

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 797**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/34 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C07D 311/00 (2006.01)

C07D 405/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2008 E 08827775 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2191006**

54 Título: **Procedimientos de ensayo de la actividad enzimática alfa-L-iduronidasa**

30 Prioridad:

17.08.2007 US 956644 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.02.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON (100.0%)
4311 11th Avenue N.E., Suite 500
Seattle, WA 98105-4608, US**

72 Inventor/es:

**GELB, MICHAEL y
BLANCHARD, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 396 797 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa

- 5 **[0001]** Los programas de cribado neonatal se han establecido para cuantificar el nivel de metabolitos asociados con enfermedades tratables. La mucopolisacaridosis de tipo I (MPS-I) es un trastorno de almacenamiento lisosómico causado por la deficiencia de actividad enzimática de α -L-iduronidasa (IdA; EC 3.2.1.76) y puede manifestar tres fenotipos clínicos principales: síndromes de Hurler, Scheie y Hurler-Scheie.
- 10 **[0002]** La IdA es esencial para la degradación de los glucosaminoglucanos dermatano y sulfato de heparano en lisosomas. La incapacidad de descomponer estos polisacáridos causa cambios físicos tales como rigidez de articulaciones, anomalías esqueléticas y opacidad corneal. El síndrome de Hurler se caracteriza por enfermedad cardíaca valvular, deterioro mental y muerte en la infancia. Como los síntomas pueden no reconocerse en la niñez, el diagnóstico de MPS-I supone un desafío. Se han desarrollado la terapia de sustitución enzimática y el trasplante de médula ósea para esta enfermedad, y ambos son beneficiosos si se efectúan tempranamente. Debido a que es necesaria la detección temprana para una respuesta clínica óptima a la terapia, es de gran interés la necesidad de desarrollar cribados para el reconocimiento temprano de MPS-I.
- 15 **[0003]** La espectrometría de masas en tándem (EM en tándem o EMEM) es una plataforma para medir actividades enzimáticas asociadas a enfermedades usando gotas de sangre seca (GSS) rehidratadas para la medida cuantitativa de las actividades de las enzimas responsables de varios trastornos de almacenamiento lisosómico. Además de ensayos de ionización por electropulverización en espectrometría de masas en tándem (IEP-EMEM), se han desarrollado ensayos fluorimétricos y radiométricos de α -L-iduronidasa.
- 20 **[0004]** Los tratamientos disponibles actualmente para MPS-I requieren una detección óptima para una respuesta clínica óptima a la terapia.
- 25 **[0005]** Wang y col. (2005), *Clin. Chem.* 51 (5), páginas 898 – 900, describen análisis espectrométricos de masas en tándem de gotas de sangre seca para cribado de mucopolisacaridosis I en neonatos.
- 30 **[0006]** Mandelli y col. (2002), *Arch. Med. Res.* 33 (1), páginas 20 – 24, describen la detección de heterocigotos de mucopolisacaridosis de tipo I basándose en las características bioquímicas de α -L-iduronidasa de leucocitos.
- 35 **[0007]** Hopwood y col., (1979), *Clin. Chim. Acta* 92 (2), páginas 257 – 265, describen un ensayo fluorimétrico que usa 4-metilumbeliferil- α -L-iduronida para la estimación de la actividad α -L-iduronidasa y la detección de los síndromes de Hurler y Scheie.
- 40 **[0008]** Por consiguiente, existe la necesidad de procedimientos para el cribado neonatal de la actividad de la enzima relevante α -L-iduronidasa. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas adicionales.
- 45 **[0009]** En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa como se definen en las reivindicaciones.
- 50 **[0010]** El procedimiento incluye extraer una mezcla de reacción enzimática acuosa que comprende α -L-iduronidasa, un producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que comprende el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa, y determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.
- 55 **[0011]** La invención proporciona un procedimiento de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que comprende
- (a) incubar un sustrato de α -L-iduronidasa con una α -L-iduronidasa durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa;
- 60 (b) añadir un tampón a la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa, inactivando la reacción enzimática;
- (c) añadir un patrón interno de α -L-iduronidasa (como se define en las reivindicaciones) a la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa, proporcionando una disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa;

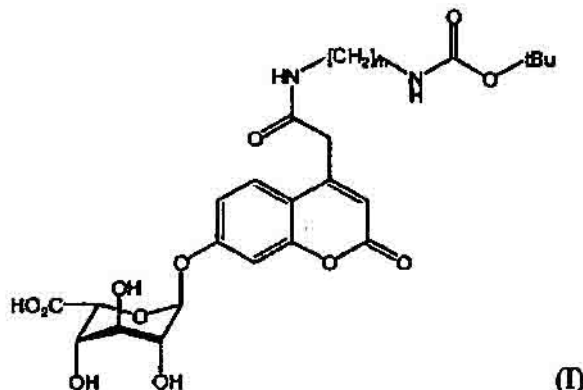
(d) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa; y

5 (e) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.

[0012] En una realización, la disolución que comprende α -L-iduronidasa se obtiene poniendo en contacto una muestra que contiene α -L-iduronidasa con una primera disolución tampón. En una realización, la muestra es una muestra de sangre. En una realización, la muestra es una gota de sangre seca de una tarjeta de cribado neonatal.

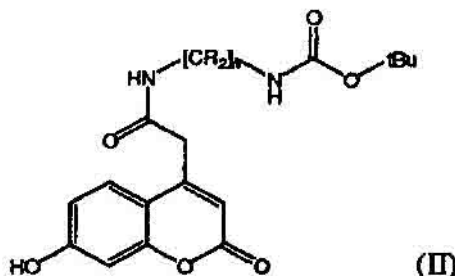
10

[0013] En una realización, el sustrato tiene la fórmula (I):



15 en la que m es un entero de 2 a 12. En una realización, el sustrato es (N-[4"- (terc-butoxicarbonilamino)-butil])-7-O-(ácido α -L-idopiranosilurónico)cumarin-4-acetamida.

[0014] El patrón interno tiene la fórmula (II):



20

en la que R es independientemente en cada aparición H o D y n es un entero de 2 a 12. En una realización, el patrón interno es (N-[3'- (terc-butoxicarbonilamino)propil])-7-hidroxycumarin-4-acetamida.

25 [0015] En una realización, el disolvente orgánico es acetato de etilo.

[0016] En una realización, determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa comprende determinar la relación de producto de α -L-iduronidasa a patrón interno de α -L-iduronidasa que comprende análisis espectrométrico de masas. En una realización, determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa comprende análisis espectrométrico de masas en tándem. En una realización, determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa comprende análisis espectrométrico de masas en tándem en que los iones originales de producto y patrón interno se generan, aíslan y someten a disociación inducida por colisión, proporcionando iones fragmentarios del producto e iones fragmentarios del patrón interno. En una realización, determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa comprende comparar las intensidades de pico de los iones fragmentarios del producto y los iones fragmentarios del patrón interno para calcular la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.

35

[0017] En una realización, el procedimiento incluye adicionalmente la etapa de usar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa para determinar si la muestra de sangre seca es de un candidato al tratamiento por

mucopolisacaridosis de tipo I.

[0018] Otras realizaciones del procedimiento de la invención incluyen:

5 un procedimiento de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que comprende

(a) incubar un sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa, proporcionando una mezcla de reacción enzimática que contiene un producto de α -L-iduronidasa,

10 (b) inactivar la reacción enzimática con una disolución tampón que comprende un patrón interno de α -L-iduronidasa como se define en las reivindicaciones,

(c) extraer la mezcla de reacción enzimática con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que comprende el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa, y

15 (d) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa; y

un procedimiento de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que comprende

20 (a) incubar un sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa en presencia de un patrón interno de α -L-iduronidasa (como se define en las reivindicaciones), proporcionando una mezcla de reacción enzimática que contiene un producto de α -L-iduronidasa,

25 (b) inactivar la reacción enzimática,

(c) extraer la mezcla de reacción enzimática con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que comprende el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa, y

30 (d) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.

[0019] En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el cribado neonatal de mucopolisacaridosis de tipo I. En una realización, el procedimiento incluye:

35 (a) poner en contacto una muestra de sangre seca de una tarjeta de cribado neonatal con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa;

(b) añadir un sustrato de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende α -L-iduronidasa e incubar el sustrato con la enzima durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa;

40 (c) añadir un segundo tampón a la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa, inactivando la reacción enzimática;

45 (d) añadir un patrón interno de α -L-iduronidasa (como se define en las reivindicaciones) a la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa, proporcionando una disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa;

50 (e) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa;

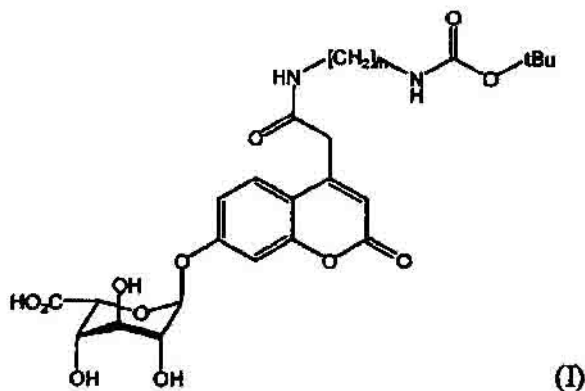
(f) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa mediante análisis espectrométrico de masas en tándem, que comprende

55 (i) generar, aislar y someter los iones originales de producto y patrón interno a disociación inducida por colisión, proporcionando iones fragmentarios de producto e iones fragmentarios de patrón interno, y

(ii) comparar las intensidades de pico iónico de los iones fragmentarios de producto y los iones fragmentarios de patrón interno y

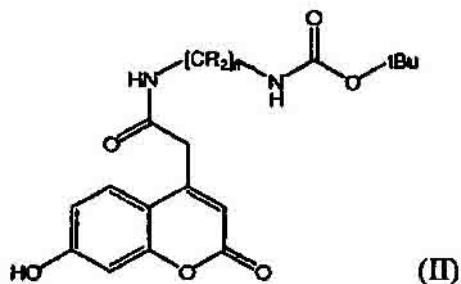
60 (g) usar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa para predecir si el neonato es candidato al tratamiento por mucopolisacaridosis de tipo I.

[0020] En otro aspecto, la invención proporciona compuestos que tienen la fórmula (I):



5 en la que m es un entero de 2 a 12. En una realización, el compuesto es (N-[4"- (*tert*-butoxicarbonilamino)butil]-7-O-(ácido α -L-idopiranosilurónico)cumarin-4-acetamida. Los compuestos son útiles en los procedimientos de la invención como sustratos de α -L-iduronidasa.

10 [0021] En otro aspecto, la invención proporciona compuestos que tienen la fórmula (II):



15 en la que R es independientemente en cada aparición H o D, y n es un entero de 2 a 12. En una realización, el compuesto es (N-[3'- (*tert*-butoxicarbonilamino)propil]-7-hidroxycumarin-4-acetamida. Los compuestos son útiles en los procedimientos de la invención como patrones internos.

20 [0022] En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento fluorimétrico de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra de sangre seca con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa;
- (b) añadir un sustrato de α -L-iduronidasa (como se define en las reivindicaciones) a la disolución que comprende α -L-iduronidasa e incubar el sustrato con la enzima durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa;
- (c) añadir un segundo tampón a la disolución, inactivando la reacción enzimática;
- (d) separar el producto de α -L-iduronidasa de la reacción enzimática; y
- (e) medir la intensidad de fluorescencia de una disolución que contiene el producto de α -L-iduronidasa.

35 [0023] En una realización, el procedimiento fluorimétrico incluye una etapa de extracción líquido-líquido para separar el producto de α -L-iduronidasa de la mezcla de reacción enzimática. En otra realización, el procedimiento fluorimétrico incluye una etapa de extracción de fase sólida para separar el producto de α -L-iduronidasa de la mezcla de reacción enzimática. En una realización, el sustrato de α -L-iduronidasa es un compuesto de fórmula (I).

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 **[0024]** Los aspectos anteriores y muchas de las ventajas acompañantes de esta invención resultarán más fácilmente apreciados y la misma se entenderá mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

10 La FIGURA 1 ilustra un sustrato de iduronidasa (IdA-S) representativo, su correspondiente producto enzimático (IdA-P) y el fragmento derivado del producto enzimático resultante de disociación inducida por colisión (DIC) analizado mediante un procedimiento de la invención;

la FIGURA 2 ilustra un patrón interno de iduronidasa (IdA-IS) representativo y el fragmento derivado del patrón interno resultante de disociación inducida por colisión (DIC) analizado mediante un procedimiento de la invención;

15 la FIGURA 3 es una ilustración esquemática de la síntesis de un sustrato de iduronidasa (IdA-S) representativo útil en el procedimiento de la invención; reactivos y condiciones: (a) HBr/AcOH; (b) AgF-MeCN, 74 % (2 etapas); (c) NBS, CCl₄, hv, reflujo, 77 %; (d) Bu₃SnH, benceno, reflujo, 65 %; (e) HOCH₂CCl₃, DCC, CH₂Cl₂, 96 %; (f) NH₃ 2 M en 2-propanol, THF, 78 %; (g) (Me₃Si)₂NH, LiClO₄/SiO₂, CH₂Cl₂; (h) *i.* compuesto 4, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂; *ii.* BF₃·OEt₂, Ac₂O, 88 % (2 etapas); (i) Zn en polvo, CuCl₂, AcOH ac. al 90 %, THF, 0 °C, 95 %; (j) H₂N (CH₂)₄NHBoc, EDC, HOBT, THF, 65 %; (k) NaOMe, MeOH, 86 %; (l) NaOH, MeOH/H₂O (1: 1), cuant.;

20 la FIGURA 4 es una ilustración esquemática de la síntesis de un patrón interno de iduronidasa (IdA-IS) representativo útil en el procedimiento de la invención; reactivos y condiciones: (a) H₂N (CH₂)₃NHBoc, EDC, HOBT, THF, 61 %; (b) NaOMe, MeOH/CH₂Cl₂ (6: 1), 92 %;

25 la FIGURA 5 es una gráfica que ilustra la cantidad de producto generado por IdA medida en gotas de sangre seca (GSS) en función del pH de la reacción enzimática durante la incubación; se llevaron a cabo las reacciones a 37 °C durante 20 h usando el ensayo descrito en la presente memoria (las barras de error se muestran para análisis por triplicado);

30 la FIGURA 6 es una gráfica que ilustra la cantidad de producto generado por IdA (nmol) medida en GSS en función del tiempo de incubación; se llevaron a cabo las reacciones a 37 °C usando IdA-S 0,5 mmol/l y las condiciones descritas en la presente memoria (las barras de error se muestran para análisis por triplicado, la línea continua muestra el ajuste de regresión lineal de los datos);

35 la FIGURA 7 es una gráfica que ilustra la cantidad de producto generado por IdA (nmol) medida en GSS en función de la concentración de IdA-S; se llevaron a cabo las reacciones a 37 °C durante 20 h usando el ensayo descrito en la presente memoria (las barras de error se muestran para análisis por triplicado; la línea continua muestra el ajuste de regresión de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten);

40 la FIGURA 8 es una gráfica que ilustra la cantidad de producto generado por IdA (nmol) medida en GSS en función del tamaño de la punción de GSS; se llevaron a cabo las reacciones a 37 °C durante 20 h usando el ensayo descrito en la presente memoria (las barras de error se muestran para análisis por triplicado);

45 la FIGURA 9 es una gráfica que ilustra la relación de ión de producto a patrón interno (IdA-P/IdA-IS) observada por IEP-EMEM en función de la cantidad relativa de IdA-P e IdA-IS añadidas al ensayo de IdA (relación de producto a patrón interno); las muestras contenían todos los componentes del ensayo excepto sustrato, una cantidad fija de IdA-IS (0,2 nmol) y diversas cantidades de IdA-P (las barras de error se muestran para análisis por triplicado; la línea continua muestra el ajuste de regresión lineal de los datos);

50 la FIGURA 10 es una gráfica que compara las actividades de IdA (μmol/h/l de sangre) determinadas mediante el procedimiento de la invención para muestras obtenidas de neonatos afectados (pacientes), portadores de mucopolisacaridosis de tipo I (MPS-I) (portadores) y neonatos no afectados (neonatos aleatorios); y

55 la FIGURE 11 es una curva de calibración que muestra la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de producto enzimático (IdA-P) para un ensayo fluorimétrico representativo de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

60 **[0025]** En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos (como se definen en las reivindicaciones) para el ensayo de la actividad enzimática α-L-iduronidasa. En realizaciones de los procedimientos, se determina la cantidad de producto de α-L-iduronidasa comparando una señal derivada del producto enzimático

con una señal derivada de una cantidad conocida de patrón interno de α -L-iduronidasa. La cantidad de producto de α -L-iduronidasa se determina mediante la actividad enzimática α -L-iduronidasa sobre un sustrato de α -L-iduronidasa que se añade a la muestra a ensayar y la cuantificación del producto enzimático proporciona la medida de la actividad enzimática α -L-iduronidasa en la muestra. Los procedimientos son útiles para ensayar la actividad enzimática α -L-iduronidasa en neonatos para evaluar si el neonato padece una deficiencia de actividad enzimática α -L-iduronidasa y es por lo tanto candidato al tratamiento por mucopolisacaridosis de tipo I.

[0026] En una realización del procedimiento, el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa difieren en la masa y la cantidad de producto de α -L-iduronidasa se determina mediante espectrometría de masas.

[0027] En ciertas realizaciones de los procedimientos, el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa se extraen de la mezcla de reacción enzimática acuosa que contiene α -L-iduronidasa, sustrato de α -L-iduronidasa en exceso, el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa mediante extracción líquido-líquido usando un disolvente orgánico.

[0028] En otras realizaciones, la mezcla de reacción enzimática acuosa observada anteriormente se aplica a una fase sólida adecuada de la que se eluyen el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa.

[0029] En cada procedimiento, se facilita la cuantificación del producto de α -L-iduronidasa cuantificando el patrón interno de α -L-iduronidasa.

[0030] En una realización, el procedimiento de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa incluye las siguientes etapas:

(a) poner en contacto una muestra de sangre seca con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa;

(b) añadir un sustrato de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende α -L-iduronidasa e incubar el sustrato con la enzima durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa;

(c) añadir un segundo tampón a la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa, inactivando la reacción enzimática;

(d) añadir un patrón interno de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa, proporcionando una disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa;

(e) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa;

(f) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.

[0031] En una realización, la muestra de sangre seca es una gota de sangre seca de una tarjeta de cribado neonatal. Sin embargo, el procedimiento puede efectuarse con cualquier muestra que contenga α -L-iduronidasa incluyendo especímenes (por ejemplo, plasma, suero, tejido) de fuentes humanas, animales y no vivas. Son también adecuadas para ensayo por el procedimiento muestras de sangre distintas de sangre seca.

[0032] En el procedimiento, se pone en contacto una muestra que contiene α -L-iduronidasa con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa. La etapa puede considerarse que es una etapa de extracción en que se extrae la α -L-iduronidasa de la muestra (por ejemplo, gota de sangre seca) en una fase líquida acuosa, de modo que pueda ocurrir la reacción enzimática. La solución no tiene que ser homogénea y necesita proporcionar solo una fase líquida acuosa suficiente para la reacción enzimática entre α -L-iduronidasa y el sustrato de α -L-iduronidasa. En una realización, el primer tampón es un tampón acuoso que tiene un pH de aproximadamente 3,4 (por ejemplo, formiato de sodio 0,1 mol/l que contiene 1,4-lactona del ácido D-sacárico 75 μ mol/l). El primer tampón tiene un pH suficiente para extraer y disolver la enzima de la muestra, según sea necesario, proporcionando una mezcla de reacción enzimática que proporciona un producto enzimático mediante incubación de la enzima con un sustrato. Los tampones adecuados tienen un pH de aproximadamente 2,8 a 4,2. Se apreciará que, en ciertas realizaciones, la muestra puede añadirse directamente a un tampón de ensayo que incluye un sustrato de α -L-iduronidasa.

[0033] Para ensayar la actividad enzimática α -L-iduronidasa, se incuba un sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa, proporcionando un producto de α -L-iduronidasa. En una realización, se añade el sustrato de α -L-iduronidasa a la disolución de α -L-iduronidasa y se incuba durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa. El tiempo predeterminado puede variar y dependerá de la cantidad de actividad enzimática de la muestra y de la sensibilidad del procedimiento analítico para la cuantificación del producto enzimático y el patrón interno. En una realización, incubar durante un tiempo predeterminado incluye incubar el sustrato con la enzima a 37 °C durante 20 horas. Los tiempos de incubación predeterminados pueden estar en el intervalo de menos de 1 hora a más de 20 horas, dependiendo de la muestra. En una realización, el sustrato se incluye en la disolución de tampón de ensayo (concretamente, la primera disolución tampón). Después del tiempo predeterminado, se inactiva la reacción enzimática (concretamente se detiene) mediante la adición de un segundo tampón (por ejemplo, acetato de sodio 0,1 mol/l, pH 5,4). El tampón inactivador tiene un pH suficiente para detener la reacción enzimática. El pH de la mezcla de reacción enzimática es tal que se consigue la separación de producto enzimático y patrón interno sin extraer también cantidades significativas de sustrato (concretamente, un $\text{pH} \geq \text{pKa}$ del grupo ácido carboxílico del sustrato).

[0034] En ciertas realizaciones de la invención, se determina la cantidad de producto enzimático comparando la señal asociada al patrón interno de α -L-iduronidasa con la señal asociada al producto de α -L-iduronidasa. En una realización del procedimiento, se añade el patrón interno a la mezcla de reacción enzimática inactivada que incluye el producto de α -L-iduronidasa. Como alternativa, puede añadirse el patrón interno de α -L-iduronidasa como componente del segundo tampón usado para inactivar la reacción enzimática, o puede añadirse el patrón interno con el sustrato antes de la incubación con la enzima.

[0035] En los procedimientos, se separan el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa de la mezcla de reacción enzimática acuosa (concretamente, se separan de la enzima y el sustrato en exceso) para análisis adicional. En una realización, se extrae la mezcla de reacción enzimática acuosa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto enzimático y patrón interno. Los disolventes orgánicos adecuados son sustancialmente inmiscibles con agua y no son eficaces para solubilizar la enzima o sustrato enzimático. Los disolventes orgánicos adecuados extraen selectiva y eficazmente el producto y el patrón interno, y extraen cada uno de forma sustancialmente igual (concretamente, el producto enzimático y el patrón interno tienen sustancialmente los mismos coeficientes de reparto para un disolvente dado). Los disolventes adecuados incluyen acetato de etilo, dietiléter, cloroformo, cloruro de metileno y butanol. En una realización, el disolvente orgánico es acetato de etilo.

[0036] En otra realización, el producto enzimático se separa de la mezcla de reacción enzimática acuosa (incluyendo patrón interno) mediante extracción en fase sólida. En esta realización del procedimiento de la invención, el sustrato enzimático es un compuesto que tiene la fórmula (I) y el patrón interno es un compuesto que tiene la fórmula (II). En esta realización, la mezcla de reacción enzimática acuosa se aplica a una fase sólida adecuada. Las fases sólidas adecuadas son eficaces para retener y liberar selectivamente el producto enzimático y el patrón interno de forma sustancialmente igual. Las fases sólidas representativas incluyen gel de sílice, sílice en fase inversa (por ejemplo, sílice C18) y resinas de intercambio iónico tales como resinas de intercambio aniónico. El producto enzimático y el patrón interno pueden eluirse entonces de la fase sólida secuencial o simultáneamente con uno o más disolventes orgánicos adecuados y analizarse la disolución o disoluciones resultantes como se describe en la presente memoria. Los disolventes orgánicos adecuados eluyen el producto enzimático y el patrón interno de forma sustancialmente completa de la fase sólida. El producto y el patrón interno pueden eluirse de la fase sólida separada o conjuntamente. En una realización, el producto y el patrón interno se eluyen conjuntamente.

[0037] Una vez se aíslan el producto enzimático y el patrón interno, se cuantifica el producto enzimático. En ciertas realizaciones de los procedimientos, se facilita la determinación de la cantidad de producto enzimático por el patrón interno. Debido a que la cantidad de patrón interno es conocida, medir una señal asociada al patrón interno y comparar esa señal con la señal asociada al producto enzimático permite la determinación de la cantidad de producto enzimático. Como se observa anteriormente, la señal asociada al producto enzimático y al patrón interno puede medirse mediante espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas en tándem).

[0038] En una realización, se determina la cantidad de producto enzimático determinando la relación de producto de α -L-iduronidasa a patrón interno de α -L-iduronidasa mediante análisis espectrométrico de masas en tándem. En el procedimiento de EMEM, los iones originales de producto y patrón interno se generan, aíslan y someten a disociación inducida por colisión, proporcionando iones fragmentarios de producto e iones fragmentarios de patrón interno, respectivamente. Comparar las intensidades de pico de los iones fragmentarios de producto y los iones fragmentarios de patrón interno permite el cálculo de la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.

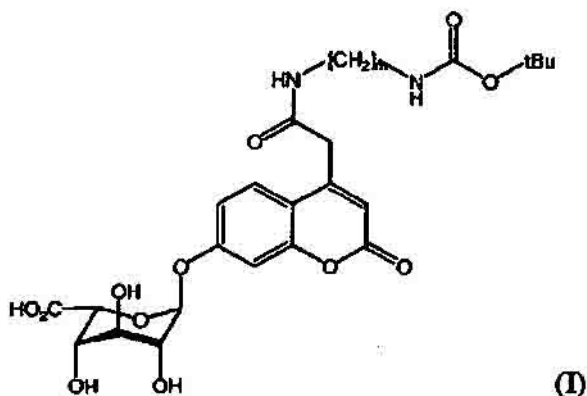
[0039] En los procedimientos de la invención, se añade una cantidad conocida de patrón interno de α -L-iduronidasa como se describe anteriormente al sistema de reacción enzimática, que genera en última instancia el

producto de α -L-iduronidasa en presencia de α -L-iduronidasa. En los procedimientos espectrométricos de masas en tándem de la invención, se miden las integrales de área de pico del ión fragmentario de producto enzimático y del ión fragmentario de patrón interno y se multiplica la relación de área de pico de producto enzimático a área de pico de patrón interno por el número de moles de patrón interno añadidos, proporcionando el número de moles de producto enzimático, cuantificando así el producto enzimático producido por α -L-iduronidasa en la muestra original.

[0040] Los procedimientos espectrométricos de masas en tándem de la invención cuantifican eficazmente el producto de α -L-iduronidasa. Los procedimientos son eficaces cuando la masa original de producto y patrón interno son iguales y sus fragmentos son diferentes, o la masa original de producto y patrón interno son diferentes y los fragmentos son tanto iguales como diferentes.

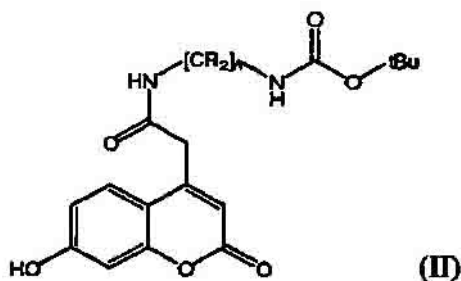
[0041] Los procedimientos de la invención de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa dependen de la medida de las señales del producto de α -L-iduronidasa y del patrón interno de α -L-iduronidasa. El producto enzimático y el patrón interno están relacionados de varios modos. Para los procedimientos de la invención que se basan en extracción líquido-líquido para el aislamiento del producto enzimático de la mezcla de reacción enzimática acuosa, cada uno es extraíble en el disolvente orgánico de extracción de forma sustancialmente igual (idealmente idéntica). Para los procedimientos de la invención que se basan en análisis espectrométricos de masas, cada uno produce un ión fragmentario que tiene una masa que es diferente y puede resolverse de la otra, y se producen iones fragmentarios de producto y patrón interno a partir de los fragmentos respectivos que tienen sustancialmente la misma eficacia de ionización (idealmente idéntica).

[0042] Los sustratos enzimáticos representativos tienen la fórmula (I):



en la que m es un entero de 1 a 20. En una realización, m es 4 (concretamente, N -[4"- (*tert*-butoxicarbonilamino)-butil]-7- O - (ácido α -L-idopiranosilurónico)cumarin-4-acetamida).

[0043] Los patrones internos para uso en la invención tienen la fórmula (II):



en la que R es independientemente en cada aparición H o D y n es un entero de 1 a 20. En una realización, n es de 2 a 12. En una realización, R es H y n es 3 (concretamente, (N -[3'- (*tert*-butoxicarbonilamino)propil]-7-hidroxycumarin-4-acetamida).

[0044] En los procedimientos de la invención, el sustrato enzimático (por ejemplo, compuestos de fórmula (I))

y el patrón interno (por ejemplo, compuestos de fórmula (II)) están relacionados. Por ejemplo, en el procedimiento representativo de la invención descrito en el Ejemplo 3, el sustrato enzimático es un compuesto de fórmula (I) con $m = 4$ y el patrón interno es un compuesto de fórmula (II) con $m = 3$. Para este par de sustrato y patrón interno, el producto enzimático y el patrón interno difieren en una sola unidad de metileno. El análisis espectrométrico de masas distingue fácilmente los iones fragmentarios de cada uno y permite su cuantificación. Para los procedimientos de la invención que emplean análisis espectrométrico de masas, los sustratos enzimáticos y patrones internos se seleccionan de los compuestos de fórmulas (I) y (II), respectivamente, de tal modo que cuando R es H en la fórmula (II), $m \neq n$ (concretamente, el sustrato y patrón difieren en al menos una unidad de metileno).

5
10 **[0045]** Como alternativa, para los procedimientos de la invención que emplean análisis espectrométricos de masas, pueden seleccionarse sustratos enzimáticos y patrones internos de los compuestos de fórmulas (I) y (II), respectivamente, en que $m = n$, cuando el patrón interno incluye uno o más átomos pesados (por ejemplo, no todos los R en la cadena de metileno son hidrógeno).

15 **[0046]** Se ilustra en la FIGURA 1 un producto de α -L-iduronidasa (IdA-P) representativo útil en los procedimientos de la invención. El sustrato de α -L-iduronidasa (IdA-S) que produce el producto enzimático se ilustra también en la FIGURA 1. Se preparó IdA-S a partir de materiales de partida económicos en trece (13) etapas. El sustrato es una umbeliferil- α -L-idurónida a la que se une una cadena de cuatro carbonos terminada con un grupo *terc*-butilamido. La incubación con la IdA presente en la GSS conduce a la liberación enzimática del grupo iduronilo, produciendo el producto derivado de umbeliferilo IdA-P (véase la FIGURA 1).

20 **[0047]** Se ilustra en la FIGURA 2 un patrón interno de α -L-iduronidasa (IdA-IS) representativo útil en los procedimientos de la invención. El IdA-IS está herméticamente relacionado con el IdA-P, y en esta realización, su cadena carbonada es más corta en un grupo metileno, de modo que el patrón interno tiene un peso molecular diferente (véase la FIGURA 2). Se detectan separadamente IdA-P e IdA-IS y se cuantifican mediante IEP-EMEM como sus iones fragmentarios, después de la eliminación inducida por colisión del grupo *terc*-butilcarbamato (diferencia de masa de 100 Da; véanse la FIGURAS 1 y 2). En un procedimiento representativo, se llevó a cabo la IEP-EMEM en un instrumento cuadrípolar en tándem que funciona en modo de ión positivo y con control de múltiples reacciones. Se aislaron los iones originales de IdA-P e IdA-IS (m/z 391,2 y 377,2, respectivamente) y se sometieron a disociación inducida por colisión (DIC). Los iones fragmentarios analizados son de m/z 291,1 y 277,1, derivados de IdA-P e IdA-IS, respectivamente mediante eliminación de isobuteno y dióxido de carbono. Se calculó la cantidad de producto comparando las intensidades de pico iónico de IdA-P con IdA-IS.

25
30 **[0048]** Se describen en los Ejemplos 1 y 2 las síntesis del sustrato enzimático y patrón interno representativos observados anteriormente y se ilustran esquemáticamente en las FIGURAS 3 y 4, respectivamente.

35 **[0049]** En los procedimientos de la invención, se separan el producto enzimático y el patrón interno de la mezcla de reacción enzimática. En ciertas realizaciones, se retiran las sales de tampón presentes a concentraciones relativamente altas en la mezcla de reacción enzimática mediante una etapa de extracción líquido-líquido. La etapa de extracción es apropiada para análisis de alto rendimiento para extraer producto y patrón interno. La presencia de una función carboxilato cargado en el resto azúcar de IdAS, por ejemplo a pH 5,4, evita su extracción con la fase orgánica, mientras que IdA-P e IdA-IS no están cargados a pH 5,4 y se extraen fácilmente con acetato de etilo. Esta etapa de extracción es importante ya que puede ocurrir la escisión del enlace glucosídico de IdA-S durante la IEP-EMEM, formando iones de IdA-P y dando lugar por tanto a actividad IdA falsa positiva. La señal de EMEM generada por el ensayo de una GSS normal es generalmente de 4 a 10 veces mayor que el blanco preparado en las condiciones mencionadas anteriormente.

40 **[0050]** Por tanto, en un aspecto, el procedimiento para ensayar la actividad enzimática α -L-iduronidasa de la invención incluye (a) extraer una mezcla de reacción enzimática acuosa que comprende α -L-iduronidasa, un producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que comprende el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa; y (b) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa. Como se observa anteriormente, la cantidad de producto enzimático está relacionada con la actividad enzimática α -L-iduronidasa de una muestra que se ensaya mediante el procedimiento. En este procedimiento, la mezcla de reacción enzimática acuosa que comprende α -L-iduronidasa, producto de α -L-iduronidasa, patrón interno de α -L-iduronidasa y enzima es de una muestra a ensayar (por ejemplo, una gota de sangre seca neonatal) y el sustrato de α -L-iduronidasa, producto de α -L-iduronidasa, patrón interno de α -L-iduronidasa, disolvente orgánico y cuantificación del producto son como se describen anteriormente.

45
50 **[0051]** Como se describe anteriormente, la adición del patrón interno a la mezcla de reacción enzimática puede ocurrir en diferentes etapas del procedimiento. Por tanto, las realizaciones del procedimiento de la invención difieren en el punto en que se incluye el patrón interno.

[0052] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de ensayo de la actividad α -L-iduronidasa que incluye (a) incubar un sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa, proporcionando una mezcla de reacción enzimática que contiene un producto de α -L-iduronidasa; (b) inactivar la reacción enzimática; (c) añadir un patrón interno de α -L-iduronidasa a la mezcla de reacción enzimática; (d) extraer la mezcla de reacción enzimática con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que comprende el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa y (e) cuantificar el producto de α -L-iduronidasa.

[0053] En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que incluye (a) incubar un sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa, proporcionando una mezcla de reacción enzimática que contiene un producto de α -L-iduronidasa; (b) inactivar la reacción enzimática con una disolución tampón que incluye un patrón interno de α -L-iduronidasa; (c) extraer la mezcla de reacción enzimática con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que comprende el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa y (d) cuantificar el producto de α -L-iduronidasa.

[0054] En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que incluye (a) incubar un sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa en presencia de un patrón interno de α -L-iduronidasa, proporcionando una mezcla de reacción enzimática que contiene un producto de α -L-iduronidasa; (b) inactivar la reacción enzimática; (c) extraer la mezcla de reacción enzimática con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que comprende producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa y (d) cuantificar el producto de α -L-iduronidasa.

[0055] En estos procedimientos, la α -L-iduronidasa es de una muestra a ensayar (por ejemplo, una gota de sangre seca neonatal) y el sustrato de α -L-iduronidasa, producto de α -L-iduronidasa, patrón interno de α -L-iduronidasa, disolvente orgánico y cuantificación del producto son como se describen anteriormente.

[0056] Se describe en el Ejemplo 3 un procedimiento representativo de la invención para el ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa mediante espectrometría de masas en tándem. La optimización del ensayo mostró una actividad IdA máxima a pH 3,4 (FIGURA 5). La cantidad de IdA-P aumenta linealmente con el tiempo de incubación de 0 a 30 h (FIGURA 6); se eligió 20 h como tiempo de incubación estándar para el ensayo descrito en el Ejemplo 3. La cantidad de IdA-P formada a las 20 h aumentaba de forma hiperbólica a medida que la concentración de IdA-S aumentaba de 0 a 0,67 mmol/l, y se determinó que la K_m era 0,2 mmol/l (FIGURA 7). Se eligió una concentración de IdA-S de 0,5 mmol/l para estar en condiciones de saturación. La cantidad de IdA-P aumenta con el área superficial de la GSS añadida (FIGURA 8), alcanzando una meseta a altas cantidades de sangre (presuntamente debida a la presencia de inhibidores endógenos en la GSS). En una realización, el procedimiento usa una punción de GSS de 3 mm.

[0057] Como se muestra en la FIGURA 10, la actividad IdA en 5 pacientes (intervalo 0-0,268; media, 0,053 μ mol/h/l de sangre) estaba muy por debajo del intervalo de actividad en muestras obtenidas de 10 neonatos no afectados (neonatos aleatorios) (intervalo, 7,4-23,4; media, 12,3 μ mol/h/l de sangre). La actividad IdA en los 5 portadores de MPS-I (portadores) era intermedia (intervalo, 1,4-5,6; media, 2,9 μ mol/h/l de sangre), pero aún muy alejada de las actividades de los pacientes afectados. La imprecisión del ensayo se calculó mediante análisis duplicados de la GSS de un control sano: el CV intraensayo era de 5,9 % ($n = 3$) y el CV interensayo era de 9,3 % ($n = 10$).

[0058] En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa mediante fluorimetría. En una realización, el procedimiento fluorimétrico incluye una etapa de extracción líquido-líquido (como se describe anteriormente) para separar el producto de α -L-iduronidasa de la mezcla de reacción enzimática. En otra realización, el procedimiento fluorimétrico incluye una etapa de extracción en fase sólida (como se describe anteriormente) para separar el producto de α -L-iduronidasa de la mezcla de reacción enzimática. Sin embargo, al contrario que el procedimiento espectrométrico de masas, el procedimiento fluorimétrico no utiliza un patrón interno. En el procedimiento fluorimétrico, se aísla el producto enzimático mediante los procedimientos descritos anteriormente y se cuantifica usando una curva de calibración estándar. En una realización, el procedimiento fluorimétrico utiliza los sustratos de α -L-iduronidasa (concretamente, los sustratos que tienen la fórmula (I)) para producir los productos (concretamente, los productos que tienen la fórmula (II)) descritos anteriormente. Los calibradores adecuados incluyen el producto enzimático mismo, cumarina y metilumbeliferona, entre otros.

[0059] Por tanto, en otra realización, la invención proporciona un procedimiento de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de sangre seca con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa;

(b) añadir un sustrato de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende α -L-iduronidasa e incubar el sustrato con la enzima durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa;

5

(c) añadir un segundo tampón inactivando la reacción enzimática;

(d) separar el producto de α -L-iduronidasa de la reacción enzimática y

(e) medir la intensidad de fluorescencia de una disolución que contiene el producto de α -L-iduronidasa.

10

[0060] En una realización, el procedimiento fluorimétrico incluye una etapa de extracción líquido-líquido para separar el producto de α -L-iduronidasa de la mezcla de reacción enzimática. En otra realización, el procedimiento fluorimétrico incluye una etapa de extracción en fase sólida para separar el producto de α -L-iduronidasa de la mezcla de reacción enzimática. Se apreciará que en este procedimiento el sustrato puede incluirse en el primer tampón.

15

[0061] En una realización adicional de la invención, se proporcionan procedimientos para el cribado neonatal de mucopolisacaridosis de tipo I (MPS-I). En diversas realizaciones, los procedimientos de cribado de MPS-I de la invención pueden emplear cada uno de los procedimientos descritos anteriormente para el ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa (concretamente, cada una de las realizaciones de los ensayos descritos anteriormente son adecuadas para los procedimientos de cribado). En los procedimientos de cribado, se obtiene la α -L-iduronidasa a partir de una muestra de sangre neonatal (por ejemplo, una gota de sangre seca) y se usa la cantidad de producto de α -L-iduronidasa para determinar si la muestra de sangre es de un candidato al tratamiento por (MPS-I).

20

[0062] En una realización, el procedimiento para el cribado neonatal de MPS-I incluye las siguientes etapas:

25

(a) poner en contacto una muestra de sangre seca de una tarjeta de cribado neonatal con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa;

(b) añadir un sustrato de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende α -L-iduronidasa e incubar el sustrato con la enzima durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa;

30

(c) añadir un segundo tampón, inactivando la reacción enzimática;

35

(d) añadir un patrón interno de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa, proporcionando una disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa;

(e) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y el patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y un patrón interno de α -L-iduronidasa;

40

(f) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa mediante análisis espectrométrico de masas en tándem que comprende

45

(i) generar, aislar y someter los iones originales de producto y patrón interno a disociación inducida por colisión, proporcionando iones fragmentarios de producto e iones fragmentarios de patrón estándar y

(ii) comparar las intensidades de pico iónico de los iones fragmentarios de producto y los iones fragmentarios de patrón interno para calcular la cantidad de producto de α -L-iduronidasa; y

50

(g) usar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa para predecir si el neonato es un candidato al tratamiento por mucopolisacaridosis de tipo I.

[0063] Se presentan en el Ejemplo 3 los resultados de cribado representativos obtenidos mediante el procedimiento de la invención descrito anteriormente y se ilustran en la FIGURA 10.

55

[0064] Los procedimientos de la invención superan las deficiencias del ensayo de ionización por electropulverización con espectrometría de masas en tándem (IEP-EMEM) desarrollado anteriormente para MPS-I, que usaba un sustrato enzimático obtenido a partir de la degradación de heparina comercialmente disponible (Wang D, Eadala B, Sadilek M, Chamoles NA, Turecek F, Scott CR, Gelb MH. "Tandem mass spectrometric analysis of dried blood spots for screening of Mucopolysaccharidosis I in newborns". *Clin. Chem.* 2005; 51: 898-900) en que el

60

aumento de escala de la síntesis del sustrato es problemática debido a dificultades técnicas en el manejo de grandes cantidades de ácido nitroso para la degradación de heparina y a la necesidad de retirar impurezas del producto. Los procedimientos de la presente invención proporcionan un ensayo de IEP-EMEM mejorado que mide directamente la velocidad de reacción de IdA en GSS rehidratada y es adaptable al cribado neonatal de MPS-I. El procedimiento hace uso de un sustrato modificado que puede prepararse mediante síntesis total a una escala adecuada para cribado neonatal mundial (10 g de sustrato para > 1 millón de ensayos).

[0065] La presente invención proporciona un ensayo basado en IEP-EMEM para IdA que es práctico para análisis de alto rendimiento en laboratorios de cribado neonatal y compatible con ensayos simultáneos de otras enzimas lisosómicas, incluyendo aquellas para las que se han desarrollado ya ensayos basados en IEP-EMEM. Este ensayo es compatible con las técnicas de placa de microvaloración y pipeteado multicanal (o robótico). El sustrato y patrón interno usados en el ensayo superan los problemas sintéticos encontrados anteriormente con el primer ensayo de IdA desarrollado anteriormente. Cada ensayo de IdA requiere solo 8,5 µg de sustrato y 0,075 µg de patrón interno. El protocolo de purificación pre-IEP-EMEM usado en el ensayo es una extracción líquido-líquido sencilla y es más fácil de ejecutar que la purificación usando placas de sílice C18 reseñadas en el ensayo anterior.

[0066] Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines de ilustrar y no limitar la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Síntesis de un sustrato representativo de iduronidasa (IdA-S):

(*N*-[4"- (*terc*-Butoxicarbonilamino)-butil])-7-*O*- (ácido α-*L*-idopiranosilurónico)cumarin-4-acetamida

[0067] La síntesis de un sustrato de iduronidasa (IdA-S) representativo, (*N*-[4"- (*terc*-butoxicarbonilamino)butil])-7-*O*- (ácido α-*L*-idopiranosilurónico)cumarin-4-acetamida, descrito a continuación es una síntesis a pequeña escala (en cantidad de miligramos) de IdA-S. La síntesis se ilustra esquemáticamente en la FIGURA 3.

[0068] (2,3,4-Tri-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranosilfluoruro)uronato de metilo (2). Se suspendió 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil-α,β-*D*-glucopiranosiluronato de metilo 1 (4,98 g, 13,25 mmol, 1 eq) a 0 °C en 67 ml de ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético bajo atmósfera de nitrógeno. Después de agitar durante 15 min a 0 °C, se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. Se diluyó entonces la mezcla de reacción con tolueno y se concentró a vacío. Se diluyó el residuo con 250 ml de acetato de etilo y se lavó con 150 ml de bicarbonato de sodio saturado frío y 150 ml de salmuera fría. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se concentró a vacío, proporcionando el derivado bromuro bruto usado directamente en la siguiente etapa. Se disolvió el intermedio bromuro en 167 ml de acetonitrilo anhidro bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Se añadió entonces fluoruro de plata (3,36 g, 26,49 mmol, 2 eq). Se agitó la mezcla de reacción durante un total de 21 h en la oscuridad. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el filtrado a vacío. La cromatografía en columna con gel de sílice (hexano: AcOEt, 4: 1 a 2: 1) proporcionó el producto 2 (3,3 g, 74 %): los datos espectrales estaban bien de acuerdo con los reseñados.

[0069] (5-Bromo-2,3,4-tri-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranosilfluoruro)uronato de metilo (3). Se agitó una suspensión de 2 (3,3 g, 9,8 mmol, 1 eq) y *N*-bromosuccinimida (3,32 g, 18,65 mmol, 1,9 eq) en tetracloruro de carbono anhidro bajo atmósfera de nitrógeno y a reflujo con irradiación durante un total de 6 h. Se añadió *N*-bromosuccinimida (3,32 g, 18,65 mmol, 1,9 eq) después de una reacción de 2 h y 4 h. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se filtró a través de lana de vidrio. Se retiró el disolvente a vacío. La cromatografía en columna con gel de sílice (hexano: AcOEt 3: 1) proporcionó el producto 3 (3,12 g, 77 %): los datos espectrales estaban bien de acuerdo con los reseñados.

[0070] (2,3,4-Tri-*O*-acetil-α'-*L*-idopiranosilfluoruro)uronato de metilo (4). Se disolvió el bromuro 3 (3,16 g, 7,61 mmol, 1 eq) en 50 ml de benceno anhidro y se agitó bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió hidruro de tributilestaño (3,1 ml, 11,4 mmol, 1,5 eq) y se calentó a reflujo la mezcla de reacción durante 40 min. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se retiró el disolvente a vacío. La cromatografía en columna con gel de sílice (tolueno: AcOEt, 8: 1 a 6: 1) proporcionó el producto 4 (1,67 g, 65 %): los datos espectrales estaban bien de acuerdo con los reseñados.

[0071] 7-Acetoxicumarin-4-acetato de (2',2',2'-triclouroetilo) 4 (6a). Se añadió 2,2,2-triclouroetanol (431 µl, 4,5 mmol, 1,25 eq) a una suspensión de ácido 7-acetoxicumarin-4-acético 5 (945 mg, 3,6 mmol, 1 eq) en 47 ml de diclorometano anhidro a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió una disolución de *N,N*-

diciclohexilcarbodiimida (818 mg, 4 mmol, 1,1 eq) en 10 ml de diclorometano anhidro. Se agitó la mezcla de reacción durante 15 min, después de lo cual se diluyó con diclorometano y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío. La cromatografía en columna con gel de sílice (CH₂Cl₂ y entonces CH₂Cl₂: AcOEt, 10: 1) proporcionó el producto 6a (1,37 g, 96 %): *Rf* 0,78 (CH₂Cl₂: AcOEt, 5: 1); RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,61 (d, 1H, *J*_{5,6} 8,7 Hz, H-5), 7,15 (d, 1H, *J*_{6,8} 2,1 Hz, H-8), 7,07 (dd, 1H, *J*_{6,8} 2,3, *J*_{5,6} 8,7 Hz, H-6), 6,42 (s, 1H, H-3), 4,77 (s, 2H, CH₂CCl₃), 3,91 (2s, 2H, CH₂CO₂), 2,33 (s, 3H, OAc); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 168,6, 167,0, 154,5, 153,5, 146,5, 125,5, 118,5, 117,0, 116,5, 110,9, 74,6, 37,7, 21,2; IEP-EM: *m/z* 393 [M + H]⁺.

[0072] 7-Hidroxycumarin-4-acetato de (2',2',2'-tricloroetilo) (6b). Se preparó una disolución de 6a (1,08 g, 2,74 mmol, 1 eq) en 108 ml de tetrahidrofurano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una disolución de amoniaco 2 M en 2-propanol (6,8 ml, 13,7 mmol, 5 eq). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente en un matraz herméticamente sellado durante 18 h. Se concentró la mezcla de reacción a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna con gel de sílice (CH₂Cl₂ y entonces CH₂Cl₂: AcOEt 10: 1 a 5: 1) proporcionó el producto 6b (753 mg, 78 %): *Rf* 0,6 (CH₂Cl₂: AcOEt, 5: 1); RMN-¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,55 (d, 1H, *J*_{5,6} 8,7 Hz, H-5), 6,79 (dd, 1H, *J*_{6,8} 2,3, *J*_{5,6} 8,7 Hz, H-6), 6,74 (d, 1H, *J*_{6,8} 2,3 Hz, H-8), 6,31 (s, 1H, H-3), 4,94 (s, 2H, CH₂CCl₃), 4,14 (2s, 2H, CH₂CO₂); RMN-¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168,4, 161,8, 160,5, 155,5, 149,2, 127,3, 113,5, 112,9, 111,5, 102,8, 95,5, 74,0, 36,9; IEP-EM: *m/z* 351 [M + H]⁺.

[0073] 7-O- (Metil-2',3',4'-tri-O-acetil-α-L-idopiranosiluronato)cumarin-4-acetato de (2'',2'',2''-tricloroetilo) (7). Se agitó una suspensión de 6b (703 mg, 2 mmol, 1,26 eq) y LiClO₄/SiO₂ (200 mg) en 2 ml de diclorometano anhidro a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota 1,1,1,3,3,3-hexametilidisilazano (835 µl, 4 mmol, 2,52 eq). Se agitó la mezcla de reacción durante 35 min. Se diluyó la mezcla de reacción con diclorometano y se filtró. Se concentró el filtrado mediante rotavapor, proporcionando 7-O-trimetilsililcumarin-4-acetato de (2',2',2'-tricloroetilo) 6c, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Se enfrió a 0 °C una disolución del donante de glucosilo 4 (534 mg, 1,6 mmol, 1 eq) y del aceptor de glucosilo 6c preparado anteriormente en 10 ml de diclorometano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota trifluoruro de boro-eterato de dietilo (196 µl, 1,6 mmol, 1 eq), después de lo cual se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se selló herméticamente el matraz de reacción, se agitó la mezcla de reacción durante 1,5 h y se concentró entonces a vacío. Se disolvió el residuo en anhídrido acético (10 ml) y se añadió trifluoruro de boro-eterato de dietilo (88 µl). Después de agitar durante 20 min, se diluyó la reacción con 200 ml de diclorometano, se lavó con 100 ml de agua, 100 ml de bicarbonato de sodio saturado y 100 ml de salmuera. Se segó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se concentró a vacío con coevaporaciones adicionales con tolueno. La cromatografía en columna con gel de sílice (CH₂Cl₂ y entonces CH₂Cl₂: AcOEt, 10: 1 a 5: 1) proporcionó el producto 7 (934 mg, 88 %): [α]_D -80° (c 1, CHCl₃); *Rf* 0,5 (CH₂Cl₂: AcOEt, 5: 1); RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,53 (d, 1H, *J*_{5,6} 8,7 Hz, H-5), 7,06 (d, 1H, *J*_{6,8} 2,5 Hz, H-8), 7,01 (dd, 1H, *J*_{6,8} 2,5, *J*_{5,6} 8,9 Hz, H-6), 6,33 (s, 1H, H-3), 5,84 (d, 1H, *J*_{1',2'} 2,5 Hz, H-1'), 5,20 (m, 2H, H-3', H-4'), 5,05 (m, 1H, H-2'), 4,89 (m, 1H, H-5'), 4,77 (2s, 2H, CH₂CCl₃), 3,87 (s, 2H, CH₂CO₂), 3,77 (s, 3H, CO₂Me), 2,16-2,09 (3s, 9H, 3OAc); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 169,5, 169,4, 169,0, 167,9, 167,2, 160,2, 158,9, 155,3, 146,7, 126,0, 115,7, 114,1, 113,2, 104,9, 95,7, 94,5, 74,6, 67,8, 67,0, 66,8, 52,9, 37,7, 20,9, 20,9, 20,7; IEP-EM: *m/z* 667 [M + H]⁺.

[0074] (N-[4''- (terc-Butoxicarbonilamino)butil]-7-O- (metil-2',3',4'-tri-O-acetil-α-L-idopiranosiluronato)cumarin-4-acetamida (9a). Se disolvió el glucósido 7 (831 mg, 1,2 mmol, 1 eq) en 41 ml de tetrahidrofurano anhidro a temperatura ambiente. Se enfrió la disolución a 0 °C y se añadió ácido acético acuoso al 90 % (5,5 ml). Finalmente, se añadieron cloruro de cobre (167 mg, 1,2 mmol, 1 eq) y cinc en polvo (813 mg, 12,4 mmol, 10 eq). Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante un total de 39 h, durante las cuales se añadió cinc en polvo (813 mg, 12,4 mmol, 10 eq) después de una reacción de 15 h y 25 h. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el filtrado a vacío. Se solubilizó el residuo en 200 ml de diclorometano y se lavó con 150 ml de agua (dos veces) y 150 ml de salmuera. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. La cromatografía en columna con gel de sílice (CH₂Cl₂ y entonces CH₂Cl₂: AcOEt, 5: 1 a 2: 1; todos los disolventes con 1 % de ácido acético) proporcionó el producto 8 (634 mg, 95 %). Se enfrió a 0 °C una disolución del ácido 8 (627 mg, 1,2 mmol, 1 eq) en 20 ml de tetrahidrofurano anhidro. Se añadieron clorhidrato de N- (3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (245 mg, 1,28 mmol, 1,1 eq) y 1-hidroxibenzotriazol (196 mg, 1,28 mmol, 1,1 eq) y se agitó la suspensión durante 30 min a 0 °C. Se añadió lentamente una disolución de N-Boc-1,4-diaminobutano (223 µl, 1,2 mmol, 1 eq) en 2 ml de N,N-dimetilformamida anhidra a la suspensión. Se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. Se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se recogió el residuo en 250 ml de acetato de etilo y se lavó con 150 ml de HCl 1 M, 150 ml de agua y 150 ml de salmuera. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. La cromatografía en columna con gel de sílice (tolueno: acetona, 3: 1 a 2: 1) proporcionó el producto 9a (528 mg, 65 %): [α]_D -70° (c 0,85, CHCl₃); *Rf* 0,38 (CH₂Cl₂: MeOH, 95: 5); RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,67 (d, 1H, *J*_{5,6} 8,7 Hz, H-5), 7,03 (d, 1H, *J*_{6,8} 2,3 Hz, H-8), 6,99 (dd, 1H, *J*_{6,8} 2,5, *J*_{5,6} 8,7 Hz, H-6), 6,29 (s, 1H, H-3), 5,84 (d, 1H, *J*_{1',2'} 2,1 Hz, H-1), 5,20 (m, 2H, H-3', H-4'), 5,04 (m, 1H, H-2'), 4,89 (d, 1H, *J*_{4',5'} 2,1 Hz, H-5'), 3,77 (s, 3H, CO₂Me), 3,65 (s, 2H, CH₂CONH), 3,26 (m, 2H, CH₂NHCO), 3,09 (m, 2H, CH₂NHCO), 2,17-2,09 (3s, 9H, 3OAc), 1,49 (m, 4H, CH₂-CH₂), 1,42 (s, 9H, CMe₃); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 169,4, 169,4, 169,0, 167,8, 167,6, 160,7, 158,8, 156,4, 155,2, 149,7, 126,7, 114,5, 114,5, 113,2, 104,5, 95,6, 79,4, 67,7, 66,9, 66,6, 52,8, 39,8, 28,5, 20,8, 20,8, 20,6;

IEP-EM: m/z 707 $[M + H]^+$.

[0075] (*N*-[4'- (*tert*-Butoxicarbonilamino)butil]-7-*O*- (ácido α -L-idopiranosilurónico)cumarin-4-acetamida (IdA-S). Se enfrió a 0 °C una disolución de 9a (98 mg, 0,165 mmol, 1 eq) en 16 ml de metanol. Se añadió gota a gota una disolución de metóxido de sodio 0,5 M en metanol (140 μ l, 0,07 mmol, 0,4 eq). Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 1,5 h. Se neutralizó la mezcla de reacción con Amberlite IR-120 (H +) y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío. La cromatografía en columna con gel de sílice (CH_2Cl_2 : MeOH, 9: 1) proporcionó el producto 9b (69 mg, 86 %): RMN- ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 7,69 (d, H, $J_{5,6}$ 9,7 Hz, H-5), 7,14 (d, 1H, $J_{6,8}$ 2,3 Hz, H-8), 7,13 (dd, 1H, H-6), 6,28 (s, 1H, H-3), 5,76 (d, 1H, $J_{1,2'}$ 3,9 Hz, H-1'), 4,75 (d, 1H, $J_{4,5}$ 3,5 Hz, H-5'), 3,97-3,89 (m, 2H, H-2', H-3'), 3,77 (s, 3H, CO_2Me), 3,74 (s, 2H, CH_2CONH), 3,73 (m, 1H, H-4'), 3,21 (m, 2H, CH_2NHCO), 3,03 (m, 2H, CH_2NHCO), 1,49 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1,42 (s, 9H, CMe_3); IEP-EM: m/z 581 $[M + H]^+$. Se disolvió el compuesto 9b (21 mg, 0,036 mmol, 1 eq) en 2 ml de agua/metanol (1: 1) a temperatura ambiente. Se añadió una disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 M en incrementos de 0,1 eq de NaOH hasta que el pH de la disolución alcanzó aproximadamente 8 (papel de pH). Se mantuvo el pH mediante adiciones incrementales de la disolución de NaOH 0,1 M a medida que procedía la reacción. Se agitó la mezcla de reacción durante 5,5 h. Se neutralizó la mezcla de reacción con Amberlite IR-120 (H +) y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío y se liofilizó entonces, proporcionando el producto IDA-S (20 mg, cuant.): $[\alpha]_D$ -29° (c 0,66, MeOH); RMN- ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 7,68 (d, 1H, $J_{5,6}$ 8,9 Hz, H-5), 7,54 (dd, 1H, $J_{6,8}$ 2,5, $J_{5,6}$ 8,9 Hz, H-6), 7,4 (d, 1H, $J_{6,8}$ 2,3 Hz, H-8), 6,25 (s, 1H, H-3), 5,58 (d, 1H, $J_{1,2'}$ 6,8 Hz, H-1'), 4,36 (d, 1H, $J_{4,5}$ 5,6 Hz, H-5'), 3,73 (s, 2H, CH_2CONH), 3,69-3,48 (m, 3H, H-2', H-3', H-4'), 3,21 (m, 2H, CH_2NHCO), 3,03 (m, 2H, CH_2NHCO), 1,49 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1,42 (s, 9H, CMe_3); IEP-EM: m/z 567 $[M + H]^+$.

Ejemplo 2

25 Síntesis de un patrón interno de iduronidasa (IdA-IS) representativo:

(*N*-[3'- (*tert*-Butoxicarbonilamino)propil]-7-hidroxycumarin-4-acetamida

30 **[0076]** La síntesis de un patrón interno de iduronidasa (IdA-IS) representativo, (*N*-[3'- (*tert*-butoxicarbonilamino)propil]-7-hidroxycumarin-4-acetamida, descrita a continuación, es una síntesis a pequeña escala (cantidad de miligramos) de IdA-IS. La síntesis se ilustra esquemáticamente en la FIGURA 4.

35 **[0077]** (*N*-[3'- (*tert*-Butoxicarbonilamino)propil]-7-acetoxicumarin-4-acetamida (10). Se enfrió a 0 °C una disolución de 5 (302 mg, 1,15 mmol, 1 eq) en 20 ml de tetrahidrofurano anhidro. Se añadieron clorhidrato de *N*- (3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (243 mg, 1,27 mmol, 1,1 eq) y 1-hidroxibenzotriazol (194 mg, 1,27 mmol, 1,1 eq) y se agitó la suspensión durante 30 min a 0 °C. Se añadió lentamente una disolución de *N*-Boc-1,3-diaminopropano (201 μ l, 1,15 mmol, 1 eq) en 1 ml de *N,N*-dimetilformamida anhidra a la suspensión. Se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 6 h. Se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se recogió el residuo en 200 ml de acetato de etilo y se lavó con 60 ml de HCl 1 M, 60 ml de agua y 60 ml de salmuera. Se secó la fase orgánica sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. La cromatografía en columna con gel de sílice (CH_2Cl_2 y entonces CH_2Cl_2 : MeOH, 98: 2 a 97: 3) proporcionó el producto 10 (296 mg, 61 %): R_f 0,6 (CH_2Cl_2 : MeOH, 95: 5); RMN- ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 7,78 (d, 1H, $J_{5,6}$ 8,7 Hz, H-5), 7,21 (d, 1H, $J_{6,8}$ 2,3 Hz, H-8), 7,15 (dd, 1H, $J_{6,8}$ 2,3, $J_{5,6}$ 8,7 Hz, H-6), 6,41 (s, 1H, H-3), 3,79 (s, 2H, CH_2CONH), 3,22 (t, 2H, J 6,8 Hz, CH_2NHCO), 3,02 (t, 2H, J 6,8 Hz, CH_2NHCO), 2,31 (s, 3H, OAc), 1,63 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,41 (s, 9H, CMe_3); RMN- ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6): δ 168,7, 167,3, 159,5, 152,8, 150,5, 126,4, 118,4, 116,9, 115,5, 110,2, 77,4, 38,8, 37,5, 36,5, 29,4, 28,2, 20,8; IEP-EM: m/z 419 $[M + H]^+$.

40 **[0078]** (*N*-[3'- (*tert*-Butoxicarbonilamino)propil]-7-hidroxycumarin-4-acetamida (IdA-IS). Se disolvió el compuesto 10 (160 mg, 0,38 mmol, 1 eq) en 21 ml de metanol/diclorometano (6: 1) y se enfrió a 0 °C la disolución. Se añadió gota a gota una disolución de metóxido de sodio 0,5 M en metanol (383 μ l, 0,19 mmol, 0,5 eq). Después de agitar durante 30 min a 0 °C, se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 18 h. Se neutralizó entonces la mezcla de reacción con Amberlite IR-120 (H +) y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío. La purificación por cromatografía en columna con gel de sílice (CH_2Cl_2 y entonces CH_2Cl_2 : MeOH, 95: 5 a 90: 10) proporcionó el producto IdA-IS (132 mg, 92 %): R_f 0,24 (CH_2Cl_2 : MeOH, 95: 5); RMN- ^1H (300 MHz, DMSO-d_6): δ 10,57 (s a, 1H, OH), 8,17 (t, 1H, J 5,4 Hz, NH), 7,62 (d, 1H, $J_{5,6}$ 8,7 Hz, H-5), 6,82 (dd, 1H, $J_{6,8}$ 2,3, $J_{5,6}$ 8,7 Hz, H-6), 6,79 (m, 1H, NH), 6,75 (d, 1H, $J_{6,8}$ 2,5 Hz, H-8), 6,19 (s, 1H, H-3), 3,66 (s, 2H, CH_2CONH), 3,08 (m, 2H, CH_2NHCO), 2,94 (m, 2H, CH_2NHCO), 1,54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,40 (s, 9H, CMe_3); RMN- ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6): δ 167,5, 161,1, 160,2, 155,0, 151,1, 126,6, 112,9, 111,8, 111,5, 102,3, 77,5, 37,5, 36,6, 29,5, 28,2; IEP-EM: m/z 377 $[M + H]^+$.

60 Ejemplo 3

Procedimiento de IEP-EMEM representativo para el ensayo directo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa

[0079] En este ejemplo, se describe un procedimiento representativo de la invención (espectrometría de masas en tándem) para ensayar directamente la actividad enzimática α -L-uronidasa de gotas de sangre seca (GSS) de una tarjeta de cribado neonatal.

[0080] Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de Revisión. Todos los pacientes afectados de MPS-I se habían diagnosticado anteriormente con procedimientos clínicos y bioquímicos establecidos. Se mantuvieron las GSS a temperatura ambiente durante el transporte (< 10 días) y se almacenaron entonces a -20 °C en bolsas de plástico con cierre de cremallera (una bolsa sellada dentro de una segunda bolsa). Las bolsas con cierre de cremallera se mantuvieron en una caja de plástico sellada que contenía desecante (gránulos de CaSO₄ anhidro).

[0081] Se obtuvo una sola GSS de 3 mm de diámetro (que contenía ~3,6 μ l de sangre) con un sacabocados y se dispuso en un tubo Eppendorf de 1 ml. Se añadió al tubo tampón de extracción [160 μ l de formiato de sodio 0,1 mol/l, pH 3,4 que contenía 1,4-lactona del ácido D-sacárico 75 mmol/L (Sigma); almacenamiento a -20 °C]. Después de mezclar con vórtex durante 1 min, se agitó suavemente el tubo en un agitador orbital durante 45 min a 37 °C. Se transfirieron 20 μ l de este extracto de sangre a un tubo Eppendorf de 0,6 ml y se añadieron 10 μ l de IdA-S 1,5 mmol/l en agua (almacenado a -20 °C). Se incubó la reacción enzimática durante 20 horas a 37 °C en un agitador termostatzado con aire y se inactivó entonces añadiendo 100 μ l de acetato de sodio 0,1 mol/l a pH 5,4. Se añadieron también 10 μ l de IdA-IS 20 μ mol/l en agua (almacenado a -20 °C) y se mezcló con vórtex el tubo. Se preparó un blanco incubando un tubo con 20 μ l de extracto de sangre y un tubo con 10 μ l de IdA-S 1,5 mmol/l en formiato de sodio 0,1 mol/l a pH 3,4 separadamente a 37 °C durante 20 horas, seguido de mezclado conjunto de las dos disoluciones y adición de 100 μ l de acetato de sodio 0,1 mol/l a pH 5,4 y 10 μ l de IdA-IS 20 μ mol/l en agua.

[0082] Se efectuó la extracción de IdA-P e IdA-IS de la reacción enzimática y el blanco mediante la adición de 250 μ l de acetato de etilo. Después de mezclar con vórtex durante 15 s, se centrifugó el tubo durante 1 min usando una centrífuga de sobremesa a velocidad máxima. Se transfirió una alícuota de 200 μ l de la fase orgánica superior a un tubo Eppendorf de 1 ml. Se retiró el disolvente bajo corriente de nitrógeno (típicamente 30 min a temperatura ambiente). Se añadieron al residuo 70 μ l de formiato de amonio 5 mmol/l en metanol y se transfirió la muestra a un pocillo de una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One, nº de cat. 651201) para el gestor de muestras Waters. Se inyectó la muestra (20 μ l de la muestra de 70 μ l en formiato de amonio 5 mmol/l en metanol) en el espectrómetro de masas con un sistema autoinyector Waters. Después de la inyección de muestra, se infundió ácido fórmico al 0,2 % en metanol durante 4 min a 0,2 ml/min, suministrando la muestra al espectrómetro de masas y limpiando la línea de suministro antes de la siguiente inyección. Se recogieron los datos de EMEM en el periodo de 0-3 min después de la inyección de muestra. Se analizó la muestra durante los primeros 45 segundos de infusión y, después de 1 min, la señal de EMEM ha vuelto al nivel de fondo. En los laboratorios de cribado neonatal, los análisis podrían reducirse a 1-2 min por muestra para minimizar el tiempo empleado en una muestra dada.

[0083] Se llevó a cabo la IEP-EME en un instrumento cuadripolar en tándem Waters ACQUITY que funciona en modo de ión positivo con control de múltiples reacciones. Se llevó a cabo el barrido iónico con el software MassLynx 4.1 con los siguientes ajustes: voltaje capilar, 4500 V; voltaje de cono, 19 V; extractor, 3 V; RF, 0,4 V; temperatura de fuente, 80 °C; temperatura de desolvatación, 250 °C; flujo de gas del cono, 0 l/h; flujo de gas de desolvatación, 500 l/h; flujo de gas de colisión, 0,20 ml/min; resolución de LM 1, 13,2; resolución de HM 1, 14,6; energía del ión 1, 0; entrada en modo EMEM, 1; energía de colisión de EMEM, 10 eV (IdA-P) y 9 eV (IdAIS); salida del modo EMEM, 0,5; resolución de LM 2, 13,0; resolución de HM 2, 14,6; energía del ión 2, 0,7; presión de la celda de colisión, ~3,7 x 10⁻⁴ kPa; gas de colisión, argón. Se usó el modo de control de múltiples reacciones para las transiciones m/z 391,2 \rightarrow 291,1 y 377,2 \rightarrow 277,1 con los siguientes ajustes: tiempo de residencia: 0,1 s, retardo, 0,02 s.

[0084] Se aislaron los iones originales de IdA-P e IdA-IS (m/z 391,2 y 377,2, respectivamente) y se sometieron a disociación inducida por colisión. Los iones fragmentarios analizados son de m/z 291,1 y 277,1, derivados de IdA-P e IdA-IS respectivamente mediante eliminación de isobuteno y dióxido de carbono. Se calculó la cantidad de producto a partir de la relación de abundancia iónica de producto (IdA-P) a patrón interno (IdA-IS) menos el de un control de blanco (extracto de sangre y sustrato en tampón a pH 3,4 incubados separadamente) multiplicado por la cantidad de patrón interno añadido y dividido entre la relación de factor de respuesta de producto a patrón interno (véase la FIGURA 9). Se calculó la actividad enzimática a partir de la cantidad de producto, que se dividió entre el tiempo de incubación y el volumen de sangre (3,6 μ l de sangre en una punción de GSS de 3 mm).

[0085] De acuerdo con el procedimiento de la invención descrito con detalle anteriormente, se midieron las actividades IdA en GSS para pacientes de MPS-I (5), portadores de MPS-I (5) y neonatos normales (10). La actividad α -L-iduronidasa medida para 5 pacientes (neonatos afectados con MPS-I) estaba muy por debajo del intervalo encontrado para los 10 neonatos elegidos aleatoriamente; la actividad medida para los 5 portadores de

MPS-I era intermedia de la de los neonatos afectados y los neonatos elegidos aleatoriamente. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividades de IdA para GSS individuales

Actividad de IdA ($\mu\text{mol/h/l}$ de sangre)			
Pacientes de MPS-I	Portadores de MPS-I	Neonatos normales	
-0,05	5,66	14,4	11,5
-0,15	2,55	11,2	11,1
-0,04	2,35	23,4	18,0
0,268	1,45	7,8	7,4
-0,67	2,60	7,4	10,6

[0086] Se restó el valor del blanco [media (DE), 2,67 (0,26) $\mu\text{mol/h/l}$ de sangre; calculado a partir de 15 ensayos independientes] obtenido a partir de un ensayo idéntico en que el extracto de sangre y el sustrato en tampón a pH 3,4 se incubaron separadamente, dando los valores.

[0087] Los resultados se presentan gráficamente en la FIGURA 10. Con respecto a la FIGURA 10, se muestran las actividades de IdA con las barras horizontales indicando el intervalo completo de valores, el recuadro indicado los valores de 25-75 % y la línea horizontal dentro del recuadro indicando la mediana y ■ indicando la media.

Ejemplo 4

Procedimiento fluorimétrico representativo para el ensayo directo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa

[0088] En este ejemplo, se describe un procedimiento representativo de la invención (fluorimétrico) para ensayar directamente la actividad enzimática α -L-uronidasa de gotas de sangre seca (GSS). El sustrato enzimático (IdA-S) usado fue como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

[0089] Se usaron gotas de sangre seca en una tarjeta de papel de filtro como fuente enzimática. Se preparó el extracto de sangre como sigue: se obtuvo una punción de gota de sangre seca de 3 mm (que contiene $\sim 3,6 \mu\text{l}$ de sangre) mediante el uso de un sacabocados estándar y se dispuso en un tubo Eppendorf de 1 ml. Se añadió tampón de extracción [160 μl de formiato de sodio 0,1 M a pH 3,4 que contiene 1,4-lactona de ácido D-sacárico 75 μM] al tubo. Después de mezclar con vórtex durante 1 min, se agitó suavemente el tubo en un agitador orbital durante 45 min a 37 °C, dando un extracto de sangre que contiene la enzima α -L-iduronidasa.

[0090] Se añadieron 10 μl de sustrato de IdA-S 1 mM a 20 μl de extracto de sangre. Después de 20 h de incubación a 37 °C en un agitador termostatzado con aire, se detuvo la reacción mediante la adición de 100 μl de carbonato de glicina 85 mM a pH 10,5 y se midió la fluorescencia de la disolución resultante. Se preparó un blanco incubando un tubo con 20 μl de extracto de sangre y un tubo con 10 μl de sustrato IdA-S 1 mM en formiato de sodio 0,1 M a pH 3,4 separadamente a 37 °C durante 20 h, seguido de mezclado conjunto de las dos disoluciones y adición de 100 μl de carbonato de glicina 85 mM a pH 10,5. Se realizó cada ensayo por triplicado y se corrigió restando el valor del blanco. Se llevaron a cabo las medidas de fluorescencia de la aglicona liberada a longitudes de onda $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 355/460 nm para (N-[4'- (terc-butoxicarbonilamino)butil]-7-hidroxicumarin-4-acetamida, IdA-P, en un fluorómetro PerkinElmer VICTOR³ V. Usando una curva de calibración (FIGURA 11), se calcularon las actividades enzimáticas como micromoles de sustrato hidrolizado por hora por litro de sangre.

[0091] De acuerdo con el procedimiento de la invención descrito con detalle anteriormente, se midieron las actividades de IdA en GSS para dos individuos no afectados. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividades de IdA para dos pacientes no afectados

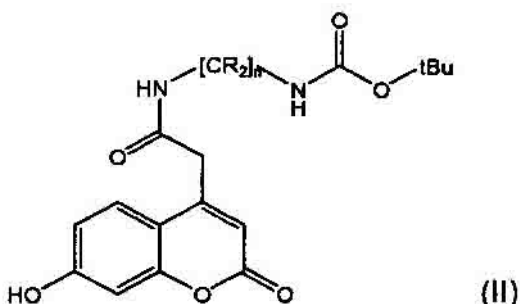
Actividad de IdA ($\mu\text{mol/h/l}$ de sangre)
Pacientes no afectados
4,47
7,17

[0092] Se restó el valor del blanco [media (DE), 1,83 (0,09) $\mu\text{mol/h/l}$ de sangre; calculado a partir de 2 ensayos independientes] obtenido a partir de un ensayo idéntico en que el extracto de sangre y el sustrato en tampón a pH 3,4 se incubaron separadamente (véase el texto principal), dando los valores.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que comprende:

- 5 (a) incubar un sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa,
- (b) inactivar la reacción enzimática, proporcionando una disolución de reacción inactivada,
- 10 (c) añadir un patrón interno de α -L-iduronidasa a la disolución de reacción inactivada, proporcionando una disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa; en el que el patrón interno tiene la fórmula (II):



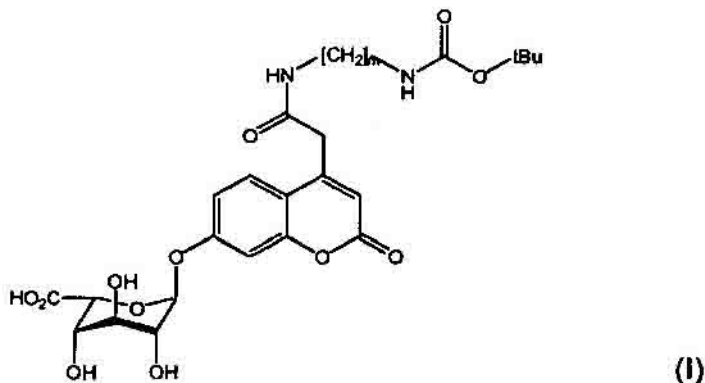
- 15 en la que R es independientemente en cada aparición H o D y n es un entero de 2 a 12;
- (d) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa; y
- 20 (e) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la disolución que comprende α -L-iduronidasa se obtiene poniendo en contacto una muestra que contiene α -L-iduronidasa con una primera disolución tampón.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la muestra es una muestra de sangre.

4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la muestra es una gota de sangre seca de una tarjeta de cribado neonatal, comprendiendo preferiblemente además usar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa para determinar si la muestra de sangre seca es de un candidato al tratamiento por mucopolisacaridosis de tipo I.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sustrato tiene la fórmula (I):



35

en la que m es un entero de 2 a 12; o

en la que el sustrato es (N-[4"- (*tert*-butoxicarbonilamino)butil])-7-O- (ácido α -L-idopiranosilurónico)cumarin-4-acetamida.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el patrón interno es (N-[3'- (*tert*-butoxicarbonilamino)propil])-7-hidroxycumarin-4-acetamida.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico se selecciona del grupo consistente en acetato de etilo, dietiléter, cloroformo, cloruro de metileno y butanol.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa comprende:

(a) determinar la relación de producto de α -L-iduronidasa a patrón interno de α -L-iduronidasa que comprende análisis espectrométrico de masas; o

(b) análisis espectrométrico de masas en tándem; o

(c) análisis espectrométrico de masas en tándem en que los iones originales de producto y patrón interno se generan, aíslan y someten a disociación inducida por colisión, proporcionando iones fragmentarios de producto e iones fragmentarios de patrón interno;

preferiblemente en el que determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa comprende comparar las intensidades de pico de los iones fragmentarios de producto y los iones fragmentarios de patrón interno para calcular la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.

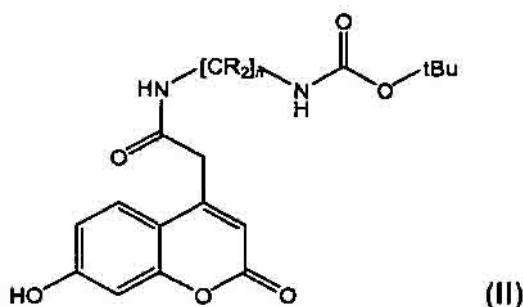
9. Un procedimiento para el cribado neonatal de mucopolisacaridosis de tipo I que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de sangre seca de una tarjeta de cribado neonatal con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa;

(b) añadir un sustrato de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende α -L-iduronidasa e incubar el sustrato con la enzima durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa;

(c) inactivar la reacción enzimática, proporcionando una disolución de reacción inactivada;

(d) añadir un patrón interno de α -L-iduronidasa a la disolución de reacción inactivada, proporcionando una disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa; en el que el patrón interno tiene la fórmula (II):



en la que R es independientemente en cada aparición H o D y n es un entero de 2 a 12;

(e) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa;

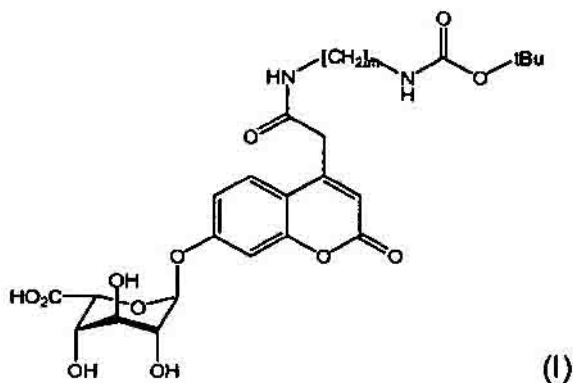
(f) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa mediante análisis espectrométrico de masas en tándem que comprende:

5 (i) generar, aislar y someter los iones originales de producto y patrón interno a disociación inducida por colisión, proporcionando iones fragmentarios de producto e iones fragmentarios de patrón interno, y

(ii) comparar las intensidades de pico iónico de los iones fragmentarios de producto y los iones fragmentarios de patrón interno para calcular la cantidad de producto de α -L-iduronidasa; y

10 (g) usar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa para predecir si el neonato es candidato al tratamiento por mucopolisacaridosis de tipo I.

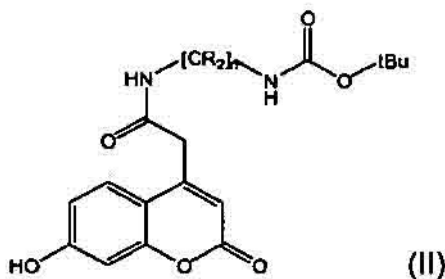
15 10. Un compuesto de fórmula (I):



en la que m es un entero de 2 a 12;

20 preferiblemente (N-[4"- (terc-butoxicarbonilamino)butil])-7-O- (ácido α -L-idopiranosilurónico)-cumarin-4-acetamida.

11. Un compuesto de fórmula (II):



25 en la que R es independientemente en cada aparición H o D y n es un entero de 2 a 12;

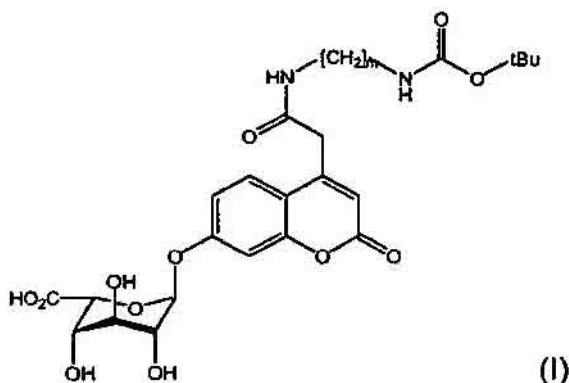
preferiblemente (N-[3'- (terc-butoxicarbonilamino)propil])-7-hidroxycumarin-4-acetamida.

30 12. Un procedimiento para el ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de sangre seca con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa;

35 (b) añadir un sustrato de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende α -L-iduronidasa e incubar el sustrato con la enzima durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-

iduronidasa; en el que el sustrato de α -L-iduronidasa tiene la fórmula (I):



5 en la que m es un entero de 2 a 12;

(c) añadir un segundo tampón a la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa para inactivar la reacción enzimática;

10 (d) separar el producto de α -L-iduronidasa de la reacción enzimática; y

(e) medir la intensidad de fluorescencia de una disolución que contiene el producto de α -L-iduronidasa.

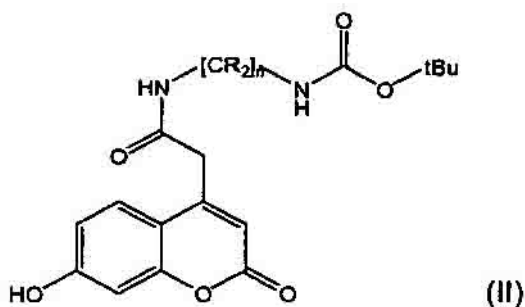
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que separar el producto de α -L-iduronidasa de la
15 reacción enzimática comprende extraer el producto de α -L-iduronidasa de la mezcla de reacción enzimática:

(a) con un disolvente orgánico; o

20 (b) usando extracción en fase sólida.

14. Un procedimiento para el ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que comprende:

(a) incubar un sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa durante un tiempo predeterminado, proporcionando
25 una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa; en el que la incubación del sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa se efectúa en presencia de un patrón interno de α -L-iduronidasa; en el que el patrón interno tiene la fórmula (II):



30 en la que R es independientemente en cada aparición H o D y n es un entero de 2 a 12;

(b) inactivar la reacción enzimática, proporcionando una disolución de reacción inactivada;

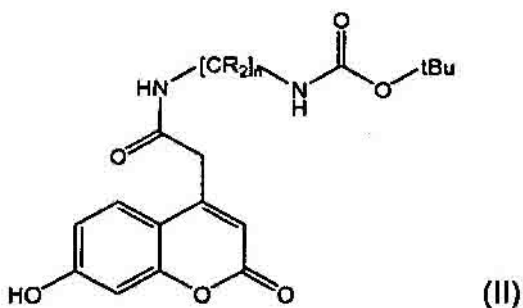
(c) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa con un
35 disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa; y

(d) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.

15. Un procedimiento para el ensayo de la actividad enzimática α -L-iduronidasa que comprende:

(a) incubar un sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa;

(b) inactivar la reacción enzimática, proporcionando una disolución de reacción inactivada, en el que inactivar la reacción enzimática comprende añadir un tampón a la disolución que comprende el producto de α -L iduronidasa, en el que el tampón comprende un patrón interno de α -L-iduronidasa; en el que el patrón interno tiene la fórmula (II):



en la que R es independientemente en cada aparición H o D y n es un entero de 2 a 12;

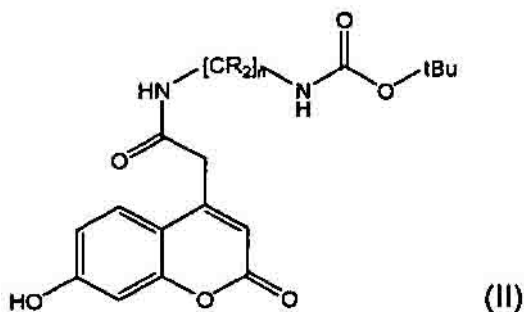
(c) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa; y

(d) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa.

16. Un procedimiento para el cribado neonatal de mucopolisacaridosis de tipo I que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de sangre seca de una tarjeta de cribado neonatal con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa;

(b) añadir un sustrato de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende α -L-iduronidasa e incubar el sustrato con la enzima durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa; en el que la incubación del sustrato de α -L-iduronidasa con α -L-iduronidasa se efectúa en presencia de un patrón interno de α -L-iduronidasa; en el que el patrón interno tiene la fórmula (II):



en la que R es independientemente en cada aparición H o D y n es un entero de 2 a 12;

(c) inactivar la reacción enzimática, proporcionando una disolución de reacción inactivada;

(d) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa;

5 (e) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa mediante análisis espectrométrico de masas en tándem que comprende:

(i) generar, aislar y someter los iones originales de producto y patrón interno a disociación inducida por colisión, proporcionando iones fragmentarios de producto e iones fragmentarios de patrón interno, y

10 (ii) comparar las intensidades de pico iónico de los iones fragmentarios de producto y los iones fragmentarios de patrón interno para calcular la cantidad de producto de α -L-iduronidasa; y

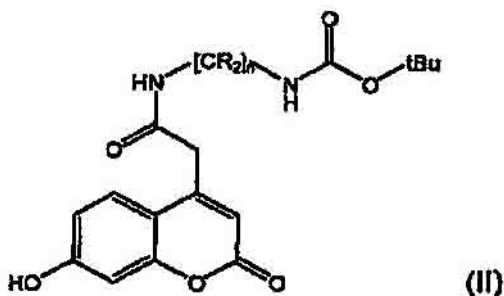
15 (f) usar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa para predecir si el neonato es candidato al tratamiento por mucopolisacaridosis de tipo I.

17. Un procedimiento para el cribado neonatal de mucopolisacaridosis de tipo I que comprende:

20 (a) poner en contacto una muestra de sangre seca de una tarjeta de cribado neonatal con una primera disolución tampón, proporcionando una disolución que comprende α -L-iduronidasa;

(b) añadir un sustrato de α -L-iduronidasa a la disolución que comprende α -L-iduronidasa e incubar el sustrato con la enzima durante un tiempo predeterminado, proporcionando una disolución que comprende un producto de α -L-iduronidasa;

25 (c) inactivar la reacción enzimática, proporcionando una disolución de reacción inactivada; en el que inactivar la reacción enzimática comprende añadir un tampón a la disolución que comprende el producto de α -L iduronidasa, en el que el tampón comprende un patrón interno de α -L-iduronidasa; en el que el patrón interno tiene la fórmula (II):



30

en la que R es independientemente en cada aparición H o D y n es un entero de 2 a 12;

35 (d) extraer la disolución que comprende el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa con un disolvente orgánico, proporcionando una fase orgánica que incluye el producto de α -L-iduronidasa y patrón interno de α -L-iduronidasa;

40 (e) determinar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa mediante análisis espectrométrico de masas en tándem, que comprende:

(i) generar, aislar y someter los iones originales de producto y patrón interno a disociación inducida por colisión para proporcionar iones fragmentarios de producto e iones fragmentarios de patrón interno, y

45 (ii) comparar las intensidades de pico iónico de los iones fragmentarios de producto y los iones fragmentarios de patrón interno para calcular la cantidad de producto de α -L-iduronidasa; y

(f) usar la cantidad de producto de α -L-iduronidasa para predecir si un neonato es candidato al tratamiento por mucopolisacaridosis de tipo I.

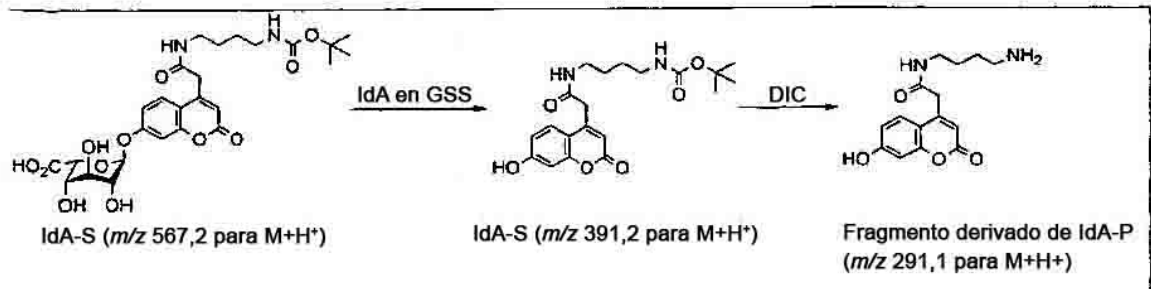


FIG. 1.

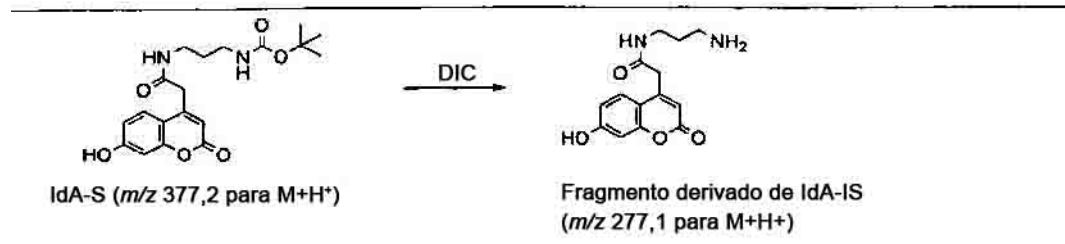


FIG. 2.

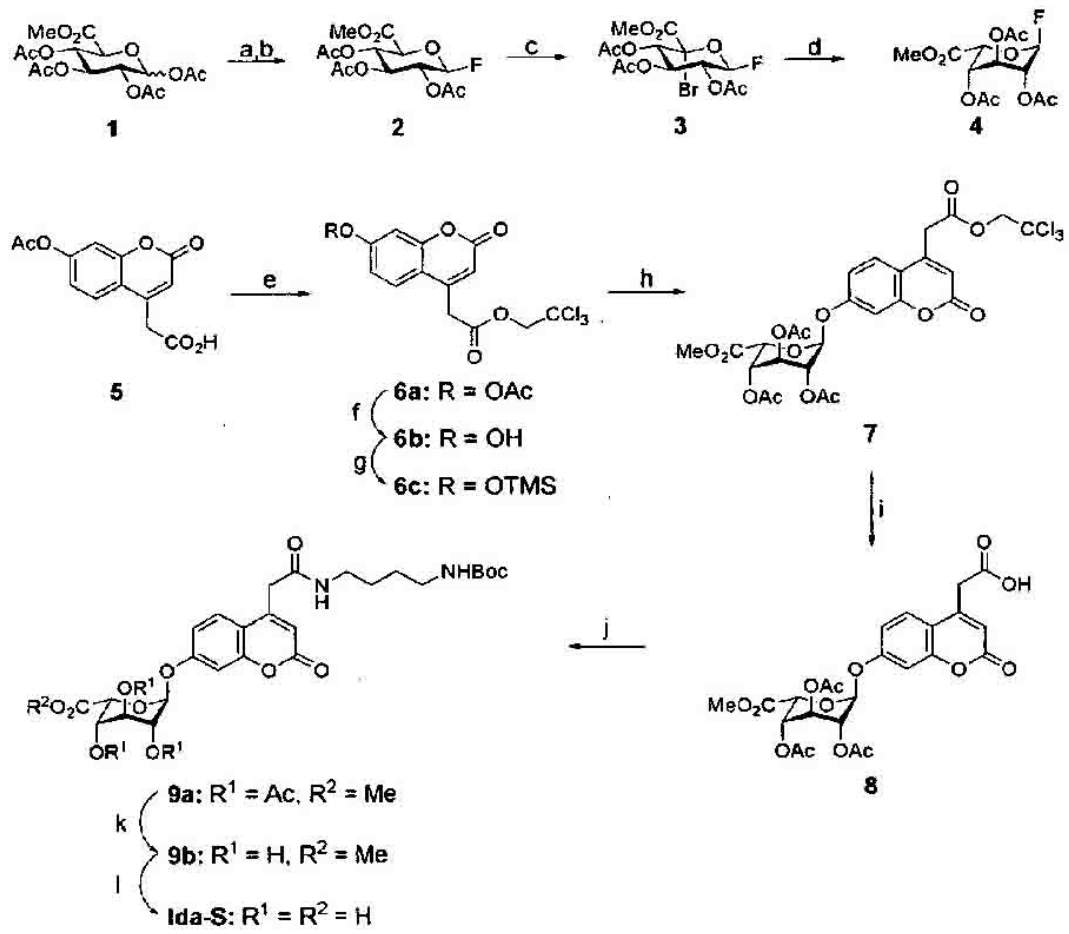
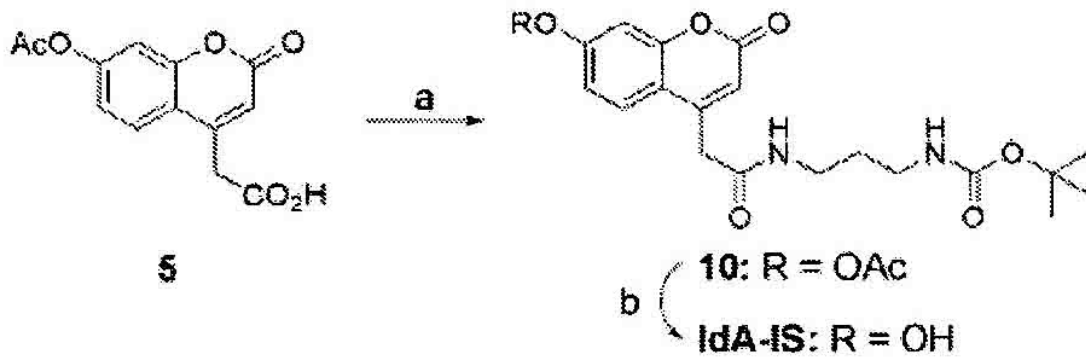


FIG. 3.



⊗

FIG. 4.

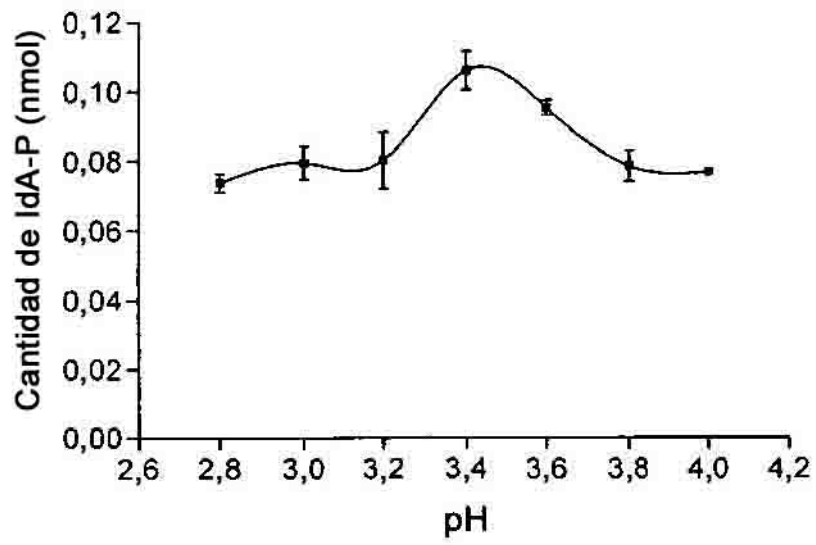


FIG. 5.

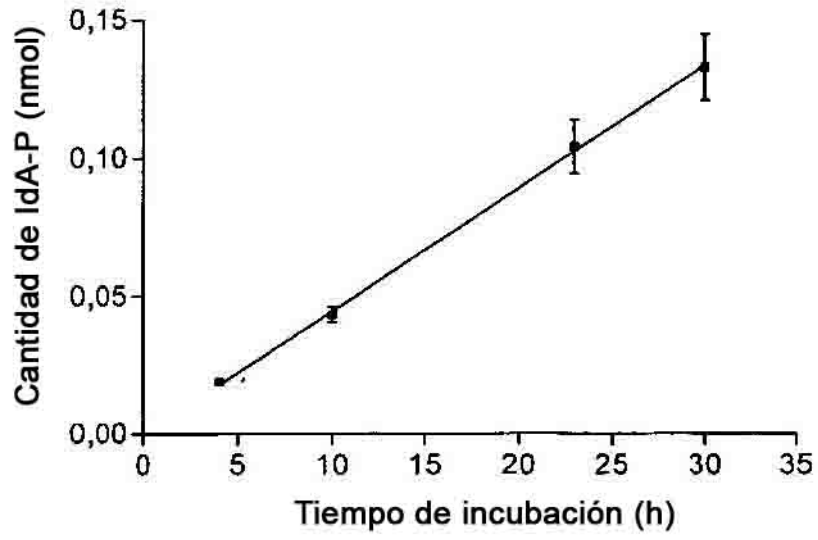


FIG. 6.

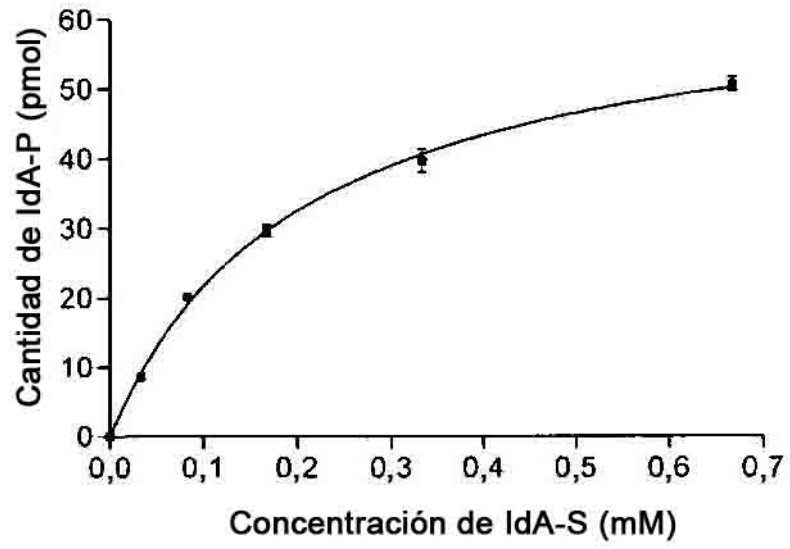


FIG. 7.

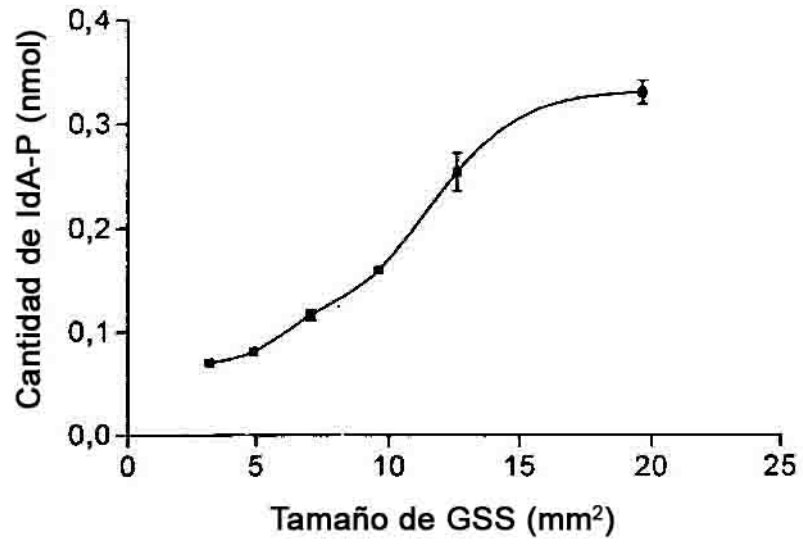


FIG. 8.

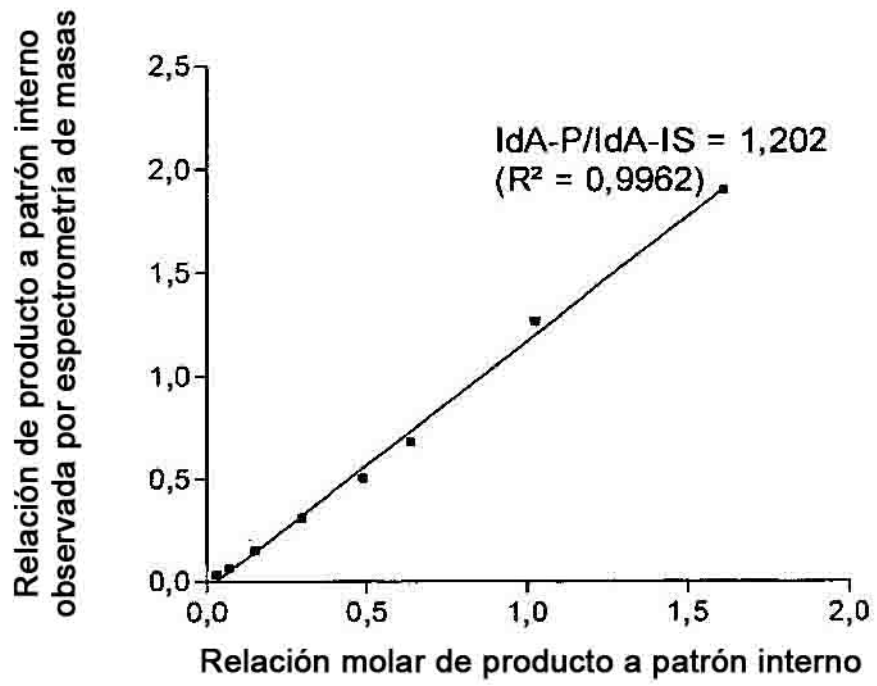


FIG. 9.

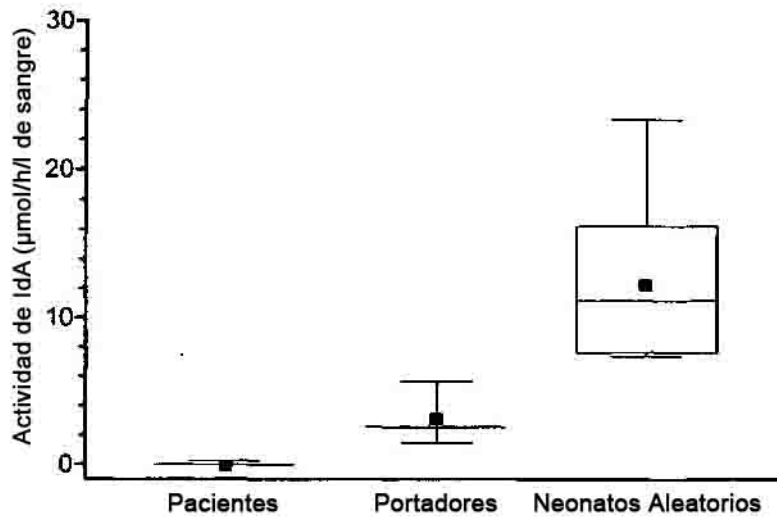


FIG. 10.

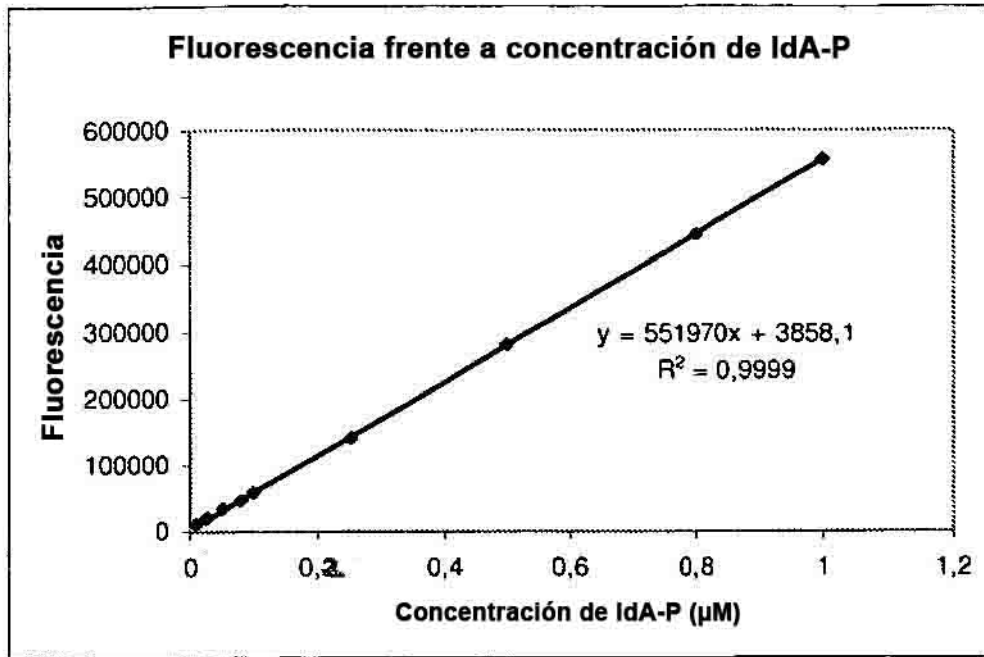


FIG. 11.