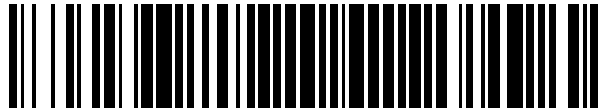


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 917**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2009 PCT/US2009/069941**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.07.2010 WO10078511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2009 E 09837207 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2376915**

54 Título: **Método para diagnosticar un trastorno MPS IIIB**

30 Prioridad:

02.01.2009 US 142291 P

27.03.2009 US 164365 P

29.12.2009 US 649094

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2017

73 Titular/es:

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)

**105 Digital Drive
Novato, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

CRAWFORD, BRETT E.;
BROWN, JILLIAN R. y
GLASS, CHARLES A.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 623 917 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

Método para diagnosticar un trastorno MPS IIIB

Antecedentes de la invención

5 Los glicosaminoglicanos comprenden un extremo reductor y un extremo no reductor. Los procesos biológicos normales degradan los glicosaminoglicanos (tales como sulfato de heparano que tiene un componente normal de aproximadamente 50-80 kDa) en monosacáridos. Los trastornos asociados con degradación, biosíntesis y/o acumulación de glicosaminoglicanos anormal pueden producir una acumulación de glicosaminoglicanos y, fragmentos de estos.

10 Toma Levy et al., Laboratory Investigations, vol. 75, no. 6, 1996, páginas 771-781, describen inter alia la degradación de sulfatos de heparina urinarios excretados por pacientes con Sanfilippo B (MPS IIIB) con heparitinasa II. Como resultado, los monosacáridos y disacáridos insaturados se han formado como biomarcadores

Síntesis de la invención

15 En la presente se describen poblaciones de glicosaminoglicanos que se transforman en poblaciones de oligosacáridos usando glicosaminoglicanos liasas. Además se describen en la presente el uso de instrumentos analíticos para caracterizar la población de oligosacáridos con el fin de proporcionar información relevante sobre la población de oligosacáridos, la población de glicosaminoglicanos y la muestra biológica que proporcionó la población de glicosaminoglicanos.

En la presente se describe un proceso para diagnosticar la identidad y/o gravedad de la acumulación anormal de glicosaminoglicanos en un individuo o un trastorno de esta, el proceso comprende las etapas de

20 a. usar un instrumento analítico para detectar la presencia y/o medir la cantidad de una población de uno o más oligosacáridos presentes en una muestra biológica transformada que se ha preparado mediante:

tratamiento de una población de glicosaminoglicanos, en o aislados de una muestra biológica de la muestra Individuo para transformar los glicosaminoglicanos en la población del uno o más oligosacáridos

25 b. mostrar o registrar la presencia o una medición de una población de uno o más de oligosacárido.

En la presente también se describe un proceso para diagnosticar la presencia, identidad y/o gravedad de la acumulación anormal de glicosaminoglicanos en un individuo o un trastorno de esta, el proceso comprende las etapas de:

30 a. generar un biomarcador que comprende uno o más oligosacáridos de extremos no reductores, en el que el biomarcador es un oligosacárido saturado y se genera mediante el tratamiento de una población de glicosaminoglicanos en, o aislado de una muestra biológica del individuo, con al menos una glicosaminoglicano liasa que digiere, donde antes del tratamiento con liasa, tal biomarcador de oligosacáridos no está presente en abundancia en muestras de individuos con acumulación anormal de glicosaminoglicanos en relación con individuos con glicosaminoglicano normal;

35 b. usar un instrumento analítico para detectar la presencia y/o medir la cantidad del biomarcador producido y mostrar o registrar la presencia de o una medición de una población del biomarcador

La presente invención se refiere a un proceso para diagnosticar la presencia de un trastorno MPS IIIB en un individuo, el proceso que comprende las etapas de:

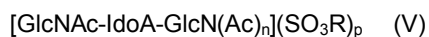
40 a) generar un biomarcador que comprende uno o más oligosacáridos de extremos no reductores, donde el biomarcador es un oligosacárido saturado y se genera mediante el tratamiento de una población de sulfatos de heparano purificados aislado de una muestra biológica del individuo, con glicosaminoglicano liasas de digestión, donde antes del tratamiento con liasa, el biomarcador no está presente en abundancia en muestras de individuos con el trastorno MPS IIIB con respecto a los individuos sin el trastorno MPS IIIB, y

45 b) usar un instrumento analítico para detectar la presencia de y/o medición de la cantidad del biomarcador producido y mostrar o registrar la presencia de o una medición de una población del biomarcador,

donde la presencia y/o cantidad del biomarcador se utiliza para determinar la presencia del trastorno MPS IIIB,

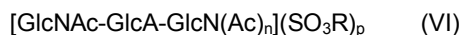
donde las glicosaminoglicano liasas de digestión comprenden heparina liasa I, heparina liasa II y heparina liasa III, y

50 donde el biomarcador se selecciona de trisacáridos de acuerdo con la fórmula V



donde n es 0-1 y p es 0-3;

trisacáridos de acuerdo con la fórmula VI



5 donde n es 0-1 y p es 0-2; y

trisacáridos de acuerdo con la fórmula XVI



10 En consecuencia, de acuerdo con la invención el trastorno para diagnosticar es un trastorno MPS IIIB. A continuación, la referencia a un trastorno en el contexto de la invención, es decir, como una realización, se entenderá como una referencia al trastorno MPS IIIB.

De acuerdo con la invención, los glicosaminoglicanos en una muestra biológica son sulfatos de heparano. A continuación, la referencia a glicosaminoglicanos en el contexto de la invención, es decir, como una realización, se entenderá como una referencia a sulfatos de heparano.

15 De acuerdo con la invención el biomarcador es un trisacárido definido anteriormente por las fórmulas V, VI y XVI. A continuación, la referencia a un biomarcador o un oligosacárido/oligosacárido de la invención en el contexto de la invención, es decir, como una realización, se entenderá como una referencia al biomarcador o trisacárido como se definió anteriormente.

20 De acuerdo con la invención la glicosaminoglicano liasa de digestión comprende heparina liasa I, heparina liasa II y heparina liasa III. A continuación, la referencia a glicosaminoglicano liasa de digestión en el contexto de la invención, es decir, como una realización, se entenderá como una referencia al glicosaminoglicano liasa de digestión como se definió anteriormente.

25 En varias realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente de preparar una muestra biológica transformada comprende purificar una población de los trisacáridos anteriores en la muestra biológica que se ha tratado con la al menos una heparina liasa, la muestra biológica transformada que comprende la población aislada de los trisacáridos anteriores. En algunas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente de preparar una muestra biológica transformada comprende purificar una población de sulfatos de heparano en la muestra biológica antes del tratamiento con la al menos una heparina liasa.

30 En determinadas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente de detección de la presencia de o la medición de la cantidad de una población de uno o más de los trisacáridos anteriores presentes en una muestra biológica transformada comprende:

- a. aislar una subpoblación de uno o más trisacáridos en la muestra biológica transformada; y
- b. detectar la presencia de y/o medir la cantidad de uno o más trisacáridos presentes en la subpoblación.

35 En realizaciones específicas, una subpoblación de uno o más trisacáridos se aísla usando, a modo de ejemplo no limitante, cromatografía o electroforesis. En realizaciones específicas, la cromatografía es cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía en columna, cromatografía de afinidad o cromatografía de capa fina (TLC). En algunas realizaciones, cualquier proceso de detección descrito en la presente comprende detectar trisacáridos usando espectrometría de masas,

40 En algunas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente de preparar una muestra biológica transformada comprende marcar el extremo reductor de una porción representativa de uno o más trisacáridos en la muestra biológica transformada con un marcador detectable. En realizaciones específicas, la marca detectable es una marca de masa, una marca de radio, una marca fluorescente, una marca de cromóforo o marca de afinidad. En algunas realizaciones, la porción marcada del uno o más oligosacáridos se detecta o mide usando espectroscopia UV-Vis, espectroscopia IR, espectrometría de masas, o una combinación de estas.

45 En la presente se describe una glicosaminoglicano liasa de digestión utilizada que comprende condroitin sulfato, queratan sulfato, hialuronano, o una de sus combinaciones.

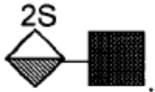
Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido que tiene la fórmula: $[\text{IdoA-GlcN(Ac)}_m](\text{SO}_3\text{R})_n$, donde m es 0-1, n es 0-3, y R es H o una carga negativa. El término R usado en cualquier fórmula descrita en la presente es H o una carga negativa.

Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula:



El disacárido anterior se detecta y/o mide en un proceso de diagnosticar un trastorno asociado con degradación de glicosaminoglicanos anormal que es MPS I.

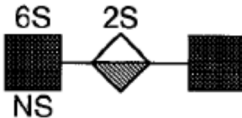
Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula:



5 Un disacárido anterior se detecta y/o mide en un proceso de diagnosticar un trastorno asociado con degradación de glicosaminoglicanos anormal que es MPS II.

En algunas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un trisacárido con la fórmula $[\text{GlcN}(\text{Ac})_m(\text{IdoA}/\text{GlcA})-\text{GlcN}(\text{Ac})_n](\text{SO}_3\text{R})_p$, donde IdoA/GlcA es IdoA o GlcA, m es 1, n es 0-1, p es 0-3 y R es H o una carga negativa.

10 En determinadas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un trisacárido con la fórmula:



15 El trisacárido anterior se detecta y/o mide en un proceso de diagnosticar un trastorno asociado con degradación de glicosaminoglicanos anormal que es MPS IIIA.

En determinadas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un trisacárido con la fórmula:



20 En algunas realizaciones, el trisacárido anterior se detecta y/o mide en un proceso de diagnosticar un trastorno asociado con degradación de glicosaminoglicanos anormal que es MPS IIIB.

Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un trisacárido con la fórmula:



El trisacárido anterior se detecta y/o mide en un proceso de diagnosticar un trastorno asociado con degradación de glicosaminoglicanos anormal que es MPS IIIC.

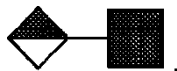
25 En determinadas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un trisacárido con la fórmula:



El trisacárido anterior se detecta y/o mide en un proceso de diagnosticar un trastorno asociado con degradación de glicosaminoglicanos anormal que es MPS IIID

30 Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula $[\text{GlcA}-\text{GlcN}(\text{Ac})_n](\text{SO}_3\text{R})_m$, donde n es 0-1, m es 0-2, y R es H o una carga negativa.

El proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula:



El disacárido anterior se detecta y/o mide en un proceso de diagnosticar un trastorno asociado con degradación de glicosaminoglicanos anormal que es MPS VII.

- 5 Como se describe en la presente, una población de glicosaminoglicanos tratados con al menos una glicosaminoglicano liasa de digestión comprende dermatan sulfato, condroitin sulfato, o una de sus combinaciones. Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula: [Ido-GalNAc](SO₃R)_n, donde n=0-2, y cada R es de modo independiente H o una carga negativa. Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un trisacárido con la fórmula: [GalNAc4S-Ido-GlcNAc](SO₃R)_m donde n=0-3; y/o uno o más trisacáridos con la fórmula: [GalNAc4S-GlcA-GlcNAc](SO₃R)_m, donde m=0-1, y donde cada R es de modo independiente H o una carga negativa.
- 10

- Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula: [Gal6S-GalNAc](SO₃R)_n, donde n = 0-1, y donde cada R es de modo independiente H o una carga negativa. La detección y/o medición de [Gal6S-GalNAc](SO₃R)_n se usa en un método de diagnóstico de MPS IVA o sus gravedad. Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula: [Gal-GalNAc](SO₃R)_m, donde n = 0-1, y donde cada R es de modo independiente H o una carga negativa. La detección y/o medición de [Gal-GalNAc](SO₃R)_n se usa en un método de diagnóstico MPS IVB o su gravedad.
- 15

En algunas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente comprende:

- a. comparar la cantidad de una población de uno o más de los trisacáridos de la invención presentes en una muestra biológica transformada con una cantidad de una población de uno o más de los trisacáridos de la invención presentes en una muestra biológica de control que se ha tratado de una manera sustancialmente similar a la muestra biológica transformada.
- 20

- En determinadas realizaciones, una muestra biológica control utilizada en cualquier proceso descrito en la presente se proporcionó a partir de un individuo que no tiene mucopolisacaridosis (por ejemplo, una línea celular no MPS). En algunas realizaciones, cualquier muestra biológica de control utilizada en un proceso descrito en la presente se proporcionó a partir de un individuo que tiene MPS IIIB. También se describen en la presente una muestra biológica de control proporcionada a partir de un individuo que tiene MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIC, MPS IIID, MPS VII, o una de sus combinaciones.
- 25

- En determinadas realizaciones en la presente se proporciona una muestra analítica que comprende todos los trisacáridos de la invención descritos en la presente, que incluye un trisacárido de la invención y que también está unido a una marca detectable (por ejemplo, en el extremo reductor del oligosacárido). En realizaciones específicas, en la presente se proporciona una muestra analítica que comprende una o más de cualquiera de las Figuras 7 y 8.
- 30

- En realizaciones específicas, una muestra analítica proporcionada en la presente es para usar en la cromatografía líquida de alto rendimiento. En algunas realizaciones, una muestra analítica proporcionada en la presente es para usar en espectrometría de masa. En determinadas realizaciones, una muestra analítica proporcionada en la presente es para usar en cromatografía de gases. En algunas realizaciones, cualquier muestra analítica proporcionada en la presente comprende al menos un trisacárido de la invención proveniente de una muestra biológica transformada de un individuo con un trastorno asociado con un trastorno MPS IIIB.
- 35

- En algunas realizaciones de la presente se proporciona un método analítico que comprende tratar una muestra biológica que comprende sulfatos de heparano con al menos una heparina liasa I, II y III para transformar una porción representativa de los trisacáridos de sulfato de heparano de la fórmula V, VI o XVI. En determinadas realizaciones un método analítico proporcionado en la presente comprende purificar uno o más trisacáridos de otros componentes de la muestra biológica. En algunas realizaciones, la etapa de purificación incluye el uso de cromatografía. En varias realizaciones, un método analítico proporcionado en la presente comprende detectar y/o medir la presencia de al menos uno de los trisacáridos (por ejemplo, después de la purificación). En determinadas realizaciones, los trisacáridos se detectan y/o miden de acuerdo con cualquier proceso o método (usado de modo indistinto en la presente) descrito en la presente usando espectroscopia V-Vis, espectroscopia IR, espectrometría de masa, o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente comprende marcar al menos uno de los trisacáridos con una marca detectable.
- 40
- 45

- En realizaciones específicas, un método analítico descrito en la presente se usa en un método de detectar y/o medir uno o más de los trisacáridos de la invención que están libres de insaturación carbono-carbono.
- 50

- Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula: [IdoA-GlcN(Ac)_n](SO₃R)_p, donde m es 0-1, n es 0-3 y R es H o una carga negativa. En algunas realizaciones, el proceso de la invención comprende detectar o medir un trisacárido con la fórmula: [GlcN(Ac)_m-(IdoA/GlcA)-G1cN(Ac)_n](SO₃R)_p, donde IdoA/GlcA es IdoA o GlcA, m es 0-1, n es 0-1, y p es 0-3. Un proceso descrito en la presente comprende
- 55

detectar o medir un disacárido con la fórmula: $[\text{GlcA-GlcN}(\text{Ac})_n](\text{SO}_3\text{R})_m$, donde n es 0-1, y m es 0-2. Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula: $[\text{Ido-GalNAc}](\text{SO}_3\text{R})_n$, donde $n=0-2$, y cada R es de modo independiente H o una carga negativa.

5 Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un trisacárido con la fórmula: $[\text{GalNAc4S-Ido-GalNAc}](\text{SO}_3\text{R})_n$, donde $n=0-3$; y/o uno o más trisacáridos con la fórmula: $[\text{GalNAc4S-GlcA-GalNAc}](\text{SO}_3\text{R})_m$, donde $m=0-2$, y donde cada R es de modo independiente H o una carga negativa. Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula: GlcA-GlcNAc . En determinadas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula: $[\text{GlcA-GalNAc}](\text{SO}_3\text{R})_m$, donde m es 0-2 (por ejemplo, para diagnosticar la acumulación de CS en MPS VII, o su gravedad). Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un trisacárido con la fórmula: $[\text{GlcNAc6S-Gal-GlcNAc}](\text{SO}_3\text{R})_m$, donde $n=0-2$, y donde cada R es de modo independiente H o una carga negativa. Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula: $[\text{Gal6S-GlcNAc}](\text{SO}_3\text{R})_n$, donde $n = 0-1$, y donde cada R es de modo independiente H o una carga negativa. Un proceso descrito en la presente comprende detectar o medir un disacárido con la fórmula: $[\text{Gal-GlcNAc}](\text{SO}_3\text{R})_n$, donde $n = 0-1$, y donde cada R es de modo independiente H o una carga negativa.

Un proceso descrito en la presente incluye un método de controlar el tratamiento de trastornos asociados con la degradación, biosíntesis y/o acumulación de glicosaminoglicanos anormal (GAGs), los métodos que comprenden:

- 20 a. después de la administración de un agente para tratar MPS a un individuo que lo necesita, generar un biomarcador que comprende uno o más oligosacáridos de extremos no reductores, donde el biomarcador es un oligosacárido saturado y se genera mediante el tratamiento de una población de glicosaminoglicanos, en o aislado de una muestra biológica del individuo, con al menos una glicosaminoglicano liasa de digestión, donde antes del tratamiento con liasa, tal biomarcador de oligosacárido no está presente en abundancia en muestras de individuos con acumulación de glicosaminoglicano anormal con respecto a los individuos con glicosaminoglicano normal;
- 25 b. usando un instrumento analítico para detectar la presencia de y/o medir la cantidad del biomarcador producido y mostrar o registrar la presencia de o una medición de la población del biomarcador.

Los aumentos o disminuciones de la cantidad del biomarcador medido (por ejemplo, en comparación con una muestra biológica previamente analizada de una manera similar o idéntica) se utilizan para controlar el tratamiento de trastornos asociados con la degradación, biosíntesis y/o acumulación de glicosaminoglicanos anormal.

Breve descripción de los dibujos

30 Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención con referencia a la siguiente descripción detallada que presenta realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos, de los cuales:

35 La Figura 1 ilustra la escisión del glicosaminoglicano (GAG) sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa (heparinasa II).

La Figura 2 ilustra la liberación de liasa de tres clases de di- y trisacáridos de normal de GAG y MPS normales. Los fragmentos de extremo no reductor (NRE) se usan como biomarcadores.

40 La Figura 3 ilustra varios residuos de oligosacáridos de GAG. La Figura 3A ilustra los fragmentos de sulfato de heparano que se acumulan en los pacientes con MPS II en consideración de solo las 3 modificaciones más comunes (N-, 2-O, y 6-O sulfatación). Incluso para un no sacárido relativamente pequeño ($n = 4$), hay más de 1.000 estructuras potenciales. Las Figuras 3A y 3B ilustran los biomarcadores de sulfato de heparano finales no reductores predichos para 7 clases de MPS.

La Figura 4 ilustra los oligosacáridos de la fórmula I.

La Figura 5 ilustra los oligosacáridos de la fórmula III.

45 La Figura 6 ilustra los oligosacáridos de la fórmula IV.

La Figura 7 ilustra los oligosacáridos de la fórmula V.

La Figura 8 ilustra los oligosacáridos de la fórmula VI.

La Figura 9 ilustra los oligosacáridos de la fórmula VII.

La Figura 10 ilustra los oligosacáridos de la fórmula VIII.

50 La Figura 11 ilustra los oligosacáridos de la fórmula IX.

- La Figura 12 ilustra los oligosacáridos de la fórmula X.
- La Figura 13 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XI.
- La Figura 14 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XII.
- La Figura 15 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XIII.
- 5 La Figura 16 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XIV.
- La Figura 17 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XV.
- La Figura 18 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XVIII.
- La Figura 19 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XIX.
- La Figura 20 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XX.
- 10 La Figura 21 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XXX.
- La Figura 22 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XXXI.
- La Figura 23 ilustra los oligosacáridos de la fórmula XXXII.
- La Figura 24 ilustra disacáridos aislados de sulfato de heparano de una muestra humana normal.
- La Figura 25 ilustra disacáridos aislados de una muestra de MPS I (deficiente en iduronidasa).
- 15 La Figura 26 ilustra la detección de oligosacáridos descritos en la presente en individuos que tienen un estado de enfermedad de MPS en comparación con los individuos que carecen un estado de enfermedad MPS.
- La Figura 27 ilustra los resultados de espectrometría de masa para oligosacáridos de extremos no reductores en una muestra no MPS.
- 20 La Figura 28 ilustra los resultados de espectrometría de masa para oligosacáridos de extremos no reductores en una muestra de MPS I.
- La Figura 29 ilustra los resultados de espectrometría de masa para oligosacáridos de extremos no reductores en una muestra de MPS II.
- La Figura 30 ilustra los resultados de espectrometría de masa para oligosacáridos de extremo no reductor en una muestra de MPS IIIA.
- 25 La Figura 31 ilustra los resultados de espectrometría de masa para oligosacáridos de extremos no reductores en una muestra de MPS IIIB.
- La Figura 32 ilustra los resultados de espectrometría de masa que muestran la acumulación de residuos de trisacárido de extremo no reductor de GAG en el hígado de un ratón con MPS IIIB.
- 30 La Figura 33 ilustra los resultados de espectrometría de masa que muestran la acumulación de residuos de trisacárido de extremo no reductor de GAG en el cerebro de un ratón con MPS IIIB.
- La Figura 34 ilustra los resultados de espectrometría de masa que muestran la acumulación de residuos de trisacárido de extremo no reductor de GAG en el riñón de un ratón con MPS IIIB.
- La Figura 35 ilustra la detección de la enfermedad de MPS en muestras de orina.
- La Figura 36 ilustra la detección de la enfermedad de MPS en muestras de suero.
- 35 La Figura 37 ilustra la detección de la enfermedad de MPS en muestras de CSF.
- La Figura 38 ilustra la detección de la enfermedad de MPS en muestras de tejido.
- La Figura 39 ilustra el control y la detección de la respuesta a la terapia en suero de pacientes MPS.
- La Figura 40 ilustra el control y la detección de la gravedad de la enfermedad de MPS.
- La Figura 41 ilustra el control y la detección de la respuesta diferencial a la terapia en el CSF de pacientes con MPS.
- 40 La Figura 42 ilustra el control y la detección de respuesta a la terapia en muestras de tejido de pacientes con MPS.
- La Figura 43 ilustra el control y la detección de la respuesta a la terapia en el suero de individuos que sufren de

MPS.

Las Figuras 43A, 43B y 43C ilustran el tratamiento de diferentes pacientes.

La Figura 44 ilustra la detección de portadores de la causa genética de MPS.

Descripción detallada de la invención

5 Si bien se han mostrado y descrito en la presente las realizaciones preferidas de la presente invención, será evidente para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solamente. En al actualidad numerosas variaciones, cambios y sustituciones se les ocurrirán a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Se debe entender que se pueden emplear diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en la presente invención para poner en práctica la invención. Se considera que las siguientes reivindicaciones definen el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes están cubiertos de este modo.

10 En determinadas realizaciones de la presente se proporcionan métodos analíticos para detectar y/o identificar sulfatos de heparano en la muestra biológica. En determinadas realizaciones, los sulfatos de heparano están presentes en las células dentro de una muestra biológica (por ejemplo, dentro de un lisosoma de esta), y/o están presentes en una muestra biológica libre de células. En determinadas realizaciones, en la presente se proporciona un método de diagnosticar un trastorno de MPS IIIB caracteriza por la acumulación de glicosaminoglicanos. En algunas realizaciones, la acumulación de glicosaminoglicanos es un efecto acumulativo primario. En ciertos casos, efectos acumulativos primarios incluyen la acumulación que es un resultado directo de un proceso de biosíntesis anormal, tales como producción anormal de enzimas involucradas en la vía biosintética de los glicanos (por ejemplo, subproducción o producción de enzimas que funcionan mal), que incluye biosíntesis de glicanos o despolimerización. En otras realizaciones, la acumulación de glicosaminoglicanos es un efecto acumulativo secundario. En determinadas realizaciones, un efecto acumulativo secundario resulta de un efecto en cascada, por ejemplo, la acumulación de otros componentes, tales como GAGs u otros glicanos, tales como glicolípidos, que hace que la vía biosintética de GAG sea obstaculizada o interrumpida.

25 En determinadas realizaciones, el glicosaminoglicano de la invención es, sulfato de heparano, En determinadas realizaciones, se proporciona un método analítico en la presente que comprende tratar una muestra biológica que comprende los glicosaminoglicanos de la invención con al menos un agente adecuado para escindir los enlaces entre los residuos de sacárido de los glicosaminoglicanos. En la presente invención el al menos un agente comprende heparina liasa I, heparina liasa II y heparina liasa. En algunas realizaciones, la liasa se utiliza para transformar una porción representativa de los sulfatos de heparano en uno o más trisacáridos de acuerdo con la fórmula V, VI y XVI.

35 Las liasas descritas en la presente incluyen, a modo de ejemplo no limitante, Hialuronato liasa, Pectato liasa, Poli(beta-D-manuronate) liasa, Condroitina ABC liasa, Condroitina AC liasa, Oligogalacturónido liasa, Heparina liasa, Heparina-sulfato liasa, Pectato disacárido-liasa, Pectina liasa, Poli(alfa-L-guluronato) liasa, Xantano liasa, Exo-(1->4)-alfa-D-glucan liasa, Glucuronano liasa, Anhidrosialidasa, Levano fructotransferasa, Inulina fructotransferasa, Condroitin B liasa. En ciertos casos, la Hialuronate liasa (EC 4.2.2.1) es una enzima que cataliza la escisión o las cadenas de hialuronato en un enlace beta-D-GalNAc-(1->4)-beta-D-GlcA, finalmente descompone el polisacárido a 3-(4-desoxi-beta-D-gluc-4-enuronosil)-N-acetil-D-glucosamina. En algunos casos, la Pectato liasa (EC 4.2.2.2) es una enzima que cataliza la escisión eliminativa de (1->4)-alfa-D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. En ciertos casos, la Poli(beta-D-manuronato) liasa (EC 4.2.2.3) es una enzima que cataliza la escisión eliminativa de polisacáridos que contienen residuos de beta-D-manuronato para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-L-eritro-hex-4-enopiranuronosilo en sus extremos. En algunos casos, la Condroitina ABC liasa (EC 4.2.2.4) es una enzima que cataliza la degradación eliminativa de polisacáridos que contienen uniones 1,4-beta-D-hexosaminilo y 1,3-beta-D-glucuronosilo a los disacáridos que contienen grupos 4-desoxi-beta-D-gluc-4-enuronosili. En algunos casos, la Condroitina ABC liasa (EC 4.2.2.4) también cataliza la escisión eliminativa de dermatan sulfato que contiene uniones 1,4-beta-D-hexosaminilo y 1,3-beta-D-glucuronosilo o 1,3-alfa-L-iduronosilo a los disacáridos que contienen grupos 4-desoxi-beta-D-gluc-4-enuronosilo para producir un disacárido dermatan sulfato 4,5-insaturado (deltaUA-GalNAc-4S). En ciertos casos, la Condroitina AC liasa (EC 4.2.2.5) es una enzima que cataliza la degradación eliminativa de polisacáridos que contienen uniones 1,4-beta-D-hexosaminilo y 1,3-beta-D-glucuronosilo a los disacáridos que contienen grupos 4-desoxi-beta-D-gluc-4-enuronosilo. En algunos casos, la Oligogalacturónido liasa (EC 4.2.2.6) es una enzima que cataliza la escisión de 4-(4-desoxi-beta-D-gluc-4-enuronosil)-D-galacturonato en 2,5-dehidro-4-desoxi-D-glucuronato. En ciertos casos, la Heparina liasa (EC 4.2.2.7) es una enzima que cataliza la escisión eliminativa de polisacáridos que contienen residuos de D-glucuronato o L-iduronato 1,4-ligados y residuos de 2-sulfoamino-2-desoxi-6-sulfo-D-glucosa 1,4-alfa-ligados para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-D-gluc-4-enuronosilo terminales en sus extremos no reductores. En algunos casos, la Heparina liasa (EC 4.2.2.7) tolera la sulfatación alternativa del sustrato. En algunos casos, la Heparina sulfato liasa (EC 4.2.2.8) es una enzima que cataliza la escisión eliminativa de polisacáridos que contienen residuos de D-glucuronato o L-iduronato 1,4-ligados y residuos de 2-sulfoamino-2-desoxi-6-sulfo-D-glucosa 1,4-alfa-ligados para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-D-gluc-4-enuronosilo terminales en sus extremos no reductores. En algunos casos, la Heparina-sulfato liasa (EC

4.2.2.8) tolera la sulfatación alternativa del sustrato. En ciertos casos, la Pectato disacárido-liasa (EC 4.2.2.9) es una enzima que cataliza la escisión eliminativa de 4-(4-desoxi-alfa-D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato del extremo reductor del pectato, es decir, pectina desesterificada. En algunos casos, la Pectina liasa (EC 4.2.2.10) es una enzima que cataliza la escisión eliminativa de (1->4)-alfa-D-galacturonano metil éster para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-6-O-metil-alfa-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. En ciertos casos, la Poli(alfa-L-guluronato) liasa (EC 4.2.2.11) es una enzima que cataliza la escisión eliminativa de polisacáridos que contienen un grupo alfa-L-guluronato terminal para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-L-eritro-hex-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. En algunos casos, la Xantano liasa (EC 4.2.2.12) es una enzima que cataliza la escisión del enlace beta-D-manosil-beta-D-1,4-glucuronosilo en el polisacárido xantano. En ciertos casos, la Exo-(1->4)-alfa-D-glucan liasa (E.C. 4.2.2.13) es una enzima que cataliza la degradación secuencial de (1->4)-alfa-D-glucanos del extremo no reductor con la liberación de 1,5-anhidro-D-fructosa. En algunos casos, la Glucuronano liasa (EC 4.2.2.14) es una enzima que cataliza la escisión eliminativa de (1->4)-beta-D-glucuronanos. Esto produce oligosacáridos con grupos 4-desoxi-beta-D-gluc-4-enuronosilo en sus extremos no reductores, o si el sustrato se degrada completamente, los glucuronanos producen tetrasacáridos. En ciertos casos, la Anhidrosialidasa (EC 4.2.2.15) es una enzima que cataliza la eliminación de grupos alfa-sialilo en glicósidos de ácido N-acetilneuramínico, que liberan 2,7-anhidro-alfa-Nacetilneuraminato. En algunos casos, la Levan fructotransferasa (formación de DFA-IV) (EC 4.2.2.16) es una enzima que produce 2,6':2',6-dianhídrido di-beta-D-fructofuranosa (DFA IV) mediante la eliminación sucesiva de la cadena decreciente (2->6)-beta-D-fructan (levan) del disacárido D-fructosil-D-fructosilo terminal. En ciertos casos, la Inulina fructotransferasa (formación de DFA-I) (EC 4.2.2.17) es una enzima que produce alfa-D-fructofuranosa beta-D-fructofuranosa 1,2':2',1'-dianhídrido (DFA I) mediante la eliminación sucesiva de la cadena decreciente (2->1)-beta-D-fructan (inulina) del disacárido D-fructosil-D-fructosilo terminal. En algunos casos, la Inulina fructotransferasa (formación de DFA-III) (EC 4.2.2.18) es una enzima que produce alfa-D-fructofuranosa beta-D-fructofuranosa 1,2':2,3'-dianhídrido (DFA III) mediante la eliminación sucesiva de la cadena decreciente de (2->1)-beta-D-fructano (inulina) del disacárido D-fructosil-D-fructosilo terminal.

En ciertos casos, la Chondroitin B liasa (EC 4.2.2.19) es una enzima que cataliza la escisión eliminativa de dermatan sulfato que contiene uniones 1,4-beta-D-hexosaminilo y 1,3-beta-D-glucuronosilo o 1,3-alfa-L-iduronosilo a los disacáridos que contienen grupos 4-desoxibeta-D-gluc-4-enuronosilo para producir un disacárido dermatan sulfato 4,5-insaturado (deltaUA-GalNAc-4S). También se utiliza opcionalmente cualquier otra enzima adecuada. Por ejemplo, se puede usar cualquier queratanasa, por ejemplo, aislada de bacterias o desarrollada/diseñada a partir de una liasa relacionada.

Las muestras biológicas adecuadas para el análisis de acuerdo con los métodos y procesos descritos en la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitante, sangre, suero, orina, cabello, saliva, piel, tejido, plasma, líquido cefalorraquídeo (CSF), líquido amniótico, aspirado de pezón, esputo, heces, líquido sinovial, uñas, similares. En realizaciones específicas, En específicas, las muestras biológicas adecuadas para el análisis de acuerdo con los métodos y procesos descritos en la presente incluyen, a modo de ejemplo no limitante, orina, suero, plasma, o CSF. En determinadas realizaciones, el proceso de la invención comprende proporcionar a partir del individuo, una muestra biológica de prueba que comprende glicosaminoglicanos. En algunas realizaciones, la provisión de una muestra biológica de prueba de un individuo incluye obtener la muestra del individuo u obtener la muestra de otra fuente (por ejemplo, de un técnico o institución que obtuvo la muestra del individuo). En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, cualquier tejido o célula (por ejemplo, orina, suero, plasma, o CSF) de un individuo. En determinadas realizaciones, el tejido y/o la célula de la que se recuperan los GAG se obtiene del tejido o células del hígado, células o tejido cerebral o células o tejido renal, o similares.

La Figura 1 ilustra la escisión del glicosaminoglicano (GAG) sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa (heparinasa II). Como se ilustra, en ciertos casos, la escisión interna de los glicosaminoglicanos con glicosaminoglicano liasas proporciona oligosacáridos con insaturación carbono-carbono entre los carbonos C4 y C5 del extremo no reductor del oligosacárido producido (es decir, el oligosacárido recién creado). En algunas realizaciones, el uno o más oligosacárido detectado y/o medido de acuerdo con un método descrito en la presente es uno o más trisacáridos de acuerdo con la fórmula V, VI y XVI que está compuesto de tres residuos de sacárido que formaban los tres residuos de sacárido de un glicosaminoglicano (GAG) antes del tratamiento con el uno o más glicosaminoglicano (GAG) liasa.

En determinadas realizaciones, los métodos analíticos provistos en la presente también comprenden métodos de purificación. En determinadas realizaciones, los métodos de purificación se realizan antes del tratamiento de una muestra biológica con la liasa, como se describe en la presente. En algunas realizaciones, los métodos de purificación se realizan después de tratar una muestra biológica con la liasa, como se describe en la presente. En determinadas realizaciones, los métodos de purificación se utilizan antes y después de tratar una muestra biológica con la liasa, como se describe en la presente. En algunas realizaciones, los métodos de purificación incluyen purificar uno o más sulfatos de heparano y/o uno o más trisacáridos de otros componentes (por ejemplo, células, partes de células, otros polisacáridos, o similares) de la muestra biológica.

En ciertos casos los GAGs provistos en una muestra biológica están presentes en los lisosomas de las células. En algunas realizaciones, cualquier proceso descrito en la presente incluye lisar una muestra biológica para liberar los GAGs de las células de esta. Los GAGs son sulfatos de heparano.

Diagnóstico

En algunas realizaciones de la presente se proporciona un proceso para diagnosticar la presencia de un trastorno MPS IIIB en un individuo, el proceso que comprende la etapa de: detectar la presencia de y/o medir la cantidad de una población de uno o más de los trisacáridos de la invención presentes en una muestra biológica transformada (por ejemplo, orina, suero, plasma, o CSF). En determinadas realizaciones, el proceso para diagnosticar la presencia de un trastorno MPS IIIB en un individuo es un proceso de diagnosticar el individuo como un individuo que sufre de, es homocigota para o sintomático para tal trastorno. En otras realizaciones, el proceso para diagnosticar la presencia de un trastorno MPS IIIB en un individuo es un proceso de diagnosticar el individuo como un individuo que sufre de tal trastorno como un portador para, o heterocigotas para, tal trastorno. En algunas realizaciones, los individuos que son portadores para, o heterocigotas para, tal trastorno tiene un nivel elevado de acumulación de glicosaminoglicanos (por ejemplo, cuando se compara con un individuo normal), pero el nivel elevado es menor que un individuo diagnosticado con el trastorno. En determinadas realizaciones, los individuos que son portadores para, o heterocigotas para, tal trastorno tiene un nivel elevado de acumulación de glicosaminoglicanos (por ejemplo, cuando se compara con un individuo normal), pero son asintomáticos (que incluyen sustancialmente asintomático) para un trastorno MPS IIIB. Los portadores e individuos que tienen un trastorno MPS IIIB se identifican usando cualquier procedimiento apropiado. Por ejemplo, en determinadas realizaciones los portadores o especímenes de portadores se pueden identificar como acumuladores, 2-100 veces más GAG que un espécimen no portador o tipo salvaje. De manera similar, en algunos ejemplos de realizaciones, los individuos que son sintomáticos o tienen un estado de enfermedad de acumulación de GAG acumulan más de 2 veces más (por ejemplo, 2 - 100x) GAG, que un portador. En algunas realizaciones, el diagnóstico de uno o más progenitores portadores se utiliza opcionalmente para realizar una evaluación del riesgo de progeñe (por ejemplo, la probabilidad de que un niño sea portador para tener un estado de enfermedad). El GAG es sulfato de heparano.

En algunas realizaciones, en la presente se proporciona un proceso para diagnosticar un trastorno MPS III en un individuo, el proceso que comprende la etapa de: usar un instrumento analítico para detectar la presencia de y/o medir la cantidad de una población de uno o más de los trisacáridos de la invención presentes en una muestra biológica transformada que se ha preparado mediante el tratamiento de una población de sulfatos de heparano en o aislado de una muestra biológica del individuo, con al menos una heparina liasa I, II o III para transformar los sulfatos de heparano en la población del uno o más de los trisacáridos, En realizaciones específicas, el trisacárido detectado o medido es uno o más extremos no reductores C4-C5 saturado.

En algunas realizaciones, en la presente se proporciona un proceso para diagnosticar un individuo como portador de un gen que causa un trastorno MPS IIIB en un individuo, o un trastorno de este, el proceso que comprende la etapa de:

uso de un instrumento analítico para detectar la presencia de y/o medir la cantidad de una población de uno o más de los trisacáridos de la invención en una muestra biológica transformada que se ha preparado mediante el tratamiento de una población de sulfatos de heparano; en o aislados de una muestra biológica del individuo, con al menos una heparina liasa I, II o III para transformar los sulfatos de heparano en la población de uno o más trisacáridos. En ciertos casos, tal proceso implica la determinación de la gravedad de un trastorno MPS IIIB donde dicha acumulación está por debajo de cierto umbral (por ejemplo, un nivel predeterminado, un nivel por el cual el individuo se convierte en sintomático, o similares). En realizaciones específicas, los trisacáridos detectados o medidos son uno o más trisacáridos saturados de extremo no reductor C4-C5.

En algunas realizaciones, en la presente se proporciona un proceso para diagnosticar un trastorno MPS IIIB en un lactante humano (por ejemplo, un recién nacido) o feto, el proceso que comprende la etapa de: usar un instrumento analítico para detectar la presencia de y/o medir la cantidad de una población de uno o más de los trisacáridos presentes en una muestra biológica transformada que se ha preparado mediante el tratamiento de una población de sulfatos de heparano en o aislados de una muestra biológica del individuo, con al menos una heparina liasa I, II o III para transformar los sulfatos de heparano en la población del uno o más trisacáridos. En realizaciones específicas, los trisacáridos detectados o medido son uno o más trisacáridos saturados de extremo no reductor C4-C5.

En realizaciones adicionales, cualquiera de los procesos descritos en la presente también comprenden la etapa de mostrar o registrar la presencia de o una medición de una población de trisacáridos de acuerdo con la fórmula (V), (VI), y (XVI). La pantalla puede estar en la pantalla de computadora o una impresión de papel. El registro puede ser en un disco legible por computadora (por ejemplo, un disco duro, CD, DVD, dispositivo de memoria portátil, tal como un dispositivo CF o dispositivo SD, etc.), una hoja de papel, o similares.

En algunas realizaciones, la muestra biológica transformada se prepara mediante el tratamiento de una población de sulfatos de heparano, los sulfatos de heparano están presentes en o se aíslan de una muestra biológica (por ejemplo, orina, suero, plasma, o CSF) de un individuo. En determinadas realizaciones, los sulfatos de heparano se tratan con al menos un agente adecuado para escindir los enlaces entre los residuos de sacáridos de los sulfatos de heparano, donde el agente es heparina liasa I, II y III. En algunas realizaciones, un proceso descrito en la presente comprende sulfatos de heparano que transforman una muestra biológica mediante el tratamiento de una población de sulfatos de heparano, los sulfatos de heparano están presentes en o se aíslan de una muestra biológica de un individuo. En determinadas realizaciones, los sulfatos de heparano se tratan con el agente adecuado anterior para

escindir los enlaces entre los residuos de sacárido de sulfatos de heparano. En realizaciones específicas, el tratamiento de una muestra biológica que comprende sulfatos de heparano con el agente adecuado anterior para escindir los enlaces entre los residuos de sacáridos de sulfatos de heparano comprende tratar la muestra biológica con uno o más [...]. En determinadas realizaciones, el tratamiento de los sulfatos de heparano en la población del uno o más [...].

Como se describe en la presente, la acumulación de glicosaminoglicanos anormal comprende acumulación de condroitin sulfato anormal, acumulación de queratan sulfato anormal, acumulación de hialuronano anormal, acumulación de dermatan sulfato anormal o una de sus combinaciones. Los trastornos asociados con la acumulación de glicosaminoglicanos anormal incluyen enfermedades de almacenamiento lisosomal, tal como, a modo de ejemplo no limitante, mucopolisacaridosis (MPS) (por ejemplo, MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIC, MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI, MPS VII, MPS IX, o similares). En algunas realizaciones, el proceso de diagnosticar la identidad de o la gravedad de un trastorno asociado con la acumulación de glicosaminoglicanos que lleva a un trastorno MPS IIIB. Como se describe en la presente, el proceso de diagnosticar la identidad de o la gravedad de un trastorno asociado con la acumulación de glicosaminoglicanos es un trastorno asociado con acumulación de dermatan sulfato anormal (por ejemplo, en algunos casos, MPS I, MPS II, MPS VI, o similares). Como se describe en la presente, el proceso de diagnosticar la identidad de o la gravedad de un trastorno asociado con la acumulación de glicosaminoglicanos es un trastorno asociado con acumulación de condroitin sulfato anormal (por ejemplo, en algunos casos, MPS VI, MPS VII, o similares). Como se describe en la presente, el proceso de diagnosticar la identidad de o la gravedad de un trastorno asociado con la acumulación de glicosaminoglicanos es un trastorno asociado con acumulación de glicosaminoglicanos es un trastorno asociado con acumulación de queratan sulfato anormal (por ejemplo, en algunos casos, MPS IVA, MPS IVB, o similares). Como se describe en la presente, el proceso de diagnosticar la identidad de o la gravedad de un trastorno asociado con la acumulación de glicosaminoglicanos es un trastorno asociado con acumulación de hialuronano anormal (por ejemplo, en algunos casos, MPS VII, MPS IX, o similares). En algunas realizaciones, los oligosacáridos proporcionados mediante el tratamiento del glicosaminoglicano con una glicosaminoglicano liasa adecuada se utilizan en procesos descritos en la presente para diagnosticar la identidad de y/o medir la gravedad de un trastorno asociado con la acumulación anormal de glicosaminoglicano particular. Los oligosacáridos específicos proporcionados mediante el tratamiento varios glicosaminoglicanos con glicosaminoglicano liasas se proporcionan en la presente en la sección de oligosacáridos.

Como también se describe en la presente, los métodos de diagnóstico descritos en la presente (u otro método descrito en la presente) son adecuados para diagnosticar (o medir la eficacia de un tratamiento de) un trastorno en un individuo involucrado con acumulación de glicano (por ejemplo, GAG) o cualquier trastorno involucrado con síntesis y degradación de GAG alteradas (por ejemplo, cualquier trastorno que proporciona un GAG único o población de GAG que se puede detectar por un proceso descrito en la presente). Tal enfermedad incluye la enfermedad de Alzheimer donde los GAG están presentes en las placas, y una muestra biológica se toma de la placa y se analiza de acuerdo con un proceso descrito en la presente. En otras realizaciones, tal enfermedad incluye cáncer.

En algunas realizaciones, los oligosacáridos específicos se detectan y/o miden de acuerdo con los métodos y/o procesos descritos en la presente para diagnosticar la identidad y/o gravedad de un trastorno específico asociado con la acumulación de glicosaminoglicanos. En algunas realizaciones, tales oligosacáridos se describen en la presente. En realizaciones específicas, un proceso para diagnosticar la identidad o gravedad de un trastorno asociado con la acumulación de glicosaminoglicanos provista en la presente comprende detectar y/o medir uno o más oligosacáridos expuestos en las fórmulas V, VI y XV. En determinadas realizaciones, los uno o más oligosacáridos detectados y/o medidos están libres de insaturación carbono-carbono. En algunas realizaciones, los uno o más oligosacáridos detectados y/o medidos están libres de insaturación de carbono C4 y C5 en el residuo sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido. En algunas realizaciones, el oligosacárido de cualquiera de las fórmulas V, VI y XVI es un trisacárido compuesto de tres residuos de sacárido que formaban los dos o tres residuos de sacárido originales de un glicosaminoglicano (GAG) antes del tratamiento con la una o más glicosaminoglicano (GAG) liasa. En ciertos casos, la cantidad de trisacárido de cualquiera de las fórmulas V, VI y XVI libres de carbono-carbono de extremo no reductor (por ejemplo, C4/C5) es representativa de la cantidad de glicosaminoglicanos acumulados que comprenden el mismo trisacárido como residuo de esto, en su extremo no reductor.

En ciertos casos, un método de diagnóstico descrito en la presente es útil para analizar las varias clases diferentes de MPS. En algunos casos, la acumulación de GAG proporciona una población única de GAG de acuerdo con la clase de MPS específica. En el caso específico, la población única de GAGs se puede identificar como correlacionada con una clase de MPS específica mediante la detección y/o medición de oligosacáridos en una muestra tomada de un individuo diagnosticado con o sospechado de tener un trastorno de MPS, los oligosacáridos están libres de insaturación de carbono C4 y C5 en el residuo de sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido. En ciertos casos, los oligosacáridos se digieren con una enzima adecuada, tal como una liasa (por ejemplo, una liasa bacteriana o heparina liasa) antes de la detección/medición y se detecta/mide el oligosacárido resultante (en ciertos casos más cortos que el oligosacárido de la muestra, tal como di- o trisacáridos). En ciertos casos, las enzimas de degradación (por ejemplo, heparina liasa) actúan por medio de mecanismo de eliminación que introduce un enlace insaturado en el extremo no reductor recién generado; mientras que los extremos no reductores preexistentes retienen su masa completa (por ejemplo, estos extremos no reductores están libres en la presente de la insaturación de carbono C4 y C5). En consecuencia, como se describe en la presente, los

oligosacáridos digeridos que comprenden extremos no reductores que están libres de insaturación de carbono C4 y C5 son representativos del número total de oligosacáridos presentes en la composición de muestra original. En ciertos casos, el mecanismo de digestión (por ejemplo, con una heparina liasa) marca efectivamente los extremos preexistentes para permitir su identificación por su masa única (por ejemplo, son 18 Dalton mayor que los otros oligosacáridos proporcionados por residuos de oligosacáridos internos). En algunos casos, la identificación de estos extremos no reductores preexistentes son biomarcadores excelentes porque, por ejemplo, en ciertos casos (1) son homogéneos dentro de una clase MPS (por ejemplo, en ciertos casos para MPS II, todos terminan en ácido urónico 2-O-sulfatado); (2) hay muchos más extremos no reductores en GAGs de individuos que sufren de MPS que en individuos no MPS); y/ o (3) en individuos que no son MPS, los residuos sacáridos de extremos no reductores son heterogéneos (ver, por ejemplo, la Figura 2). La Figura 3A ilustra el gran número de residuos de oligosacáridos encontrados dentro de GAG y las Figuras 3B y 3C resumen los residuos de oligosacáridos de sulfato de heparano de extremos no reductores predichos, (por ejemplo, los biomarcadores) para 7 clases de MPS. Como se describe en la presente, uno o más de estos oligosacáridos se detectan y/o miden en un método de diagnóstico de un individuo que sufre de la clase de MPS específica descrita. Como se describe en la presente, los biomarcadores adicionales para estas clases de MPS que se originan de condroitina y dermatan también se pueden analizar utilizando el mismo método. El mismo enfoque (usando condroitinasa, queratanasa y hialuronidasas) se proporciona en determinadas realizaciones para otras clases de MPS que acumulan CS, DS, KS y/o HA.

Como se describe en la presente, un proceso para diagnosticar la identidad o gravedad de un trastorno asociado con la acumulación de glicosaminoglicanos descritos en la presente comprende detectar y/o medir uno o más oligosacáridos expuestos en las fórmulas XXI-XXIX o en cualquiera de las Figuras descritas en la presente. Como se describe en la presente, los uno o más oligosacáridos detectados y/o medidos comprenden al menos un punto de insaturación carbono-carbono. Como se describe en la presente, los uno o más oligosacáridos detectados y/o medidos comprenden insaturación de carbono C4 y C5 en el residuo de sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido.

En determinadas realizaciones, los procesos descritos en la presente, que incluyen procesos diagnósticos, incluyen preparar una muestra biológica transformada mediante la purificación de una población de trisacáridos de la invención en una muestra biológica que se ha tratado con uno o más heparina liasa), la muestra biológica transformada que comprende la población aislada de los trisacáridos. En algunas realizaciones, glicosaminoglicanos de la muestra biológica de un individuo se purifican antes del tratamiento con la una o más glicosaminoglicano liasa.

En algunas realizaciones, un proceso diagnóstico (que incluye identidad o gravedad diagnóstica) provisto en la presente comprende comparar una detección o medición de acuerdo con el proceso con una lectura de control. En algunas realizaciones, la comparación con un control comprende comparar la cantidad de la población de uno o más oligosacáridos presentes en la muestra biológica transformada con una cantidad de una población del uno o más oligosacárido presente en una muestra biológica control que se ha tratado de una manera sustancialmente similar a la muestra biológica transformada. En realizaciones específicas, la muestra biológica control se proporcionó a partir de un individuo que no tiene un trastorno de MPS IIIB. En realizaciones específicas, la muestra biológica control se proporcionó de un individuo que tiene un trastorno de MPS IIIB.

En algunas realizaciones, la detección de la presencia o medición de la cantidad de una población de uno o más de los trisacáridos de la invención presentes en una biológica transformada de acuerdo con un proceso descrito en la presente:

a. aislar una subpoblación de uno o más de los trisacáridos en la muestra biológica transformada (por ejemplo, una muestra de orina, suero, plasma, o CSF transformada); y

b. detectar la presencia de y/o medir la cantidad de uno o más de los trisacáridos presentes en la subpoblación.

El aislamiento de la subpoblación de uno o más de los trisacáridos en la muestra biológica transformada se obtiene de cualquier manera adecuada, por ejemplo, usando un proceso de purificación descrito en la presente (por ejemplo, cromatografía, electroforesis, filtración, centrifugación, etc). De manera similar, de acuerdo con cualquier proceso descrito en la presente, la detección y/o la medición de la presencia de uno o más trisacáridos se obtiene usando cualquier proceso adecuado, que incluyen los procesos de detección expuestos en la presente (por ejemplo, espectrometría, espectrometría UV visible, espectrometría IR, espectrometría de RMN, espectrometría de masas, o similares). En casos específicos, antes de detectar y/o medir los trisacáridos presentes, cualquier proceso descrito en la presente comprende además marcar el extremo reductor de una porción representativa de uno o más trisacáridos en la muestra biológica transformada con cualquier marca detectable adecuada (por ejemplo, un marcador de masa, una marca de radio, una marca fluorescente, una marca de cromóforo, una marca de afinidad, etc).

En determinadas realizaciones, la detección de la presencia y/o la medición de la cantidad de trisacáridos de la invención se realiza utilizando un instrumento analítico. En realizaciones específicas, el dispositivo analítico comprende un espectrómetro que detecta y/o mide la cantidad de una marca detectable. En determinadas realizaciones específicas, la detección y/o la medición de cantidades de una marca detectable sirven como un sustituto para la presencia o cantidades de GAG presentes. En realizaciones más específicas, el espectrómetro

5 incluye, a modo de ejemplo no limitante, uno o más de un espectrómetro de masas, un espectrómetro de resonancia magnética nuclear, un espectrómetro UV-Vis, un espectrómetro IR, un fluorímetro, un fosforímetro, un espectrómetro de radiación, o similares. En determinadas realizaciones, el dispositivo analítico comprende un dispositivo de purificación acoplado a un detector o un dispositivo de medición (por ejemplo, un sistema de HPLC acoplado a un espectrómetro UV-Vis). En determinadas realizaciones, un dispositivo analítico es un espectrómetro de masa de cromatografía líquida (LC-MS) que detecta y/o mide la masa de un oligosacárido.

10 En algunas realizaciones, se visualiza o se registra la presencia detectada y/o la medición de la población de los trisacáridos de la invención. En algunas realizaciones, el proceso comprende mostrar o registrar los resultados de la caracterización. En determinadas realizaciones, los resultados se muestran en un monitor de pantalla (por ejemplo, un monitor de computadora, televisión, PDA, o similar), o impreso. En algunas realizaciones, los resultados se registran en un medio electrónico (por ejemplo, una unidad de disco duro, unidad de almacenamiento magnético, unidad de almacenamiento óptico o similar, un disco tal como un disquete, CD, DVD, BLU-ray o similar, una unidad de memoria flash, una unidad extraíble o similar).

15 En determinadas realizaciones, el individuo es un mamífero, por ejemplo, un ser humano. En algunas realizaciones, el ser humano es un recién nacido. En determinadas realizaciones, el ser humano es un embrión in utero. En algunas realizaciones, el ser humano se ha diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosomal. En algunas realizaciones, se sospecha que el ser humano sufre de una enfermedad de almacenamiento lisosomal.

Muestras analíticas

20 En determinadas realizaciones en la presente se proporcionan composiciones que comprenden cualquiera o más de los trisacáridos de la invención provistos en la presente. En algunas realizaciones, la composición en la presente se proporciona una muestra analítica, análisis adecuado en cualquier dispositivo analítico, por ejemplo, uno proporcionado en la presente (tal como, a modo de ejemplo no limitante, cromatografía líquida de alto rendimiento, espectrometría de masa, cromatografía de gases, o similares).




25 En determinadas realizaciones, una composición proporcionada en la presente comprende al menos uno de los trisacáridos de una muestra biológica transformada de un individuo con un trastorno asociado con un trastorno MPS IIIB. En realizaciones específicas, la muestra biológica transformada se preparó por tratamiento de una muestra biológica que comprende sulfatos de heparano con uno o más heparina liasa I, II o III.


30 En algunas realizaciones, una muestra analítica provista en la presente comprende uno o más oligosacáridos de cualquiera de las fórmulas V, VI o XVI. En determinadas realizaciones, el uno o más oligosacáridos también comprenden una marca detectable unida (por ejemplo, en forma covalente y/o no covalente) en el extremo reductor del uno o más oligosacáridos.


35 También se describe en la presente una composición que comprende glicanos aislados, en donde los glicanos se aislaron a partir de una muestra biológica, y una o más como enzima de degradación de glicano. Como se describe en la presente, la composición también comprende uno o más biomarcadores generados de acuerdo con cualquier método descrito en la presente (por ejemplo, en el que el biomarcador es un oligosacárido saturado no reductor). Como se describe en la presente, se proporciona en la presente un oligosacárido (por ejemplo, un oligosacárido saturado no reductor marcado o no marcado) y un instrumento analítico o resina cromatográfica.



Oligosacáridos



40 En determinadas realizaciones, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir uno o más biomarcadores descritos en la presente.

Como se usa en la presente, IdoA y  son residuos de sacárido de ácido idurónico (por ejemplo, ácido α-L-idurónico). Como se usa en la presente, GlcA y  son residuos de sacárido de ácido glucurónico (por ejemplo, ácido β-L-glucurónico. Como se usa en la presente,  es un residuo de sacárido de ácido idurónico (por ejemplo, ácido α-L-idurónico) o un residuo de sacárido de ácido glucurónico (por ejemplo, ácido β-L-glucurónico. Como se


usa en la presente, GlcN y  son residuos de sacárido de glucosamina (por ejemplo, 2-desoxi-2-amino-β-D-

glucopiranosilo). Como se usa en la presente, GlcN(Ac)₁ y  son un residuo de sacárido de glucosamina (por ejemplo, 2-desoxi-2-amino-β-D-glucopiranosilo) donde el grupo 2-amino está acetilado. Como se usa en la presente,

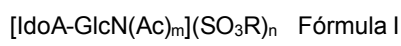
Gal y  es un residuo de sacárido de galactosa. Como se usa en la presente GalNAc y  representa un

residuo de N-acetilgalactosamina. Como se usa en la presente **NS** y **NS**   ambos representan glucosamina

N-sulfatada (esto es, N-sustituida con SO₃R como se describe en esta memoria) (por ejemplo, 2-desoxi-2-amino-β-D-glucopiranosilo). En varios casos específicos, los residuos de sacárido ácido idurónico, ácido glucurónico, glucosamina y/o galactosa están saturados en 4 y 5 carbonos del residuo de sacárido de extremo no reductor o están libres de insaturación carbono-carbono. En otros casos, uno o más de los residuos de sacárido es insaturado, por ejemplo, en las posiciones del carbono 4 y 5 del residuo de sacárido en el extremo no reductor de un oligosacárido proporcionado en la presente. La nomenclatura simbólica usada en la presente sigue la "Nomenclatura de símbolos y texto para la representación de la estructura de glicanos" promulgada por el Consortium for Functional Glycomics, según lo enmendado en octubre de 2007. La mención de un NS (por ejemplo, por encima o por debajo de cualquiera de estructuras mencionadas anteriormente) indica que el grupo amino del mismo está sustituido con

(SO₃R). Si el NS está asociado con GlcN(Ac)_m o por encima o por debajo de , el residuo es GlcN(SO₃R), donde el grupo amino porta el (SO₃R). La mención de un 2S (por ejemplo, por encima o por debajo de cualquiera de las estructuras mencionadas anteriormente) indica que el grupo hidroxilo en la posición dos de carbono del residuo de sacárido indicado está sustituido con (SO₃R). La mención de un 3S (por ejemplo, por encima o debajo de cualquiera de las estructuras mencionadas anteriormente) indica que el grupo hidroxilo en la posición tres de carbono del residuo de sacárido indicado está sustituido con (SO₃R). La mención de un 4S (por ejemplo, por encima o debajo de cualquiera de las estructuras mencionadas anteriormente) indica que el grupo hidroxilo en la posición de cuatro de carbono del residuo de sacárido indicado está sustituido con (SO₃R). La mención de un 6S (por ejemplo, por encima o debajo de cualquiera de las estructuras mencionadas anteriormente) indica que el grupo hidroxilo en la posición seis de carbono del residuo de sacárido indicado está sustituido con (SO₃R).

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (disacárido) que tiene la fórmula:



Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, a son disacáridos de la fórmula I, donde m es 0-1, y n es 0-3. Como se describe en la presente, cada R es de modo independiente H o una carga negativa. El disacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un disacárido de la fórmula I tiene una estructura de IdoA-GlcNAc, IdoA-GlcNS, IdoA-GlcNS6S, IdoA2S-GlcNAc, IdoA2SGlcNS, IdoA2S-GlcNAc6S, IdoA2S-GlcNS6S o como se expone en cualquiera de las fórmulas I-A a I-G, como se expone en la Figura 4. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas I-A a I-G se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

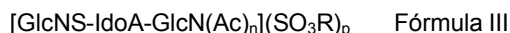
Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de las fórmulas I-A a I-C se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS I. Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de las fórmulas I-D a I-G se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS II.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:



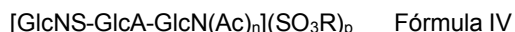
Como se describe en la presente los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula II, donde IdoA/GlcA es IdoA o GlcA, m es 0-1, n es 0-1, y p es 0-5. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con p grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada.

Como se describe en la presente, un compuesto de la fórmula II tiene una estructura expuesta en la fórmula III



5 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula III, donde n es 0-1, y p es 0-3. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con p grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un trisacárido de la fórmula III tiene una estructura de GlcNS-IdoA-GlcNAc, GlcNS-IdoA2SGlcNAc, GlcNS-IdoA-GlcNS, GlcNS-IdoA2S-GlcNS, GlcNS-IdoA-GlcNAc6S, GlcNS-IdoA2S-GlcNAc6S, GlcNS-IdoA-GlcNS6S, GlcNS-IdoA2S-GlcNS6S, o como se expone en cualquiera de los trisacáridos de la Figura 5. En ciertos casos, los compuestos de Fórmulas III-A a III-H se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

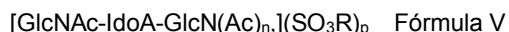
10 Como se describe en la presente, un compuesto de la fórmula II tiene una estructura que se expone en la fórmula IV:



15 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula IV, donde n es 0-1, y p es 0-2. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con p grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un trisacárido de la fórmula IV tiene una estructura de GlcNS-GlcA-GlcNAc, GlcNS-GlcA-GlcNS, GlcNS-GlcA-GlcNAc6S, GlcNS-GlcA-GlcNS6S o como se expone en cualquiera de los trisacáridos de la Figura 6. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas IV-A a IV-D se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

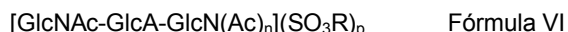
20 Como se describe en la presente, la detección y medición de uno o más trisacáridos de las fórmulas III y/o IV se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IIIA.

Como se describe en la presente, un compuesto de la fórmula II tiene una estructura que se expone en la fórmula V:



25 En determinadas realizaciones, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula V, donde n es 0-1, y p es 0-3. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con p grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. En realizaciones específicas, un trisacárido de la fórmula V tiene una estructura de GlcNAc-IdoA-GlcNAc, GlcNAc-IdoA2SGlcNAc, GlcNAc-IdoA-GlcNS, GlcNAc-IdoA2S-GlcNS, GlcNAc-IdoA-GlcNAc6S, GlcNAc-IdoA2S-GlcNAc6S, GlcNAc-IdoA-GlcNS6S, GlcNAc-IdoA2S-GlcNS6S, o como se expone en cualquiera de los trisacáridos de la Figura 7. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas V-A a V-H se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

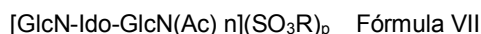
30 En determinadas realizaciones específicas, un compuesto de la fórmula II tiene una estructura que se expone en la fórmula VI:



35 En determinadas realizaciones, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula VI, donde n es 0-1, y p es 0-2. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con p grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. En realizaciones más específicas, un trisacárido de la fórmula VI tiene una estructura de GlcNAc-GlcA-GlcNAc, GlcNAc-GlcA-GlcNS, GlcNAc-GlcA-GlcNAc6S, GlcNAc-GlcA-GlcNS6S o como se expone en cualquiera de los trisacáridos de la Figura 8. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas VI-A a VI-D se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

40 En algunas realizaciones, la detección y/o medición de uno o más trisacáridos de las fórmulas V y/o VI se utilizan en un proceso para diagnosticar MPS IIIB.

45 Como se describe en la presente, un compuesto de la fórmula II tiene una estructura que se expone en la fórmula VII:



50 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula VII, donde n es 0-1, y p es 0-4. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con p grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presentes, un trisacárido de la fórmula VII tiene una estructura de GlcN-IdoA-GlcNAc, GlcN-IdoA2SGlcNAc, GlcN-IdoA-GlcNS, GlcN-IdoA2S-GlcNS, GlcN-IdoA-GlcNAc6S, GlcN-IdoA2S-GlcNAc6S, GlcN-IdoA-GlcNS6S, GlcN-IdoA2S-GlcNS6S, o como se expone en cualquiera de los trisacáridos de la Figura 9. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas VII-A a VII-H se proporcionan mediante

el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

Como se describe en la presente, un compuesto de la fórmula II tiene una estructura que se expone en la fórmula VIII:

$[\text{GlcN-GlcA-GlcN}(\text{Ac})_n](\text{SO}_3\text{R})_p$ Fórmula VIII

- 5 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula VIII, donde n es 0-1, y p es 0-4. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con p grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un trisacárido de la fórmula VIII tiene una estructura de GlcN-GlcA-GlcNAc, GlcN-GlcA-GlcNS, GlcN-GlcA-GlcNAc6S, GlcN-GlcA-GlcNS6S, o como se expone en cualquiera de los trisacáridos de la Figura 10. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas VIII-A a VIII-D se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más trisacáridos de las fórmulas VII y/o VIII se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IIIC.

Como se describe en la presente, un compuesto de la fórmula II tiene una estructura que se expone en la fórmula IX:

- 15 $[\text{GlcNAc6S-Ido-GlcN}(\text{Ac})_n](\text{SO}_3\text{R})_p$ Fórmula IX

- Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula IX, donde n es 0-1, y p es 0-3. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con p grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un trisacárido de la fórmula VII tiene una estructura de GlcNAc6S-IdoA-GlcNAc, GlcNAc6S-IdoA2S-GlcNAc, GlcNAc6S-IdoA-GlcNS, GlcNAc6S-IdoA2S-GlcNS, GlcNAc6S-IdoAGlcNAc6S, GlcNAc6S-IdoA2S-GlcNAc6S, GlcNAc6S-IdoA-GlcNS6S, GlcNAc6S-IdoA2S-GlcNS6S, o como se expone en cualquiera de los trisacáridos de la Figura 11. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas IX-A a IX-H se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

- 25 Como se describe en la presente, un compuesto de la fórmula II tiene una estructura que se expone en la fórmula X:

$[\text{GlcNAc6S-GlcA-GlcN}(\text{Ac})_n](\text{SO}_3\text{R})_p$ Fórmula X

- Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula X, donde n es 0-1, y p es 0-2. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con p grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, el trisacárido de la fórmula X tiene una estructura de GlcNAc6S-GlcA-GlcNAc, GlcNAc6S-GlcAGlcNS, GlcNAc6S-GlcA-GlcNAc6S, GlcNAc6S-GlcA-GlcNS6S, o como se expone en cualquiera de los trisacáridos de la Figura 12. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas X-A a X-D se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

- 35 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más trisacáridos de las fórmulas IX y/o X se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS HID.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (disacárido) que tiene la fórmula:

$[\text{GlcA-GlcN}(\text{Ac})_m](\text{SO}_3\text{R})_n$ Fórmula XI

- 40 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son disacáridos de la fórmula XI, donde m es 0-1, y n es 0-2. El disacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un disacárido de la fórmula XI tiene una estructura de GlcA-GlcNAc, GlcA-GlcNAc 6S, GlcAGlcNS, GlcA-GlcNS6S, o como se expone en cualquiera de los disacáridos de la Figura 13. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XI-A a XI-D se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno más disacáridos de la fórmula XI se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS VII.

- 50 Como se describe en la presente, los procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (disacárido) que tiene la fórmula:

$[\text{IdoA-GalNAc}](\text{SO}_3\text{R})_n$ Fórmula XII

Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son disacáridos de la fórmula XII, donde n es 0-2. El disacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un disacárido de la fórmula XII tiene una estructura de IdoA-GalNAc, IdoA-GalNAc6S, IdoA-GalNAc4S, IdoAGalNAc4S6S, o como se expone en cualquiera de los disacáridos de la Figura 14. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XII-A a XII-D se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano dermatan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

5 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de la fórmula XII se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS I. Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de la fórmula XII y uno o más disacáridos de las fórmulas I-A a I-C se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS I.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (disacárido) que tiene la fórmula:

[IdoA2S-GalNAc](SO₃R)_n. Fórmula XIII

15 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son disacáridos de la fórmula XIII, donde n es 0-2. El disacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un disacárido de la fórmula XIII tiene una estructura de IdoA2S-GalNAc, IdoA2S-GalNAc6S, IdoA2S-GalNAc4S, IdoA2S-GalNAc4S6S, o como se expone en cualquiera de los disacáridos de la Figura 15. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XIII-A a XIII-D se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano dermatan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

20 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de la fórmula XIII se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS II. Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de la fórmula XIII y uno o más disacáridos de las fórmulas I-D a I-G se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS II. Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (triacárido) que tiene la fórmula:

[GalNAc4S-IdoA-GalNAc](SO₃R)_n Fórmula XIV

30 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son triacáridos de la fórmula XIV, donde n es 0-4. El triacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un triacárido de la fórmula XIV tiene una estructura de GalNAc4S(±6S)-IdoA(±2S)-GalNAc(±4S)(±6S), o como se expone en cualquiera de los triacáridos de la Figura 16, donde ± indica que la sulfatación indicada está de modo independiente presente o ausente. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XIV-A a XIV-P se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano dermatan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

35 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más triacáridos de la fórmula XIV se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS VI.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (triacárido) que tiene la fórmula:

40 [GalNAc4S-GlcA-GalNAc](SO₃R)_n, Fórmula XV

Como se describe en la presente los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son triacáridos de la fórmula XV, donde n es 0-3. El triacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un triacárido de la fórmula XV tiene una estructura de GalNAc4S(±6S)-GlcA(±2S)-GlcNAc(±4S)(±6S), o como se expone en cualquiera de los triacáridos de la Figura 17, donde ± indica que la sulfatación indicada está de modo independiente presente o ausente. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XV-A a XV-P se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano condroitin sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

45 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más triacáridos de la fórmula XV se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS VI. Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más triacáridos de la fórmula XIV y uno o más triacáridos de la fórmula XV se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS VI.

En determinadas realizaciones, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (triacárido) que tiene la fórmula:

GlcA-GlcNAc-GlcA Fórmula XVI

En determinadas realizaciones, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XVI. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XVI se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano hialuronan con una glicosaminoglicano liasa adecuada. En algunas realizaciones, la detección y/o medición de uno o más trisacárido de la fórmula XVI se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IIIB. En determinadas realizaciones, la detección y/o medición de uno o más trisacárido de la fórmula XVI y uno o más trisacáridos de las fórmulas V y/o VI se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IIIB.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (disacárido) que tiene la fórmula:

GlcA-GlcNAc Fórmula XVII

Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son disacáridos de la fórmula XVII. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XVII se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano hialuronano con una glicosaminoglicano liasa adecuada. Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de la fórmula XVII se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS VII o MPS IX. Como se describe en la presente, la detección y/o medición de un disacárido de la fórmula XVII y uno o más disacáridos de la fórmula XI se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS VII. Como se describe en la presente, la detección y/o medición de a disacárido de la fórmula XVII y la ausencia de uno o más disacáridos de la fórmula XI se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IX.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

 $[GlcNAc6S-Gal-GlcNAc](SO_3R)_n$ Fórmula XVIII

Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XVIII, y donde n es 0-2. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un disacárido de la fórmula XVIII tiene una estructura de GlcNAc6S-Gal-GlcNAc, GlcNAc6S-Ga16S-GlcNAc, GlcNAc6S-Gal-GlcNAc6S, GlcNAc6S-Ga16S-GlcNAc6S, o como se expone en cualquiera de los trisacáridos de la Figura 18. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XVIIIA a XVIII-D se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano queratan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más trisacáridos de la fórmula XVIII se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IIID. Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más trisacárido de la fórmula XVIII y uno o más trisacáridos de las fórmulas IX y/o X se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IIID.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (disacárido) que tiene la fórmula:

 $[Ga16S-GlcNAc-(Gal)_m](SO_3R)_n$ Fórmula XIX

Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son disacáridos de la fórmula XIX, donde n es 0-2 y m es 0-1. El disacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un disacárido de la fórmula XIX tiene una estructura de Ga16S-GlcNAc, Ga16S-GlcNAc6S, o como se expone en cualquiera de los disacáridos de la Figura 19. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XIX-A a XIX-B se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano queratan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de la fórmula XIX se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IVA.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (disacárido) que tiene la fórmula:

50 $[Gal-GlcNAc](SO_3R)_n$ Fórmula XX

Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son disacáridos de la fórmula XX, donde n es 0-1. El disacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un disacárido de la fórmula XX tiene una estructura de Gal-GlcNAc, Gal-

GlcNAc6S, o como se expone en cualquiera de los disacáridos de la Figura 20. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XX-A a XX-B se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano queratan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

5 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de la fórmula XX se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IVB.

En determinadas realizaciones, cualquier método analítico o proceso de diagnóstico descrito en la presente comprende detectar y/o medir uno o más de los oligosacáridos de cualquiera de las fórmulas V y VI, donde el residuo sacárido de extremo no reductor está saturado en los carbonos 4 y 5 del residuo sacárido de extremo no reductor, el residuo sacárido de extremo no reductor está libre de insaturación carbono-carbono, o el oligosacárido está libre de insaturación carbono-carbono. En ciertos casos, el residuo sacárido de extremo no reductor está en el extremo izquierdo de los oligosacáridos descritos en la presente. La Figura 1 ilustra la escisión del glicosaminoglicano (GAG) sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa (heparinasa II). Como se ilustra, en ciertos casos, la escisión interna de los glicosaminoglicanos con glicosaminoglicano liasas proporciona oligosacáridos con insaturación carbono-carbono entre los carbonos C4 y C5 del extremo no reductor del oligosacárido producido. De acuerdo con la invención, el trisacárido (es decir, el oligosacárido recién creado) de las fórmulas V y VI es un disacárido o trisacárido compuesto de tres residuos de sacárido que formaron los tres residuos de sacárido de un glicosaminoglicano (GAG) antes del tratamiento con una o más glicosaminoglicano (GAG) liasas.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

20 $[\text{IdoA-GlcN}(\text{Ac})_m\text{-IdoA}](\text{SO}_3\text{R})_n$ Fórmula XXI

Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XXI, donde m es 0-1 y n es 0-4. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXI se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

$[\text{IdoA-GlcN}(\text{Ac})_m\text{-GlcA}](\text{SO}_3\text{R})_n$ Fórmula XXII

30 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XXII, donde m es 0-1 y n es 0-3. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXII se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

35 Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

$[\text{GlcA-GlcN}(\text{Ac})_m\text{-GlcA}](\text{SO}_3\text{R})_n$ Fórmula XXIII

40 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XXIII, donde m es 0-1 y n es 0-3. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO_3R en cualquier ubicación adecuada. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXIII se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano sulfato de heparano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

45 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más trisacárido de cualquiera de las fórmulas XXI a XXIII se utiliza en un proceso para diagnosticar un trastorno asociado con la acumulación de sulfato de heparano (por ejemplo, una enfermedad de almacenamiento lisosomal de sulfato de heparano tal como, a modo de ejemplo no limitante, MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIIC, MPS IIID, MPS VII, o una de sus combinaciones). Como se describe en la presente, un oligosacárido de cualquiera de las fórmulas XXI a XXIII está saturado o insaturado en las posiciones C4 y C5 del residuo sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido. Como se describe en la presente, un proceso para diagnosticar a trastorno asociado con la acumulación de sulfato de heparano (por ejemplo, MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIIC, MPS IIID, MPS VII, o una de sus combinaciones) también comprende detectar uno o más oligosacáridos, como se expuso anteriormente y según sea apropiado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas I-XX, ya que pertenecen al trastorno particular que se diagnostica).

50 Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

[IdoA-GalNAc-Ido](SO₃R)_n Fórmula XXIV

5 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XXIV, donde n es 0-4. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXIV se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano condroitin y/o dermatan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

[IdoA-GalNAc-GlcA](SO₃R)_n Fórmula XXV

10 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XXV, n es 0-3. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXV se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano condroitin y/o dermatan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

15 Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

[GlcA-GalNAc-Ido](SO₃R)_n, Fórmula XXVI

20 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XXVI, donde n es 0-3. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXVI se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano condroitin y/o dermatan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

25 [GlcA-GalNAc-GlcA](SO₃R)_n, Fórmula XXVII

Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo,

30 los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XXVII, donde n es 0-2. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXVII se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano condroitin y/o dermatan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

35 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más trisacáridos de cualquiera de las fórmulas XXIV a XXVII se utiliza en un proceso para diagnosticar un trastorno asociado con la acumulación de condroitin y/o dermatan sulfato (por ejemplo, enfermedad de almacenamiento lisosomal de condroitin y/o dermatan sulfato). Como se describe en la presente, un oligosacárido de cualquiera de las fórmulas XXIV a XXVII está saturado o insaturado en las posiciones C4 y C5 del residuo de sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido. Un proceso para diagnosticar un trastorno asociado con la acumulación de condroitin y/o dermatan sulfato también comprende detectar uno o más oligosacáridos, como se expuso anteriormente y según sea apropiado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas I-XX, ya que pertenecen al trastorno particular que se diagnostica.

40 Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

GlcA-GlcITAc-GlcA Fórmula XXVIII

45 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XXVIII. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXVIII se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano hialuronano con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

50 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de un trisacárido de la fórmula XXVIII se utiliza en un proceso para diagnosticar un trastorno asociado con la acumulación de hialuronano (por ejemplo, una enfermedad de almacenamiento lisosomal de hialuronano). Como se describe en la presente, un oligosacárido de la fórmula XXVIII está saturado o insaturado en las posiciones C4 y C5 del residuo sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido. Como se describe en la presente, un proceso para diagnosticar un trastorno asociado con la acumulación de hialuronano también comprende detectar uno o más oligosacáridos, como se expuso anteriormente y según sea apropiado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas I-XX, ya que pertenecen al trastorno particular que se diagnostica.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

[Gal-GlcINAc-Gal](SO₃R)_n Fórmula XXIX

5 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son trisacáridos de la fórmula XXIX, donde n es 0-3. El trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXIX se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano queratan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

10 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más trisacáridos de la fórmula XXIX se utiliza en un proceso para diagnosticar un trastorno asociado con la acumulación de queratan sulfato (por ejemplo, una enfermedad de almacenamiento lisosomal de sulfato de queratano). Como se describe en la presente, un oligosacárido de la fórmula XXIX está saturado o insaturado en las posiciones C4 y C5 del residuo sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido. Como se describe en la presente, el oligosacárido está saturado en las posiciones C4 y C5 del residuo sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido. Como se describe en la presente un proceso para diagnosticar un trastorno asociado con la acumulación de queratan sulfato también comprende detectar uno o más oligosacáridos, como se expuso anteriormente y según sea apropiado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas I-XX, ya que pertenecen al trastorno particular que se diagnostica.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

20 [GalNAc6S-GlcA-(GalNAc)_m](SO₃R)_n Fórmula XXX

25 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son di- y trisacáridos de la fórmula XXX, donde n es 0-3. El di- o trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXX se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano condroitin sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada. Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos o trisacárido de la fórmula XXX se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IVA, Como se describe en la presente, un di- o trisacárido de la fórmula XXX tiene una estructura o como se expone en cualquiera de los disacáridos de la Figura 21.

30 Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (trisacárido) que tiene la fórmula:

[GalNAc6S-IdoA-(GalNAc)_m](SO₃R)_n Fórmula XXXI

35 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son di- o trisacáridos de la fórmula XXXI, donde n es 0-4 y m es 0-1. El di- o trisacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente un disacárido de la fórmula XVIII tiene una estructura de cualquiera de los di- o trisacáridos de la Figura 22. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXXI-A a XXXI-T se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano dermatan sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

40 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más di- o trisacárido de la fórmula XXXI se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS IVA.

Como se describe en la presente, los métodos y procesos descritos en la presente se utilizan para detectar y/o medir un oligosacárido (disacárido) que tiene la fórmula:

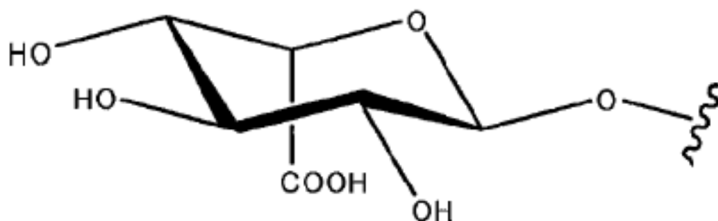
[GlcA-GalNAc](SO₃R)_n Fórmula XXXII

45 Como se describe en la presente, los oligosacáridos descritos en la presente, por ejemplo, los detectados y/o medidos de acuerdo con los métodos y/o los procesos descritos en la presente, son disacáridos de la fórmula XXXII, donde n es 0-2. El disacárido está opcionalmente sulfatado con n grupos SO₃R en cualquier ubicación adecuada. Como se describe en la presente, un disacárido de la fórmula XXXII tiene una estructura que se expone en cualquiera de los disacáridos de la Figura 23. En ciertos casos, los compuestos de las fórmulas XXXII-A a XXXII-C se proporcionan mediante el tratamiento del glicosaminoglicano condroitin sulfato con una glicosaminoglicano liasa adecuada.

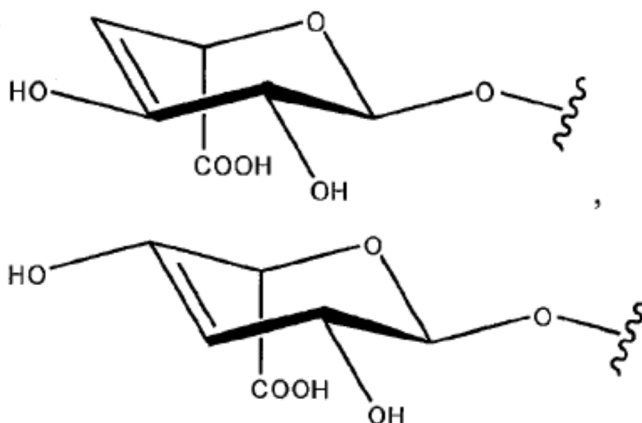
50 Como se describe en la presente, la detección y/o medición de uno o más disacáridos de la fórmula XXXII se utiliza en un proceso para diagnosticar MPS VII.

Como se describe en la presente, un oligosacárido de cualquiera de las fórmulas XXX a XXXII está saturado o insaturado en las posiciones C4 y C5 del residuo sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido.



En determinadas realizaciones, en la presente se proporciona un compuesto de cualquiera de las fórmulas V y VI, En algunas realizaciones, en la presente se proporciona un compuesto de cualquiera de las Figuras 7 y 8. En determinadas realizaciones, el compuesto de cualquiera de las fórmulas V y VI y las Figuras 7 y 8 es un compuesto aislado y/o purificado. En algunas realizaciones, el compuesto aislado y/o purificado de V y VI o Figuras 7 y 8 cualquiera de las fórmulas V y VI o las Figuras 7 y 8 está sustancialmente libre de oligosacáridos que comprenden un residuo de sacárido en el extremo no reductor del oligosacárido que está insaturado en las posiciones C4 y C5. A modo de ejemplo ilustrativo de los residuos de sacárido de extremo no reductor que están saturados e insaturados en las posiciones C4 y C5, un residuo de ácido L-idurónico (IdoA) que está saturado en las posiciones C4 y C5 tiene la siguiente estructura:



mientras que un residuo de ácido L-idurónico (IdoA) en el extremo no reductor del oligosacárido que está insaturado en las posiciones C4 y C5 puede tener una estructura como la siguiente:



o similares. Los oligosacáridos que tienen residuos de sacárido de extremo no reductor que están saturados en la posición C4 y C5 se denominan en la presente como "oligosacáridos saturados de extremo no reductor C4-C5".

Como se describe en la presente, los residuos de sacárido insaturados incluyen el residuo insaturado de IdoA, que se indica con  y el residuo insaturado de GlcA que se indica con .

En algunas realizaciones, el compuesto aislado y/o purificado descrito en la presente comprende al menos al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% oligosacárido (en peso). En realizaciones adicionales o alternativas, el compuesto aislado y/o purificado comprende 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% NRE-oligosacárido saturado (en peso).

En algunas realizaciones, en la presente se proporciona una composición que comprende uno o más oligosacáridos aislados de cualquiera de las Figuras 7 y 8. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 90% en peso de oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 80% en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 70% en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 60% en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 50% en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 40% en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 30% en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 25% en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 20%

- en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 15% en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 10% en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En determinadas realizaciones, el oligosacárido presente en la composición es menor de 5%
- 5 en peso oligosacárido insaturado de extremo no reductor. En algunas realizaciones, la composición también comprende resina cromatográfica o resina electroforética. En algunas realizaciones, la resina es una resina cromatográfica líquida de alto rendimiento
- Los compuestos de cualquiera de las fórmulas I-XXXII o las Figuras 4-23 se obtienen de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante generación y purificación de fuentes naturales, síntesis química, o cualquier otro método adecuado. Estas estructuras no existen naturalmente en una forma aislada y/o purificada.
- 10 Los trisacáridos descritos opcionalmente se generan y purifican de fuentes naturales. En determinadas realizaciones, a partir de sulfato de heparano de fuentes naturales, estos trisacáridos se generan mediante el tratamiento de los sulfatos de heparano con heparina liasas o condroitinasas) y se purifican los trisacáridos liberados de los extremos no reductores preexistentes. En el caso específico, los trisacáridos liberados de los extremos no reductores preexistentes son únicos porque no contienen un enlace doble c4-5 debido a la acción de la liasa.
- 15 En determinadas realizaciones, el rendimiento de los trisacáridos deseados aumenta mediante el uso de sulfatos de heparano que se han tratado con enzimas degradativas de glicano para generar fragmentos más pequeños o fragmentos con un número mayor de extremos no reductores deseables. En realizaciones adicionales o alternativas, el rendimiento aumenta a partir de sulfatos de heparano que se han aislado de un organismo o célula que tienen un defecto en la degradación de sulfatos de heparano de modo que los extremos no reductores deseables están enriquecidos. Como se muestra en las Figuras 24 y 25, estos disacáridos de extremo no reductor únicos se pueden aislar por HPLC. La Figura 24 muestra disacáridos aislados de sulfato de heparano de una muestra humana normal, mientras que la Figura 25 muestra disacáridos aislados de una muestra MPS I (deficiente de iduronidasa). Los disacáridos saturados (indicados con flechas rojas) se pueden aislar mediante la recolección de las fracciones apropiadas de esta o una cromatografía preparativa similar.
- 20 Métodos adicionales o alternativos para obtener tales compuestos incluyen, por ejemplo, la transformación química de los sacáridos insaturados en los sacáridos saturados. Los trisacáridos descritos se pueden sintetizar por métodos químicos o quimioenzimáticos. Los métodos químicos para la síntesis de estos trisacáridos saturados se convierten opcionalmente de los métodos descritos por Prabhu, Venot y Boons (Organic Letters 2003 Vol. 5, N ° 26 4975-4978).
- 25 En realizaciones adicionales, en la presente se proporciona un compuesto de cualquiera de las fórmulas V, VI y XVI o las Figuras 8 y 9, donde el compuesto se marca con cualquier marca descrita en la presente.
- 30 En algunas realizaciones, un oligosacárido aislado o generado de otro modo descrito en la presente tiene un peso molecular menor de 2000 g/mol, menor de 1500 g/mol, menor de 1000 g/mol, menor de 500 g/mol, menor de 400 g/mol, menor de 300 g/mol, menor de 260 g/mol, menor de 200 g/mol, menor de 100 g/mol, o similares (por ejemplo, antes de marcar con cualquier marca detectable que se puede incluir en un proceso descrito en la presente).
- 35 En determinadas realizaciones, antes del tratamiento con liasa de cualquier proceso descrito en la presente, un biomarcador u oligosacárido descrito en la presente (y detectado o medido de acuerdo con el proceso no está presente en abundancia en las muestras (por ejemplo, muestras del mismo tipo) de individuos (por ejemplo, la cantidad en un solo individuo, un promedio de tales individuos, una media de tales individuos, una mediana de tales individuos, o similares) con acumulación de glicosaminoglicanos anormal con respecto a los individuos con normal glicosaminoglicano (por ejemplo, la cantidad en un individuo solo, un promedio de tales individuos, una media de tales individuos, una mediana de tales individuos, o similares). En algunas realizaciones, no presente en una abundancia incluye no presente en una cantidad superior 1,01 x (es decir, 1,01 veces), 1,05x, 1,1x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,4x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, o similares.
- 40 Métodos de detección/Medición
- 45 Los oligosacáridos (que incluyen, por ejemplo, oligosacáridos marcados con marcas detectables) descritos en la presente se detectan y/o se miden en los procesos descritos en la presente de cualquier manera adecuada. En determinadas realizaciones, las marcas detectables se detectan y/o cuantifican de acuerdo con cualquier proceso descrito en la presente usando cualquier técnica, particularmente cualquier técnica adecuada para la marca detectable utilizada. En algunas realizaciones, las técnicas de detección adecuadas incluyen, a modo de ejemplo no limitante, uno o más de un espectrómetro de masas, un espectrómetro de resonancia magnética nuclear, un espectrómetro UV-Vis, un espectrómetro IR, un fluorímetro, un fosforímetro, un espectrómetro de radiación (por ejemplo, un contador de centelleo), una técnica de cromatografía en capa fina, o similar.
- 50 En determinadas realizaciones, en cualquier proceso descrito en la presente, los oligosacáridos opcionalmente se detectan de forma directa usando una técnica adecuada, tal como resonancia magnética nuclear cuantitativa. La resonancia magnética nuclear cuantitativa también se utiliza opcionalmente para cuantificar y/o detectar la presencia de una marca detectable. En determinadas realizaciones, uno o más oligosacáridos se detectan opcionalmente usando un espectrómetro de masa de cromatografía de líquidos adecuado (LC-MS).
- 55

En algunas realizaciones, los oligosacáridos se marcan con un anticuerpo o una sonda y se cuantifican usando cualquier método adecuado (por ejemplo, técnicas de transferencia puntual, técnicas de detección inmune (por ejemplo, ELISA) o similares).

5 Varios métodos analíticos útiles para los procesos descritos en la presente incluyen, a modo de ejemplo no limitante, espectrometría de masas, cromatografía, HPLC, UPLC, TLC, GC, HPAEC-PAD, electroforesis capilar o gel o similares. En determinadas realizaciones, en las que se utiliza una técnica cromatográfica, se emplea opcionalmente cualquier sistema solvente adecuado. En determinadas realizaciones, una columna (por ejemplo, Cosmogel DEAE, Tsk Gel DEAE, Cosmogel QA, Cosmogel CM, Cosmogel SP, 130A BEH partícula Fenilo (1,7, 2,5, 3,5, 5, o 10 µM de tamaño de partícula), 130A BEH partícula C18 (1,7, 2,5, 3,5, 5, o 10 µM de tamaño de partícula), HSS partícula C18 (1,8, 3,5, o 5 µM de tamaño de partícula), 300A BEH partícula C18 (1,7, 3,5, 5, 10 µM de tamaño de partícula), o similares con una longitud y un diámetro interno adecuados) se carga opcionalmente con un solvente de equilibrio (por ejemplo, un buffer o una solución de sal, tal como una solución de acetato de potasio, solución de cloruro de sodio, solución de acetato de sodio, solución de acetato de amonio o similares), por ejemplo, con un pH de aproximadamente 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, el tampón o solución de sal tiene una concentración de aproximadamente 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM, 1 M, 2M, o similares. Se utiliza cualquier velocidad de flujo adecuada, por ejemplo, 0,5 ml/min, 1 ml, min, 1,5 ml/min, 2 ml/min, o similares. Después del equilibrio, se utiliza opcionalmente un gradiente lineal. En algunas realizaciones, el gradiente lineal se corre durante 1-20 min, 1-10 min, 10-20 min, 1-5 min, 5-10 min, o similares. En determinadas realizaciones, el gradiente es un buffer o una solución de sal, por ejemplo, como se describió anteriormente (por ejemplo, de 0 M a 0.5 M, de 0 M a 3 M, de 0.5 M a 2 M, de 0 M a 2 M, de 1 M a 2 M, de 0 M a 3 M, de 2 M a 0 M, de 3 M a 0 M, o similares). Una vez que el gradiente ha alcanzado una concentración final, el eluyente se mantiene opcionalmente a la concentración final durante un período de tiempo adecuado (por ejemplo, 1-20 min, 5-10 min, 10-15 min, 1-5 min, 1 - 10 Min, 15 - 20 min, o similares). Después de la retención opcional de la concentración final, el eluyente se puede cambiar a un segundo solvente o sistema solvente (por ejemplo, un alcohol, tal como metanol, etanol, o isopropanol, acetonitrilo, agua, o similares). El cambio al segundo sistema solvente puede ser durante un periodo de tiempo, por ejemplo, 15 segundos, 30 segundos, 45 segundos, 60 segundos, 2 minutos, 3 minutos, o similares. El segundo sistema de solventes se mantiene opcionalmente durante un periodo de tiempo, tal como 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, o similares. Después del segundo ciclo del sistema solvente, la columna se restaura opcionalmente a las condiciones de solvente inicial.

30 En determinadas realizaciones, la detección o medición de un dispositivo analítico proporciona el diagnóstico de una enfermedad, el diagnóstico de gravedad de una enfermedad, la eficacia de una terapia o un análisis basado en otros procedimientos descritos en la presente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la ausencia de un pico o señal (por ejemplo, un pico o una señal indicativa de la presencia de un oligosacárido particular) indica que un individuo está en un estado no enfermo, en remisión para un estado de enfermedad o sometido a una terapia efectiva para una enfermedad, de acuerdo con las circunstancias del diagnóstico. En determinadas realizaciones, se utiliza la presencia y/o el área de un pico o señal (que incluye, por ejemplo, la presencia de una cierta señal o patrón de pico o huella digital) para determinar la gravedad de una enfermedad. En algunas realizaciones, se utiliza la presencia y/o el área de un pico o señal para determinar la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, el estado de portador de la enfermedad o similares, sobre la base de un cierto valor umbral para la enfermedad, gravedad de la enfermedad, estado del portador de la enfermedad. Dichos umbrales se determinan opcionalmente de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante el análisis de muestras de control, tales muestras de control proceden de individuos no enfermos, individuos enfermos o similares.

45 En determinadas realizaciones, se proporcionó una muestra biológica de control utilizada en cualquier proceso descrito en la presente a partir de un individuo que no sufre del trastorno que se diagnostica. En otras realizaciones, se toma una muestra biológica de control de un individuo que sufre de un trastorno que se diagnostica. En determinadas realizaciones, el resultado obtenido a partir de la muestra biológica de control se almacena en una base de datos. En tales casos, una muestra de prueba se compara opcionalmente con una pluralidad de datos de control en una base de datos. Además, en determinadas realizaciones, cualquier proceso de diagnóstico descrito en la presente se utiliza opcionalmente solo o en combinación con otras técnicas de diagnóstico. Otras técnicas de diagnóstico incluyen, a modo de ejemplo no limitante, análisis de síntomas, biopsias, detección de acumulación de otros compuestos en muestras biológicas o similares. En algunas realizaciones, las muestras biológicas de control se toman opcionalmente del mismo individuo sustancialmente al mismo tiempo, simplemente desde un lugar diferente (por ejemplo, un fluido articular sinovial inflamado/artrítico frente a la articulación sinovial contralateral no artrítica). En otras realizaciones, las muestras biológicas de control se toman opcionalmente del mismo individuo en diferentes momentos (por ejemplo, antes de la terapia y después de la terapia si el método que se utiliza es un método de control de una terapia de tratamiento).

Marcas detectables

60 En las diversas realizaciones de cualquier proceso o método descrito en la presente, se utiliza opcionalmente cualquier marca detectable adecuada. En algunas realizaciones, las marcas detectables útiles en los procesos o métodos descritos en la presente incluyen, a modo de ejemplo no limitante, marcas de masa, anticuerpos, marcas de afinidad, radiomarcas, cromóforos, marcas fluorescentes o similares..

Las marcas fluorescentes adecuadas para usar en varias realizaciones en la presente incluyen, a modo de ejemplo no limitante, 2-aminopiridina (2-AP), ácido 2-aminobenzoico (2-AA), 2-aminobenzamida (2-AB), 2-aminoacridona (AMAC), etil éster del ácido p-aminobenzoico (ABEE), p-aminobenzonitrilo (ABN), 2-amino-6-cianoetilpiridina (ACP), 7-amino-4-metilcumarina (AMC), 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfato (ANTS), 7-aminonaftalen-1,3-disulfuro (ANDS), y 8-aminopireno-1,3,6-trisulfato (APTS), o similares. Las marcas fluorescentes se pueden unir mediante aminación reductora con la marca fluorescente y cianoborohidruro de sodio o similares.

Las marcas de masa adecuadas para uso en diversas realizaciones de la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitante, ácido D-2-antranílico, D-2-aminopiridina, yoduro de D-metilo, yoduro de metilo ^{13}C , piridilamina deuterada, D-biotina o similares. Las marcas de masa se pueden unir por permmetilación o aminación reductora por cualquier método que sea conocido por los expertos en la técnica.

Las marcas de afinidad adecuadas para usar en diversas realizaciones de la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitante biotina y derivados.

Las radiomarcas adecuadas para usar en diversas realizaciones de la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitante, borotrituro de sodio (NaB^3H_4), o similares.

Los cromóforos adecuados para usar en diversas realizaciones de la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitante, 4-amino-1,1'-azobenceno, 4'-N, N-dimetilamino-4-aminoazobenceno, aminoazobenceno, diaminoazobenceno, Rojo directo 16, CI Ácido Rojo 57, CI Ácido azul 45, CI Ácido azul 22, CL Mordant Marrón 13, CI Naranja Directo 75, o similares. Los cromóforos se pueden marcar por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, tal como aminación reductora con el cromóforo y cianoborohidruro sódico.

En algunas realizaciones, la marca detectable es un anticuerpo. En realizaciones específicas, el anticuerpo se une a un compuesto detectable, tal como marcas de masa, radiomarcas, cromóforos, marcas fluorescentes, o similares. En algunas realizaciones, los anticuerpos se detectan y/o se pueden detectar de diversas maneras, por ejemplo, como un cromóforo, un fluoróforo, o similares; o con una sonda (por ejemplo, usando técnicas de transferencias puntuales, técnicas de detección inmune, o similares).

25 Métodos de purificación

En algunas realizaciones, los procesos descritos en la presente comprenden etapas de tratamiento adicionales de las muestras de ensayo y/o de control. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las muestras se homogeneizan y/o se purifican. En realizaciones específicas, la homogeneización se obtiene de cualquier manera adecuada, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, una solución básica (por ejemplo, NaOH 0,1 N), sonicación, molienda de tejidos u otros agentes químicos.

En determinadas realizaciones, las muestras, incluidas las muestras de prueba y/o muestras de control, descritas en la presente descriptiva se purifican opcionalmente antes del tratamiento con glicosaminoglicano (por ejemplo, tratamiento con liasa) y/o caracterización. Las muestras de prueba y/o muestras de control (es decir, uno o más o todos los glicanos que se encuentran en el mismo) se purifican opcionalmente usando cualquier técnica de purificación adecuada. Las muestras de prueba y/o muestras de control se purifican opcionalmente en cualquier punto adecuado en un proceso descrito en la presente, que incluye antes o después de la marca de los glicanos hallados en la muestra. En determinadas realizaciones, las técnicas de purificación incluyen centrifugación, electroforesis, cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de gel de sílice o alúmina), cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (por ejemplo, HPLC de fase inversa en columnas quirales o acquirales), cromatografía de capa fina, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía en gel (por ejemplo, filtración o permeación en gel o cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis en gel), cromatografía de tamiz molecular, cromatografía de afinidad, exclusión de tamaño, filtración (por ejemplo, a través de florisil o tapón de carbón activado), precipitación, ósmosis, recristalización, purificación de fase fluorosa, destilación, extracción, cromatoenfoque, extracción de fluido supercrítico, cromatografía flash preparativa (por ejemplo, cromatografía flash usando un detector UV-Vis y/o un espectrómetro de masas (por ejemplo, usando el conjunto de productos Biotage®) o similares..

En algunas realizaciones, los sulfatos de heparano se hallan naturalmente unidos a una proteína del núcleo (que forman juntos un proteoglicano). En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente procesos de purificación para separar los fragmentos de sulfato de heparano de proteoglicanos antes de procesarlos para su detección.

50 Métodos terapéuticos

En la presente se describe el tratamiento de trastornos asociados con degradación, biosíntesis y/o acumulación de glicosaminoglicanos anormal (GAGs), que comprende:

a. administrar un agente para tratar MPS (por ejemplo, un agente que modula (por ejemplo, promueve y/o inhibe) la biosíntesis y/o degradación de glicosaminoglicano) en un individuo que lo necesita

55 b. controlar la acumulación de glicosaminoglicanos en el individuo usando cualquier proceso descrito en la presente

para detectar o cuantificar la cantidad de oligosacáridos (por ejemplo, di- y/o trisacáridos, tal como oligosacáridos GAG, que incluyen fragmentos de sulfato de heparano) presentes en una muestra biológica digerida con liasa (por ejemplo, muestra de orina, suero, plasma, o CSF) de acuerdo con cualquier proceso descrito en la presente.

5 También se describe en la presente el control del tratamiento de trastornos asociados con la degradación, biosíntesis y/o acumulación de glicosaminoglicanos anormal (GAGs), que comprende:

10 a. después de la administración de un agente para tratar MPS (por ejemplo, un agente que modula (por ejemplo, por ejemplo, promueve y/o inhibe) la biosíntesis y/o degradación de glicosaminoglicano) en un individuo que lo necesita usando un instrumento analítico para detectar la presencia de y/o medir la cantidad de a población de uno o más oligosacáridos saturados de extremo no reductor C4-C5 presentes en una muestra biológica transformada que se ha preparado mediante: el tratamiento de una población de glicosaminoglicanos, en o aislados de una muestra biológica tomada del individuo, con al menos una glicosaminoglicano liasa de digestión para transformar los glicosaminoglicanos en la población del uno o más oligosacáridos saturados de extremo no reductor C4-C5;

b. mostrar o registrar la presencia de o una medición de a población de uno o más oligosacáridos.

15 El oligosacárido detectado o medido es uno o más oligosacáridos saturados de extremo no reductor C4-C5. El agente se administra una o más veces. Como se describe en la presente, el agente se administra varias veces. Como se describe en la presente, el agente se administra en una dosis de carga una o más veces (por ejemplo, en un programa de dosificación de carga) y posteriormente se administra en una dosis de mantenimiento (por ejemplo, en un programa de dosificación de mantenimiento, tal como tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez a la semana o similares). Como se describe en la presente, cuando la acumulación de oligosacáridos GAG comienza a aumentar o acelerarse, la dosis se ajusta opcionalmente (por ejemplo, se aumenta la dosis de mantenimiento o se utiliza una dosis de carga adicional o un programa de dosificación).

Como se describe en la presente, el control de la acumulación de glicosaminoglicanos

25 comprende repetir la etapa de: utilizar un instrumento analítico para detectar la presencia y/o medir la cantidad de una población de uno o más oligosacáridos presentes en una muestra biológica transformada que se ha preparado mediante el tratamiento de una población de glicosaminoglicanos, en o aislada de una muestra biológica del individuo, con al menos una glicosaminoglicano liasa de digestión para transformar los glicosaminoglicanos en la población del uno o más oligosacáridos. Como se describe en la presente, la etapa se repite a intervalos periódicos (por ejemplo, todos los días, día por medio, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada semana, cada mes, cada 3 meses, cada trimestre, cada 6 meses, anualmente o similares), a tiempos regulares después de una dosis (por ejemplo, 4 horas después de la administración del agente, 6 horas después de la administración del agente, 8 horas después de la administración del agente, 12 horas después de la administración del agente, o similares), antes de la administración de la dosis (por ejemplo, inmediatamente antes de la administración del agente, 2 horas antes de la administración del agente, o similares), o cualquier otro programa de control.

35 Como se describe en la presente, el control de la acumulación de glicosaminoglicanos se realiza durante un período de tiempo por ejemplo, durante una semana, dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses, un año, o similares. Como se describe en la presente, el método de cuantificar la cantidad de uno o más oligosacáridos en una muestra biológica digerida con liasa (por ejemplo, orina, suero, plasma, o CSF) comprende detectar y/o medir (por ejemplo, con un dispositivo analítico), uno o más oligosacáridos dentro de la muestra biológica digerida con liasa del individuo a después de que la muestra biológica obtenida del individuo se ha tratado con una o más glicosaminoglicano liasas. Como se describe en la presente, tales glicosaminoglicano liasas son adecuadas para preparar di- y/o trisacáridos de los glicosaminoglicanos presentes en la muestra biológica obtenida del individuo. En ciertos casos, el extremo reductor de una porción representativa de uno o más oligosacáridos en la muestra biológica transformada se marca con una marca detectable adecuada (por ejemplo, una marca de masa, radiomarca, marca fluorescente, una marca cromóforo, una marca de afinidad, un anticuerpo). Como se describe en la presente, el proceso comprende mostrar o registrar tal caracterización de la población de oligosacáridos y/o marcar los oligosacáridos.

50 Como se describe en la presente, el agente que modula la biosíntesis de glicosaminoglicanos incluye inhibidores de la acumulación de glicosaminoglicanos, agentes que promueven la degradación de glicosaminoglicanos, agentes que activan enzimas que degradan glicosaminoglicanos, agentes que inhiben la biosíntesis de glicosaminoglicanos o similares. Como se describe en la presente, el agente que modula la biosíntesis de glicosaminoglicanos es un agente que modula selectivamente la biosíntesis de sulfato de heparano, un agente que modula selectivamente la biosíntesis de condroitin sulfato, un agente que modula selectivamente la biosíntesis de dermatan sulfato, un agente que modula selectivamente la biosíntesis de queratan sulfato, un agente que modula selectivamente la biosíntesis de hialuronano, o una de sus combinaciones.

En algunos casos, la detección y/o la cuantificación de la identidad y/o cantidad de los trisacáridos presentes en una muestra biológica se usar para identificar y/o diagnosticar un trastorno MPS IIIB en un individuo que se sospecha que tiene tal trastorno.

5 En algunos casos, la detección y/o la cuantificación de la identidad y/o cantidad de los trisacáridos presentes en una muestra biológica se usa para controlar la gravedad y el curso de la enfermedad en un individuo diagnosticado con o que se sospecha que tiene un trastorno MPS IIIB. En algunos casos, la detección y/o la cuantificación de la identidad y/o cantidad de los trisacáridos presentes en una muestra biológica se usa para calcular la dosis administrada de un agente que modula (por ejemplo, promueve y/o inhibe) la biosíntesis y la degradación de glicosaminoglicano.

10 En ciertos casos, en los que después de la administración de una dosis seleccionada de un agente que modula (por ejemplo, promueve y/o inhibe) la biosíntesis y/o degradación de glicosaminoglicanos, la afección de un individuo no mejora, la detección y/o cuantificación de la identidad y/o cantidad de oligosacáridos presentes en una muestra biológica proporciona un régimen de tratamiento que se modifica de acuerdo con la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o afección, terapia previa, estado de salud del individuo y respuesta a los fármacos y el criterio del médico tratante.

15 Como se describe en la presente, el control de la acumulación de glicosaminoglicanos en el individuo comprende la detección o cuantificación de la cantidad de un oligosacárido (o uno o más oligosacáridos) en una muestra obtenida del individuo (por ejemplo, de acuerdo con cualquier método descrito en la presente) para obtener un primer resultado de acumulación (por ejemplo, una lectura inicial antes de comenzar el tratamiento o en cualquier otro momento) y un segundo resultado de acumulación que es posterior a la obtención del primer resultado. Como se describe en la presente, el segundo resultado se compara con el primer resultado para determinar si el tratamiento está efectivamente reduciendo, manteniendo o reduciendo la tasa de aumento de los niveles de oligosacáridos en una muestra obtenida de forma sustancialmente idéntica del individuo que se está tratando. Como se describe en la presente, de acuerdo con la diferencia entre el primer y segundo resultado, el tratamiento se puede alterar por ejemplo, para aumentar o disminuir la cantidad de agente administrado; para sustituir el agente terapéutico con un agente terapéutico alternativo; o similar. Como se describe en la presente, la dosis del agente terapéutico disminuye a un nivel de mantenimiento (por ejemplo, si el nivel de oligosacárido se ha reducido suficientemente); el control adicional de los niveles de oligosacáridos es opcional en tal situación, por ejemplo, para asegurar que se logran los niveles reducidos o mantenidos de oligosacárido (por ejemplo, oligosacáridos GAG).

En la presente se describe la detección de la respuesta a la terapia en un individuo o un método de predecir la respuesta a la terapia en un individuo que comprende:

30 a. administrar un agente para tratar MPS (por ejemplo, un agente que modula (por ejemplo, promueve y/o inhibe) la biosíntesis y/o degradación de glicosaminoglicanos) a una pluralidad de células de un individuo que lo necesita (por ejemplo, una pluralidad de fibroblastos, suero, plasma, o células CSF de un ser humano que sufre de MPS);

b. controlar la acumulación de glicosaminoglicanos en la pluralidad de células usando cualquier proceso descrito en la presente para detectar o cuantificar la cantidad de oligosacáridos (por ejemplo, di- y/o trisacáridos, tales como oligosacáridos GAG, que incluyen fragmentos de sulfato de heparano) presentes en una muestra biológica digerida con liasa de la pluralidad de células de acuerdo con cualquier proceso descrito en la presente.

35 Como se describe en la presente, el oligosacárido(s) detectado o medido es uno o más de oligosacárido saturado de extremo no reductor C4-C5. Se debe entender que una pluralidad de células de un individuo incluye células que se toman directamente del individuo, y/o células que se toman de un individuo seguido de cultivo para expandir su población.

40 Como se discutió anteriormente, las Figuras 24 y 25 ilustran los oligosacárido saturados de extremo no reductor C4-C5 se pueden aislar, por ejemplo, por HPLC.

45 En algunas realizaciones, el control de la acumulación de sulfato de heparano comprende repetir la etapa de: usar un instrumento analítico para detectar la presencia de y/o medir la cantidad de una población de uno o más trisacáridos de la invención presentes en una muestra biológica transformada que se ha preparado mediante el tratamiento de una población de sulfatos de heparano en o aisladas de una muestra biológica del individuo, con al menos una de heparina liasa I, II o III para transformar los sulfatos de heparano en la población de uno o más trisacáridos. En realizaciones específicas, la etapa se repite a intervalos periódicos (por ejemplo, todos los días, día por medio, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada semana, o similares), o cualquier otro programa de control.

Trastornos

50 Los trastornos asociados con la degradación, biosíntesis y/o acumulación anormales de glicosaminoglicanos útiles en los métodos de diagnóstico descritos en la presente incluyen cualquier trastorno en el que la acumulación de glicosaminoglicanos y/o fragmentos de estos se puede detectar en una muestra biológica tomada de un individuo que sufre de tal trastorno. Como se discutió en la presente, el trastorno asociado con la degradación, biosíntesis y/o acumulación anormales de glicosaminoglicanos es MPS IIIB.

55 En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal es causada por la degradación anormal de glicosaminoglicanos. En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal causa una acumulación de sulfato de heparano y/o dermatan sulfato (por ejemplo, MPS I) y es causada por una deficiencia de iduronidasa. En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal causa una acumulación de sulfato de heparano y/o

dermatan sulfato (por ejemplo, MPS II) y es causada por una deficiencia de 2-sulfatasa. La Figura 26 ilustra la acumulación de oligosacáridos en fibroblastos humanos MPS II versus la acumulación de oligosacáridos en fibroblastos humanos normales. En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal causa una acumulación de sulfato de heparano y/o hialuronano (por ejemplo, MPS IIIB) y es causada por una deficiencia de N-acetilglucosaminidasa. En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal causa una acumulación de sulfato de heparano (por ejemplo, MPS IIIC) y es causada por una deficiencia de glucosamina acetiltransferasa. En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal causa una acumulación de sulfato de heparano y/o queratan sulfato (por ejemplo, MPS IIID) y es causada por una deficiencia de N-acetilglucosamina 6-sulfatasa. En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal causa una acumulación de queratan sulfato (por ejemplo, MPS IVA) y es causada por una deficiencia de galactosa 6-sulfatasa. En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal causa una acumulación de queratan sulfato (por ejemplo, MPS IVB) y es causada por una deficiencia de N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa. En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal causa una acumulación de sulfato de heparano y/o hialuronano (por ejemplo, MPS VII) y es causada por una deficiencia de glucuronidasa. En algunos casos, una enfermedad de almacenamiento lisosomal causa una acumulación de hialuronano (por ejemplo, MPS IX) y es causada por una deficiencia de hialuronidasa.

Como se describe en la presente, una MPS es enfermedad de Hunter. La enfermedad de Hunter causa una acumulación de los glicosaminoglicanos dermatan sulfato y sulfato de heparano. En ciertos casos, la acumulación de los dermatan sulfato y sulfato de heparano dermatan sulfato y sulfato de heparano en la enfermedad de Hunter se asocia con una deficiencia en una sulfatasa. Como se describe en la presente, la MPS es la enfermedad de Hurler. En ciertos casos, la enfermedad de Hurler causa una acumulación de los glicosaminoglicanos dermatan sulfato y sulfato de heparano. En algunos casos, la acumulación de glicosaminoglicanos dermatan sulfato y sulfato de heparano en la enfermedad de Hurler se asocia con una deficiencia de una iduronidasa.

Como se describe en la presente, un trastorno asociado con degradación, biosíntesis y/o acumulación de glicosaminoglicanos anormal es una angiogénesis no deseada (por ejemplo, angiogénesis asociada con cáncer, ceguera diabética, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide o psoriasis), angiogénesis insuficiente (por ejemplo, enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular o retraso en la cicatrización de heridas), amiloidosis, lesión de la médula espinal, hipertrigliceridemia, inflamación o una herida.

En algunos casos, la amiloidosis está presente en diversas enfermedades que incluyen, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes tipo 2, enfermedad de Huntington, encefalopatías espongiiformes (Creutzfeld-Jakob, Kuru, Vaca loca), amiloidosis diabética, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedad de Still de adultos, síndrome de Behcet, fiebre mediterránea familiar, enfermedad de Crohn, lepra, osteomielitis, tuberculosis, bronquiectasias crónica, enfermedad de Castleman, enfermedad de Hodgkin, carcinoma de células renales, carcinoma del intestino, pulmón o tracto urogenital. En algunos casos, la enfermedad de Alzheimer está asociada con cambios en el contenido y estructura de uno o más GAG (por ejemplo, sulfato de heparano, sulfato de queratano, o similares).

Como se describe en la presente, los trastornos asociados con la acumulación anormal de glicosaminoglicanos incluyen trastornos asociados con biosíntesis anormal (por ejemplo, polimerización y/o sulfatación) de glicosaminoglicanos. En ciertos casos, la biosíntesis anormal de glicosaminoglicanos produce glicosaminoglicanos que no se degradan fácilmente por las enzimas que degradan glicosaminoglicanos normales. En algunos casos, los trastornos asociados con la biosíntesis GAG anormal incluyen la osteoartritis. En ciertos casos, la osteoartritis se asocia con cambios en la sulfatación del condroitin sulfato, cambios en la longitud del condroitin sulfato, cambios en los niveles de expresión del condroitin sulfato, o cualquier combinación de estos. En algunos casos, la osteoartritis se asocia con condroitin sulfato sulfotransferasa anormal. En ciertos casos, la osteoartritis está asociada con cambios en la sulfatación del dermatan sulfato, cambios en la longitud del dermatan sulfato, cambios en los niveles de expresión del dermatan sulfato, o cualquier combinación de estos. En ciertos casos, la osteoartritis está asociada con cambios en la sulfatación del sulfato de queratano, cambios en la longitud del sulfato de queratano, cambios en los niveles de expresión de queratan sulfato o cualquier combinación de estos.

Como se describe en la presente, un trastorno asociado con degradación, biosíntesis y/o acumulación de glicosaminoglicanos anormal es la distrofia corneal macular. En algunos casos, la distrofia corneal macular se asocia con bajas cantidades de queratan sulfato. Como se describe en la presente, los niveles de queratan sulfato se deben a la falla en la iniciación de la síntesis de queratan sulfato, polimerización de la longitud de la cadena de queratan sulfato, o cualquier combinación de estos.

Como se describe en la presente, un trastorno asociado con degradación, biosíntesis y/o acumulación de glicosaminoglicanos anormal es una enfermedad infecciosa o viral. Como se describe en la presente, la enfermedad infecciosa o viral incluye herpes, difteria, virus del papiloma, hepatitis, VIH, coronavirus o adenovirus.

Como se describe en la presente, un trastorno asociado con degradación, biosíntesis y/o acumulación de glicosaminoglicanos anormal es un cáncer. Como se describe en la presente, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer cervical, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de próstata, melanoma, osteosarcoma, cáncer de endometrio, mieloma múltiple, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides,

neuroblastoma o linfoma no Hodgkin.

5 En ciertos casos, el cáncer está asociado con una despolimerización y degradación de sulfato de heparano anormal que produce sulfato de heparano acumulado y no unido. Si en algunos casos, la despolimerización y degradación anormal de sulfato de heparano está asociada con melanomas, gliomas, mielomas múltiples, cáncer de ovario, mama, colon, cervical, pancreático, gástrico y esofágico. En ciertos casos, la despolimerización y degradación anormal del sulfato de heparano contribuye a angiogénesis, metástasis y movilización del factor de crecimiento. En algunos casos, la despolimerización y degradación anormal de sulfato de heparano proviene de la actividad aumentada de una heparanasa.

10 En ciertos casos, el cáncer se asocia con una sulfatación anormal del sulfato de heparano que produce sulfato de heparano acumulado. En algunos casos, la sulfatación anormal de sulfato de heparano está asociada con carcinoma de colon, mieloma, cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de próstata. En algunos casos, la sulfatación con sulfato de heparano está disminuida en ciertos cánceres, mientras que en otras realizaciones; aumenta la sulfatación con sulfato de heparano. En algunos casos, la sulfatación anormal de sulfato de heparano es causada por la función anormal de sulfotransferasa de sulfato de heparano.

15 En ciertos casos, el cáncer se asocia con condroitin sulfato anormal como se describe en la sulfatación. Como se describe en la presente, la sulfatación anormal de condroitin sulfato está asociada con cáncer de pulmón. En algunos casos, la sulfatación de condroitin sulfato está aumentada en ciertos cánceres. En ciertos casos, la sulfatación anormal de condroitin sulfato es causada por una función anormal de la condroitin sulfato sulfotransferasa. En algunos casos, el aumento de la producción de condroitin sulfato se asocia en cáncer de mama, melanoma y fibroblastos transformados..

20 En ciertos casos, el cáncer se asocia con En ciertos casos, el cáncer está asociado con la expresión de dermatan sulfato epimerasa. En algunos casos, la expresión de la dermatan sulfato epimerasa está aumentada en el carcinoma de células escamosas, glioma, cáncer ginecológico, cáncer pancreático, carcinoma colorrectal y cáncer de próstata. En ciertos casos, el cáncer está asociado con la acumulación de niveles de dermatan sulfato. En algunos casos, los niveles de dermatan sulfato están aumentados en el cáncer de páncreas.

25 En ciertos casos, el cáncer se asocia con una sulfatación de queratan sulfato anormal. En algunos casos, la sulfatación de queratan sulfato anormal está asociada con glioblastomas. En ciertos casos, la sulfatación de queratan sulfato anormal es causada por una función anormal de queratan sulfato sulfotransferasa. En algunos casos, la expresión de queratan sulfato aumenta en los glioblastomas.

30 En ciertos casos, el cáncer se asocia con una acumulación anormal de hialuronano. En algunos casos, la acumulación de hialuronano anormal está asociada con cáncer de mama, cáncer de próstata, subtipos agresivos de linfoma no Hodgkin y cáncer colorrectal. En ciertos casos, la acumulación de hialuronano contribuye a la metástasis de ciertos cánceres. En algunos casos, la acumulación de hialuronano proviene de la sobreexpresión de una

35 Hialuronano sintasa.

Pruebas de fármacos

En la presente se describe un proceso para identificar un agente que inhibe la acumulación de glicosaminoglicanos en una célula, el proceso que comprende:

40 a. poner en contacto una pluralidad de células de mamífero con un compuesto, la pluralidad de células de mamífero es de una línea celular que acumula una cantidad anormal de glicosaminoglicanos;

b. incubar las células de mamífero con el compuesto;

c. opcionalmente transformar las células de mamífero por ejemplo, mediante el aislamiento de una población de glicosaminoglicanos de las células (por ejemplo, usando cualquier método descrito en la presente);

d. poner en contacto las células de mamífero y/o la población

45 aislada de glicosaminoglicanos de la etapa (c) con una GAG liasa (por ejemplo, heparina liasa);

e. purificar una subpoblación de oligosacáridos de la etapa (d) (por ejemplo, , usando cualquier método descrito en la presente);

f. detectar la presencia de y/o medir la cantidad de uno o más oligosacáridos presentes en la subpoblación (por ejemplo, usando LC-MS o GC-MS); y

50 g. mostrar o registrar una caracterización de la subpoblación de uno o más oligosacáridos.

En ciertos casos, las células de mamífero se transforman opcionalmente por ejemplo, por marcación de una

población de glicosaminoglicanos en y/o en las células con una marca detectable. En algunos casos, las células de mamífero se transforman opcionalmente por ejemplo, por aislamiento de una población de glicosaminoglicanos en y/o en las células usando cualquier técnica de purificación adecuada descrita en la presente.

5 Como se describe en la presente, la célula está presente en un individuo (por ejemplo, un ser humano u otro mamífero) y se incubaba a temperatura corporal. Como se describe en la presente; la línea celular que acumula una cantidad anormal de glicosaminoglicanos que es una línea celular de mucopolisacaridosis (MPS) (por ejemplo, una línea celular de MPS humana). La línea celular MPS es una línea celular para MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIIC, MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI, MPS VII, MPS IX o una combinación de estos, Como se describe en la presente, la línea celular MPS humana está presente en un ser humano u otro mamífero. Como se describe en la presente, los inhibidores de la acumulación de glicosaminoglicanos son compuestos que reducen la velocidad de acumulación de glicosaminoglicanos en la célula y/o agentes que reducen la cantidad total de glicosaminoglicanos acumulados en la célula (es decir, disminuyen la cantidad De glicosaminoglicano que se ha acumulado en la célula). Los agentes que opcionalmente se analizan para el proceso de selección descrito en la presente incluyen cualquier compuesto tal como, a modo de ejemplo no limitante, un polinucleótido (por ejemplo, ARNs), un polipéptido o un compuesto de molécula pequeña (por ejemplo, que tiene un peso molecular menor de 2.000 g/mol).

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Purificación: La muestra biológica (células, tejido, sangre, suero, o similares) se homogeniza y solubiliza en NaOH 0,1 - 1,0 N (por ejemplo, 0,1 N, 0,2 N, 0,3 N, 0,4 N, 0,5 N, 0,6 N, 0,7 N, 0,8 N, 0,9 N, o 1,0 N) o ácido acético y después se neutraliza con ácido acético o NaOH. A continuación se toma una pequeña muestra para medir el contenido de proteína de la muestra usando métodos estándares. 0,01 - 0,5 mg/mL (0,01 mg/mL, 0,07 mg/mL, 0,12 mg/mL, 0,17 mg/mL, 0,22 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,32 mg/mL, 0,37 mg/mL, 0,42 mg/mL, o 0,5 mg/mL) proteasa (tripsina, quimotripsina, pepsina, pronasa, papaína, o elastasa) se trata en 0,1 - 0,5 M (por ejemplo, 0,1 M, 0,16 M, 0,23 M, 0,32 M, 0,39 M, 0,44 M, o 0,5 M) NaCl, 0,01 - 0,1 M (por ejemplo, 0,01 M, 0,02 M, 0,04 M, 0,06 M, 0,08 M, 0,1 M) NaOAc, a pH 5,5 - 7,5 (por ejemplo, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, o 7,5) y 25 - 40 C (por ejemplo, 25 C, 30 C, 35 C, o 40 C) durante 1 - 24 horas (por ejemplo, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h). La muestra se diluye para reducir la fuerza iónica y se carga en una columna de intercambio iónico en 5 - 100 mM (por ejemplo, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM) NaOAc pH 5 - 7 con 0 - 300 mM NaCl. Después de lavar, los glicosaminoglicanos unidos se eluyen con 5 - 100 mM NaOAc pH 5 - 7 (por ejemplo, 5, 5,5, 6, 6,5, 7) con 0,8 - 3 M (por ejemplo, 0,8 M, 1 M, 1,2 M, 1,4 M, 1,6 M, 1,8 M, 2 M, 2,5 M, o 3 M) NaCl. Los glicanos eluidos luego se concentran y desalinizan mediante precipitación con etanol, exclusión por tamaños, o otros métodos. Los glicanos purificados se secan para análisis posterior.

Ejemplo 2 — Digestión: Digestión con liasa: Los glicanos purificados se resuspenden en 10 — 300 mM de acetato de sodio, tris, fosfato, u otro buffer adecuado, 0,02 - 1 mM (por ejemplo, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, o 1) acetato de calcio, pH 5 — 8 (por ejemplo, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, o 8), se digirieron con heparina liasas I, II, III, I y II, I y III, II y III, o I, II, y III (0,0,15 - 1,5 miliunidades de cada uno en reacciones de 100-u1, IBEX, Montreal, Canadá) a 25 a 37 °C durante 1 a 24 horas.

Ejemplo 3 — Marcación: La muestra de glicanos seca se resuspende en 2 — 100 µL 0,003 — 0,1 M (por ejemplo, 0,003 M, 0,003 M, 0,03 M, 0,06 M, 0,1 M) AB, AA, AMAC, o colorante Bodipy y se incubaba a temperatura ambiente durante 1 — 120 minutos (por ejemplo, 1-10 min, 10-15 min, 15-20 min, 20-25 min, 25-30 min, 30-40 min, 40-50 min, 50-60 min, 60-90 min, 90-120 min). A continuación, la reacción se inicia con 2 — 100 µL (2 µL, 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL, 25 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL, 60 µL, 70 µL, 80 µL, 90 µL, o 100 µL) 1 M NaCNBH₄ y la reacción se dejó proceder a 25 — 100 C. (por ejemplo, 25 C, 30 C, 35 C, 40 C, 50 C, 60 C, 70 C, 80 C, 90 C, 100 C).

Ejemplo 4 — Detección: la separación HPLC de sacáridos marcados se realizó usando las siguientes condiciones:

• Tipos de columnas: 130A BEH partícula Fenilo (1,7, 2,5, 3,5, 5 ó 10 µM de tamaño de partícula), 130A BEH partícula C18 (1,7, 2,5, 3,5, 5, o 10 µM de tamaño de partícula), HSS partícula C18 (1,8, 3,5, o 5 µM de tamaño de partícula), o 300A BEH partícula C18 (1,7, 3,5, 5, 10 µM de tamaño de partícula) con longitud y diámetro interno adecuados.

• Condiciones de buffer:

o A = Acetato de amonio 10 mM con 0 — 20% metanol

50 o B = 100% Metanol

o Condiciones iniciales: 70 — 95% A, 0 — 30% B

• El caudal de flujo es constante a 0,05 — 1 ml/min

• Corridas a gradiente hasta 70 — 90% A, 10 — 30% B durante 5 — 65 min.

• A 8,1 mM corridas con gradiente hasta 0 - 20% A, 80 - 100% B durante 5 — 20 min.

- 5 — 65 min retorna a las condiciones iniciales

Los oligosacáridos marcados fluorescentemente (disacáridos) se detectaron a diversos tiempos de elución de acuerdo con el marcador específico producido de interés. El orden de elución de los estándares de disacáridos insaturados fue:

- 5 • 2SNS6S
- NS6S
- 2SNS
- NS
- NA6S
- 10 • NA

Ejemplo 5:

Se probó la capacidad de un método de detección del extremo no reductor para identificar y clasificar muestras de MPS mediante el análisis ciego de los GAGs normales y de MPS a partir de fibroblastos cultivados. Los cultivos de fibroblastos primarios humanos de pacientes MPS con MPS I, II, HA y IIIB (GM01256, GM00298, GM00879, y GM01426, respectivamente) se obtuvieron del NIGMS Human Genetic Cell Repository. Las células se sembraron a alta densidad y se dejaron acumular GAGs durante 7-14 días. En la recolección, se aislaron los GAG utilizando el procedimiento descrito en las especificaciones. Los GAG totales se digirieron con heparina-liasas para la terminación. Una porción de los fragmentos de GAG digeridos se analizó mediante cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas por electroaspersión a presión atmosférica de los oligosacáridos derivatizados con anilina para determinar si los biomarcadores de diagnóstico estaban presentes. Figuras 27-31- El Panel A muestra estructuras representativas de los oligosacáridos predichos para cada clase de MPS. - Figura 27-31 Los paneles B, C, D y E muestran las corrientes iónicas extraídas para biomarcadores representativos para MPS I, MPS II, MPS IIIA y MPS IIIB, respectivamente. El análisis MS se realizó de acuerdo con los métodos de Lawrence et al. J Biol Chem. 2008 Nov 28;283(48):33674-84. Las inserciones son los espectros MS correspondientes a las estructuras finales no reductoras detectadas. Mediante la combinación del defecto degradativo conocido con los datos de espectrometría de masas, las estructuras reales de los biomarcadores se pueden deducir o reducir a unas pocas estructuras probables. La sensibilidad del método para detectar e identificar correctamente la enfermedad de MPS a partir de muestras de cultivo de células pequeñas indica que este método tiene la sensibilidad para trabajar en muestras clínicamente relevantes, tales como sangre u orina.

30 Ejemplo 6:

Se utilizó el método de biomarcador del extremo no reductor para medir la acumulación de GAG en el modelo de ratón de MPS IIIB. Los informes anteriores han tenido dificultades para medir la acumulación de GAG en el cerebro, a pesar de la validación microscópica de las inclusiones lisosomales. Esto ha sido especialmente desconcertante porque el fenotipo primario en pacientes MPS IIIB son los síntomas neurológicos. Los autores usaron este desafiante caso para determinar si este método de biomarcador puede detectar la acumulación de GAG en los tejidos difíciles. Se homogeneizaron muestras de tejido de 20 mg (peso húmedo) y se purificaron los GAGs celulares totales usando el método descrito en las especificaciones. Los GAG purificados luego se trataron con heparina-liasas para liberar los extremos no reductores únicos de la colección heterogénea de fragmentos. La presencia de los biomarcadores MPS IIIB {(dp3-1Ac, 2S), (dp3 (IAc, 3S), y (dp3 (IAc, 4S)) se analizó por LC-MS Estos estudios verifican que la acumulación GAG se está produciendo en el cerebro..

Ejemplo de referencia 7

Diagnóstico de la enfermedad:

Los siguientes datos se generan mediante la medición de abundancia de un disacárido saturado liberado de GAGs por heparina-liasas que se acumulan en muestras de MPS I. Usando el método descrito, el disacárido saturado analizado eluye a 3,07 minutos.

Ejemplo 7A En estos estudios, se analizaron 9 µl de muestras de orina congelada de perros afectados con MPS I y perros portadores (no afectados) para detectar la presencia de disacáridos saturados liberados del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad. Los picomoles de disacárido saturado por mililitro de suero se muestran en la Figura 35. La Figura 35 ilustra que el ensayo es útil para detectar la presencia de enfermedad MPS en muestras de orina.

Ejemplo 7B: En estos estudios se analizaron 30 µl de muestras de suero congeladas de perros afectados con MPS I y perros portadores (no afectados) para detectar la presencia de disacáridos saturados liberados del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad. Los picomoles de disacárido saturado por mililitro de suero se

muestran en la Figura 36. La Figura 36 ilustra que este ensayo es útil para identificar la presencia de la enfermedad de MPS (por ejemplo, MPS I) en suero. Utilizando los marcadores únicos apropiados para otras clases de MPS, se logra lo mismo para otras clases de MPS.

5 Ejemplo 7C: En estos estudios se analizaron 30 µl de muestras de CSF congeladas de perros afectados con MPS I y perros portadores (no afectados) para detectar la presencia de disacáridos saturados liberados del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad. Los picomoles de disacárido saturado por mililitro de CSF se muestran en la Figura 37. La Figura 37 ilustra que este método es útil para detectar la enfermedad en CSF de pacientes con MPSs.

10 Ejemplo 7D: Para determinar si el ensayo de acumulación de GAG descrito aquí es capaz de detectar la enfermedad de MPS I en muestras de tejido, se analizó la acumulación de GAG en muestras de corteza de 2,5 mg tomada de perro no afectado y afectado con MPS I. Las muestras se analizaron para detectar la presencia del disacárido saturado liberado del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad. Las picomoles de disacárido saturado por miligramo de corteza se muestran en la Figura 38. La Figura 38 ilustra que este método es útil para detectar la enfermedad de MPS en muestras de tejido de pacientes.

15 Ejemplo de referencia 8- Diagnóstico de la gravedad de la enfermedad:

Los siguientes datos se generan mediante la medición de la abundancia de un disacárido saturado liberado de GAGs por heparina-liasas que se acumulan en muestras de MPS I. Usando el método descrito, este disacárido saturado analizado eluye a 3,07 minutos.

20 En estos estudios se analizaron 30 µl de muestras de suero congeladas de perros afectados con MPS I para medir el nivel de acumulación de GAG en cada perro. Debido a que el modelo de perro MPS I es un modelo natural y genéticamente heterogéneo, existe una variación significativa en la gravedad de la enfermedad entre perros individuales. Estas diferencias en la gravedad de la enfermedad se revelan por las variaciones en el nivel de acumulación de GAG entre los perros individuales usando los métodos descritos en la presente. Las muestras se analizan para detectar la presencia del disacárido saturado liberado del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad. Las picomoles de disacárido saturado por mililitro de suero se muestran en la Figura 39. La Figura 39 ilustra que este método se puede usar para detectar la respuesta al tratamiento en suero de pacientes MPS.

Ejemplo de referencia 9 - Control de la respuesta a la terapia:

30 Los siguientes datos se generan mediante la medición de la abundancia de un disacárido saturado liberado de GAGs por heparina-liasas que se acumulan en muestras de MPS I. Usando el método descrito, este disacárido saturado analizado eluye a 3,07 minutos. Ejemplo 9A: En estos estudios se analizaron 30 µl de muestras de CSF congeladas de perros afectados antes del tratamiento (no tratado) y después del tratamiento intratecal (IT) mensual con laronidasa (tratado). Las muestras se analizaron para detectar la presencia del disacárido saturado liberado del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad. Las picomoles de disacárido saturado por mililitro de CSF se muestran en la Figura 40. La Figura 40 ilustra que este método es útil para detectar la respuesta al tratamiento en CSF de pacientes con MPS.

40 Ejemplo 9B: Para determinar si el ensayo de acumulación de GAG descrito aquí es capaz de medir diferentes niveles de respuesta a los tratamientos, se analizó un grupo de perros MPS I que se trataron con laronidasa IT con respecto a su nivel de anticuerpos dirigidos para terapia. Los perros "tolerantes" son perros que no montan una reacción inmunitaria significativa al tratamiento con laronidasa mientras que los perros "no tolerantes" montan una respuesta significativa de anticuerpos. Se espera que esta respuesta de anticuerpos reduzca la eficacia de la terapia de reemplazo enzimático, la laronidasa. Para determinar si el ensayo puede detectar esta respuesta diferencial, se emplearon 30 µl de muestras de CSF congeladas de perros afectados con MPS I antes del tratamiento (sin tratamiento) y después de tratamiento intratecal mensual (IT) con 0,58 mg/kg de laronidasa (tratado).

45 Las muestras se analizaron para detectar la presencia del disacárido saturado liberado del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad y se resumieron con respecto a su clase de tolerancia. La respuesta a la terapia se muestra para tres perros diferentes afectados con MPS I. Las picomoles de disacárido saturado por mililitro de CSF se muestran en la Figura 41. La Figura 41 ilustra que este método es útil para detectar la respuesta diferencial a la terapia en CSF de pacientes con MPS. En algunas realizaciones, este procedimiento se utiliza para guiar el tratamiento para pacientes individuales.

50 Ejemplo 9C: Para determinar si el ensayo de acumulación de GAG descrito aquí es capaz de detectar una respuesta a la terapia en la enfermedad MPS I en muestras de tejido tratadas con laronidasa IT, se analizó la acumulación de GAG en muestras de 2,5 mg de corteza extraída de perros no afectados y afectado con MPS I. Se observa la respuesta diferencial a la terapia sobre la base del estado de tolerancia de los perros específicos. Las muestras se analizan para detectar la presencia del disacárido saturado liberado del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad y se resumieron con respecto a su clase de tolerancia. La respuesta a la terapia se muestra para tres perros diferentes afectados con MPS I. Las picomoles de disacárido saturado por mililitro de CSF se muestran en la Figura 42. La Figura 42 ilustra que este método es útil para detectar la respuesta a la terapia en

muestras de tejidos de pacientes.

5 Ejemplo 9D: En estos estudios se analizaron 30 µl de muestras de suero congelado de perros afectados con MPS I antes del tratamiento (muestra # 1) y muestras mensuales hasta el tratamiento IV semanal con laronidasa (muestras #2, 3, 4, etc.). Se tomaron inmediatamente muestras de suero antes de la siguiente infusión IV. Las muestras se analizaron para detectar la presencia de disacáridos insaturados liberados del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad. La respuesta al tratamiento se muestra para tres perros diferentes afectados con MPS I. Las picomoles de estas estructuras por mililitro de suero se muestran en la Figura 43. La Figura 43 ilustra que este método es útil para detectar la respuesta al tratamiento en suero de pacientes con MPS.

10 Ejemplo de referencia 10: Diagnóstico de portadores: Para determinar si el ensayo de acumulación de GAG descrito aquí es capaz de detectar portadores de la causa genética de MPS I, se analizaron perros de tipo salvaje y perros que son heterocigotos para la mutación causante de MPS I. Se supone que los portadores carecen de cualquier manifestación clínica de MPS I; sin embargo, es posible que la deficiencia parcial en una enzima lisosómica conduzca a niveles bajos de acumulación de GAG que pueden ser detectados con este ensayo. Las muestras se
15 analizaron para detectar la presencia de disacáridos saturado insaturado liberados del extremo no reductor de los glicanos que causan la enfermedad y se resumieron con respecto a su clase de tolerancia. Las picomoles de disacárido saturado por miligramo de tejido se muestran en la Figura 44. La Figura 44 ilustra que el método descrito aquí es útil para detectar portadores de la causa genética de MPS.

REIVINDICACIONES

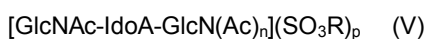
1. Un proceso para diagnosticar la presencia de un trastorno de mucopolisacaridosis IIIB (MPS IIIB) en un individuo, el proceso comprende las etapas de:

5 a) generar un biomarcador que comprende uno o más oligosacáridos de extremo no reductor, donde el biomarcador es un oligosacárido saturado y se genera mediante el tratamiento de una población de sulfatos de heparano purificados aislados de una muestra biológica del individuo, con glicosaminoglicano liasas de digestión, donde antes del tratamiento con liasa, el biomarcador no está presente en abundancia en las muestras de individuos con el trastorno MPS IIIB con respecto a los individuos sin el trastorno MPS IIIB, y

10 b) usar un instrumento analítico para detectar la presencia de y/o medir la cantidad de biomarcador producido y mostrar o registrar la presencia de una medición de una población del biomarcador,

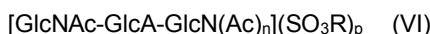
donde la presencia y/o cantidad de el biomarcador se utiliza para determinar la presencia del trastorno MPS IIIB,

15 donde la glicosaminoglicano liasa de digestión comprende heparina liasa I, heparina liasa II y heparina liasa III, y donde el biomarcador se selecciona de trisacáridos de acuerdo con la fórmula V



donde n es 0-1 y p es 0-3;

trisacáridos de acuerdo con la fórmula VI



20 donde n es 0-1 y p es 0-2; y

trisacáridos de acuerdo con la fórmula XVI



25 2. El proceso según la reivindicación 1, donde los trisacáridos se seleccionan de GlcNAc-IdoA-GlcNAc, GlcNAc-IdoA2SGlcNAc, GlcNAc-IdoA-GlcNS, GlcNAc-IdoA2S-GlcNS, GlcNAc-IdoA-GlcNAc6S, GlcNAc-IdoA2S-GlcNAc6S, GlcNAc-IdoA-GlcNS6S,

GlcNAc-IdoA2S-GlcNS6, GlcNAc-GlcA-GlcNAc, GlcNAc-GlcA-GlcNS, GlcNAcGlcA-GlcNAc6S, y GlcNAc-GlcA-GlcNS6S.

30 3. El proceso según la reivindicación 1 ó 2, donde una muestra biológica transformada se genera mediante el tratamiento de la población de sulfatos de heparano purificados con la glicosaminoglicano liasa de digestión en la etapa a) de la reivindicación 1, y el proceso además comprende purificar una población de oligosacáridos en la muestra biológica transformada.

4. El proceso según la reivindicación 3, donde la población de oligosacáridos se purifica de la muestra biológica transformada usando cromatografía o electroforesis.

35 5. El proceso según la reivindicación 3 ó 4, donde el proceso también comprende marcar el extremo reductor de una porción representativa del oligosacáridos en la muestra biológica transformada con una marca detectable.

6. El proceso según la reivindicación 5, donde el extremo reductor de los oligosacáridos de la muestra biológica transformada se marca con una marca detectable.

7. El proceso según la reivindicación 5 ó 6, donde la marca detectable es una marca de masa, una marca de radio, una marca fluorescente, una marca de cromóforo, o una marca de afinidad.

40 8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el proceso para diagnosticar el trastorno MPS IIIB en un individuo es un proceso de diagnosticar un individuo como un portador heterocigota del trastorno de MPS IIIB.

Figura 1

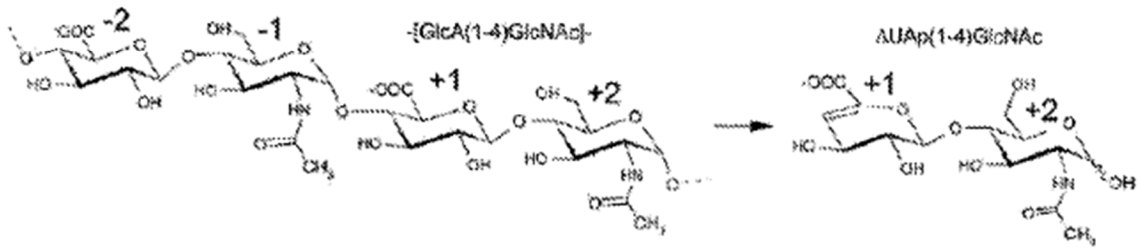


FIGURA 2

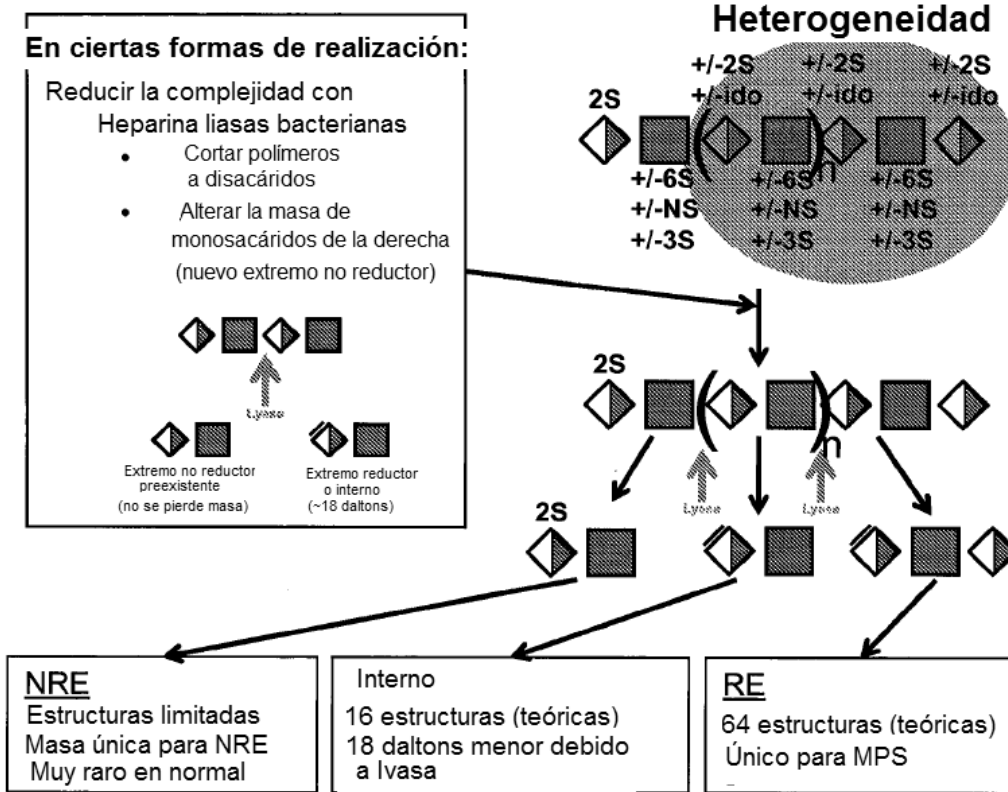
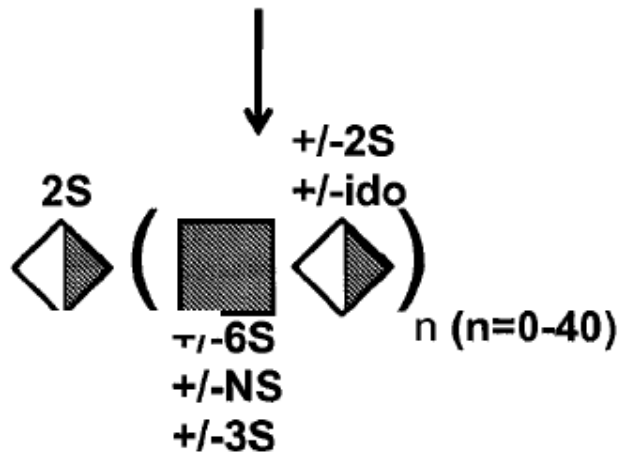
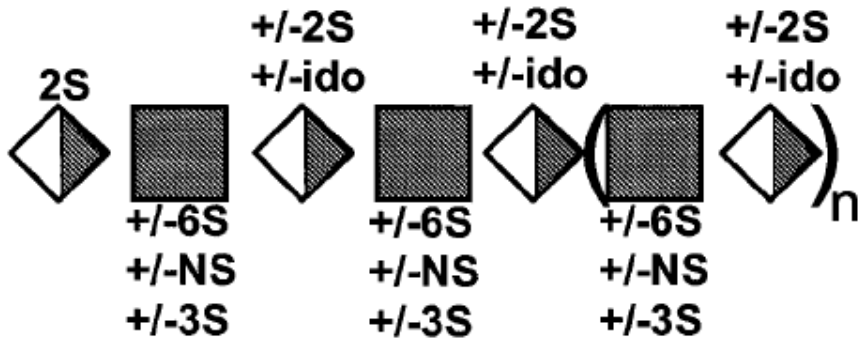


FIGURA 3A



↓ Basado en 6 disacáridos comunes

Número de estructuras potenciales

- n=0 2 estructuras
- n=1 12
- n=2 72
- n=3 732
- n=4 2,592
- n=5 15,552

FIGURA 3B



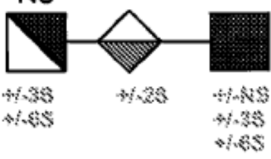
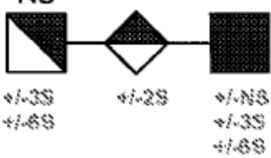


Clase MPS	NRE (Extremo no reductor)		Interna
No afectado	Heterogéneo (niveles muy bajos)		Composición normal 32 estructuras teóricas, 6 comunes Enlace doble generado por liasa (~18 daltons)
MPS I Iduronidasa	 +/-NS +/-3S +/-6S	Masa marcada Ido-Y 0-3 sulfatos 8 estructuras teóricas	Composición normal 32 estructuras teóricas, 6 comunes Enlace doble generado por liasa (~18 daltons)
MPS II 2-Sulfatasa	2S  +/-NS +/-3S +/-6S	Masa marcada Ido2S-Y por ejemplo, 1-4 sulfatos 16 estructuras teóricas	Composición normal 32 estructuras teóricas, 6 comunes Enlace doble generado por liasa (~18 daltons)
MPS IIA N-Sulfatasa	NS  +/-3S +/-6S +/-NS +/-3S +/-6S NS  +/-3S +/-6S +/-2S +/-NS +/-3S +/-6S	Masa marcada GlcNS-X-Y por ejemplo, 1-6 sulfatos 64 estructuras teóricas	Composición normal 32 estructuras teóricas, 6 comunes Enlace doble generado por liasa (~18 daltons)
MPS IIIB N-acetil-glucosaminidasa	 +/-3S +/-6S +/-2S +/-NS +/-3S +/-6S  +/-3S +/-6S +/-2S +/-NS +/-3S +/-6S	Masa marcada GlcNAc-X-Y por ejemplo, 0-4 sulfatos 32 estructuras teóricas	Composición normal 32 estructuras teóricas, 6 comunes Enlace doble generado por liasa (~18 daltons)

FIGURA 3C






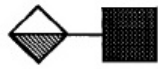
Clase MPS	NRE (Extremo no reductor)		Interna
<p>MPS III GlcN Acetil-transferasa</p>	 <p>+/-3S +/-2S +/-NS +/-6S +/-3S +/-6S</p>  <p>+/-3S +/-2S +/-NS +/-6S +/-3S +/-6S</p>	<p>Masa marcada GlcNS-X-Y por ejemplo, 0-5 sulfatos 64 estructuras teóricas</p>	<p>Composición normal 32 estructuras teóricas, 6 comunes Enlace doble generado por liasa (~18 daltons)</p>
<p>MPS IIID GlcNAc 6-Sulfatasa</p>	<p>6S</p>  <p>+/-3S +/-2S +/-NS +/-3S +/-6S</p> <p>6S</p>  <p>+/-3S +/-2S +/-NS +/-3S +/-6S</p>	<p>GlcAc6S-X-Y por ejemplo, 1-4 sulfatos 32 estructuras teóricas</p>	<p>Composición normal 32 estructuras teóricas, 6 comunes Enlace doble generado por liasa (~18 daltons)</p>
<p>MPS VII Glucuronidasa</p>	 <p>+/-NS +/-3S +/-6S</p>	<p>GlcA-X en MPS VII 0-3 sulfatos 8 estructuras teóricas</p>	<p>Composición normal 32 estructuras teóricas, 6 comunes Enlace doble generado por liasa (~18 daltons)</p>

Figura 4



F6rmula I-A



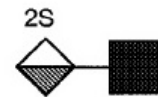
F6rmula I-B

NS



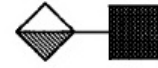
F6rmula I-C

NS



F6rmula I-D

2S



F6rmula I-E

NS

2S



F6rmula I-F

6S

2S



F6rmula I-G

NS

Figura 5

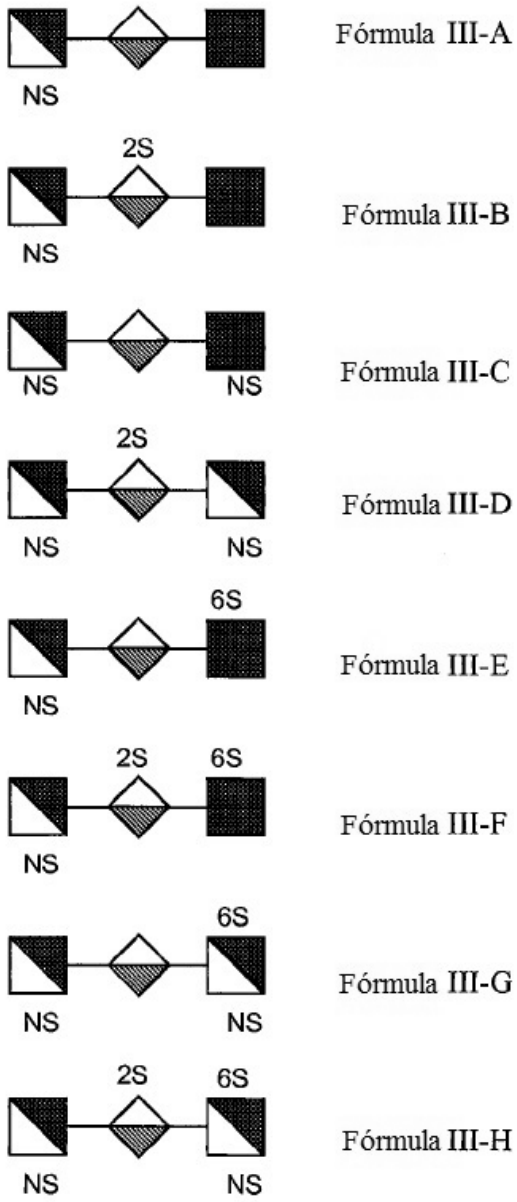
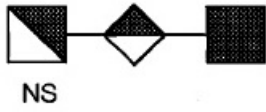


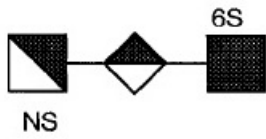
Figura 6



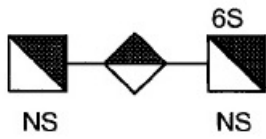
Fórmula IV-A



Fórmula IV-B

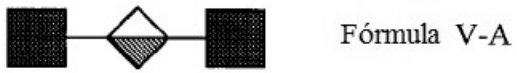


Fórmula IV-C



Fórmula IV-D

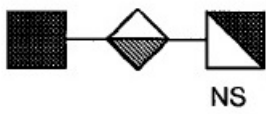
Figura 7



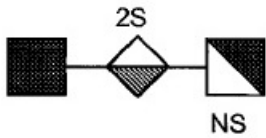
Fórmula V-A



Fórmula V-B



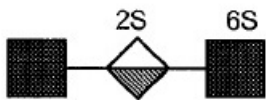
Fórmula V-C



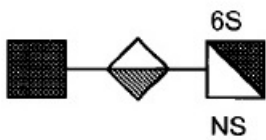
Fórmula V-D



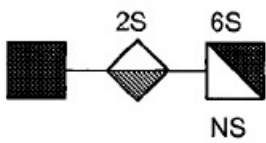
Fórmula V-E



Fórmula V-F



Fórmula V-G



Fórmula V-H

Figura 8



Fórmula VI-A



Fórmula VI-B

NS



Fórmula VI-C

6S



Fórmula VI-D

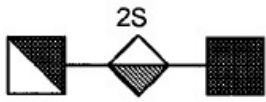
6S

NS

Figura 9



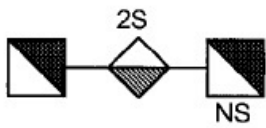
Fórmula VII-A



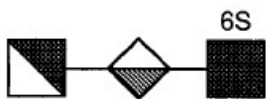
Fórmula VII-B



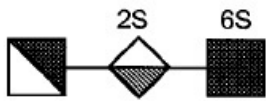
Fórmula VII-C



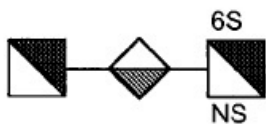
Fórmula VII-D



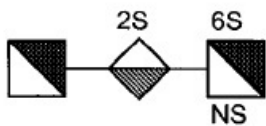
Fórmula VII-E



Fórmula VII-F



Fórmula VII-G



Fórmula VII-H

Figura 10



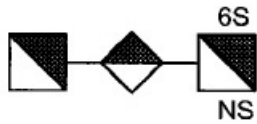
Fórmula VIII-A



Fórmula VIII-B



Fórmula VIII-C



Fórmula VIII-D

Figura 11

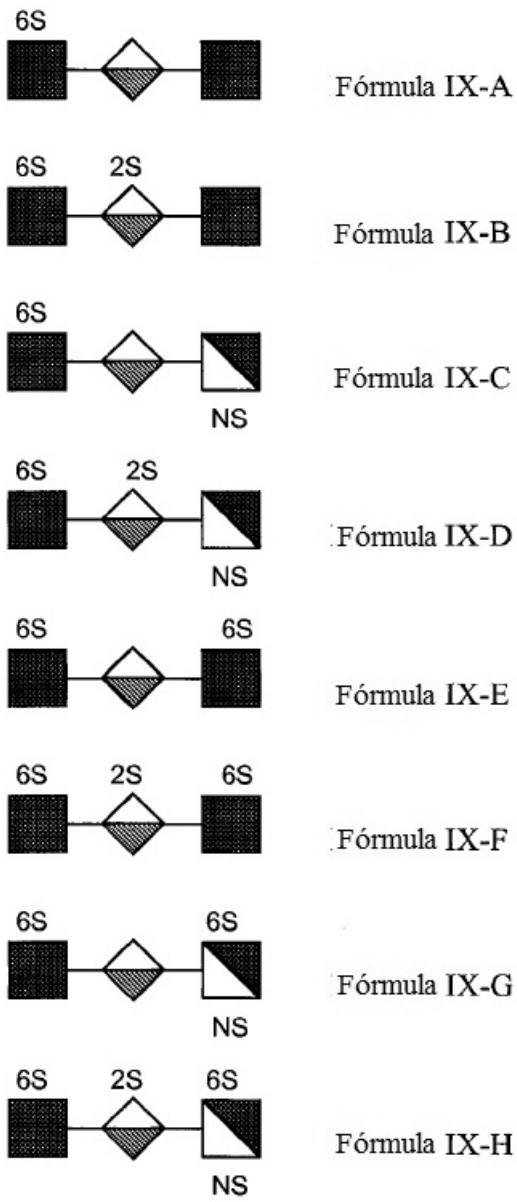


Figura 12

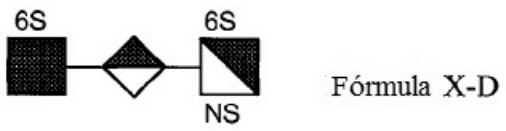
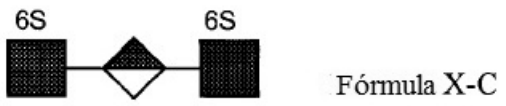
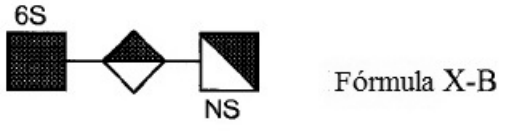
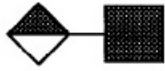
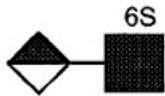


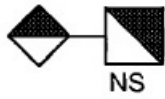
Figura 13



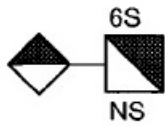
Fórmula XI-A



Fórmula XI-B

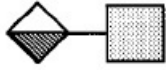


Fórmula XI-C

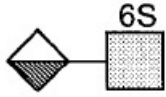


Fórmula XI-D

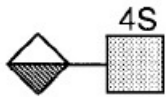
Figura 14



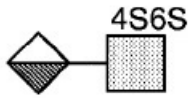
Fórmula XII-A



Fórmula XII-B

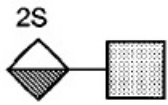


Fórmula XII-C

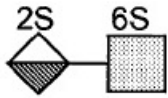


Fórmula XII-D

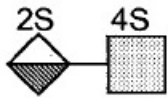
Figura 15



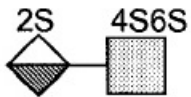
Fórmula XIII-A



Fórmula XIII-B



Fórmula XIII-C

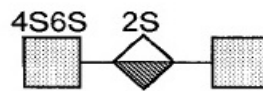


Fórmula XIII-D

Figura 16



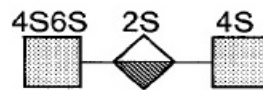
Fórmula XIV-A



Fórmula XIV-I



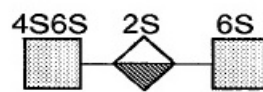
Fórmula XIV-B



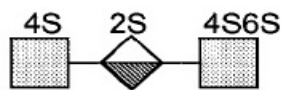
Fórmula XIV-J



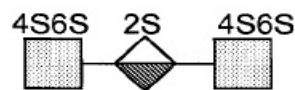
Fórmula XIV-C



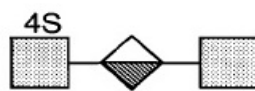
Fórmula XIV-K



Fórmula XIV-D



Fórmula XIV-L



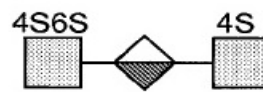
Fórmula XIV-E



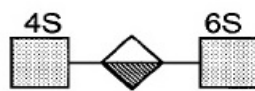
Fórmula XIV-M



Fórmula XIV-F



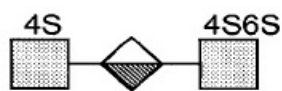
Fórmula XIV-N



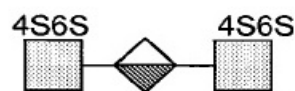
Fórmula XIV-G



Fórmula XIV-O



Fórmula XIV-H

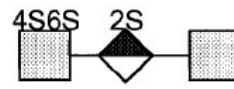


Fórmula XIV-P

Figura 17



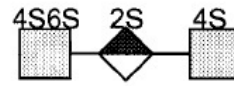
Fórmula XV-A



Fórmula XV-I



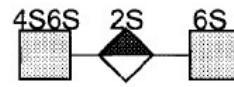
Fórmula XV-B



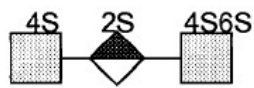
Fórmula XV-J



Fórmula XV-C



Fórmula XV-K



Fórmula XV-D



Fórmula XV-L



Fórmula XV-E



Fórmula XV-M



Fórmula XV-F



Fórmula XV-N



Fórmula XV-G



Fórmula XV-O

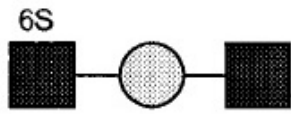


Fórmula XV-H

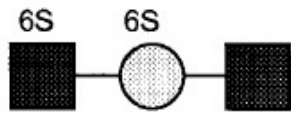


Fórmula XV-P

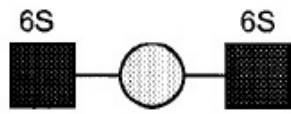
Figura 18



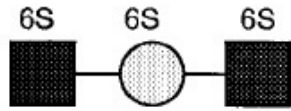
Fórmula XVIII-A



Fórmula XVIII-B

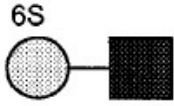


Fórmula XVIII-C

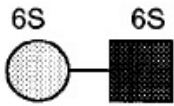


Fórmula XVIII-D

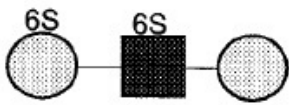
Figura 19



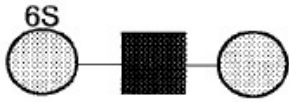
Fórmula XIX-A



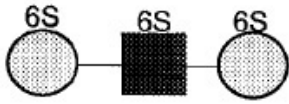
Fórmula XIX-B



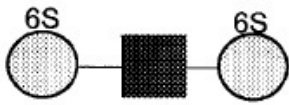
Fórmula XIX-C



Fórmula XIX-D

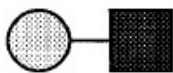


Fórmula XIX-E

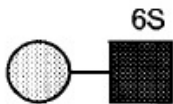


Fórmula XIX-F

Figura 20

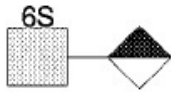


Fórmula XX-A

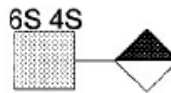


Fórmula XX-B

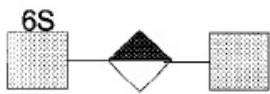
Figura 21



Fórmula XXX-A



Fórmula XXX-B



Fórmula XXX-C



Fórmula XXX-D



Fórmula XXX-E



Fórmula XXX-F



Fórmula XXX-G



Fórmula XXX-H



Fórmula XXX-I



Fórmula XXX-J

Figura 22

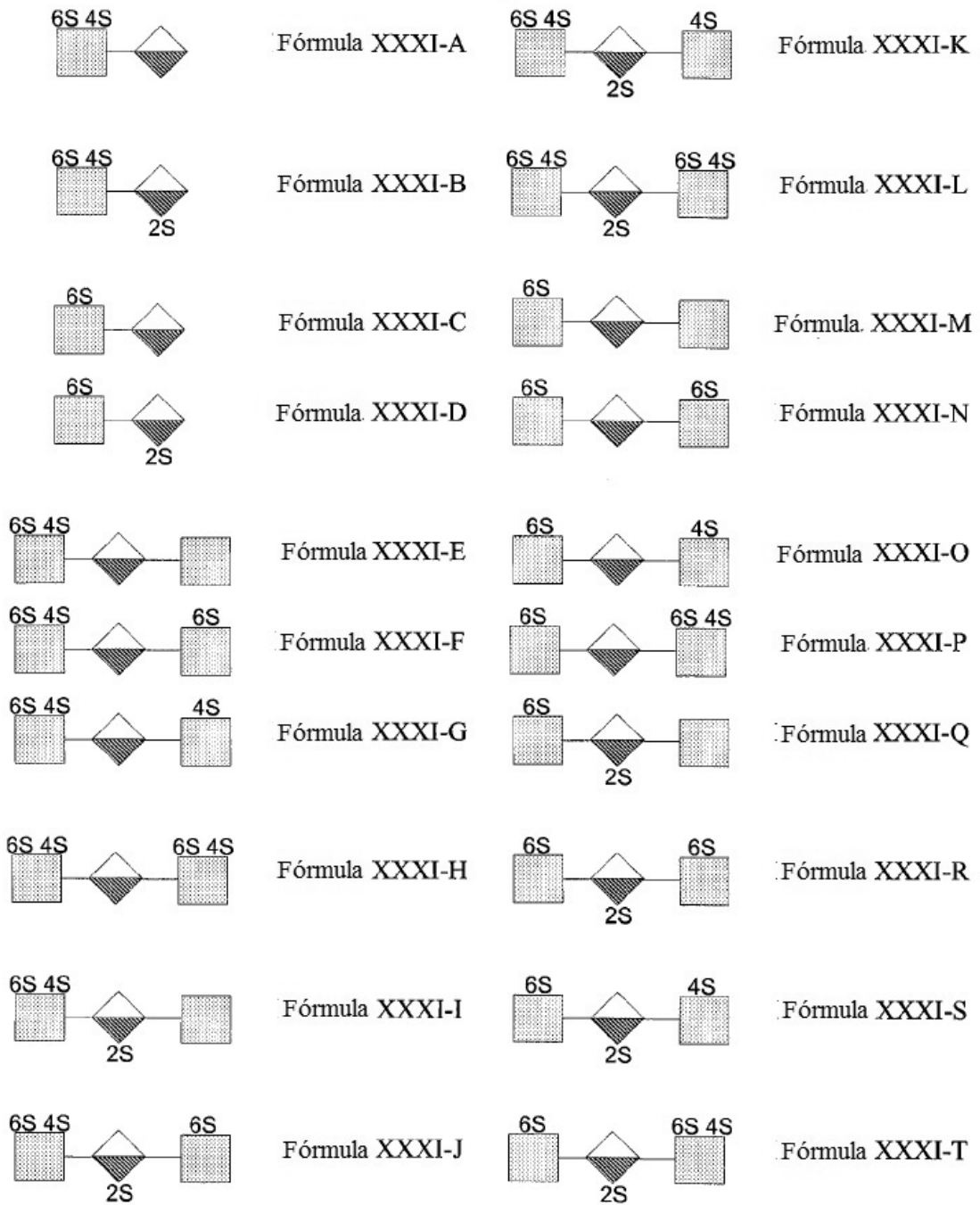
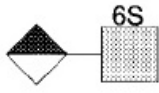
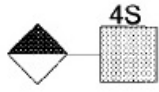


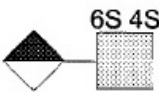
Figura 23



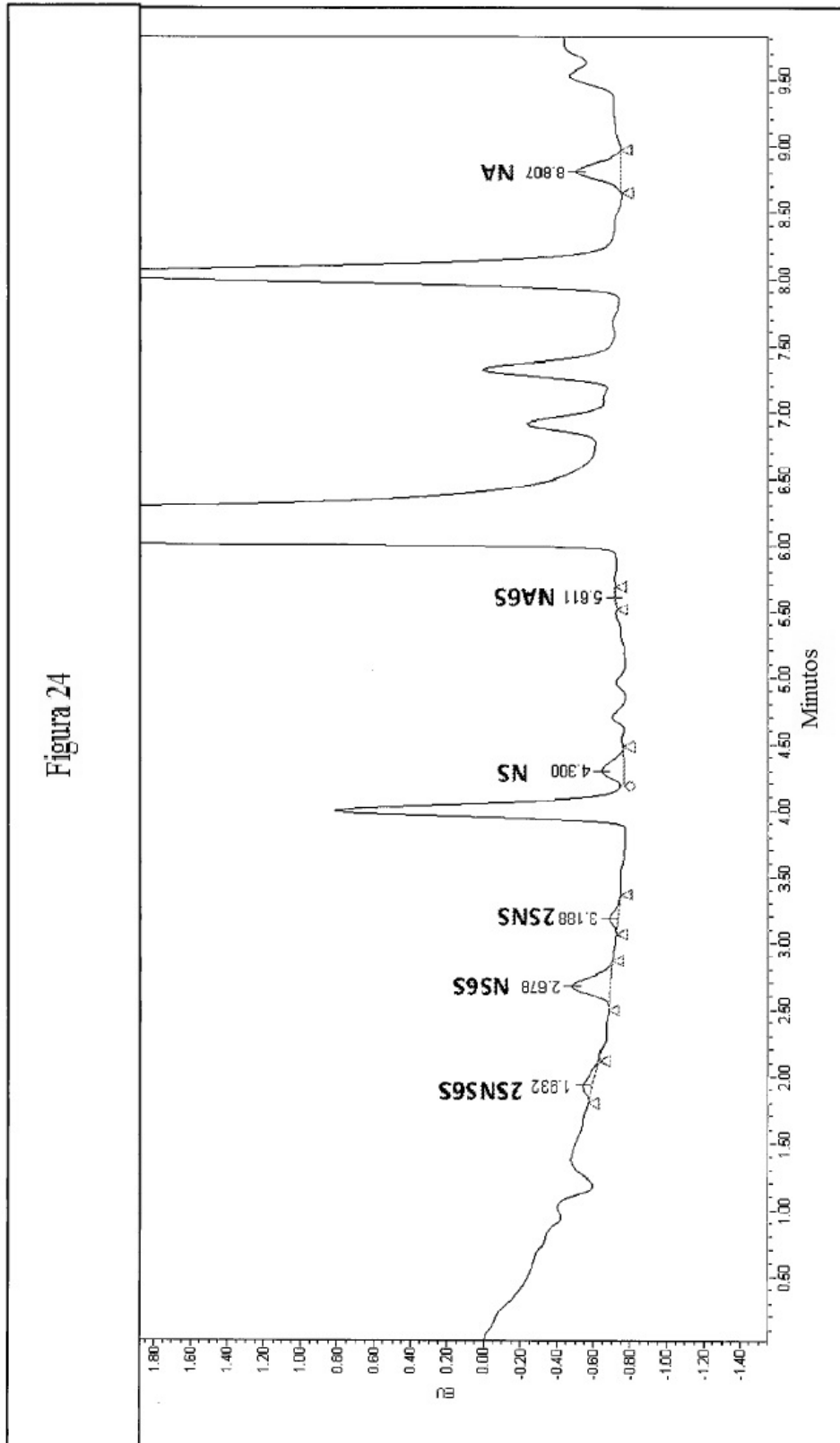
Fórmula XXXII-A



Fórmula XXXII-B



Fórmula XXXII-C



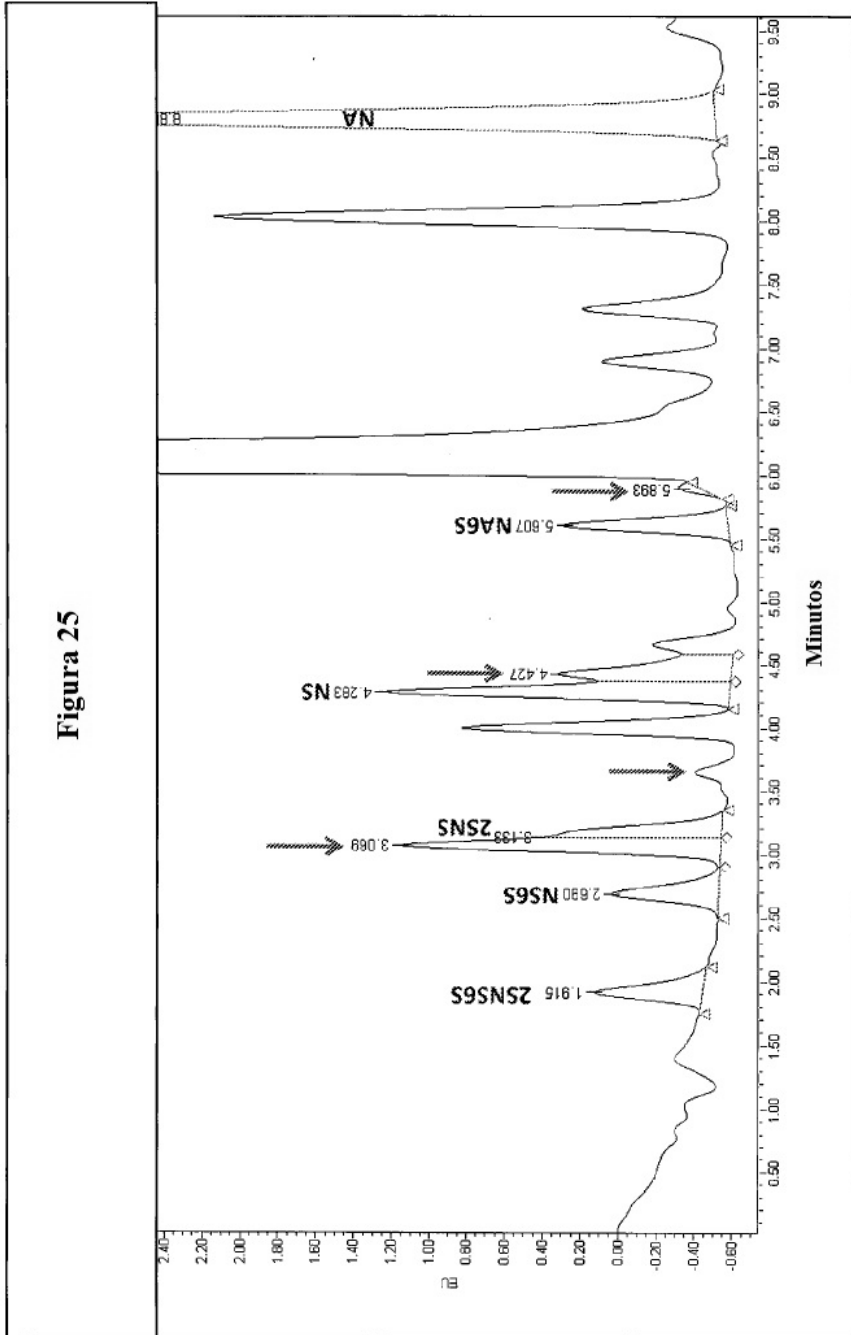


Figura 26

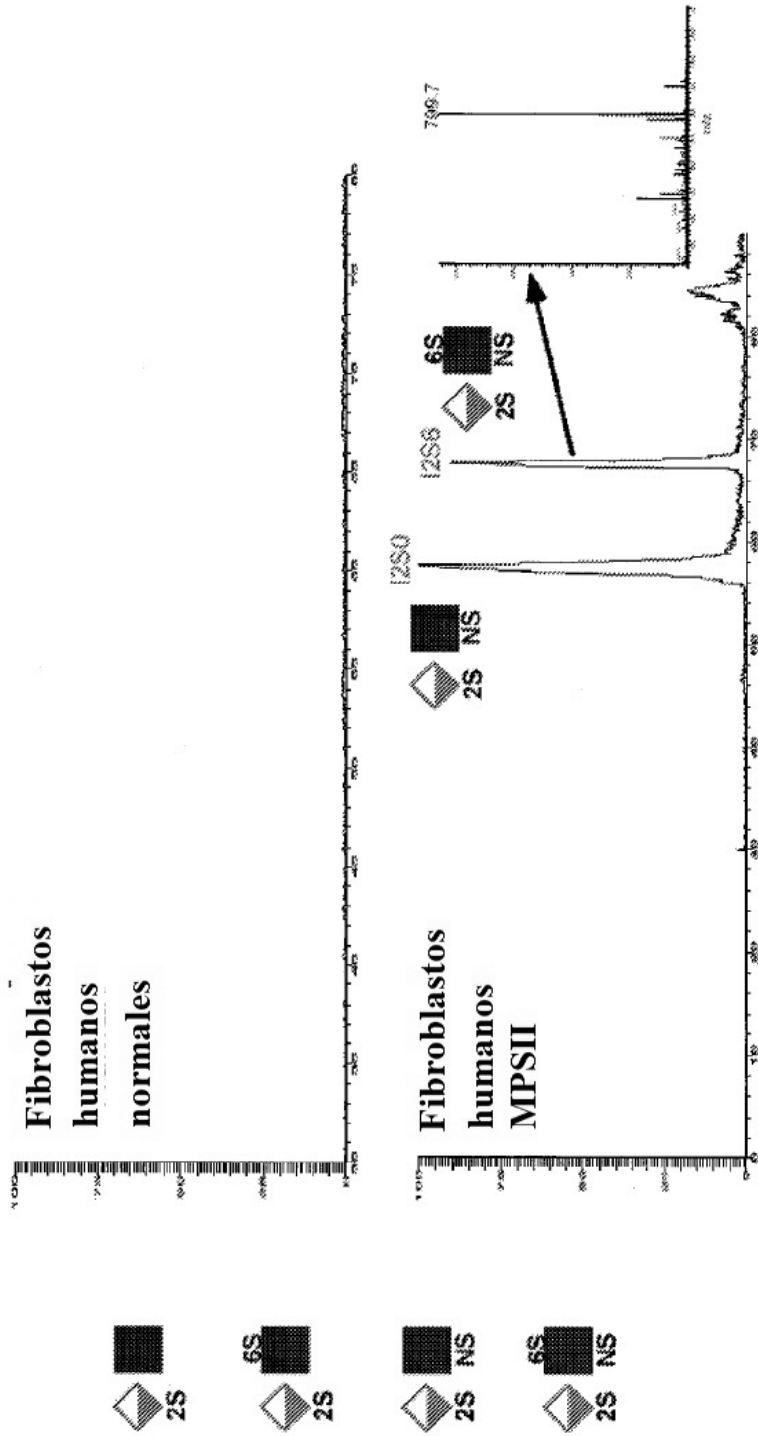


FIGURA 27

Muestra no afectada (GM01393)

(132 ng de heparan sulfato)

Biomarcadores candidatos

Ninguno-NRE deben ser raros y heterogéneos

MPS I
Escaneado

MPS II
Escaneado

MPS IIIA
Escaneado

MPS IIIB
Escaneado

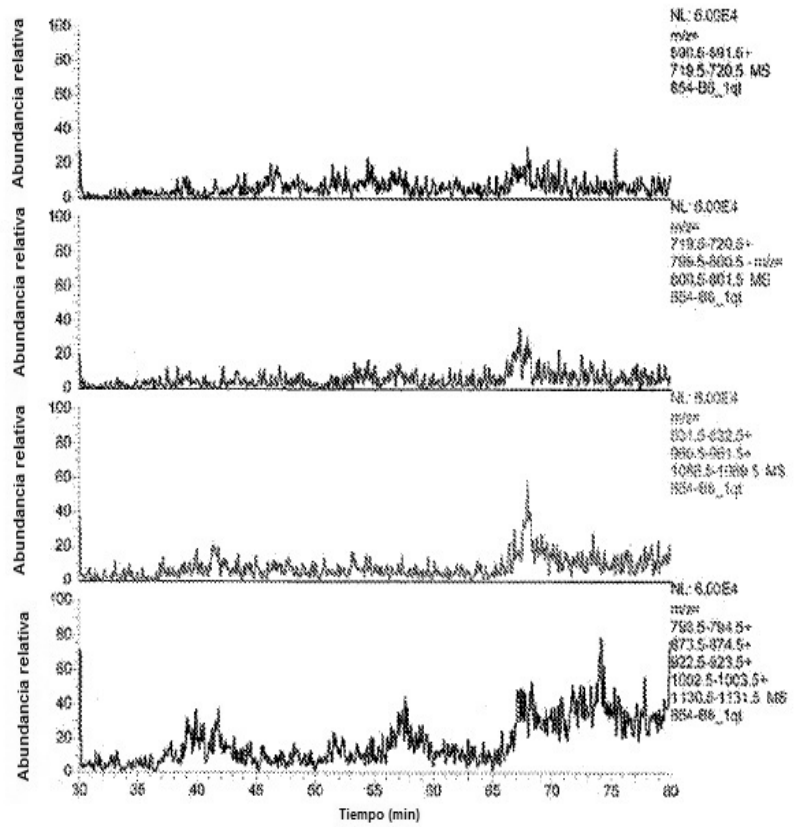


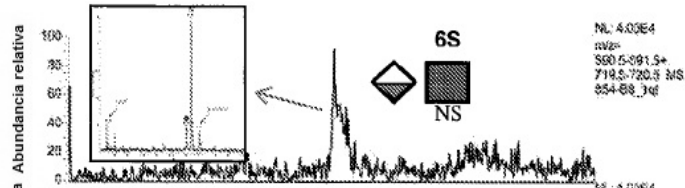
FIGURA 28

MPS I Muestra GM01256
(60 ng de heparan sulfato)

Biomarcadores candidatos



MPS I
Escaneado



MPS II
Escaneado



MPS IIIA
Escaneado



MPS IIIB
Escaneado

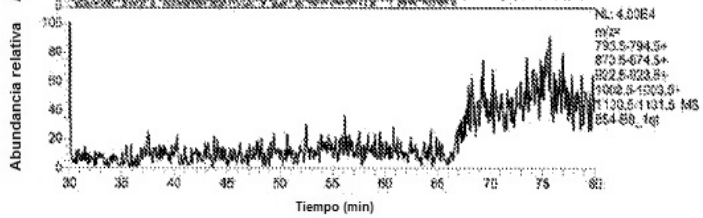


FIGURA 29

MPS II Muestra GM00298
(301 ng de heparan sulfato)

Biomarcadores candidatos



MPS I
Escaneado

MPS II
Escaneado

MPS IIIA
Escaneado

MPS IIIB
Escaneado

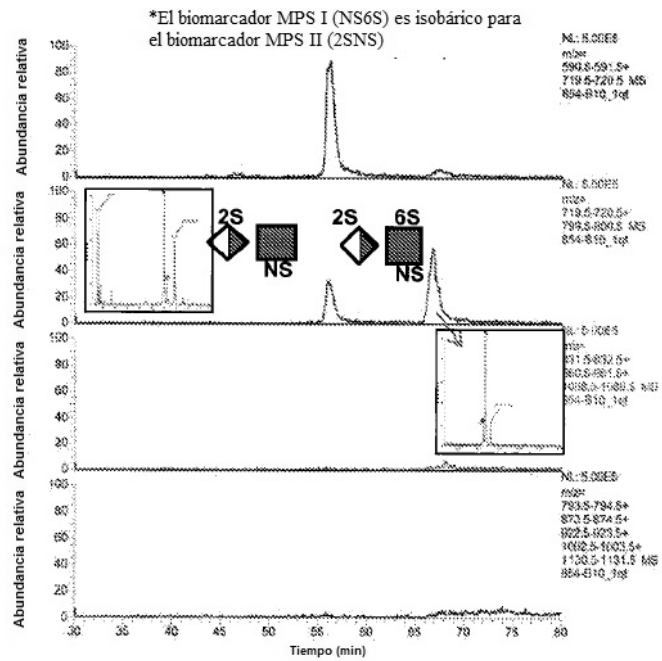
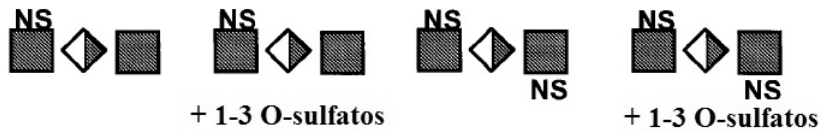


FIGURA 30

MPS IIIA Muestra GM00879
(205 ng de heparan sulfato)

Biomarcadores candidatos



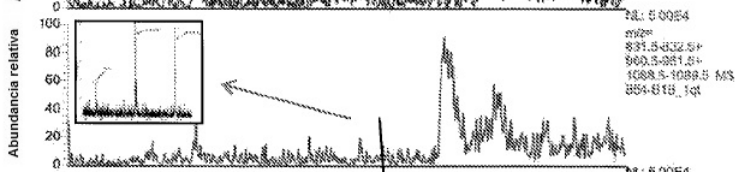
MPS I
Escaneado



MPS II
Escaneado



MPS IIIA
Escaneado



MPS IIIB
Escaneado

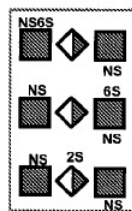
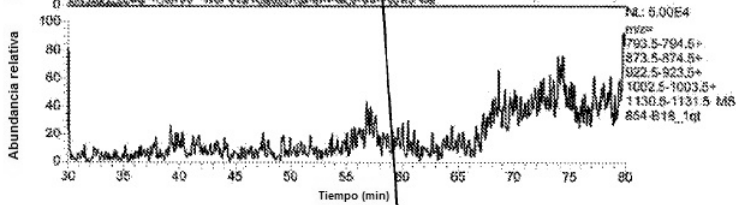
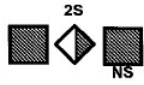
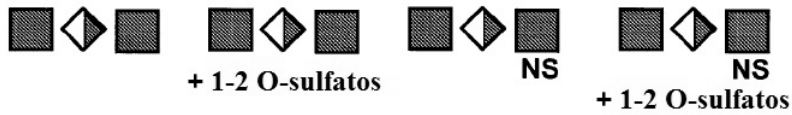


FIGURA 31

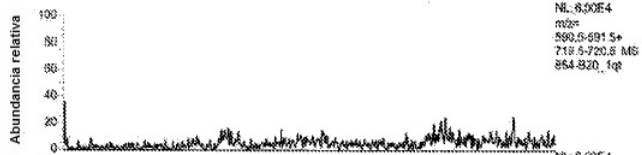


MPS IIIB Muestra GM01426
(204 ng de heparan sulfato)

Biomarcadores candidatos



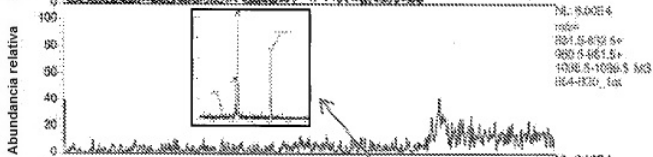
MPS I
Escaneado



MPS II
Escaneado



MPS IIIA
Escaneado



MPS IIIB
Escaneado

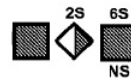
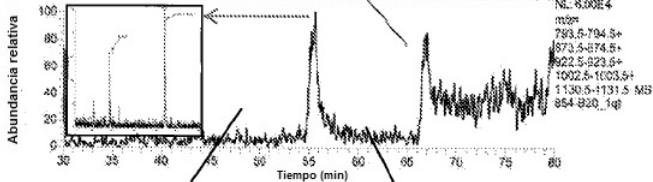


FIGURA 32

MPS IIIB RATÓN - HÍGADO

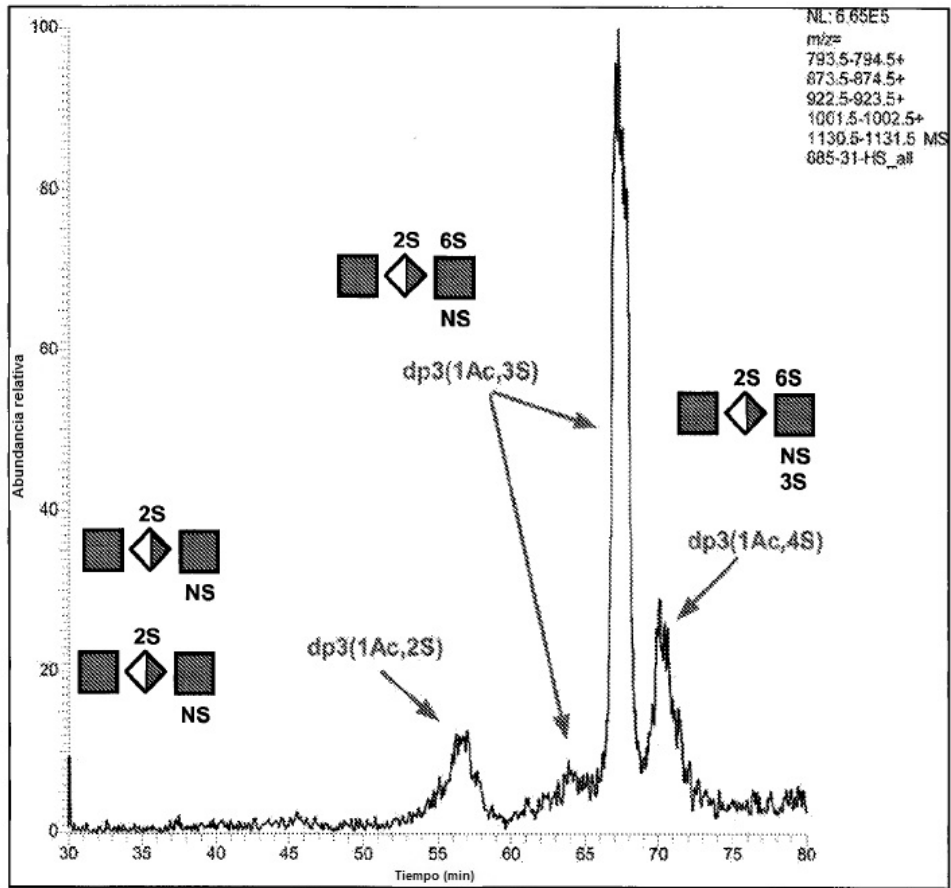


FIGURA 33
MPS IIIB RATÓN - CEREBRO

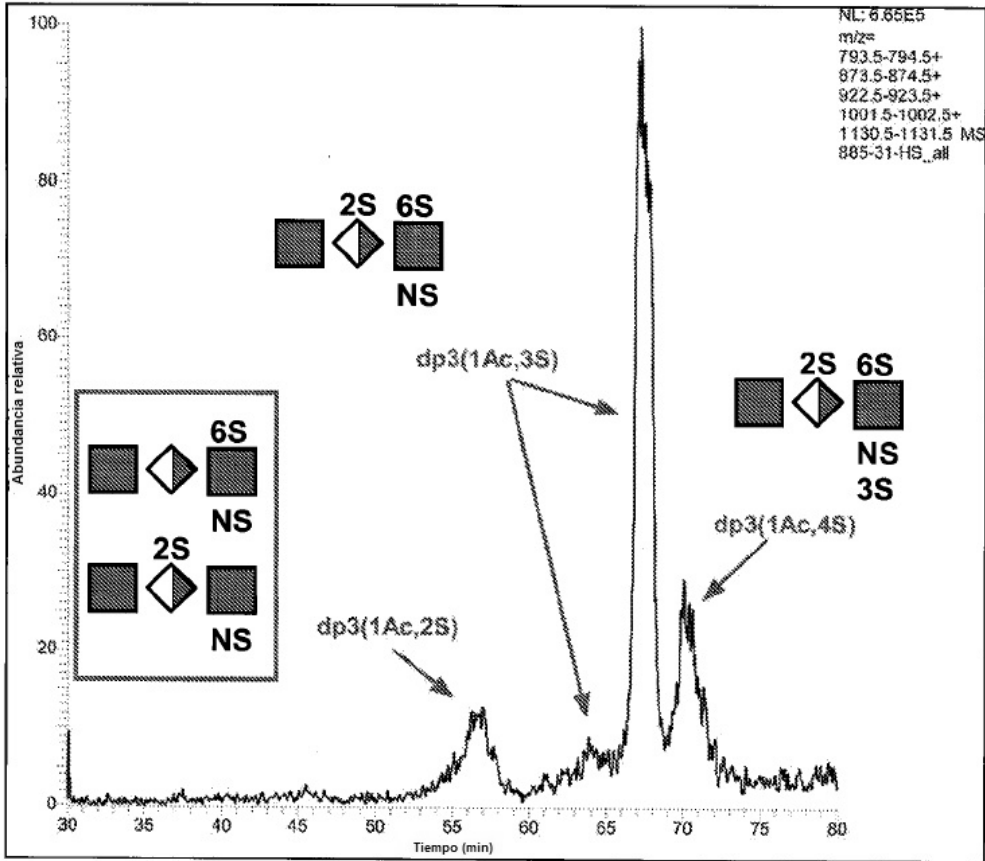


FIGURA 34
MPS IIIB RATÓN — RIÑÓN

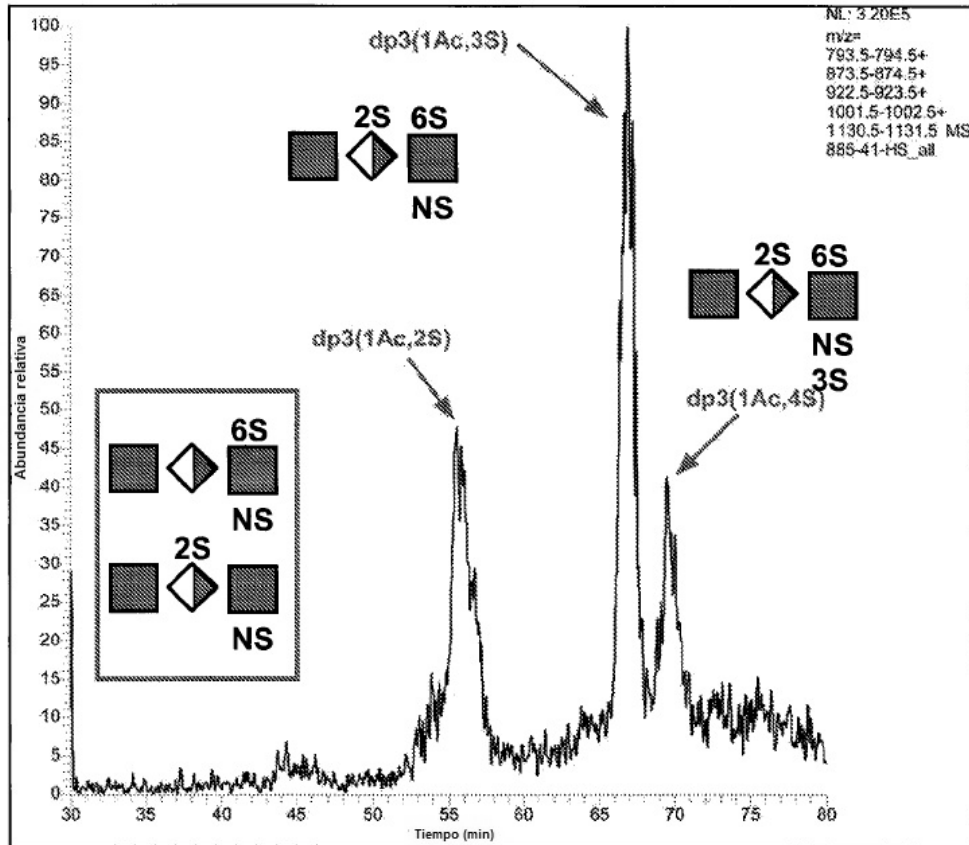


FIGURA 35

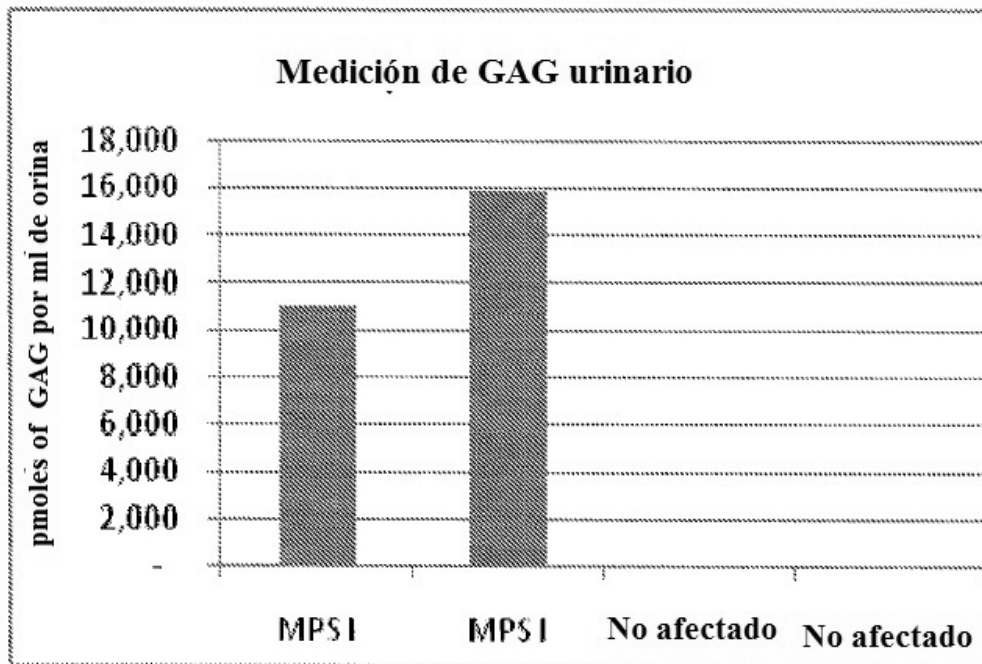


FIGURA 36

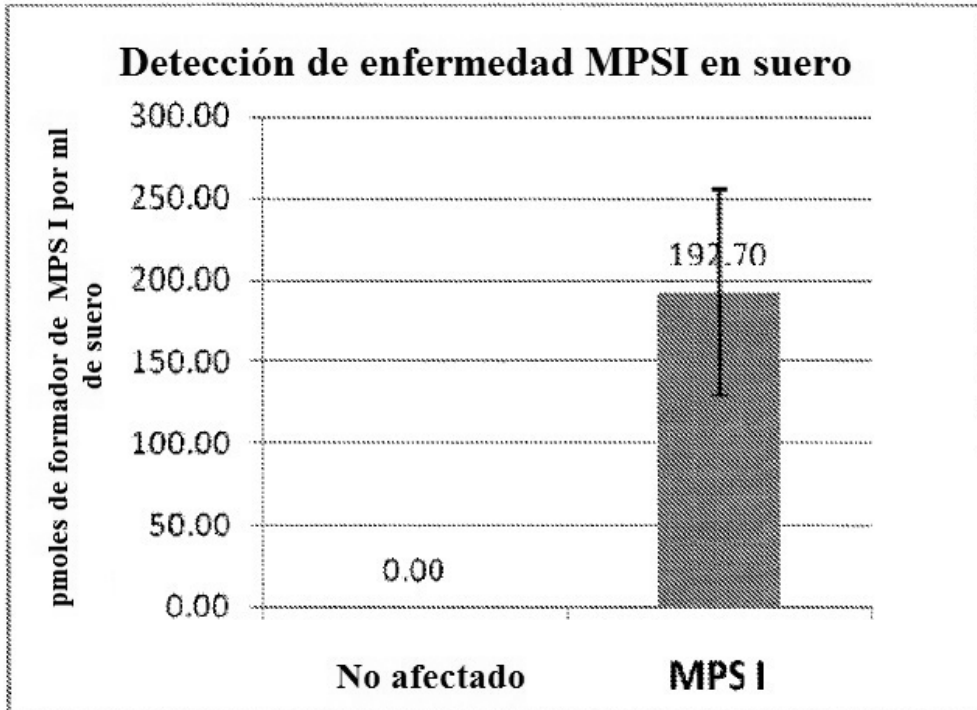


FIGURA 37

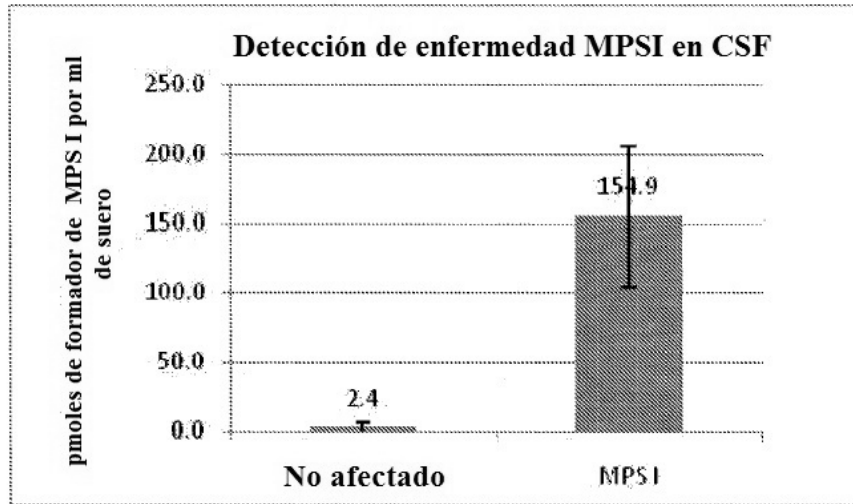


FIGURA 38

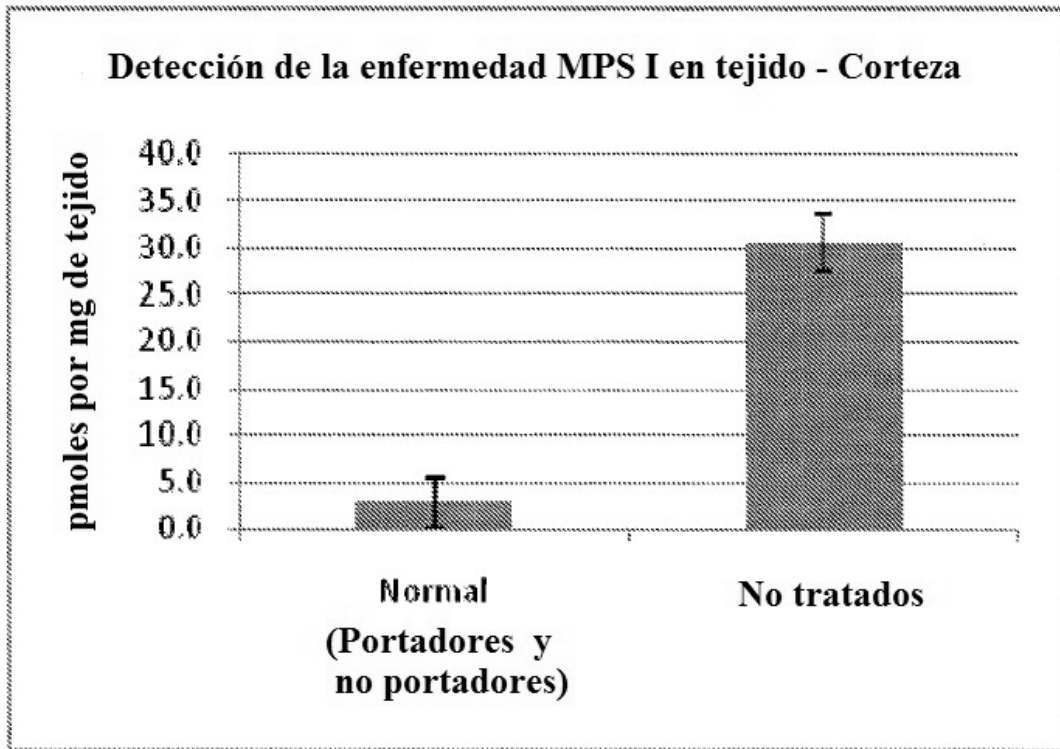


FIGURA 39

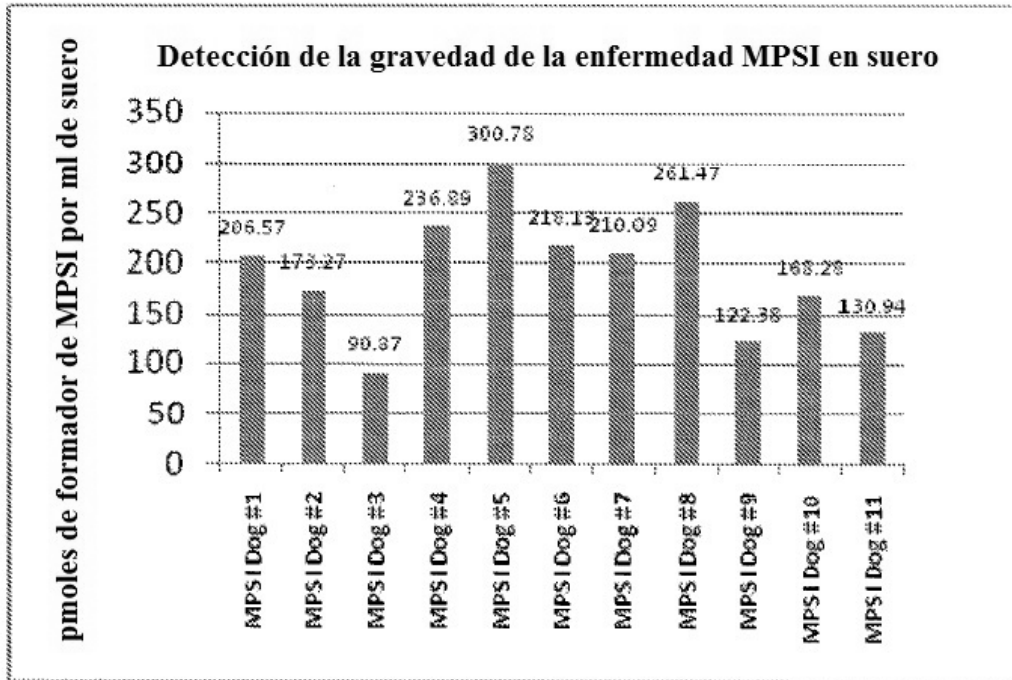


FIGURA 40

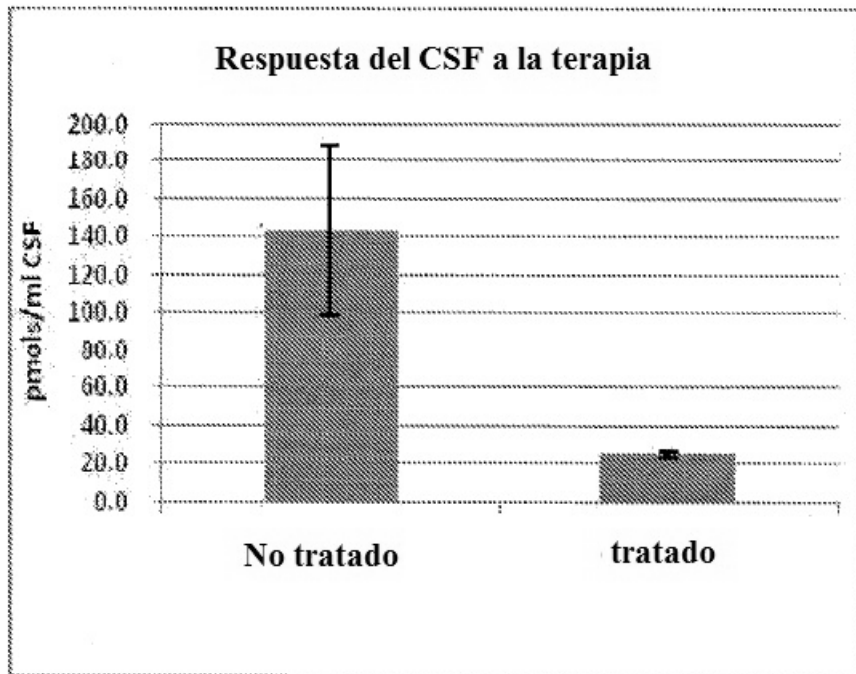


FIGURA 41

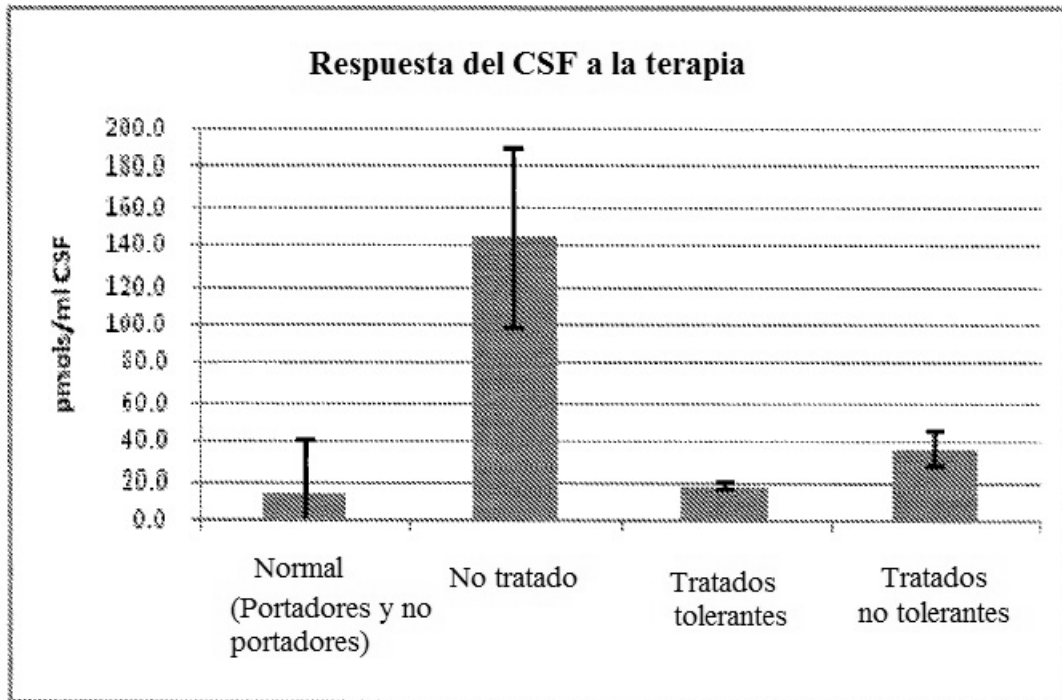


FIGURA 42

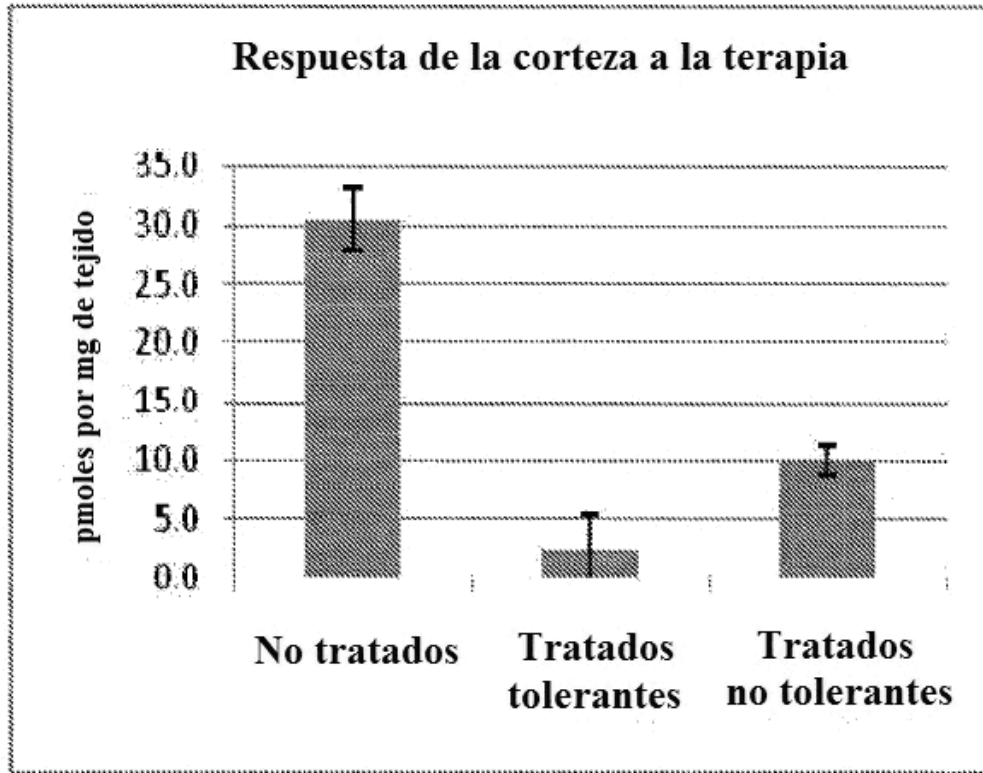


FIGURA 43A

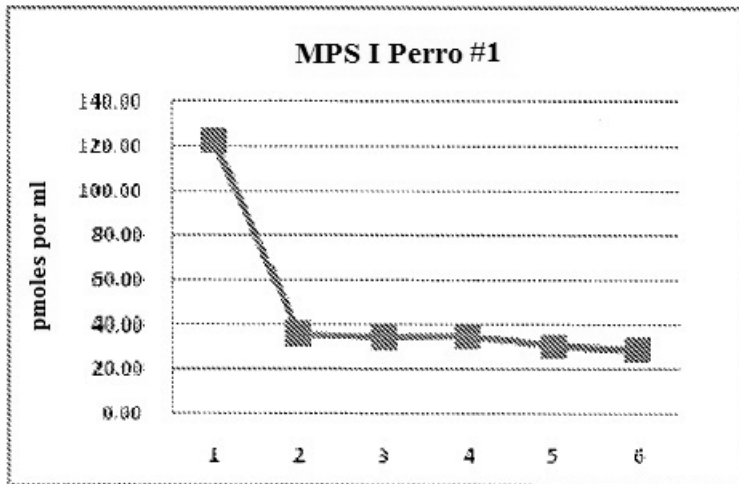


FIGURA 43B

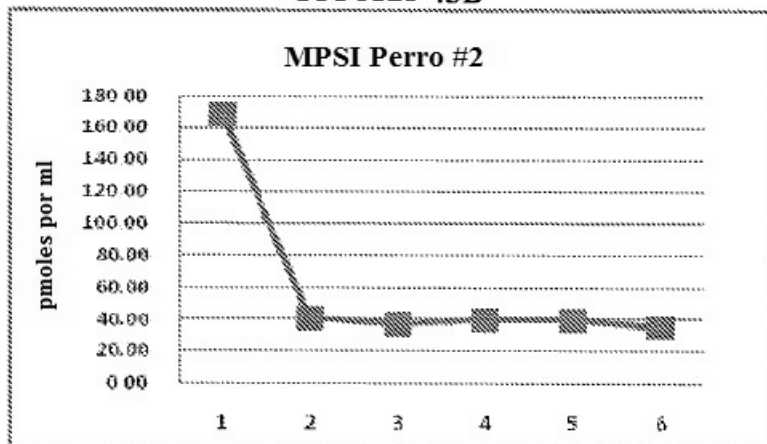


FIGURA 43C

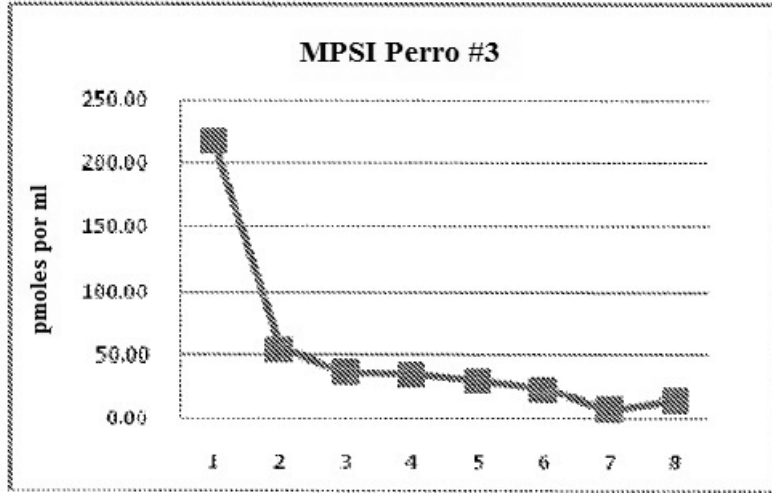


FIGURA 44

