

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680033461.2

[43] 公开日 2008年9月10日

[11] 公开号 CN 101263391A

[22] 申请日 2006.9.12

[21] 申请号 200680033461.2

[30] 优先权

[32] 2005. 9. 12 [33] US [31] 60/716,310

[32] 2006. 6. 14 [33] US [31] 60/804,764

[86] 国际申请 PCT/CA2006/001502 2006.9.12

[87] 国际公布 WO2007/030928 英 2007.3.22

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.12

[71] 申请人 菲诺梅诺米发现公司

地址 加拿大萨斯喀彻温省

[72] 发明人 肖恩·里奇 达扬·古登奥韦

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王旭

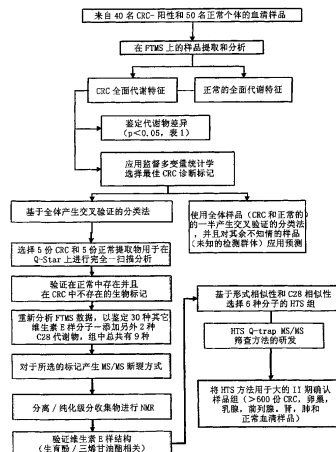
权利要求书 6 页 说明书 71 页 附图 44 页

[54] 发明名称

通过测量维生素 E - 相关的代谢物诊断结肠直肠癌和卵巢癌的方法

[57] 摘要

本发明涉及结肠直肠癌和卵巢癌(分别为 CRC 和 OC)的诊断。本发明描述内源小分子和 CRC 或 OC 之间的关系。具体地,本发明涉及通过测量维生素 E - 同种型及相关的代谢物而诊断 CRC 和 OC。本发明还涉及在所述方法中鉴定的诊断标记。本发明涉及 CRC 的潜伏情形和症状之前的阶段, CRC 各个阶段和严重性的诊断, CRC 的早期检测, 监测并且诊断治疗对 CRC 和 OC 健康状态的作用。



1. 鉴定用于在受试者中诊断结肠直肠癌(CRC)或卵巢癌(OC)的代谢物标记的方法，其包括步骤：

将来自表现出结肠直肠癌的患者的样品引入到高分辨率质谱仪中，所述样品含有多种未鉴定的代谢物；

获得、鉴定并且定量关于所述代谢物的数据；

生成所述鉴定和定量的数据的数据库；

将来自所述样品的鉴定和定量数据与来自对照样品的相应的数据进行比较；

鉴定有差别的一种或多种代谢物，其中一种或多种所述代谢物可以用于在受试者中诊断结肠直肠癌和卵巢癌。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述代谢物选自由在表 3 中列出的代谢物组或它们的片段或衍生物组成的组。

3. 权利要求 2 的方法，其还包括选择最佳诊断所需的最小数目的代谢物标记的步骤。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述高分辨率的质谱仪是傅里叶变换离子回旋加速共振质谱仪(FTMS)。

5. 权利要求 3 的方法，其中所述代谢物选自由下列各项组成的组：具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的精确中性质量的代谢物，或其片段或衍生物。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述代谢物选自由下列各项组成的组：具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的精确中性质量和在图 13-21 中任一附图中所示的 LC-MS/MS 片段模式的代谢物或其片段或衍生物。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述代谢物选自由具有下列分子式的代谢物组成的组：C₂₈H₄₆O₄, C₂₈H₄₈O₄, C₂₈H₅₀O₄, C₂₈H₄₈O₅, C₂₈H₅₀O₅,

C28H52O5, C32H58O6, C36H64O6 和 C36H66O6。

8. 权利要求 7 的方法, 其中所述代谢物是生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物的代谢衍生物。

9. CRC/OC 癌-特异性代谢标记, 其选自由在表 3 中列出的代谢物或它们的片段或衍生物组成的组。

10. 权利要求 9 的标记, 其选自由具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711, 和 594.4851 的精确中性质量(以道尔顿测量)的代谢物或其片段或衍生物组成的组, 其中 ± 5 ppm 的差别将指示相同的代谢物。

11. 权利要求 10 的标记, 其中所述标记选自由下列各项组成的组: 具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的精确中性质量和在图 13-21 中任一附图中所示的 LC-MS/MS 片段模式的代谢物或其片段或衍生物。

12. 权利要求 11 的标记, 其中所述标记选自由具有下列分子式的代谢物组成的组: C28H46O4, C28H48O4, C28H50O4, C28H48O5, C28H50O5, C28H52O5, C32H58O6, C36H64O6 和 C36H66O6。

13. 权利要求 12 的标记, 其中所述代谢物是生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物的代谢衍生物。

14. 诊断患者存在 CRC 或 OC 或者处于发展 CRC 或 OC 的危险中的方法, 其包括步骤:

筛查来自所述患者的样品存在或不存在一种或多种代谢物标记, 所述代谢物标记选自由在表 3 列出的代谢物或其片段或衍生物组成的组, 其中在一种或多种所述代谢物标记强度中的差别指示 CRC 或 OC 的存在, 或者发展 CRC 或 OC 的危险。

15. 权利要求 14 的方法, 其中所述代谢物标记选自由具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的精确中性质量的代谢物标记或其片段或衍生物组成的组; 其中一种或多种所述代谢物标记的不存在指示 CRC 或 OC 的存在, 或者发展 CRC 或 OC 的危险。

16. 权利要求 15 的方法, 其中所述标记选自由下列各项组成的组: 具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的精确质量和在图 13-21 中任一附图中所示的 LC-MS/MS 片段模式的代谢物或其片段或衍生物。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述标记选自由具有下列分子式的代谢物组成的组: C₂₈H₄₆O₄, C₂₈H₄₈O₄, C₂₈H₅₀O₄, C₂₈H₄₈O₅, C₂₈H₅₀O₅, C₂₈H₅₂O₅, C₃₂H₅₈O₆, C₃₆H₆₄O₆ 和 C₃₆H₆₆O₆。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述代谢物是生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物的代谢衍生物。

19. 在未知疾病状态的测试受试者中诊断 CRC 或 OC 的存在或不存在或者处于发展 CRC 或 OC 的危险中的方法, 其包括:

获得来自所述测试受试者的血液样品;

分析所述血液样品, 以获得关于选自由表 3 列出的代谢物或其片段或衍生物组成的组的分子的定量数据;

将在所述测试受试者中获得的关于所述分子的定量数据与从多名 CRC-或 OC-阳性的人的所述分子获得的定量数据或从多名 CRC-或 OC-阴性的人获得的定量数据进行比较;

应用所述比较来确定所述测试受试者是 CRC 或 OC 阳性或阴性或处于发展 CRC 或 OC 的危险的概率。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述分子选自由通过 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的精确中性质量鉴定的分子或者具有基本上等于这些分子的质量的分子或它们的片段或衍生物组成的组。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述分子选自由下列各项组成的组: 具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的精确中性质量和在图 13-21 中任一附图中所示的 LC-MS/MS 片段模式的分子或其片段或衍生物。

22. 权利要求 21 的方法, 其中所述分子选自由具有下列分子式的分

子组成的组：C₂₈H₄₆O₄, C₂₈H₄₈O₄, C₂₈H₅₀O₄, C₂₈H₄₈O₅, C₂₈H₅₀O₅, C₂₈H₅₂O₅, C₃₂H₅₈O₆, C₃₆H₆₄O₆ 和 C₃₆H₆₆O₆。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述分子是生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物的代谢衍生物。

24. 权利要求 22 的方法，其中所述分子通过液体层析-质谱(LC-MS)方法或直接注射三联-四极质谱方法进行分析。

25. 权利要求 24 的方法，其中测量每一种所述分子的强度转换和内标的强度转换。

26. 权利要求 25 的方法，其中患者得分通过为所述患者确定所述分子中的最低平均-标准化的 log(2)转换比例而产生。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述患者得分与从正常个体产生的患者得分比较，由此诊断 CRC 或 OC 的存在或不存在，或者发展 CRC 或 OC 的危险。

28. 鉴定和诊断将从抗氧化剂治疗受益的个体的方法，其包括步骤：

获得来自所述测试受试者的血液样品；

分析所述血液样品，以获得关于生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢衍生物的全体或子集的定量数据；

将在所述测试受试者中关于所述分子获得的定量数据与从多名 CRC-或 OC-阴性的人的分析获得的参考数据进行比较；并且

应用所述比较来确定所述测试受试者将受益于所述治疗的可能性。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢衍生物选自由表 3 列出的代谢物或其片段或衍生物组成的组。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢衍生物选自具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711, 和 594.4851 的精确中性质量（以道尔顿测量）的代谢物或其片段或衍生物组成的组，其中 +/- 5 ppm 的差别将指示相同的代谢物。

31. 权利要求 30 的方法, 其中所述生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢衍生物选自由下列各项组成的组: 具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的精确中性质量和在图 13-21 中任一附图中所示的 LC-MS/MS 片段模式的代谢物或其片段或衍生物。

32. 权利要求 31 的方法, 其中所述生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢衍生物选自由具有下列分子式的代谢物组成的组: $C_{28}H_{46}O_4$, $C_{28}H_{48}O_4$, $C_{28}H_{50}O_4$, $C_{28}H_{48}O_5$, $C_{28}H_{50}O_5$, $C_{28}H_{52}O_5$, $C_{32}H_{58}O_6$, $C_{36}H_{64}O_6$ 和 $C_{36}H_{66}O_6$ 。

33. 诊断应答于被设计用于预防、治愈、或稳定 CRC 或 OC 或改善与 CRC 或 OC 相关的症状的饮食、化学、或生物学治疗策略的个体的方法, 其包括步骤:

通过单次收集或随时间的多次收集从所述测试受试者获得一份或多份血液样品;

分析所述生物样品, 以获得关于生育酚、生育三烯酚、维生素 E 样分子、或所述代谢物种类的代谢衍生物的全体或子集的定量数据;

将在所述测试受试者样品中关于所述分子获得的定量数据与来自多名 CRC-或 OC-阴性的人的所述分子而获得的参考数据进行比较; 并且

应用所述比较来确定所述测试受试者的代谢状态是否在所述治疗策略过程中得到改善。

34. 权利要求 33 的方法, 其中所述生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢衍生物选自由表 3 列出的代谢物或其片段或衍生物组成的组。

35. 权利要求 34 的方法, 其中所述生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢物衍生物选自具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711, 和 594.4851 的精确中性质量 (以道尔顿测量) 的代谢物或其片段或衍生物组成的组, 其中 ± 5 ppm 的差别将指示相同的代谢物。

36. 权利要求 35 的方法, 其中所述生育酚、生育三烯酚、维生素 E-

相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢衍生物选自由下列各项组成的组：
具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661,
468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的精确中性质量
和在图 13-21 中任一附图中所示的 LC-MS/MS 片段模式的代谢物或其片段
或衍生物。

37. 权利要求 36 的方法, 其中所述生育酚、生育三烯酚、维生素 E-
相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢衍生物选自由具有下列分子式的
代谢物组成的组: $C_{28}H_{46}O_4$, $C_{28}H_{48}O_4$, $C_{28}H_{50}O_4$, $C_{28}H_{48}O_5$,
 $C_{28}H_{50}O_5$, $C_{28}H_{52}O_5$, $C_{32}H_{58}O_6$, $C_{36}H_{64}O_6$ 和 $C_{36}H_{66}O_6$ 。

通过测量维生素 E-相关的代谢物诊断结肠直肠癌和卵巢癌的方法

发明领域

本发明涉及结肠直肠癌和卵巢癌（分别为 CRC 和 OC）的诊断。本发明描述内源小分子和 CRC 或 OC 之间的关系。具体地，本发明涉及通过测量维生素 E-相关的代谢物而诊断 CRC 和 OC。本发明还涉及在所述方法中鉴定的诊断标记。

发明背景

结肠直肠癌是世界上第三大最常见的恶性病，并且代表大约 10%的世界总癌症发生率[1]。由于世界范围人口的老龄化，CRC 代表一种严重的公众健康问题，其需要将这种疾病的影响减小到最低的新的措施。CRC 的存活机会与诊断时疾病的阶段非常相关（如在表 1 中显示；<http://www.alternative-cancer-treatments.com/colon-cancer-prognosis.htm>）；诊断越早，存活的可能性越大。例如，当在疾病时限末期诊断时（杜克阶段 D），存在小于 5%的 5 年存活的机会，而当在早期诊断时（杜克阶段 A），存在大于 90%的 5 年存活机会。因此，由于早期手术治疗的效用，CRC 患者将极大地受益于早期检测。

目前，CRC 的危险因子尚未得到充分的理解。事实上，除了日常饮食之外，对于所述疾病几乎没有确定具体的危险因子。炎性肠病和家族性腺瘤息肉病(FAP)增加危险，但是只占总的 CRC 发生率的很小部分。由于在移民和他们的后代中的发生率上升很快，达到东道国的发生率，所以种族和人种差异，以及移民研究，表明环境因素在疾病病因学中起作用[2, 3]。总之，低于 15%的 CRC 病例是家族性的，这表明日常饮食、环境和生活方式对所述疾病的病因有巨大的影响。

目前最常见的 CRC 筛查检测为：1) 大便潜印血检测(fecal occult blood test) (FOBT)，其基于这样的假设，即，癌症应该出血，并且因此可以使

用化学或免疫学检测在大便中检测到；和 2) 鉴定肥胖异常（gross abnormalities）的侵入性方法。FOBT 是用于 CRC 的最广泛的检测，并且包括血红蛋白中血红素的过氧化酶样活性的初步检测。然而，由于不是所有的腺瘤和 CRCs 都出血的事实，所以所述检测的灵敏性只有大约 50%，对于腺瘤有 20%灵敏性[2]。

鉴定肥胖异常的方法可以包括灵活的乙状结肠镜检查 and 结肠镜检查，以及双重对比的钡灌肠和仿真结肠镜检查。结肠镜检查是用于具有阳性 FOBT 的患者的下一步检测，并且具有 80%的假阳性率，这对许多个体施加了不必要的风险和危险。结肠镜检查通常是用于筛查患有 CRC 病史或先前的腺瘤息肉病，或其它易患疾病诸如炎性肠病的超过 50 岁的平均和增加的危险的个体的优选方法。没有证据表明只使用结肠镜检查的筛查在平均-危险群体中减小发病率或死亡率[3]，然而，乙状结肠镜检查 and 包括上述技术组合的综合评估可以减小超过给定的时间长度的更高危险性个体中的预见的 CRC 率[4]。

尽管结肠镜检查仍然是存在或不存在的息肉病和 CRC 的标准检测，它可能未察觉 15%的直径>1 cm 的损伤[5]。使用结肠镜检查的并发症可能包括穿孔、出血、呼吸微弱、心律失常、和感染[6]。大约 1/1,000 的患者患有穿孔，和 3/1,000 的患者患有出血。在 10,000 例检测中有 1-3 例死亡是因为所述方法而发生[3]。其它缺点，诸如缺少经过训练的人员、患者不适、和高成本，将可能阻止所述结肠镜检查成为用于一般群体的常规 CRC 筛查方法（见表 2）。认为大部分偶发性 CRCs 是从良性腺瘤发展的，这些良性腺瘤中只有少量将不断发展成恶性瘤。假定从良性腺瘤到恶性瘤发展的时间阶段是 5 到 10 年，那么通过结肠镜检查/乙状结肠镜检查在一般群体中检测腺瘤将需要对患者进行明显的过度治疗，这是成本高的并且潜在有害的[7]。

计算机体层摄影结肠术(CTC)，或虚拟结肠镜检查，是用于结肠成像的最近的非侵入性技术，主要由于在患者制备物中和分析所用的硬件与元件的技术差别，在关于所述检测的性能特点上有显著不同的报道（特异性在 39%-94%之间）。CTC 的其它局限性包括高的假阳性读数，不能检测扁平腺瘤，没有去除息肉的能力，反复和累积的放射给药，和成本[6]。

随着我们理解 CRC 的分子病理学的进步，已经出现了一些基于大便样品 DNA 分析的新筛查方法。这些是用于鉴定已知发生在腺瘤-到-癌症序列中或发生在家族 CRC 中的突变的典型的基于 PCR 的检测。常规筛选的基因突变包括 *KRAS*, *TP53*, *APC*, 以及检测微卫星不稳定性 and 高度甲基化的 DNA。表 2, 由 Davies 等重现[7], 比较了目前用于 CRC 的筛查方法。

上述所有方法都典型地只能检测腺瘤形成后的 CRC, 并且通常不理想地适用于大规模群体筛查。上述检测中没有一种提供 CRC-阳性或阴性促进环境的定量评估。上述检测的任一种都没有提供 CRC 对于正常人生物化学和相关健康状态的作用的定量评估。基于基因组的检测是否将导致对于偶发性 CRC 的高诊断准确率尚待观察。Davies 等[7]概括了用于 CRC 的理想的筛查检测的特点, 如下: 1) 成本低; 2) 实行简单; 3) 非侵入性; 4) 描述整个结肠; 5) 明确的结果解释(即, 高灵敏性, 特异性, 阳性预测值, 和阴性预测值); 6) 容易教导; 和 7) 容易保持质量控制。

由于能够检测特异性代谢物的检测的开发相对简单并且每次检测成本低, 所以基于血清中的小分子或代谢物的诊断检测满足上述标准。所述检测将是最低程度侵入性的, 并且将是疾病状态的指征而不管结肠的临近性。将所述方法转换成与当前临床化学实验室硬件相容的临床检测将是商业可接受的和有效的, 并且将导致快速的世界范围内的应用。此外, 将消除对操作和解释检测的高度训练过的人员的需要。

在人血清中的 CRC-特异性生物标记, 其可以提供 CRC 存在的评估, CRC-促进或抑制性环境的评估, CRC 生理负担的评估, 或这些特点的组合的评估, 将极大地有利于 CRC 危险、预防和治疗的管理。由于它将是最低程度侵入性的, 并且可能在采用常规筛查方法之前或者与常规筛查方法组合用于监测个体对疾病的敏感性, 所以设计成检测这些生物标记的检测将被一般群体广泛接受。

卵巢癌是在妇女中癌症死亡的第五最重要的原因[8]。据估计今年将诊断超过 22,000 例新卵巢癌病例, 只在美国就预计有 16,210 例死亡[9]。典型地, 直到患者已经达到第 III 或 IV 阶段卵巢癌才能被鉴定, 并且具有低的预后 (5 年存活大约 25-30%) [10]。目前用于卵巢癌的筛查方法包括双手骨盆检查、透过阴道的超声检查和血清 CA125 检测的结合[9]。由于缺

少所述筛查减小死亡率的证据,并且它没有详细检查与假阳性结果相关的危险,所以这种用于卵巢癌的筛查方法的功效目前益处是未知的[8, 11]。按照美国癌症协会(American Cancer Society), CA125 检测和透过阴道的超声检查不是卵巢癌的可靠的筛查或诊断检测,并且当前唯一用于进行精确诊断的方法是外科手术(<http://www.cancer.org>)。

CA125, 癌症抗原-125, 是一种高分子量黏蛋白, 与正常细胞相比, 已经发现其在大部分卵巢癌细胞中升高[9]。高于 30-35U/ml 的 CA125 检测结果被典型地接受为处于升高的水平[9]。由于定义升高的 CA125 的不同的阈值, 检测的患者组的变化的大小, 和患者年龄与种族的广泛范围, 很难确定用于卵巢癌的 CA125 筛查的精确性、灵敏性和特异性[8]。按照约翰霍普金斯大学的病理学网页, CA125 检测只在约 50% 的第 I 阶段患者中, 和在约 80% 的第 II、III 和 IV 阶段中获得准确的卵巢癌阳性结果(<http://pathology2.jhu.edu>)。已经报道子宫内膜异位、良性卵巢囊肿、盆腔炎病以及甚至怀孕的第一个三个月增加 CA125 的血清水平[11]。美国全国卫生研究所网页陈述 CA-125 不是卵巢癌的有效通用筛查检测。他们报道在 100 名具有升高的 CA125 水平的健康妇女中只有大约 3 名真正发现患有卵巢癌, 并且约 20% 的诊断为卵巢癌的患者实际上具有升高的 CA125 水平(<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/007217.htm>)。

因此, 由于所述检测是非侵入性的, 并且可以用于在常规方法之前或与常规方法结合监测个体对疾病的敏感性, 所以, 鉴定在人血清中的高度特异性和灵敏性的卵巢癌生物标记将是极其有益的。血清检测是最低程度侵入性的, 并且将被一般群体广泛接受。

发明概述

在本发明的一个实施方案中, 提供鉴定用于诊断 CRC 和 OC 的代谢物标记的方法, 其包括步骤: 将来自表现出所述疾病状态的患者的样品, 所述样品含有多种未鉴定的代谢物, 引入到高分辨率质谱仪中, 例如, 傅里叶变换离子回旋加速共振质谱仪(Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer (FTMS)); 获得、鉴定并且定量关于所述代谢物的数据; 生成所述鉴定和定量的数据的数据库; 将来自所述样品的鉴定

和定量数据与来自对照样品的相应的数据进行比较；鉴定有差别的一种或多种代谢物；并且选择最佳诊断所需要的最少数目的代谢物标记。

在本发明的另一个实施方案中，提供用于研发诊断生物体的健康状态的代谢物生物标记检测的方法，其包括：获得来自多种健康状态的生物体的生物样品；将所述生物样品引入到高分辨率/精确质量质谱仪中，以获得关于在所述生物样品中包含的代谢物的鉴定和定量数据，从而找到在多种健康状态之间在强度上不同的代谢物；应用多变量统计学鉴定区分所述健康状态必需的最小的生物标记组；应用独立的 MS 方法验证这些生物标记；并且产生用于检测被鉴定和验证的生物标记目标性高通量方法。

在本发明的另一个实施方案中，提供鉴定结肠直肠癌-特异性代谢标记的方法，其包括步骤：将来自诊断患有结肠直肠/卵巢癌的患者样品，所述样品包含多种未鉴定的代谢物，引入到傅里叶变换离子回旋加速共振质谱仪(FTMS)中；获得关于所述代谢物的鉴定和定量数据；生成所述鉴定和定量数据的数据库；将来自所述样品的鉴定和定量数据与来自对照样品的相应的数据进行比较；鉴定有不同的一种或多种代谢物；其中所述代谢物选自由在表 3 中所示的一种或多种代谢物、或其片段或衍生物组成的组。

在本发明的另一个实施方案中，提供鉴定结肠直肠癌-特异性代谢标记的方法，其包括步骤：将来自诊断患有结肠直肠/卵巢癌的患者样品，所述样品包含多种未鉴定的代谢物，引入到傅里叶变换离子回旋加速共振质谱仪(FTMS)中；获得关于所述代谢物的鉴定和定量数据；生成所述鉴定和定量数据的数据库；将来自所述样品的鉴定和定量数据与来自对照样品的相应的数据进行比较；鉴定有不同的一种或多种代谢物；其中所述代谢物选自由下列各项组成的组：具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的中性精确质量和在图 13-21 中任一附图中所示的 LC-MS/MS 片段模式的代谢物或其片段或衍生物；并且选择最佳诊断所需的最小数目的代谢物标记。

在本发明的另一个实施方案中，提供鉴定卵巢癌-特异性代谢标记的方法，其包括步骤：将来自诊断患有结肠直肠/卵巢癌的患者样品，所

述样品包含多种未鉴定的代谢物，引入到傅里叶变换离子回旋加速共振质谱仪(FTMS)中；获得关于所述代谢物的鉴定和定量数据；生成所述鉴定和定量数据的数据库；将来自所述样品的鉴定和定量数据与来自对照样品的相应的数据进行比较；鉴定有不同于一种或多种代谢物；其中所述代谢物选自由下列各项组成的组：具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的精确中性质量 (neutral mass) 和在图 13-21 中任一附图中所示的 LC-MS/MS 片段模式的代谢物或其片段或衍生物；并且选择最佳诊断所需的最小数目的代谢物标记。

在本发明的一个实施方案中，提供 CRC/OC 癌症-特异性代谢物标记，其选自在表 3 中列出的代谢物或其片段或衍生物。

在本发明的一个实施方案中，提供 CRC/OC 癌症-特异性代谢物标记，其选自由下列各项组成的组：具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的精确中性质量（以道尔顿测量）的代谢物，或其片段或衍生物，其中 +/- 5 ppm 的差别将指示相同的代谢物。

在本发明的另一个实施方案中，提供结肠直肠/卵巢癌-特异性代谢物标记，其选自由下列各项组成的组：具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的以道尔顿测量的精确中性质量和在图 13-21 中任一附图中所示的 LC-MS/MS 片段模式的代谢物或其片段或衍生物。

在本发明的另一个实施方案中，提供结肠直肠/卵巢癌-特异性代谢物标记，其选自由具有下列分子式的代谢物组成的组：C₂₈H₄₆O₄, C₂₈H₄₈O₄, C₂₈H₅₀O₄, C₂₈H₄₈O₅, C₂₈H₅₀O₅, C₂₈H₅₂O₅, C₃₂H₅₈O₆, C₃₆H₆₄O₆ 和 C₃₆H₆₆O₆。

在本发明的另一个方面，提供诊断患者存在结肠直肠或卵巢癌或者处于发展 CRC 或 OC 的危险中的方法，其包括步骤：筛查来自所述患者的样品存在或不存在一种或多种代谢物标记，所述代谢物标记选自在表 3 列出的代谢物或其片段或衍生物组成的组，其中在一种或多种所述代谢物标记强度中的差别指示 CRC 或 OC 的存在。

在本发明这一方面的另一个实施方案中，提供诊断患者存在结肠直肠癌或卵巢癌的方法，其包括步骤：筛查来自所述患者的样品存在或不存在一种或多种代谢物标记，所述代谢物标记选自由具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的精确中性质量的代谢物组成的组；其中一种或多种所述代谢物标记的不存在指示 CRC 或 OC 的存在。

在本发明的另一个实施方案中，提供诊断在未知疾病状态的测试受试者中存在或不存在 CRC 或 OC 的方法，其包括：从所述测试受试者获得血液样品；分析所述血液样品，以获得关于选自由下列各项组成的组的分子的定量数据：鉴定为中性精确质量 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711 和 594.4851 的分子，或具有基本上等于这些分子的质量的分子或其片段或衍生物；将在所述测试受试者中关于所述分子获得的定量数据，与从来自多名 CRC 或 OC-阳性的人的所述分子获得的定量数据或从多名 CRC 或 OC-阴性的人获得的定量数据进行比较；并且应用所述比较，来确定所述测试受试者是 CRC/OC 阳性或阴性的概率。

本发明还公开维生素 E 样代谢物的鉴定，所述维生素 E 样代谢物在 CRC-和 OC-阳性患者的血清中相对健康对照差异性地表达。这种公开的差异性表达是 CRC 和 OC 特异性的。

在本发明的一个实施方案中，应用选自由维生素 E 样代谢物组成的组的代谢物最佳子集研发的血清检测，可以用来诊断 CRC/OC 的存在、或者 CRC 或 OC-促进或抑制环境的存在。

在本发明的另一个实施方案中，应用选自由维生素 E 样代谢物组成的组的代谢物最佳子集研发的血清检测，可以用来诊断由诊断患有 CRC 的患者的治疗作用而导致的 CRC 健康状态。治疗可以包括化学治疗、手术、放射治疗、生物治疗、或其它治疗。

在本发明的另一个实施方案中，应用选自由维生素 E 样代谢物组成的组的代谢物最佳子集研发的血清检测，可以用来纵向监测处于 CRC 治疗的患者的 CRC 状态，以确定用于所述患者的适当的剂量或特别的治疗。

本发明还公开其中的芳香环结构被还原的 γ -生育酚/生育三烯酚

(tocotrienol) 代谢物的鉴定, 所述其中的芳香环结构被还原的 γ -生育酚/生育三烯酚代谢物相对于健康对照在 CRC-和 OC-阳性患者的血清中差异性表达。所述公开的差异性表达是 CRC 和 OC 特异性的。

本发明公开在人血清中存在这样的 γ -生育酚/生育三烯酚代谢物, 即, 其中存在附着到含有羟基苯并二氢吡喃结构的 -OC₂H₅, -OC₄H₉, 或 -OC₈H₁₇ 部分。

本发明还公开 α -生育酚代谢物的鉴定, 其相对于健康对照在 CRC-阳性患者的血清中差异性地表达。所述公开的差异性表达是 CRC 特异性的。

在本发明的另一个实施方案中, 提供鉴定和诊断将受益于抗氧化剂治疗的个体的方法, 其包括: 从所述测试受试者获得血液样品; 分析所述血液样品, 以获得关于生育酚、生育三烯酚、维生素 E-相关的代谢物或所述代谢物种类的代谢衍生物的全体或子集的定量数据; 将在所述测试受试者中关于所述分子获得的定量数据与从多名 CRC-或 OC-阴性的人的分析获得的参考数据进行比较; 并且应用所述比较来确定所述测试受试者将受益于所述治疗的概率。

在本发明的另一个实施方案中, 提供确定受试者处于发展 OC 或 CRC 的危险的概率的方法, 其包括: 获得来自无 CRC 或 OC 症状的受试者的血液样品; 分析所述血液样品, 以获得关于生育酚、生育三烯酚、或所述代谢物种类的代谢衍生物的全体或子集的定量数据; 将在所述测试受试者中获得的关于所述分子的定量数据与从多名 CRC-或 OC-阴性的人的分析获得的参考数据进行比较; 应用所述比较来确定所述测试受试者处于发展 OC 或 CRC 的危险的概率。

在本发明的另一个实施方案中, 提供诊断这样的个体的方法, 即, 所述个体应答设定预防、治愈或稳定 CRC 或 OC 或者改善与 CRC 或 OC 相关的症状的日常饮食、化学或生物治疗策略, 所述方法包括: 通过单次收集或随时间的多次收集从所述测试受试者获得一份或多份血液样品; 分析所述生物样品, 以获得关于生育酚、生育三烯酚、维生素 E 样分子、或所述代谢物种类的代谢衍生物的全体或子集的定量数据; 将在所述测试受试者样品中关于所述分子获得的定量数据与从来自多名 CRC-或 OC-阴性的人的所述分子而获得的参考数据进行比较; 并且应用所述比较来确定所述

测试受试者的代谢状态是否在所述治疗策略过程中得到改善。

在本发明的另一个实施方案中，提供鉴定缺乏维生素 E 和相关代谢物的细胞吸收或转运的个体的方法，其通过使用各种策略分析血清或组织而进行，所述各种策略包括，但不限于：放射性标记追踪研究，维生素 E 转运蛋白的基因表达或蛋白表达分析，维生素 E 转运蛋白中基因组异常或突变的分析，维生素 E 转运蛋白水平的体内或先体外后体内成像，维生素 E 转运蛋白的基于抗体的检测（酶联免疫吸附测定，ELISA）。

本发明的这一概述不必描述本发明的所有特点。

附图简述

本发明的这些和其它特点将从下述描述中变得更加明显，其中对附图进行参考，其中：

图 1 显示按照本发明的一个实施方案鉴定 CRC/OC 诊断生物标记组包括的步骤的总结。

图 2 显示微点阵分析(PAM)训练误差 (training error) (图 2A) 和横向验证错分类误差 (图 2B) 图的预测。

图 3 显示基于在图 2 中产生的分类法(classifier)对于所有样品的 PAM 输出横向-验证的诊断概率。

图 4 显示基于横向-验证的概率的接收-操作者特征性曲线。

图 5 显示当一半样品用于训练和另一半用作不知情检测组时的不知情检测样品的诊断预测。

图 6 显示基于不知情检测组诊断的预测结果 (图 6A) 和接收-操作者特征曲线 (图 6B)。

图 7 显示关于六种选择的生物标记的原始 FTMS 光谱 (显示 FTMS 中性质量; 图 7A-7F)。顶部组, 5 种正常样品; 底部组, 5 种 CRC-阳性样品。

图 8 显示 6 种生物标记的 QSTAR 提取的离子层析 (显示指定的检测质量; 图 8A-8F)。顶部组, 5 种正常样品; 底部组, 5 种 CRC-阳性样品。

图 9 显示关于滞留时间窗口的平均提取质谱; 当在 QSTAR 上检测时对于 5 种正常的 (图 9A) 和 5 种 CRC (图 9B) 血清样品为 16-17 分钟,

和净差异 (图 9C)。

图 10 显示 5 种 CRC 和 5 种正常样品通过 FTMS (图 10A)和 Q-star (图 10B)分析的平均 CRC 生物标记强度。对于每种生物标记, 第一列是 CRC-阳性的; 对于每种生物标记, 正常的显示在第二列。

图 11 显示在 FTMS 数据中检测的为维生素 E 样家族的部分的 30 种代谢物的图表。这些可以依据它们包含的碳数目分成组。还显示 γ (GT)和 α 生育酚(AT)的强度。

图 12 显示通过 MSMS 和 NMR 确定的 γ 生育酚和生育三烯酚(图 12A 和 12B) 以及 6 种含有 C28-维生素 E 样分子 (图 12C-12H) 的结构。

图 13 显示中性质量生物标记 448.3726 ($C_{28}H_{48}O_4$)的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

图 14 显示中性质量生物标记 464.3522 ($C_{28}H_{48}O_5$)的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

图 15 显示中性质量生物标记 446.3522 ($C_{28}H_{46}O_4$)的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

图 16 显示中性质量生物标记 466.3661 ($C_{28}H_{50}O_5$)的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

图 17 显示中性质量生物标记 450.3726 ($C_{28}H_{50}O_4$)的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

图 18 显示中性质量生物标记 468.3840 ($C_{28}H_{52}O_5$)的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

图 19 显示中性质量生物标记 538.4259 ($C_{32}H_{58}O_6$)的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

图 20 显示中性质量生物标记 592.4711 ($C_{36}H_{64}O_6$)的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

图 21 显示中性质量生物标记 594.4851 ($C_{36}H_{66}O_6$)的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

图 22 显示 448.3406 ($C_{28}H_{48}O_4$)的 1H -NMR 光谱。

图 23 显示 464.3522 ($C_{28}H_{48}O_5$)的 1H -NMR 分析。

图 24 显示 446.3406 ($C_{28}H_{46}O_4$)的 1H -NMR 分析。

图 25 显示 466.3661 (C₂₈H₅₀O₅)的 ¹H-NMR 分析。

图 26 显示 MS/MS 高通量筛查方法的概括。

图 27 显示 6 种 CRC 生物标记转换和内标转换 (图 27A-27F)、和持家转换 (图 27G) 的分析屏幕截图。每一页显示两种生物标记在典型的“正常”和典型的“CRC 阳性”个体中的转换的峰面积。顶部 4 幅图来自正常的, 底部 4 幅图来自 CRC 阳性的。BM: 生物标记, IS: 内标。

图 28 显示基于 288 例没有疾病的个体的最终 HTS 输出的正常群体分布。-1.3 显示截点值, 其选择作为低于其认为人有 CRC 高危险的点 (见图 29)。

图 29 显示 HTS 诊断输出。选择基于正常受试者分布的截点比例, 如在图 28 中所示, 以获得 90.5% 的特异性。这意味着得分在 -4 和 -1.3 之间的患者有高 CRC 危险, 得分在 -1.3 和 -0.8 之间的患者有中等的危险, 和得分大于 -0.8 的患者有低危险。显示推荐的作用过程。

图 30 显示脂质过氧化反应的 γ -生育酚/生育三烯酚中和。本图显示不饱和脂肪酸的自动氧化 (图 30A), γ -生育酚对过氧化氢自由基的稳定 (图 30B), γ -生育酚自由基对过氧化氢自由基的反应 (图 30C) 和由 γ -生育酚形成的两种半稳定过氧化物 (图 30D)。

图 31 显示在铁存在下 γ -生育酚过氧化物的内部降解。图 31A 显示从亚麻酸产生的 C₃₀ 系列生育酚代谢物。图 31B 显示从亚油酸产生的 C₃₂ 系列生育酚代谢物。图 31C 显示从油酸产生的 C₃₆ 系列生育酚代谢物。

图 32 显示在铁存在下氢过氧化物的降解。

图 33 显示自由基的自发降解。图 33A 显示短链烷烃自由基和长链醛, 其由在虚线“A”所示的键处的降解产生, 和图 33B 显示短链醛和长链烷烃自由基, 其将由在键“B” (虚线 B) 处的自发降解产生。

图 34 显示 γ -生育酚可以中和游离的烷烃自由基。 γ -生育酚/生育三烯酚的不受阻碍的芳香环结构可以接受来自烷烃自由基的氢自由基, 形成稳定环的生育酚/生育三烯酚自由基和稳定的烯烃 (图 34A)。这种氢自由基接受反应可以发生 4 次, 将环结构还原成单一的双键 (图 34B)。

图 35 显示由肝 P450 代谢导致的 ω 羧化作用。

图 36 显示关于维生素 E 及相关的代谢物在正常状态 (图 36A) 和在

CRC 与 OC（图 36B）中的作用的假说。

发明详述

本发明涉及结肠直肠癌和卵巢癌（分别为 CRC 和 OC）的诊断。本发明描述内源小分子和 CRC 或 OC 之间的关系。具体地，本发明涉及通过检测维生素 E 同种型和相关的代谢物而诊断 CRC 和 OC。更具体地，本发明涉及在人血清中的维生素 E-相关的代谢物和它们参与 CRC 和 OC 之间的关系。

本发明第一次公开特异性与 CRC 相关的清楚而明确的生物化学变化。这些发现还意味着这些生物标记的检测可能提供检测 CRC 治疗功效的通用方式。由于可以应用简单的生化检测来评估新治疗的可行性（viability），所以这将显著降低进行临床试验的成本。此外，将不必等到肿瘤发展或等到患者死亡才能确定所述治疗是否提供了任何益处。这样的检测的应用将使得研究者能够在数月内而不是数年内确定剂量、制剂和 CRC 治疗的化学结构修饰的功效。

本发明涉及诊断 CRC 或 OC 的方法，其通过检测存在于人血清中的特异性小分子的水平并且将它们与“正常”参考水平进行比较而进行。在本申请的一个实施方案中，描述一种用于 CRC 或 OC 的早期检测和诊断以及监测对 CRC 和 OC 的治疗的效果的新颖方法。

优选的方法包括应用从选自表 3 的代谢物子集研发的高通量筛查 (HTS) 检测，用于诊断一种或多种疾病或具体的健康-状态。通过研发能够诊断 CRC-阳性健康-状态的 HTS 检测而证明并且验证本申请方法的用途。

由于确实地每个人可以在它们的一生中纵向进行筛查，以评估危险并且早些检测这些疾病，所以这样的检测对 CRC 和 OC 的作用将是巨大的。假定所述检测的性能特点代表普通 CRC 群体，那么这种检测单独可以优于任何其它目前可用的 CRC 筛查方法，原因在于它可以具有在常规方法可以检测到之前检测到疾病进展的潜力。疾病的早期检测对阳性治疗结果很关键。

为了确定在特定群体中是否存在给定健康-状态的生化标记，将需要一组代表健康状态（即，特定的疾病）的患者和一组“正常的”副本。然

后可以将处于特定健康-状态类别的患者采取的生物样品与从正常群体采取的相同样品进行比较，以鉴定在这两组之间的差异，其通过使用各种分析平台，包括但不限于，傅里叶变换离子回旋加速共振质谱仪(FTMS)和液相色谱质谱仪(LC-MS)，提取样品并且分析而进行。所述生物样品可以来源于机体内的任何部位，包括，但不限于，血液（血清/血浆）、脑脊液(CSF)、尿、大便、呼吸气、唾液或任何实体组织的活组织切片，所述实体组织包括肿瘤、临近的正常部位、平滑肌和骨骼肌、脂肪组织、肝、皮肤、头发、肾、胰腺、肺、结肠、胃或其它。

对于所述的 CRC 诊断检测的方法，血清样品获自健康的 CRC-和 OC-阴性个体和专业诊断为 CRC-阳性患者的代表性群体。贯穿整个本申请，将使用术语“血清”，但是对于本领域的技术人员应该清楚，血浆、全血或全血的亚级分可以用于本方法中。

当血液样品从患者提取时，存在可以处理所述样品的一些方法。处理的范围可以如不作处理那样少（即，冷冻全血）或者如分离特别的细胞类型那样复杂。这种最常见和常规的方法包括从全血制备血清或血浆。本发明也考虑所有的血液样品处理方法，包括将血液样品点样到固相支持物上，诸如滤纸或其它固定的材料上。

然后进一步处理上述处理的血液样品，以使得其与用于检测和测量包含在所述处理的血液样品（在本情形中，血清样品）中的生化剂的解析性分析技术相兼容。处理的类型可以从如没有进一步处理那样少到如差别萃取和化学衍生那样复杂。萃取方法包括，但不限于，超声、soxhlet 萃取、微波辅助的萃取(MAE)、超临界流体萃取(SFE)、加速溶剂萃取(ASE)、加压液体萃取(PLE)、加压热水萃取(PHWE)、和/或在普通溶剂中的表面活性剂-辅助的萃取，所述普通溶剂诸如甲醇、乙醇、醇和水的混合物、或有机溶剂，诸如乙酸乙酯或己烷。萃取用于 FTMS 非目标性分析的代谢物的优选方法是进行液体/液体萃取，其中非极性代谢物溶解在有机溶剂中，且极性代谢物溶解在水性溶剂中。在本发明的一个实施方案中，通过超声和用力搅拌（漩涡搅拌）而将血清样品中包含的代谢物分离成极性和非极性的萃取物。

通过直接注射或在层析分离之后，生物样品的提取物适合在基本上任

何质谱仪平台上进行分析。典型的质谱仪由使样品内分子离子化的能源 (source) 和检测所离子化的颗粒的检测器组成。常规能源的实例包括电子碰撞, 电雾化电离(ESI), 大气压化学电离 (APCI), 基质辅助的激光解吸附电离 (MALDI), 表面增强的激光解吸附电离 (SELDI), 和它们的衍生物。常规离子检测器可以包括基于四极的系统、飞行时间(TOF)、磁性部分、离子回旋加速器和它们的衍生物。

按照本发明, 通过已知为无目标性分析的方法鉴定小分子。无目标性分析包括尽可能多地检测样品中的分子, 在分析之前没有任何已有的关于成分的认识或选择 (参见 WO 01/57518, 其于 2001 年 8 月 9 号公布)。因此, 相对于检测预先确定的分子列表的目标性方法, 无目标性分析发现新的代谢物生物标记的潜力更高。本发明应用无目标性方法来鉴定在 CRC-阳性和健康个体之间不同的代谢物成分, 然后研发关于从所述无目标性分析中鉴定的代谢物子集的高通量目标性检测。然而, 本领域的技术人员应该清楚, 其它代谢物剖析策略可以潜在地用来发现本申请中公开的一些或全部差别调控的代谢物, 并且本文所述的代谢物, 不管是发现的还是检测的, 代表不依赖于可以用于检测并且测量它们的解析性技术的独特的化学实体。

按照这种分析, 可以鉴定数百种在 CRC-阳性血清和正常血清之间有差别性丰度的小分子、代谢物或代谢物片段。本发明公开 480 种代谢物质量, 如在表 3 中所列出, 发现它们在 CRC-阳性血清和正常血清之间有统计学显著的差别性丰度。在两种群体之间统计学差异的所有这些特点具有潜在的诊断用途。然而, 将 480 种信号结合到商业诊断检测中是不切实际的, 因此进行选择最适宜的标记或代谢物诊断组的公知方法。

从在本专利中所述的方法, 选择一组 9 种代谢物作为区分 CRCs 和正常的最适合代谢物。在本发明中, 鉴定了直肠结肠癌-特异性的代谢物标记, 其选自由具有或基本上等于 446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711, 和 594.4851 的精确中性质量 (以道尔顿测量) 的代谢物组成的组, 其中 +/- 5 ppm 的差别将指示相同的代谢物。因此, 这些标记可以用于诊断检测, 以筛查患者存在 CRC。

在上述 9 种代谢物中, 进一步选择 6 种用于高通量筛查(HTS)检测中。

所述 HTS 检测基于常规三联-四极质谱技术（概述参见图 26）。HTS 检测通过将血清提取物直接注射到三联-四极质谱仪中而工作，然后所述三联-四极质谱仪通过单一离子监测(SIM)而单独分离所述 6 种亲本分子中的每一种。这之后使用惰性气体（叫作碰撞气体，综合参考诱导碰撞的解离或 CID）将每种分子断裂。然后通过叫作多反应监测(MRM)的方法，检测并记录来自每种亲本生物标记的特异性片段的强度。另外，内标分子也添加到每种样品中，并且也经受断裂。如果方法和使用仪器操作正确，那么这种内标片段应该在每种样品中具有相同的强度。当收集所有 6 种生物标记片段的强度，以及内标片段的强度时，计算生物标记与 IS 片段的比例，并且将所述比例进行对数转换。然后，将关于每种患者样品的六种生物标记中的最低值与先前确定的疾病-阳性和对照的分布进行比较，从而确定该人对于所述疾病是阳性还是阴性的相对概率。

取决于要检测的分子，存在多种类型的当前可用的低成本检测平台选择。这些可以包括比色化学检测(UV, 或其它波长)，基于抗体的酶联免疫吸附测定(ELISAs)，基于芯片和聚合酶链式反应的核酸检测测定，基于珠子的核酸检测方法，测量尺化学检测（dipstick chemical assays），成像分析诸如 MRI、petscan、CT 扫描和各种基于质谱的系统。

按照本发明的这一方面，提供使用在前部分中鉴定的 MS/MS 断裂模式筛查 CRC 患者的商业方法的研发。对于世界范围内应用所述检测存在无数选择。最明显的两种为：1. 研发与当前实验室使用仪器和已经在全世界的许多实验室中就位的三联-四极质谱仪相兼容的 MS/MS 方法，和/或 2. 建立检测设施，在那里可以在一个位置装运并且分析样品，并且将结果寄回给患者或患者的医生。

在一系列物理和化学性质研究后，确定所选代谢物的结构说明。例如，通常用于这种鉴定的主要特征是精确质量和分子式确定，极性，酸/碱性，NMR 光谱，和 MS/MS 或 MS_n 光谱。使用本发明的代谢物的性质的说明，可以鉴定参与疾病发展的一种或多种代谢途径。

基于它们的精确中性质量、极性和电离特征，9 种优选的诊断标记（446.3406, 448.3563, 450.3726, 464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711, 和 594.4851）的分子式确定为 C₂₈H₄₆O₄, C₂₈H₄₈O₄,

C28H50O4, C28H48O5, C28H50O5, C28H52O5, C32H58O6, C36H64O6, C36H66O6。按照本发明, 已经确定这些代谢物由半饱和苯并二氢吡喃环和植基侧链组成, 并且因此与维生素 E-相关的结构一致。

已经进行了关于维生素 E 在体外和 CRC 动物模型的作用的有意义的研究, 而关于维生素 E 和 OC 进行了非常少的研究。早在 1980 年, Cook 和 McNamara [12]表明维生素 E 在小鼠中对化学诱导的结肠癌的保护作用。然而, 人类研究没能提供维生素 E 在 CRC 的预防、引发、治疗或支持性治疗的任一种中起显著作用的任何令人信服的证据。Coulter 等表明在 38 次研究中, α -生育酚治疗对任何单个癌症没有显著作用, 并且汇集的单一相对危险为 0.91 (95% CI: 0.74m 1.12)[13]。

术语“维生素 E”笼统指 8 种天然存在的同种型, 4 种生育酚 (α , β , γ 和 δ) 和 4 种生育三烯酚 (α , β , γ 和 δ)。在西方日常饮食中发现的主要形式为 γ -生育酚, 而在人血清/血浆中发现的主要形式是 α -生育酚。生育三烯酚也存在于日常饮食中, 但是更多集中在粮食谷物和某些蔬菜油诸如棕榈和稻麸油中。有趣地, 表明在预防心血管疾病和癌症中生育三烯酚可能比生育酚更有潜力[14]。这可能归因于生育三烯酚在脂膜内增加的分布, 更强的与自由基相互作用的能力, 和比生育酚副本更快地快速再循环的能力[15]。已经证明, 在大鼠肝脏微粒体中, α -生育三烯酚保护抗铁-介导的脂质过氧化反应的功效高于 α -生育酚的功效 40 倍[15]。然而, 在人血浆中的检测表明, 可能由于导致优先的 biliary 排泄的更高的亲脂性, 三烯甘油酯要么没有检测到要么以微小的浓度存在[16]。

关于这些同种型已经进行了相当多量的关于 α 和 γ 生育酚分布之间的差异的研究。早在 1974 年就已知并且报道 γ -和 α -生育酚具有相似的肠吸收, 但是具有显著不同的血浆浓度[18]。在 Bieri 和 Evarts 研究中[18], 将大鼠耗尽维生素 E 10 天, 然后喂给含有 0.5 的 α : γ 比例的日常饮食 14 天。在第 14 天, 观察到血浆 α : γ 比例为 5.5! 作者将这归因于 γ -生育酚的显著更高的转换, 然而, 这种增加的转换的起因未知。据信生育酚的血浆浓度受到肝生育酚结合蛋白的紧密调控。已经表明这种蛋白优先结合 α -生育酚[19]。在 α -生育酚消耗中的大增加只导致血浆浓度中的小增加[20]。相似的观察对于生育三烯酚保持正确, 在这种情形中表明高剂量的补充导

致大约只有 1-3 微摩尔的最大血浆浓度[21]。更近地, Birringer 等[17]表明, 尽管 50%以上的吸收的 γ -生育酚被人肝细胞瘤 HepG2 细胞通过 ω -氧化代谢成为各种醇和羧酸, 但是低于 3%的 α -生育酚通过这一途径代谢。这一系统似乎负责增加的 α -生育酚转换。在这一论文中, 他们表明从 γ -生育酚产生 ω COOH 以比从 α -生育酚产生类似的 ω COOH 高>50X 的速率发生。Birringer 还表明三烯甘油酯通过类似的但是更复杂的需要辅助酶的 ω 羧化作用途径代谢[17]。

可能地, 这两种结构选择性作用的存在具有生物意义。Birringer 等[17]提议 γ -生育酚-特异性 P450 ω 羟化酶的目标是优先消除 γ -生育酚/三烯甘油酯, 成为 2,7,8-三甲基-2-(β -羧基-3'-羧基乙基)-6-羟基苯并二氢吡喃 (γ -CEHC)。然而, 我们主张, 如果生物学目标只是简单消除 γ -生育酚/三烯甘油酯, 那么通过选择性羟化作用和葡糖醛酸化作用将更简单得多并且更加能量有效性。这两种作用的纯生物学作用, 其尚未在维生素 E 文献中得到评论, 在于, 当在首次通过新陈代谢过程中进入肝脏时, 两种主要饮食维生素 E 同种型 (α 和 γ) 分流进入两种独立的代谢系统。系统 1 将最生物活跃的抗氧化剂同种型 (α -生育酚) 快速运到血流中, 以为机体组织补充足够水平的这种主要的维生素。系统 2 将 γ -生育酚快速转化成 ω COOH。在本发明中, 公开在正常的人血清中总是存在显著浓度的 γ -生育酚/生育三烯酚 ω COOH 的 6 种同种型。通过测量胆酸, 一种用于三联-四极方法的包含有机可溶的羧酸的内标, 我们能够估计这些分子的每一种在人血清中的浓度在低的微摩尔范围。这在先前报道的关于 γ -生育酚的 0.5-2 微摩尔的血浆浓度范围内 (低于 α -生育酚的浓度约 20 倍) [22]。因此, 全部 6 种新 γ -生育酸 (γ -tocopheric acids) 在血清中的累积总量不是微不足道的, 并且可能超过 γ -生育酚本身的量。在血清中没有检测到任何一种 Birringer 等[17]所述的其它短链长度的 γ -生育酚/三烯甘油酯代谢物。此外, 在这一工作报道的研究中所用的患者的血清中也没有检测到 α 和 γ 生育三烯酚, 这表明 γ -生育酚/三烯甘油酯-特异性 P450 ω 羟化酶的主要目的是形成 ω COOH 和非 γ -CEHC。不受所述理论的正确性的束缚, 因此这表明, 在本申请中公开的各种 γ -生育酚/生育三烯酚 ω COOH 代谢物是新颖的生物活性剂, 并且它们行使维持正常的健康和预防疾病的特异性和必

需的生物功能。

已经表明哺乳动物能够在体内将三烯甘油酯转化成生育酚的事实也是相关的[23, 24]。由于所述新颖的 6 种维生素 E-样代谢物中的两种包含饱和植基侧链，并且因此生育酚样，和其余 4 种携带半饱和植基侧链，这表明生育三烯酚来源。由于哺乳动物不能引入双键，因此，可能所有 6 种分子都来源于生育三烯酚-样前体。

正是由于已经报道三烯甘油酯具有与生育酚分离的生物活性[25]，所以 γ -生育酚已被报道具有与 α -生育酚分离并且不同的生物功能。例如， α 生育酚和 α 生育三烯酚之间的主要差别包括 α 生育三烯酚通过调控特异的细胞死亡调控因子而特异性预防神经退化的能力[26]，三烯甘油酯降低胆固醇的能力[27]，减少氧化蛋白损害和延长秀丽隐杆线虫 (*C.elegans*) 生命期限的能力[28]，和抑制乳腺癌细胞生长的能力[29, 30]。 α 和 γ 形式的生育酚之间的主要差别包括 γ 减少大鼠炎症损伤中的促炎性类花生酸 (proinflammatory eicosanoids) [31]并且抑制环加氧酶(COX-2)活性[32]。在 Jiang 等[32]中，报道 γ -生育酚经过 8-24 小时才有效，并且花生四烯酸 (arachadonic acid) 竞争性抑制 γ -生育酚的抑制活性。假设 γ -生育酚的 ω COOH 代谢物可能是负责其抗炎活性的主要生物活性种类。花生四烯酸转化成类花生酸是炎症中的关键步骤。更可能的是，由于它们与花生四烯酸的结构相似性， γ -生育酚的 ω COOH 形式是比天然 γ -生育酚更有潜在竞争性的本制剂的抑制剂。

在本发明的一个方面中，提供人血清中新的 γ -生育酚/生育三烯酚代谢物。这些 γ -生育酚/生育三烯酚代谢物以使芳香环结构被还原。在本发明的这一方面，所述人血清中的 γ -生育酚/生育三烯酚代谢物包括附着到羟基苯并二氢吡喃结构的-OC₂H₅，-OC₄H₉，或-OC₈H₁₇ 部分。

不受任何具体理论的束缚，本发明公开关于 γ -生育酚/生育三烯酚可以怎样与烷烃自由基反应而产生稳定的烯烃和稳定的 γ -生育酚/生育三烯酚自由基的假说。本发明表明，通过这种机制，一分子的 γ -生育酚/生育三烯酚可以中和达到六分子的烷烃自由基。本发明还表明 γ -生育酚/生育三烯酚自由基可以怎样与脂质过氧化物反应并且随后将所述脂质过氧化物中和成稳定的 γ -生育酚/生育三烯酚烷基醚和稳定的脂质醛。本发明还

表明，铁的存在可以催化这一反应。

相对于血浆， γ -生育酚的吸收和浓度在结肠上皮细胞中显著不同。Tran 和 Chan [33]表明，相对于 α -生育酚， γ -生育酚优先由人的内皮细胞吸收，和 Nair 等[34]表明， γ -生育酚在人结肠上皮细胞中的体内浓度高于 α -生育酚浓度 2 倍。因此，主要由血液供给营养的组织优先富含 α -生育酚[18]，而结肠上皮细胞，其直接从大肠吸收生育酚，具有代表这些同种型的饮食比例的浓度[34]。

本申请公开相对于对照， α -生育酚/生育三烯酚浓度在 CRC 患者血清中显著下降，而在 OC、前列腺、肾细胞、胸腺或肺癌中没有下降。本申请还公开相对于对照， γ -生育酚和 γ -生育酚/生育三烯酚-相关的代谢物强度在 CRC 和 OC 患者血清中显著下降，而在前列腺癌、肾细胞癌、乳腺癌或肺癌中没有下降。

不希望受到任何具体的理论的束缚，在本发明中，假设本文公开的新代谢物是维生素 E 活性的指征，并且所述代谢物的减少是下列情形中的一种的指征：

1. 以超过由饮食供给的速率消耗维生素 E 及相关代谢物的高度氧化或代谢状态。
2. 维生素 E 及相关代谢物的饮食缺乏或减弱的吸收。
3. 维生素 E 相关代谢物的饮食缺乏或减弱的吸收/上皮细胞转运。

特别是关于血清维生素 E 浓度和 CRC 的关联，尚不存在相对于对照在 CRC 患者中显著减少的维生素 E 水平的报道。最近和最强的研究是 Ingles 等的研究[35]。在这一研究中，作者阐述：“我们检测了来自这一先前基于乙状结肠显微镜检查的研究的 332 例患有结肠直肠腺瘤的受试者和 363 例对照受试者的血浆 α 和 γ -生育酚浓度。增加的 α 和下降的 γ -生育酚水平与大的($\geq 1\text{cm}$)而不是小的($\leq 1\text{cm}$)腺瘤的减少的发生相关；然而，在调整潜在的混淆变量后，这些趋势不明显。”

在所有前文提及的关于维生素 E 和 CRC 的流行病学研究中，研究的焦点围绕日常饮食对疾病发生的参与作用。这些研究都没有考虑疾病对这些内在代谢物的作用。因此，一种潜在的假说是，特异性维生素或营养的饮食缺乏导致增加的特别疾病的危险。没有考虑所述疾病状态导致重要营

养或维生素缺乏的假说。

基于在本申请中公开的发现，考虑尽管饮食缺乏可能增加 CRC 发生的危险（这尚未最终证明），但是 CRC 的存在导致维生素 E 同种型和相关代谢物的减少。由于在流行病学研究中将揭示出这样强的相关性，所以这些减少的水平不可能是简单纯的饮食缺乏的结果。如果 CRC 引起这些代谢物的减少，并且不是反之亦然，那么在维生素浓度和 CRC 之间的弱流行病学联系可能只是存在于假定正常的群体中的早期的、未检测的 CRC 的结果，原因在于已知 CRC 可以持续许多年才能呈现出可被结肠显微镜检查检测到的大小和程度。

基于在本申请中公开的发现，还考虑维生素 E-样代谢物减少的水平不是单纯饮食缺乏的结果，而是结肠上皮细胞对维生素 E 和相关代谢物摄取的削弱。因此，这代表在氧化压力负荷下充分供给上皮细胞抗氧化剂能力的限速步骤。在这一模型中，通过红色肉类、高度饱和的脂肪、和减少的纤维（导致减少的铁螯合作用[36]）增加铁消耗的饮食作用导致先前提及的芬顿-诱导的自由基传播，它的充分清除取决于维生素 E 的充足的上皮水平。因此，上皮自由基负荷的增加，与维生素 E-相关的转运缺陷组合，将反映在作为抗氧化剂的维生素 E-样代谢物的减少，以及由肝摄取和 P450-介导的代谢导致的还原羧化同种型的减少。最近已经表明，摄取维生素 E 进入 CaCo-2 结肠上皮细胞是饱和过程，主要取决于蛋白-调控事件 [37]。由于蛋白转运子主要是酶，并且遵循典型的米-曼动力学，维生素 E 可以被吸收进入结肠上皮细胞的速率将达到最大速率(V_{max})，其可能不能为 CRC 的发展提供充分的抗氧化剂保护作用。因此，在某种程度上，高于维生素 E 可以转运进入结肠上皮细胞的速率的氧化压力增加的速率最终将耗尽结肠内/上皮储蓄。因此，关于 CRC 发展的假说不但基于铁的增加和饮食中的低纤维，而且基于上皮摄取维生素 E γ 和相关代谢物的缺乏。这与表明在 CRC 发生和饮食维生素 E 补充之间缺乏任何显著相关性的许多流行病学研究一致，原因在于在这种模型下的大剂量的维生素 E 将不由增加的上皮细胞内水平所反映。

CRC 病理学特异性的 9 种代谢物的精确中性质量（转换成中性质量的 M-H 离子）通过 FTICR-MS 确定为 446.3406, 448.3563, 450.3726,

464.3522, 466.3661, 468.3840, 538.4259, 592.4711, 和 594.4851。基于这些精确中性质量值, 确定所述 9 种优选的诊断标记的分子式分别为 C₂₈H₄₆O₄, C₂₈H₄₈O₄, C₂₈H₅₀O₄, C₂₈H₄₈O₅, C₂₈H₅₀O₅, C₂₈H₅₂O₅, C₃₂H₅₈O₆, C₃₆H₆₄O₆, C₃₆H₆₆O₆。

这些代谢物的 M-H 离子特征在于具有碰撞诱导的解离(CID) MS/MS 断裂模式, 其包括在图 13-21 中所示的一种或多种子离子(daughter ions)。更特别地, 这 7 种代谢物的 M-H 离子特征在于具有碰撞诱导的解离(CID) MS/MS 断裂模式, 其包括在图 13-21 中所示的每一种子离子。

基于精确质量 MS/MS 光谱, 为每种生物标记指定推定的结构。所述生物标记的 MS/MS 光谱的综合解释表明它们都包含羧酸部分(由失去 CO₂ 表明)和至少一个羟基部分(由失去 H₂O 表明)。此外, 除了 C₂₈H₄₆O₄ 之外所有的结构都产生 C₁₈H_xO_y 片段, 其中 $x \geq 31$ 和 $y \geq 2$, 表示高度饱和的脂肪酸侧链。这一信息与成为 γ -生育酚和 γ -生育三烯酚代谢物的 C₂₈ 分子一致。后来假设 C₃₂ 和 C₃₆ 生物标记分别是由 γ -生育酚与亚麻酸和油酸残基的脂质过氧化物的反应导致的代谢副产物。

对于所选的 6 种代谢物中 4 种的确定的结构, 和其中 2 种的推定的结构显示在图 12 中。

本发明还参考下述实施例定义, 所述实施例不解释为限制。

实施例

实施例 1: 相对于正常健康对照在 CRC-阳性中差异表达的代谢物的发现和鉴定

本发明中所述的 CRC 生化标记来源于来自 CRC-阳性患者(24 名 TNM 阶段 I/II, 和 16 名阶段 III/IV) 的 40 例血清样品和来自健康对照的 50 例血清样品的分析。所有样品都是单一时间点收集, 并且 CRC 样品在手术切除肿瘤之前立即或在手术切除肿瘤之后立即采取。所有样品都在化学或放射治疗之前采取。

在科学文献中已经描述了多种非目标性代谢物组学策略, 包括 NMR [38], GC-MS [39-41], LC-MS, 和 FTMS 策略[38, 42- 44]。在本申请中用于发现差异表达的代谢物的代谢概述策略是由 Phenomenome Discoveries

(Phenomenome 发现) 发明的非目标性 FTMS 策略[40, 44-47]。

本文所述的发明包括分析来自 90 名个体 (40 名 CRC, 50 名正常的) 的血清提取物, 其通过在阳极和阴极模式中直接注射到 FTMS 并且通过 ESI 或 APCI 电离而进行分析。FTMS 比其它基于 MS 的平台优点是允许分离只有几百道尔顿差异的代谢物的高分辨能力, 这些代谢物中的许多将被更低分辨率的仪器遗漏。有机 (100% 丁醇) 样品提取物在甲醇: 0.1% (v/v) 氢氧化铵 (50:50, v/v) 中稀释 3 倍或 6 倍, 用于阴极电离模式, 或者在甲醇: 0.1% (v/v) 甲酸 (50:50, v/v) 中稀释 3 倍或 6 倍, 用于阳极电离模式。对于 APCI, 直接注射乙酸乙酯有机样品提取物而不稀释。所有分析在装配 7.0 T 活性屏蔽超导磁体的 Bruker Daltonics APEX III FTMS (Bruker Daltonics, Billerica, MA) 上进行。使用 ESI 和 APCI 直接注射样品, 流速为每小时 600 μ L。使用丝氨酸、四丙氨酸、利血平、Hewlett-Packard 调谐混合物和促肾上腺皮质激素片段 4-10 的标准混合物, 最优化离子迁移/检测参数。另外, 按照仪器供应商的推荐, 将仪器条件调谐到最优化离子强度和超过 100-1000 amu 质量范围的宽波段累积。为了超过 100-1000 amu 获得范围的质量精确性, 将上文提及的标准的混合物用来在内部校准每份样品光谱。

对于每份样品, 获得总共 6 种独立的分析, 包括提取物和电离模式的结合:

水性提取

1. 阳极 ESI (分析模式 1101)
2. 阴极 ESI (分析模式 1102)

有机提取

3. 阳极 ESI (分析模式 1201)
4. 阴极 ESI (分析模式 1202)
5. 阳极 APCI (分析模式 1203)
6. 阴极 APCI (分析模式 1204)

应用线形最小平方回归线, 校准质量轴值, 以致与其理论质量相比, 每个内标质量峰具有 <1 ppm 的质量误差。使用 Bruker Daltonics 公司的 XMASS 软件, 获得 1 兆字节的数据文件大小, 并且补零成 2 兆字节。在

傅里叶变换和量级计算之前进行 *sinm* 数据转换。将来自每次分析的质量光谱整合，产生包含每个峰的精确质量和绝对强度的峰列表。分析了在 100-2000 *m/z* 范围内的化合物。为了比较和总结不同电离模式和极性之间的数据，假定形成氢加成物，将所有检测到的质量峰都转换成它们相应的中性质量。然后使用 *DISCOVA*metrics™ 软件(Phenomenome 发现公司, Saskatoon, SK, 加拿大)，产生自我-产生的二维（质量相对样品强度）点阵。将来自多份文件的数据整合，然后处理这一结合的文件，从而确定所有独特的质量。确定每一独特质量的平均值，代表 *y*-轴。对于原始选择进行分析的每份文件产生一系列，代表 *x*-轴。然后将在所选的每份文件中发现的每一质量强度填到其代表性 *x,y* 坐标中。不含有强度值的坐标保持空白。当在点阵中时，进一步处理、显现和解释数据，并且确定推定的化学性质（chemical identities）。然后将每一光谱最高排列，以获得所有检测的代谢物的质量和强度。然后将这些来自所有模式的数据合并，以产生每份样品一个数据文件。然后将来自所有 90 份样品的数据合并并且排列，以产生二维代谢物点阵，其中每份样品由一系列代表，并且每种独特的代谢物由单行代表。在与给定的代谢物样品组合相对应的单元中，显示在所述样品中的代谢物的强度。当数据以这种格式表示时，可以确定在样品组（即，正常的和癌症）之间表现出差异的代谢物。

斯氏 *T*-检验用来选择在正常和 *CRC*-阳性样品之间不同的代谢物 ($p < 0.05$)。满足这一标准的代谢物(480 种)显示在表 3 中。这些是在两种群体之间以统计学显著方式不同的所有特征，并且因此具有潜在的诊断应用。所述特征通过它们的精确质量和分析模式描述，精确质量和分析模式共同充分提供每种代谢物的推定的分子式和化学特征（诸如极性和推定的官能团）。然而，将 480 种信号结合并且开发进入商用测定中是复杂的，因此应用监督统计学方法（supervised statistical methods）从 480 种代谢物中选取最佳诊断特点组，如下文所述。

应用称为微点阵预测分析 (PAM) (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/PAM/>) 的监督统计学方法从原始点阵中选择具有最佳诊断特点的代谢物特征[48]。所述方法包括使用具有相对应已知的诊断的样品训练归类运算法则，然后其可以用于诊断未知的样品

(即, 测试组)。存在一些监督方法, 其中任一种可以用于鉴定最好特点组, 包括人工神经网络(artificial neural networks, ANNs)、支持载体机械(support vector machines, SVMs)、部分最小平方判别式分析(PLSDA)、亚线性缔合方法、贝氏推论方法、监督主要成分分析(PCA)、缩小的质心(本文所述)或其它方法(综述参见[49])。

由于在本研究中只有 40 份 CRC 样品工作, PAM 方法对于诊断 CRC 的正确性以两种方式检测。第一, 使用所有 90 份样品(CRC 和正常的), 没有为测试组留下任何样品, 产生交叉-验证的训练分类方法。第二种方法包括将样品随机分成两半, 一半用来产生分类法, 另一半作为不知情“测试组”用于诊断。由于第一种方法使用更多的样品产生分类法, 所以预测它的预测准确性将高于第二种方法, 并且因此对于高诊断准确性应该需要更少的代谢物。关键点是在第一种方法中鉴定的相同的诊断特点也包含在第二种方法鉴定的子集中。基于这些结果, 和来自质谱数据的信号-对-噪声强度信息, 选择 7 种代谢物作为进一步结构特征描述的最佳 CRC 诊断的生物标记组。图 2A 中的图表明在不同阈值获得给定的训练误差所需要的代谢物的数目(使用者-定义的 PAM 参数)。本图表明具有小于 10% 误差率(0.1 训练误差)的训练分类法可以具有少至 7 种代谢物特点(约 5.8 的阈值, 见箭头)。值得注意的是, 最低的训练误差可以使用 300 种或更多的代谢物特点获得, 然而, 所述误差只比使用 7 种代谢物特点低少量的百分数, 并且使用数百个特点对于临床应用将是复杂的。图 2B 中的图在概念上与 2A 中的图相似, 然而, 在 2B 中的图表示在 PAM 程序必需的交叉-验证步骤后用于 CRC 和正常个体的训练分类法的错分类误差。由菱形连接的线反映先前的结果, 表明关于 CRC-阳性个体的最小交叉-验证的错分类误差可以使用少如 7 种的代谢物获得。它还表明, 由正方形表示的正常个体可以只使用一种代谢物特点而准确地诊断为正常, 但是在这一阈值, 关于 CRC 的错分类误差大于 95% (见箭头)。因此, 基于这种方法的最佳代谢物特点组合, 其可以阳性和阴性地诊断 CRC, 包括 7 种代谢物特点的组合。这些包括是或基本上等于 446.3406, 450.3726, 466.3661, 538.4259, 468.384, 592.4711, 和 594.4851 的质量。

在本研究中关于 90 名个体的每一个的单个交叉-验证的诊断概率在图

3 中显示。所有这些 CRC-阳性样品在图的左侧列出，并且正常个体在右侧。每份样品在图上包括 2 个点，一个点表示患有 CRC 的概率（菱形），和一个点表示没有患有 CRC 的概率（即，正常的，正方形）。可以看出，存在 7 种 CRC 样品，其分类为正常（在图的左侧圈出）和分类为 CRC-阳性的两种正常样品（在图的右侧圈出）。然后，将预测的概率用来通过应用 JROCFIT (<http://www.rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html>)而产生图 4 中的接收者-操作特征(receiver-operating characteristic, ROC)曲线，其表示相对于假阳性部分（预测患有 CRC 的正常个体）的正确阳性部分（预测患有 CRC 的患有 CRC 的那些）。曲线下的面积是 95%，灵敏性 82.5%，和特异性 96%。总之，基于交叉-验证的设计方案，诊断的准确性是 90%。这 7 种代谢物进一步选择用于结构特征性描述。

可以用作训练组的样品越多，得到的分类法在诊断未知样品时应该越准确。这是使用所有 90 种样品鉴定上述最佳诊断标记组的原因。然而，这种方法的缺点是它没有留下可以用作不知情测试组的样品（其不包含在训练组中）。为了解决这一问题，将样品随机分成两组：一组用来产生分类法，和一组用作测试组。训练组包括 21 份 CRC 样品和 27 份正常。使用这些样品关于最低错分类误差所需要的代谢物的最佳数目是 16，在图 5 的底部列出。在这 16 种内包含上述 7 种的子集。然后分类法用来预测其余样品的诊断（不知情的；22 例 CRC 和 27 例正常）。预测不知情的测试样品为 CRC-阳性或正常的概率在图 5 中绘图。结果表明 CRC-阳性样品中有两种给出更高的为正常的概率，和正常的中有两种给出更高的为 CRC-阳性的概率。图 6A 列出用于测试组的这些患者，和它们的实际和预测的诊断。然后将来自图 5 的概率转换成 ROC 曲线，如在图 6B 中所示。基于所述不知情测试组的分类的性能特征为灵敏性 91%，特异性 92.6%，和综合诊断准确性 91.8%。

为了验证通过所述分类法选择的所述 7 种代谢物真正表示 CRC 和正常血清之间的差异，显现原始光谱数据。用于 5 种正常的和 5 种 CRC 样品的所述 7 种生物标记中的 6 种的光谱显示在图 7A-7F 中（正常的在每组的顶部，和 CRCs 在底部）。在每种情形中，所述标记在正常样品中存在，而在 CRC 样品中不存在。

基于这些结果，在 CRC-阳性患者和健康（非 CRC）个体的血清之间可以做出清楚的区分。因此，能够鉴定并且区分 CRC-阳性和 CRC-阴性血清的这样的发现，可以形成在本申请中所述的 CRC 诊断检测的基础。

实施例 2：证实所发现的代谢物的独立方法

使用独立的质谱方法，检验对于使用 FTMS 方法发现的 7 种诊断代谢物的正常的和 CRC 血清之间的强度差别。使用与 ABI QSTAR®质谱仪界面连接的 HP 1050 高效液相色谱，通过 LC-MS 分析 5 种代表性 CRC-阳性样品提取物和 5 种代表性正常样品提取物。

将来自 5 种 CRC 和 5 种正常样品提取物的乙酸乙酯级分在氮气下蒸发，并且在 70 μ L 异丙醇：甲醇：甲酸(10:90:0.1)中再生。将 10 μ L 再生样品进行 HPLC (HP 1050，具有 Hypersil ODS 5 μ , 125 x 4 mm 柱，安捷伦技术 (Agilent Technologies))用于完全扫描，和 30 μ L 用于 MS/MS，流速为 1 ml/分钟。

将来自 HPLC 的洗脱物使用在阴极模式装配大气压化学电离(APCI)能源的 ABI QSTAR® XL 质谱仪进行分析。完全扫描模式的扫描类型是飞行时间(TOF)，累积时间 1.0000 秒，质量范围在 50 和 1500 Da 之间，和持续时间 55 分钟。，能源参数如下：离子能源气体 1 (GS1) 80；离子能源气体 2 (GS2) 10；Curtain 气体(CUR) 30；喷雾器电流(NC) -3.0；温度 400°C；解聚电势(DP) -60；聚焦电势(FP) -265；解聚电势 2 (DP2) -15。在 MS/MS 模式中，扫描类型是产物离子，积聚时间是 1.0000 秒，扫描范围在 50 和 650 Da 之间，和持续时间 55 分钟。所有的能源参数与上述相同，具有-35 V 的碰撞能量和 5 psi 的碰撞气体(CAD, 氮气)。

对于所述生物标记中的 6 种当在 QSTAR®中检测的提取的离子色谱 (EICs)表示在图 8A-8F 中。每图的顶部组显示 5 种正常的 EICs，和底部组显示 5 种 CRC EICs。此外，当与 FTMS 比较时，QSTAR®的灵敏性更好，导致在正常和 CRC 群体之间关于所选择的生物标记更大量级的强度差别。

图 9 显示在 16-17 分钟保留时间窗口的关于 6 种代谢物的三组提取的质谱(EMS)。图 9A 代表 5 种正常样品的平均 EMS，而图 9B 代表 5 种 CRC

样品的平均 EMS。图 9C 显示在顶部两种光谱之间的纯差异。可以看出，在 CRC 组中，在质量范围约 445 和 600 Da 之间的所有峰都几乎不能检测到（框起的区域）。在 Q-Trap 上检测到在 FTMS 平台上鉴定的所有 7 种生物标记，并且是在这一质量范围内 7 种最丰富的峰（箭头突出表示）。

对于正常的和 CRC 患者在 FTMS 和 Q-Star 上检测的 7 种标记的平均值分别显示在图 10A 和图 10B 中。使用这两种平台，在 CRC-阳性群体中观察到这些分子的可重现的和一致的消耗。

尽管 PAM 运算法则已经选择具有“最佳”诊断性能的 7 种特点，但是基于分子式、化学性质和电离信息，我们重新检验关于似乎与这 7 种代谢物相关的代谢物的原始 FTMS 发现数据。我们能够鉴定所选的与 7 种 PAM 相关的多于 30 种分子，其在 CRC 患者群体中全部都表现出减少的表达。按照碳含量，可以将这些进一步分类，即，28, 32 或 36 个碳（见图 11）。另外，在 CRC 群体中，鉴定了天然 α 和 γ -生育酚，并且它们也表现出减小的强度（图 11, GT 和 AT）。基于这一信息，我们重新评估哪些分子应该继续在高通量筛查方法中运行，并且由于它们一向似乎是两种群体（CRC 和正常）之间最强的辨别者，而决定使用 6 种包含 C28 的分子。

实施例 3: 主要代谢物生物标记的结构说明(NMR, FTIR 和 MSMS)

通常用于新代谢物结构说明的主要特点是精确质量和分子式确定，极性，酸/碱性质，NMR 光谱，和 MS/MS 或 MS_n 光谱。然而，本领域的技术人员应该显而易见，在尝试确定其结构时，可以应用代谢物的其它特点。

基于它们的精确中性质量，极性和电离特点，确定 9 种优选的诊断标记的分子式为 C₂₈H₄₆O₄, C₂₈H₄₈O₄, C₂₈H₅₀O₄, C₂₈H₄₈O₅, C₂₈H₅₀O₅, C₂₈H₅₂O₅, C₃₂H₅₈O₆, C₃₆H₆₄O₆, C₃₆H₆₆O₆。按照本发明，这些代谢物已确定由半饱和苯并二氢吡喃环和植基侧链组成，并且因此与维生素 E-相关的结构一致。

使用 C18 柱，将含有目的代谢物的提取物进行反相 LC-MS，并且通过在上述详细方法中所述的 MS 进行分析。在这些 HPLC 条件下，对于所有所述维生素 E-样生物标记的保留时间为约 16.5 分钟。

提取条件还提供关于生物标记的化学性质的认识。将所有 7 种代谢物标记萃取到有机乙酸乙酯级分中,表明这些代谢物在酸性条件下是非极性的。此外,它们优选在阴极 APCI 模式中电离,表明在分子中存在酸性质子。

给定的分子的结构将在对所述分子特异的(等价于人的指纹)定义条件下指示特异性断裂模式。甚至分子结构的微小变化都可能导致不同的断裂模式。除了提供分子性质的指纹外,通过 CID 产生的片段可以用来获得关于分子结构的认识。MS/MS 分析在 ABI-QSTAR® XL 上进行,所有参数如先前所提及,使用氮气作为在 5 psi 的碰撞气体,和-25, -35 和-50 伏特的 CE 设置。

使用碰撞-诱导的解离(CID),将鉴定为具有最佳诊断能力和用于 HTS 开发的适用性的 6 种代谢物进行 MS/MS 断裂。从最初的 9 种中选择 6 种,以将组缩小到所有含有 C28 的分子和全部可以在相同的分析模式中检测的分子。图 12A 和 12F 将 6 种分子的结构与 γ 形式的生育酚和生育三烯酚进行比较。本附图可以参考下文的显示详细描述。

基于精确质量 MS/MS 光谱,为每种生物标记指定推定的结构。概言之,生物标记 MS/MS 光谱的综合解释表明,它们都包含羧酸部分(由失去 CO₂ 表明)和至少一个羟基部分(由失去 H₂O 表明)。此外,除了 C₂₈H₄₆O₄ 之外所有的结构都产生 C₁₈H_xO_y 片段,其中 $x \geq 31$ 和 $y \geq 2$,表示高度饱和的脂肪酸侧链。这一信息与成为 γ -生育酚代谢物的 C28 分子一致。后来假设 C32 和 C36 生物标记分别是由 γ -生育酚与亚麻酸和油酸残基的脂质过氧化物的反应导致的代谢副产物(图 19-21)。MS/MS 光谱支持这一假说。本领域的技术人员应该显而易见,较轻微的修饰(包括,但不限于,双键位置,羟基位置,某些碳原子的立体或手性朝向)将不会显著地分散所述生物标记的性质。关于下文进一步描述的 6 种标记的片段结构的指定显示在图 13-21 中,并且列在表 5-10 中。MS-MS 结果报道的质量指检测的质量,而不是中性质量。这些叫作 M-1 质量,并且由于它们在质谱仪上阴极电离模式中检测,相对于在前面部分中提及的它们的中性负体,似乎在质量上少 1 道尔顿,或在分子式中少一个氢。然而, M-1 质量代表与中性负体相同的分子。随后的 NMR 部分指中性质量。

特别地，对于每种生物标记，单独分析在阴极电离模式中获得的 MS/MS 数据，用于结构指定，特别是官能团的置换。每种生物标记的 MS/MS 光谱表示由于失水 (M-18) 和二氧化碳 (M-44) 的峰。这些保证临近三级或二级碳分子的游离羟基和羧酸基的存在。还通常观察到叶绿醇链片段的失去，但是所述链的分裂发生在不同位置。

对于 $C_{28}H_{47}O_4$ (表 5, 图 13), 观察到初始失去水和二氧化碳 (m/z 385; $C_{27}H_{45}O$)。代表 m/z 279 ($C_{19}H_{35}O$) 的下一个片段表示在 O1-C9 随之发生的苯并二氢吡喃环开环和在 C10-C4 位置的叶绿醇链的分裂。

对于 $C_{28}H_{47}O_5$ (表 6, 图 14), 其具有 2 个游离羟基官能性, 表现出失去 2 个水分子以及规则的二氧化碳失去 ($m/z = 383$; $C_{27}H_{43}O$)。在 O1-C9 相继的开环接着在 C18-C19 之间分裂在此处也是产生 $C_{22}H_{35}O$ (m/z 315) 的指征。随后还观察到与 m/z 297 ($C_{22}H_{33}$) 相对应的信号, 代表从打开的环片段失去水分子。与在生物标记 3 (m/z 448.3726) 中不同, 叶绿醇链的分裂发生在 C12-C13, 在那里在 $C_{28}H_{48}O_5$ 的 MS/MS 光谱中观察到关于分子 m/z 241 ($C_{14}H_{25}O_3$), 223 ($C_{14}H_{23}O_2$) 的两个等分部分 (halves) 的信号。这种特别的断裂是官能团分布在苯并二氢吡喃环和叶绿醇链的有力证据。

$C_{28}H_{45}O_4$ 的 MS/MS 光谱 (表 7, 图 15) 表现与 $C_{28}H_{47}O_5$ 的光谱相似的模式。观察到水 (m/z 427; $C_{28}H_{43}O_3$) 和二氧化碳 (m/z 401; $C_{27}H_{45}O_2$) 的失去是交替和瞬时发生的 (m/z 383; $C_{27}H_{43}O$)。如在 $C_{28}H_{47}O_5$ 中那样, 在初始失去 C17-C18 之间的水之后, 叶绿醇链的分裂发生在 C12-C13, 产生 m/z 223 ($C_{14}H_{23}O_2$) 的片段。其它相反片段, 还观察到 $C_{14}H_{21}O$ (m/z 205), 并且还代表另外两种连续的片段, m/z 177 ($C_{12}H_{17}O$) 和 162 ($C_{11}H_{14}O$) 的亲本离子, 表示分别失去 C_2H_8 和 CH_3 。

有趣地, 在 $C_{28}H_{49}O_5$ 中 (表 8, 图 16), 除了习惯的失水 (m/z 447; $C_{28}H_{47}O_4$) 和失二氧化碳 (m/z 421; $C_{26}H_{45}O_3$) 之外, 还检测到失去乙醇片段 (m/z 433; $C_{27}H_{45}O_4$) 然后失去乙烯基片段 (m/z 405; $C_{26}H_{45}O_3$)。这些观察表示苯并二氢吡喃环在 C2-C3 假定的开环和 C27 甲基的羟化, 产生甲醇和乙烯片段的可行前体。由于叶绿醇侧链的断裂观察到一些不同的片段。在 C18-C19 的分裂 (m/z 349; $C_{22}H_{37}O_3$), 在 C18-C17 之间的初始失水后在 C1-C2 的分裂 (m/z 297; $C_{18}H_{33}O_3$), 然后失去另一个水分子 (m/z 279;

$C_{18}H_{31}O_2$), 和在 C15-C16 的分裂 (m/z 185; $C_{13}H_{19}O_3$) 在它们之中。在 C12-C13 之间预测的断裂也观察为两种相反分子-离子等分部分, m/z 241 ($C_{15}H_{29}O_2$)和 223 ($C_{13}H_{19}O_3$)。

$C_{28}H_{49}O_4$ 的 MS/MS 光谱(表 9, 图 17)也表现出预测的失水和失二氧化碳(m/z 431; $C_{28}H_{49}O_4$, 405; $C_{27}H_{49}O_2$)。与 $C_{28}H_{47}O_5$ 的相似, 这表示由于失去两个水分子而形成的片段(m/z 413; $C_{28}H_{45}O_2$)。这表明在结构中存在两个游离的羟基。叶绿醇环的分裂发生在两个位置, 在 C15-C16 之间(m/z 281; $C_{18}H_{33}O_2$)和在 C16-C17 之间然后失去水分子(m/z 277; $C_{19}H_{33}O$)。这些片段确定在叶绿醇链中不存在羟基和在 C17-C18 之间的不饱和性。因此组装生物标记 7 的结构。

$C_{28}H_{51}O_5$ 的 MS/MS 光谱(表 10, 图 18)表示失去两个水分子(m/z 431; $C_{28}H_{47}O_3$)和同时失去水和二氧化碳分子的另一种片段 (m/z 405; $C_{27}H_{49}O_2$), 表明存在两个游离羟基和羰基官能性。在这里观察到的一些片段与 $C_{28}H_{49}O_5$ 的片段相同, 其中与 $C_{28}H_{51}O_5$ 的唯一区别是大量的不饱和度。在 C18-C17 之间初始失水之后在 C1-C2 的分裂(m/z 297; $C_{18}H_{33}O_3$)然后失去另一个水分子(m/z 279; $C_{18}H_{31}O_2$)在它们之中。后来从 $C_{18}H_{31}O_2$ 失去 CH_4 由分子离子峰 m/z 263 ($C_{17}H_{27}O_2$)代表。 m/z 215 ($C_{12}H_{23}O_3$)分子离子峰表示由于 C13-C14 间断裂然后失去 CH_3 而形成的叶绿醇链的片段。观察到由于叶绿醇链在 C15-C16 的断裂形成的片段(m/z 187; $C_{10}H_{19}O_3$)为另外两种连续的片段的亲本离子, 分别由于从 $C_{10}H_{19}O_3$ 失去一个水分子 (m/z 169; $C_{10}H_{17}O_2$)和乙烯基片段(m/z 141; $C_8H_{13}O_2$)而导致。

除了所述 6 种含有 C28 的分子之外, 还进行非 C28 维生素 E 样分子的 MS/MS 分析, 如在图 19-21 中所示。认为这些 C32 和 C36 生物标记分别是由 γ 生育酚和亚麻酸与油酸残基的脂质过氧化物反应而导致的代谢副产物。MS/MS 光谱支持在图 19-21 中所示的这种假说。

对于 NMR 和 FTIR 方法, 所有的化学剂和培养基购自 ON Oakville 的西格玛-奥德里奇加拿大有限公司 (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON)。所有溶剂都是 HPLC 级的。分析薄层层析 (TLC) 在预先包被的硅胶 TLC 铝制薄片(EM 科学, Kieselgel 60 F₂₅₄, 5 x 2 cm x 0.2 mm)上进行。化合物在 UV 光(254/366 nm)下显现, 或者置于碘蒸汽罐中, 并且通过将平

板浸没在含有 1% (w/v) 硫酸高铈和 4% (v/v) H_2SO_4 的 5% 水性 (w/v) 磷钼酸溶液中, 然后加热而进行。制备薄层层析 (prep TLC) 在硅胶平板 (EM 科学, 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm, 0.25 mm 厚) 上进行。化合物在 UV 光和碘中显现。HPLC 使用高效液相色谱进行, 其装配四元泵、自动注射器、除气器和 Hypersil ODS 柱 (5 μm 颗粒大小的硅石, 4.6 i.d x 200 mm) 和半制备柱 (5 μm 颗粒大小的硅石, 9.1 i.d x 200 mm), 使用内嵌滤器。移动相: 在 52 分钟内以 1.0 ml/分钟的流速的线性梯度 H_2O -MeOH 至 100% MeOH。

在 Bruker Avance 光度计上记录 NMR 光谱; 对于 ^1H (500 MHz), δ 值参考 CDCl_3 (CHCl_3 , 在 7.24 ppm), 并且对于 ^{13}C NMR (125.8 MHz) 参考 CDCl_3 (77.23 ppm)。高分辨率 (HR) 质谱 (MS) 在阴极模式具有大气压化学电离 (APCI) 能源的 Bruker apex 7T 傅里叶变换离子回旋加速共振 (FT-ICR) 和 QStar XL TOF 质谱仪上记录。傅里叶变换红外 (FT-IR) 光谱在 Bio-Rad FTS-40 分光计上记录。光谱通过在分散在 KBr 中的样品上进行漫反射系数方法而测量。

通过制备 TLC, 纯化在 ^1H NMR 光谱中表现出 γ -生育酚样和 γ -生育三烯酚样化合物的混合物的半纯化的合并的血清提取物 HPLC 级分 (32 mg), 以产生如在图 12C-12F 中所示的结构; C (**3**, 3.6 mg), D (**4**, 2.5 mg), E (**5**, 3.4 mg), 和 F (**6**, 4.6 mg)。在下述部分中我们将这些新的结构叫作 γ -tocoenoic acids。

γ -tocoenoic 酸 **3** 的分子式; 图 12C (**3**) 通过 HRAPCI-MS 确定为 $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_4$ (中性), 具有 5 个不饱和度。在 3315 (br) 和 1741 cm^{-1} 的 FTIR 吸收表示羟基和羰基。 ^1H 和 ^{13}C NMR 分光数据 (表 11 和 12) 的分析表明存在 6 个甲基, 4 个烯烃碳和如在 γ -生育三烯酚中存在的长叶绿醇链; 图 12B(2)[50, 51]。HMQC 和 HMBC 数据的分析在指定结构中是有帮助的 (instrumental)。使用在其 MS/MS 光谱中观察到的二氧化碳的失去, 将表现出与在 δ_{H} 2.24 (H-22) 的次甲基质子的一种长范围相关性 (long range correlations) 的在 δ_{C} 173.8 (C-23) 存在的唯一的羰基样碳证实为羧酸官能度。类似地, 在 δ_{C} 74.2 (C-9) 碳表现出与在 δ_{H} 2.28 (H-4) 的亚甲基质子的相关性, 其与在 δ_{H} 2.28 (H-6) 的另一个亚甲基质子一起表现出与在 δ_{C} 130.5 (C-10) 的 sp^2 碳的 HMBC 相关性。这些是如在 γ -生育三烯酚中存在

的半饱和苯并二氢吡喃环系统的指征(图 12B)。在叶绿醇侧链上,在 δ_{H} 1.55 (H-26)的甲基质子和在 δ_{C} 123.2 (C-13)的 sp^2 碳之间,在 δ_{H} 1.01 (H-12, H-15)的亚甲基质子和在 δ_{C} 140.2 (C-14)的 sp^2 碳之间,在 δ_{H} 0.91 (H-25)的甲基质子和在 δ_{C} 56.6 (C-18)的四级碳之间,观察到长范围相关性。MS/MS 光谱分析证实由于失去水和二氧化碳和在 C9-O1 位置的开环然后失去叶绿醇侧链片段(m/z 279; $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_2$)而形成的片段。因此,这种 γ -tocoenoic 酸的结构指定为 **3** (图 12C)。

γ -Tocoenoic 酸 4; 图 12D (4)具有表示 5 个不饱和度的分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_5$ (HRAPCI-MS)。在 3437 (br)和 1743 cm^{-1} 的 FTIR 吸收表示羟基和羰基。 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱与 $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_4$ 的光谱非常相似。唯一的差别包括一个额外的羟基,当与 $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_4$ 比较时由在 MS/MS 断裂中额外的失 H_2O 而表示,考虑亚甲基质子, H-5 (δ_{H} 2.21-2.25)和 H-7 (δ_{H} 1.47-1.53),与次甲基质子, H-6 (δ_{H} 3.69-3.71),的 $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY 相关性,其指定在 C-6 上。MS/MS 光谱分析还证实存在羧基,其由失去 CO_2 分子和由于在 C12 和 C13 之间的分裂形成的片段, $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_3$ (m/z 241)和 $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_2$ (m/z 223),而指征,其进一步支持将二烯分配到叶绿醇侧链上和苯并二氢吡喃环上的羟基化作用。因此,指定 γ -tocoenoic 酸 4 的结构如图 12D 所示。

γ -Tocoenoic 酸 5; 图 12E (5)具有表示 6 个不饱和度的分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$ (HRAPCI-MS)。在 3125 (br)和 1736 cm^{-1} 的 FTIR 吸收表示存在羟基和羰基。 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱与 $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_4$ 的光谱非常相似;唯一的差别是在半饱和苯并二氢吡喃环系统中的一个额外的双键,其由在 C6 和 C7 之间的高脱氢倾向而形成。MS/MS 光谱分析证实存在羧基,由于失水形成的片段以及由于在 C12 和 C13 之间的分裂形成的片段, $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_2$ [m/z 223; ($\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_3 - \text{H}_2\text{O}$)和 $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}$ (m/z 205; $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_2 - \text{H}_2\text{O}$)],与对于 $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_5$ 所观察到的相似。因此,指定 γ -tocoenoic 酸 5 的结构如图 12E 所示。

γ -Tocopheric 酸 6(图 12F)具有表示 4 个不饱和度的分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}_5$ (HRAPCI-MS)。在 3314 (br)和 1744 cm^{-1} 的 FTIR 吸收表示羟基和羰基。 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱表现出与 $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_4$ 和 $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_5$ 的光谱的一些相似性,但是也存在一些观察到的显著差别。相似性包括存在 6 个甲基,4 个 sp^2 杂化碳,和在 δ_{C} 174.1 (C-23)的羰基样碳,表现出与在 δ_{H} 2.28 (H-22)的次

甲基质子的长范围相关性。差别包括苯并二氢吡喃环系统的打开, ^1H NMR 光谱表现出旋转系统, 所述旋转系统含有在 δ_{H} 4.27 - 4.29 (H-27a, dd, $J=4.0, 12.0$ Hz)和 δ_{H} 4.04 - 4.14 (H-27b, dd, $J=6.0, 12.0$ Hz)的两个亚甲基质子, 所述两个亚甲基质子彼此偶联并且与在 δ_{H} 5.12 (H-2, m)的次甲基质子偶联, 这应用 $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY 和 $^1\text{H} - ^1\text{H}$ 同核退偶实验确定。另外, C28H50O5 的 HMBC 和 $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY 没有表现出在甲基质子和 sp^2 碳之间的长范围相关性, 其是其它 tocotrienoic 酸 C28H48O4, C28H48O5 和 C28H46O4 的共有事实, 表示叶绿醇侧链的饱和性, 其将这一结构限制为 γ -生育酸的衍生物。MS/MS 光谱分析证实存在羧基, 由于失水形成的片段以及由于 C12 和 C13 之间的分裂的结果形成的两种常见的片段, m/z 241 和 223。这表明除了在 C2 和 C3 之间的开环以及叶绿醇侧链的饱和性之外, 其余的结构特征与其它鉴定的 tocotrienoic 酸 C28H48O4, C28H48O5 和 C28H46O4 的那些结构特征相似。因此, 指定 γ -生育酸的结构如图 12F 的 6。

通过分别评估它们的 MS/MS 断裂数据, 如在图 12G 和 12H 中所示, 组装其余两种生物标记, C₅₈H₅₀O₄ (7, 图 12G)和 C₂₈H₅₂O₅ (8, 图 12 H)的结构, 所述两种生物标记不能通过使用检测的溶剂系统的制备 TLC 而分离。

从血清中分离代谢物, 并且通过 NMR 再次证实结构。使用乙酸乙酯 (500 mL, 3 \times) 总共提取 200 mL 血清, 使用氮气蒸发器干燥, 并且将提取物在 4 mL 甲醇中再生。将所述提取物以级分收集模式(100 μL 注射, 40 \times)进行 LC/MS, 级分在 1 分钟的窗口收集持续 52 分钟。预测的代谢物, 其在 15-17 分钟内洗脱下来, 收集起来并且使用氮气蒸发器浓缩至干燥 (约 32 mg)。将在 ^1H NMR 光谱中表现出生育酚相关化合物的混合物的半纯化的级分进行制备 TLC, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{己烷}$ (2: 1)展层, 以产生 γ -tocotrienoic 酸 3 (3.6 mg)和 γ -tocotrienoic 酸 4 (2.5 mg)。将其余的条带合并 (约 22 mg), 并且进一步用于制备 TLC, 使用环己烷- $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{EtOAc}$ (35:5:1, 2 次), 以产生 γ -tocotrienoic 酸 5 (3.4 mg), γ -生育酸 6 (4.6 mg)和证明是混合物的级分(6.6 mg)。

γ -Tocotrienoic 酸 3

TLC $R_f = 0.81$ (环己烷- CH_2Cl_2 -EtOAc, 10:4:1); 关于 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱, 参见表 11 和 12; FTIR (cm^{-1}) 3315 (br), 2935, 2852, 1741, 1465, 1377, 1178, 726; HRAPCI-MS m/z : 测量的 447.3490 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 关于 $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{O}_4$ 计算的 447.3480)。MS/MS m/z (相对强度): 447 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 50%), 429 (45%), 403 (100%), 385 (20%), 279 (10%)。

γ -Tocoenic 酸 4

TLC $R_f = 0.21$ (环己烷- CH_2Cl_2 -EtOAc, 10:4:1); 关于 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱, 参见表 11 和 12; FTIR (cm^{-1}) 3347 (br), 2935, 2868, 1743, 1466, 1377, 1057, 958; HRAPCI-MS m/z : 测量的 463.3449 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 关于 $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{O}_5$ 计算的 463.3429); MS/MS m/z (相对强度): 463 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 100%), 445 (50%), 419 (90%), 401 (25%), 241 (20%)。

γ -Tocoenic 酸 5

TLC $R_f = 0.79$ (环己烷- CH_2Cl_2 -EtOAc, 10:4:1, UV 活性点); 关于 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱, 参见表 11 和 12; FTIR (cm^{-1}) 3125 (br), 2941, 2855, 1736, 1556, 1466, 1377, 1177, 1008, 773; HRAPCI-MS m/z : 测量的 445.3333 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 关于 $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{O}_4$ 计算的 445.3323)。MS/MS m/z (相对强度): 445 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 100%), 427 (60%), 401 (85%), 383 (40%), 223 (12%), 205 (20%), 177 (10%), 162 (18%)。

γ -生育酸 6

TLC $R_f = 0.62$ (环己烷- CH_2Cl_2 -EtOAc, 10:4:1, UV 活性点); 关于 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱, 参见表 11 和 12; FTIR (cm^{-1}) 3314 (br), 2926, 2854, 1744, 1465, 1379, 1253, 1145, 722; HRAPCI-MS m/z : 测量的 465.3588 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 关于 $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{O}_5$ 计算的 465.3585)。MS/MS m/z (相对强度): 465 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 100%), 447 (50%), 421 (35%), 403 (20%), 349 (10%), 279 (18%)。

实施例 4. 高通量筛查(HTS)方法研发和独立样品组的分析

然后, 对于应用 FTMS 方法发现并且应用 LC-MS 方法证实的 6 种主

要的生物标记，研发高通量的分析方法。

如所述提取血清样品用于非目标性 FTMS 分析。乙酸乙酯有机级分用于分析每份样品。向每份 120 μL 乙酸乙酯的样品等分试样中加入 15 μL 内标（在甲醇中的 1 ng/mL 的(24- ^{13}C)-胆酸），总体积 135 μL 。自动取样器通过流动-注射分析将 100 μL 样品注射到 4000QTRAP 中。载体溶剂是 90%甲醇：10%乙酸乙酯，流速 360 μL /分钟，进入 APCI 源中。

MS/MS HTS 方法在四极线性离子捕获 ABI 4000QTrap 质谱仪上展开，所述质谱仪装配 Turbo VTM 源，具有 APCI 探头。能源气体参数如下：CUR: 10.0, CAD: 6, NC: -3.0, TEM: 400, GS1 : 15, 界面加热器打开。“化合物”设置如下：入口电势(EP): -10, 和碰撞元件出口电势（collision cell exit potential (CXP)）: -20.0。本方法基于每种代谢物一种亲本离子转换，内源持家基因的一次转换和内标的单一转换的多反应监测(MRM)。每种转换监测 250 毫秒，持续 2.3 秒的总循环时间。每份样品的总获得时间是约 1 分钟。完整方法的概括在图 26 中显示。概言之，本方法测量所述 6 种生物标记中每一种的强度，和内标(IS)转换（如在图 27A-27F 中所示），以及先前确定内源存在于人的血清中的“持家”生物标记转换（图 27G）。持家生物标记是鉴定为不随疾病状态改变的代谢物，并且应该在任何正确制备的血清样品中检测到。因此，“持家”生物标记的目的是保证从多个位点收集的样品与所述 HTS 检测相容。然后通过确定每名患者的所述 6 种测量的生物标记：IS 转换的最低平均-标准化的 $\log(2)$ 转化比例而产生患者得分。然后，将这一值与从正常个体产生的得分分布进行比较，并且因此指定 CRC 危险因子。我们证实使用上述方法 ABI 4000QTrap 能够准确地测量转换峰面积，其通过绘制 6 种生物标记的每一种以及持家代谢物的生物标记转换相对内标转换的峰面积比例而进行（图 26）。另外，HTS 方法还结合一系列参照血清材料的稀释物，其允许确定并且保证仪器的线性。如果没有检测到持家代谢物，或者校正曲线具有 >0.98 的 R^2 值，那么认为样品运行失败并且所述样品需要重新运行。

为了验证所述维生素 E 样分子与 CRC 相关的最初发现，使用上述 HTS 方法分析一个独立的样品组，其包括 186 份 CRC，288 份正常，24 份前列腺癌，25 份卵巢癌，30 份肾细胞癌，25 份肺癌和 20 份乳腺癌样品。这种

分析的结果总结在表 13A 中，其表明，当应用-1.3 的截点比例来确定谁应该被认为处于存在 CRC 的高危险时（参见图 28 中的正常分布和图 29 的诊断输出），所述方法关于 CRC 的灵敏度约 78%。这一结果无可辩驳地验证这些新维生素 E 样分子减少的水平与结肠癌的存在。然而，这里还确定横向癌症比较分别表明在卵巢癌中 70%的灵敏度，对肾细胞和肺癌为 36-40%的灵敏度。这些灵敏度值是基于对于 CRC89%的特异性截点而选择的（这等于约 5%的假阳性率，由于正常分布，如在图 28 中所示，是基于通过结肠镜检查没有被证实无病的个体）。先前已经清楚地报道，当内窥镜检查时，达到 10%的平均到低危险性群体关于高级发育异常是阳性的，这不能在我们的分布中得到解释[52]。尽管非 CRC 癌症组在数量上相对少，但是检测结果与卵巢癌的重叠是显著的，因此卵巢癌的诊断包含在本申请中。最后，需要检测更大的非 CRC 癌症群体以验证这些结果。

我们还是要用随机选择的正常和 CRC-阳性个体的子集来验证由于年龄、种族、BMI 和性别引起的偏好，并且在任何这些变量种类内的所述生物标记水平中没有观察到显著的差别（表 13B）。另外，我们没有观察到对分组为 CRC 阶段 I/II 或 III/IV (TNM)的患者或者对存在或不存在息肉的患者的偏好（表 13B）。

实施例 5: 在 CRC 和 OC 中紊乱的代谢途径的生物学解释

基于 6 种生物标记的结构说明，和 FTMS 数据的进一步研究，假设与自由基形成和 CRC 相关的其它洞察力。

对推定的生育酚和 tocotrienal 代谢物的进一步研究表明，在 CRC 患者群体中观察到血清中 α 和 γ -生育酚的浓度都显著下降（见图 11）。我们计算 α/γ -生育酚的比例为 6.3，这与先前报道的文献值一致。特别表明这样的观察，尽管观察到血清 α -生育酚强度显著高于 γ 的强度，但是在正常和在 CRC 患者中都观察到具有与 ω -氧化的 γ -生育酚/生育三烯酚代谢物相对应的分子式的 6 种代谢物，所述代谢物从未在文献中报道过，而没有观察到 ω -氧化的 α -生育酚代谢物。这些发现与 Sontag 和 Parker [53]最近的发现一致，其中表明，在人肝 HepG2 细胞中对于 γ -生育酚的 ω COOH 形成比 α -生育酚高出 $50\times$ 更多。对于生育三烯酚也已经观察到这种 ω 羧化

事件和随后的生育酚成为各种羟化苯并二氢吡喃醇的代谢[17]。据信，Sontag 和 Parker [53]或 Birringer 等[17]没有发现这些代谢物的原因是这些科学家所述的 ω -氧化机制是在未修饰的 α -和 γ -生育酚/生育三烯酚代谢物上进行的。我们的结果表明， ω -氧化发生在 γ -生育酚/生育三烯酚已经与自由基反应之后，可能在结肠/卵巢上皮细胞中，或者在结肠/卵巢上皮细胞中同时发生。

在 CRC 中观察到减少的许多其它代谢物具有与推测鉴定为 γ -生育酚或 γ -生育三烯酚-相关的那些相似的分子式。基于碳分子数目，这些代谢物属于三大类，具体地，它们是否具有 30 个、32 个或 36 个碳（图 11）。后来假设这些代谢物来源于 γ -生育酚和来自亚麻酸、亚油酸和油酸脂质残基的过氧自由基之间的反应（下文所述）。在肝脏中首次通过代谢过程中，这些 γ -生育酚/生育三烯酚的代谢衍生物随后通过 P450 进行 ω 氧化。

不希望受到任何具体理论的束缚，本发明公开一种假说（图 36），通过考虑特异性脂肪酸、维生素 E 同种型和相关代谢物的减少的水平不是单纯饮食缺乏的结果，而是维生素 E 和相关分子的结肠上皮摄取的消弱，而将维生素 E 和相关代谢物的作用包含在 CRC 和 OC 的确定和发展中。这种消弱代表在正常或升高的氧化压力负担下充分提供抗氧化剂能力的限速步骤。在这种模型中，CRC 或 OC 发展的起始事件是在结肠上皮细胞中缺乏维生素 E γ 。假定在两名个体中相等的饮食，具有向结肠上皮细胞减弱的维生素 E 转运的人具有升高的自由基。然后这变成直接与减少的血清维生素 E 代谢物成比例，如在本申请中所述。然而，所述假说还考虑到，由于对花生四烯酸的减小的竞争性抑制作用，如在本申请中先前所述，所得到的血清中减少的 ω -COOH 代谢物水平将对前列腺素生物合成途径具有负抑制作用。我们假设所得到的前列腺素途径的活化参与其它上皮细胞来源的癌症的发展，特别是卵巢癌的发展。我们还考虑到 CRC 中的 COX 途径通过这一机制的进一步活化，其可以解释非类固醇抗炎药物（NSAIDS）作为 CRC 和其它癌症的预防药剂的充分确定的作用。

关于 CRC 和 OC 的治疗策略，这些发现是有意义的。在这些疾病中，炎症是危险因素。已经表明 γ -生育酚和 γ -羧基乙基羟基色原烷醇(CEHC)减少花生四烯酸介导的炎症。这种 γ -生育酚活性的延迟表明 γ -生育酚可能

是实际的生物活性分子的前体。多种 ω COOH γ -生育酚/生育三烯酚代谢物的发现表明这些是内源的抗炎药剂,并且在这些代谢物中的减少可以导致或者成为与 CRC 和 OC 相关的炎症的指征。

很久以来一直认为自由基在结肠癌的病因学中其作用[36], [54], [55]。在本申请中,我们第一次阐述完整的假说,所述假说表明 CRC 与慢性过氧化物压力相关,并且 γ -生育酚具有独特的抗氧化性质,所述抗氧化性质对于维持结肠和卵巢上皮细胞的健康氧化状态很重要。尽管[56]提及 γ -生育酚的抗氧化性质,但是假定这些性质等价于 α -生育酚的那些性质。本发明鉴定表明 γ -生育酚/三烯甘油酯或相关代谢物可能具有独特的脂质自由基清除机制的独特的代谢物。这些发现对 CRC 和 OC 相对其它癌症的高选择性程度(表 13)——与先前的报道结合,先前的报道表明优先将 γ -生育酚摄取到结肠上皮细胞中,在结肠上皮细胞中相对 α -生育酚更高浓度的 γ -生育酚,相对生育酚提高的三烯甘油酯生物活性,和相对 α -生育酚的 γ -生育酚提高的转换——是支持 γ -生育酚/三烯甘油酯-相关作用选择性参与上皮细胞动态平衡的假说的有利证据。

已经充分确定,抗氧化剂随着它们作用的过程消耗,并且这一功能实时运行;即,一天过量的抗氧化剂能力不弥补另一天不足的抗氧化剂能力。除了相对较小的再循环机制,抗氧化剂具有有限的能力和保存时间,并且一旦它们被用尽,氧化反应不受限制地进行。由于这一原因,选择能够中和多种自由基分子的抗氧化剂分子将是生物学有利的。提议单个 γ -生育酚/生育三烯酚分子可以中和多达 6 个自由基分子的机制,并且得到关于自由基传播的分析数据和先前的文献的支持。

已经广泛研究了脂质氧化的过程。图 30 举例说明不饱和脂肪酸(亚麻酸用作实例)的自动氧化过程。概言之,氢自由基从烃分子上被夺取(图 30A)。这种夺取,由光、热、放射、金属离子或自由基调控,相对饱和烃在不饱和烃中非常有利。在生物系统中,过氧化物形成是起始步骤(图 30A)。然后过氧化物自由基可以 a)通过 γ -生育酚-羟化物稳定(图 30B),或 b)它可以与 γ -生育酚过氧化物自由基反应(图 30C),在两种情形中都形成半稳定的过氧化物。然后这两种过氧化物通过铁-催化的芬顿反应[36]或在通过氧化氮的不依赖铁的方式中[57], [58]转化成羟化物自由基。尽管

已经表明在体外解毒二氧化氮中 γ -生育酚优于 α -生育酚[59]，但是 Stone 等[60]的体内研究清楚地证明，在用比例分别为~2: 1 和 1: 18 的高或低 γ/α -生育酚比例的饮食饲养的大鼠中，使用推荐的每日铁量或富含 8 倍的饮食，观察到增加的铁离子显著减少结肠细胞中(32%)和血浆中(18%)的 γ -生育酚水平和在结肠细胞中的 α -生育酚水平(22%)。增加的铁对肝或粪便中的 α -或 γ 生育酚的浓度没有影响。相对于小肠，在胃肠道中增加的铁浓度基本上在结肠中更高。估计在结肠中的铁浓度比在其它组织中发现的那些高 10 倍[36]。因此，在结肠中的自由基形成更可能是铁催化的事件。

羟基自由基夺取氢自由基，以形成稳定的水分子，并且留下脂质自由基。所有的生育酚和生育三烯酚可以中和这些羟基自由基，由此防止脂质自由基形成。然而，当脂质自由基形成时，抗氧化剂的活性与它同脂质自由基协同定位能力相关。已经表明，维生素 E 同种型包含最佳的植基侧链长度，从而结合到脂质膜中，这使得这些分子适合消除来自膜的脂质自由基。

没有消除的脂质自由基容易与氧反应以形成脂质过氧化物自由基(图 30A)。生育酚/生育三烯酚可以为脂质过氧化物提供氢自由基，导致通过 chromanin 结构而稳定的生育酚/生育三烯酚自由基和得到的脂质氢过氧化物的形成(图 30B)。当正常条件下，自由基传播在这一步停止。生育酚/生育三烯酚自由基能够与第二个脂质过氧化物自由基反应，形成生育酚/生育三烯酚过氧化物，其为偶电子分子(图 30C)。尽管氢/烷基过氧化物分子不是自由基，但是 O-O 键是高能量的，它的断裂是高能有利的(图 30D)。已知促进氢过氧化物断裂的两种最有潜力的催化剂是铜和铁。由于在本申请中先前已经提及，大肠是特别集中的铁来源。因此，这些氢过氧化物可以断裂成羟基自由基和脂质氧化物自由基，由此重新起始自由基传播顺序。如同游离脂质氢过氧化物，推测在铁或铜存在下，生育酚/生育三烯酚过氧化物对断裂敏感。

本发明提出关于这种过氧化物内部降解成为稳定的生育酚/生育三烯酚烷基醚和脂质醛的新机制。所提出的反应产生两种热动力学稳定的产物。提出由在内源脂质中存在的三种主要不饱和脂肪酸残基——亚麻酸、亚油酸和油酸——形成的过氧化物，通过这种机制被生育酚/生育三烯酚

中和 (图 31A-C)。这种机制似乎是 γ -生育酚选择性的, 并且得到这样的观察的支持, 即, 在人中形成 C30、C32 和 C36, γ -生育酚而不是 α -生育酚的副产物。对于通过起始氢过氧化物的降解产生稳定的产物不存在这样的机制, 所述起始氢过氧化物从在铁存在下降解的中性生育酚/生育三烯酚反应产生 (图 32)。这一反应产生羟基自由基和脂质氧化物自由基, 并且因此需要通过常规方法进行中和。所述脂质氧化物自由基可以自发降解成醛和自由基烷烃或烯烃 (图 33)。我们提出生育酚/生育三烯酚可以中和得到的自由基烷烃的另外的机制。我们提议 γ -生育酚/生育三烯酚的不受阻的芳香环结构可以接受来自自由基烷烃的氢自由基, 形成环-稳定的生育酚/生育三烯酚自由基和稳定的烯烃 (图 34)。通过这种机制, γ -生育酚/生育三烯酚将能够中和多达 6 种烷烃自由基。这种假说得到 γ -生育酚代谢物的观察的支持, 其中所述芳香环还原成单一的双键。因此, 表明 γ -生育酚可以接受最多 4 个氢自由基 (图 34)。这两种机制的结果, 一分子 γ -生育酚/生育三烯酚能够中和 6 分子自由基。

如先前所讨论, 在肝脏中首次通过代谢过程中, 由这些提议的机制导致的 γ -生育酚-相关代谢物通过 P450 进行 ω -氧化 (图 35)。

参考文献

1. Boyle, P.和 M.E. Leon, *Epidemiology of colorectal cancer* (结肠直肠癌流行病学). Br Med Bull, 2002. 64: 第 1-25 页.
2. Ahlquist, D.A.,等, *Fecal blood levels in health and disease. A study using HemoQuant* (健康和疾病中的便血水平. 应用 HemoQuant 的研究). N Engl J Med (新英格兰医学杂志), 1985. 312(22): 第 1422-8 页.
3. Winawer, S., 等, *Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence* (结肠直肠癌筛查和监督: 基于新迹象的临床指导和原理-更新). Gastroenterology (肠胃病学), 2003. 124(2): 第 544-60 页.
4. Rex, D.K., 等, *Colorectal cancer prevention 2000: screening recommendations of the American College of Gastroenterology* (结肠直肠癌预防 2000: 美国肠胃病学学院的筛查建议). American College of

- Gastroenterology (美国肠胃病学学院). Am J Gastroenterol (美国肠胃病学杂志), 2000. 95(4): 第 868-77 页.
5. Hixson, L.J., 等, *Prospective study of the frequency and size distribution of polyps missed by colonoscopy* (结肠显微镜检查遗漏的息肉的频率和大小分布的预测研究). J Natl Cancer Inst (国家癌症协会杂志), 1990. 82(22): 第 1769-72 页.
6. Lidofsky, S., *Detection and prevention of colon cancer: colonoscopy, virtual colonoscopy, and DNA stool tests* (结肠癌的检测和预防: 结肠显微镜检查, 虚拟结肠显微镜检查, 和 DNA 大便检测). Med Health R I (罗得岛医学和健康), 2005. 88(3): 第 82-5 页.
7. Davies, R.J., R. Miller, 和 N. Coleman, *Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis* (结肠直肠癌筛查: 分子大便分析的前景). Nat Rev Cancer (自然癌症综述), 2005. 5(3): 第 199-209 页.
8. *Screening for ovarian cancer: recommendation statement* (筛查卵巢癌: 建议综述). Ann Fam Med (家庭医学年刊), 2004. 2(3): 第 260-2 页.
9. Chu, CS.和 S.C. Rubin, *Screening for ovarian cancer in the general population* (在普通群体中筛查卵巢癌). Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol (临床产科学和妇科学的最佳实践和研究), 2005.
10. Hanna, L. 和 M. Adams, *Prevention of ovarian cancer* (卵巢癌预防). Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol (临床产科学和妇科学的最佳实践和研究), 2005.
11. Rosenthal, A. 和 I. Jacobs, *Familial ovarian cancer screening* (家族卵巢癌筛查). Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol (临床产科学和妇科学的最佳实践和研究), 2005.
12. Cook, M. G. 和 P. McNamara, *Effect of dietary vitamin E on dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice* (在小鼠中饮食维生素 E 对二甲胂-诱导结肠肿瘤的作用的). Cancer Res (癌症研究), 1980. 40(4): 第 1329-31 页.
13. Coulter, I.D., 等, *Antioxidants vitamin C and vitamin e for the prevention and treatment of cancer* (抗氧化剂维生素 C 和维生素 e 用于癌症的预防和

- 治疗). *J Gen Intern Med* (普通内科医学杂志), 2006. 21(7): 第 735-44 页.
14. Theriault, A., 等, Tocotrienol: a review of its therapeutic potential (生育三烯酚: 其治疗潜力的综述). *Clin Biochem* (临床生物化学), 1999. 32(5): 第 309-19 页.
15. Serbinova, E., 等, Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol (在 α -生育酚和 α -生育三烯酚的抗氧化剂性质中的自由基再循环和膜内移动). *Free Radic Biol Med* (自由基生物学), 1991. 10(5): 第 263-75 页.
16. Lee, B.L., A.L. New, 和 C.N. Ong, *Simultaneous determination of tocotrienols, tocopherols, retinol, and major carotenoids in human plasma* (在 人血清中同时确定生育三烯酚、生育酚、视黄醇和主要的类胡萝卜素). *Clin Chem* (临床化学), 2003. 49(12): 第 2056-66 页.
17. Birringer, M., 等, Identities and differences in the metabolism of tocotrienols and tocopherols in HepG2 cells (在 HepG2 细胞中生育三烯酚和生育酚代谢的相同和差别). *J Nutr* (营养学杂志), 2002. 132(10): 第 3113-8 页
18. Bieri, J. G. 和 R.P. Evarts, *Gamma tocopherol: metabolism, biological activity and significance in human vitamin E nutrition* (γ -生育酚: 在人维生素 E 营养中的代谢、生物活性和重要性). *Am J Clin Nutr* (美国临床营养学杂志), 1974. 27(9): 第 980-6 页.
19. Traber, M.G., Determinants of plasma vitamin E concentrations (血浆维生素 E 浓度的确定). *Free Radic Biol Med* (自由基生物学), 1994. 16(2): 第 229-39 页.
20. Princen, H. M., 等, *Supplementation with low doses of vitamin E protects LDL from lipid peroxidation in men and women* (在男人和女人中补充低剂量的维生素 E 防止 LDL 脂质过氧化作用). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (动脉硬化、血栓和血管生物学), 1995. 15(3): 第 325-33 页.
21. Schaffer, S., W. E. Muller, 和 G. P. Eckert, *Tocotrienols: constitutional effects in aging and disease* (生育三烯酚: 在衰老和疾病中的组成性作用). *J Nutr* (营养学杂志), 2005. 135(2): 第 151 -4 页.

22. Winklhofer-Roob, B.M., M.A. van't Hof, 和 D.H. Shmerling, *Reference values for plasma concentrations of vitamin E and A and carotenoids in a Swiss population from infancy to adulthood, adjusted for seasonal influences* (在从婴儿到成年的瑞士人口中的维生素 E 和 A 和类胡萝卜素的血浆浓度的参照值, 季节影响调整). *Clin Chem (临床化学)*, 1997. 43(1): 第 146-53 页.
23. Qureshi, A. A.,等, *Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee)* (通过生育三烯酚(palmvitee)降低高胆固醇人中的血清胆固醇). *Am J Clin Nutr (美国临床营养学杂志)*, 1991. 53(4 Suppl): 第 1021S-1026S 页.
24. Qureshi, A.A., 等 , *Novel tocotrienols of rice bran suppress cholesterologenesis in hereditary hypercholesterolemic swine* (大米糠新的生育三烯酚抑制遗传高胆固醇猪中的胆固醇产生). *J Nutr (营养学杂志)*, 2001. 131(2): 第 223-30 页.
25. Sen, CK., S. Khanna, 和 S. Roy, *Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols* (生育三烯酚: 维生素 E 超过生育酚). *Life Sci (生命科学)*, 2006. 78(18): 第 2088-98 页.
26. Khanna, S., 等, *Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration* (维生素 E 作用的分子基础: 生育三烯酚调控 12-脂加氧酶, 谷氨酸-诱导的神经退化的主要调控因子). *J Biol Chem (生物的化学杂志)*, 2003. 278(44): 第 43508-15 页.
27. Qureshi, A.A., 等, *Synergistic effect of tocotrienol-rich fraction (TRF(25)) of rice bran and lovastatin on lipid parameters in hypercholesterolemic humans* (大米糠的富含生育三烯酚的级分(TRF(25))和抑甲羟酶素对高胆固醇人中的脂质参数的协同作用). *J Nutr Biochem (营养生物化学杂志)*, 2001. 12(6): 第 318-329 页.
28. Adachi, H.和 N. Ishii, *Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in *Caenorhabditis elegans** (在秀丽隐杆线虫中生育三烯酚对生命期限和蛋白羰基化的作用). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci (老年医学)*

- 杂志系列 A: 生物科学和医学科学), 2000. 55(6): 第 B280-5 页.
29. Nesaretnam, K., 等, *Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture* (生育三烯酚对培养物中的人乳腺癌细胞系生长的作用). *Lipids* (脂质), 1995. 30(12): 第 1139-43 页.
30. McIntyre, B. S., 等, *Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells* (生育酚和生育三烯酚对正常的小鼠乳房上皮细胞的抗增殖和凋亡作用). *Lipids* (脂质), 2000. 35(2): 第 171-80 页.
31. Jiang, Q. 和 B.N. Ames, *Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats* (γ -生育酚而不是 α -生育酚在大鼠中减少促炎性类花生酸和炎症损害). *Faseb J* (美国实验生物学学会联合杂志), 2003. 17(8): 第 816-22 页.
32. Jiang, Q., 等, *gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells* (γ -生育酚及其主要代谢物, 与 α -生育酚相反, 抑制巨噬细胞和上皮细胞中的环加氧酶活性). *Proc Natl Acad Sci U S A* (美国国家科学院学报), 2000. 97(21): 第 11494-9 页.
33. Tran, K. 和 A.C. Chan, *Comparative uptake of alpha- and gamma-tocopherol by human endothelial cells* (人上细胞对 α -和 γ -生育酚的比较摄取). *Lipids* (脂质), 1992. 27(1): 第 38-41 页.
34. Nair, P.P., 等, *Uptake and distribution of carotenoids, retinol, and tocopherols in human colonic epithelial cells in vivo* (类胡萝卜素、视黄醇和生育酚在人结肠上皮细胞中的体内摄取和分布). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (癌症流行病学生物标记和预防), 1996. 5(11): 第 913-6 页.
35. Ingles, S.A., 等, *Plasma tocopherol and prevalence of colorectal adenomas in a multiethnic population* (血浆生育酚和结肠直肠癌在多种族群体中的流行). *Cancer Res* (癌症研究), 1998. 58(4): 第 661-6 页.
36. Babbs, C. F., *Free radicals and the etiology of colon cancer* (自由基和结肠癌的病因). *Free Radic Biol Med* (自由基生物医学), 1990. 8(2): 第

191-200 页.

37. Reboul, E., 等, *Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte* (清除剂受体 B 类 I 型(SR-BI)参与维生素 E 穿过消化道细胞的转运). *J Biol Chem* (生物的化学杂志), 2006. 281(8): 第 4739-45 页.

38. Reo, N.V., *NMR-based metabolomics* (基于 NMR 的方法学). *Drug Chem Toxicol* (药物化学毒性), 2002. 25(4): 第 375-82 页.

39. Fiehn, O., 等, *Metabolite profiling for plant functional genomics* (关于植物功能基因组的代谢物描述). *Nat Biotechnol* (自然生物技术), 2000. 18(11): 第 1157-61 页.

40. Hirai, M.Y., 等, *Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana* (拟南芥中理解对营养胁迫的全体反应的转录物组学和代谢物组学综合). *Proc Natl Acad Sci U S A* (美国国家科学院学报), 2004. 101(27): 第 10205-10 页.

41. Roessner, U., 等, *Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems* (代谢描述允许理解遗传或环境修饰的植物系统的表型). *Plant Cell* (植物细胞), 2001. 13(1): 第 11-29 页.

42. Castrillo, J. I., 等, *An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry* (使用直接输注的电喷雾质谱仪在酵母中进行代谢组分析的最佳方法). *Phytochemistry* (植物化学), 2003. 62(6): 第 929-37 页.

43. Fiehn, O., *Metabolomics- the link between genotypes and phenotypes* (代谢物组学-基因型和表型之间的联系). *Plant Mol Biol* (植物分子生物学), 2002. 48(1-2): 第 155-71 页.

44. Aharoni, A., 等, *Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry* (通过使用傅里叶变换离子回旋加速质谱仪进行无目标性代谢物组分析). *Omics* (组学), 2002. 6(3): 第 217-34 页.

45. Hirai, M. Y., 等, *Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics* (通过结合代谢物组学和转录物组学解释拟南芥中基因-对-基因和代谢物-对-基因的网络). *J Biol Chem* (生物的化学杂志), 2005. 280(27): 第 25590-5 页.
46. Murch, S.J., 等, *A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (Scutellaria baicalensis Georgi) genotypes: discovery of novel compounds*(黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)基因型中药学多样性的代谢物组学分析:发现新的化合物). *Plant Cell Rep*(植物细胞报道), 2004. 23(6): 第 419-25 页.
47. Tohge, T., 等, *Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor* (通过综合分析过表达 MYB 转录因子的拟南芥植物的代谢物组和转录物组的功能基因组学). *Plant J*(植物杂志), 2005. 42(2): 第 218-35 页.
48. Tibshirani, R., 等, *Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression* (通过缩小基因表达的质心诊断多种癌症). *Proc Natl Acad Sci U S A*(美国国家科学院学报), 2002. 99(10): 第 6567-72 页.
49. Wu, B., 等, *Comparison of statistical methods for classification of ovarian cancer using mass spectrometry data* (使用质谱数据分类卵巢癌的比骄傲和统计学方法). *Bioinformatics* (生物信息学), 2003. 19(13): 第 1636-43 页.
50. Pearce, B.C., 等., *Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols*(合成的和天然的生育三烯酚的降低胆固醇活性). *J Med Chem* (医学化学杂志), 1992. 35(20): 第 3595-606 页.
51. Han, N. M., 等, *Isolation of palm tocotols using supercritical fluid chromatography* (应用超临界流体层析分离棕榈母育酚). *J Chromatogr Sci* (层析科学杂志), 2004. 42(10): 第 536-9 页.
52. Collins, J.F., 等, *Accuracy of screening for fecal occult blood on a single stool sample obtained by digital rectal examination: a comparison with*

- recommended sampling practice* (在通过数字直肠检查获得的单一大便样品上筛查大便潜印血的准确性: 与推荐的取样操作的比较). *Ann Intern Med* (内科医学年刊), 2005. 142(2): 第 81-5 页.
53. Sontag, T.J. 和 R.S. Parker, *Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status* (生育酚分解代谢的细胞色素 P450 ω -羟化酶途径。维生素 E 状态调控的新机制). *J Biol Chem* (生物的化学杂志), 2002. 277(28): 第 25290-6 页.
54. Blakeborough, M.H., R. W. Owen, 和 R.F. Bilton, *Free radical generating mechanisms in the colon: their role in the induction and promotion of colorectal cancer?* (结肠中的自由基产生机制: 它们在诱导和促进结肠直肠癌中的作用?) *Free Radic Res Commun* (自由基研究通讯), 1989. 6(6): 第 359-67 页.
55. Graf, E 和 J.W. Eaton, *Dietary suppression of colonic cancer. Fiber or phytate?* (结肠癌的饮食抑制。纤维或肌醇六磷酸?) *Cancer* (癌症), 1985. 56(4): 第 717-8 页.
56. Campbell, S., 等, *Development of gamma (gamma)-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent* (γ (gamma)-生育酚作为结肠直肠癌化学预防剂的研发). *Crit Rev Oncol Hematol* (肿瘤学/血液学的重要综述), 2003. 47(3): 第 249-59 页.
57. Rubbo, H., 等, *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives* (超氧化物和过氧亚硝酸盐依赖型脂质过氧化反应的氧化氮调控。含有氮的氧化脂质衍生物的形成). *J Biol Chem* (生物的化学杂志), 1994. 269(42): 第 26066-75 页.
58. Radi, R., 等, *Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide* (过氧亚硝酸盐-诱导的膜脂质过氧化反应: 超氧化物和氧化氮的细胞毒性潜力). *Arch Biochem Biophys* (生物化学和生物物理学档案), 1991. 288(2): 第 481-7 页.

59. Cooney, R. V., 等, *Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol* (γ -生育酚的二氧化氮解毒作用: 优于 α -生育酚). *Proc Natl Acad Sci U S A* (美国国家科学院学报), 1993. 90(5). 第 1771-5 页.
60. Stone, W. L., 等, *The influence of dietary iron and tocopherols on oxidative stress and ras-p21 levels in the colon* (饮食铁离子和生育酚对氧化胁迫和结肠中 ras-p21 水平的影响). *Cancer Detect Prev*(癌症检测和预防), 2002. 26(1) 第 78-84 页.

所有的引用都通过引用结合于此。

本发明已经关于一个或多个实施方案进行了描述。然而，本领域的技术人员应该清楚，可以进行许多变化和改进，而不背离本发明的范围。

表 1：CRC 阶段和存活统计 (<http://www.alternative-cancer-treatments.com/colon-cancer-prognosis.htm>)

阶段	TNM	组	组	DUKE'S	预后
阶段 I	T1	N0	M0	Duke's A	5 年存活 > 90%
	T2	N0	M0		
阶段 II	T3	N0	M0	Duke's B	5 年存活 70-85%
	T4	N0	M0		
阶段 III	任意 T	N1	M0	Duke's C	5 年存活 45-55%
	任意 T	N2, N3	M0		
阶段 IV	任意 T	任意 N	M1 (远)	Duke's D	5 年存活 < 5%

T=肿瘤； N=节点参与； M=转移

表 2: 当前 CRC 筛查检测的比较 (由 Devies 等改进)

检测	灵敏性	特异性	成本	完整结肠	非侵入性	优点	缺点
大便潜血检测	中等到低	中等	低	是	是	无肠制备, 可以与灵活的乙状结肠镜结合以提高检测	需要重复的样品, 需要饮食和药物限制
数字直肠检查	低	低	低	否	否	进行简单	患者不舒服
灵活的乙状结肠镜检查	中等到高	高	中等	否	否	允许去除癌症前期的损伤	患者不舒服, 需要肠制备, 有肠穿孔和出血的危险, 需要经过训练的人员, 来自随机试验的数据还未处理
钡灌肠法	中等	中等到高	中等	是	否	比内窥镜筛查更低的肠操作危险	患者不舒服, 需要肠制备, 需要经过训练的人员
结肠镜检查	高	高	高	是	否	允许去除癌症前期的息肉, 在去除息肉之后减少的癌症发生的证据	患者不舒服, 需要肠制备, 有肠穿孔和出血的危险, 死亡率 1-3/10000, 需要静脉内镇静, 需要经过高度训练的人员, 无随机对照试验
仿真结肠	高	高	高	是	是	速度, 不需要镇静, 结肠外和骨盆器官可以成	患者不舒服, 需要肠制备, 高放射剂量, 需要经过训

显微镜检查						像，患者接受性高	练的人员，观察者之间的变化高，有限的特异性，对于扁平腺瘤灵敏性未知
细胞标记	中等到高	中等到高	未知	是	是	单一大便样品足够，不需要肠制备，标本可运输，患者接受潜力高	发展的研究阶段，测定可能是耗时的，缺乏大规模应用的技术
DNA标记	中等到低	中等到高	未知	是	是	单一大便样品足够，不需要肠制备，标本可运输，患者接受潜力高	发展的研究阶段，测定耗时，缺少大规模技术
血清代谢物组*	高	高	低	是	是	需要单一血清样品，标本可运输，患者接受性高，轻便并且潜在地简单，测定结合到常规临床化学实验室中，快速的转换时间，成本很低，潜在检测在完全 CRC 发作之前的危险	可用的试验仍在发展中，对于没有表现出可检测到的腺瘤或 CRC 的高危个体缺少适当的临床措施

*如在本申请中所述

表 3: 在 CRC 和正常血清之间有差别的精确中性质量 ($p < 0.05$, \log_2 转换)

检测的 质量	分析 模式	AVG (log2) 正常	标准 误差 正常	AVG (log2) CRC	标准 误差 CRC	Log(2) 比例	P 值
450.3726	1204	2.367	0.145	0.335	0.149	7.072	2.31E-24
466.3661	1204	2.338	0.157	0.386	0.136	6.052	8.16E-23
499.9401	1202	2.454	0.196	0.254	0.144	9.673	2.16E-21
469.384	1204	3.078	0.139	1.062	0.201	2.899	8.85E-21
592.4711	1204	2.769	0.159	0.794	0.189	3.487	1.54E-19
538.4259	1204	2.843	0.131	1.000	0.199	2.842	3.04E-19
502.405	1204	2.060	0.115	0.553	0.171	3.729	6.10E-18
594.4851	1204	3.471	0.169	1.406	0.225	2.469	7.92E-18
464.3522	1204	2.122	0.142	0.528	0.160	4.019	9.72E-18
446.3406	1204	3.044	0.141	1.137	0.226	2.678	1.19E-17
594.4876	1202	2.602	0.175	0.814	0.166	3.196	2.89E-17
777.5285	1201	3.664	0.087	2.750	0.092	1.332	8.33E-17
492.3829	1204	1.937	0.159	0.399	0.141	4.850	1.46E-16
504.4189	1204	1.835	0.142	0.424	0.146	4.328	5.17E-16
536.4108	1204	2.371	0.119	0.894	0.191	2.652	9.64E-16
801.5542	1202	3.194	0.119	2.084	0.108	1.532	1.21E-15
795.5182	1101	2.286	0.130	1.025	0.133	2.231	1.89E-15
616.4672	1201	1.818	0.169	0.361	0.123	5.036	2.01E-15
595.4896	1204	2.249	0.191	0.534	0.162	4.209	2.62E-15
783.5777	1101	5.534	0.096	4.543	0.119	1.218	5.59E-15
808.5794	1101	4.104	0.077	3.296	0.100	1.245	7.83E-15
802.5576	1202	1.954	0.113	0.812	0.140	2.407	1.49E-14
576.4766	1202	1.763	0.154	0.428	0.133	4.117	1.55E-14
494.3977	1204	2.110	0.168	0.630	0.152	3.348	1.70E-14
577.4798	1204	2.055	0.169	0.519	0.167	3.960	1.79E-14
580.5092	1204	1.593	0.158	0.277	0.120	5.758	1.81E-14
520.3353	1101	1.969	0.103	0.897	0.137	2.195	2.03E-14
784.5809	1101	4.467	0.099	3.480	0.122	1.284	2.04E-14
520.4144	1204	2.424	0.124	1.065	0.183	2.276	2.49E-14
755.5466	1101	2.161	0.115	1.175	0.099	1.838	2.81E-14
807.5761	1101	5.086	0.077	4.315	0.098	1.179	4.13E-14
829.5604	1101	2.570	0.087	1.559	0.144	1.648	4.96E-14
756.5498	1201	2.630	0.095	1.815	0.086	1.449	5.34E-14
519.3318	1101	3.772	0.113	2.595	0.157	1.454	5.48E-14
448.3563	1204	2.591	0.136	1.218	0.181	2.127	7.47E-14
590.4597	1204	1.815	0.155	0.467	0.153	3.883	1.13E-13
595.4925	1202	1.382	0.172	0.130	0.083	10.667	1.33E-13
755.5463	1201	3.794	0.096	3.047	0.072	1.245	2.47E-13
541.3138	1101	3.841	0.114	2.663	0.168	1.442	3.35E-13
542.317	1101	2.075	0.127	0.887	0.157	2.338	3.53E-13
576.4771	1204	3.435	0.154	1.899	0.218	1.809	5.17E-13
579.4963	1204	1.842	0.180	0.437	0.146	4.213	6.58E-13
574.463	1202	1.571	0.158	0.302	0.141	5.206	7.17E-13
574.4607	1204	2.939	0.144	1.485	0.214	1.979	9.40E-13
771.5778	1201	2.571	0.081	1.793	0.111	1.434	1.11E-12
779.5445	1101	5.753	0.106	4.896	0.103	1.175	1.68E-12
446.3406	1202	1.122	0.151	0.117	0.064	9.622	2.41E-12
597.5068	1202	1.653	0.195	0.294	0.114	5.628	2.57E-12
780.5475	1101	4.747	0.107	3.896	0.103	1.218	2.96E-12
518.3976	1204	1.666	0.184	0.330	0.135	5.050	3.35E-12

576.4931	1204	3.080	0.187	1.378	0.248	2.236	4.49E-12
592.4701	1202	1.058	0.159	0.048	0.049	21.965	5.41E-12
596.5029	1204	4.054	0.227	2.121	0.271	1.911	7.71E-12
617.5827	1202	1.929	0.102	1.010	0.136	1.909	8.34E-12
821.5337	1201	3.796	0.056	3.240	0.090	1.171	1.27E-11
597.5076	1204	2.845	0.225	1.098	0.228	2.592	1.66E-11
783.5778	1201	6.912	0.074	6.326	0.079	1.093	1.76E-11
854.5885	1202	4.322	0.101	3.409	0.143	1.268	2.42E-11
447.3433	1204	1.153	0.166	0.110	0.076	10.525	3.19E-11
596.5048	1202	3.032	0.236	1.328	0.208	2.284	3.26E-11
593.4742	1204	1.199	0.179	0.081	0.080	14.774	3.39E-11
829.5599	1201	5.678	0.059	5.099	0.098	1.114	3.50E-11
758.5657	1101	5.811	0.113	4.987	0.103	1.165	3.50E-11
757.5627	1101	6.813	0.117	5.975	0.104	1.140	4.68E-11
784.5811	1201	5.761	0.070	5.207	0.080	1.106	5.54E-11
484.3786	1204	1.065	0.184	0.000	0.000	1.065	5.91E-11
830.5883	1202	5.281	0.114	4.428	0.115	1.193	6.19E-11
853.5845	1202	5.306	0.107	4.402	0.141	1.205	6.49E-11
575.4635	1204	1.675	0.172	0.435	0.162	3.849	8.15E-11
512.4086	1204	1.346	0.218	0.063	0.062	21.466	8.16E-11
452.3876	1204	0.921	0.152	0.030	0.042	30.716	8.35E-11
476.3873	1204	1.353	0.139	0.356	0.130	3.804	9.08E-11
786.5965	1101	5.014	0.090	4.330	0.097	1.158	9.66E-11
830.5632	1201	4.686	0.057	4.113	0.102	1.139	1.03E-10
533.2881	1101	2.090	0.121	1.045	0.172	1.999	1.21E-10
785.5932	1101	6.079	0.089	5.404	0.097	1.125	1.28E-10
829.5846	1202	6.510	0.132	5.584	0.121	1.166	1.51E-10
522.4313	1204	2.524	0.140	1.335	0.195	1.891	1.54E-10
540.4404	1202	1.289	0.166	0.245	0.104	5.265	1.87E-10
469.3865	1204	1.006	0.169	0.045	0.045	22.354	2.06E-10
850.7049	1203	2.885	0.147	1.574	0.226	1.833	2.13E-10
449.3614	1204	1.189	0.160	0.211	0.098	5.629	4.32E-10
540.4397	1204	2.096	0.216	0.710	0.169	2.951	5.41E-10
596.4796	1203	3.393	0.157	2.200	0.193	1.542	6.64E-10
618.4831	1201	1.939	0.207	0.629	0.159	3.083	7.03E-10
312.0014	1101	1.381	0.211	2.718	0.164	0.508	7.54E-10
440.3529	1204	1.169	0.173	0.166	0.094	7.058	1.08E-09
467.3718	1204	0.950	0.163	0.067	0.054	14.116	1.59E-09
822.537	1201	2.677	0.069	2.133	0.096	1.255	1.72E-09
578.4903	1202	1.141	0.171	0.182	0.088	6.270	2.17E-09
339.9965	1101	2.070	0.228	3.376	0.133	0.613	2.35E-09
558.4665	1202	2.384	0.145	1.060	0.264	2.250	3.15E-09
382.1081	1101	0.233	0.094	1.105	0.176	0.211	3.79E-09
599.5006	1203	5.116	0.137	4.193	0.150	1.220	5.59E-09
803.5446	1101	4.329	0.111	3.539	0.139	1.223	6.60E-09
831.5762	1101	3.397	0.080	2.792	0.112	1.217	6.92E-09
804.5477	1101	3.349	0.114	2.551	0.141	1.313	9.08E-09
598.4963	1203	6.342	0.142	5.413	0.153	1.172	1.03E-08
797.5338	1201	3.695	0.071	4.125	0.065	0.896	1.36E-08
416.3666	1204	0.987	0.175	0.079	0.080	12.444	1.39E-08
826.5569	1202	2.314	0.139	1.360	0.173	1.702	1.64E-08
761.5844	1201	3.463	0.078	3.926	0.073	0.882	2.56E-08
879.7421	1203	4.626	0.167	3.620	0.167	1.278	3.85E-08
597.4839	1203	2.015	0.179	0.922	0.185	2.186	4.01E-08
878.7384	1203	5.443	0.166	4.437	0.169	1.227	4.16E-08
851.7098	1203	2.239	0.170	1.100	0.215	2.035	4.28E-08
519.332	1201	2.979	0.072	2.485	0.096	1.199	4.91E-08
868.7532	1203	2.234	0.153	1.193	0.203	1.873	5.20E-08
810.5967	1101	4.041	0.081	3.445	0.124	1.173	5.66E-08
824.6891	1203	2.054	0.201	0.854	0.205	2.405	6.37E-08

809.5934	1101	5.021	0.083	4.443	0.118	1.130	7.39E-08
853.7241	1203	4.663	0.150	3.698	0.183	1.261	7.75E-08
852.7206	1203	5.373	0.149	4.411	0.184	1.218	7.85E-08
798.537	1201	2.627	0.067	3.017	0.066	0.871	8.85E-08
496.4164	1204	2.089	0.186	1.019	0.179	2.050	9.50E-08
858.6852	1202	2.103	0.096	2.673	0.101	0.787	1.12E-07
558.4659	1204	4.053	0.131	3.023	0.235	1.341	1.50E-07
563.595	1102	0.875	0.130	1.657	0.147	0.528	1.67E-07
832.5797	1101	2.426	0.082	1.855	0.123	1.308	1.89E-07
795.5179	1201	5.214	0.062	4.861	0.063	1.073	2.02E-07
782.5653	1101	5.050	0.102	4.437	0.118	1.138	2.09E-07
760.5811	1201	5.562	0.082	6.013	0.077	0.925	2.10E-07
559.4695	1204	2.709	0.123	1.698	0.240	1.596	2.11E-07
779.5439	1201	8.173	0.068	7.796	0.065	1.048	2.17E-07
560.4796	1203	3.168	0.104	2.532	0.126	1.251	2.63E-07
877.7266	1203	2.795	0.194	1.591	0.244	1.756	2.74E-07
825.5533	1202	3.304	0.152	2.461	0.153	1.343	3.25E-07
183.066	1101	3.212	0.092	2.455	0.185	1.308	3.33E-07
758.5654	1201	7.099	0.085	6.647	0.077	1.068	3.36E-07
290.0628	1101	1.143	0.256	0.032	0.045	36.180	3.39E-07
541.3139	1201	2.953	0.076	2.495	0.094	1.184	4.09E-07
565.3391	1202	7.189	0.115	6.499	0.139	1.106	4.17E-07
796.5213	1201	4.064	0.062	3.723	0.063	1.091	4.87E-07
440.2897	1201	0.000	0.000	0.776	0.226	0.000	5.04E-07
845.5341	1201	2.938	0.063	2.518	0.095	1.167	5.07E-07
781.5619	1101	6.005	0.103	5.417	0.116	1.109	5.33E-07
847.5937	1202	1.831	0.157	0.979	0.157	1.869	5.47E-07
422.3404	1204	0.642	0.144	0.025	0.036	25.237	5.47E-07
495.4022	1204	0.753	0.166	0.042	0.041	18.100	5.47E-07
202.0453	1101	3.261	0.222	4.340	0.158	0.751	5.70E-07
803.5676	1202	8.206	0.144	7.440	0.137	1.103	5.76E-07
804.5711	1202	6.699	0.135	6.008	0.118	1.115	6.58E-07
544.4483	1203	2.547	0.142	1.728	0.168	1.474	7.19E-07
561.5983	1102	1.422	0.132	2.159	0.145	0.658	7.20E-07
560.4831	1204	3.752	0.107	2.718	0.276	1.380	7.41E-07
648.3846	1101	0.378	0.102	1.014	0.141	0.372	7.73E-07
218.0369	1102	1.332	0.196	2.429	0.221	0.548	8.72E-07
827.7087	1203	3.409	0.166	2.410	0.217	1.415	9.04E-07
807.5759	1201	7.358	0.050	7.060	0.065	1.042	9.23E-07
826.7047	1203	4.145	0.171	3.170	0.203	1.307	9.68E-07
757.5619	1201	8.087	0.100	7.586	0.085	1.066	9.71E-07
566.3433	1202	5.332	0.101	4.739	0.127	1.125	9.98E-07
805.5616	1101	4.724	0.081	4.184	0.128	1.129	1.03E-06
586.4957	1203	2.208	0.109	1.500	0.165	1.471	1.03E-06
244.056	1101	1.789	0.174	2.644	0.143	0.677	1.16E-06
276.2093	1204	3.348	0.103	2.797	0.109	1.197	1.29E-06
428.3651	1201	3.186	0.070	2.766	0.095	1.152	1.33E-06
744.496	1204	3.432	0.077	2.882	0.139	1.191	1.43E-06
541.4432	1204	0.842	0.183	0.079	0.064	10.679	1.59E-06
823.5494	1201	3.978	0.068	3.612	0.075	1.101	1.68E-06
673.6198	1204	3.299	0.093	3.737	0.072	0.883	1.82E-06
798.6741	1203	1.579	0.205	0.598	0.171	2.641	2.06E-06
521.3476	1101	3.429	0.100	2.753	0.170	1.246	2.07E-06
543.3292	1101	3.593	0.101	2.921	0.168	1.230	2.09E-06
780.5473	1201	7.108	0.059	6.801	0.062	1.045	2.15E-06
743.5483	1204	3.857	0.086	3.407	0.092	1.132	2.20E-06
429.3743	1204	2.242	0.123	1.618	0.122	1.386	2.27E-06
560.4816	1202	1.965	0.128	1.002	0.257	1.962	2.46E-06
744.5537	1204	2.960	0.084	2.515	0.094	1.177	2.71E-06
561.4869	1204	2.350	0.125	1.372	0.267	1.713	2.92E-06

763.5146	1201	1.401	0.131	2.052	0.128	0.683	3.11E-06
555.3103	1102	1.936	0.126	1.230	0.162	1.574	3.19E-06
260.2136	1203	1.742	0.129	1.080	0.139	1.614	3.40E-06
876.7228	1203	3.508	0.201	2.521	0.193	1.391	3.42E-06
524.3666	1101	1.671	0.122	0.952	0.173	1.756	3.43E-06
268.132	1204	0.908	0.144	0.260	0.108	3.497	3.98E-06
661.6227	1204	3.016	0.105	2.518	0.095	1.198	4.47E-06
727.5563	1204	2.134	0.134	1.335	0.197	1.598	4.49E-06
648.5862	1203	4.067	0.086	3.589	0.113	1.133	4.80E-06
758.5096	1204	2.677	0.091	2.168	0.121	1.235	4.82E-06
808.5793	1201	6.244	0.044	5.985	0.064	1.043	5.15E-06
827.5684	1202	7.255	0.139	6.530	0.166	1.111	6.33E-06
828.5726	1202	6.015	0.126	5.362	0.148	1.122	6.54E-06
570.4649	1203	2.474	0.125	1.717	0.196	1.440	6.59E-06
562.4993	1204	2.569	0.118	1.839	0.192	1.397	7.02E-06
392.2932	1204	2.106	0.201	0.988	0.275	2.132	7.35E-06
688.4688	1204	3.330	0.077	2.947	0.086	1.130	8.09E-06
264.2453	1203	2.851	0.098	3.278	0.076	0.870	8.41E-06
559.4698	1202	1.156	0.147	0.399	0.178	2.901	9.51E-06
743.5463	1201	2.075	0.091	1.610	0.109	1.289	9.72E-06
806.5648	1101	3.768	0.084	3.275	0.130	1.151	1.05E-05
565.3398	1102	3.209	0.122	2.559	0.161	1.254	1.11E-05
545.3451	1101	3.523	0.117	2.811	0.193	1.253	1.13E-05
630.4874	1204	3.273	0.195	2.306	0.224	1.420	1.14E-05
523.3633	1101	3.385	0.107	2.713	0.186	1.248	1.23E-05
310.2881	1204	2.825	0.124	3.408	0.127	0.829	1.27E-05
832.6026	1202	5.437	0.119	4.898	0.111	1.110	1.33E-05
880.7535	1203	6.327	0.159	5.592	0.157	1.131	1.34E-05
426.3714	1204	0.671	0.138	0.125	0.079	5.380	1.38E-05
216.0399	1102	2.911	0.205	3.930	0.242	0.741	1.41E-05
793.5987	1101	2.239	0.084	1.808	0.106	1.238	1.45E-05
638.4885	1201	1.839	0.165	1.096	0.160	1.678	1.80E-05
222.0699	1202	2.486	0.203	1.492	0.239	1.666	1.82E-05
257.8107	1101	2.777	0.068	3.098	0.075	0.897	1.95E-05
881.7573	1203	5.629	0.157	4.925	0.153	1.143	1.96E-05
749.541	1204	2.884	0.097	2.271	0.178	1.270	1.99E-05
831.5991	1202	6.714	0.146	6.084	0.128	1.104	2.03E-05
805.5832	1102	2.664	0.094	3.152	0.126	0.845	2.06E-05
550.4605	1204	1.671	0.170	0.881	0.182	1.897	2.10E-05
759.5777	1201	6.723	0.089	7.100	0.074	0.947	2.22E-05
802.5317	1201	2.811	0.137	2.206	0.132	1.274	2.39E-05
253.8165	1101	3.252	0.073	3.571	0.068	0.911	2.41E-05
692.5571	1204	2.642	0.103	3.179	0.144	0.831	2.76E-05
606.415	1202	0.784	0.212	0.044	0.043	17.964	2.84E-05
801.5283	1201	3.911	0.133	3.339	0.122	1.172	2.85E-05
649.5893	1203	3.030	0.096	2.517	0.141	1.204	2.93E-05
430.3817	1204	4.158	0.157	3.535	0.113	1.176	3.22E-05
546.3482	1101	1.930	0.121	1.292	0.176	1.494	3.51E-05
738.5445	1102	1.368	0.100	1.857	0.127	0.737	3.54E-05
188.0491	1102	1.405	0.256	0.448	0.145	3.134	3.68E-05
336.2664	1203	3.612	0.099	3.191	0.091	1.132	3.72E-05
553.3853	1201	0.133	0.067	0.907	0.268	0.146	3.76E-05
263.8453	1101	2.545	0.083	2.912	0.087	0.874	4.05E-05
255.8136	1101	3.727	0.071	4.031	0.069	0.925	4.14E-05
731.491	1204	3.147	0.123	2.568	0.148	1.225	4.16E-05
855.7394	1203	6.558	0.154	5.877	0.161	1.116	4.23E-05
824.5528	1201	2.869	0.069	2.566	0.071	1.118	4.35E-05
772.5279	1204	2.216	0.107	1.624	0.172	1.364	4.42E-05
785.5933	1201	7.132	0.070	6.820	0.075	1.046	4.47E-05
278.2251	1204	5.577	0.108	5.109	0.109	1.091	4.78E-05

566.4556	1204	0.666	0.155	0.110	0.076	6.046	5.03E-05
759.5154	1204	2.271	0.119	1.671	0.167	1.359	5.36E-05
854.7356	1203	7.289	0.158	6.609	0.162	1.103	5.37E-05
763.5147	1202	1.289	0.148	1.919	0.147	0.672	5.37E-05
812.6124	1101	2.277	0.089	1.827	0.126	1.246	5.55E-05
495.3318	1101	5.159	0.100	4.604	0.166	1.121	5.75E-05
249.9647	1101	2.274	0.161	1.511	0.204	1.505	5.79E-05
568.3559	1201	0.018	0.025	0.535	0.191	0.034	6.01E-05
799.6776	1203	0.955	0.193	0.251	0.118	3.804	6.53E-05
563.396	1204	0.996	0.197	0.259	0.135	3.845	6.61E-05
748.572	1102	2.381	0.107	2.886	0.138	0.825	6.91E-05
518.3171	1101	3.505	0.112	2.935	0.165	1.194	6.94E-05
279.2286	1204	3.300	0.109	2.824	0.120	1.168	7.10E-05
517.3137	1101	5.483	0.113	4.913	0.165	1.116	7.11E-05
496.3352	1101	3.327	0.108	2.766	0.165	1.203	7.26E-05
431.3856	1204	2.686	0.149	2.064	0.149	1.302	7.78E-05
328.2412	1204	3.467	0.149	4.078	0.143	0.850	7.97E-05
408.2547	1201	0.447	0.130	1.096	0.190	0.408	8.53E-05
631.491	1204	2.071	0.211	1.175	0.224	1.762	8.68E-05
283.26	1204	7.010	0.124	7.515	0.120	0.933	9.26E-05
277.886	1101	3.032	0.058	3.288	0.068	0.922	9.60E-05
274.1936	1204	1.684	0.110	1.169	0.146	1.441	9.97E-05
536.4799	1203	2.866	0.226	1.889	0.256	1.517	1.02E-04
452.2381	1201	2.521	0.064	2.273	0.055	1.109	1.04E-04
788.6128	1201	2.826	0.070	3.175	0.105	0.890	1.06E-04
767.583	1101	2.301	0.088	1.881	0.122	1.223	1.08E-04
855.6004	1202	6.120	0.134	5.526	0.161	1.107	1.10E-04
282.257	1204	9.595	0.130	10.114	0.124	0.949	1.12E-04
542.47	1203	1.218	0.174	0.532	0.162	2.291	1.21E-04
856.6045	1202	5.073	0.122	4.531	0.149	1.119	1.21E-04
771.5806	1204	2.315	0.089	1.836	0.153	1.261	1.24E-04
494.434	1203	2.948	0.346	1.559	0.339	1.891	1.24E-04
786.5967	1201	6.015	0.065	5.735	0.075	1.049	1.30E-04
568.4729	1204	1.088	0.191	0.398	0.137	2.733	1.35E-04
855.5756	1201	3.881	0.094	4.328	0.134	0.897	1.38E-04
859.7708	1203	5.116	0.170	5.728	0.122	0.893	1.40E-04
519.4376	1203	0.921	0.221	0.179	0.112	5.145	1.44E-04
326.2197	1201	2.476	0.355	3.915	0.368	0.633	1.47E-04
338.2823	1203	4.938	0.078	5.268	0.090	0.937	1.51E-04
694.573	1204	1.900	0.163	2.530	0.151	0.751	1.56E-04
352.2296	1201	0.691	0.197	1.581	0.260	0.437	1.61E-04
259.9417	1101	2.617	0.136	1.986	0.191	1.318	1.81E-04
749.5757	1102	1.277	0.136	1.823	0.144	0.700	1.86E-04
226.0687	1102	1.303	0.192	2.053	0.194	0.635	2.18E-04
748.5726	1202	3.195	0.104	3.585	0.095	0.891	2.19E-04
217.9126	1101	2.667	0.133	3.135	0.098	0.851	2.24E-04
745.4986	1204	2.011	0.166	1.294	0.212	1.555	2.36E-04
495.4373	1203	1.699	0.297	0.620	0.254	2.738	2.54E-04
215.9154	1101	4.225	0.094	4.601	0.103	0.918	2.55E-04
843.518	1201	3.089	0.094	3.477	0.111	0.889	2.62E-04
194.0802	1203	0.635	0.201	0.029	0.041	21.815	2.66E-04
285.1365	1201	1.200	0.277	0.260	0.189	4.614	2.72E-04
552.3819	1201	0.921	0.175	1.952	0.372	0.472	2.95E-04
750.5441	1204	1.757	0.149	1.130	0.188	1.555	2.98E-04
329.2441	1204	1.195	0.176	1.860	0.174	0.642	2.99E-04
803.5441	1201	7.309	0.075	6.986	0.100	1.046	3.13E-04
829.586	1102	2.482	0.112	1.983	0.158	1.251	3.21E-04
870.7694	1203	2.133	0.152	1.468	0.208	1.453	3.23E-04
530.3997	1201	0.063	0.043	0.568	0.208	0.111	3.72E-04
819.5628	1202	1.666	0.185	0.998	0.174	1.670	4.06E-04

691.1955	1102	1.840	0.082	2.128	0.071	0.865	4.06E-04
853.5599	1201	2.536	0.090	2.159	0.117	1.174	4.08E-04
466.4018	1203	1.299	0.308	0.270	0.225	4.807	4.09E-04
856.5788	1201	2.843	0.108	3.299	0.145	0.862	4.29E-04
625.5165	1203	2.293	0.074	1.852	0.168	1.238	4.58E-04
751.5554	1204	3.149	0.107	2.612	0.193	1.206	4.98E-04
537.4829	1203	1.394	0.228	0.591	0.219	2.360	6.17E-04
469.3608	1201	2.840	0.087	2.517	0.096	1.128	6.56E-04
750.5397	1202	1.844	0.076	1.385	0.182	1.331	6.92E-04
217.0698	1202	0.000	0.000	0.533	0.239	0.000	6.92E-04
805.5605	1201	7.202	0.053	6.978	0.076	1.032	7.15E-04
724.5494	1201	2.164	0.152	2.644	0.108	0.818	7.29E-04
752.5577	1204	2.057	0.132	1.473	0.208	1.397	7.56E-04
642.5195	1201	2.218	0.124	2.644	0.118	0.839	7.85E-04
205.8866	1101	2.131	0.163	2.642	0.119	0.807	8.48E-04
328.2604	1202	2.681	0.229	3.545	0.276	0.756	8.54E-04
577.5142	1203	8.031	0.134	8.453	0.102	0.950	9.73E-04
693.56	1204	1.549	0.169	2.151	0.184	0.720	1.01E-03
310.2152	1204	2.713	0.091	2.415	0.081	1.123	1.02E-03
518.4343	1203	2.231	0.268	1.384	0.216	1.612	1.07E-03
556.3437	1102	1.489	0.141	0.990	0.155	1.503	1.09E-03
689.6527	1204	2.424	0.124	2.039	0.096	1.189	1.11E-03
804.5474	1201	6.295	0.071	6.015	0.097	1.047	1.12E-03
576.5109	1203	9.389	0.132	9.799	0.102	0.958	1.13E-03
440.2713	1201	0.264	0.095	0.737	0.188	0.358	1.16E-03
449.3171	1204	0.922	0.216	0.281	0.143	3.285	1.24E-03
459.1582	1203	1.001	0.232	1.912	0.321	0.524	1.26E-03
874.7062	1203	0.890	0.194	0.308	0.135	2.887	1.26E-03
281.2447	1204	6.344	0.106	5.984	0.111	1.060	1.32E-03
329.264	1202	0.790	0.183	1.472	0.232	0.537	1.35E-03
537.4501	1204	2.198	0.165	1.531	0.246	1.435	1.43E-03
280.2412	1204	8.699	0.109	8.331	0.114	1.044	1.46E-03
825.6926	1203	1.229	0.204	0.595	0.171	2.066	1.46E-03
804.5717	1102	2.955	0.096	2.601	0.121	1.136	1.47E-03
588.5115	1203	3.617	0.089	3.315	0.096	1.091	1.52E-03
602.5286	1203	8.518	0.111	8.889	0.115	0.958	1.53E-03
444.3599	1201	1.999	0.068	1.694	0.121	1.181	1.54E-03
218.0193	1101	2.686	0.184	3.262	0.161	0.823	1.56E-03
283.9863	1101	0.029	0.040	0.430	0.187	0.066	1.58E-03
858.766	1203	6.089	0.172	6.596	0.123	0.923	1.59E-03
860.7756	1203	3.656	0.189	4.201	0.124	0.870	1.60E-03
859.7718	1204	1.061	0.195	1.700	0.198	0.624	1.74E-03
614.3424	1202	2.236	0.096	2.558	0.104	0.874	1.75E-03
877.5815	1202	1.648	0.158	1.125	0.165	1.465	1.76E-03
468.3574	1201	4.315	0.083	4.044	0.085	1.067	1.79E-03
461.1552	1203	0.756	0.215	1.596	0.316	0.474	1.87E-03
578.5176	1203	5.603	0.257	6.290	0.120	0.891	1.91E-03
712.4704	1204	1.935	0.131	1.470	0.163	1.316	1.95E-03
326.2261	1204	1.887	0.172	2.476	0.201	0.762	2.08E-03
749.5359	1202	2.784	0.085	2.366	0.179	1.176	2.13E-03
858.7678	1204	1.862	0.219	2.525	0.192	0.737	2.21E-03
221.0733	1202	0.635	0.176	0.158	0.100	4.014	2.25E-03
523.4675	1203	3.901	0.258	3.075	0.264	1.269	2.25E-03
603.532	1203	7.217	0.111	7.576	0.117	0.953	2.27E-03
626.5286	1203	3.408	0.067	3.168	0.087	1.076	2.33E-03
269.9705	1101	3.238	0.143	2.783	0.145	1.164	2.33E-03
589.3396	1202	6.112	0.115	5.739	0.122	1.065	2.34E-03
564.513	1203	3.173	0.185	2.575	0.196	1.232	2.34E-03
460.1603	1203	0.298	0.129	0.843	0.223	0.354	2.39E-03
304.2379	1201	2.272	0.224	3.075	0.296	0.739	2.44E-03

834.5961	1201	3.998	0.067	4.255	0.100	0.940	2.45E-03
690.4865	1204	2.157	0.158	2.587	0.097	0.834	2.49E-03
749.5767	1202	2.180	0.106	2.504	0.100	0.870	2.55E-03
854.7373	1204	1.519	0.199	0.909	0.190	1.671	2.66E-03
830.589	1102	1.478	0.127	1.069	0.137	1.382	2.73E-03
558.4093	1204	1.158	0.209	1.868	0.255	0.620	2.76E-03
339.285	1203	2.667	0.112	2.983	0.087	0.894	2.94E-03
534.4658	1203	1.939	0.173	1.342	0.221	1.445	2.97E-03
183.066	1201	4.591	0.102	4.277	0.102	1.073	3.05E-03
575.2726	1101	2.063	0.102	1.683	0.151	1.226	3.14E-03
342.2198	1204	0.868	0.156	1.178	0.183	0.567	3.28E-03
282.2555	1202	2.757	0.245	3.580	0.304	0.770	3.29E-03
262.2294	1203	3.003	0.113	2.708	0.066	1.109	3.30E-03
819.5179	1201	4.478	0.065	4.242	0.093	1.056	3.31E-03
588.3273	1202	0.618	0.135	0.251	0.093	2.458	3.31E-03
842.7386	1203	1.913	0.190	1.345	0.182	1.422	3.38E-03
292.204	1204	2.164	0.112	1.822	0.114	1.187	3.43E-03
820.5213	1201	3.401	0.067	3.161	0.094	1.076	3.46E-03
743.5455	1202	2.517	0.134	2.144	0.105	1.174	3.48E-03
587.3228	1202	1.766	0.180	1.239	0.167	1.426	3.58E-03
522.4639	1203	5.433	0.268	4.629	0.265	1.174	3.61E-03
102.0621	1204	2.296	0.108	1.948	0.128	1.179	3.84E-03
590.3426	1202	4.115	0.104	3.793	0.115	1.085	4.09E-03
915.5193	1201	3.194	0.058	3.020	0.061	1.058	4.38E-03
613.3402	1202	3.884	0.108	4.220	0.123	0.920	4.48E-03
617.0614	1204	4.859	0.065	4.651	0.080	1.045	4.87E-03
557.4528	1204	1.201	0.131	0.740	0.193	1.622	4.91E-03
789.5649	1201	3.490	0.063	3.690	0.077	0.946	4.93E-03
658.5913	1203	0.314	0.127	0.022	0.031	14.101	5.13E-03
746.5139	1204	1.980	0.178	2.454	0.143	0.807	5.43E-03
624.513	1203	3.469	0.078	3.208	0.108	1.081	5.56E-03
283.2589	1202	0.856	0.181	1.443	0.237	0.593	5.65E-03
589.5159	1203	2.441	0.093	2.154	0.110	1.133	5.68E-03
723.5217	1204	2.597	0.106	2.121	0.230	1.224	5.77E-03
556.4496	1204	2.541	0.091	2.166	0.178	1.173	6.26E-03
817.5011	1201	1.369	0.130	1.027	0.106	1.333	6.32E-03
803.5692	1102	4.118	0.106	3.792	0.129	1.086	6.40E-03
831.7406	1203	3.546	0.181	4.021	0.149	0.882	6.47E-03
493.422	1203	0.710	0.197	0.203	0.151	3.495	6.53E-03
833.5927	1201	4.967	0.066	5.190	0.096	0.957	6.58E-03
591.532	1203	2.662	0.116	2.334	0.118	1.141	6.66E-03
328.2391	1202	1.395	0.197	2.013	0.251	0.693	6.68E-03
296.2359	1204	4.596	0.125	4.259	0.115	1.079	6.95E-03
233.0648	1202	0.000	0.000	0.299	0.171	0.000	7.11E-03
223.9491	1101	2.665	0.135	3.041	0.137	0.876	7.48E-03
519.5021	1203	2.640	0.117	2.989	0.140	0.883	7.72E-03
350.2828	1204	1.458	0.166	1.008	0.161	1.447	7.87E-03
806.5641	1201	6.132	0.050	5.971	0.072	1.027	8.56E-03
623.5006	1203	1.607	0.141	1.167	0.191	1.377	8.77E-03
492.4181	1203	1.564	0.279	0.851	0.249	1.837	9.77E-03
564.5127	1202	0.208	0.096	0.576	0.186	0.361	9.98E-03
768.4964	1204	2.254	0.119	1.921	0.135	1.173	1.02E-02
807.5893	1202	2.736	0.126	3.050	0.106	0.897	1.03E-02
635.34	1202	0.641	0.142	1.098	0.212	0.584	1.05E-02
521.4526	1203	2.899	0.236	2.219	0.289	1.307	1.06E-02
600.5128	1203	8.293	0.117	7.966	0.135	1.041	1.08E-02
524.472	1203	1.524	0.269	0.839	0.249	1.817	1.08E-02
767.5501	1204	3.193	0.090	2.957	0.089	1.080	1.09E-02
844.5214	1201	2.139	0.090	2.427	0.136	0.881	1.15E-02
520.4497	1203	4.589	0.221	3.985	0.248	1.152	1.16E-02

695.646	1204	0.570	0.185	0.158	0.109	3.618	1.19E-02
449.3152	1202	1.438	0.249	0.851	0.189	1.689	1.21E-02
490.4024	1203	1.084	0.191	0.619	0.162	1.750	1.22E-02
559.4131	1204	0.163	0.084	0.536	0.205	0.304	1.23E-02
307.1185	1201	0.882	0.253	0.293	0.189	3.012	1.25E-02
739.5157	1202	1.103	0.162	1.482	0.121	0.745	1.26E-02
806.5863	1202	4.868	0.111	5.155	0.114	0.944	1.29E-02
830.7368	1203	4.321	0.188	4.767	0.151	0.907	1.32E-02
833.7567	1203	2.625	0.240	3.151	0.142	0.833	1.34E-02
601.5163	1203	7.045	0.117	6.727	0.136	1.047	1.37E-02
508.4487	1203	0.723	0.200	0.240	0.178	3.014	1.45E-02
224.1416	1204	1.978	0.145	1.617	0.142	1.223	1.49E-02
565.5157	1203	1.644	0.229	1.074	0.225	1.530	1.49E-02
832.7528	1203	3.413	0.248	3.948	0.147	0.865	1.50E-02
356.2929	1204	0.288	0.139	0.016	0.023	17.586	1.52E-02
793.5383	1102	2.428	0.098	2.150	0.129	1.129	1.54E-02
592.5453	1203	0.774	0.183	0.345	0.155	2.243	1.55E-02
828.5475	1201	4.737	0.094	5.011	0.132	0.945	1.61E-02
939.5193	1201	2.282	0.092	2.002	0.140	1.140	1.64E-02
471.2953	1201	0.759	0.197	0.328	0.136	2.317	1.68E-02
858.6202	1202	2.937	0.128	2.598	0.152	1.131	1.68E-02
647.6057	1204	2.830	0.099	2.610	0.074	1.084	1.75E-02
273.9573	1101	0.000	0.000	0.230	0.150	0.000	1.79E-02
703.5709	1101	2.890	0.063	2.695	0.101	1.073	1.82E-02
573.485	1203	4.750	0.113	4.450	0.139	1.067	1.85E-02
300.2098	1204	2.097	0.103	1.828	0.123	1.147	1.88E-02
805.5828	1202	6.134	0.120	6.429	0.127	0.954	1.99E-02
607.5616	1203	0.757	0.254	0.226	0.163	3.349	2.01E-02
632.5761	1203	1.009	0.202	0.556	0.170	1.815	2.04E-02
294.2205	1204	4.901	0.151	4.551	0.146	1.077	2.23E-02
716.4988	1204	2.371	0.109	2.106	0.119	1.126	2.25E-02
677.5763	1203	1.718	0.148	1.349	0.171	1.274	2.26E-02
572.4813	1203	6.067	0.112	5.782	0.136	1.049	2.28E-02
745.5663	1204	2.558	0.108	2.787	0.084	0.918	2.47E-02
732.4923	1204	1.802	0.165	1.430	0.163	1.260	2.71E-02
874.8477	1102	0.276	0.120	0.055	0.045	4.969	2.73E-02
464.3874	1203	0.584	0.183	0.205	0.140	2.847	2.74E-02
882.7684	1203	6.327	0.155	5.988	0.142	1.057	2.74E-02
569.3684	1102	2.360	0.124	2.045	0.160	1.154	2.81E-02
615.354	1202	2.392	0.101	2.153	0.115	1.111	2.84E-02
831.5536	1201	2.439	0.366	1.588	0.398	1.536	2.88E-02
297.2386	1204	2.034	0.141	1.724	0.136	1.180	2.98E-02
751.5514	1201	1.722	0.114	1.381	0.199	1.247	3.03E-02
308.2717	1204	2.288	0.128	2.557	0.112	0.895	3.09E-02
883.7727	1203	5.568	0.148	5.248	0.140	1.061	3.11E-02
827.5442	1201	5.719	0.093	5.963	0.132	0.959	3.12E-02
768.5545	1204	2.082	0.117	1.786	0.157	1.166	3.15E-02
832.6028	1102	1.971	0.109	1.695	0.147	1.163	3.15E-02
609.3247	1202	1.229	0.162	1.636	0.214	0.751	3.16E-02
660.6083	1203	0.312	0.152	0.045	0.044	7.005	3.17E-02
832.5788	1201	5.331	0.059	5.167	0.093	1.032	3.26E-02
303.2293	1204	1.818	0.124	1.529	0.146	1.189	3.44E-02
827.545	1101	2.585	0.105	2.320	0.145	1.114	3.49E-02
616.504	1201	2.171	0.146	2.461	0.114	0.882	3.49E-02
615.1693	1201	1.416	0.225	0.895	0.264	1.583	3.50E-02
749.5358	1201	1.926	0.090	1.648	0.172	1.169	3.52E-02
602.472	1204	2.476	0.080	2.206	0.173	1.122	3.58E-02
295.2286	1204	3.056	0.165	2.723	0.142	1.123	3.75E-02
244.2189	1203	3.033	0.067	2.898	0.058	1.047	3.80E-02
622.4973	1203	2.765	0.120	2.463	0.173	1.123	3.96E-02

252.0763	1201	0.462	0.253	0.041	0.058	11.223	4.01E-02
195.0535	1202	0.293	0.181	0.000	0.000	0.293	4.16E-02
467.4052	1203	0.500	0.188	0.148	0.136	3.385	4.17E-02
293.0679	1202	0.000	0.000	0.207	0.158	0.000	4.32E-02
847.5498	1201	3.490	0.057	3.344	0.088	1.044	4.48E-02
592.3569	1202	2.197	0.103	1.946	0.151	1.129	4.84E-02
670.57	1204	2.170	0.133	1.827	0.214	1.188	4.85E-02
447.3848	1204	0.952	0.193	0.578	0.173	1.649	4.85E-02
361.1439	1101	0.056	0.056	0.367	0.235	0.152	4.92E-02
732.5496	1201	1.909	0.155	2.217	0.150	0.861	4.98E-02
732.5496	1201	2.160	0.143	1.910	0.169	1.131	0.0498

表 4: 7 种 CRC 生物标记的保留时间

FT 精确质量	式	理论质量	中性 Q-Star 质量	Q-Star- 检测 的质量	保留时间 (分钟)
446.3406	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	446.3406	446.40132	445.3935	16.5
450.3726	C ₂₈ H ₅₀ O ₄	450.3726	450.43052	449.4227	16.8
466.3661	C ₂₈ H ₅₀ O ₅	466.36581	466.42027	465.41245	16.5
468.384	C ₂₈ H ₅₂ O ₅	468.38145	468.42562	467.4178	16.5
538.4259	C ₃₂ H ₅₈ O ₆	538.42332	538.423335	537.415515	16.4
592.4711	C ₃₆ H ₆₄ O ₆	592.47026	592.521895	591.514075	16.5
594.4851	C ₃₆ H ₆₆ O ₆	594.48591	594.54482	593.537	16.8

表 5: 对于生物标记 3, C₂₈H₄₇O₄, (448.3726, 中性质量)的主要 MS/MS 片段的结构指定

m/z	式	分子片段	失去的片段
(a) 447	C ₂₈ H ₄₇ O ₄		-H ⁺
(b) 429	C ₂₈ H ₄₅ O ₃		-H ₂ O
(c) 403	C ₂₇ H ₄₇ O ₂		-CO ₂
(d) 385	C ₂₇ H ₄₅ O		-(CO ₂ + H ₂ O)
(e) 279	C ₁₈ H ₃₁ O ₂		(d)在 C9-O1 的 开环和

表 6: 对于生物标记 4, C₂₈H₄₇O₅, (464.3522, 中性质量)的主要 MS/MS 片段的结构指定

m/z	式	分子片段	失去的片段
(a) 463	C ₂₈ H ₄₇ O ₅		-H ⁺
(b) 445	C ₂₈ H ₄₅ O ₄		-H ₂ O
(c) 419	C ₂₇ H ₄₇ O ₃		-CO ₂
(d) 401	C ₂₇ H ₄₅ O ₂		-(CO ₂ + H ₂ O)
(e) 383	C ₂₇ H ₄₃ O		-(CO ₂ + 2H ₂ O)
(f) 315	C ₂₂ H ₃₅ O		在 C9-O1 的开环
(g) 297	C ₂₂ H ₃₃		F - H ₂ O
(h) 241	C ₁₄ H ₂₅ O ₃		

表 7: 对于生物标记 5, C₂₈H₄₅O₄, (446.3522, 中性质量)的主要 MS/MS 片段的结构指定

m/z	式	分子片段	失去的片段
(a) 445	C ₂₈ H ₄₅ O ₄		-H ⁺
(b) 427	C ₂₈ H ₄₃ O ₃		-H ₂ O
(c) 401	C ₂₇ H ₄₅ O ₂		-CO ₂
(d) 383	C ₂₇ H ₄₃ O		-(CO ₂ + H ₂ O)
(e) 223	C ₁₄ H ₂₃ O ₂		(b) -
(f) 205	C ₁₄ H ₂₁ O		
(g) 177	C ₁₂ H ₁₇ O		(f) - C ₂ H ₈
(h) 162	C ₁₁ H ₁₄ O		g - CH ₃

表 8: 对于生物标记 6, C₂₈H₄₉O₅, (466.3661, 中性质量)的主要 MS/MS 片段的结构指定

m/z	式	分子片段	失去的片段
(a) 465	C ₂₈ H ₄₉ O ₅		-H ⁺
(b) 447	C ₂₈ H ₄₇ O ₄		-H ₂ O
(c) 433	C ₂₇ H ₄₅ O ₄		-CH ₃ OH
(d) 421	C ₂₆ H ₄₅ O ₃		-CO ₂
(e) 405	C ₂₆ H ₄₅ O ₃		(c) - C ₂ H ₄
(f) 403	C ₂₇ H ₄₇ O ₂		-(CO ₂ + H ₂ O)
(g) 349	C ₂₂ H ₃₇ O ₃		
(h) 297	C ₁₈ H ₃₃ O ₃		(b) -
(i) 279	C ₁₈ H ₃₁ O ₂		(h) - H ₂ O
(j) 241	C ₁₅ H ₂₉ O ₂		
(k) 223	C ₁₃ H ₁₉ O ₃		
(l) 185	C ₁₃ H ₁₉ O ₃		

表 9: 对于生物标记 7, C₂₈H₄₉O₄, (450.3726, 中性质量)的主要 MS/MS 片段的结构指定

m/z	式	分子片段	失去的片段
(a) 449	C ₂₈ H ₄₉ O ₄		-H ⁺
(b) 431	C ₂₈ H ₄₉ O ₄		-H ₂ O
(c) 417	C ₂₇ H ₄₅ O ₃		-(H ₂ O + CH ₃)
(d) 413	C ₂₈ H ₄₅ O ₂		-2 x H ₂ O
(e) 405	C ₂₇ H ₄₉ O ₂		-CO ₂
(f) 399	C ₂₇ H ₄₉ O ₂		(c) - H ₂ O
(g) 387	C ₂₇ H ₄₇ O		-(CO ₂ + H ₂ O)
(h) 371	C ₂₆ H ₄₃ O		(g) - CH ₄
(i) 281	C ₁₈ H ₃₃ O ₂		
(j) 277	C ₁₉ H ₃₃ O		(c) -

表 10: 对于生物标记 8, C₂₈H₅₁O₅, (468.3840, 中性质量)的主要 MS/MS 片段的结构指定

m/z	式	分子片段	失去的片段
(a) 467	C ₂₈ H ₅₁ O ₅		-H ⁺
(b) 449	C ₂₈ H ₄₉ O ₄		-H ₂ O
(c) 431	C ₂₈ H ₄₇ O ₃		-2 x H ₂ O
(d) 423	C ₂₇ H ₅₁ O ₂		-CO ₂
(e) 405	C ₂₇ H ₄₉ O ₂		-(CO ₂ + H ₂ O)
(f) 389	C ₂₆ H ₄₅ O ₂		(e) -CH ₄
(g) 297	C ₁₇ H ₃₃ O ₃		(b) -
(h) 279	C ₁₈ H ₃₁ O ₂		(g) -H ₂ O
(i) 263	C ₁₇ H ₂₇ O ₂		(h) -CH ₄
(i) 215	C ₁₂ H ₂₃ O ₃		i, ii, CH ₃
(j) 187	C ₁₀ H ₁₉ O ₃		
(k) 169	C ₁₀ H ₁₇ O ₂		(j) -H ₂ O
(l) 141	C ₈ H ₁₃ O ₂		(k) -C ₂ H ₄

表 11: γ -生育酚(1)和相关化合物 3, 4, 5 和 6 在 CDCl_3 中的 ^1H NMR (500 MHz)化学转换(ppm)^a, 多样性和 J (Hz)^b。

H #'s	1	2	3	4	5	6
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	5.12, m
3	1.75, m	1.95-2.10, m	1.48-1.59, m 1.78-1.86, m	1.41-1.53, m 1.80-1.83, m	1.82-1.83, m 1.97-2.03, m	1.24-1.25, m
4	2.66, m	2.69, t	1.78-1.86, m 1.94-2.01, m	1.80-1.83, m 1.93-1.99, m	1.97-2.03, m 2.23-2.30, m	2.28-2.34, m
5	6.35, s	6.38, s	5.33-5.36, m	1.80-1.83, m 2.21-2.25, m	5.31-5.36, m	5.25-5.37, m
6	-	-	1.78-1.86, m 1.94-2.01, m	3.69-3.71, m	5.31-5.36, m	5.25-5.37, m
7	-	-	1.94-2.01, m	1.41-1.53, m	-	1.95-2.02, m
8	-	-	2.24-2.31, m	2.21-2.25, m	2.74-2.76, m	2.72-2.75, m
9	-	-	4.59-4.62, m	-	4.58-4.62, m	-
10	-	-	-	-	-	-
11	1.05-1.25, m	1.79, m	1.10-1.32, m	1.08-1.15, m	1.24-1.36, m	1.95-2.02, m
12	1.05-1.25, m	1.95-2.10, m	2.24-2.31, m	1.93-1.99, m	1.97-2.03, m	1.24-1.25, m
13	1.05-1.25, m	5.08-5.14, m	5.33-5.36, m	5.33-5.34, m	5.31-5.36, m	1.53-1.54, m
14	1.32-1.36, m	-	-	-	-	-
15	1.05-1.25, m	1.95-2.10, m	1.48-1.59, m	1.41-1.53, m	1.82-1.83, m	1.53-1.54, m
16	1.05-1.25, m	1.95-2.10, m	1.10-1.32, m	1.08-1.15, m	1.24-1.36, m	1.24-1.25, m
17	1.05-1.25, m	5.08-5.14, m	1.10-1.32, m	1.23-1.31, m	-	1.24-1.25, m
18	1.32-1.36, m	-	-	1.80-1.83, m	1.24-1.36, m	1.95-2.02, m
19	1.05-1.25, m	1.95-2.10, m	1.10-1.32, m	1.23-1.31, m	1.24-1.36, m	1.24-1.25, m
20	1.05-1.25, m	1.95-2.10, m	1.10-1.32, m	1.08-1.15, m	1.24-1.36, m	1.24-1.25, m
21	1.05-1.25, m	5.08-5.14, m	1.10-1.32, m	1.23-1.31, m	1.24-1.36, m	1.53-1.54, m
22	1.32-1.36, m	-	2.24-2.31, m	2.21-2.25, m	2.23-2.30, m	2.28-2.34, m
23	0.81-0.85, m	1.60, s	-	-	-	-
24	0.81-0.85, m	1.69, s	0.84-0.88, m	0.083-0.85, m	0.83-0.90, m	0.85-0.87, m
25	0.81-0.85, m	1.61, s	1.00 ^c , s	0.95 ^c , s	1.00 ^c , s	0.85-0.87, m
26	0.81-0.85, m	1.61, s	1.55, s	1.53, s	1.54, s	1.53-1.54, m
27	1.53, s	1.27, s	0.91, s	0.89, s	0.90, s	a: 4.04-4.14, dd ($J = 6.0, 12.0$) b: 4.27-4.29, dd ($J = 4.0, 12.0$)
28	2.12, s	2.13, s	0.84-0.88, m	0.083-0.85, m	0.83-0.90, m	1.24-1.25, m
29	2.09, s	2.14, s	0.67 ^c , br s	0.66 ^c , br s	0.66 ^c , br s	1.24-1.25, m

^a 信号从在 ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H 同核解偶联, HMQC 和 HMBC 光谱中的交叉峰的位置确定和指定。

^b 偶联常数(J)报道为最接近 0.5 Hz。

^c 指定可以相反

表 12: γ -生育酚(1)和相关化合物 3,4,5 和 6 在 CDCl_3 中的 ^{13}C NMR (125.8 MHz)化学转移(ppm)^a。

碳#	1	2	3	4	5	6
1	-	-	-	-	-	-
2	74.5	75.2	57.2	57.3	56.7	69.7
3	31.7	31.4	30.2	32.4	37.0	14.9
4	20.8	22.3	30.1	36.3	35.8	30.1 ^b
5	118.6	112.13	130.5	37.8	122.6	130.8
6	144.6	146.3	28.7	72.3	130.0	130.5
7	121.2	118.24	37.5	32.2	126.1	30.3
8	122.6	121.6	38.7	42.8	27.8	30.3
9	145.6	134.9	74.2	141.8	73.7	147.5
10	117.3	135.0	140.2	100.5	138.5	100.8
11	39.9	39.8	40.2	40.0	36.6	30.5
12	21.1	22.3	24.3	28.7	31.9	23.3
13	37.4	124.4	120.7	119.9	128.3	39.5
14	32.8	125.7	130.3	122.2	139.7	69.0
15	37.4	39.6	32.4	24.8	28.2	35.0
16	24.5	26.6	40.0 ^b	19.9 ^b	28.0 ^b	23.5 ^b
17	37.4	124.4	37.1 ^b	36.7 ^b	27.8	30.0
18	32.7	134.9	56.6	56.7	56.1	31.2
19	37.4	36.7	28.5 ^b	40.2 ^b	29.0 ^b	29.9
20	24.8	26.8	23.3 ^b	23.3 ^b	24.3 ^b	29.7
21	39.4	124.2	36.3 ^b	28.5 ^b	23.8 ^b	34.8
22	28.0	131.2	42.8	37.0	39.7	32.7
23	22.7	25.7	173.8	173.8	174.0	174.1
24	21.1	17.8	23.0	24.3	22.8	24.6 ^b
25	19.7	16.0	19.2 ^b	19.2 ^b	18.7 ^b	26.4
26	19.7	15.87	19.8	23.0	22.5	28.0 ^b
27	23.8	24.5	30.1 ^b	21.6 ^b	21.0 ^b	62.9
28	12.1	11.9	19.2 ^b	24.3 ^b	19.3 ^b	25.7 ^b
29	11.8	11.8	19.8 ^b	12.3 ^b	11.8 ^b	11.7 ^b

^a 信号从在 HMQC 和 HMBC 光谱中的交叉峰的位置确定和指定。

^b 指定可以相反

表 13: A. HTS 结果总结, 包括交叉-癌症特异性, 人口统计学和疾病阶段数据。B. P-值, 基于种族、性别、年龄、BMI、存在息肉和阶段, 在随机选择的患者组之间没有表现出统计学显著性。

A

疾病	正常	CRC	卵巢	前列腺	肾细胞	肺	乳腺
样品大小	288	186	20	24	30	25	25
平均 CRC 得分**	-0.45±0.076*	-2.31±1.18*	-1.96±0.94*	-0.71±0.56*	-1.10±1.03*	-1.20±0.90*	-0.76±0.71*
P-值相对于正常	—	5.40E-68	2.00E-16	7.00E-02	9.60E-06	1.80E-06	3.20E-02
预测的 CRC 阳性 (%)	11.4	78.1	70.0	16.7	33.3	40.0	20.0
预测的 CRC 阴性 (%)	88.6	21.9	30.0	83.3	66.7	60.0	80.0
平均年龄	58.7±13.7	60.3±14.8	60.7±12.8	63.1±9.9	67.6±12.1	61.2±13.0	57.7±12.8
平均 BMI	26.4±5.2	23.8±6.0	21.5±7.8	24.6±4.6	24.3±5.8	24.0±4.6	25.0±6.5
性别							
男性	157	115	—	24	17	11	—
女性	131	71	20	—	13	14	25
种族							
白种人	218	76	13	24	26	22	18
亚洲人/西班牙人	42	101	7	—	2	1	3
非洲人 美洲人	20	6	—	—	24	2	4

其它	8	3	—	—	—	—	—
疾病阶段							
0	—	2	—	—	—	—	1
I	—	25	5	1	14	12	3
II	—	79	—	12	6	2	13
III	—	45	13	8	5	3	4
IV	—	15	—	1	2	2	1
不确定的阶段	—	20	2	2	3	6	3
病理	—	186 例腺瘤	2 例腺癌	22 例腺瘤	19 例主细胞腺癌	5 例非小细胞腺癌	4 例导管腺癌
			7 例上皮细胞	2 例其它	4 例乳突	3 例非小细胞癌	16 例渗透导管
			8 例乳突		7 例其它	5 例良性肿瘤	2 例小叶
			3 例其它			3 例小细胞	2 例渗透小叶
CRC 的息肉状态							
存在息肉	—	29	—	—	—	—	—
不存在息肉	—	143	—	—	—	—	—
不确定	—	14	—	—	—	—	—
Gleason 得分	—	—	—	7.3	—	—	—

*标准偏差

**基于 6 种生物标记信号中最低的平均-标准化的比例

B

	西班牙人/ 亚洲人相 对白种人	男性相对 女性	年龄 < 60 岁相对 > 60 岁	BMI < 25 相对 > 25	有息肉相 对无息肉	阶段 I/II 相对 III/IV
p-值	0.3 ¹	0.6 ²	0.3 ³	0.2 ⁴	0.2 ⁵	0.5 ⁶

¹ 40 名 CRC-阳性的西班牙人/亚洲人，40 名正常的西班牙人/亚洲人，40 名 CRC-阳性白种人和 40 名正常的白种人

² 所有受试者

³ 20 名 CRC-阳性 < 60 岁，20 名正常 < 60 岁，20 名 CRC-阳性 > 60 岁，20 名正常 > 60 岁

⁴ 25 名 CRC-阳性 BMI < 25，25 名正常 BMI < 20，25 名 CRC-阳性 BMI > 25，25 名正常 BMI > 25

⁵ 29 名 CRC-阳性有息肉，29 名 CRC-阳性无息肉

⁶ 30 名 CRC-阳性 TNM 阶段 I 或 II，30 名 CRC-阳性 TNM 阶段 III 或 IV

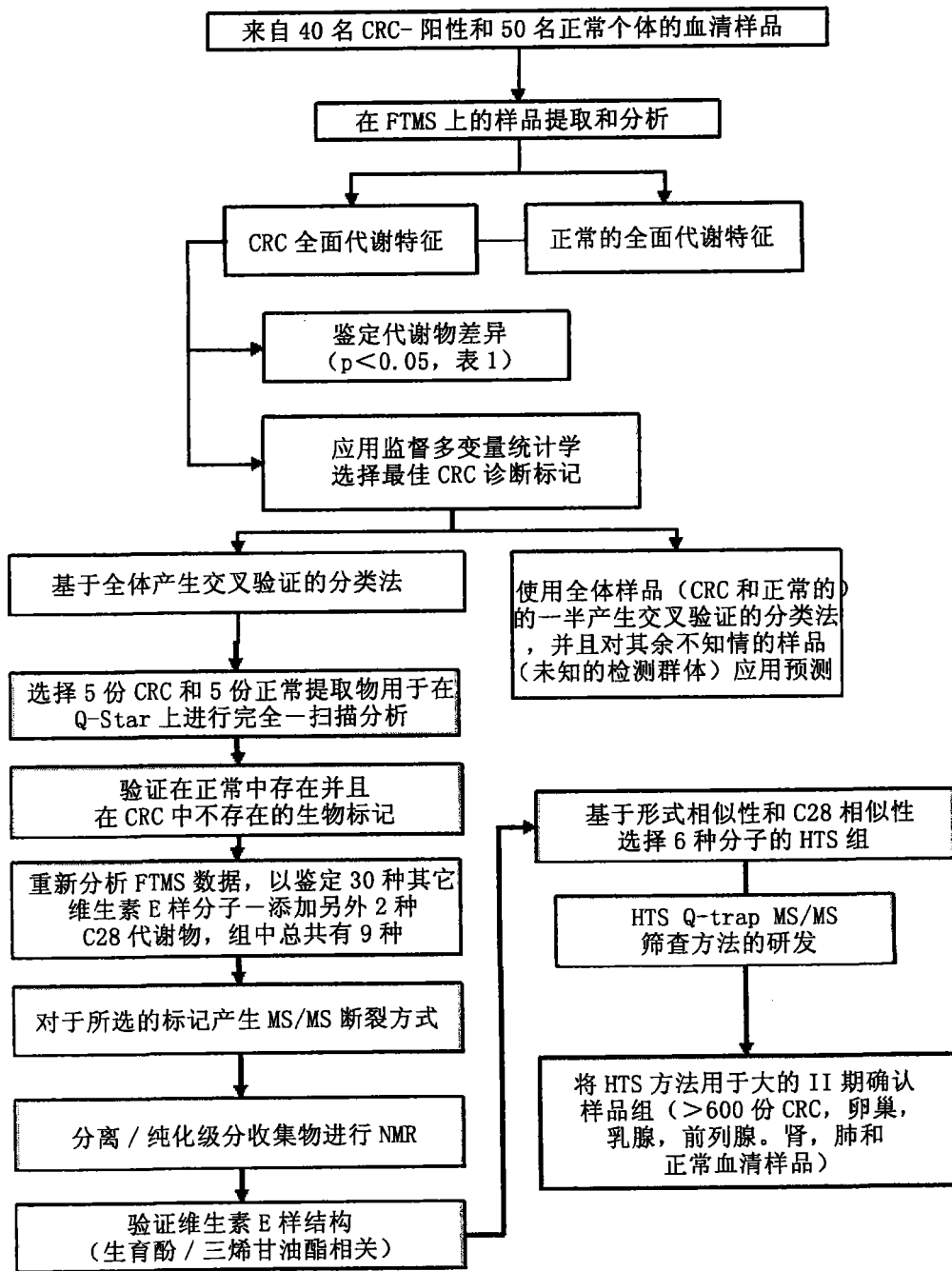
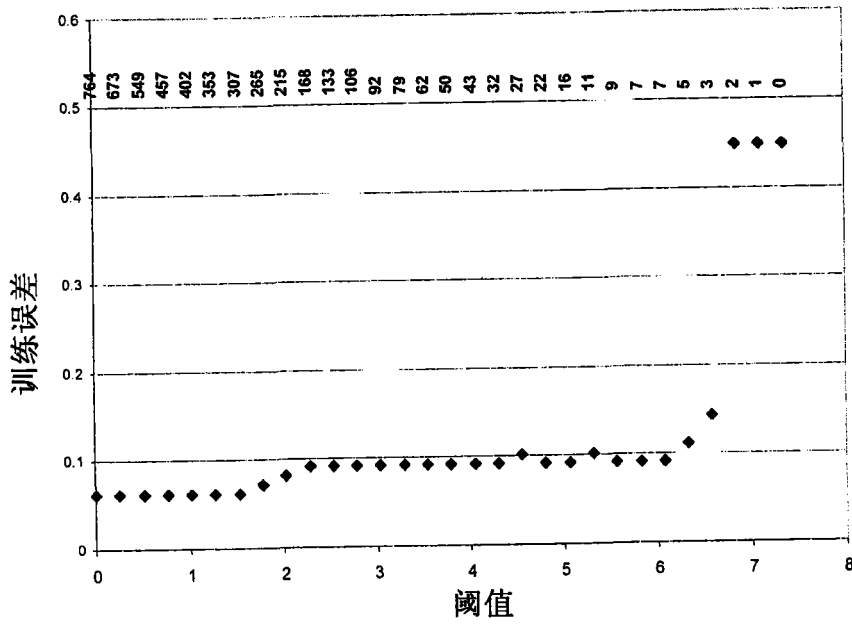


图 1

A

训练误差图



B

个体 CV 曲线

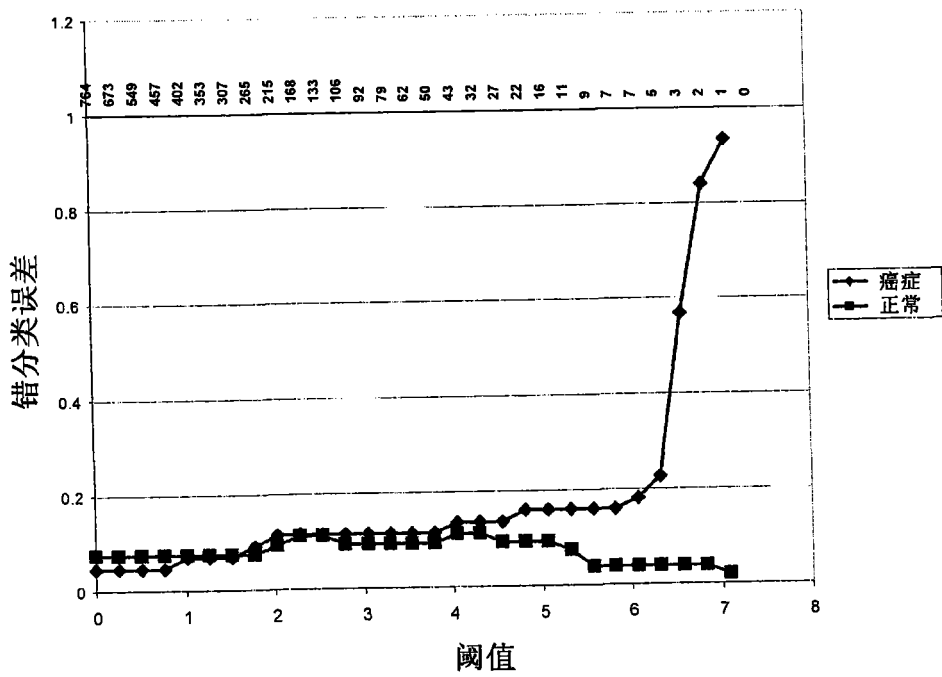


图 2

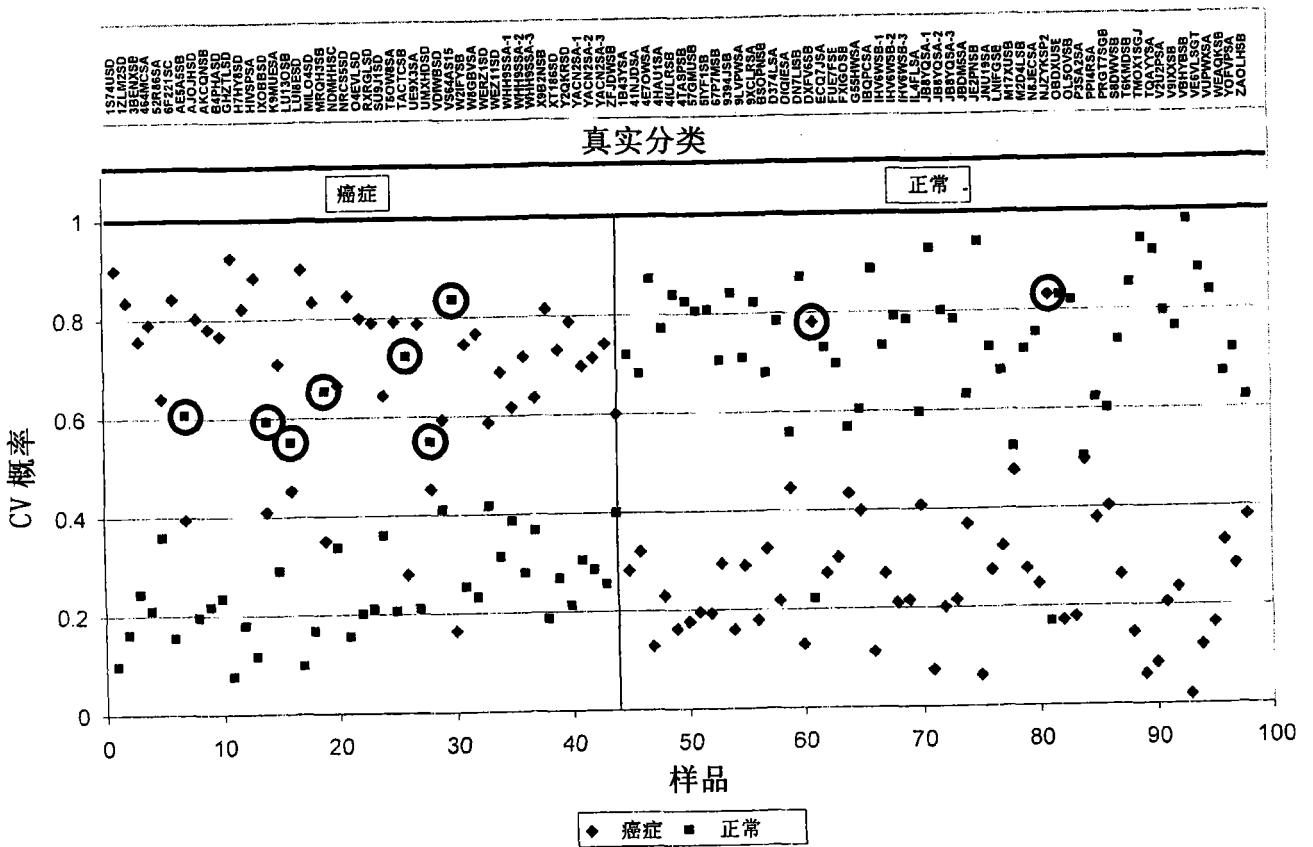


图 3

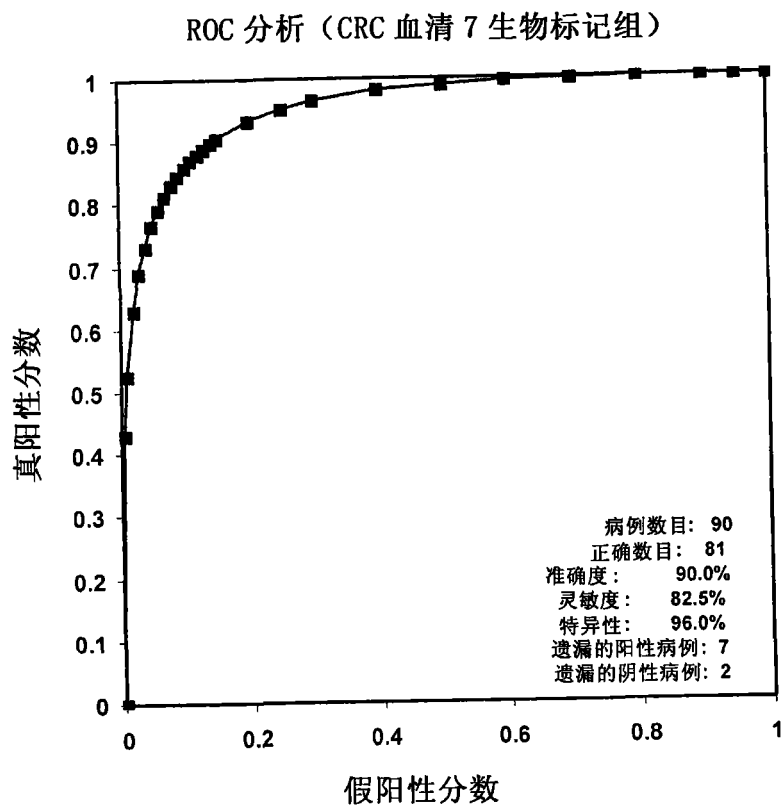


图 4

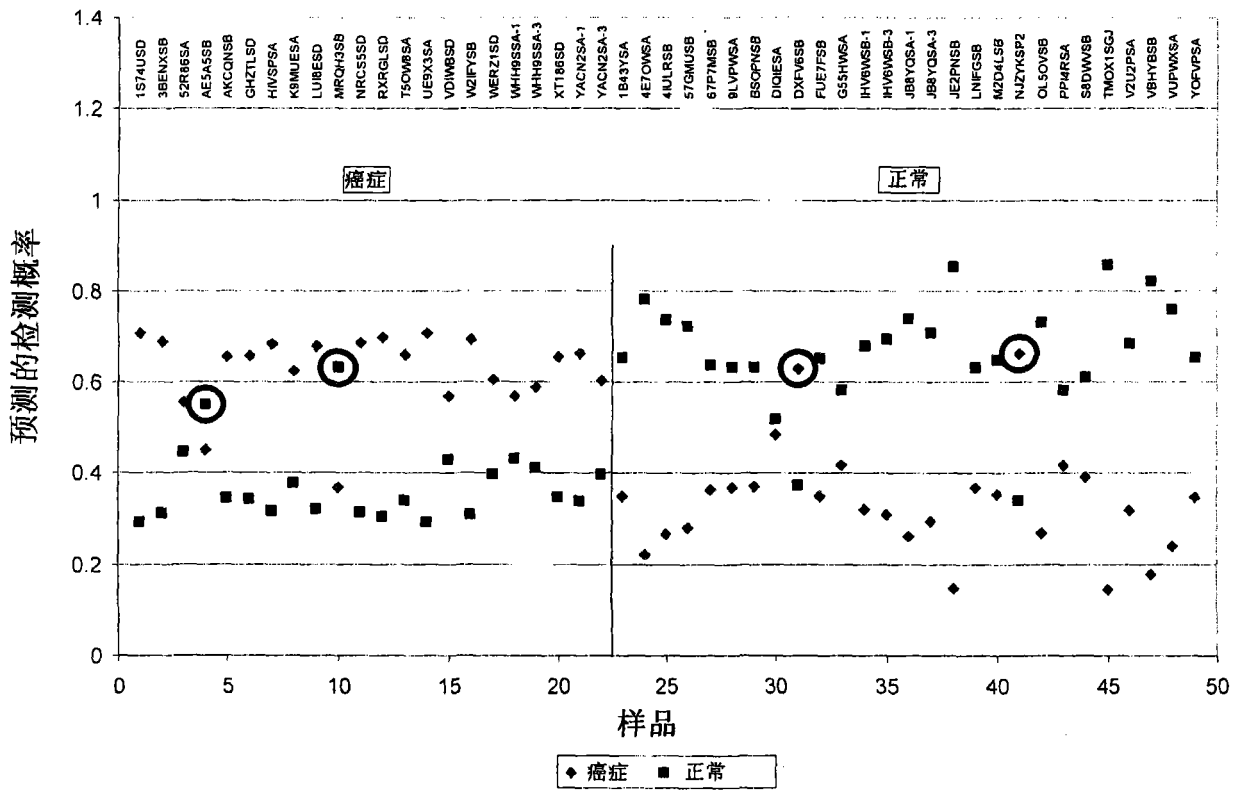


图 5

A

患者 ID	实际	预测	患者 ID	实际	预测
1B43YSA	正常	正常	LUI8ESD	癌症	癌症
1S74USD	癌症	癌症	M2D4LSB	正常	正常
3BENXSB	癌症	癌症	MRQH3SB	癌症	正常
4E7OWSA	正常	正常	NJZYKSP2	正常	癌症
4IULRSB	正常	正常	NRCS5SD	癌症	癌症
52R86SA	癌症	癌症	OL5OVSB	正常	正常
57GMUSB	正常	正常	PPI4RSA	正常	正常
67P7MSB	正常	正常	RXRGLSD	癌症	癌症
9LVPWSA	正常	正常	S8DWVSB	正常	正常
AE5A5SB	癌症	正常	T5OW8SA	癌症	癌症
AKCQNSB	癌症	癌症	TMOX1SGJ	正常	正常
BSOPNSB	正常	正常	UE9X3SA	癌症	癌症
DIQIESA	正常	正常	V2U2PSA	正常	正常
DXFV6SB	正常	癌症	VBHYBSB	正常	正常
FUE7FSB	正常	正常	VDIWBSD	癌症	癌症
G55HWSA	正常	正常	VUPWXSA	正常	正常
GHZTLSD	癌症	癌症	W2IFYSB	癌症	癌症
HIVSPSA	癌症	癌症	WERZ1SD	癌症	癌症
IHV6WSB-1	正常	正常	WHH9SSA-1	癌症	癌症
IHV6WSB-3	正常	正常	WHH9SSA-3	癌症	癌症
JB8YQSA-1	正常	正常	XT186SD	癌症	癌症
JB8YQSA-3	正常	正常	YACN2SA-1	癌症	癌症
JE2PNSB	正常	正常	YACN2SA-3	癌症	癌症
K9MUESA	癌症	癌症	YOFVPSA	正常	正常
LNIFGSB	正常	正常			

B

ROC 分析 (CRC 血清 16 生物标记组)

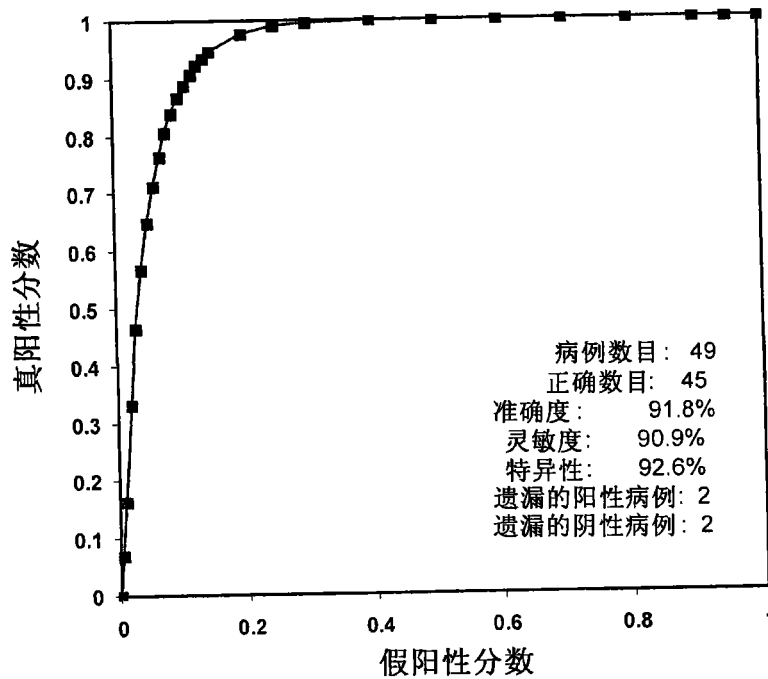


图 6

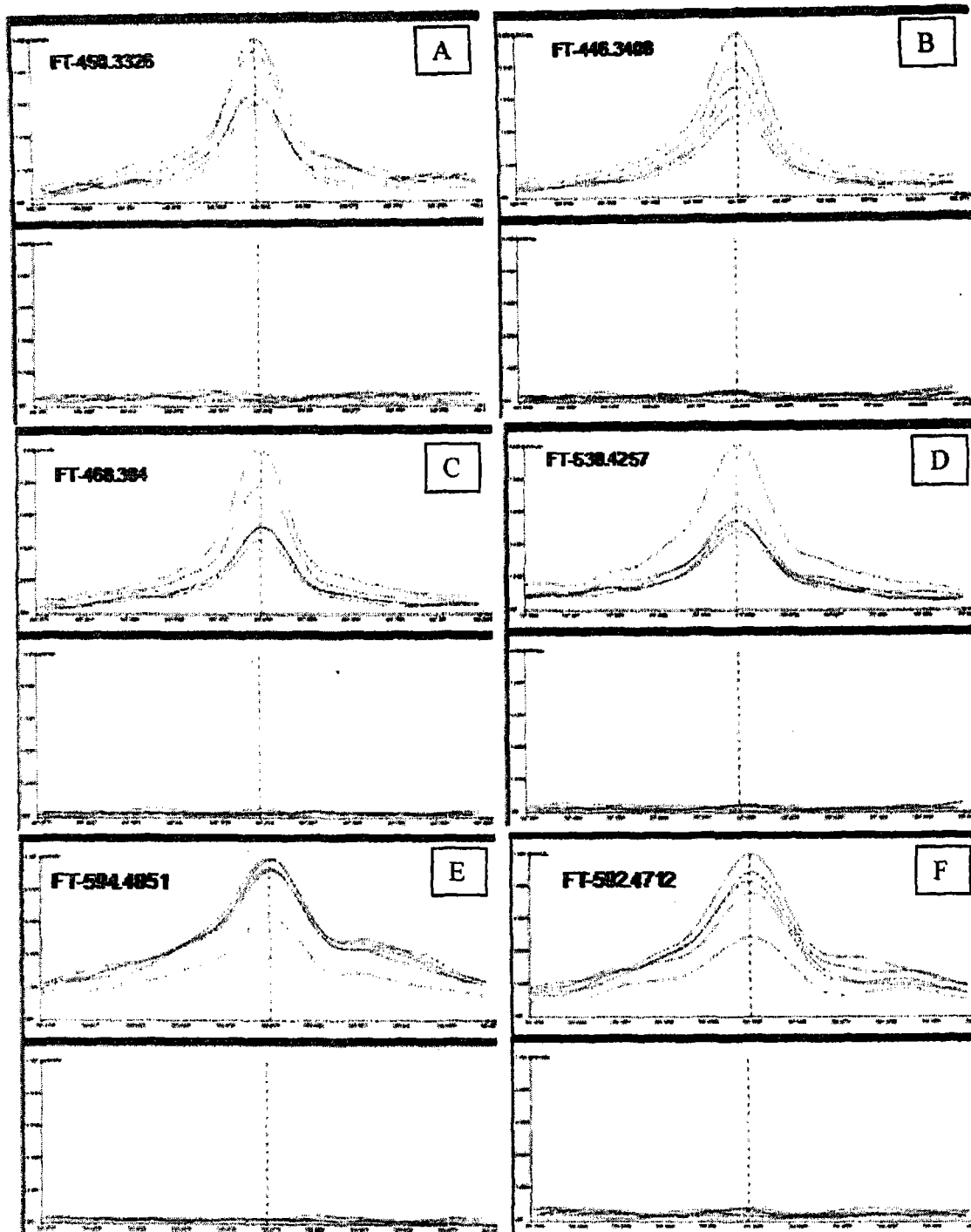


图 7

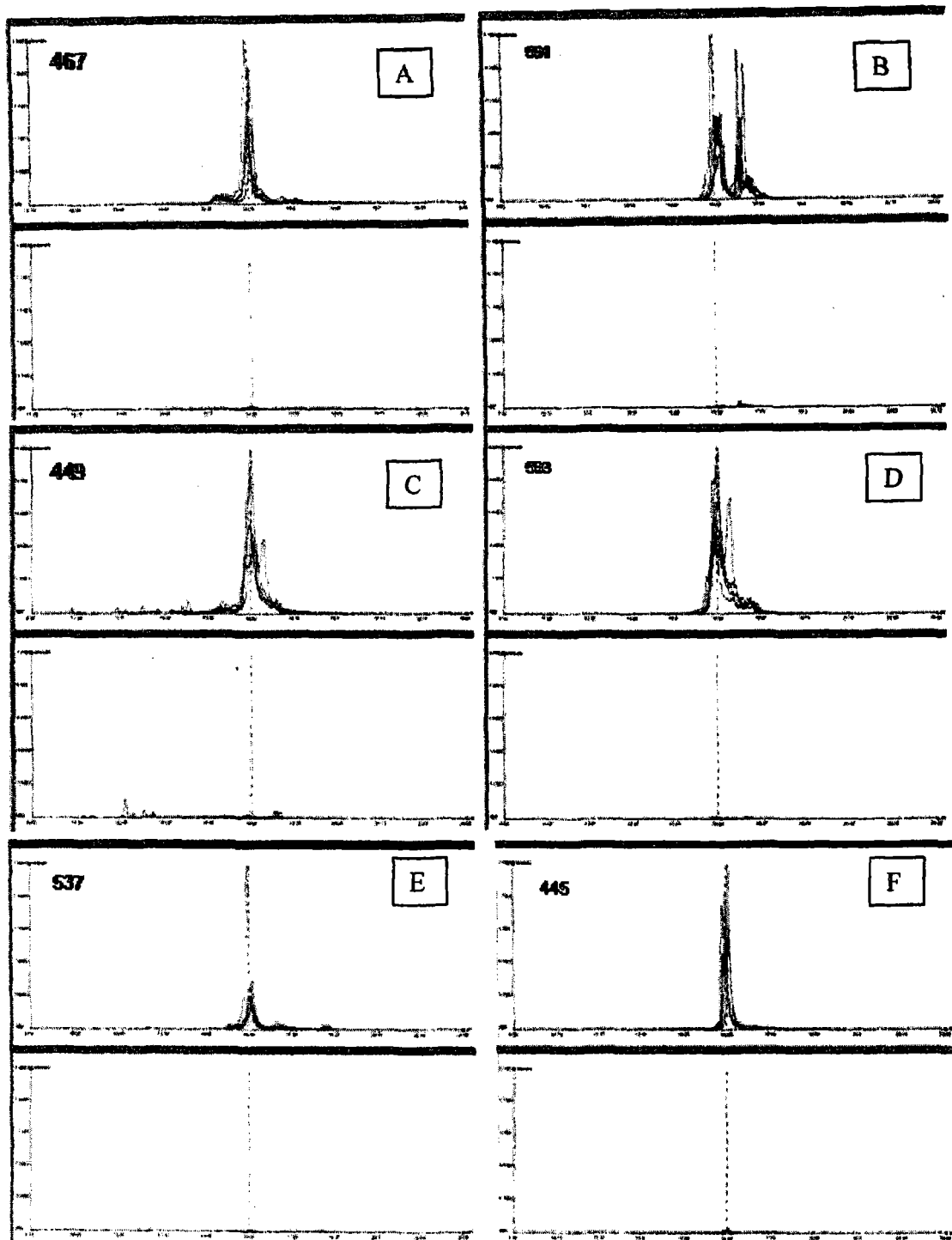


图 8

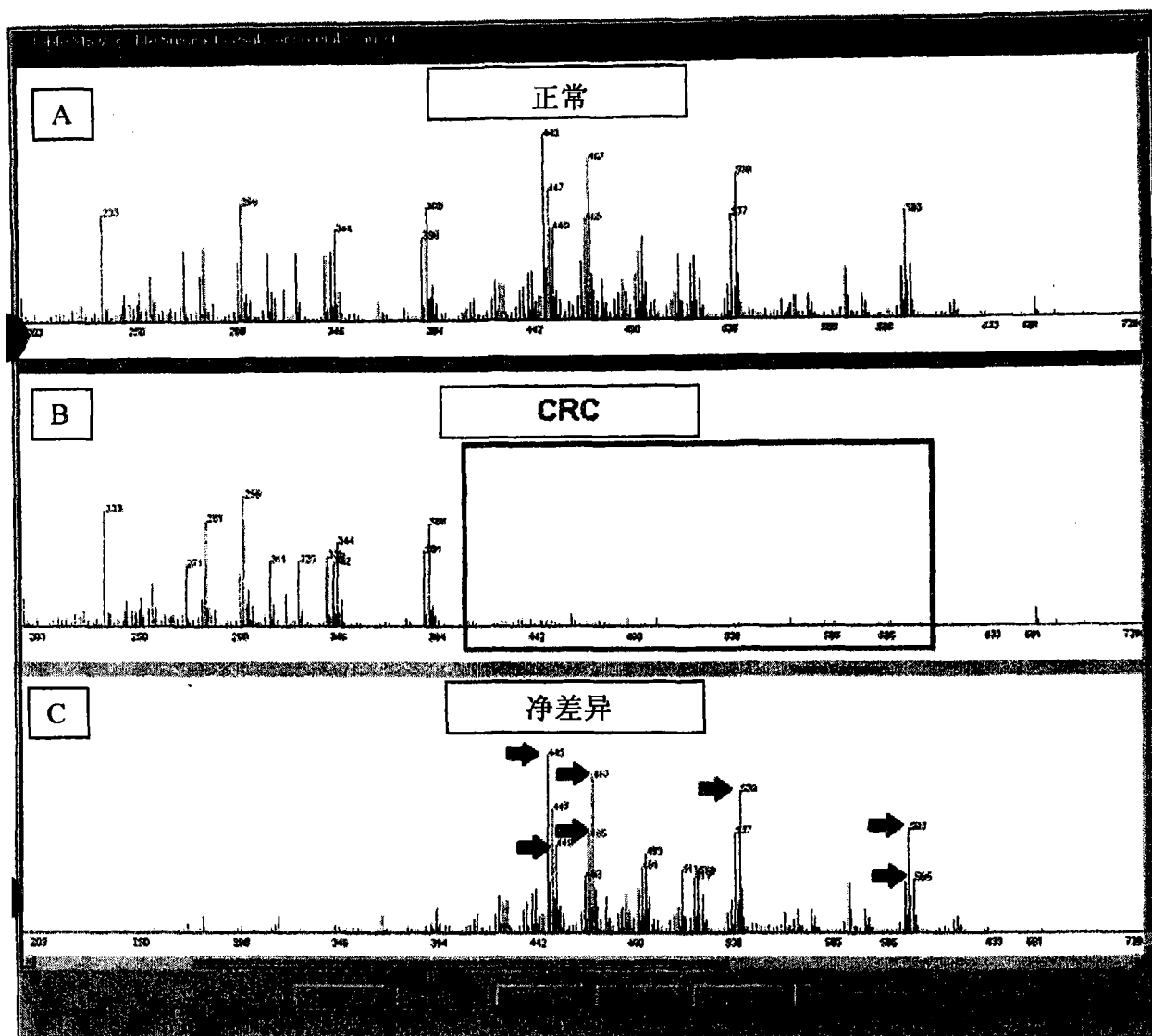


图 9

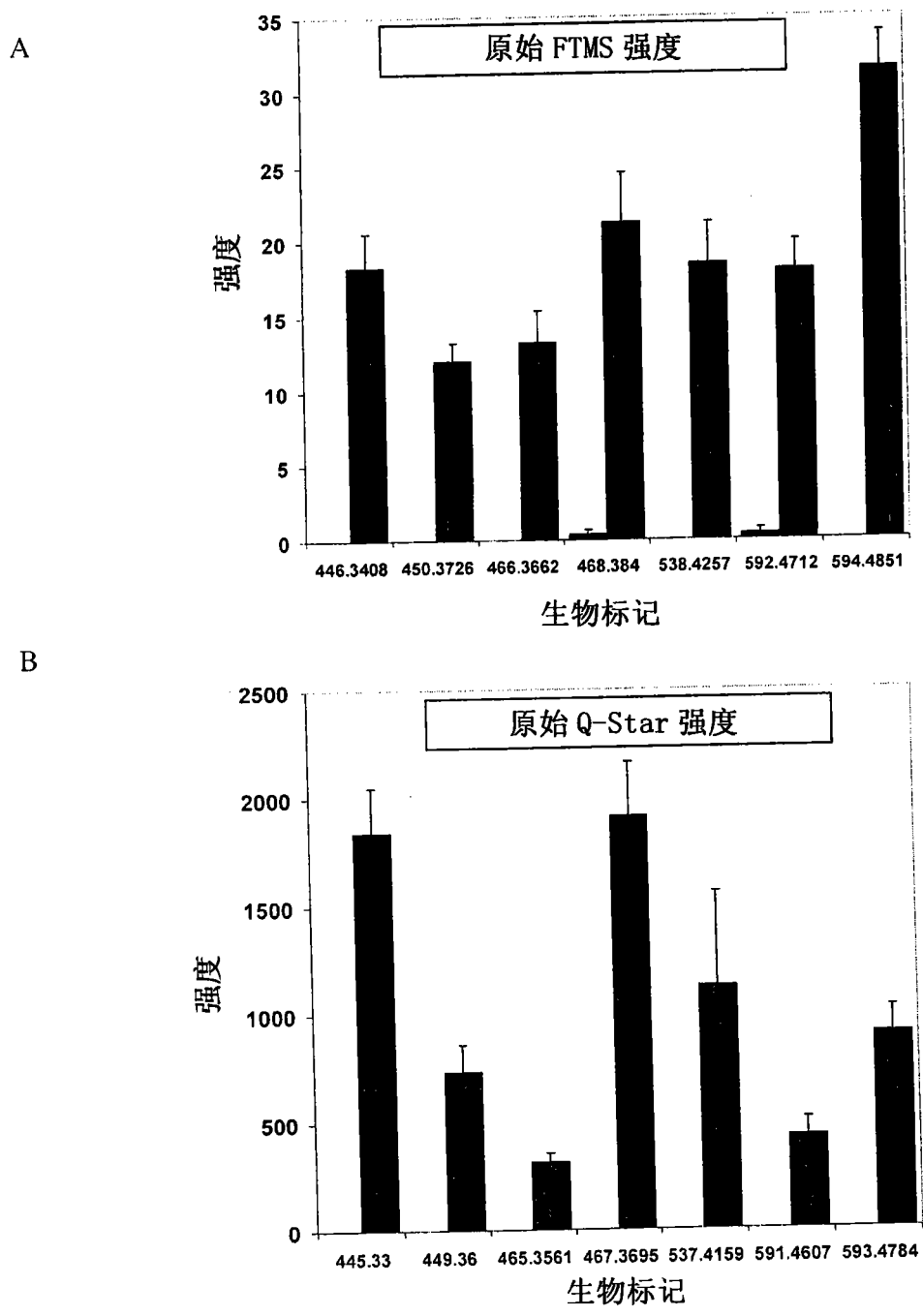


图 10

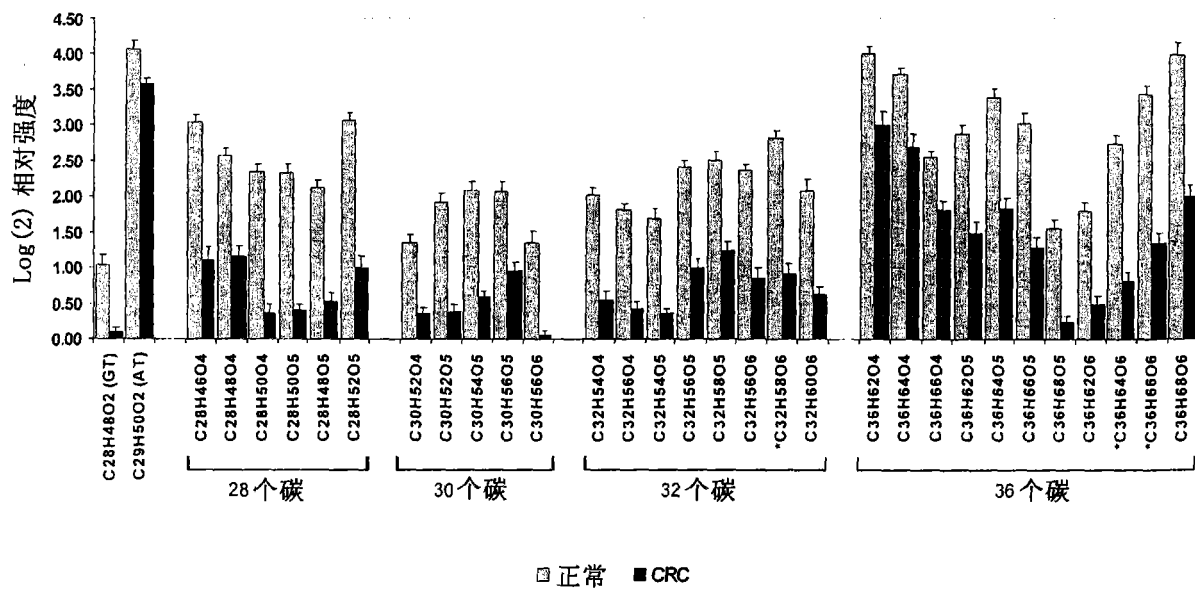


图 11

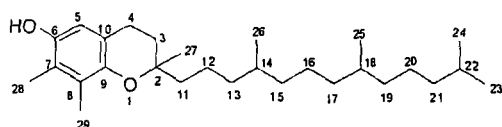
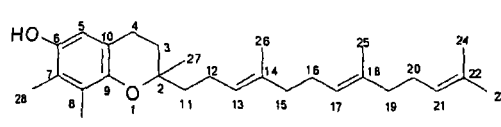
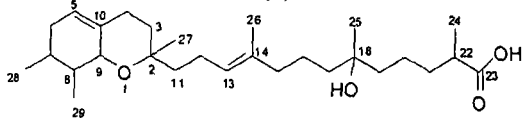
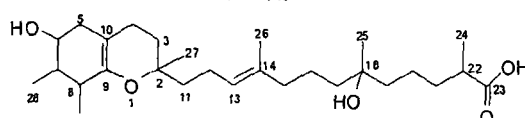
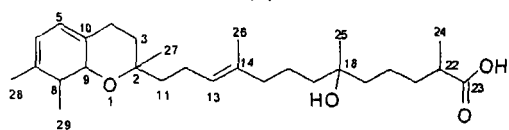
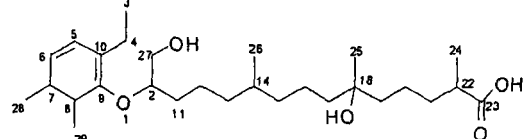
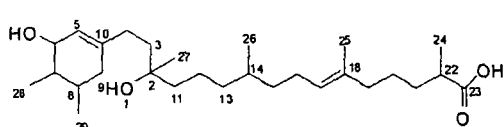
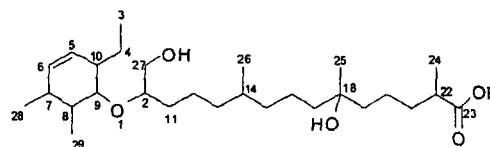
A. 416.3666, C₂₈H₄₈O₂, ... Y-生育酚... (1)B. 410.3184, C₂₈H₄₂O₂, Y-生育酚 (2)C. 448.3406, C₂₈H₄₈O₄ (3)D. 464.3522, C₂₈H₄₈O₅ (4)E. 446.3406, C₂₈H₄₆O₄ (5)F. 466.3661, C₂₈H₅₀O₅ (6)G. 450.3726, C₂₈H₅₀O₄ (7)H. 468.3840, C₂₈H₅₂O₅ (8)

图 12

m/z 448.3726 (中性), C₂₈H₄₇O₄ 主要 MS/MS 片段的结构指定

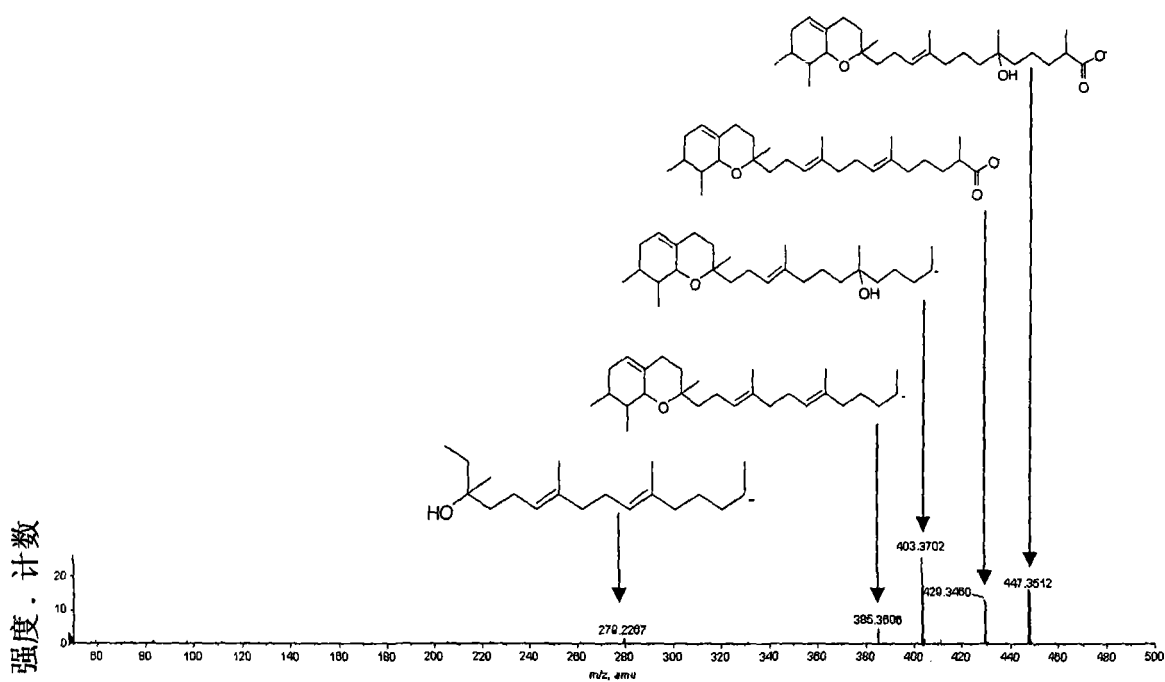


图 13

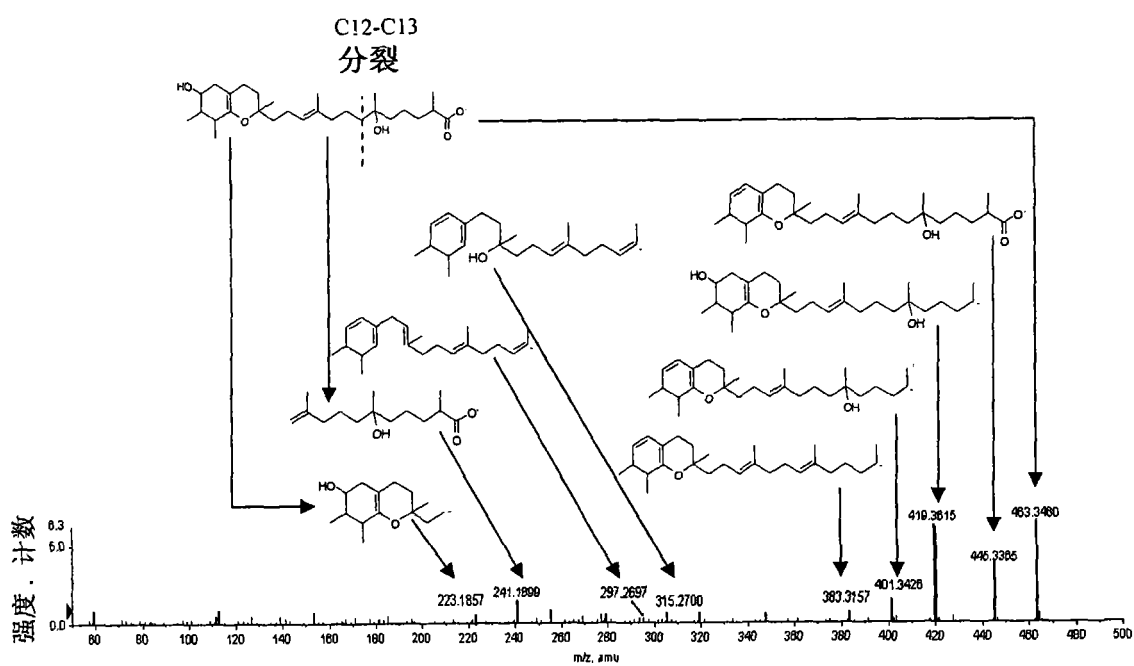
464.3522(中性), C₂₈H₄₇O₅ 主要 MS/MS 片段的结构指定

图 14

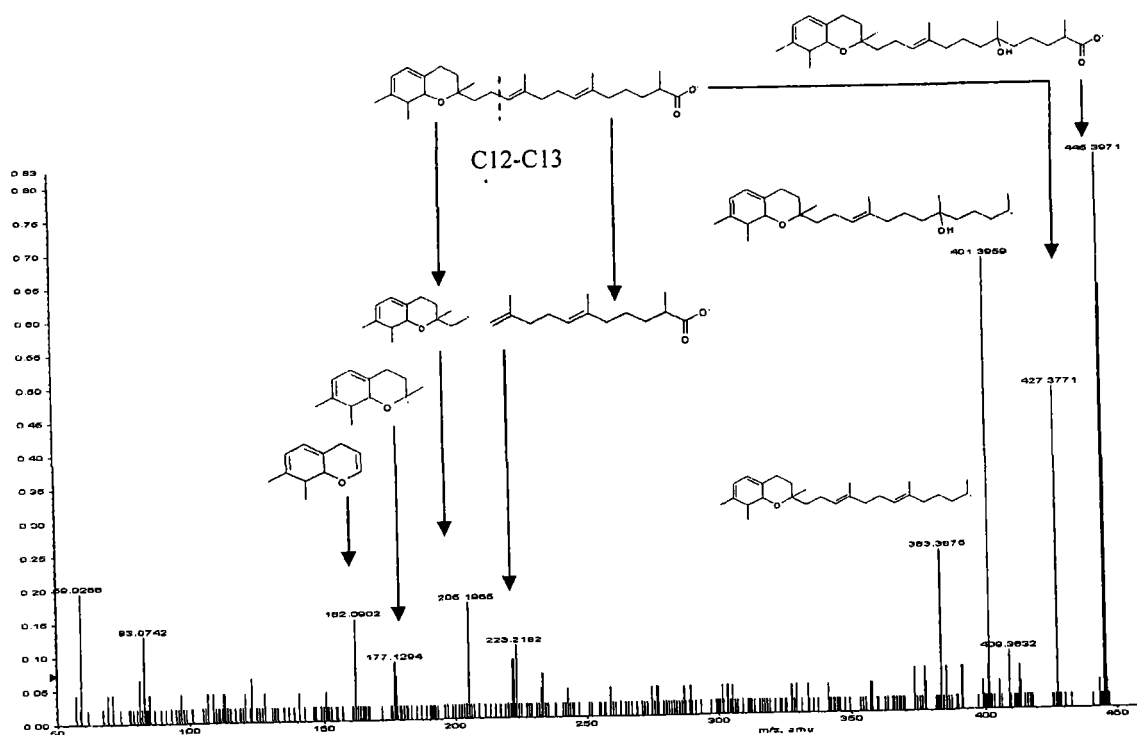
446.3522 (中性), C₂₈H₄₅O₄ 主要 MS/MS 片段的结构指定

图 15

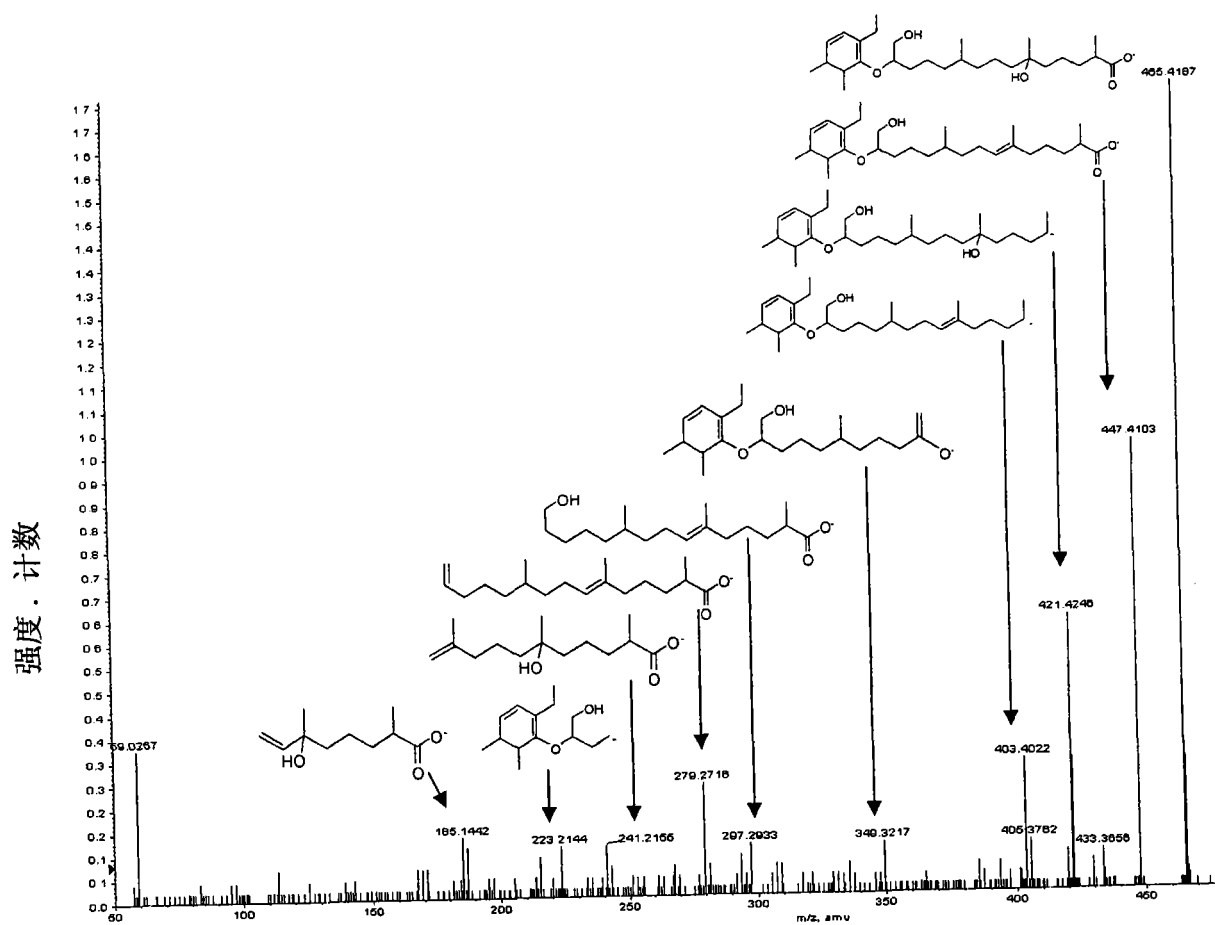
466.3661 (中性), C₂₈H₄₉O₅ 主要 MS/MS 片段的结构指定

图 16

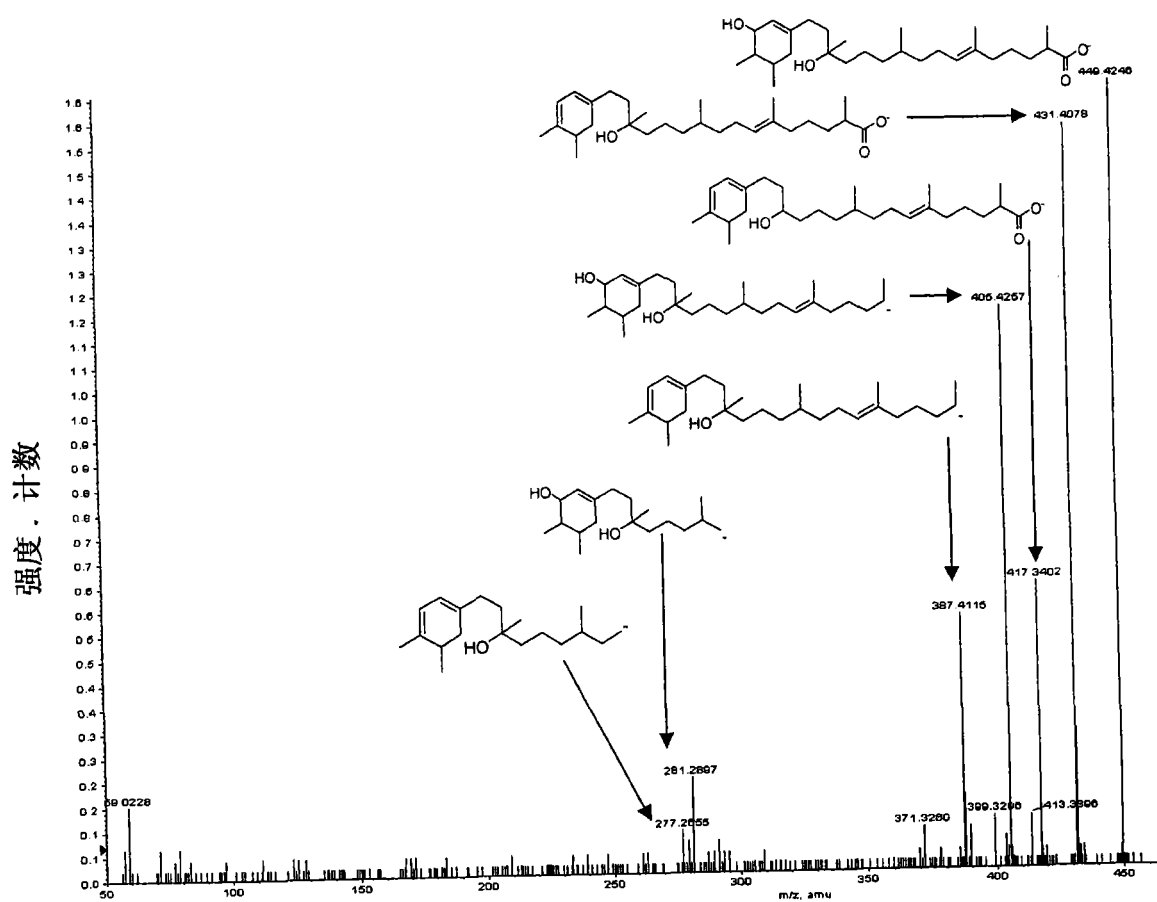
450.3726(中性), C₂₈H₄₉O₄ 主要 MS/MS 片段的结构指定

图 17

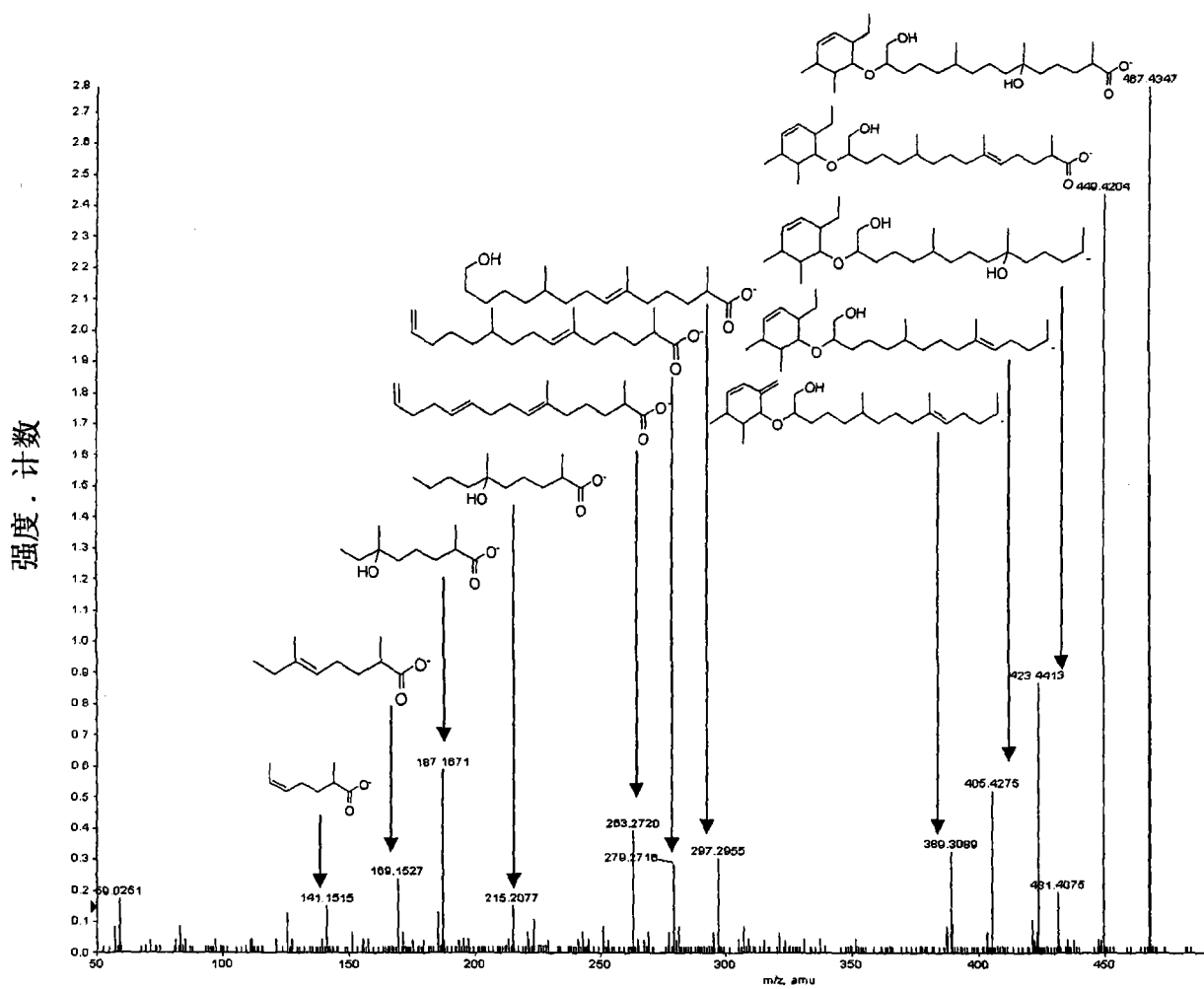
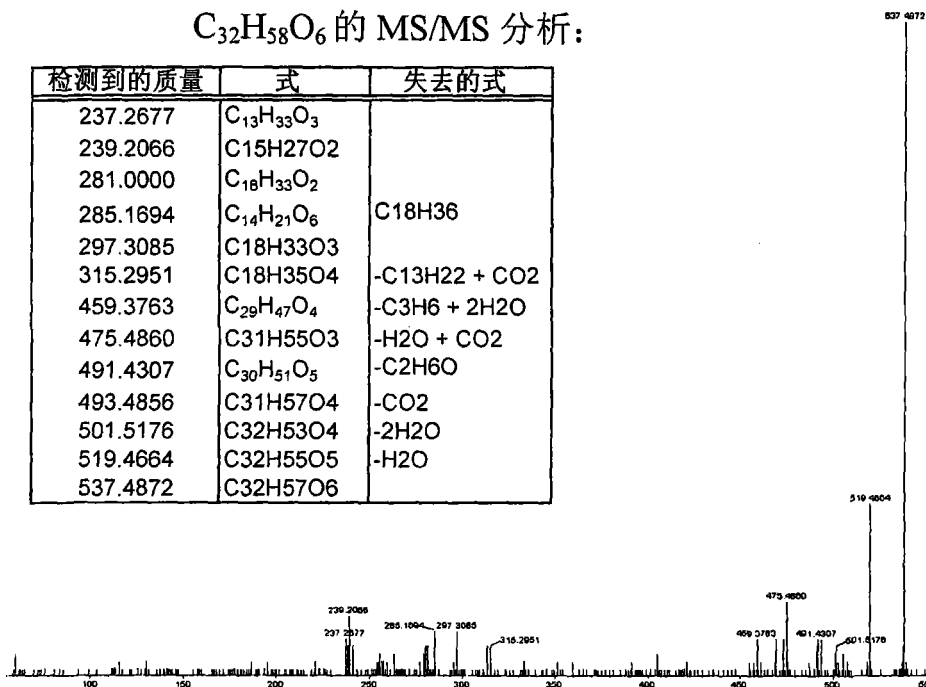
468.3840(中性), C₂₈H₅₁O₅ 主要 MS/MS 片段的结构指定

图 18

生物标记 538.4259 (中性) ($C_{32}H_{57}O_6$) 的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

$C_{32}H_{58}O_6$ 的 MS/MS 分析:

检测到的质量	式	失去的式
237.2677	$C_{13}H_{33}O_3$	
239.2066	$C_{15}H_{27}O_2$	
281.0000	$C_{18}H_{33}O_2$	
285.1694	$C_{14}H_{21}O_6$	$C_{18}H_{36}$
297.3085	$C_{18}H_{33}O_3$	
315.2951	$C_{18}H_{35}O_4$	$-C_{13}H_{22} + CO_2$
459.3763	$C_{29}H_{47}O_4$	$-C_3H_6 + 2H_2O$
475.4860	$C_{31}H_{55}O_3$	$-H_2O + CO_2$
491.4307	$C_{30}H_{51}O_5$	$-C_2H_6O$
493.4856	$C_{31}H_{57}O_4$	$-CO_2$
501.5176	$C_{32}H_{53}O_4$	$-2H_2O$
519.4664	$C_{32}H_{55}O_5$	$-H_2O$
537.4872	$C_{32}H_{57}O_6$	



$C_{32}H_{58}O_6$ 的 MS/MS 分析:

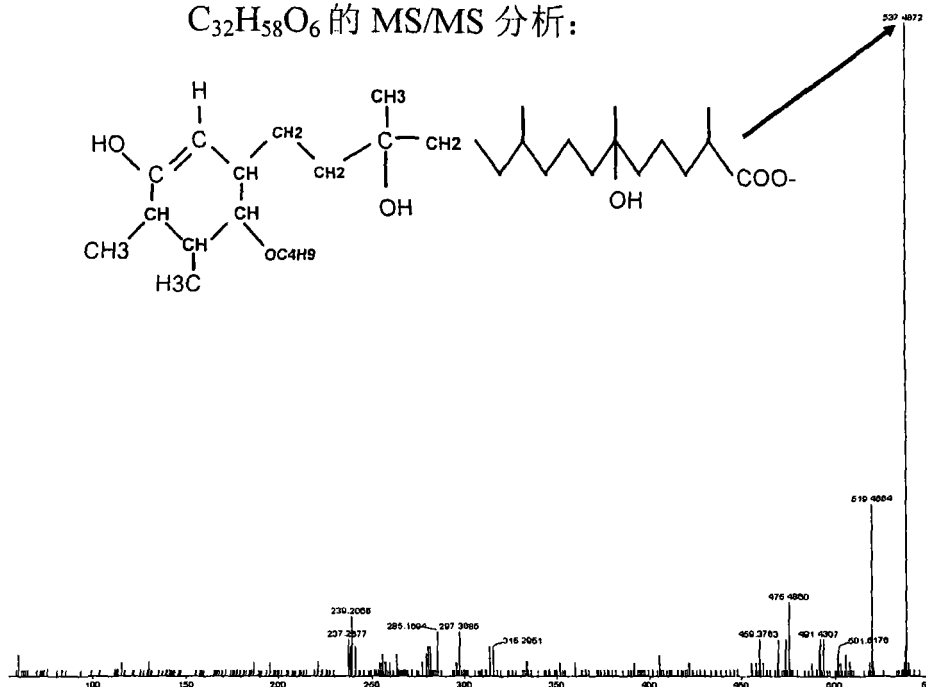
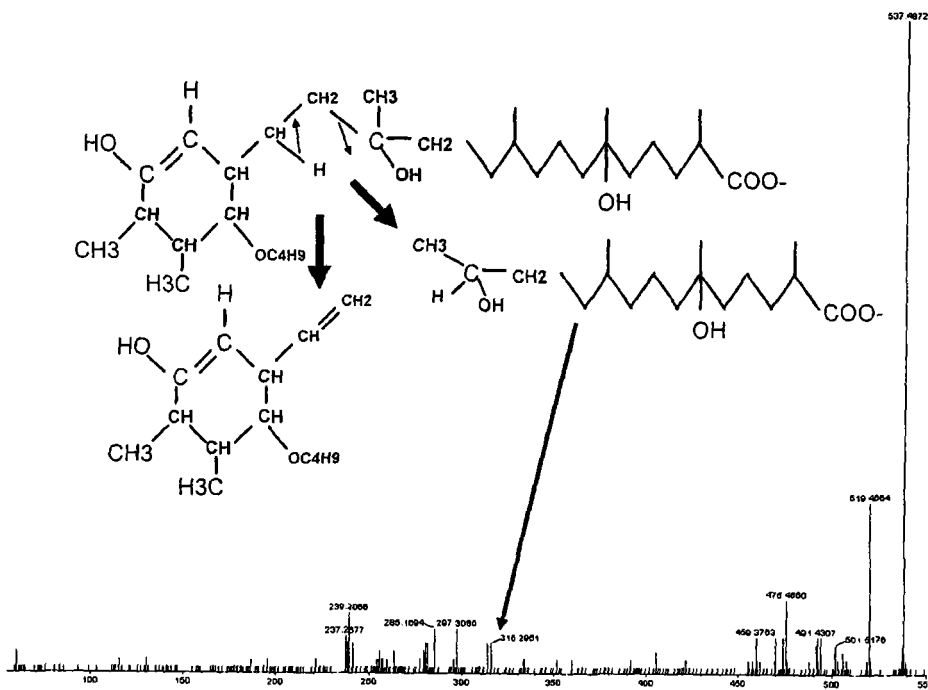


图 19

$C_{32}H_{58}O_6$ 的 MS/MS 分析:



$C_{32}H_{58}O_6$ 的 MS/MS 分析:

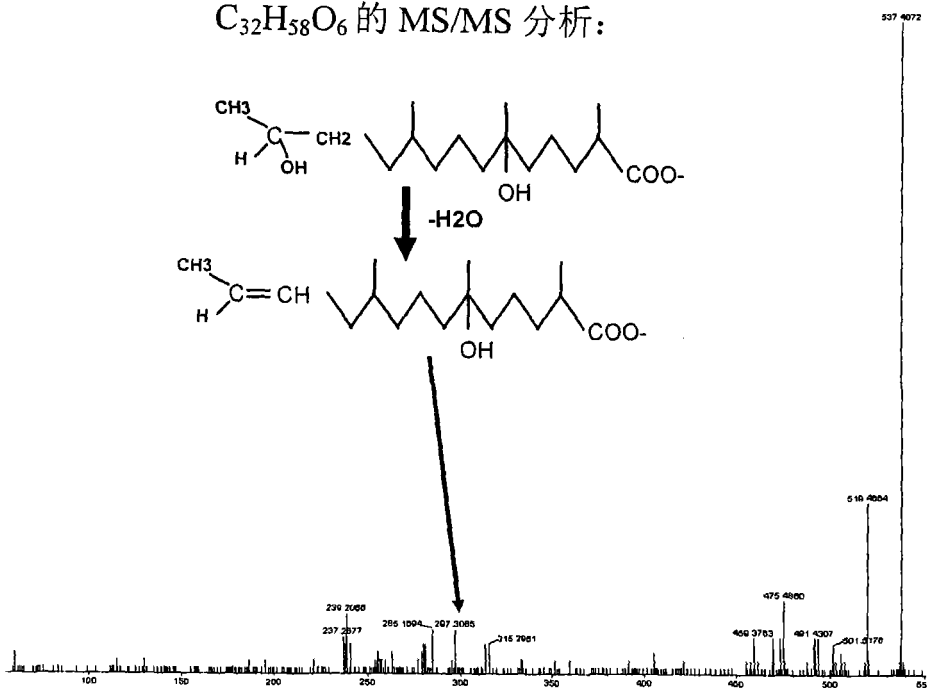
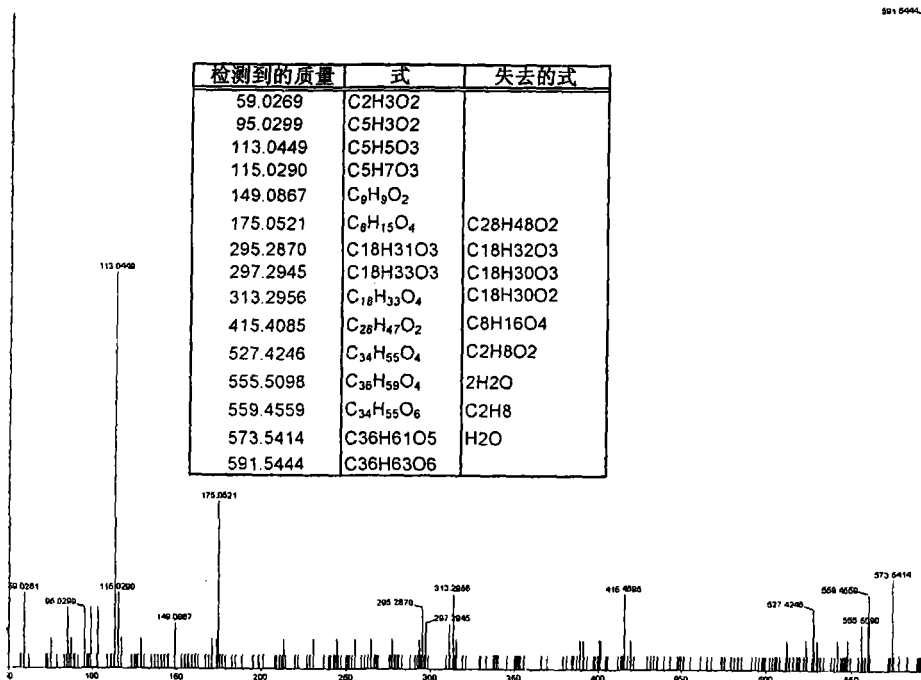


图 19 续

生物标记 592.4711 (中性) ($C_{36}H_{63}O_6$) 的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

$C_{36}H_{64}O_6$ 的 MS/MS 分析:



$C_{36}H_{64}O_6$ 的 MS/MS 分析:

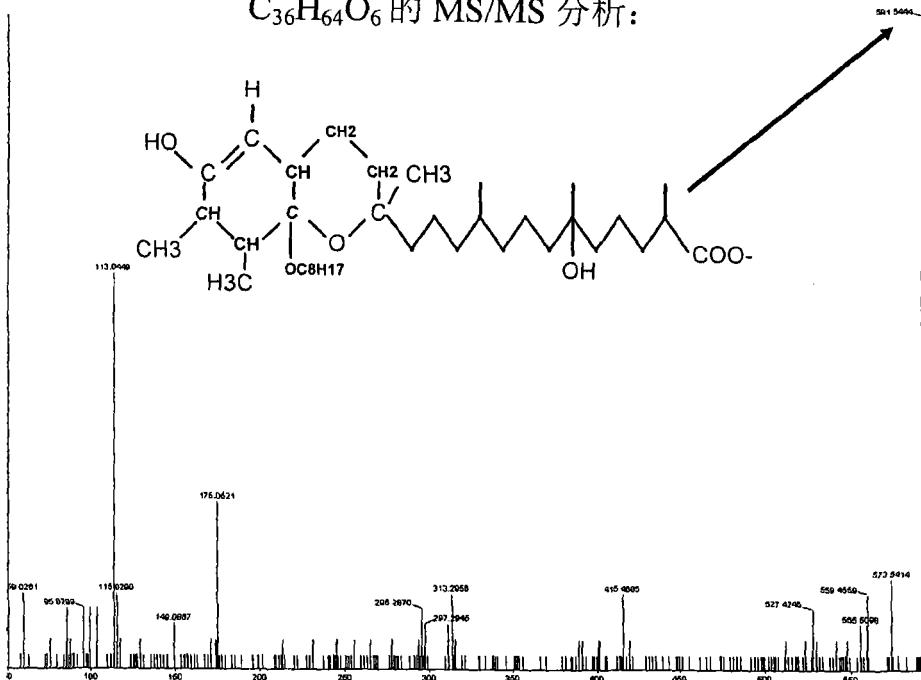


图 20

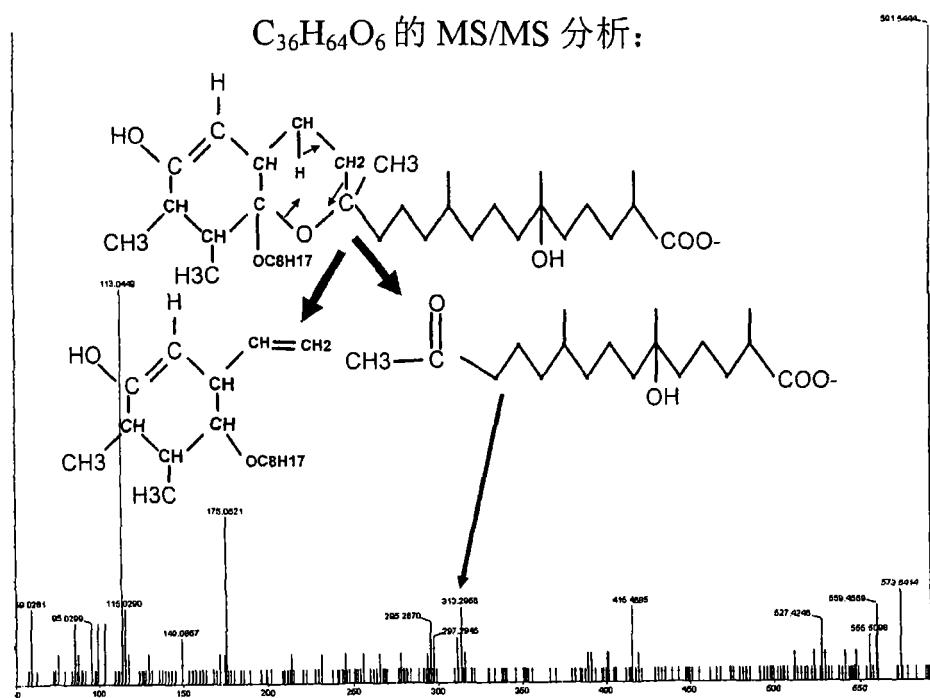
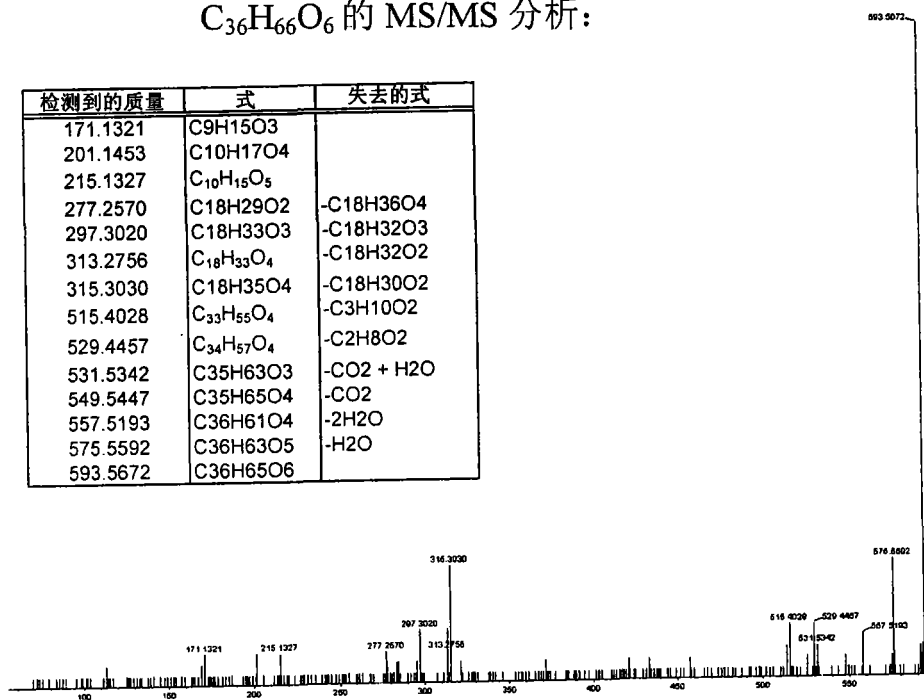


图 20 续

生物标记 594.4851 (中性) ($C_{36}H_{65}O_6$) 的主要 MS/MS 片段的推定的结构。

$C_{36}H_{66}O_6$ 的 MS/MS 分析:

检测到的质量	式	失去的式
171.1321	$C_9H_{15}O_3$	
201.1453	$C_{10}H_{17}O_4$	
215.1327	$C_{10}H_{15}O_5$	
277.2570	$C_{18}H_{29}O_2$	$-C_{18}H_{36}O_4$
297.3020	$C_{18}H_{33}O_3$	$-C_{18}H_{32}O_3$
313.2756	$C_{18}H_{33}O_4$	$-C_{18}H_{32}O_2$
315.3030	$C_{18}H_{35}O_4$	$-C_{18}H_{30}O_2$
515.4028	$C_{33}H_{55}O_4$	$-C_3H_{10}O_2$
529.4457	$C_{34}H_{57}O_4$	$-C_2H_8O_2$
531.5342	$C_{35}H_{63}O_3$	$-CO_2 + H_2O$
549.5447	$C_{35}H_{65}O_4$	$-CO_2$
557.5193	$C_{36}H_{61}O_4$	$-2H_2O$
575.5592	$C_{36}H_{63}O_5$	$-H_2O$
593.5672	$C_{36}H_{65}O_6$	



$C_{36}H_{66}O_6$ 的 MS/MS 分析:

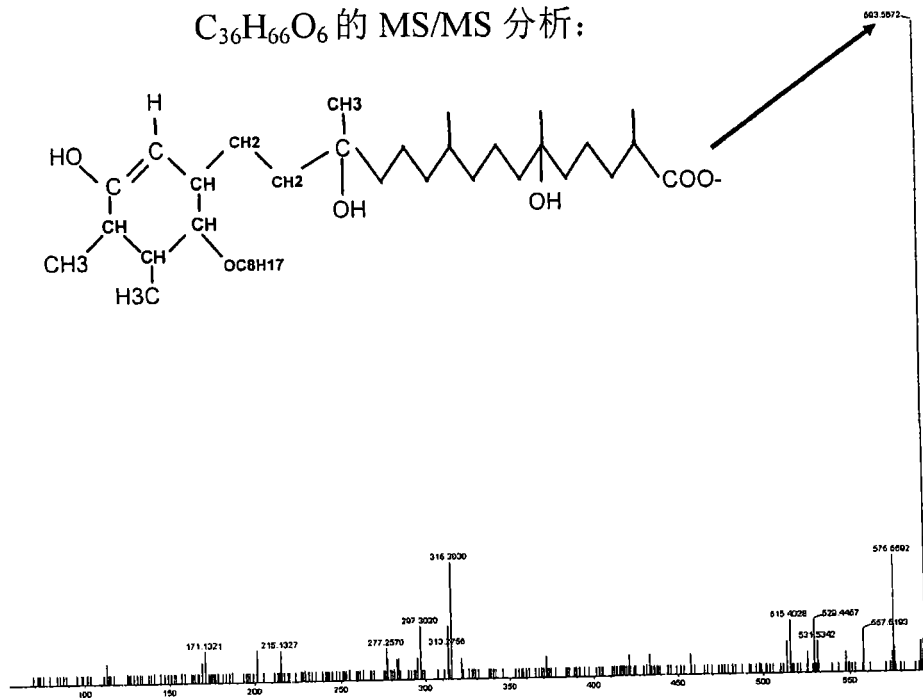
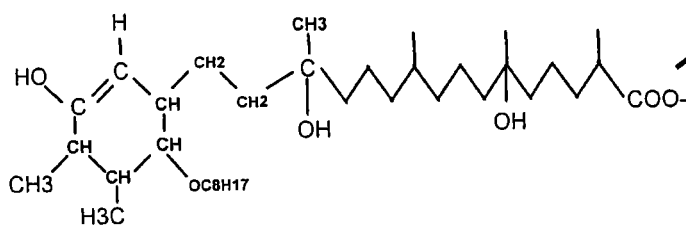
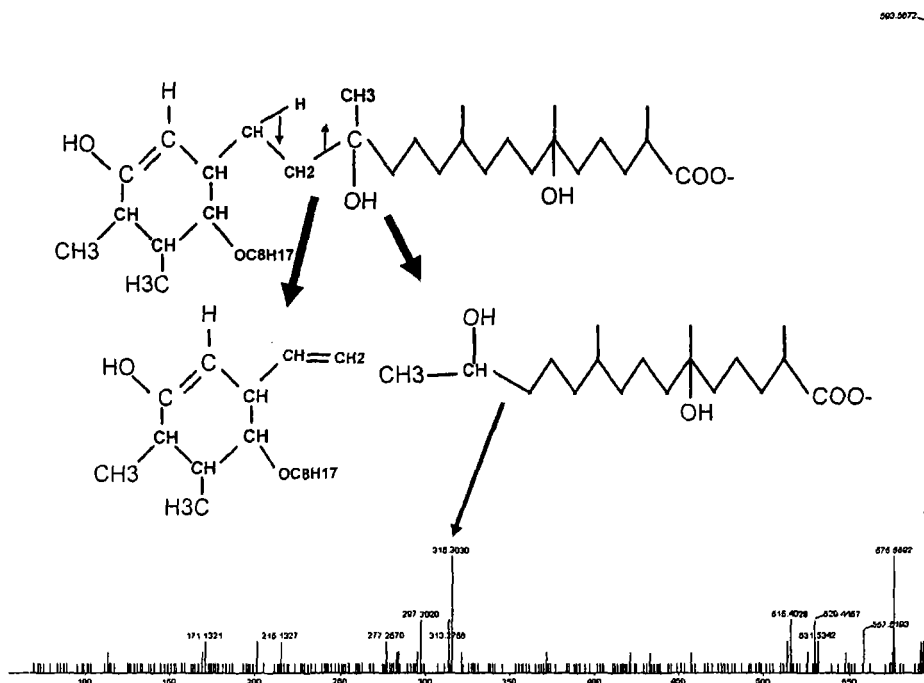


图 21

$C_{36}H_{66}O_6$ 的 MS/MS 分析:



$C_{36}H_{66}O_6$ 的 MS/MS 分析:

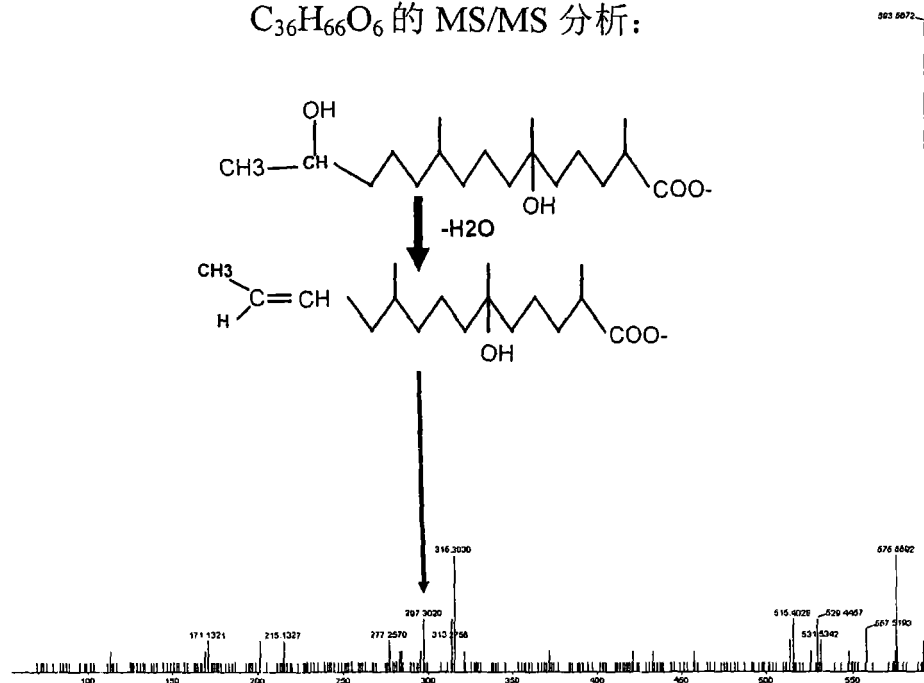


图 21 续

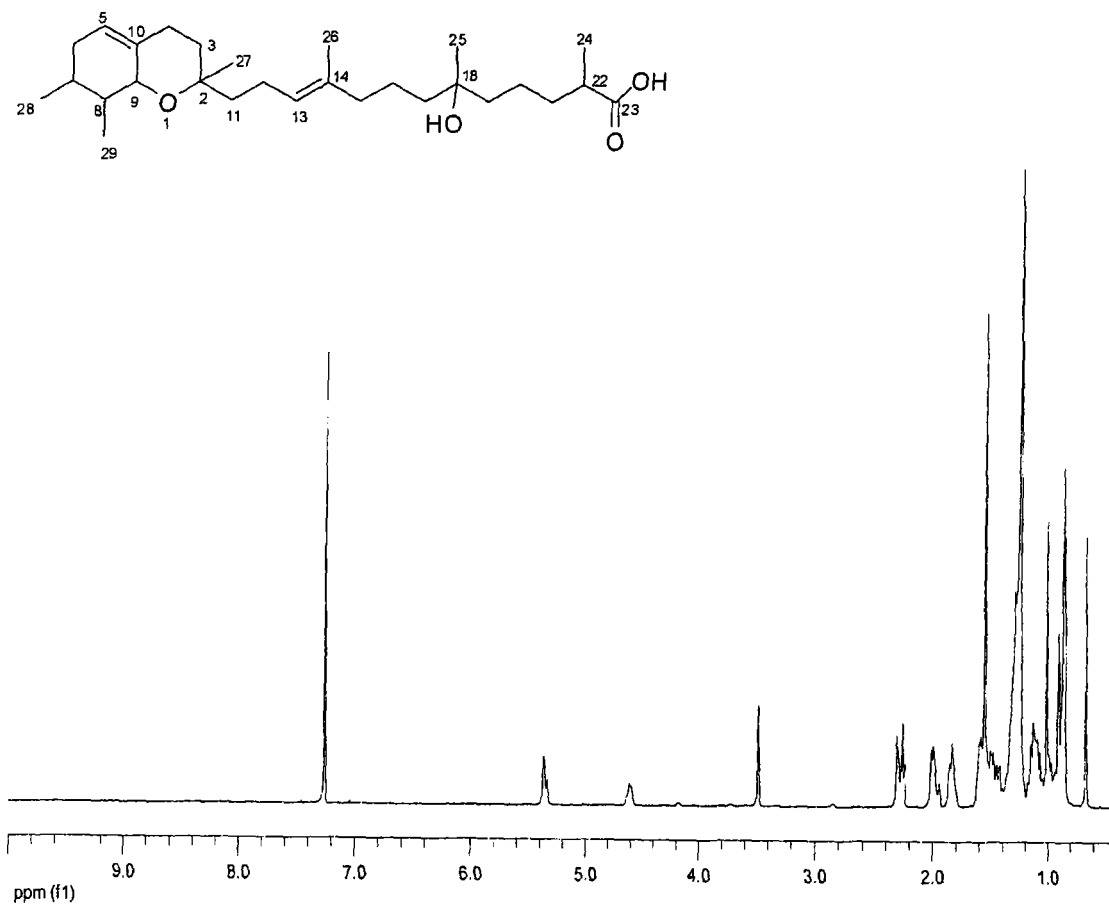


图 22

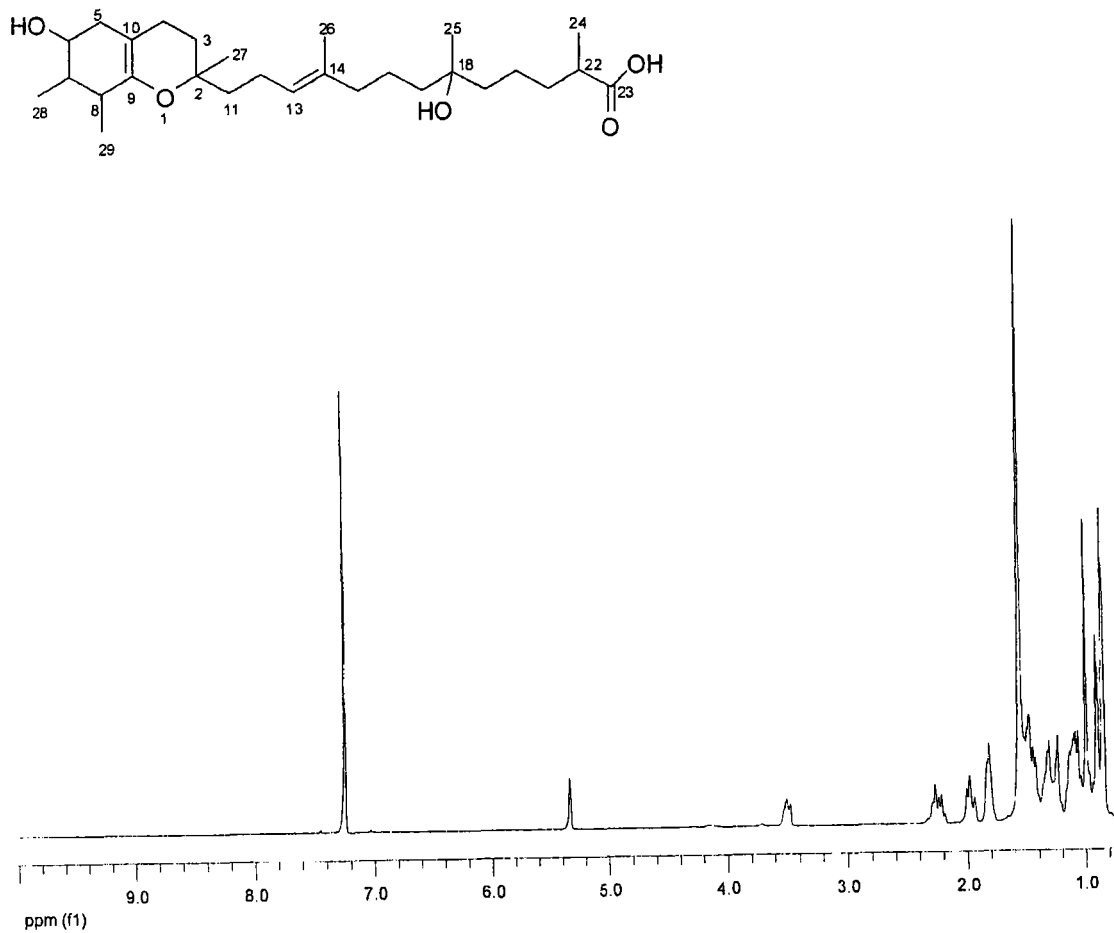


图 23

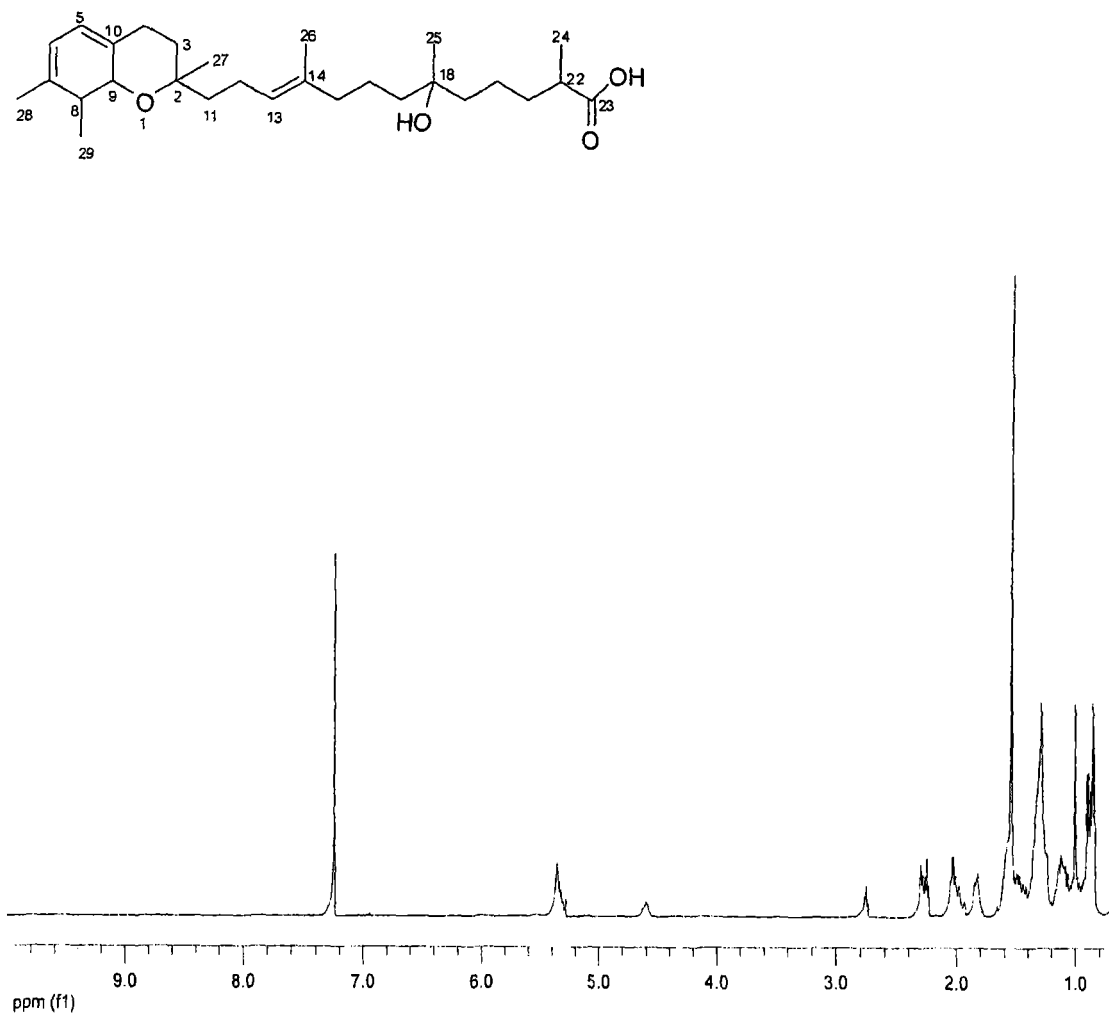


图 24

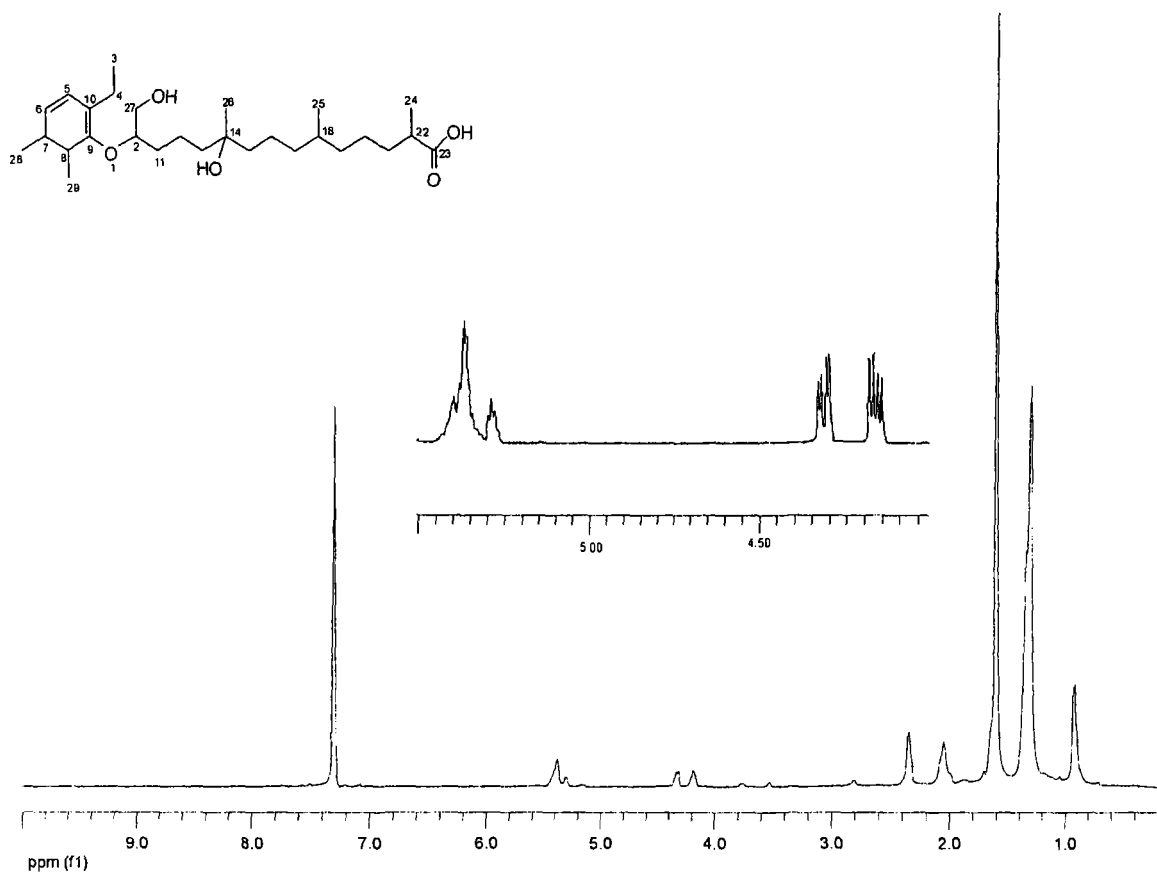


图 25

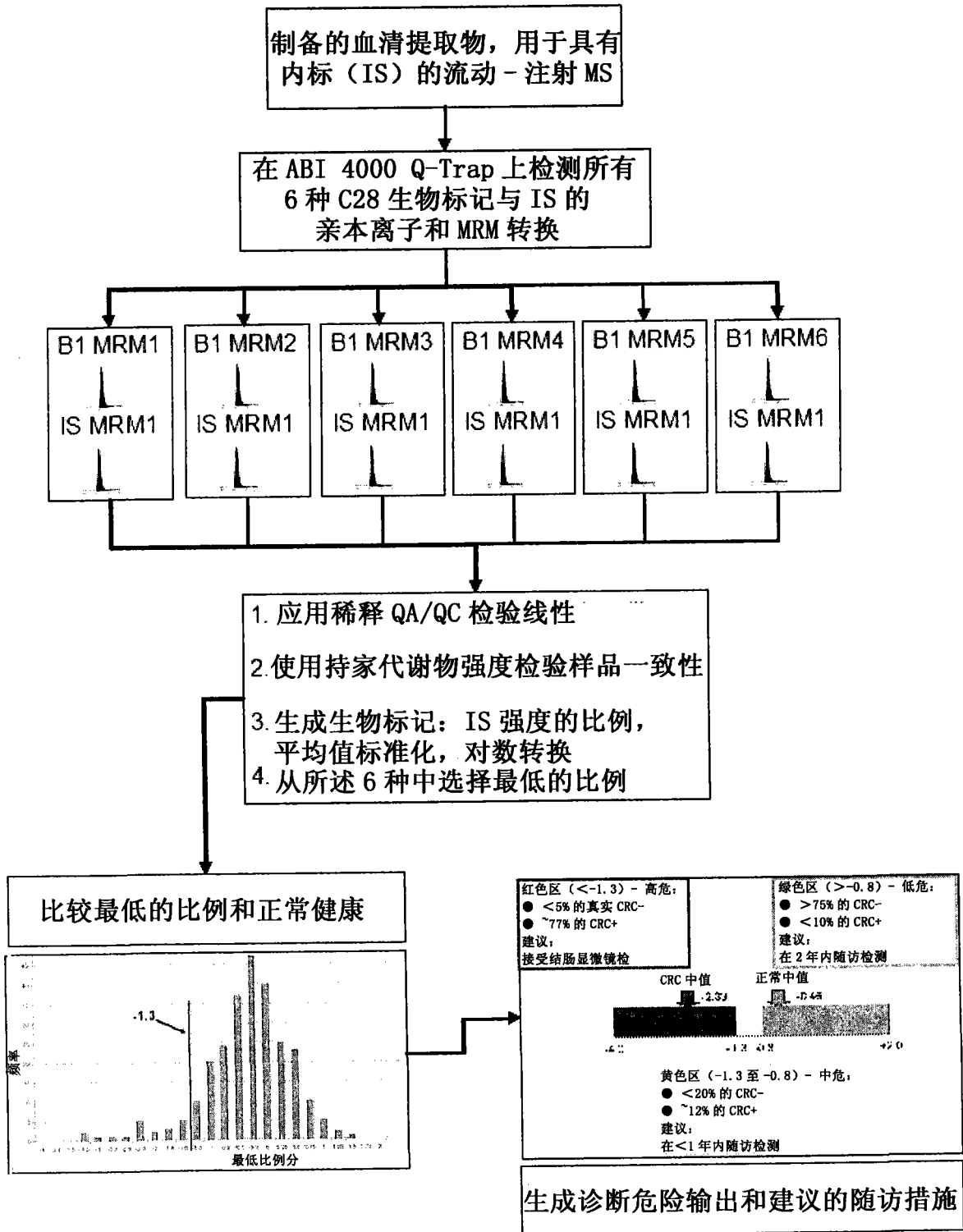


图 26

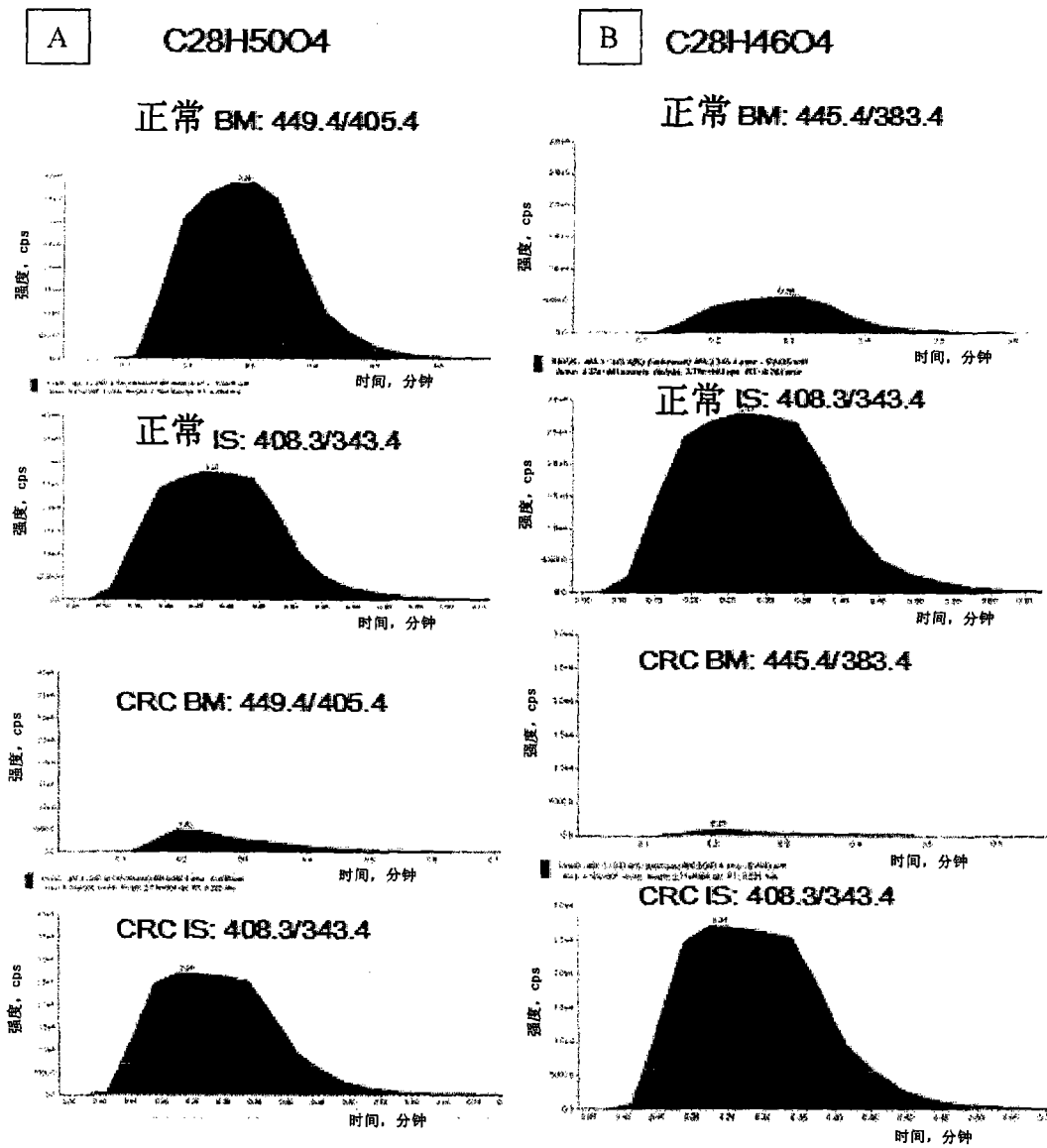


图 27

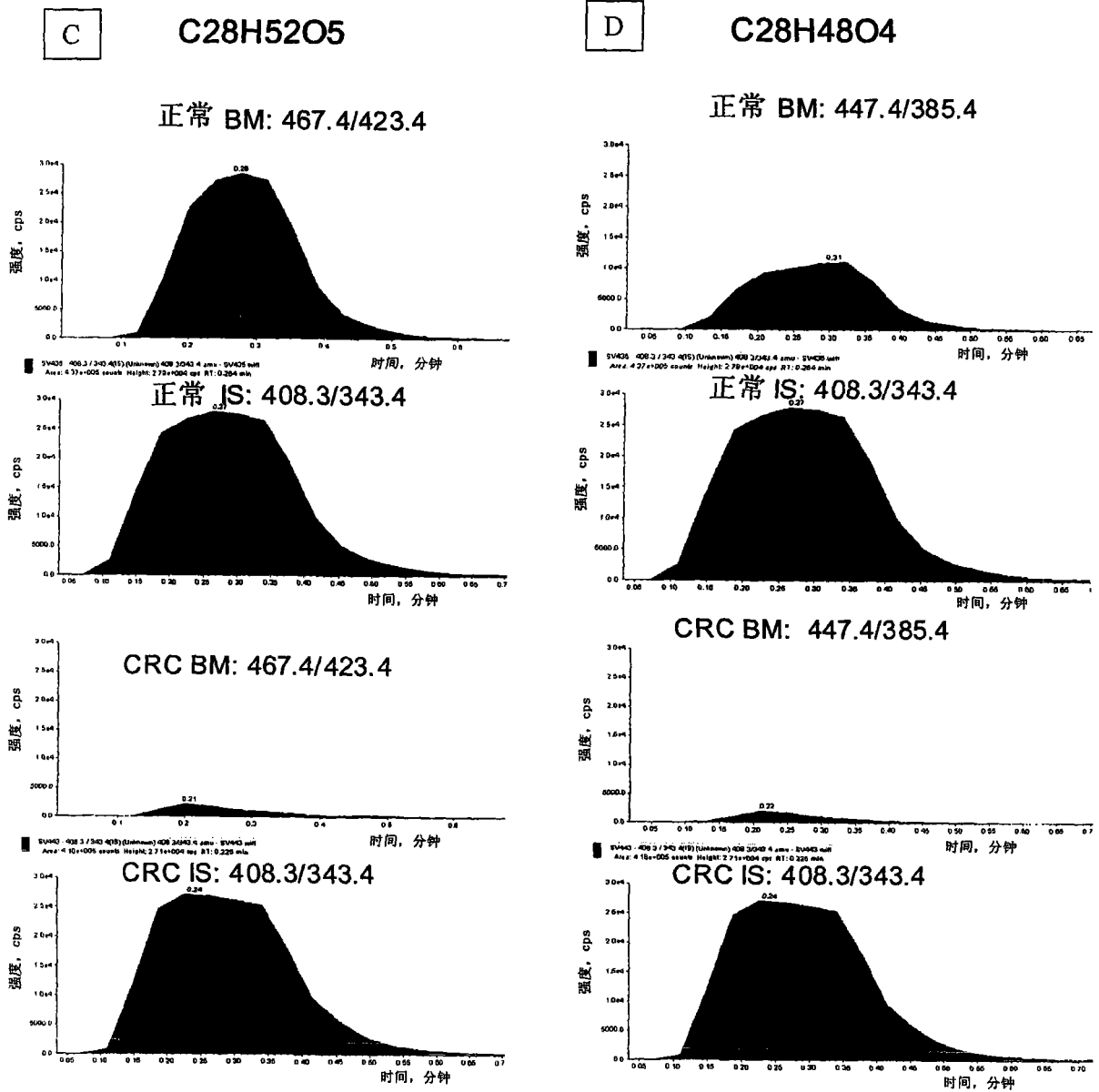


图 27 续

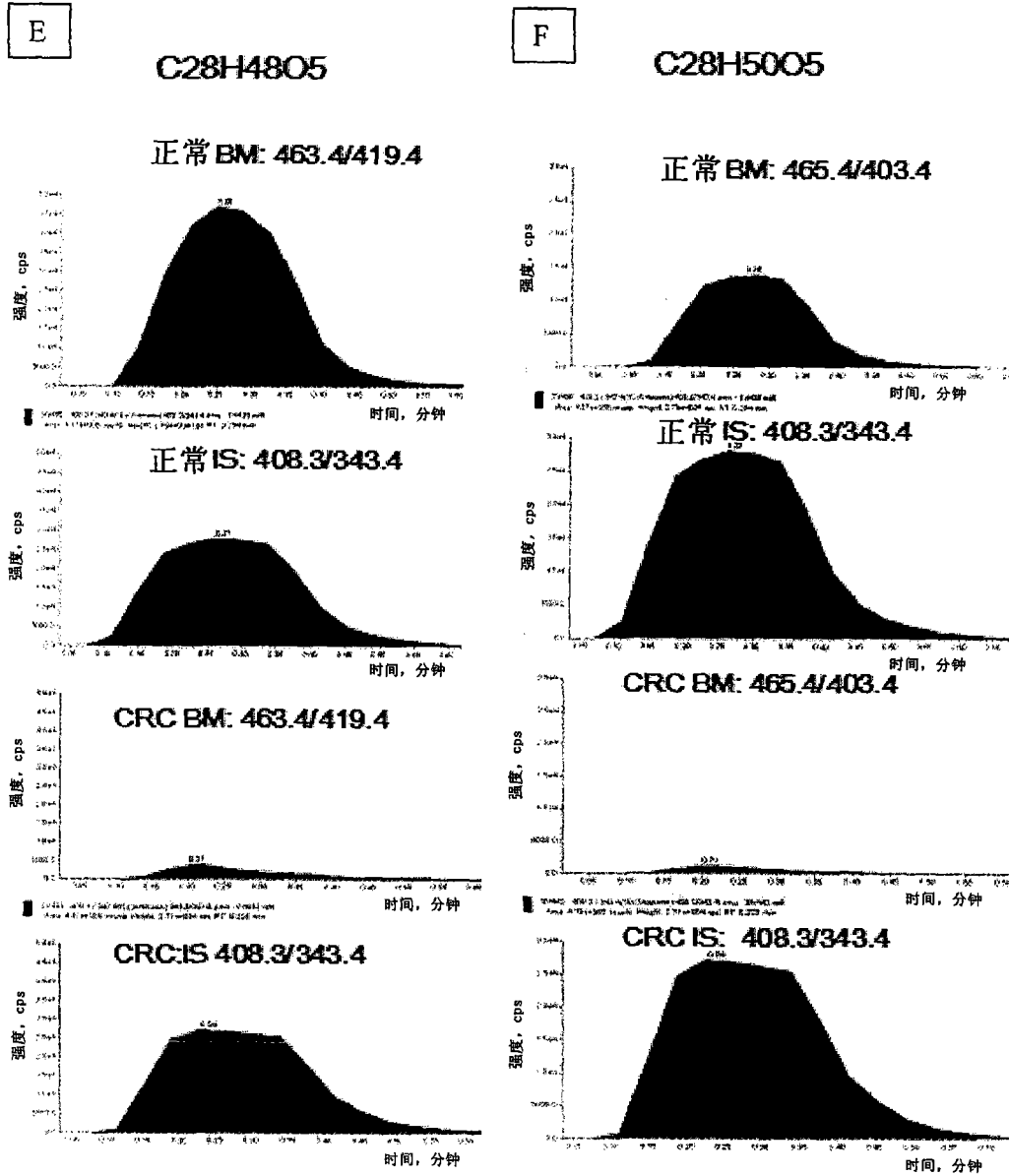


图 27 续

G

持家基因

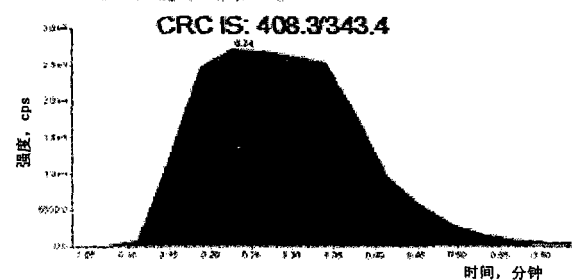
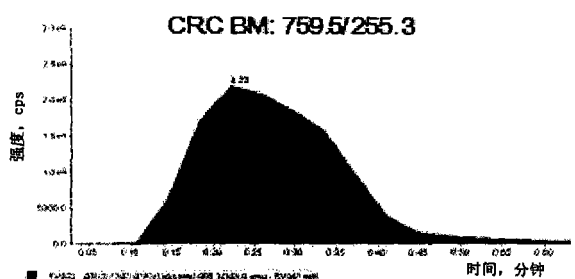
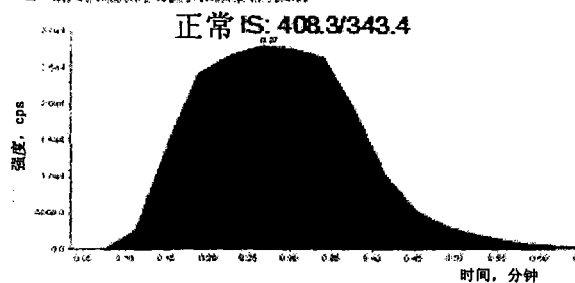
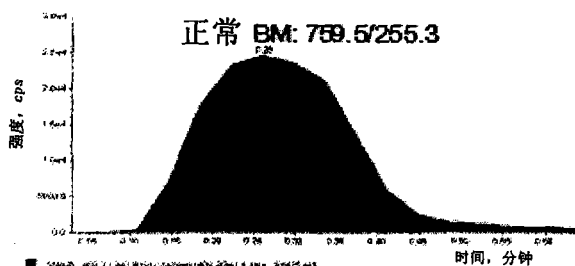


图 27 续

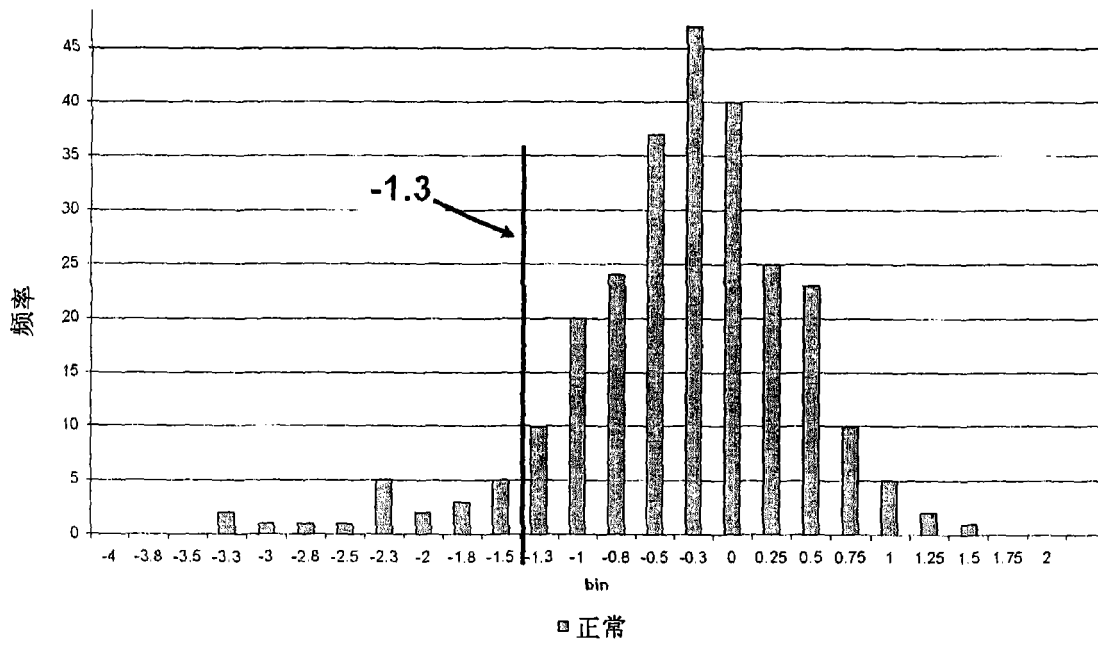


图 28

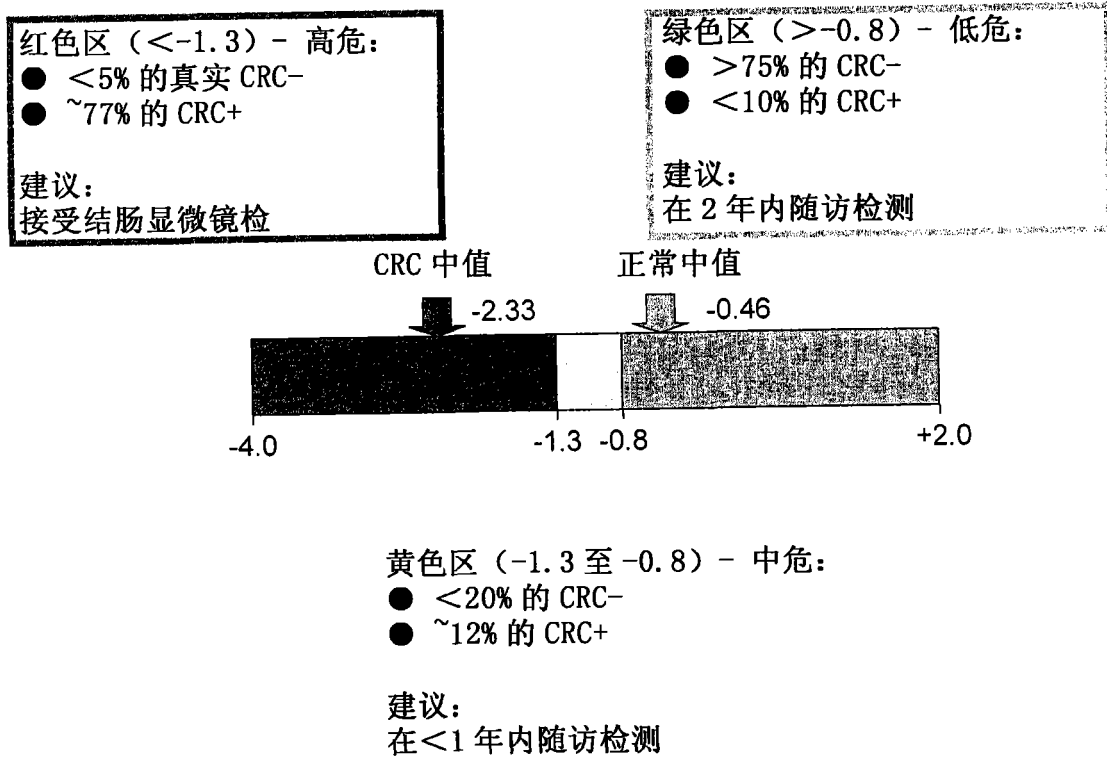


图 29

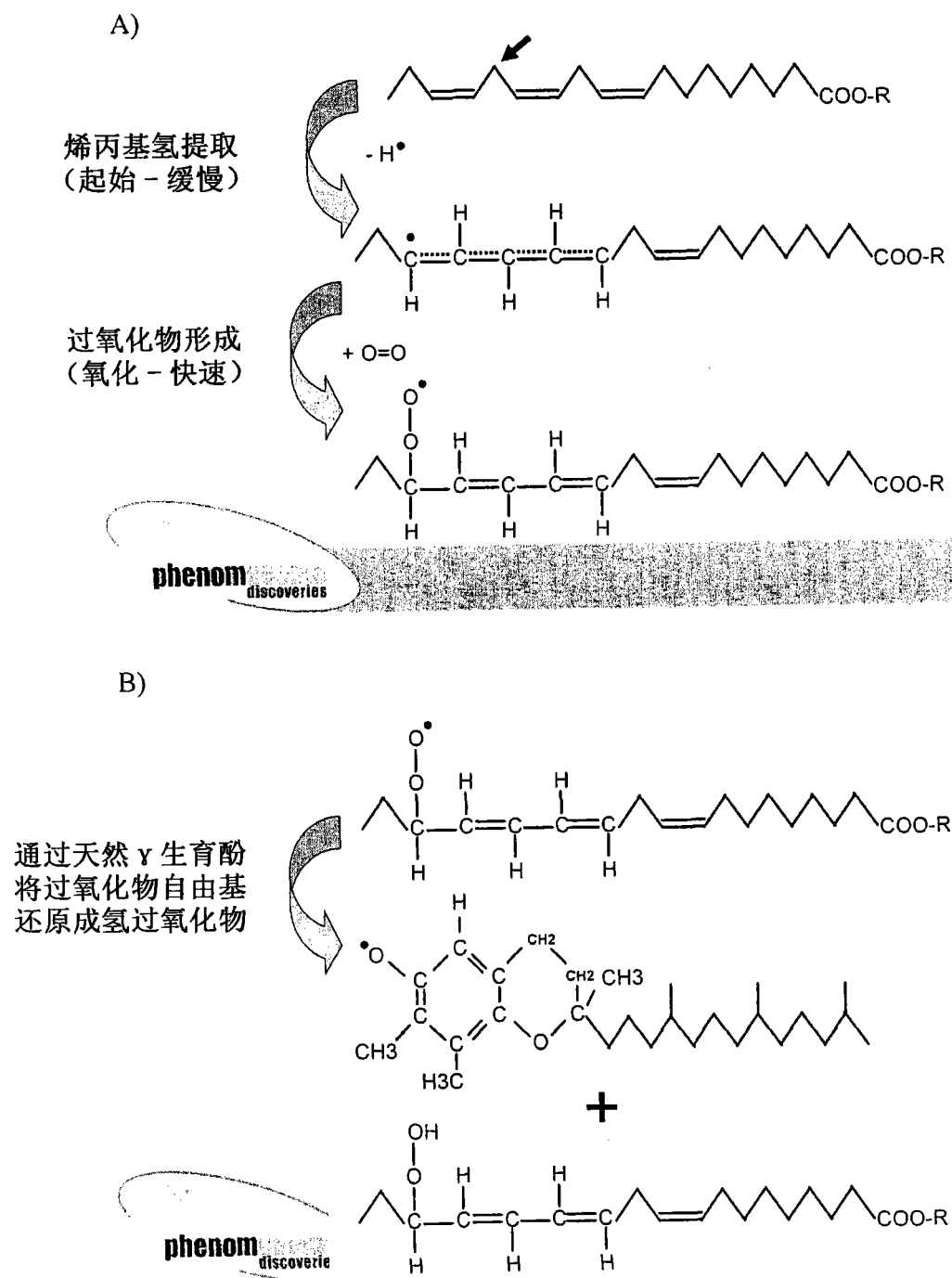
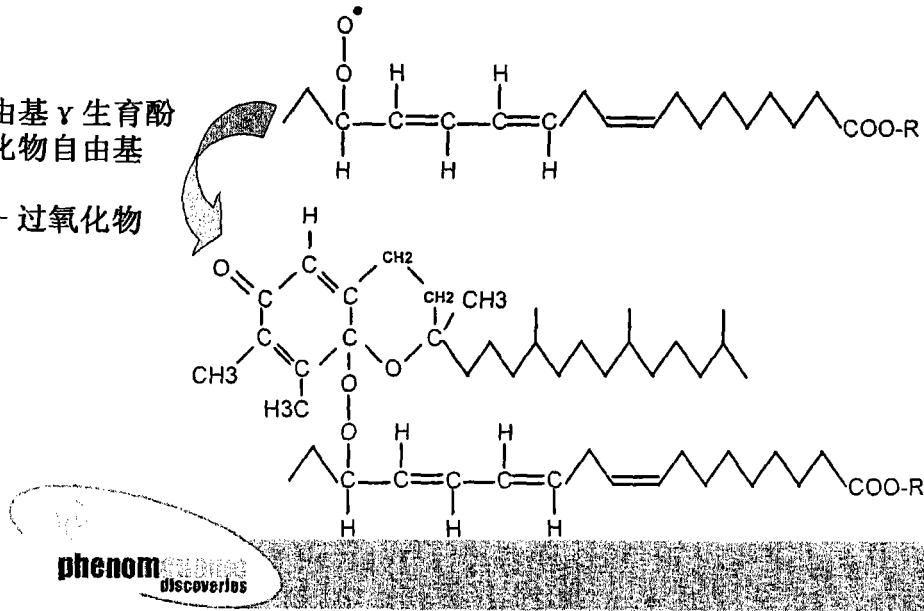


图 30

C)

通过自由基 γ 生育酚
将过氧化物自由基
还原成
生育酚-过氧化物



D)

然而

- O-O 键分裂是热力学有利的反应
- Fe²⁺/Fe³⁺ 是主要催化剂 (芬顿 Rx)
- 相对于其它组织, 排泄物质具有 >10X 的铁浓度
- 排泄物铁比系统铁更易利用

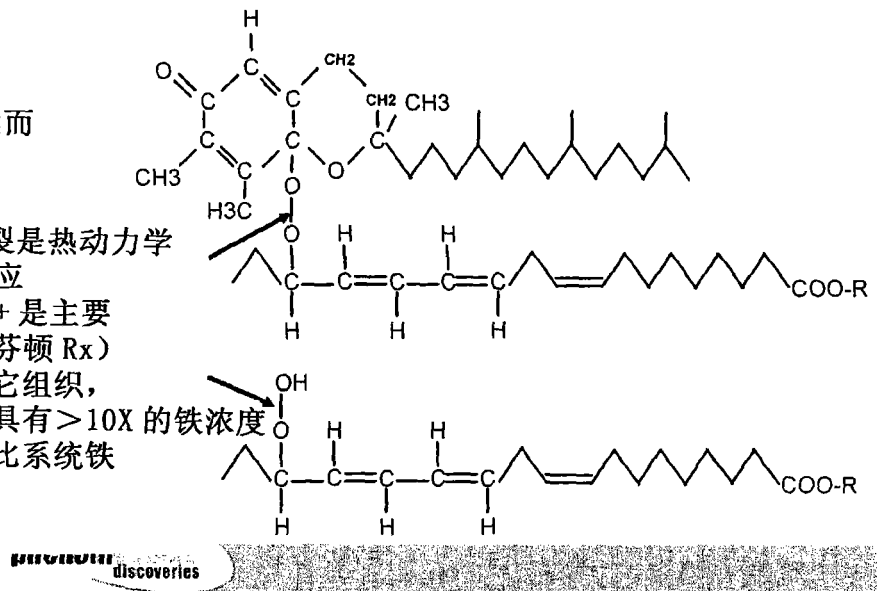


图 30 续

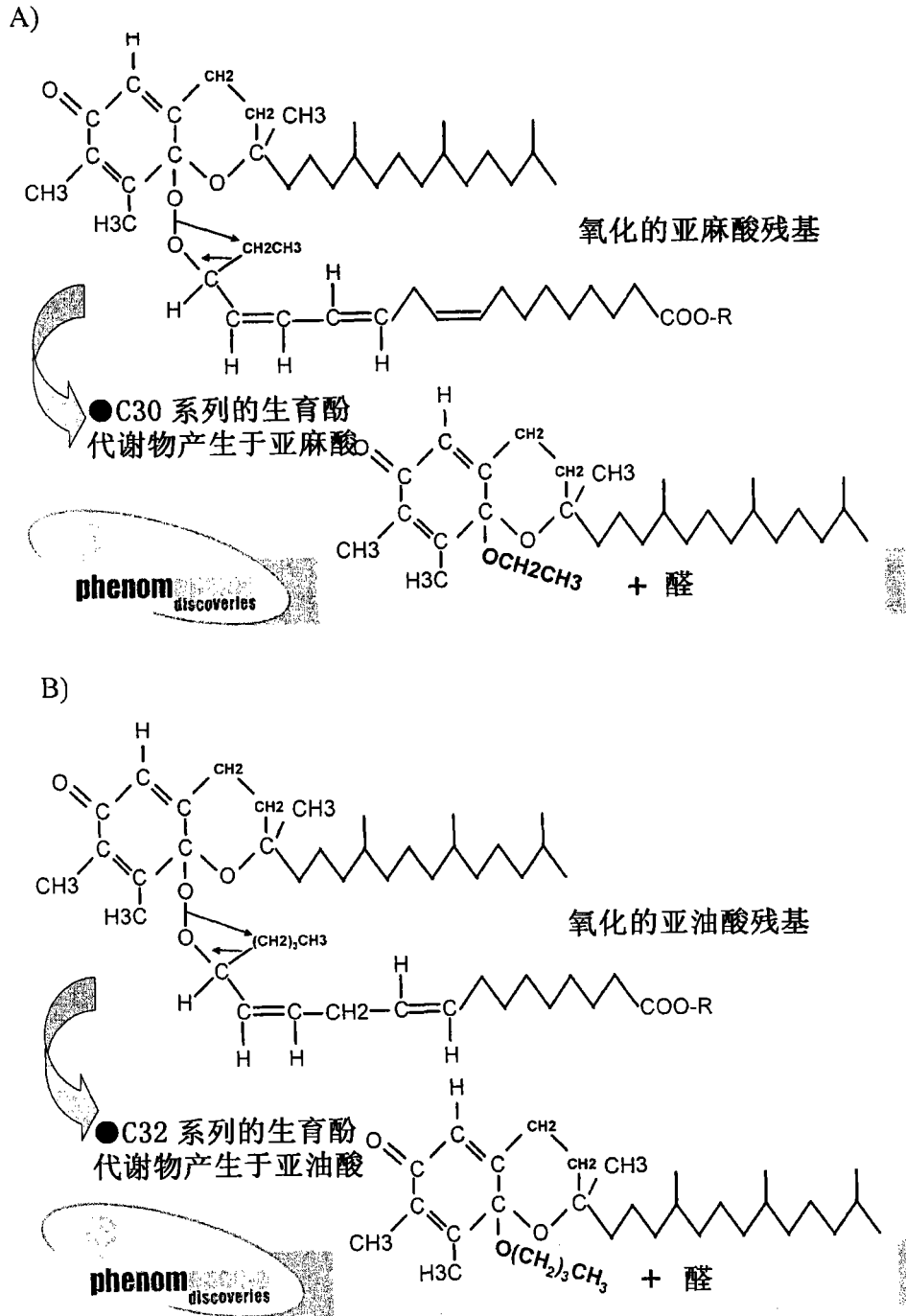


图 31

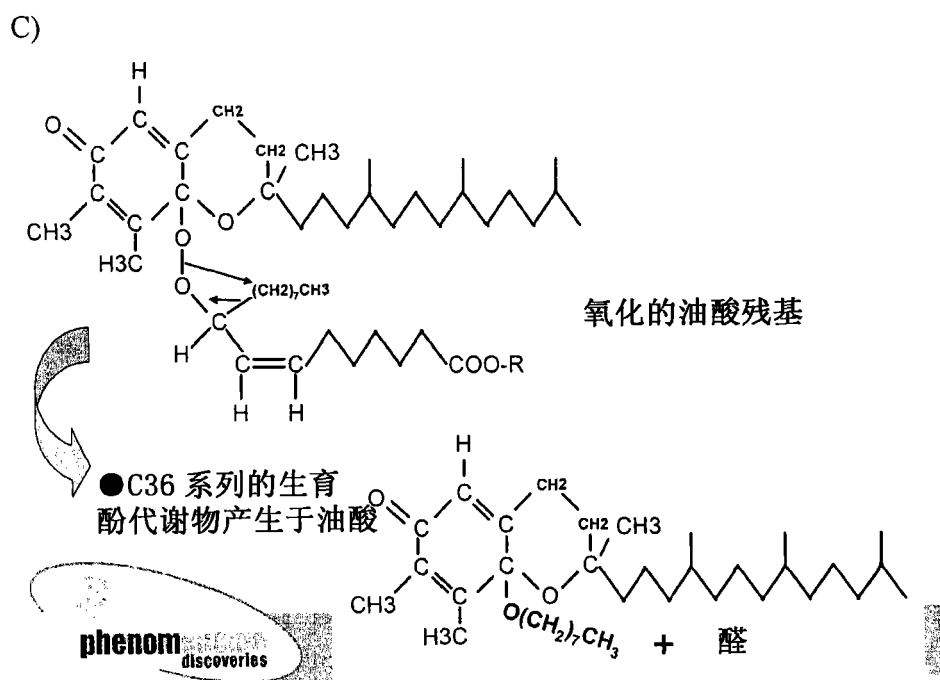


图 31 续

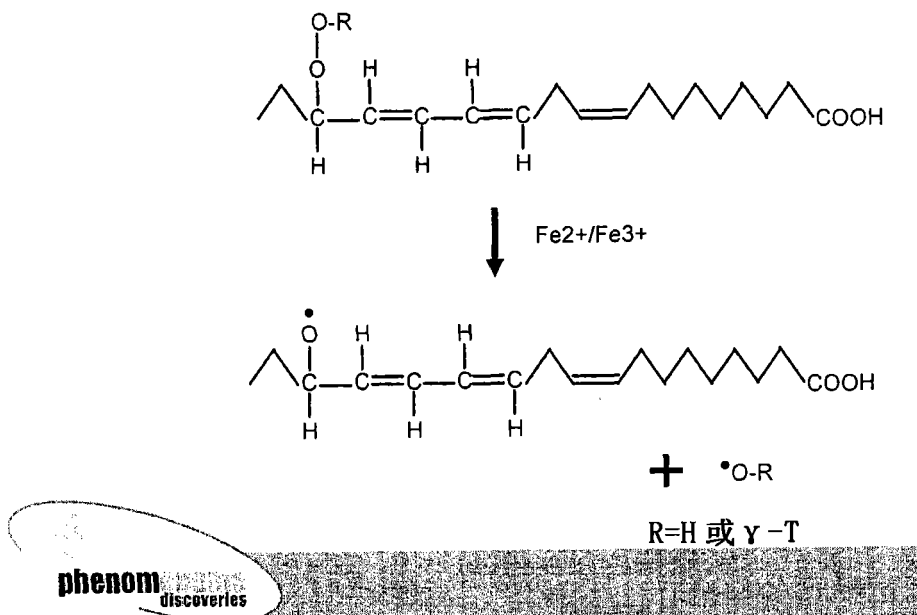


图 32

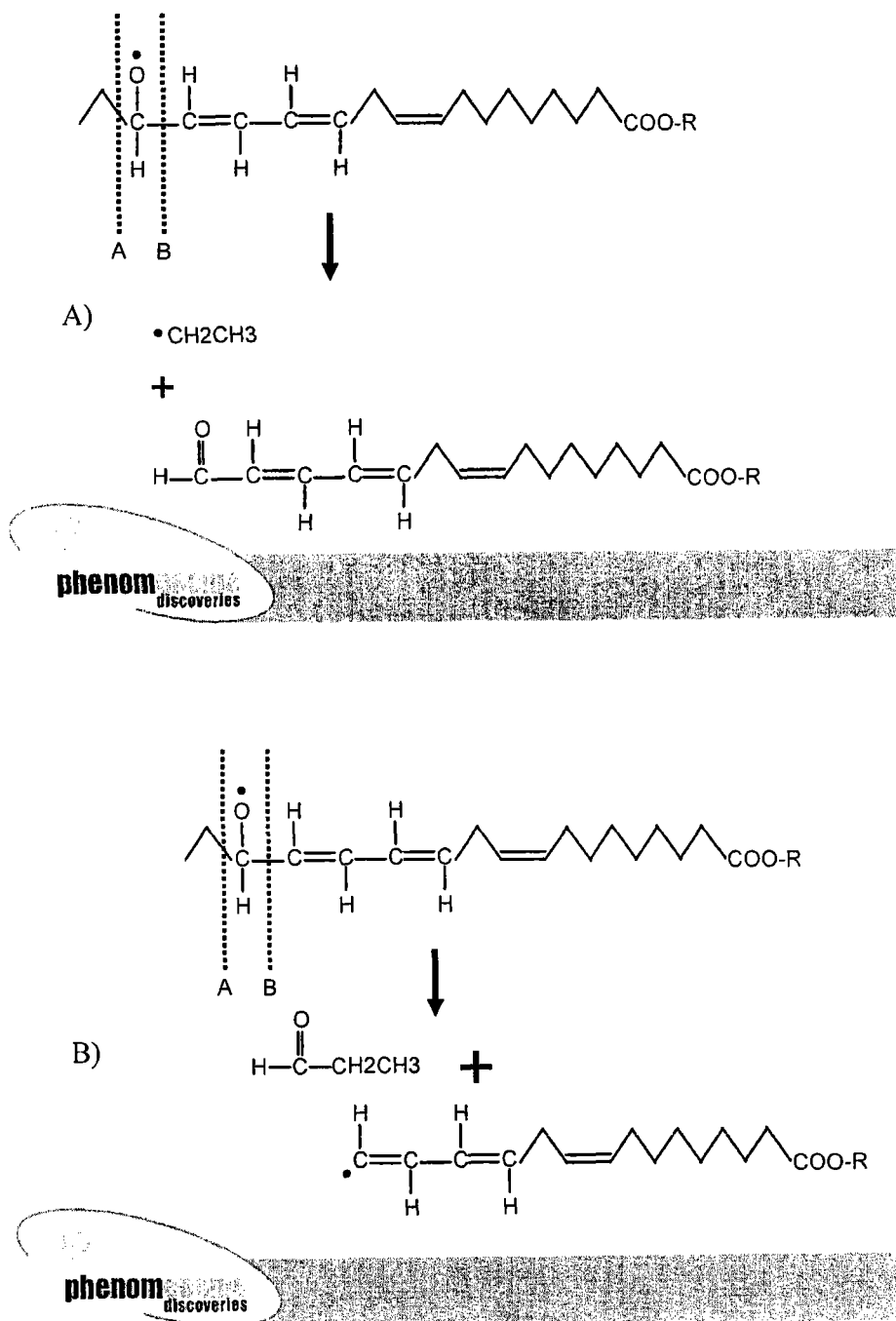
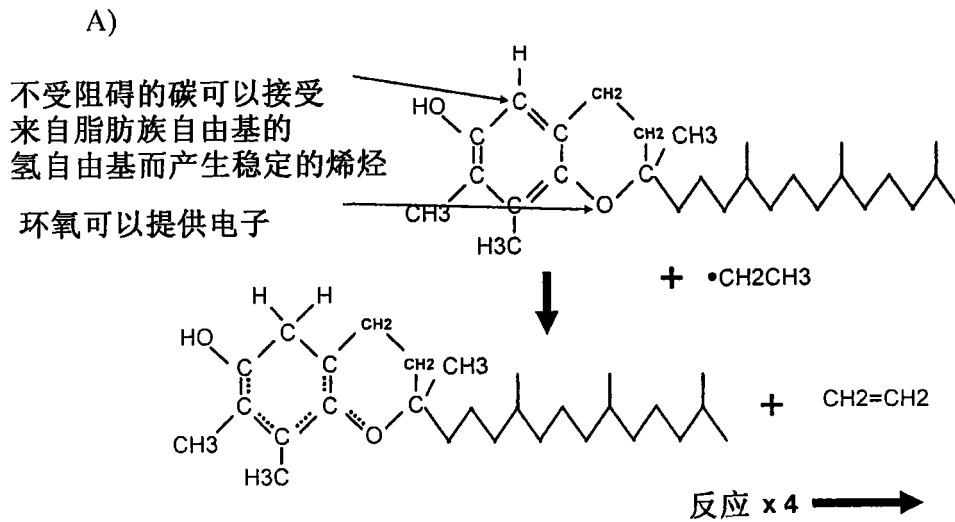
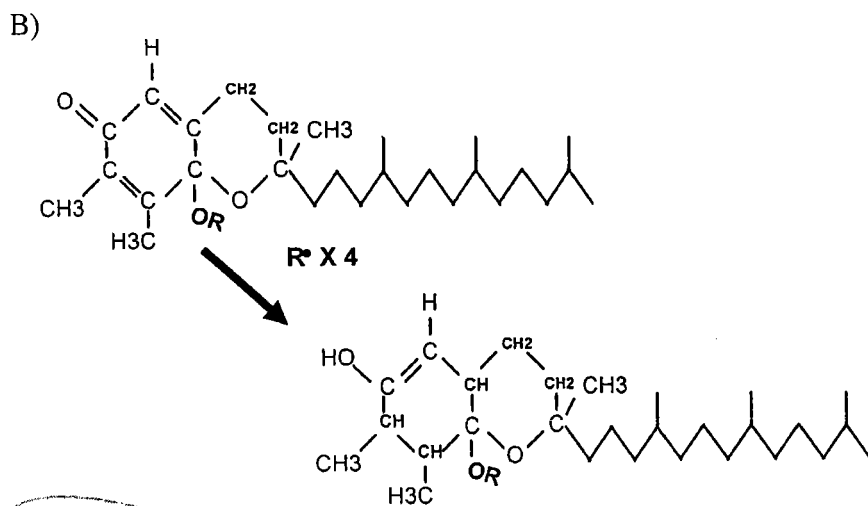


图 33



phenom discoveries ●通过这一机制，1分子γ-T可以中和4分子脂肪族自由基



phenom discoveries 通过这两种机制的结合，1分子γ-T可以中和4分子脂肪族自由基和2分子过氧化氢自由基

图 34

肝 P450 代谢

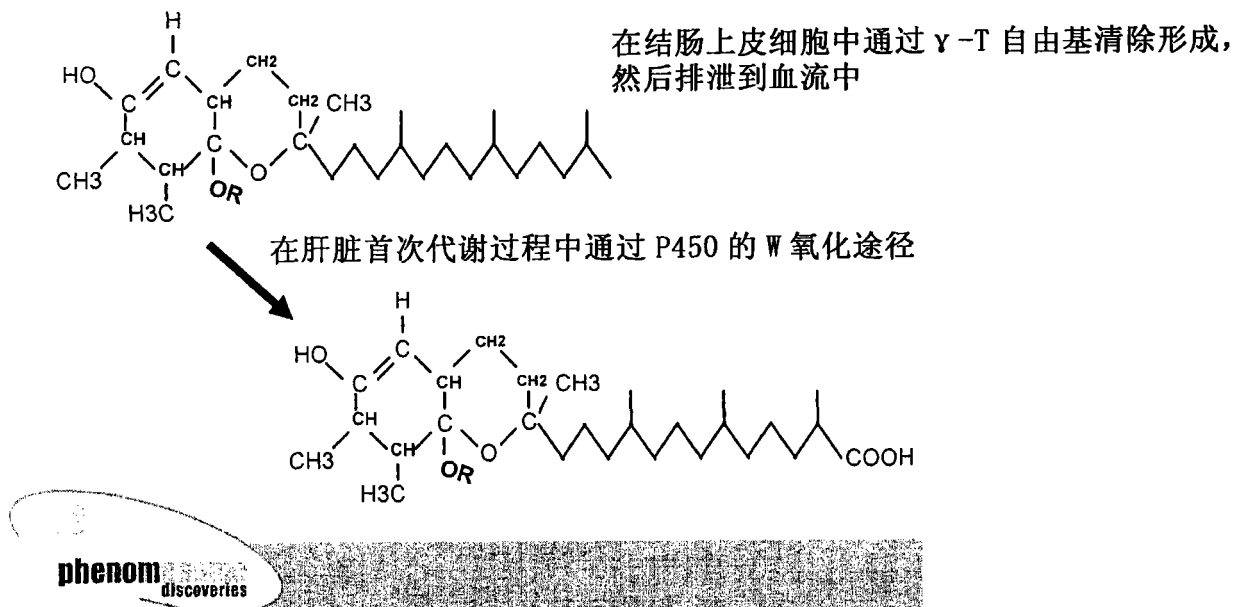


图 35

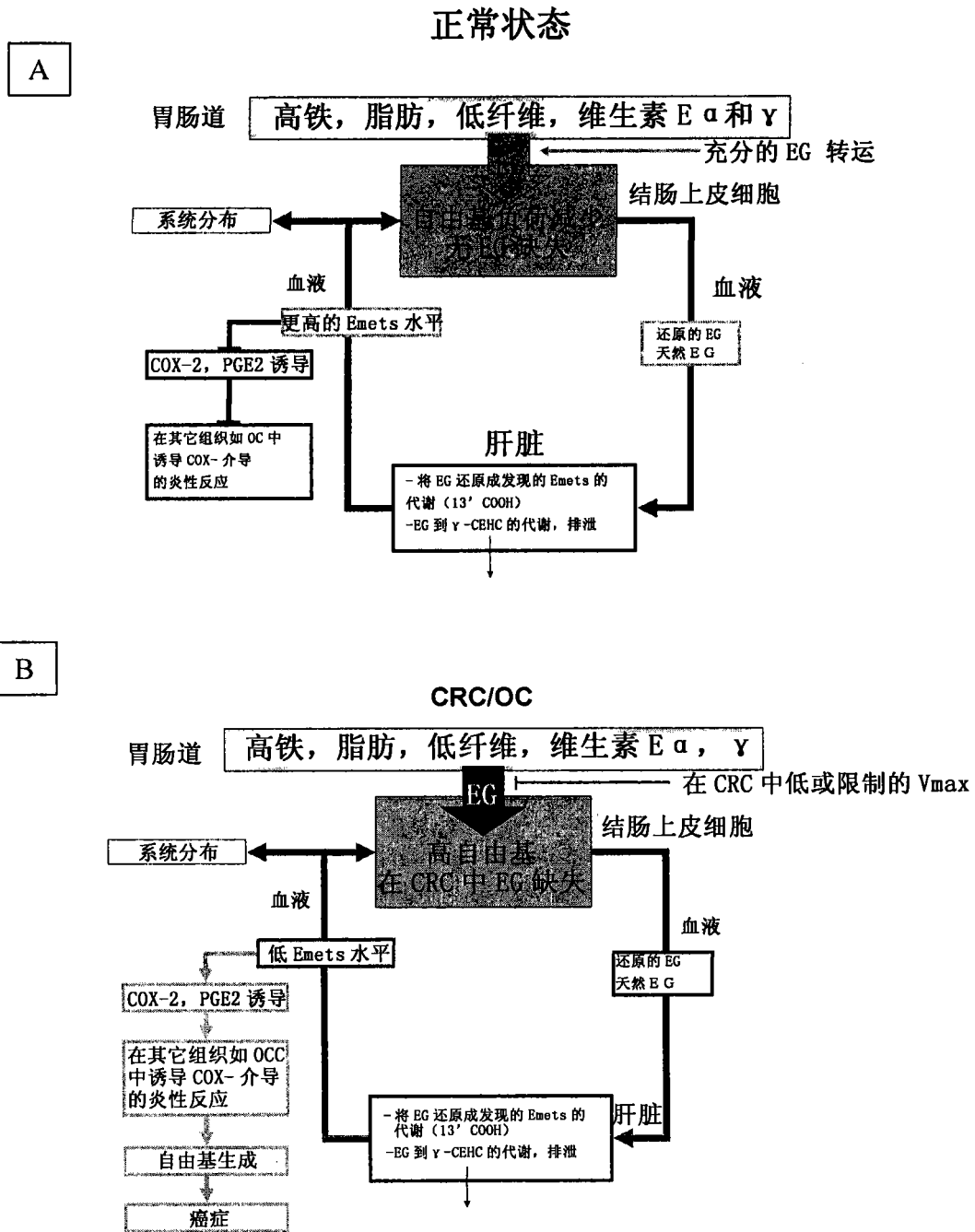


图 36

专利名称(译)	通过测量维生素E - 相关的代谢物诊断结肠直肠癌和卵巢癌的方法		
公开(公告)号	CN101263391A	公开(公告)日	2008-09-10
申请号	CN200680033461.2	申请日	2006-09-12
申请(专利权)人(译)	菲诺梅诺米发现公司		
当前申请(专利权)人(译)	菲诺梅诺米发现公司		
[标]发明人	肖恩里奇 达扬古登奥韦		
发明人	肖恩·里奇 达扬·古登奥韦		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/6848 G01N33/57484 G01N33/57449 G01N33/82 G01N33/57419		
代理人(译)	王旭		
优先权	60/804764 2006-06-14 US 60/716310 2005-09-12 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及结肠直肠癌和卵巢癌(分别为CRC和OC)的诊断。本发明描述内源小分子和CRC或OC之间的关系。具体地,本发明涉及通过测量维生素E - 同种型及相关的代谢物而诊断CRC和OC。本发明还涉及在所述方法中鉴定的诊断标记。本发明涉及CRC的潜伏情形和症状之前的阶段, CRC各个阶段和严重性的诊断, CRC的早期检测, 监测并且诊断治疗对CRC和OC健康状态的作用。

