	0.78 *	0.59 *	0.66 *	0.83 *	0.59 *	0.55 *	0.98	0.53 *	0.51 *
酮亮氨酸	1.02	0.92 *	0.74 *	0.81 *	0.72 *	0.71 *	0.55 *	0.44 *	0.65 *
3,4-二羟基苯基乙二醇	NA	NA	NA	0.94 *	0.72 *	0.7 *	NA	NA	NA

[0213]

(DOPEG)													
孕酮	NA	NA	NA	0.84 *	0.41 *	0.74 *	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

表 5c: 雄性大鼠中血液毒性（脾含铁血黄素沉着症）的标记物；标记(*)了显著的上调变化（p 值≤0.2）。对一些代谢物（用#标记），在表 11 中提供了额外信息。

	环己酮肟(CHO)			利谷隆			1,4-二硝基苯			4-氯-3-硝基苯胺		
代谢物	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
Ribal	1.47 *	1.56 *	1.77 *	1.46 *	1.36 *	1.26 *	1.61 *	1.43 *	1.98 *	1.51 *	1.57 *	1.52 *
二十二碳六烯酸 顺 (C22: [4,7,10,13,16,19]6)	1.41 *	1.36 *	1.35 *	1.05 *	1.25 *	1.22 *	1.58 *	1.55 *	1.55 *	1.33 *	1.36 *	1.22 *
胞嘧啶	1.39 *	1.49 *	1.68 *	1.13 *	1.31 *	1.05 *	1.66 *	1.37 *	1.97 *	1.31 *	1.64 *	1.71 *
苏糖酸	1.21	1.34	1.34	1.9	1.77	1.24 *	1.04	1.31	1.19 *	0.85	1.15	1.24

[0214]

	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
泛酸	1.25	1.37	1.68	1.54	1.96	2.24 *	1.06	1.24	1.12	1.27	1.51	0.98						
木糖醇	1.59	1.55	2.08	2.86	2.93	2.06 *	1.51	1.26	1.99	1.7	1.45	1.44						
亚油酸 (C18: 顺 [9,12 2)	1.31	1.18	1.18	1.44	1.49	1.5 *	1.68	1.88	1.56	1.1	1.24	1.39	*	*	*	*	*	*
葡萄糖醛酸	1.35	1.36	1.74	4.64	2.54	2.25 *	1.27	1.09	1.18	2 *	1.68	1.08						
植物鞘氨醇	1.18	1.15	0.94	1.89	2.14	2.47 *	1.28	1.07	1.12	1.93	1.6	1.3						
苏氨酸	1.25	1.23	1.28	1.48	1.62 *	1.53 *	1.5 *	1.32	1.36	1.37	1.4 *	1.47	*	*	*	*	*	*
尿酸素	1.1	1.25	1.35	0.98	1.36	1.1 *	1.2 *	1.19	1.42	1.43	1.2	1.21	*	*	*	*	*	*

[0215]

表 5d: 雄性大鼠中血液毒性 (脾含铁血黄素沉着症) 的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值 ≤ 0.2)。对一些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	环己酮肟(CHO)			利谷隆			1,4-二硝基苯			4-氯-3-硝基苯胺		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
棕榈油酸 (C16: 顺[9]1)	1.22	0.78	0.8 *	0.75 *	0.5 *	0.77 *	0.92	0.55 *	0.38	0.64 *	0.59	0.44
16-甲基十七酸	1.14	0.82 *	0.72	0.75	*	0.69 *	0.91	1.01	0.61	*	0.84	1.05

表 6a: 雌性大鼠中血液毒性 (全身性抗增殖) 的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值 ≤ 0.1)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。以高剂量施用奥沙利铂。

	奥沙利铂	盐酸阿霉素
--	------	-------

[0216]

代谢物	f7	f14	f28	f7	f14	f28
辅酶 Q9	1.18 *	1.48 *	1.63 *	1.98 *	1.71 *	2.3 *
辅酶 Q10	1.31 *	1.67 *	1.56 *	1.22	1.19 *	1.82 *
胞嘧啶	1.27 *	1.5 *	1.34 *	1.77 *	1.71 *	2.05 *
甘露糖	1.13	1.24 *	1.23 *	1.35 *	1.31 *	1.36 *
Ribal	1.48 *	1.41	1.47 *	1.51 *	1.6 *	2.11 *
亮氨酸	1.23 *	1.13 *	1.43 *	1	1.24 *	1.36 *
异亮氨酸	1.27 *	1.11 *	1.36 *	0.97	1.21 *	1.28 *
缬氨酸	1.21 *	1.08 *	1.31 *	0.95	1.14 *	1.27 *

表 6b: 雌性大鼠中血液毒性 (全身性抗增殖) 的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值 < 0.1)。对有些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。以高剂量施用奥沙利铂。

代谢物	奥沙利铂			盐酸阿霉素		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28
肌酸酐	0.69 *	0.77 *	0.81 *	0.77 *	0.95 *	0.92
苹果酸盐	0.85 *	0.67 *	1.3	0.55 *	0.67 *	0.93

[0217]

表 7a: 雄性大鼠中血液毒性 (血液再生障碍性贫血) 的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值 ≤ 0.1) 。对一些代谢物 (用#标记) , 在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	丙磺舒			甲硫咪唑		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28
γ-亚麻酸 (C18:顺[6,9,12 3])	2.14 *	2.74 *	2.26 *	1.85 *	2.63 *	2.23 *
鞘磷脂 (d18:1,C24:0)#	1.39 *	1.49 *	1.23 *	1.35 *	1.64 *	1.41 *
组氨酸	1.31 *	1.4 *	1.34 *	1.25 *	1.2 *	1.21 *
胆碱缩醛磷脂 No 01#	1.36 *	1.19 *	1.38 *	1.24 *	1.34 *	1.21 *
鸟氨酸	1.37 *	1.09	1.3 *	1.17 *	1.34 *	1.59 *
辅酶 Q9	1.66 *	1.63 *	1.02	1.23	1.54 *	2.14 *
磷脂酰胆碱 (C18:0,C18:1)#	1.2 *	1.31 *	1.28 *	1.36 *	1.55 *	1.6 *
磷脂酰胆碱 (C18:0,C18:2)#	1.08 *	1.12 *	1.13 *	1.11 *	1.28 *	1.35 *
磷脂酰胆碱 (C16:0,C20:5)#	1.28 *	1.36 *	1.15 *	1.05 *	1.35 *	1.35 *
亮氨酸	1.18 *	1.1	1.18 *	1.24 *	1.34 *	1.78 *
植物鞘氨醇	1.44 *	2.24 *	1.96 *	2 *	3.12 *	3.11 *

[0218]

二高-γ-亚麻酸 (C20:顺[8,11,14]3)	1.48 *	1.43 *	1.41 *	2.38 *	3.18 *	2.09 *
二十酸 (C20:0)	1.39	1.29 *	1.18	1.32 *	1.71 *	1.74 *
缬氨酸	1.13 *	1.2 *	1.09 *	1.28 *	1.5 *	1.77 *
α-生育酚	1.16	1.31 *	1.11 *	2.26 *	3.65 *	2.04 *

表 7b: 雄性大鼠中血液毒性 (血液再生障碍性贫血) 的标记物; 标记(*)了显著的下调变化 (p 值 ≤ 0.1)。对一些代谢物 (用#标记), 在表 11 中提供了额外信息。

	丙磺舒		甲硫咪唑			
	m7	m14	m28	m7	m14	m28
代谢物						
胞嘧啶	0.7 *	0.69 *	0.68 *	0.64 *	0.44 *	0.32 *
磷脂酰胆碱 No 04#	0.53 *	0.79 *	0.68 *	0.84 *	0.75 *	0.64 *
Ribal	0.78 *	0.87 *	0.68 *	0.65 *	0.46 *	0.42 *
16-甲基十七酸	0.63 *	0.64 *	0.55 *	1.21 *	0.73 *	0.47 *

表 8a: 雄性大鼠中血液毒性 (免疫抑制) 的标记物; 标记(*)了显著的上调变化 (p 值 ≤ 0.2)。对有些代谢物 (用

[0219]

#标记)，在表 11 中提供了额外信息。

	环孢菌素 A	他克莫司	甲基强的松龙
代谢物	m28	m28	m28
胆固醇酯 No 01#	1.15 *	1.05 *	1.08 *
谷氨酸	1.16 *	1.29 *	1.11 *
天冬氨酸	1.31 *	1.42 *	1.37 *
甘油-3-磷酸，极性级分#	1.2 *	1.54 *	1.4 *

表 8b: 雄性大鼠中血液毒性（免疫抑制）的标记物；标记(*)了显著的下调变化（p 值 ≤ 0.2）。对有些代谢物（用#标记），在表 11 中提供了额外信息。

	环孢菌素 A	他克莫司	甲基强的松龙
代谢物	m28	m28	m28
酮亮氨酸	0.65 *	0.85 *	0.75 *
18-羟基-11-去氧皮质酮	0.23 *	0.48 *	0.15 *
丙酮酸盐	0.89 *	0.77 *	0.65 *

[0220]

表 9：雄性大鼠中血液毒性（脾造血作用）的标记物；标记(*)了显著的下调变化（p 值 ≤ 0.2）。对有些代谢物（用#标记），在表 11 中提供了额外信息。

代谢物	氟环唑			三乙醇胺			2-丁氧基乙醇		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
尿酸	0.85 *	0.69 *	0.62 *	0.76 *	0.52 *	0.67 *	0.75 *	0.71 *	0.66 *
胞嘧啶	0.82 *	0.78 *	0.84 *	0.91	0.86 *	0.92 *	0.86 *	0.93	0.86 *
尿嘧啶	0.91	0.84 *	0.93	0.79 *	0.81 *	1.07	0.77 *	0.9	0.71 *
抗坏血酸	0.9 *	0.9 *	0.89 *	1.04	0.85 *	0.83 *	0.91	0.8 *	0.94 *
Ribal	0.77 *	0.8 *	0.78 *	0.82 *	0.7 *	0.86 *	0.82 *	1.06	0.91 *
葡萄糖	0.72 *	0.79 *	0.71 *	1.13 *	0.82 *	0.82 *	0.81 *	0.73 *	0.93 *
18-羟基-11-去氧皮质酮	0.31 *	0.4 *	0.93	0.36 *	0.17 *	0.29	0.18 *	0.44 *	0.68 *
苹果酸盐	1.04	0.66 *	0.62 *	0.83	0.61 *	0.75 *	0.81 *	0.79 *	0.7 *
丙氨酸	0.87 *	0.74 *	0.85 *	0.78 *	0.7 *	0.92 *	0.83 *	0.93	0.91 *
肌醇	0.85 *	1.02	1.21 *	0.7 *	0.7 *	0.82 *	0.88	0.82 *	0.93 *
苯丙氨酸	0.94 *	0.92 *	0.98	0.85 *	0.91 *	0.9	0.87 *	0.94 *	0.95 *

[0221]

溶血磷脂酰胆碱 (C20:4)#	0.76 *	0.67 *	0.7 *	0.85 *	0.89 *	0.78 *	0.89 *	0.85 *	0.94
------------------	--------	--------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	------

表 10: 化合物和施药(CMC = 羧甲基纤维素)

化合物	同义词	CAS 号	施用剂量	详情
1,3-二硝基苯	m-二硝基苯	99-65-0	10 mg/kg 体重 通过强饲法	在玉米油中; 施用体 积: 5 ml/kg 体重
1,4-二硝基苯	p-二硝基苯	100-25-4	20 mg/kg 体重 通过强饲法	在玉米油中, 施用体 积: 5 ml/kg 体重
2-丁氧基乙醇	na	111-76-2	6,000 ppm 在饮食中	混合在饮食中
2-氯苯胺	1-氨基-2-氯苯	95-51-2	160 mg/kg 体重 通过强饲法	在玉米油中; 施用体 积: 5 ml/kg 体重
4-氯-3-硝基苯胺	4-氯-3-硝基苯胺	635-22-3	90 mg/kg 体重 通过强饲法	在玉米油中; 施用体 积: 5 ml/kg 体重
盐酸阿霉素	多柔比星	25316-40-9	2 mg/kg 体重 皮下, 每周 1 次	在 0.9% NaCl 中; 施 用体积: 1 ml/kg 体重; 每周 1 次, 在第 0, 6, 13,

[0222]

苯胺	氨基苯	62-53-3	100 mg/kg 体重 通过强饲法	20 和 27 天 在双蒸水(aqua bidest) 中的溶液; 施用体积: 10 ml/kg 体重
苯噻草胺	N'-[2-氯-4-氯-5-(3-甲基-2,6-二氧-4-(三 氟甲基)-3,6-二羟-1(2H)-嘧啶基)苯甲 酰基]-N-异丙基-N-甲基硫酰胺	372137-35-4	1,000 ppm 在饮食中	混合在饮食中
环己酮肟(CHO)	(羟基亚氨基)环己烷	100-64-1	200 mg/kg 体重 通过强饲法	在双蒸水中, 施用体 积: 15 ml/kg 体重
氟环唑	na	106325-08-0	2,000 ppm 在饮食中	混合在饮食中
氟他胺	na	13311-84-7	100 mg/kg 体重 通过强饲法	在玉米油中, 施用体 积: 5 ml/kg 体重
三水合醋酸铅	na	6080-56-4	500 ppm 在饮食中	混合在饮食中
利谷隆	3-(3,4-二氯苯基)-1-甲氧基-1-甲基尿素	330-55-2	100 mg/kg 体重 通过强饲法	在玉米油中, 施用体 积: 10 ml/kg 体重
石胆酸	na	434-13-9	1000 mg/kg 体重	在玉米油中; 施用体

[0223]

			通过强饲法	积: 5 ml/kg 体重
甲巯咪唑	an	60-56-0	100 mg/kg 体重 通过强饲法	在饮用水中, 施用体 积: 10 ml/kg 体重
奥沙利铂	na	61825-94-3	2 mg/kg 体重 腹膜内, 每周 2 次	在 0.9% NaCl 中; 施 用体积: 3 ml/kg 体重
丙磺舒	na	57-66-9	800 mg/kg 体重 通过强饲法	在玉米油中, 施用体 积: 5 ml/kg 体重
三乙醇胺	三(2-羟乙基)胺	102-71-6	2,000 mg/kg 体重 通过强饲法	在双蒸水中, 施用体 积: 10 ml/kg 体重
卡铂	顺-二氯(1,1-环丁烷基二羧酸)铂	41575-94-4	2 mg/kg 体重 腹膜内, 每周 2 次	在 0.9% NaCl 中; 施 用体积: 3 ml/kg 体重
顺铂	na	15663-27-1	0.1 mg/kg 体重 腹膜内	在 0.9% NaCl 中; 施 用体积: 3 ml/kg 体重; 一周 2 次
布洛芬	na	15687-27-1	30 mg/kg 体重 通过强饲法	在含 0.5% CMC (Tylose CB30000)的饮 用水中, 施用体积: 10 ml/kg 体重

[0224]

奥沙利铂 *)	na	61825-94-3	0.7 mg/kg 体重 腹腔内, 每周 2 次	在 0.9% NaCl 中; 施用体积: 3 ml/kg 体重
环磷酰胺一水合物	1-溴萘	6055-19-2	8 mg/kg 体重 通过强饲法 (第 0 至 9 天), 4 mg/kg 体重 通过强饲法 (从第 10 天往后)	在饮用水中, 施用体积: 10 ml/kg 体重
盐酸阿霉素	多柔比星	25316-40-9	2 mg/kg 体重 皮下, 每周 1 次	在 0.9% NaCl 中; 施用体积: 1 ml/kg 体重; 每周 1 次, 在第 0, 6, 13, 20 和 27 天
阿糖胞苷	β-D-阿拉伯呋喃糖苷	147-94-4	100 mg/kg 体重 腹腔内	在 0.9% NaCl 中; 施用体积 3 ml/kg 体重

*) 低剂量仅用于骨髓抑制

表 11: 选定的分析物的化学/物理性质。通过化学和物理性质在本文中表征这些生物标记物。

[0225]

代谢物	碎断图式(GC-MS)和描述
3-O- 甲 基 鞘 氨 醇 (d18:1)	在酸性甲醇解和用在吡啶中的 2% O-甲基羟胺盐酸衍生化和随后用 N-甲基-N-三甲基硅烷基三氟乙酰胺衍生化后, 当应用电子碰撞(EI) 电离质谱用 GC/MS 检测时, 3-O-甲基鞘氨醇 (d18:1)展示以下特征 离子片段: MS (EI, 70 eV): m/z (%): 204 (100), 73 (18), 205 (16), 206 (7), 354 (4), 442 (1).
5-O- 甲 基 鞘 氨 醇 (d18:1)	在酸性甲醇解和用在吡啶中的 2% O-甲基羟胺盐酸衍生化和随后用 N-甲基-N-三甲基硅烷基三氟乙酰胺衍生化后, 当应用电子碰撞(EI) 电离质谱用 GC/MS 检测时, 5-O-甲基鞘氨醇 (d18:1)展示以下特征 离子片段: MS (EI, 70 eV): m/z (%): 250 (100), 73 (34), 251 (19), 354 (14), 355 (4), 442 (1).
胆固醇酯 No 01	代谢物属于胆固醇酯类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时, 其展示以下特征离子种类: 正电荷离子种类的质荷比(m/z) 是 369.2 (+/- 0.5)。
胆碱缩醛磷脂 No 01	代谢物属于胆碱缩醛磷脂类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时, 其展示以下特征离子种类: 正电荷离子种类的质荷 比(m/z)是 772.6 (+/- 0.5)。

[0226]

胆碱缩醛磷脂 No 02	代谢物属于胆碱缩醛磷脂类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时,其展示以下特征离子种类:正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 767 (+/- 0.5)。
胆碱缩醛磷脂 No 03	代谢物属于胆碱缩醛磷脂类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时,其展示以下特征离子种类:正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 768.8 (+/- 0.5)。
DAG (C18:1,C18:2)	DAG (C18:1,C18:2)代表包含 C18:1 脂肪酸单元和 C18:2 脂肪酸单元的组的二酰基甘油的和参数。电离的种类的质荷比(m/z)是 641.6 Da (+/- 0.5 Da)。
二十碳一烯酸 (C20:1) No 02	在酸性甲醇解和用在吡啶中的 2% O-甲基羟胺盐酸衍生化和随后用 N-甲基-N-三甲基硅烷基三氟乙酰胺衍生化后,当应用电子碰撞(EI)电离质谱用 GC/MS 检测时,二十碳一烯酸 (C20:1)展示以下特征离子片段: MS (EI, 70 eV): m/z (%): 55 (100), 69 (75), 41 (57), 83 (54), 74 (53), 97 (45), 110 (20), 292 (13), 293 (13), 124 (12), 250 (9), 152 (8), 138 (8), 208 (7), 324 (2)。
磷酸甘油, 脂级分	磷酸甘油, 脂级分代表包含甘油-2-磷酸或甘油-3-磷酸部分的且在提取和将提取物分离为极性和脂级分后存在于脂级分中的代谢物的和参数。

[0227]

溶血磷脂酰胆碱 (C17:0)	溶血磷脂酰胆碱 (C17:0)代表包含 C17:0 脂肪酸单元的溶血甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷射离子化(ESI)质谱, 用 LC/MS 检测, 正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 510.4 Da (+/- 0.5 Da)。
溶血磷脂酰胆碱 (C18:0)	溶血磷脂酰胆碱 (C18:0)代表包含 C18:0 脂肪酸单元的溶血甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷射离子化(ESI)质谱, 用 LC/MS 检测, 正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 546.6 Da (+/- 0.5 Da)。
溶血磷脂酰胆碱 (C18:1)	溶血磷脂酰胆碱 (C18:1)代表包含 C18:1 脂肪酸单元的溶血甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷射离子化(ESI)质谱, 用 LC/MS 检测, 正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 522.2 Da (+/- 0.5 Da)。
溶血磷脂酰胆碱 (C18:2)	溶血磷脂酰胆碱 (C18:2)代表包含 C18:2 脂肪酸单元的溶血甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷射离子化(ESI)质谱, 用 LC/MS 检测, 正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 542.4 Da (+/- 0.5 Da)。
溶血磷脂酰胆碱 (C20:4)	溶血磷脂酰胆碱 (C20:4)代表包含 C20:4 脂肪酸单元的溶血甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷射离子化(ESI)质谱, 用 LC/MS 检测, 正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 544.4 Da (+/- 0.5 Da)。
溶血磷脂酰乙醇胺 (C22:5)	当应用电喷射离子化(ESI)质谱, 用 LC/MS 检测时, 溶血磷脂酰乙醇胺 (C22:5)展示以下特征离子种类: 正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 528.2 (+/- 0.5)。

[0228]

磷脂酰胆碱 (C16:0,C16:0)	磷脂酰胆碱 (C16:0/C16:0)代表包含2个C16:0脂肪酸单元的任一个组合的甘油磷酸胆碱的和参数。电离的种类的质荷比(m/z)是 734.8 Da (+/- 0.5 Da)。
磷脂酰胆碱 (C16:0,C20:5)	当应用电喷射离子化(ESI)质谱,用 LC/MS 检测时,磷脂酰胆碱 (C16:0,C20:5)展示以下特征离子种类:正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 780.8 (+/- 0.5)。
磷脂酰胆碱 (C16:1,C18:2)	磷脂酰胆碱 (C16:1, C18:2)代表包含 C16:1 脂肪酸单元和 C18:2 脂肪酸单元的组合的甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷射离子化 (ESI)质谱,用 LC/MS 检测,正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 756.8 Da (+/- 0.5 Da)。
磷脂酰胆碱 (C18:0,C18:1)	磷脂酰胆碱 (C18:0, C18:1)代表包含 C18:0 脂肪酸单元和 C18:1 脂肪酸单元的组合的甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷射离子化 (ESI)质谱,用 LC/MS 检测,正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 788.6 Da (+/- 0.5 Da)。
磷脂酰胆碱 (C18:0,C18:2)	磷脂酰胆碱 (C18:0, C18:2)代表包含 C18:0 脂肪酸单元和 C18:2 脂肪酸单元的组合的甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷射离子化 (ESI)质谱,用 LC/MS 检测,正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 786.6 Da (+/- 0.5 Da)。

[0229]

磷脂酰胆碱 (C18:0,C20:3)	当用电喷雾离子化(ESI)质谱, 用 LC/MS 检测时, 磷脂酰胆碱(C18:0,C20:3)展示以下特征离子种类: 正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 812.6 (+/- 0.5).
磷脂酰胆碱 (C18:0,C20:4)	磷脂酰胆碱 (C18:0, C20:4)代表包含 C18:0 脂肪酸单元和 C20:4 脂肪酸单元的组合的甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷雾离子化(ESI)质谱, 用 LC/MS 检测, 正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 810.8 Da (+/- 0.5 Da)。
磷脂酰胆碱 (C18:0,C22:6)	磷脂酰胆碱 (C18:0, C22:6)代表包含 C18:0 脂肪酸单元和 C22:6 脂肪酸单元的组合的甘油磷酸胆碱的和参数。如果应用电喷雾离子化(ESI)质谱, 用 LC/MS 检测, 正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 834.8 Da (+/- 0.5 Da)。
磷脂酰胆碱 (C18:1,C18:2)	磷脂酰胆碱 (C16:0/C20:3 C18:1/C18:2)代表包含 C18:1 脂肪酸单元和 C18:2 脂肪酸单元的组合的甘油磷酸胆碱的和参数。电离的种类的质荷比(m/z)是 784.6 Da (+/- 0.5 Da)。
磷脂酰胆碱 (C18:2,C20:4)	磷脂酰胆碱 (C16:0/C22:6 C18:2/C20:4)代表包含 C16:0 脂肪酸单元和 C22:6 脂肪酸单元的组合或 C18:2 脂肪酸单元和 C20:4 脂肪酸单元的组合的甘油磷酸胆碱的和参数。电离种类的质荷比(m/z)是 806.6 Da (+/- 0.5 Da)。

[0230]

磷脂酰胆碱 No 02	代谢物属于甘油磷酸胆碱类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时,其展示以下特征离子种类:正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 808.4 (+/- 0.5)。
磷脂酰胆碱 No 04	代谢物属于甘油磷酸胆碱类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时,其展示以下特征离子种类:正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 796.8 (+/- 0.5)。
鞘磷脂 (d18:1,C23:0)	当应用电喷射离子化(ESI)质谱,用 LC/MS 检测时,鞘磷脂 (d18:1,C23:0)展示以下特征离子种类:正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 801.8 (+/- 0.5)。
鞘磷脂 (d18:1,C24:0)	鞘磷脂 (d18:1,C24:0)代表包含 d18:1 长链基础单元和 C24:0 脂肪酸单元的组合的鞘磷脂的和参数。如果应用电喷射离子化(ESI)质谱,用 LC/MS 检测,正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 815.8 Da (+/- 0.5 Da)。
鞘磷脂 (d18:2,C16:0)	当应用电喷射离子化(ESI)质谱,用 LC/MS 检测时,鞘磷脂 (d18:2,C16:0)展示以下特征离子种类:正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 723.6 (+/- 0.5)。
鞘磷脂 (d18:2,C18:0)	当应用电喷射离子化(ESI)质谱,用 LC/MS 检测时,鞘磷脂 (d18:2,C18:0)展示以下特征离子种类:正电荷离子种类的质荷比

[0231]

	(m/z)是 729.8 (+/- 0.5)。
TAG (C16:0,C16:1)	代谢物代表包含 C16:0 脂肪酸单元和 C16:1 脂肪酸单元的组成的三酰甘油的和。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 549.6 (+/- 0.5)。
TAG (C16:0,C18:1,C18:3)	当应用电喷射离子化(ESI)质谱，用 LC/MS 检测时，TAG (C16:0,C18:1,C18:3)展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 855.6 (+/- 0.5)。
TAG (C16:0,C18:2)	代谢物代表包含 C16:0 脂肪酸单元和 C18:2 脂肪酸单元的组成的三酰甘油的和。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 575.6 (+/- 0.5)。
TAG (C18:1,C18:2)	代谢物代表包含 C18:1 脂肪酸单元和 C18:2 脂肪酸单元的组成的三酰甘油的和。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 601.6 (+/- 0.5)。

[0232]

TAG (C18:2,C18:2)	代谢物代表包含 C18:2 脂肪酸单元和 C18:2 脂肪酸单元的组成的三酰甘油的和。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 599.6 (+/- 0.5)。
TAG (C18:2,C18:3)	代谢物代表包含 C18:2 脂肪酸单元和 C18:3 脂肪酸单元的组成的三酰甘油的和。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 597.6 (+/- 0.5)。
TAG (DAG-片段)	代谢物属于三酰甘油类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 600.6 (+/- 0.5)。
TAG No 01	代谢物属于三酰甘油类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 547.6 (+/- 0.5)。
TAG No 02	代谢物属于三酰甘油类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z)是 695.6 (+/- 0.5)。

[0233]

TAG No 05	代谢物属于三酰甘油类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z) 是 879.6 (+/- 0.5)。
TAG No 059	代谢物属于三酰甘油类别。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z) 是 904 (+/- 0.5)。
TAG No 07	代谢物属于三酰甘油类。当应用电喷射离子化(ESI)质谱用 LC/MS 检测时，其展示以下特征离子种类：正电荷离子种类的质荷比(m/z) 是 853.6 (+/- 0.5)。

[0234]

表 12a: 雄性大鼠中血液毒性(血液贫血)的标记物; 所有代谢物显示了显著的下调变化(p 值 ≤0.2)。

代谢物	4-氯-3-硝基苯胺	苯胺	2-氯苯胺
	m7	m7	m7
酮亮氨酸	0,61	0,94	0,60
3,4-二羟基苯基乙二醇 (DOPEG)	0,53	0,84	0,87
3,4-二羟基苯丙氨酸 (DOPA)	0,93	0,81	0,76

表 12b: 雄性大鼠中血液毒性(血液贫血)的标记物; 所有代谢物显示了显著的上调变化(p 值 ≤0.2)。

代谢物	4-氯-3-硝基苯胺	苯胺	2-氯苯胺
	m7	m7	m7
Ribal	1,89	1,66	1,24
胞嘧啶	1,75	1,62	1,41
3-羟基吗啉	1,25	1,61	1,40
3-羟基吗啉硫酸盐	1,34	1,64	1,68

2,64
1,48

NA
1,35

9,50
1,90

[0235]

血清素 (5-HT)
3-甲氧基酪氨酸