

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201790769 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.11.30

(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.11.13

(54) ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЕЙ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

(31) 62/080,154

(32) 2014.11.14

(33) US

(86) PCT/US2015/060714

(87) WO 2016/077775 2016.05.19

(71) Заявитель:

ШИР ХЬЮМАН ДЖЕНЕТИК
ТЕРАПИС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Наими Хишам, Цю Юнчан, Хаслетт
Патрик Энтони Джон, Барбиер Энн
(US)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Выявление гликозаминогликанов (ГАГ) и/или определение уровня одного или более гликозаминогликанов может быть полезно, например, для идентификации или отслеживания различных патологических состояний, статуса пациентов, имеющих различные патологические состояния, и/или ответа на лечение индивидов, имеющих различные патологические состояния. В настоящем изобретении предложены способы выявления гликозаминогликанов и/или определения уровня гликозаминогликанов с помощью, например, масс-спектрометрии.

A1

201790769

201790769

A1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЕЙ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США №
5 62/080154, поданной 14 ноября 2014 г., содержание которой в полном объеме включено в
данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Различные патологические состояния связаны с накоплением гликозаминогликанов.
10 Гликозаминогликаны (ГАГ) представляют собой большой комплекс углеводных молекул,
которые участвуют во многих биологических процессах. Гликозаминогликаны включают
полисахариды, полученные из аминокексозы, такие как гепаран, гепарансульфат (ГС),
гиалуроновая кислота, кератансульфат, хондроитинсульфат, дерматансульфат и их
сополимеры. Различные ГАГ отличаются на основании, например, типа единицы гексозамина,
15 гексозы или гексуроновой кислоты, которую они содержат, а также геометрией гликозидной
связи между этими единицами. В некоторых случаях молекула ГАГ может быть расщеплена
на дисахаридные компоненты. ГАГ и полученные из ГАГ дисахаридные компоненты могут
проявлять высокую степень структурной гетерогенности в отношении степени сульфатации,
ацетилирования, эпимеризации и других характеристик. Вследствие таких вариаций ГАГ
20 включают широкий спектр различных молекул, что затрудняет количественную оценку и
характеризацию.

Некоторые ГАГ, например, ГС, являются не одним соединением, а, скорее, набором
родственных молекул, которые имеют, в некоторых случаях, разную молекулярную массу. Это
является одной из причин, по которой количественная оценка и получение характеристик
25 таких ГАГ, включая ГС, труднодостижимы. В данной области техники существует
необходимость в дополнительных и улучшенных способах определения уровней ГАГ.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Выявление гликозаминогликанов (ГАГ) и/или определение уровня одного или более гликозаминогликанов может быть полезно, например, для идентификации или отслеживания различных патологических состояний, статуса пациентов, имеющих различные патологические состояния, и/или ответа на лечение индивидов, имеющих различные патологические состояния. В настоящем изобретении предложены способы выявления гликозаминогликанов и/или определения уровня гликозаминогликанов с помощью, например, масс-спектрометрии. Такие способы, их применения, устройства для их применения и связанные с ними способы и композиции дополнительно описаны в данном документе.

Описанные в данном документе способы улучшены по сравнению с предыдущими способами, по меньшей мере в отношении точности, корректности, воспроизводимости и производительности. В конкретных случаях один или более описанных в данном документе способов улучшены по сравнению с определенными предыдущими способами, по меньшей мере в отношении точности. В других случаях определенные варианты реализации настоящего изобретения имеют практическую ценность вместо или в дополнение к результатам их применимости для идентификации или отслеживания различных патологических состояний, статуса пациентов, имеющих различные патологические состояния, и/или ответа на лечение индивидов, имеющих различные патологические состояния.

Определенные способы согласно настоящему изобретению с целью решения определенных задач, связанных с количественным определением ГАГ, включают расщепление одной или более молекул ГАГ на дисахаридные компоненты с последующим количественным определением дисахаридных продуктов расщепления ГАГ так, что измеренный уровень одного или более дисахаридных продуктов расщепления ГАГ является заменой или альтернативой прямому количественному определению одного или более ГАГ.

В определенных случаях, в которых дисахарид указан в единственном числе (например, «дисахарид» или «индивидуальный дисахарид»), термин «дисахарид» может относиться ко всем молекулами конкретного типа, которые присутствуют в образце, популяции и т.д., вне зависимости от того, указывается или нет конкретный дисахарид.

В соответствии с настоящим изобретением многие полученные из ГАГ дисахариды (например, продукты расщепления ГАГ), включая определенные изомерные дисахариды,

можно разделить с помощью обращенно-фазовой (ОФ) хроматографии, например, после их дериватизации меткой, например, гидрофобной меткой, например, 4-бутиланилином (4-NBA). В различных вариантах реализации изобретения метка важна для разделения индивидуальных молекул или типов молекул во время хроматографии. Доступность меченого изотопом

5 внутреннего стандарта (I_{std}) для одного или более выбранных дисахаридов может быть включена как механизм, способный обеспечить высокий уровень точности и воспроизводимости.

По меньшей мере в одном аспекте настоящее изобретение включает способ определения уровня гликозаминогликанов (ГАГ) в биологическом образце, который содержит

10 этапы инкубации биологического образца с одним или более ферментами в условиях, которые обеспечивают расщепление гликозаминогликана, чтобы получить смесь дисахаридов; химическую дериватизацию смеси дисахаридов, полученной на этапе инкубации; измерение количества каждого индивидуального дериватизированного дисахарида; и определение уровня гликозаминогликанов (ГАГ) в биологическом образце на основании количества каждого

15 индивидуального дериватизированного дисахарида, измеренного на этапе измерения. В определенных вариантах реализации таких способов гликозаминогликан включает гепарансульфат. В определенных вариантах реализации таких способов, включая варианты реализации, в которых гликозаминогликан включает гепарансульфат, один или более ферментов включают одну или более гепариназ, например, гепариназы I, II и/или III. В

20 определенных вариантах реализации таких способов, включая варианты реализации, в которых гликозаминогликан содержит гепарансульфат, один или более ферментов включают один или более ферментов, выбранных из группы, состоящей из хондроитиназы AC, хондроитиназы B, хондроитиназы C, хондроитиназы ABC и кератаназ.

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше,

25 смесь дисахаридов может содержать дисахариды I-S ($\Delta U A, 2 S\text{-GlcNS}, 6 S$), II-S ($\Delta U A\text{-GlcNS}, 6 S$), III-S ($\Delta U A, 2 S\text{-GlcNS}$), IV-S ($\Delta U A\text{-GlcNS}$), II-A ($\Delta U A\text{-GlcNAc}, 6 S$) и/или IV-A ($\Delta U A\text{-GlcNAc}$).

В определенных вариантах реализации настоящего изобретения измерение заключается в измерении количества каждого из дериватизированного I-S ($\Delta U A, 2 S\text{-GlcNS}, 6 S$), дериватизированного II-S ($\Delta U A\text{-GlcNS}, 6 S$), дериватизированного III-S ($\Delta U A, 2 S\text{-GlcNS}$),

30 дериватизированного IV-S ($\Delta U A\text{-GlcNS}$), дериватизированного II-A ($\Delta U A\text{-GlcNAc}, 6 S$) и дериватизированного IV-A ($\Delta U A\text{-GlcNAc}$).

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше, смесь дисахаридов может быть дериватизирована гидрофобным соединением.

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше, смесь дисахаридов дериватизируют 4-бутиланилином, 2-аминобензамидом (2-АБ), 2-аминобензойной кислотой (антраниловой кислотой; 2-АК) или 2-аминоакридоном (АМАК).

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше, этап измерения может включать, во-первых, разделение индивидуальных дериватизированных дисахаридов методом хроматографии, и, во-вторых, определение каждого отдельного дисахарида методом масс-спектрометрии. В конкретных вариантах реализации изобретения хроматография является обращено-фазовой жидкостной хроматографией.

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше, количество каждого индивидуального дериватизированного дисахарида определяют в сравнении с внутренним стандартом. Например, в конкретных вариантах реализации изобретения каждый индивидуальный дисахарид дериватизируют 4-бутиланилином, а внутренний стандарт для каждого соответствующего дисахарида метят $^{13}\text{C}_6$ -4-бутиланилином.

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше, уровень гликозаминогликанов (ГАГ) в биологическом образце определяют по суммарному значению концентрации дисахаридов на основании измеренного количества каждого индивидуального дисахарида.

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше, биологический образец представляет собой образец цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). В конкретных вариантах реализации изобретения образец ЦСЖ имеет объем в диапазоне от около 10 мкл до 100 мкл (например, от 10 мкл до 100 мкл, от 10 мкл до 75 мкл, от 10 мкл до 50 мкл, от 25 мкл до 100 мкл, от 25 мкл до 75 мкл или от 50 мкл до 100 мкл). В конкретных вариантах реализации изобретения образец ЦСЖ имеет объем в диапазоне от около 45 мкл до 55 мкл.

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше, биологический образец представляет собой образец крови, образец плазмы, образец мочи, или образец плазмы или образец мочи.

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше, биологический образец сначала обрабатывают, чтобы выделить гликозаминогликан.

В различных способах согласно настоящему изобретению, таких как описанные выше, биологический образец содержит полученные из гликозаминогликанов дисахариды в концентрации, превышающей 0,1 мкМ (например, превышающей 0,1 мкМ, превышающей 0,5 мкМ, превышающей 1 мкМ, превышающей 5 мкМ или превышающей 10 мкМ).

5 По меньшей мере в еще одном аспекте настоящее изобретение включает способ лечения лизосомной болезни накопления, который включает лечение субъекта, страдающего от лизосомной болезни накопления, с помощью курса лечения, заключающегося в введение субъекту терапевтически эффективной дозы заместительного фермента с определенным интервалом введения; измерение уровня гликозаминогликанов (ГАГ) в биологическом образце, полученном от субъекта во время курса лечения, способом по любому из предыдущих пунктов; и поддержание терапевтически эффективной дозы и интервала введения, если уровень гликозаминогликанов снижен на 10% по сравнению с уровнем ГАГ до лечения. В связанных вариантах реализации изобретения терапевтически эффективную дозу и интервал введения сохраняют, если уровень гликозаминогликанов снижен, например, на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже 100%. В связанных вариантах реализации изобретения терапевтически эффективную дозу и интервал введения сохраняют, если уровень гликозаминогликанов снижен, например, по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. В связанных вариантах реализации изобретения терапевтически эффективную дозу и интервал введения сохраняют, если уровень гликозаминогликанов снижен, например, до нормального или практически нормального уровня, до контрольного уровня, до уровня в пределах экспериментально или канонически определенного нормального диапазона, до уровня в пределах контрольного диапазона или до уровня, находящегося в пределах 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% любого такого уровня или любого такого диапазона.

По меньшей мере в еще одном аспекте настоящее изобретение включает способ лечения синдрома Хантера, включающий периодическое интратекальное введение нуждающемуся в лечении субъекту терапевтически эффективной дозы рекомбинантной идуронат-2-сульфатазы (I2S) так, чтобы уровень гликозаминогликанов (ГАГ) в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) был снижен более чем на 85% по сравнению с исходным уровнем ГАГ до лечения, согласно определению способом по любому из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает способ лечения синдрома СанА, включающий периодическое интратекальное введение нуждающемуся в лечении субъекту терапевтически эффективной дозы рекомбинантной гепаран-*N*-сульфатазы так, чтобы уровень гликозаминогликанов (ГАГ) в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) был снижен более чем на 10% по сравнению с исходным уровнем ГАГ до лечения, согласно определению способом по любому из предыдущих пунктов.

По меньшей мере в одном аспекте настоящее изобретение включает способ отслеживания лечения лизосомной болезни накопления, включающий лечение субъекта, страдающего от лизосомной болезни накопления, с помощью курса лечения, включающего введение субъекту терапевтически эффективной дозы заместительного фермента с определенным интервалом введения и измерение уровня гликозаминогликанов (ГАГ) в биологическом образце, полученном от субъекта во время курса лечения, любым способом, например, описанным в данном документе способом измерения уровня ГАГ. В определенных вариантах реализации изобретения лизосомная болезнь накопления может быть выбрана из группы, состоящей из МПСІ, МПСІІ, МПСІІІА, МПСІІІВ, МПСІІІС, МПСІІІD, МПСІІІV, МПСІІІV, МПСІV, МПСІVІ, МПСІVІІ, МПСІVІХ, альфа-маннозидоза, аспартилглюкозаминурии, болезни Фабри, фукозидоза, галактосиалидоза, болезни Гоше, GM1-ганглиозидоза, недостатка активатора GM2, сиалидоза, болезни Краббе, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза IV, множественной сульфатазной недостаточности, болезни Помпе, болезни Сандхоффа, болезни Тей-Сакса, варианта АВ болезни Шиндлера, болезни Салла, бета-маннозидоза и глобоидно-клеточной лейкодистрофии. В конкретных вариантах реализации изобретения введение может представлять собой интратекальное введение или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации изобретения доза может быть выбрана из группы, состоящей из 10 мг, 45 мг, 90 мг и их комбинаций. В некоторых случаях заместительный фермент может представлять собой рекомбинантную человеческую гепаран-*N*-сульфатазу или рекомбинантную идурсульфазу. В различных вариантах реализации

изобретения интервал введения может быть суточным, недельным, двухнедельным, месячным, двухмесячным, годичным или представляет собой их комбинации. В некоторых описанных в данном документе способах биологический образец может быть выбран из группы, состоящей из цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), цельной крови, клеток, ткани, плазмы, сыворотки, крови, мочи и их комбинаций.

Определенные описанные в данном документе способы могут дополнительно включать поддержание терапевтически эффективной дозы и/или интервала введения, если уровень ГАГ снижен или был снижен по сравнению с контрольным уровнем ГАГ, например, когда уровень ГАГ снижен или был снижен по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более.

Определенные описанные в данном документе способы могут дополнительно включать корректировку терапевтически эффективной дозы и/или интервала введения, если уровень ГАГ снижен или был снижен по сравнению с контрольным уровнем ГАГ, например, когда корректировка терапевтически эффективной дозы и интервала введения может включать увеличение дозы и/или уменьшение интервала введения. В некоторых случаях уровень ГАГ снижен или был снижен на 1% или менее, 2% или менее, 3% или менее, 4% или менее, 5% или менее, 6% или менее, 7% или менее, 8% или менее, 9% или менее или 10% или менее.

Определенные описанные в данном документе способы могут дополнительно включать корректировку терапевтически эффективной дозы и/или интервала введения, если уровень ГАГ повышен или был повышен по сравнению с контрольным уровнем ГАГ, например, когда корректировка терапевтически эффективной дозы и интервала введения может включать увеличение дозы и/или уменьшение интервала введения. В некоторых случаях уровень ГАГ повышен или был повышен по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более.

В различных способах согласно настоящему изобретению контрольный уровень ГАГ может представлять собой i) уровень ГАГ у субъекта, страдающего от лизосомной болезни накопления, ii) уровень ГАГ у субъекта, страдающего от лизосомной болезни накопления, измеренный в более ранний момент времени в течение лечения, или iii) уровень ГАГ у не проходящего лечение контрольного субъекта.

По меньшей мере в одном аспекте, настоящее изобретение включает способ лечения синдрома Хантера, включающий периодическое интратекальное введение нуждающемуся в лечении субъекту терапевтически эффективной дозы рекомбинантной идуронат-2-сульфатазы (I2S) так, чтобы уровень гликозаминогликанов (ГАГ) в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) был снижен более чем на 85% по сравнению с базовым уровнем ГАГ до лечения, согласно определению любым способом определения уровня ГАГ, например, любым описанным в данном документе способом.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Чтобы было легче понять настоящее изобретение, сначала приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов приведены в тексте описания. Поскольку определения не противоречат пониманию 5 этих терминов специалистами в данной области техники, подразумевается, что определения не исключают общепринятые значения этих терминов.

Биомаркер: В контексте данного документа термин «биомаркер» относится к веществу (например, белку или нуклеиновой кислоте), которое можно применять в качестве индикатора заболевания, риска развития заболевания, статуса носителя заболевания или ответов на 10 терапевтическое вмешательство. Как правило, подходящий биомаркер обладает характеристикой, которую можно объективно измерить или оценить в качестве индикатора. В некоторых вариантах реализации изобретения биомаркер представляет собой органическую биомолекулу, которая выборочно присутствует в образце, взятом у субъекта с одним фенотипическим статусом (например, имеющего заболевание), по сравнению с другим 15 фенотипическим статусом (например, не имеющего заболевание). Биомаркер выборочно присутствует среди разных фенотипических статусов, если рассчитанный средний или медианный уровень экспрессии биомаркера в разных группах является статистически значимым. Общепринятые критерии для определения статистической значимости включают, помимо прочего, t-критерий, дисперсионный анализ ANOVA, критерий Крускала-Уоллиса, 20 критерий Уилкоксона, критерий Манна-Уитни, коэффициент несогласия, линейный дискриминантный анализ, квадратичный дискриминантный анализ и принцип ближайших К-соседей. Биомаркеры, один или в комбинации, обеспечивают определение относительного риска того, что субъект имеет тот или иной фенотипический статус. Следовательно, они

применимы в качестве маркеров заболевания (диагностика), терапевтической эффективности лекарственного препарата (тераностика) и токсичности лекарственного препарата.

Контроль: В контексте данного документа термин «контроль» имеет общепринятое в данной области техники значение стандарта, с которым сравнивают результаты. Как правило, контроли используют для повышения чистоты экспериментов путем выделения переменных с целью сделать вывод в отношении таких переменных.

Дериватизация: В контексте данного документа «дериватизация» означает комбинирование первого соединения или молекулы и второго предоставляемого в избытке соединения или молекулы путем приведения первого соединения или молекулы в контакт со вторым соединением или молекулой в условиях, способных обеспечить связывание первой и второй молекул или соединений, например, стабильным или полустабильным образом. В контексте данного документа дериватизированный образец означает образец, подвергнутый этапу дериватизации. Соответственно, в контексте данного документа «дериватизированное» соединение или молекула представляет собой соединение или молекулу, которое связалось с предоставленным вторым соединением или молекулой. В случае однозначного предоставления конкретного второго соединения или молекулы в одном или более конкретных вариантах реализации изобретения для специалистов в данной области техники очевидно, что применяемое в таких вариантах реализации изобретения дериватизированное соединение или молекула, если не указано иное, будет относиться к соединению или молекуле, связанному с предоставленным вторым соединением или молекулой.

Расщеплять: В контексте данного документа «расщеплять» означает разрушать одну или более химических связей, посредством которых соединены две или более составляющие части соединения или молекулы, при этом разрушение приводит к разделению двух или более из двух, или более составных частей. Расщепление включает, например, ферментативное расщепление соединения или молекулы путем приведения соединения или молекулы в контакт с ферментом, способным расщепить соединение или молекулу.

Эффективное количество: В контексте данного документа термин «эффективное количество» относится к количеству соединения или агента, достаточному для осуществления его предполагаемой(ых) цели(ей). В контексте настоящего изобретения цель(и) может заключаться, например: в модуляции экспрессии по меньшей мере одного биомаркера согласно изобретению; и/или в замедлении или предотвращении развития связанного с ГАГ патологического состояния; и/или в замедлении или прекращении прогрессирования,

обострения или ухудшения симптомов связанного с ГАГ патологического состояния; и/или в ослаблении одного или более симптомов, связанных со связанным с ГАГ патологическим состоянием; и/или в облегчении симптомов связанного с ГАГ патологического состояния и/или в излечении связанного с ГАГ патологического состояния.

5 *Фермент*: В контексте данного документа термин «фермент» относится к любому белку, способному вносить изменения в биологическое соединение посредством каталитического действия.

Ферментативная активность: В контексте данного документа термин «ферментативная активность», «ферментная активность» или его грамматический эквивалент
10 относится к общим каталитическим свойствам фермента.

Выделенный: В контексте данного документа термин «выделенный» относится к веществу и/или соединению, которое было (1) отделено по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми оно связано в исходном состоянии после выработки (в природе и/или в экспериментальных условиях), и/или (2) сконструировано, получено, приготовлено и/или
15 произведено человеком. Выделенные вещества и/или соединения могут быть отделены от около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более чем около 99% других компонентов, с которыми они были изначально связаны. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенные агенты
20 являются очищенными на около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более чем около 99%. В контексте данного документа вещество является «очищенным», если оно в значительной степени свободно от других компонентов. В некоторых вариантах реализации изобретения, как понятно специалистам в данной области техники, вещество может считаться
25 «выделенным» или даже «очищенным» после смешивания с некоторыми другими компонентами, такими как, например, один или более носителей или вспомогательных веществ (например, буфер, растворитель, вода и т.д.); в таких вариантах реализации изобретения процент выделения или очистки вещества рассчитывают без учета таких носителей или вспомогательных веществ. В некоторых вариантах реализации изобретения
30 выделение включает или требует разрушения ковалентных связей (например, для выделения домена полипептида из более длинного полипептида и/или для выделения элемента

нуклеотидной последовательности из более длинного олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты).

5 *Инtrateкальное введение:* В контексте данного документа термин «инtrateкальное введение» или «инtrateкальная инъекция» относится к инъекции в позвоночный канал (инtrateкальное пространство, окружающее спинной мозг). Можно применять различные методики, включая, но не ограничиваясь этим, латеральную церебровентрикулярную инъекцию через трепанационное отверстие или посредством цистернальной или люмбальной пункции, или подобных мер. В некоторых вариантах реализации изобретения «инtrateкальное введение» или «инtrateкальная доставка» в соответствии с настоящим изобретением
10 относится к ИТ введению или доставке через люмбальную область или люмбальный участок, т.е. люмбальному ИТ введению или доставке. В контексте данного документа термин «люмбальная область» или «люмбальный участок» относится к области между третьим и четвертым люмбальными (поясничными) позвонками и, более точно, области L2-S1 позвоночника.

15 *Уровень:* В контексте данного документа термин «уровень» означает абсолютное или относительное количество, концентрацию, частоту или их качественную или количественную меру, или выраженность для измеряемого качества или объекта, например, молекулы, соединения, типа молекулы или соединения, группы молекул или соединений, фенотипа, генотипа, симптома, события или другого измеряемого качества или объекта.

20 *Нормальный:* В контексте данного документа термин «нормальный», применяемый вместе с термином «индивид» или «субъект», относится к индивиду или группе индивидов, не имеющих конкретного заболевания или патологического состояния и также не являющихся носителями заболевания или патологического состояния. Также в контексте данного документа термин «нормальный» употребляется для качественной оценки биологического
25 препарата или образца, полученного от нормального индивида или субъекта или индивида или субъекта дикого типа, например, «нормальный биологический образец».

Образец: В контексте данного документа термин «образец» обозначает небольшую часть чего-то, предназначенную для демонстрации качества, природы или количества объекта, из которого она была получена. Термин образец включает любой образец, полученный из
30 любого источника.

Лечение: В контексте данного документа термин «лечение» (также «лечить») в самом широком смысле относится к любому введению терапевтического белка (например,

лизосомального фермента), которое частично или полностью ослабляет, уменьшает, облегчает, ингибирует, замедляет развитие, снижает тяжесть и/или снижает частоту появления одного или более симптомов или признаков определенного заболевания, нарушения и/или патологического состояния (например, синдрома Санфилиппо, синдрома Хантера). Такое

5 лечение можно осуществлять в отношении субъекта, который не проявляет признаков соответствующего заболевания, нарушения и/или патологического состояния, и/или субъекта, который проявляет только ранние признаки соответствующего заболевания, нарушения и/или патологического состояния. В альтернативном или дополнительном варианте такое лечение

10 можно осуществлять в отношении субъекта, который проявляет один или более установленных признаков соответствующего заболевания, нарушения и/или патологического состояния. В некоторых вариантах реализации изобретения лечение можно осуществлять в отношении субъекта, у которого было диагностировано соответствующее заболевание, нарушение и/или патологическое состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения

15 лечение можно осуществлять в отношении субъекта, для которого известно наличие одного или более факторов восприимчивости, которые статистически коррелируют с повышенным риском развития соответствующего заболевания, нарушения и/или патологического состояния.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

20 На Фиг. 1 представлены типовая диаграмма и таблица, иллюстрирующие Δ -ненасыщенные дисахариды ГС, полученные при ферментативной деполимеризации с помощью гепариназ. Общая структура дисахаридов ГС. Дисахарид содержит гексуоновую кислоту, связанную с глюкозамином посредством α/β 1-4 гликозидной связи. 4-5 Δ -ненасыщенность гексуоновой кислоты не является природным признаком, а внесена

25 посредством элиминационного механизма фермента. Показаны обычные участки замещений: R1, R2 и R3. На основании *N*-замещения дисахариды структурно делятся на две категории, а именно, *N*-сульфатированные и *N*-ацетилированные. В каждой категории дисахариды могут быть сульфатированными по разным гидроксильным атомам кислорода. Следует отметить, что IIS/IIIIS и IIA/IIIA являются позиционными изомерами в отношении O-сульфатных позиций.

30 На Фиг. 2А и 2В представлены типовые диаграммы и график, иллюстрирующие восстановительное аминирование дисахаридов ГС 4-бутиланилином (4-NBA). На Фиг. 2А

представлена диаграмма, иллюстрирующая химическую структуру 4-NBA и его версии, меченой изотопом ^{13}C , применяемой для получения внутренних дисахаридных стандартов. На Фиг. 2В представлены диаграмма и график, иллюстрирующие, что восстанавливающий конец дисахарида находится в равновесии между гидроксильной и альдегидной группой. Во время восстановительного аминирования первичный амин 4-NBA легко вступает в реакцию с альдегидом с образованием ковалентной иминной связи. Иминную связь дополнительно восстанавливали восстанавливающими агентами, чтобы получить более стабильную аминную связь. Масс-спектр высокого разрешения показал наличие однозарядного репрезентативного дисахарида (IIS) наряду с внутренним стандартом, который был на 6 Да тяжелее.

На Фиг. 3 представлена серия типовых графиков, иллюстрирующих ЖХ/МС разделение меченых 4-NBA дисахаридов ГС с помощью C18 обращенно-фазовой хроматографии. Показаны шесть коммерчески доступных дисахаридов, представляющих распространенные виды, полученные при расщеплении ГС из ЦСЖ пациентов с синдромом Санфилиппо А. Разделение осуществляли коротким методом ЖХ в течение двенадцати минут. Изомерные *N*-сульфатированные дисахариды IIS и IIIS являются полностью разделенными. Аналогично, с помощью этой платформы могут быть разделены *N*-ацетилированные изомеры IIA и IIIA (не показано).

На Фиг. 4 представлена типовая диаграмма, иллюстрирующая этапы процедуры приготовления образцов.

На Фиг. 5 представлен типовой график, иллюстрирующий суточную линейность и достоверность калибровочной кривой для дисахаридов. Чтобы построить калибровочную кривую, готовили смесь с определенным соотношением шести дисахаридов и вносили ее в предназначенную для мечения матрицу. Использовали восемь отличных от нуля стандартных (СТД) уровней концентрации смеси в диапазоне от 0,1 мкМ до 50,0 мкМ в двух повторностях. СТД1 представляет НПКО анализа. Получали кривую наилучшего соответствия, описывающую соотношение между номинальной концентрацией калибраторов и ответом детектора. На оси Y представлены общие ответы шести дисахаридов, нормированные относительно их I_{std} . Линейность соотношения подтверждалась коэффициентом корреляции $R^2 = 0,99$.

На Фиг. 6 представлен типовой график, иллюстрирующий уровни ГС в ЦСЖ пациентов с синдромом Санфилиппо А по сравнению с контролем. Контрольные образцы с концентрациями ГС меньше нижнего предела количественного определения ($n = 53$) на график не наносили.

5 На Фиг. 7 представлен типовой график, иллюстрирующий изменение в концентрации ГС в ЦСЖ после интратекального применения ферментозаместительной терапии рекомбинантной гепаран-N-сульфатазой в отношении пациентов с синдромом Санфилиппо А.

На Фиг. 8 представлен типовой график, иллюстрирующий уровни ГС в ЦСЖ пациентов с синдромом Хантера по сравнению с контролем. Контрольные образцы с концентрациями ГС
10 меньше нижнего предела количественного определения ($n = 53$) на график не наносили.

На Фиг. 9 представлена типовая диаграмма, иллюстрирующая распределение включенных в исследование пациентов.

На Фиг. 10 представлен типовой график, иллюстрирующий концентрации ГАГ в ЦСЖ в зависимости от возраста и когнитивной функции (фармакодинамическая группа). Величины
15 меньше нижнего предела количественного определения (НПКО) были заменены величиной НПКО.

На Фиг. 11 представлен типовой график, иллюстрирующий концентрации ГАГ в ЦСЖ пациентов с синдромом Санфилиппо А, которых лечили рекомбинантной человеческой гепаран-N-сульфатазой.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящее изобретение включены способы и композиции для определения уровня одного или более гликозаминогликанов (ГАГ). Некоторые ГАГ, например, гепарансульфат
20 (ГС), не являются одним соединением, а скорее набором родственных молекул (молекул ГС ГАГ), имеющих в некоторых случаях разную молекулярную массу. В различных вариантах реализации изобретения способ может включать этапы ферментативного расщепления биологического образца (например, биологического образца, содержащего ГАГ) для получения расщепленного биологического образца и последующей дериватизации
25 расщепленного биологического образца. После дериватизации можно проводить анализ

образца, чтобы идентифицировать соединения, присутствующие в дериватизированном образце, при этом идентифицированные соединения прямо или косвенно обеспечивают определение уровня одного или более гликозаминогликанов. Соответственно, в различных вариантах реализации в изобретении предложен способ определения уровня одного или более ГАГ (например, ГС) в образце, включающий этапы расщепления, дериватизации и анализа.

В различных вариантах реализации настоящего изобретения анализ включает один или более этапов разделения и один или более этапов выявления. В общем случае разделение может включать разделение такими методами, как хроматография, или схожими методами, известными в данной области техники. В общем случае выявление может включать такие методы, как масс-спектрометрия. Соответственно, в некоторых конкретных вариантах реализации изобретение включает способ определения уровня одного или более ГАГ в образце, включающий этапы расщепления, дериватизации, разделения и выявления.

В различных вариантах реализации настоящего изобретения биологический образец готовят для ферментативного расщепления методом экстракции. В различных вариантах реализации настоящего изобретения биологический образец готовят (например, готовят для ферментативного расщепления, дериватизации, расщепления с последующей дериватизацией или дериватизации с последующим расщеплением) методом экстракции. В различных вариантах реализации настоящего изобретения биологический образец готовят (например, готовят для ферментативного расщепления, дериватизации, расщепления с последующей дериватизацией или дериватизации с последующим расщеплением) методом экстракции с последующим обессоливанием. Например, клинический образец может быть получен от одного или более пациентов, а ГАГ может быть выделен из клинического образца. В некоторых случаях продукт, полученный такой экстракцией, является обессоленным. Соответственно, в некоторых конкретных вариантах реализации изобретение включает способ определения уровня одного или более ГАГ (например, ГС) в образце, включающий этапы экстракции, расщепления, дериватизации, разделения и выявления. Кроме того, в некоторых конкретных вариантах реализации изобретения изобретение включает способ определения уровня одного или более ГАГ в образце, включающий этапы экстракции, обессоливания, расщепления, дериватизации, разделения и выявления. Любые два или более из этих этапов можно проводить в любой последовательности, включая конкретные варианты реализации изобретения, включающие любые два или более этих этапов, в которых комбинация включает конечный

этап анализа, поскольку за этапом анализа необязательно следует дополнительный этап, выбранный из этих этапов, или, конкретнее, конечный этап выявления, поскольку за этапом выявления необязательно следует дополнительный этап, выбранный из этих этапов.

В различных вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению можно применять для отслеживания прогрессирования заболевания или патологического состояния путем отслеживания уровня одного или более ГАГ (например, ГС) или одного или более их компонентов. В определенных вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению можно применять для отслеживания уровня одного или более гликозаминогликанов или одного или более их компонентов у субъекта, например, субъекта, проходящего лечение терапевтическим агентом. В определенных вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению можно применять для отслеживания уровня одного или более гликозаминогликанов или одного или более их компонентов у субъекта, у которого было диагностировано наличие или который подвержен риску наличия патологического состояния, связанного с клинически значимой модуляцией или нарушением баланса уровня одного или более ГАГ или одного или более их компонентов (связанного с ГАГ патологического состояния). Связанные с ГАГ патологические состояния включают, например, МПСІ, МПСІІ, МПСІІА, МПСІІВ, МПСІІС, МПСІІD, МПСІVА, МПСІVВ, МПСVІ, МПСVІІ и МПСІХ (включая, например, СанА и СанВ), а также синдром Хантера. В определенных вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению можно применять для отслеживания уровня одного или более гликозаминогликанов или их компонентов (например, составляющих дисахаридов) у субъекта, у которого было диагностировано наличие или который подвержен риску наличия лизосомной болезни накопления или связанного с ГАГ патологического состояния, которое представляет собой лизосомную болезнь накопления.

В некоторых вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению применяют для определения уровня одного или более гликозаминогликанов или одного или более их компонентов у субъекта, имеющего патологическое состояние, связанное с нарушением баланса гликозаминогликанов. В определенных вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению применяют в сочетании с дополнительным критерием или биомаркером, например, биомаркером связанного с ГАГ патологического состояния,

например, качественным или количественным биомаркером наличия, активности или прогрессирования связанного с ГАГ патологического состояния.

В различных вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению применяют для определения уровня одного или более гликозаминогликанов или одного или более их компонентов у индивида, проходящего лечение патологического состояния, например, связанного с ГАГ патологического состояния.

В некоторых вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению применяют для диагностирования патологического состояния, связанного с нарушением баланса уровня одного или более гликозаминогликанов по сравнению с абсолютным или относительным стандартом, таким как уровень одного или более гликозаминогликанов или другого биомаркера или биологической молекулы.

Различные варианты реализации способов и композиций согласно настоящему изобретению более подробно описаны в данном документе.

Образцы

В настоящем изобретении предложены, помимо прочего, способы и композиции для определения уровня одного или более гликозаминогликанов или одного или более их компонентов (например, составляющих дисахаридов) в образце. В контексте данного документа термин образец включает образец, полученный изначально, а также любые полученные позже варианты или части этого образца, полученные позже варианты или части, полученные из этого образца, например, с помощью различных лабораторных процедур, добавления вещества, удаления вещества, модификации компонентов и т.д., включая любые из множества этапов согласно настоящему изобретению. В определенных вариантах реализации изобретения образец представляет собой объединенный композит из множества образцов.

В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения образец представляет собой биологический образец. Биологический образец может представлять собой любой образец, включая объем одной или более клеток, одной или более тканей, одной или более жидкостей организма, одной или более молекул или одного или более веществ, полученных или приведенных в контакт с живым субъектом, например, человеком.

В конкретных случаях биологический образец представляет собой цереброспинальную жидкость или ее компонент. В конкретных случаях биологический образец представляет собой кровь или ее компонент. В конкретных случаях биологический образец представляет собой плазму или ее компонент. В конкретных случаях биологический образец представляет собой мочу или ее компонент. В конкретных случаях биологический образец представляет собой фекальную массу или ее компонент. В конкретных случаях биологический образец представляет собой слюну, жидкости, полученные из полостей организма, жидкости, полученные из суставов, слезы или их компоненты. В конкретных случаях биологический образец представляет собой тканевый материал, такой как образец, полученный с помощью биопсии ткани. Тканевый материал может быть получен из любой ткани, известной специалистам в данной области техники, включая, например, любую одну или более тканей из ткани головного мозга, ткани почки, ткани печени, ткани легкого, волос, ногтей, тканей репродуктивных органов, кожи, сухожилий, хрящей или хрящевых тканей, соединительной ткани, слизистой оболочки кишечника или мышечной ткани. Примеры подходящих биологических образцов включают, но не ограничиваются этим, сыворотку, мочу, кал, слюну, эпидермальный образец, ротовой мазок, сперму, культивированные клетки, костный мозг, соскоб из ротовой полости, пуповинную кровь, образец хориальных ворсин, культуру образцов хориальных ворсин, околоплодную жидкость, культуру околоплодной жидкости и/или трансцервикальную промывную жидкость.

Также в качестве биологических образцов можно использовать клеточные культуры любых биологических образцов, например, культуры образцов хориальных ворсин и/или культуры околоплодной жидкости, такие как культуры амниоцитов. Подходящие биологические образцы можно получить на таких стадиях развития, как эмбрионы, молодые люди, взрослые люди (например, беременные женщины) и т.д. Также можно использовать фиксированные или замороженные ткани.

Биологические образцы, подходящие для изобретения, могут представлять собой свежие или замороженные образцы, полученные от субъекта, или архивные образцы с известным диагнозом, лечением и/или историей результатов. Биологические образцы можно получать любыми инвазивными или неинвазивными способами, такими как, например, забор ЦСЖ или крови у пациента или аспирационная или пункционная биопсия с помощью тонкой иглы, или хирургическая биопсия.

В определенных случаях субъект согласно настоящему изобретению, например, субъект, от которого получают образец, является животным. В конкретных случаях субъект согласно настоящему изобретению, например, субъект, от которого получают образец, является млекопитающим. В определенных случаях субъект согласно настоящему изобретению, например, субъект, от которого получают образец, является человеком или отличным от человека приматом. Субъект также может быть животным, таким как собака, кошка, корова, лошадь, коза, курица, свинья, птица или рыба. Субъект может быть ветеринарным животным, сельскохозяйственным животным или животным-компаньоном. Субъект может быть человеком, который точно имеет связанное с ГАГ патологическое состояние, у которого диагностировано связанное с ГАГ патологическое состояние, который имеет риск наличия связанного с ГАГ патологического состояния или который нуждается в диагностировании в отношении связанного с ГАГ патологического состояния. Субъект может быть индивидом, нуждающимся в лечении связанного с ГАГ патологического состояния. Субъект может быть индивидом, проходящим лечение связанного с ГАГ патологического состояния.

В различных вариантах реализации изобретения образец или биологический образец может содержать или может быть смешан с лабораторными реагентами. Например, образец или биологический образец может включать образец, изначально полученный от субъекта, в комбинации с одним или более консервантами, вспомогательными веществами, разбавителями, буферами или любыми агентами, которые облегчают анализ образца в соответствии со способом согласно настоящему изобретению.

Образцы ГАГ или их компонентов (например, составляющих дисахаридов) согласно настоящему изобретению могут быть получены из различных источников, известных специалистам в данной области техники, включая петушиные или куриные гребни или скорлупу яиц, например, скорлупу куриных яиц.

В различных вариантах реализации настоящего изобретения образец можно обрабатывать любым методом, известным в данной области техники, чтобы повысить концентрацию одного или более ГАГ или одного или более их компонентов в образце. Такая обработка может проводиться до проведения любого или всех этапов из, например, этапа экстракции, этапа расщепления, этапа дериватизации, этапа разделения или этапа выявления или любого другого ряда или комбинации этапов, приведенных в данном документе

(например, предварительной обработки), или может проводиться в любое время между любыми двумя этапами способа согласно настоящему изобретению, включая, например, непосредственно перед анализом, непосредственно перед разделением или непосредственно перед выявлением. Для специалистов в данной области техники очевидно, что такую
5 обработку можно проводить включительно с или в дополнение к, или, в некоторых случаях, в комбинации с или одновременно с различными этапами, процедурами или способами, каким-либо другим образом описанными в данном документе.

В различных вариантах реализации настоящего изобретения образец (например, изначально полученный образец, биологический образец, обрабатываемый образец, образец
10 непосредственно перед этапом экстракции, образец непосредственно перед этапом разделения или образец непосредственно перед этапом выявления, например, ЦСЖ) имеет объем от 1 мкл до 50 мл или более, например, 1 мкл, 2 мкл, 3 мкл, 4 мкл, 5 мкл, 10 мкл, 20 мкл, 30 мкл, 40 мкл, 50 мкл, 75 мкл, 100 мкл, 250 мкл, 500 мкл, 1 мл, 5 мл, 10 мл, 25 мл, 50 мл или более, или соответствующий любому диапазону между ними. Например, в определенных вариантах
15 реализации изобретения предложенный в данном документе образец имеет объем от 10 мкл до 100 мкл, например, 50 мкл.

Образцы можно получать в один момент времени, в два момента времени или во множественные моменты времени с регулярными или нерегулярными интервалами. Например, образцы могут быть получены от субъекта или группы субъектов, или выбранных
20 представителей группы одинаковых субъектов в течение периода времени в диапазоне от 10 минут до 2 лет или более, например, 10 минут, 30 минут, 1 часа, 6 часов, 12 часов, 1 суток, 1 недели, 1 месяца, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет или более, или любого промежуточного диапазона, например, от 1 месяца до 6 месяцев, от 6 месяцев до 1 года или от 1 года до 2 лет.

Описанные в данном документе человеческие субъекты, от которых получают образцы,
25 могут представлять собой, например, эмбрион, ребенка или взрослого. Возраст ребенка может составлять, например, менее 1 года, менее 2 лет, менее 3 лет, менее 4 лет, менее 5 лет, менее 6 лет, менее 7 лет, менее 8 лет, менее 9 лет, менее 10 лет, менее 15 лет или менее 18 лет, или любой промежуточный возраст. Возраст взрослого может составлять, например, более 18 лет, более 20 лет, более 25 лет, более 30 лет, более 40 лет, более 50 лет, более 60 лет, более 70 лет,
30 более 80 лет или более, или любой промежуточный возраст, например, от 18 до 25 лет, от 25 до 30 лет, от 30 до 35 лет, от 35 до 40 лет, от 40 до 50 лет или от 50 до 60 лет. В любых

предложенных в данном документе вариантах реализации изобретения, если не указано иное, субъектом или источником образцов может быть человек.

Гликозаминогликаны (ГАГ) и связанные с ГАГ патологические состояния

5 Гликозаминогликаны (ГАГ) составляют семейство в общем случае линейных анионных полимеров, которые можно обнаружить в организмах, например, на клеточных поверхностях, во внеклеточном матриксе (ВКМ) и гранулах тучных клеток. ГАГ включают, например, гиалуронан, кератансульфат (КС), хондроитинсульфат (ХС), дерматансульфат (ДС), гепарансульфат (ГС), гепарин, хондроитинсульфат/дерматансульфат (ХС/ДС) и
10 гепарансульфат (ГС)/гепарин. ГАГ выполняют широкий спектр биологических функций, а их метаболизм регулируется множеством факторов. Заболевания или патологические состояния, которые являются результатом или связаны с клинически значимой модуляцией или нарушением баланса уровней одного или более ГАГ или одного или более их компонентов, могут называться связанными с ГАГ патологическими состояниями. В различных вариантах
15 реализации изобретения связанное с ГАГ патологическое состояние представляет собой лизосомную болезнь накопления.

В различных вариантах реализации изобретения связанное с ГАГ патологическое состояние включает нарушение функции одного или более ферментов, которые оказывают прямое или не прямое действие на регуляцию уровней ГАГ, например, гликозидазы, сульфатазы или деацетилазы, например, фермента, разрушающего гликаны.
20

При определенных связанных с ГАГ патологических состояниях ГАГ могут накапливаться, например, в лизосомах, в результате разрушения, например, ферментов, которые принимают участие в разрушении ГАГ, что приводит к клеточной токсичности. Связанные с ГАГ патологические состояния включают мукополисахаридозы (МПС), которые
25 могут являться рецессивными наследственными нарушениями, возникающими вследствие частичной или полной потери активности одного или нескольких ферментов, например, гидролаз, принимающих участие в разрушении ГАГ. Не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, можно сказать, что по меньшей мере один известный путь разрушения ГАГ включает девять последовательно действующих ферментов. На сегодняшний день были

получены характеристики одиннадцати разных МПС (МПСI, МПСII, МПСIIIA, МПСIIIB, МПСIIIC, МПСIIID, МПСIVA, МПСIVB, МПСVI, МПСVII и МПСIX).

Синдром Санфилиппо или мукополисахаридоз III (МПСIII) представляет собой редкое генетическое нарушение, характеризующееся недостатком ферментов, принимающих участие в разрушении гликозаминогликанов (ГАГ). В отсутствие этого фермента частично разрушенные молекулы ГАГ не могут выводиться из организма и накапливаются в лизосомах различных тканей, что приводит к прогрессирующей обширной соматической дисфункции. Было идентифицировано четыре разные формы МПСIII, названные МПСIIIA, B, C и D. Каждая представляет недостаток одного из четырех ферментов, принимающих участие в разрушении ГАГ гепарансульфата. Все формы включают варьирующиеся степени одинаковых клинических симптомов, включая грубые черты лица, гепатоспленомегалию, помутнение роговой оболочки глаза и деформации скелета. Однако, наиболее важной является тяжелая и прогрессирующая потеря когнитивной способности, которая связана не только с накоплением гепарансульфата в нейронах, но также с последующим повышением содержания ганглиозидов GM2, GM3 и GD2, вызываемым первичным накоплением ГАГ.

В конкретном примере связанного с ГАГ патологического состояния синдром Санфилиппо A (СанА; МПСIIIA) может являться результатом аберрантного катаболизма ГС вследствие мутации в разрушающем ферменте гепаран-N-сульфатазе (HNS). При СанА в лизосоме могут накапливаться промежуточные продукты разрушения ГС. Хотя могут поражаться все типы клеток в организме, клинические проявления СанА включают фенотипы, связанные с нарушением функции центральной нервной системы (ЦНС), и включают, но не ограничиваются этим, недостаток интеллектуальных и языковых навыков и двигательных навыков. Одной из стратегий лечения пациентов с МПС является ферментозаместительная терапия (ФЗТ), целью которой является замещение недостающей гидролазы рекомбинантной формой этого белка.

В другом конкретном примере мукополисахаридоз типа IIIB (МПСIIIB; болезнь Санфилиппо B) представляет собой аутосомное рецессивное нарушение, которое характеризуется недостатком фермента альфа-N-ацетилглюкозаминидазы (Naglu). В отсутствие этого фермента ГАГ гепарансульфат накапливается в лизосомах нейронов и глиальных клеток и меньшей степени накапливается за пределами головного мозга.

Недостаток фермента идуронат-2-сульфатазы (I2S) у пациентов с синдромом Хантера может приводить к прогрессирующему накоплению гликозаминогликанов (ГАГ), например, дерматансульфата или гепарансульфата, в лизосомах различных типов клеток, потенциально приводя к клеточному переполнению, органомегалии, разрушению ткани и дисфункции системы органов. В общем случае проявления синдрома Хантера включают как соматические, так и нейрональные симптомы. В некоторых случаях синдрома Хантера вовлечение центральной нервной системы приводит к задержке в развитии и проблемам с нервной системой. Накопление ГАГ в периферической ткани может приводить к заметному огрублению черт лица пациента и обуславливает выдающийся лоб, приплюснутую переносицу и увеличенный язык. Накопление ГАГ может негативно влиять на системы органов организма. Проявляясь изначально в виде утолщения стенок сердца, легких и дыхательных путей и аномального увеличения печени, селезенки и почек, эти тяжелые изменения могут в конечном итоге привести к обширной катастрофической органной недостаточности. Синдром Хантера, как правило, является тяжелым, прогрессирующим и ограничивающим продолжительность жизни.

В различных вариантах реализации изобретения связанное с ГАГ патологическое состояние представляет собой лизосомную болезнь накопления, например, лизосомную болезнь накопления, выбранную из МПСІ, МПСІІ, МПСІІА, МПСІІВ, МПСІІС, МПСІІD, МПСІVА, МПСІVВ, МПСVІ, МПСVІІ, МПСІХ, альфа-маннозидоза, аспартилглюкозаминурии, болезни Фабри, фукозидоза, галактосиалидоза, болезни Гоше, GM1-ганглиозидоза, недостатка активатора GM2, сиалидоза, болезни Краббе, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза IV, множественной сульфатазной недостаточности, болезни Помпе, болезни Сандхоффа, болезни Тей-Сакса, варианта АВ болезни Шиндлера, болезни Салла, бета-маннозидоза или глобоидно-клеточной лейкодистрофии. Для специалистов в данной области техники очевидно, что эти патологические состояния могут относиться к настоящему изобретению только в той степени, в которой они включают изменение, модификацию или нарушение уровня одного или более ГАГ, их компонентов или их продуктов расщепления. В различных вариантах реализации настоящее изобретение может включать или представлять, не ограничиваясь этим, механизм оценки активности фермента, относящегося к связанному с ГАГ патологическому состоянию, оценки статуса связанного с ГАГ патологического состояния или отслеживания

эффективности лечения в связи со связанным с ГАГ патологическим состоянием, например, у нуждающегося в этом субъекта или в целях исследования.

Экстракция

5 В различных вариантах реализации настоящего изобретения образец обрабатывают путем экстракции (например, очистки или выделения) одного или более ГАГ (например, ГС) или одного или более их компонентов (например, составляющих дисахаридов). ГАГ содержат, например, гиалуронан, кератансульфат (КС), хондроитинсульфат (ХС), дерматансульфат (ДС), гепарансульфат (ГС), гепарин, хондроитинсульфат/дерматансульфат (ХС/ДС) и
10 гепарансульфат (ГС)/гепарин. В конкретных вариантах реализации изобретения экстракция представляет собой процесс, посредством которого производится отделение или очистка одной или более молекул ГАГ или одного или более их компонентов от одной или более других молекул или одного или более других типов молекул, присутствующих в образце.

В данной области техники известны различные способы экстракции одного или более
15 ГАГ или одного или более их компонентов из образца. Также в данной области техники известны способы экстракции одного или более конкретных ГАГ или одного или более их конкретных компонентов.

В различных вариантах реализации изобретения этап экстракции согласно настоящему изобретению может включать фракционирование, градиентное или колоночное
20 центрифугирование, центрифугирование, электрофорез, хроматографию (например, хроматографию на силикагеле, хроматографию на алюминиевой колонке, хиральную колоночную ВЭЖХ, ахиральную колоночную ВЭЖХ, тонкослойную хроматографию, препаративную флэш-хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, проникающую хроматографию, эксклюзионную хроматографию, хроматографию на молекулярных ситах,
25 аффинную хроматографию или любой другой метод хроматографии, предложенный в данном документе в этом или любом другом контексте, фильтрацию (например, через флоризированный фильтр или фильтр из активированного угля), осаждение, осмос, перекристаллизацию, очистку фторсодержащей фазы, дистилляцию, хроматофокусирование, сверхкритическую флюидную экстракцию или любой другой применяемый метод, известный в данной области техники.

Экстракция может включать расщепление протеиназой, например, папаином. Экстракция может включать этап осаждения, включая, например, этанолом (например, этанолом в изменяющейся концентрации). Экстракция может включать спиртовое фракционирование. Экстракция может включать хроматографию, например, анионообменную хроматографию, ионообменную хроматографию с ДЭАЭ-сефацелом, хроматографию с СЕФАРОЗОЙ® или гель-фильтрационную хроматографию, или любой метод хроматографии, предложенный в данном документе или иным образом известный специалистам в данной области техники. Экстракция может включать солублилизацию одного или более ГАГ или одного или более их компонентов, которые были осаждены в виде комплексов ГАГ/молекул ГАГ с четвертичными соединениями аммония разными концентрациями NaCl. Экстракция может включать избирательное осаждение, например, сульфатом меди в щелочных условиях. Экстракция может включать этап диафильтрации или диализа. Экстракция одного или более ГАГ или одного или более их компонентов может включать обработку уксусной кислотой. Дополнительные способы экстракции ГАГ или молекул ГАГ известны в данной области техники.

Конкретные ГАГ или их компоненты (например, составляющие дисахариды) можно выделять на основании аффинности к известному связывающему веществу или партнеру по связыванию, такому как костный морфогенетический белок 2.

Экстракция одного или более ГАГ или одного или более их компонентов из образца может требовать разрушения других тканевых компонентов или связанных тканевых компонентов, с которыми один или более ГАГ или один или более их компонентов могут быть, например, ковалентно связаны. Экстракция одного или более ГАГ или одного или более их компонентов может включать гидролиз. Экстракция одного или более ГАГ или одного или более их компонентов может включать инкубацию с детергентом. Экстракция одного или более ГАГ или одного или более их компонентов может включать обработку щелочью.

В определенных вариантах реализации изобретения способ экстракции ГАГ или компонента ГАГ представляет собой экстракцию ДЭАЭ. В конкретных случаях способ экстракции ГАГ представляет собой экстракцию ДЭАЭ, при которой образцы приводят в контакт с ДЭАЭ, необязательно промывают загрузочным буфером так, чтобы не происходило элюирование одного или более ГАГ или одного или более их компонентов, а затем приводят

образец в контакт с элюирующим буфером так, чтобы происходило элюирование одного или более ГАГ или одного или более их компонентов.

В различных вариантах реализации изобретения экстракция, выделение или очистка включает или приводит к частичному, практически полному или полному удалению одного или более моносахаридов, сульфатов, фосфатов, ацетата, сиаловой кислоты или любого компонента, который может быть признан специалистами в данной области техники как загрязняющий, такого как, в некоторых случаях, компонент, который не является ГАГ или их компонентом (например, составляющим дисахаридом), или продуктом их расщепления.

В определенных вариантах реализации изобретения ГАГ экстрагируют путем ионообменной твердофазной экстракции гепарансульфата.

В конкретных случаях экстракция приводит к получению экстрагированного образца с повышением абсолютной или относительной концентрацией одной или более молекул ГАГ или одного или более их компонентов (согласно определению, например, по молярности или массе) на 5% или более, например, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, в 2 раза (т.е. повышение на 100%), 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 1000 раз, 1000000 раз или более или на любой промежуточный диапазон. Например, экстракция может повышать абсолютную или относительную концентрацию одной или более молекул ГАГ или одного или более их компонентов (согласно определению, например, по молярности или массе) на от 20% до 100%, от 20% до 2 раз, от 20% до пяти раз, от 50% до 100%, от 50% до 2 раз, от 50% до 5 раз, от 1 раза до 5 раз, от 1 раза до 100 раз, от 50 раз до 100 раз, от 100 раз до 1000 раз или от 1000 раз до 1000000 раз.

В конкретных случаях экстрагированный образец содержит общее количество одной или более молекул ГАГ или одного или более их компонентов, превышающее нижний предел обнаружения, в соответствии по меньшей мере с одним способом согласно настоящему изобретению. Например, в определенных вариантах реализации изобретения экстрагированный образец может содержать от 0,01 до 100 или более мкМ конкретного ГАГ или его компонента (например, составляющего дисахарида) или общего дисахарида, например, 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500 или более мкМ конкретной молекулы или общего дисахарида.

Обессоливание

В различных вариантах реализации настоящего изобретения образец обрабатывают путем обессоливания. В различных вариантах реализации изобретения обессоливание может происходить после экстракции. В различных вариантах реализации изобретения обессоливание может происходить до экстракции. В различных вариантах реализации изобретения обессоливание может происходить параллельно с экстракцией. В различных вариантах реализации изобретения экстракция и обессоливание являются одновременными, например, проводятся вместе на одном этапе.

В определенных вариантах реализации изобретения обессоливание включает гель-фильтрацию и/или гель-фильтрационную хроматографию. В определенных вариантах реализации изобретения обессоливание включает применение самотечной колонки, хроматографических картриджей, гель-фильтрационных колонок или сред или центрифужных или спин-колонок. В определенных вариантах реализации изобретения обессоливание включает диафильтрацию, например, диафильтрацию с применением ультрафильтрационных мембран, избирательно проницаемых мембран или других фильтрационных сред. В конкретных вариантах реализации изобретения диафильтрация включает непрерывную диафильтрацию или диафильтрацию с постоянным объемом, или прерывную диафильтрацию. Обессоливание может включать применение концентраторов, кассет или единиц для диализа, колонок для обессоливания или устройств для буферного обмена. В определенных вариантах реализации изобретения обессоливание включает ДЭАЭ-хроматографию или хроматографию с ДЭАЭ-конъюгатом. В некоторых вариантах реализации изобретения обессоливание может включать этап выпаривания с последующей обработкой спиртом и/или ацетатом аммония.

В конкретных примерах образец (например, биологический образец или экстрагированный образец) добавляют в планшет для обессоливания, такой как планшет G-25 Multitrap, и центрифугируют планшет так, чтобы элюент представлял собой обессоленный образец.

В некоторых случаях обессоливание включает применение одного или более различных буферов, известных в данной области техники, для применения в обессоливании или в

сочетании с обессоливанием и сходными процессами. Наборы и компоненты для применения для обессоливания и сходных процессов также являются коммерчески доступными. Например, коммерчески доступные продукты для гель-фильтрации включают СЕФАДЕКС® G-10, СЕФАДЕКС® G-25, Био-гель Р-60, СЕФАДЕКС® G-75, СЕФАДЕКС® G-100, Био-гель Р-100, СЕФАДЕКС® G-200, Био-гель Р-200, СЕФАКРИЛ® S-300 и СЕФАРОЗУ® 2В. Известные буферы включают, например, трис-НСl, фосфат натрия и ацетат натрия. Различные буферы можно готовить так, чтобы получить любые подходящие или оптимизированные к условиям уровни рН или другие характеристики.

В различных вариантах реализации изобретения обессоливание включает диализ или замену буфера.

Обессоленный продукт можно выпаривать, например, под вакуумом и/или при 50°C.

В определенных случаях этап обессоливания представляет собой параллельный этап обессоливания. Параллельный этап обессоливания может исключить необходимость в отдельном обессоливании образца перед разделением и/или выявлением. В определенных вариантах реализации настоящее изобретение включает прямой ввод образца в устройство, включая устройство для параллельного обессоливания, например, устройство, включающее предколонку и разделительную или аналитическую колонку, устройство, включающее предколонку, напрямую соединенную с разделительной или аналитической колонкой. В конкретных случаях устройство для параллельного обессоливания может включать обращено-фазовую предколонку и анионообменную колонку. Обращено-фазовую колонку в некоторых случаях можно применять для захвата липидов. В определенных вариантах реализации изобретения устройство для параллельного обессоливания включает обращено-фазовую предколонку, соединенную с анионообменной колонкой, например, напрямую соединенную с анионообменной колонкой. В различных вариантах реализации изобретения, включающих параллельное обессоливание, обессоливание проводится параллельно с экстракцией, параллельно с разделением или параллельно с анализом.

Ферментативное расщепление

Различные варианты реализации настоящего изобретения включают этап, на котором один или более ГАГ ферментативно расщепляют, чтобы получить такие компоненты ГАГ, как дисахариды. ГАГ содержат, например, гиалуронан, кератансульфат (КС), хондроитинсульфат (ХС), дерматансульфат (ДС), гепарансульфат (ГС), гепарин, хондроитинсульфат/дерматансульфат (ХС/ДС) и гепарансульфат (ГС)/гепарин. Группа ферментов, известных как ГАГ-лиазы, содержит примеры ферментов, которые расщепляют молекулы ГАГ. В широком смысле настоящее изобретение содержит как класс, помимо других ферментов, ферменты, которые, как известно, специфически расщепляют ГАГ. Специфичность в расщеплении молекул ГАГ необязательно может быть достигнута подбором конкретных расщепляющих ферментов. Примеры содержат лиазы хондроитинсульфата, хондроитиназу АВС, хондроитиназу С, хондроитиназу С из *Flavobacterium heparinum*, лиазы гепарансульфата, стрептококковую гиалуронидазу, гиалуронидазу стрептомицетов, гиалуронидазу А, гиалуронидазу С, тестикулярную гиалуронидазу, кератаназу, тестикулярную гиалуронидазу из бараньих яичек и эндо-β-галактозидазу. В данной области техники известны различные ферменты с более широкой или более узкой или условно более широкой или более узкой специфичностью. Специфичность таких ферментов известна специалистам в данной области техники. В различных вариантах реализации изобретения расщепление приводит к получению продуктов расщепления ГАГ.

Для специалистов в данной области техники очевидно, что гепариназа I, гепариназа II и гепариназа III представляют собой ферменты, способные расщеплять гепарансульфат. Хондроитиназа АС, хондроитиназа В и хондроитиназа С, а также хондроитиназа АВС способны расщеплять хондроитинсульфат и/или дерматансульфат. Кератаназа II способна расщеплять кератансульфат. Гиалуронидаза способна расщеплять гиалуроновую кислоту.

Например, гепариназа I представляет собой фермент, который расщепляет определенные ГАГ, включая гепаран и сходные молекулы. Не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, считается, что гепариназа I, по меньшей мере в определенных условиях, способна принимать участие в элиминационном расщеплении полисахаридов, содержащих остатки 1,4-связанного D-глюкуроната или L-идуроната и остатки 1,4-а-связанной 2-сульфоамино-2-дезоксид-6-сульфо-D-глюкозы, для получения олигосахаридов с концевыми 4-дезоксид-а-D-глюк-4-енуронозильными группами в своих невосстанавливающих концах, и что гепариназа I расщепляет гепарин более легко, чем гепарансульфат.

Опять же, не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, считается, что гепариназа II расщепляет как гепарин, так и гепарансульфат.

Опять же, не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, считается, что гепариназа III расщепляет исключительно гепарансульфат и не расщепляет нефракционированный гепаран или низкомолекулярные гепараны.

Опять же, не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, считается, что хондроитиназа ABC или лиаза хондроитина ABC, например, из *Proteus vulgaris*, способна расщеплять все типы хондроитинсульфата, дерматансульфата и гиалуронана. Не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, считается, что хондроитиназа ABC катализирует элиминационное расщепление N-ацетилгексозаминидных связей, например, в хондроитин-4-сульфате, хондроитин-6-сульфате, дерматансульфате, хондроитине и гиалуроновой кислоте, что приводит к получению различных дисахаридов. Считается, что этот фермент не действует на кератинсульфат, гепарин и гепарансульфат.

Опять же, не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, считается, что хондроитиназа AC II артро или лиаза хондроитина AC, например, из *Arthrobacter aurescens*, расщепляет все типы хондроитинсульфата и гиалуронана, но не дерматансульфат. Не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, считается, что хондроитиназа AC катализирует элиминационное расщепление N-ацетилгексозаминидных связей в хондроитине, хондроитин-4-сульфате и хондроитин-6-сульфате, что приводит к получению различных дисахаридов.

Опять же, не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, считается, что гиалуронидаза или гиалуронатлиаза из *Streptomyces hyalurolyticus* специфически расщепляет гиалуронан или гиалуроновую кислоту. Считается, что гиалуронидаза SD или гиалуронатлиаза из *Streptococcus dysgalactiae* расщепляет несulfатированный хондроитин и гиалуронан. В других случаях ферменты гиалуронидазы расщепляют все типы хондроитинсульфата и гиалуронана.

В других вариантах реализации изобретения расщепление согласно настоящей реакции включает один или более ферментов, которые не расщепляют гепаран или гепарансульфат. Например, не ограничиваясь какой-либо конкретной научной теорией, считается, что фермент

хондроитина АС принимает участие в элиминационном разрушении полисахаридов, содержащих 1,4- β -D-гексозаминильные и 1,3- β -D-глюкуронозильные связи, до дисахаридов, содержащих 4-дезоксид- β -D-глюк-4-енуронозильные группы, и расщепляет хондроитинсульфаты А и С. Считается, что хондроитиназа В расщепляет дерматансульфат.

5 В различных вариантах реализации настоящего изобретения образец одного или более ГАГ или их компонентов приводят в контакт с одним или более ГАГ-расщепляющими ферментами, например, одним или более ГАГ-расщепляющими ферментами, приведенными в данном документе или иным образом известными в данной области техники.

10 Реакция расщепления согласно настоящему изобретению может включать применение ГАГ в концентрации, например, от 0,01 до 100 или более мкМ конкретной молекулы или общего дисахарида, например, 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500 или более мкМ конкретной молекулы или общего дисахарида.

15 Реакция расщепления согласно настоящему изобретению может включать применение ГАГ-расщепляющего фермента в концентрации от 0,1 Е до 100 Е или более, например, 0,1 Е, 0,5 Е, 1 Е, 2 Е, 3 Е, 4 Е, 5 Е, 10 Е, 20 Е, 30 Е, 40 Е, 50 Е, 75 Е, 100 Е или более, или соответствующей любому промежуточному диапазону, например, от 0,1 Е до 20 Е, от 0,5 Е до 10 Е или от 1 Е до 5 Е.

20 Реакция расщепления может длиться от 30 секунд до 6 дней или более, например, 30 секунд, 1 минуту, 5 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток или более или любой промежуточный диапазон времени. Реакция может происходить, например, при температуре от 1°C до 99°C, такой как 1°C, 5°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, или соответствующей любому промежуточному диапазону.

25 Реакцию расщепления согласно настоящему изобретению можно инкубировать в течение периода времени, достаточного для расщепления одного или более ГАГ (например, ГС) или одного или более их компонентов (например, составляющих дисахаридов) ГАГ-расщепляющими ферментами. Например, реакцию расщепления согласно настоящему изобретению можно инкубировать в течение 10 секунд или более, например, 10 секунд, 20 секунд, 30 секунд, 40 секунд, 50 секунд, 1 минуты, 2 минут, 3 минут, 4 минут, 5 минут, 10

минут, 20 минут, 40 минут, 60 минут, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 1 суток, 2 суток или более, или любого промежуточного диапазона времени в различных условиях. Расщепление может быть полным или неполным, например, расщепление может включать расщепление от 1% до 100% ГАГ или компонентов ГАГ, которые могут расщепляться конкретным ферментом, например, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% или любого промежуточного диапазона, например, от 30% до 100%, от 40% до 100%, от 50% до 100%, от 60% до 100%, от 70% до 100%, от 80% до 100% или от 90% до 100%.

10 Дериватизация

В различных вариантах реализации изобретения образцы согласно настоящему изобретению могут быть дериватизированы. В конкретных случаях продукты расщепления ГАГ, присутствующие в расщепленном образце, являются дериватизированными. Дериватизация может повысить чувствительность анализа различных предложенных в данном документе способов, например, облегчая хроматографическое разделение дериватизированных молекул, например, разделение дериватизированных продуктов расщепления ГАГ.

В различных вариантах реализации изобретения дериватизация включает добавление дериватирующего вещества во множественные участки молекулы ГАГ или ее продукта расщепления. В различных вариантах реализации изобретения дериватизация включает добавление дериватирующего вещества в конкретный участок молекулы ГАГ или ее продукта расщепления.

Образец можно дериватизировать перед этапом экстракции или после этапа экстракции. Образец можно дериватизировать перед этапом расщепления или после этапа расщепления. Образец можно дериватизировать в момент времени перед этапом экстракции и перед этапом расщепления. Образец можно дериватизировать в момент времени после этапа экстракции и после этапа расщепления. Образец можно дериватизировать в момент времени между этапом экстракции и этапом расщепления, например, после экстракции, но перед расщеплением, или, например, после расщепления, но перед экстракцией. В различных вариантах реализации

способ согласно настоящему изобретению может включать, например, этап экстракции, за которым следует этап расщепления, за которым следует этап дериватизации.

Дериватизация может включать добавление гидрофобного вещества к продуктам расщепления ГАГ. Дериватизация может включать добавление вещества, такого как 2-аминопиридин, 2-аминобензамид (АБ), 2-аминобензойная кислота (АК), 4-аминосалициловая кислота (АСИЛ), 3-аминохинолон (3-АХ), 3-(ацетиламино)-6-аминоакридин (АА-Ак), 2-аминоакридон (АМАК), прокаин (Про), прокаинамид (ПроА), этил-4-аминобензоат (АБЭ), бутил-4-аминобензоат (АББ), 5-амино-2-нафталенсульфоновая кислота (АНСК), 8-аминонафтален-1,3,6-трисульфоновая кислота (АНТС), 8-аминопирен-1,3,6-трисульфоновая кислота (АПТС), 1-фенил-3-метил-5-пиразолон (ФМП), 4-нитро-2,1,3-бензоксадиазол (НБДФ), Fmoc и 6-аминохинолон (смотрите, например, Pabst et al. 2009 *Analytical Biochemistry* 384: 263-273).

Специалистам в данной области техники известны различные вещества для дериватизации молекул (например, таких молекул, как продукты расщепления ГАГ) для разделения, например, хроматографического разделения, добавление которых облегчает разделение и тем самым улучшает чувствительность при выявлении. Специалистам в данной области техники также известно, что конкретные дериватизирующие вещества, например, гидрофобные дериватизирующие вещества, могут быть выбраны в соответствии со способом разделения, например, хроматографии, например, анионообменной хроматографии.

Реакция дериватизации может длиться от 30 секунд до 6 дней или более, например, 30 секунд, 1 минуту, 5 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток или более или любой промежуточный диапазон времени. Реакция дериватизации может происходить, например, при температуре от 1°C до 99°C, такой как 1°C, 5°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C или 99°C, или соответствующей любому промежуточному диапазону.

Гликан-специфическая экстракция

В различных вариантах реализации изобретения в любой момент времени в способе согласно настоящему изобретению можно проводить этап гликан-специфической экстракции,

например, после расщепления или дериватизации, но перед анализом. В конкретных вариантах реализации изобретения этап гликан-специфической экстракции может представлять собой этап гликан-специфической твердофазной экстракции. В случае наличия этап гликан-специфической экстракции может быть единственным этапом экстракции. В альтернативном варианте в случае наличия этап поздней экстракции может быть единственным этапом экстракции. На этапе гликан-специфической экстракции можно применять любые способы или методики, описанные в данном документе или каким-либо другим образом известные в данной области техники, в частности, те способы или методики, которые имеют отношение к любому другому этапу экстракции, условному, необязательному или другому.

Анализ

Образцы согласно настоящему изобретению, например, образцы, которые были экстрагированы, обессолены и/или расщеплены, например, образцы, которые были по меньшей мере экстрагированы и расщеплены, можно анализировать, чтобы определить по образцу тип и/или количество одного или более ГАГ (например, ГС) или одного или более их компонентов или продуктов расщепления, присутствующих в образце. В конкретных случаях расщепленный образец анализируют, чтобы определить тип и количество одного или более ГАГ, которые изначально присутствовали в образце перед расщеплением, путем идентификации продуктов расщепления, присутствующих в образце после расщепления. Анализ может включать этап разделения одного или более ГАГ или одного или более их компонентов или продуктов расщепления, присутствующих в расщепленном и/или дериватизированном образце. В конкретных случаях настоящее изобретение включает разделение дериватизированных продуктов расщепления ГАГ.

Анализ может включать этап выявления одного или более ГАГ (например, ГС) или одного или более их компонентов или продуктов расщепления, присутствующих в расщепленном и/или дериватизированном образце. В конкретных вариантах реализации изобретения анализ может включать выявление дериватизированных продуктов расщепления ГАГ.

В конкретных вариантах реализации изобретения анализ может включать этап разделения одного или более ГАГ или одного или более их компонентов или продуктов расщепления, присутствующих в расщепленном и/или дериватизированном образце с последующим этапом выявления одного или более разделенных ГАГ или одного или более разделенных компонентов ГАГ, или одного или более разделенных продуктов расщепления. В более конкретных вариантах реализации изобретения анализ может включать разделение одного или более дериватизированных продуктов расщепления ГАГ и выявление одного или более разделенных продуктов расщепления ГАГ.

10 Разделение

Образцы согласно настоящему изобретению, например, образцы, которые были экстрагированы, обессолены, расщеплены и дериватизированы, например, в указанном порядке, можно обрабатывать так, чтобы разделить один или более ГАГ или один или более их компонентов или продуктов расщепления.

В данной области техники известны различные методы разделения, включающие в качестве примера методы разделения на основе геля и хроматографические методы разделения. В конкретных случаях метод разделения может включать жидкостную хроматографию, тонкослойную хроматографию, капиллярный электрофорез, газовую хроматографию или экстракцию растворителем. В некоторых случаях метод разделения может включать адсорбционную хроматографию, распределительную хроматографию, нормально-фазовую хроматографию, водную нормально-фазовую хроматографию, обращено-фазовую хроматографию, ионообменную хроматографию, молекулярно-ситовую или эксклюзионную хроматографию или аффинную хроматографию. Метод разделения может включать сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (СЭЖХ) или высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). Метод разделения может включать высокоэффективную анионообменную хроматографию (ВЭАОХ). Методы ВЭЖХ, ВЭАОХ и СЭЖХ известны в данной области техники. Метод разделения, включающий хроматографию, может включать жидкостную хроматографию с гидрофильным взаимодействием (ЖХГВ), обращено-фазовую (ОФ) хроматографию или колоночную хроматографию с гибридами с заряженной поверхностью (ГЗП). В различных вариантах реализации изобретения

хроматография включает применение гранул, например, анионообменных гранул. В некоторых случаях разделение включает один или более этапов, на которых молекулы различают на основании, например, размера, полярности, гидрофобности, заряда, флуоресценции, радиоактивности, спектрофотометрических характеристик, спектров, массы или других известных в данной области техники характеристик или любых их комбинаций. В данном документе предусмотрено применение любой комбинации любых двух или более методов разделения (например, многофакторное разделение).

Выявление

Разделенные или неразделенные образцы можно подвергать этапу выявления. В определенных вариантах реализации изобретения выявление включает применение масс-спектрометрии в одной или более из ее различных форм. В некоторых вариантах реализации изобретения этап выявления может включать, например, выявление по проводимости, газ-хроматографическое выявление, амперометрическое выявление (например, импульсное амперометрическое детектирование (ИАД) или 3D амперометрию), гель-электрофорез и другие традиционные методы белкового анализа, масс-спектрометрии в любой из ее различных форм, а также другие известные в данной области техники методы.

Методы масс-спектрометрии, применяемые в данном изобретении, могут включать любой известный в данной области техники метод масс-спектрометрии. Например, для выявления одного или более ГАГ или одного или более их компонентов или продуктов расщепления может применяться ускорительная масс-спектрометрия (УМС), газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС), жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ-МС), масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП), масс-спектрометрии изотопных соотношений (МСИС), спектрометрия ионной подвижности-масс-спектрометрия, масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ) (например, МАЛДИ-ВП), масс-спектрометрия с поверхностно-усиленной лазерной десорбцией/ионизацией (ПУЛДИ) (например, ПУЛДИ-ВП), tandemная масс-спектрометрия (МС/МС), масс-спектрометрия с термической ионизацией (МСТИ), масс-спектрометрия с искровым источником (МСИИ), масс-спектрометрия с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА), масс-спектрометрия со слабой лазерной

десорбцией (СЛД), масс-спектрометрия с химической ионизацией при атмосферном давлении (ХИАД), масс-спектрометрия вторичных ионов (МСВИ), масс-спектрометрия с искровой ионизацией (ИИ), масс-спектрометрия с термической ионизацией (ТИ), масс-спектрометрия с химической ионизацией (ХИ), масс-спектрометрия с ионизацией электронным ударом (ЭУ),
5 масс-спектрометрия с десорбцией полем/ионизацией полем (ДП/ИП) и масс-спектрометрия с ионизацией термораспылением (ИТР). Специалисты в данной области техники знакомы с различными формами масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрия может включать применение источника ионизации, анализатора и детектора. Анализатор для масс-спектрометрии может быть выбран из любого известного в
10 данной области техники анализатора, например, квадрупольных масс-анализаторов, времяпролетных масс-анализаторов, магнитных секторных масс-анализаторов, электростатических секторных масс-анализаторов, квадрупольных масс-анализаторов с ионными ловушками, орбитрэпных анализаторов или ионно-циклотронно резонансных анализаторов. Детектор для масс-спектрометрии может быть выбран из любого известного в
15 данной области техники детектора, например, фотоумножителя, электронного умножителя, цилиндров Фарадея или детектора на базе микроканальных пластин или матричного детектора.

В различных описанных в данном документе способах, способ согласно настоящему изобретению включает применение ЖХ/МС или ЖХ/МС/МС.

В определенных случаях этап выявления согласно настоящему изобретению может
20 включать газовую хроматографию вместо или в комбинации с масс-спектрометрией. Детекторы для газовой хроматографии могут включать неизбирательные, избирательные, специфические, зависимые от концентрации или зависимые от массового потока детекторы. Конкретные типы детекторов могут включать пламенно-ионизационные детекторы, детекторы по теплопроводности, детекторы захвата электронов и азотно-фосфорные детекторы. В
25 конкретных случаях настоящее изобретение включает применение газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХМС).

В различных вариантах реализации изобретения этап выявления может включать вместо или в комбинации с масс-спектрометрией или любым другим предложенным в данном документе механизмом выявления применение ядерного магнитного резонанса,
30 спектрометрии, спектрометрии излучения, тонкослойной хроматографии или сходных

методик или других известных в данной области техники способов, включая, но не ограничиваясь этим, применение веществ, способных действовать в качестве зондов, специфических к конкретным ГАГ, их компонентам, их продуктам расщепления или любому количеству элементов, выбранных из любых ГАГ, их компонентов (например, составляющих дисахаридов) или их продуктов расщепления, которые, как понятно специалистам в данной области техники, включены в объем настоящего изобретения.

В данном документе предусматривается применение любой комбинации любых двух или более методов выявления (например, многофакторное выявление).

В различных вариантах реализации изобретения перед выявлением образцы смешивают с раствором трибутиламина в ацетонитриле.

В различных вариантах реализации анализ образцов согласно настоящему изобретению, например, образцов, которые были расщеплены и дериватизированы, включает как этап разделения, так и этап выявления.

В различных вариантах реализации настоящего изобретения способ определения уровня одного или более ГАГ (например, ГС) включает описанные в данном документе этапы экстракции, обессоливания, расщепления, дериватизации, разделения и выявления, необязательно в указанном порядке. В различных вариантах реализации настоящего изобретения способ определения уровня одного или более ГАГ включает описанные в данном документе этапы экстракции, расщепления, дериватизации, разделения и выявления. В различных вариантах реализации настоящего изобретения способ определения уровня одного или более ГАГ включает описанные в данном документе этапы обессоливания, расщепления, дериватизации, разделения и выявления, необязательно в указанном порядке. В различных вариантах реализации настоящего изобретения способ определения уровня одного или более ГАГ включает описанные в данном документе этапы расщепления, дериватизации, разделения и выявления, необязательно в указанном порядке. В различных вариантах реализации настоящего изобретения способ определения уровня одного или более ГАГ включает описанные в данном документе этапы обессоливания, экстракции, расщепления, дериватизации, разделения и выявления, необязательно в указанном порядке. Различные варианты реализации настоящего изобретения включают любую комбинацию предложенных в данном документе этапов в любом порядке, включая необязательное исключение любых

предложенных в данном документе этапов или необязательное включение нескольких этапов конкретного типа или функции.

Для специалистов в данной области техники очевидно, что различные варианты реализации настоящего изобретения включают выявление (например, с помощью масс-спектрометрии) множества продуктов расщепления ГАГ, например, множества разных продуктов расщепления, полученных из конкретного ГАГ или его компонента. Кроме того, различные варианты реализации настоящего изобретения могут включать выявление множества разных ГАГ в одном образце или в одной группе реакций, или в одной реакции. Настоящее изобретение подразумевает, что в различных случаях определения любого одного продукта расщепления ГАГ может быть достаточно, чтобы обеспечить функцию или практическую ценность раскрытого в данном документе изобретения или, в различных вариантах реализации изобретения, значительную ее часть. Кроме того, можно выявить любую подгруппу из общего возможного диапазона выявляемых продуктов расщепления ГАГ в одном образце и тем самым обеспечить функцию или практическую ценность раскрытого в данном документе изобретения или, в различных вариантах реализации изобретения, значительную ее часть. Выявление или определение всех ГАГ, компонентов ГАГ или продуктов расщепления ГАГ, присутствующих в образце, не является необходимым в контексте настоящего изобретения. Настоящее изобретение также включает варианты реализации, в которых выявляют или определяют все ГАГ, компоненты ГАГ или продукты расщепления ГАГ, присутствующие в образце.

Преимуществом различных вариантов реализации настоящего изобретения является повышение точности выявления и, следовательно, повышение точности определения уровня одного или более ГАГ, уровня одного или более их компонентов или уровня одного или более продуктов расщепления ГАГ.

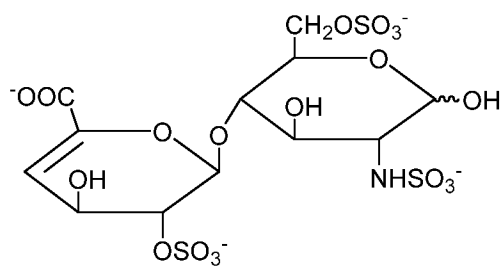
Контроли и стандарты

В различных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе методы анализа включают применение контролей и/или внутренних стандартов. Выбор контролей и/или внутренних стандартов в общем случае известен специалистам в данной области техники. Сравнение результатов анализа с контролями и/или внутренними стандартами может обеспечить основание для выводов и/или определения критических данных. В контексте данного документа термин контроль или стандарт (или контроли или стандарты) следует понимать как обозначающий любую одну реакцию или результат, множество реакций или результатов, совокупность реакций или результатов или любое другое их проявление или комбинирование.

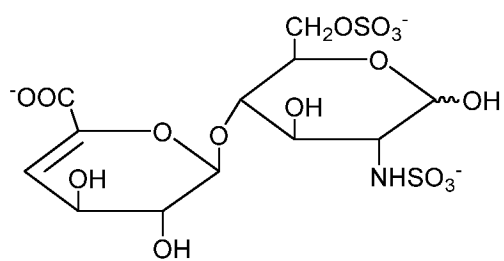
В различных вариантах реализации настоящего изобретения анализ включает применение внутреннего стандарта, при этом внутренний стандарт содержит одну или более молекул, которые, как известно, получают в результате расщепления одной или более молекул ГАГ в присутствии одного или более расщепляющих ГАГ ферментов.

Например, внутренним стандартом может быть продукт расщепления ГАГ или молекула, имеющая формулу продукта расщепления ГАГ, например, сахарид или дисахарид. Внутренний стандарт в виде продукта расщепления ГАГ может представлять собой, например, молекулу, имеющую формулу продукта расщепления гепарансульфата, например, продукта расщепления гепарансульфата, выбранного из I-S (Δ UA,2S-GlcNS,6S; рассчитанная ММ 665,3975), II-S (Δ UA-GlcNS,6S; рассчитанная ММ 563,3533), III-S (Δ UA,2S-GlcNS; рассчитанная ММ 563,3533), IV-S (Δ UA-GlcNS; рассчитанная ММ 461,3091), II-A (Δ UA-GlcNAc,6s; рассчитанная ММ 503,3463) и IV-A (Δ UA-GlcNAc; рассчитанная ММ 401,3022), структуры которых приведены ниже. Контроли или стандарты могут быть синтезированы, приобретены или получены путем расщепления молекул ГАГ.

I-S

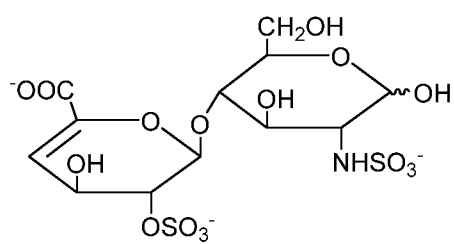


II-S

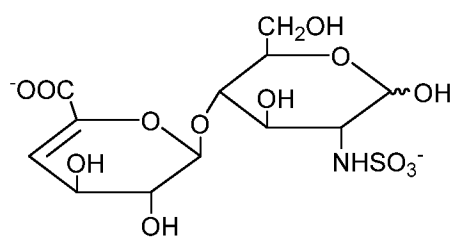


5

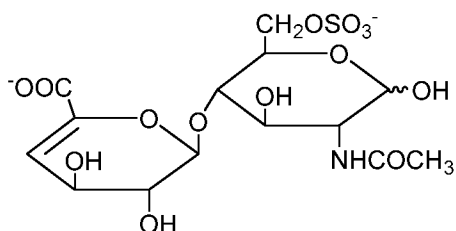
III-S



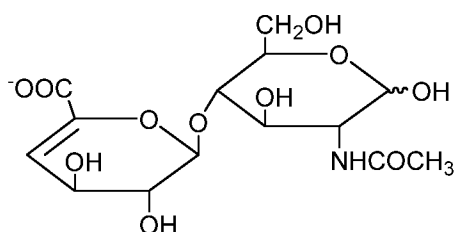
10 IV-S



II-A



5 IV-A



В различных вариантах реализации изобретения внутренний стандарт модифицирован или содержит такую модификацию, которая делает возможным выявление. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения образец дериватизирован конкретной молекулой, в то время как внутренние стандарты дериватизированы меченой изотопом версией, например, тяжелой версией этой конкретной молекулы. Например, в некоторых случаях образец дериватизирован 4-бутиланилином, а одна или более молекул внутреннего стандарта дериватизированы $^{13}\text{C}_6$ -4-бутиланилином.

Любой из одного или более контролей или внутренних стандартов может быть представлен градиентом концентраций. Например, любой из одного или более контролей или внутренних стандартов может быть представлен в концентрации от 0,01 до 100 или более мкМ конкретной молекулы или общего дисахарида, например, 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500 или более мкМ конкретной молекулы или общего дисахарида.

В различных вариантах реализации изобретения стандарт состоит из одного дисахарида, например, одного дисахарида, получаемого при расщеплении одного или более конкретных ГАГ одним или более конкретными ферментами, включенными в описанный в данном документе способ. В различных вариантах реализации изобретения стандарт состоит из двух или более дисахаридов, например, двух или более дисахаридов, получаемых при расщеплении одного или более конкретных ГАГ одним или более конкретными ферментами, включенными в описанный в данном документе способ. В различных вариантах реализации изобретения такие два или более дисахаридов можно анализировать в одной реакционной смеси или в нескольких реакционных смесях. В различных вариантах реализации изобретения два или более дисахаридов включены в стандарт на разных уровнях.

В конкретных вариантах реализации изобретения индивидуальные уровни одного или более (например, двух или более, например, шести) дисахаридных стандартов можно выбрать так, чтобы индивидуальные уровни двух или более дисахаридных стандартов совпадали с, приближались к или отображали нормальный или практически нормальный уровень, экспериментально определенный нормальный уровень, канонический нормальный уровень, специфический для образца нормальный уровень, специфический для группы образцов нормальный уровень, специфический для популяции нормальный уровень или специфический для патологического состояния нормальный уровень. В конкретных вариантах реализации изобретения индивидуальные уровни одного или более (например, двух или более, например, шести) дисахаридных стандартов можно выбрать так, чтобы индивидуальные уровни двух или более дисахаридных стандартов совпадали с, приближались к или отображали значение, которое попадает в нормальный или практически нормальный диапазон, экспериментально определенный нормальный диапазон, канонический нормальный диапазон, специфический для образца нормальный диапазон, специфический для группы образцов нормальный диапазон, специфический для популяции нормальный диапазон или специфический для патологического состояния нормальный диапазон. В конкретных вариантах реализации изобретения индивидуальные уровни одного или более (например, двух или более, например, шести) дисахаридных стандартов можно выбрать так, чтобы индивидуальные уровни двух или более дисахаридных стандартов попадали в нормальный или практически нормальный диапазон, экспериментально определенный нормальный диапазон, канонический нормальный диапазон, специфический для образца нормальный диапазон, специфический для группы образцов нормальный диапазон, специфический для популяции нормальный диапазон или

специфический для патологического состояния нормальный диапазон. В различных вариантах реализации изобретения уровень одного или более дисахаридных стандартов находится в пределах 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% любого такого уровня или любого такого диапазона.

В конкретных вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению включает применение шести стандартов. В более конкретных вариантах реализации изобретения шесть стандартов представляют собой IS, IIS, IIIS, IVS, IIA и IVA. Настоящее изобретение дополнительно включает любую их подгруппу, применяемую, например, как описано в данном документе, включая соответствующие независимо определенные молярные процентные соотношения. Эти шесть стандартов могут присутствовать в одной смеси, в индивидуальных смесях или в любой их комбинации, включая множество разных комбинированных или индивидуальных смесей.

В любых таких вариантах реализации изобретения, включая варианты реализации изобретения, в которых IS, IIS, IIIS, IVS, IIA и IVA присутствуют в одной смеси, молярное процентное соотношение IS может составлять от 0,5% до 100%, например, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% или любой промежуточный диапазон (например, от 1% до 20%, от 5% до 15% или от 8% до 12%). В различных таких вариантах реализации изобретения молярное процентное соотношение IS может составлять 10%.

В любых таких вариантах реализации изобретения, включая варианты реализации изобретения, в которых IS, IIS, IIIS, IVS, IIA и IVA присутствуют в одной смеси, молярное процентное соотношение IIS может составлять от 0,5% до 100%, например, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% или любой промежуточный диапазон (например, от 1% до 20%, от 1% до 15%, от 1% до 10%, от 3% до 8% или от 3% до 6%). В различных таких вариантах реализации изобретения молярное процентное соотношение IIS может составлять 5%.

В любых таких вариантах реализации изобретения, включая варианты реализации изобретения, в которых IS, IIS, IIIS, IVS, IIA и IVA присутствуют в одной смеси, молярное

процентное соотношение ПИС может составлять от 0,5% до 100%, например, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% или любой промежуточный диапазон (например, от 1% до 30%, от 5% до 25%, от 10% до 20%, от 12% до 18% или от 13% до 17%). В различных
5 таких вариантах реализации изобретения молярное процентное соотношение ПИС может составлять 15%.

В любых таких вариантах реализации изобретения, включая варианты реализации изобретения, в которых IS, PIS, ПИС, IVS, ПА и IVA присутствуют в одной смеси, молярное процентное соотношение IVS может составлять от 0,5% до 100%, например, 1%, 2%, 3%, 4%,
10 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% или любой промежуточный диапазон (например, от 1% до 20%, от 5% до 15% или от 8% до 12%). В различных таких вариантах реализации изобретения молярное процентное соотношение IVS может составлять 10%.

В любых таких вариантах реализации изобретения, включая варианты реализации изобретения, в которых IS, PIS, ПИС, IVS, ПА и IVA присутствуют в одной смеси, молярное процентное соотношение ПА может составлять от 0,5% до 100%, например, 1%, 2%, 3%, 4%,
15 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% или любой промежуточный диапазон (например, от 1% до 20%, от 5% до 15% или от 8% до 12%). В различных таких вариантах реализации изобретения молярное процентное соотношение ПА может составлять 10%.

В любых таких вариантах реализации изобретения, включая варианты реализации изобретения, в которых IS, PIS, ПИС, IVS, ПА и IVA присутствуют в одной смеси, молярное процентное соотношение IVA может составлять от 0,5% до 100%, например, 1%, 5%, 10%,
25 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% или 100% или любой промежуточный диапазон (например, от 20% до 80%, от 30% до 70%, от 35% до 65%, от 40% до 60% или от 45% до 55%). В различных таких вариантах реализации изобретения молярное процентное соотношение IVA может составлять 50%.

Соответственно, в конкретных вариантах реализации настоящего изобретения IS, PIS, ПИС, IVS, ПА и IVA могут быть смешаны вместе в следующих соответствующих молярных
30 процентных соотношениях: 10%, 5%, 15%, 10%, 10% и 50%. Специалистам в данной области

техники понятно, что в различных представленных в данном документе случаях и конкретных случаях, в которых в одной смеси присутствует множество разных дисахаридов, чистое процентное молярное соотношение этих дисахаридов (или групп дисахаридов в случае определения в отношении процентного содержания) будет соответствовать 100%. Как понятно

5 специалистам в данной области техники, в различных случаях согласно настоящему изобретению смесь дисахаридных стандартов содержит другие соединения или молекулы, не имеющих отношения к функции стандарта, и эти другие соединения или молекулы, не имеющие отношения к функции стандарта, исключаются из расчета процентного молярного соотношения.

10 В различных вариантах реализации изобретения достоверность настоящих способов в отношении определения уровня одного или более ГАГ, их компонентов, их продуктов расщепления или молекул ГАГ превышает $\pm 20\%$, например, превышает $\pm 20\%$, $\pm 19\%$, $\pm 18\%$, $\pm 17\%$, $\pm 16\%$, $\pm 15\%$, $\pm 14\%$, $\pm 13\%$, $\pm 12\%$, $\pm 11\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$ или превышает $\pm 1\%$, или любой промежуточный

15 диапазон. В различных вариантах реализации изобретения точность настоящих способов в отношении определения уровня одного или более ГАГ, их компонентов, их продуктов расщепления или молекул ГАГ составляет от 0% до 20%, от 0% до 19%, от 0% до 18%, от 0% до 17%, от 0% до 16%, от 0% до 15%, от 0% до 14%, от 0% до 13%, от 0% до 12%, от 0% до 11%, от 0% до 10%, от 0% до 9%, от 0% до 8%, от 0% до 7%, от 0% до 6%, от 0% до 5%, от 0%

20 до 4%, от 0% до 3%, от 0% до 2%, от 0% до 1%, от 5% до 20%, от 5% до 19%, от 5% до 18%, от 5% до 17%, от 5% до 16%, от 5% до 15%, от 5% до 14%, от 5% до 13%, от 5% до 12%, от 5% до 11%, от 5% до 10%, от 5% до 9%, от 5% до 8% или от 5% до 7%.

В различных вариантах реализации изобретения аналитические результаты включают компенсацию или принятие во внимание наличия мультианалитических взаимных помех,

25 относительной разницы эффективности экстракции и матричных факторов.

В различных вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению имеет нижний предел количественного определения для одного или более ГАГ или их компонентов, составляющий 10 мкМ или менее, например, 9 мкМ, 8 мкМ, 7 мкМ, 6 мкМ, 5 мкМ, 4 мкМ, 3 мкМ, 2 мкМ, 1 мкМ, 0,9 мкМ, 0,8 мкМ, 0,7 мкМ, 0,6 мкМ, 0,5 мкМ, 0,4 мкМ, 0,3 мкМ, 0,2 мкМ,

30 0,1 мкМ, 0,05 мкМ, 0,01 мкМ или менее.

В конкретных вариантах реализации изобретения, в которых уровень ГС, определенный в образце, составляет от 1 нг/мл до 10000 нг/мл, например, 1 нг/мл, 2 нг/мл, 3 нг/мл, 4 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 нг/мл, 2000 нг/мл, 3000 нг/мл, 4000 нг/мл, 5000 нг/мл, 6000 нг/мл, 7000 нг/мл, 8000 нг/мл, 9000 нг/мл или 1000 нг/мл, или любой промежуточный диапазон, например, от 200 нг/мл до 1000 нг/мл, от 200 нг/мл до 5000 нг/мл, от 1000 нг/мл до 5000 нг/мл или от 3000 нг/мл до 5000 нг/мл.

Биомаркеры

В некоторых случаях способы и композиции согласно настоящему изобретению применяют для определения уровня одного или более ГАГ, их компонентов (например, составляющих дисахаридов) или полученных из них молекул у субъекта, при этом для субъекта также определяют, также определили или впоследствии определяют вторую характеристику. В различных случаях второй характеристикой является биомаркер, например, биомаркер связанного с ГАГ патологического состояния.

В некоторых случаях получение характеристик, отслеживание или диагностирование связанного с ГАГ патологического состояния проводят в соответствии с одним или более описанными в данном документе или известными в данной области техники биомаркерами. Биомаркер, например, биомаркер связанного с ГАГ патологического состояния (биомаркер, ассоциируемый со связанным с ГАГ патологическим состоянием), может характеризоваться диапазоном или совокупностью значений. Биомаркер связанного с ГАГ патологического состояния может характеризоваться значением, диапазоном значений, совокупностью значений, ассоциируемыми со связанным с ГАГ патологическим состоянием, или ассоциируемой со связанным с ГАГ патологическим состоянием взаимосвязью с нормальными или контрольными значениями для пациента или популяции (например, когда значения выше или ниже определенного стандартного значения считаются связанными со связанным с ГАГ патологическим состоянием). Биомаркер связанного с ГАГ патологического состояния также может характеризоваться значением, диапазоном значений, совокупностью значений, ассоциируемыми с не связанным с ГАГ патологическим состоянием, или ассоциируемой с не связанным с ГАГ патологическим состоянием взаимосвязью с нормальными или контрольными значениями для пациента или популяции. В некоторых случаях лечение

связанного с ГАГ патологического состояния включает изменение или тенденцию к изменению временного среднего, режима или моментального значения для биомаркера от значения, ассоциированного со связанным с ГАГ патологическим состоянием, к значению, ассоциированному с не связанным с ГАГ патологическим состоянием. Кроме того, биомаркер можно определять в ходе определения прогрессирования заболевания и/или прогресса или эффективности лечения.

Биомаркеры одного или более связанных с ГАГ патологических состояний могут включать, не ограничиваясь этим, информацию, полученную с помощью методов визуализации, наблюдения, когнитивного тестирования и анализа полученных от пациента образцов. Например, биомаркер связанного с ГАГ патологического состояния может включать одну или более стандартизированных нейрокогнитивных оценок, стандартизированных поведенческих оценок, результаты по шкалам развития младенцев Бейли (например, BSID-III), результаты по оценочной батарее Кауфмана для детей (например, KABC-II), результаты по специфической в отношении синдрома Санфилиппо шкале оценки поведения, результаты по шкале оценки по четырем точкам/шкале полной нетрудоспособности (FPSS/TDS), результаты по шкале оценки поведения для синдрома Санфилиппо (SBRs), результаты оценки крупной моторики, результаты оценки мелкой моторики, результаты оценки произвольных движений, результаты по оценочной батарее двигательной активности для детей (например, MABC-2), результаты оценки функционального адаптивного поведения, сводные результаты по адаптивному поведению (ABC), результаты по шкале адаптивного поведения Вайнленда (например, VABS-II), результаты оценки качества жизни (QoL), результаты по ОПРОСНИКУ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ™ (например, результаты по форме для родителей 50 (CHQ-50); например, результаты по форме для детей 87 (CHQ-87)), результаты по ОПРОСНИКУ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ОТ 1 ДО 3 ЛЕТ™ (ITQOL; например, ITQOL-97), результаты по шкале оценки особенностей сна детей, результаты по опроснику особенностей сна детей (CSHQ), результаты по шкале раннего обучения Маллен (MSEL), результаты по шкале психического развития Гриффитса, результаты по шкале действия Лейтера, результаты по шкале интеллекта Станфорд-Бине, результаты по шкале интеллекта Векслера для дошкольников и младшеклассников, результаты по шкале интеллекта Векслера для взрослых (WAIS-IV), результаты по шкале дифференцированной оценки способностей (например, по шкале дифференцированной оценки способностей II; DASII), результаты по терапевтической концентрации в ЦСЖ и/или

сыворотке (например, терапевтического средства для связанного с ГАГ патологического состояния), результаты МРТ головного мозга, результаты по ответу слухового отдела ствола головного мозга, результаты по размеру печени (например, по данным МРТ), результаты по размеру селезенки (например, по данным МРТ), прогрессирование заболевания, прогрессирование фенотипа, ассоциируемого со связанным с ГАГ патологическим состоянием ЦНС, объем серого вещества, объем белого вещества, внутричерепной ЦС объем (например, желудочки плюс дополнительное занимаемое ЦСЖ пространство), ответ слухового отдела ствола головного мозга (ABR) или тест-ответ слухового отдела ствола головного мозга, событийно-обусловленные потенциалы (СОП), результаты электрокардиографии, результаты абдоминальной МРТ, измерения активности одной или более сульфатаз, измерения активности одного или более ферментов, принимающих участие в разрушении ГАГ, результаты исследования в отношении или уровня слуховой агнозии, результаты исследования в отношении любых изменений слуха (например, проблем со слухом или связанной с слухом патологии), уровень прогрессирования патологии ЦНС, нарушение сна, повышенную активность, поведенческие проблемы, припадочное поведение, персеверативное жевание, неуспешную тренировку кишечника, неуспешную тренировку мочевого пузыря, атрофию головного мозга, гидроцефалию, тяжелые поражения белого вещества, неблагоприятные явления и любые известные в данной области техники лабораторные тесты, например, стандартные лабораторные тесты.

Биомаркер может включать количественное или качественное определение или оценку частоты, типа или тяжести.

В определенных вариантах реализации изобретения оценку биомаркера можно проводить, не ограничиваясь этим, по электрокардиограммам, клиническому лабораторному исследованию биохимии ЦСЖ, подсчету клеток ЦСЖ, воспалительным маркерам ЦСЖ, биохимическому анализу сыворотки, функциональной печеночной пробе, гематологии, анализу мочи или определению наличия антител против любой одной или более конкретных мишеней (например, мишени, являющейся терапевтическим агентом) в одной или более тканях (например, в крови).

Биомаркер может включать информацию, собранную в один момент времени или в разные моменты времени. Биомаркер, включающий информацию, собранную в разные моменты времени, можно применять в исходной или проанализированной форме, или в форме,

определяемой анализом двух или более результатов (например, среднего, наклона или суммарного значения).

В различных случаях биомаркер представляет собой неблагоприятное явление.

В различных случаях биомаркер представляет собой уровень одного или более ГАГ или их компонентов в образце. В различных случаях биомаркер представляет собой меру общего количества ГАГ, например, результат анализа активности тромбина, например, анализа активности тромбина, в котором образцы предварительно инкубируют с человеческим кофактором гепарина II (НС II), а после этого инкубируют с фиксированным количеством тромбина и фиксированной концентрацией хромогенного субстрата S-2238 в аналитическом буфере для проведения измерения общего количества ГАГ. В определенных приведенных в качестве примера методах анализа активности тромбина ГАГ в образцах ЦСЖ может связываться с НС II, что, в свою очередь, ускоряет инактивацию тромбина. В таком анализе концентрацию ГАГ, отображающую молекулы, оцениваемые в анализе, можно рассчитать по калибровочной кривой для дисахаридов. Концентрацию недисахаридных ГАГ в соответствии с таким методом анализа также можно определить после обработки образцов хондроитиназой В, которая специфически расщепляет дисахариды.

Согласно данному документу биомаркер также может представлять собой уровень конкретного ГАГ или его компонента (например, составляющего дисахарида) или его продукта расщепления, который может быть определен в соответствии с любым одним или более методами анализа, предложенными в данном документе, или который в ином случае включен в настоящее изобретение, как понятно специалистам в данной области техники.

Биомаркеры также могут включать такие биомаркеры, как результаты диагностического или генерического секвенирования ДНК или мРНК. Например, поскольку определенные последовательности ДНК или мРНК, например, геномные последовательности, связаны с повышенным риском появления одного или более связанных с ГАГ патологических состояний или их статусом, наличие или отсутствие любой такой последовательности в геноме или транскриптоме индивида или наличие или отсутствие любой такой совокупности последовательностей в геноме или транскриптоме индивида может быть включено в диагностическую или лечебную стратегию, включая, например, составление терапевтических составов или схем.

Биомаркер может представлять собой комбинацию одного или более биомаркеров, включая любой из вышеуказанных биомаркеров или другие, известные в данной области техники, например, «отпечаток» заболевания.

В некоторых случаях биомаркер может быть биомаркером второй степени, т.е.
5 биомаркером биомаркера.

В различных случаях биомаркер представляет собой меру уровня одного или более ГАГ, одного или более их компонентов или одного или более их продуктов расщепления. Например, в различных вариантах реализации изобретения биомаркер представляет собой общее количество ГАГ. Способы определения общего количества ГАГ известны в данной
10 области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения биомаркер представляет собой альтернативный способ количественного определения одного или более ГАГ, например, альтернативу способу согласно настоящему изобретению. В различных вариантах реализации изобретения биомаркер представляет собой уровень ГАГ, определяемый в качественно отличном образце, например, образце отличной ткани или жидкости организма, например,
15 ЦСЖ, крови или мочи или любого из других различных источников образцов, приведенных в данном документе.

Другие биомаркеры известны в данной области техники.

В различных случаях настоящего изобретения определение любого из предложенных в данном документе биомаркеров можно проводить в связи с любым одним или более
20 заболеванием из: синдрома Хантера, СанА, СанВ или любым другим связанным с ГАГ патологическим состоянием, приведенным в данном документе или иным образом известным специалистам в данной области техники. В определенных вариантах реализации изобретения количественное определение биомаркера проводят в образце, полученном от субъекта, имеющего, диагностированного как имеющий, подверженного риску наличия или
25 диагностированного, как подверженный риску наличия любого одного или более заболевания из: синдрома Хантера, СанА, СанВ или любого другого связанного с ГАГ патологического состояния, приведенного в данном документе или иным образом известного специалистам в данной области техники. В различных вариантах реализации настоящего изобретения такой субъект может являться субъектом, которого лечили, одновременно лечат или впоследствии
30 лечат терапевтическим агентом для лечения патологического состояния, которое было

диагностировано у субъекта, или риск наличия которого был диагностирован у субъекта. Например, субъекта могут лечить терапевтическим средством идурсульфазой для лечения синдрома Хантера. Например, субъекта могут лечить ЭЛАПРАЗОЙ® для лечения синдрома Хантера. В других случаях субъекта могут лечить одним или более из ПЕГАСИСА®,

5 ТИЗАБРИ® или БИАКСИНА®, например, независимо от или в сочетании с ЭЛАПРАЗОЙ®.

Любой один или более лекарственных препаратов для применения в лечении связанного с ГАГ патологического состояния, включая, например, ЭЛАПРАЗУ®, может предоставляться в различных дозированных лекарственных формах, дозировках, иметь различные пути введения и т.д. Например, предложенное в данном документе терапевтическое

10 средство можно вводить интратекально, например, путем инъекции в интратекальное пространство посредством подкожно имплантируемого устройства для интратекальной доставки лекарственного препарата (УИДЛП). В других случаях предложенное в данном документе терапевтическое средство можно вместо этого или дополнительно вводить путем люмбальной пункции. В различных вариантах реализации изобретения введение в

15 интратекальное пространство длится в течение пары минут, например, от двух до пяти минут. Специалистам в данной области техники известен широкий спектр применяемых терапевтических средств, составов и путей введения.

Кроме того, предложенные в данном документе способы можно применять в способе корреляции уровня одного или более ГАГ или их компонентов, или их продуктов расщепления

20 с одним или более биомаркерами, предложенными в данном документе или иным образом известными специалистам в данной области техники.

В отношении проведения определения любого одного или более биомаркеров, предложенных в данном документе или иным образом известных в данной области техники, значения могут быть определены в один момент времени, в два момента времени или во

25 множественные моменты времени с регулярными или нерегулярными интервалами в течение некоторого периода времени. Например, образцы могут быть получены от субъекта или группы субъектов, или выбранных представителей группы одинаковых субъектов в течение периода времени в диапазоне от 10 минут до 2 лет или более, например, 10 минут, 30 минут, 1 часа, 6 часов, 12 часов, 1 суток, 1 недели, 1 месяца, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет или

30 более, или любого промежуточного диапазона, например, от 1 месяца до 6 месяцев, от 6 месяцев до 1 года или от 1 года до 2 лет.

В контексте данного документа субъекты могут представлять собой например, эмбрион, ребенка или взрослого. Возраст ребенка может составлять, например, менее 1 года, менее 2 лет, менее 3 лет, менее 4 лет, менее 5 лет, менее 6 лет, менее 7 лет, менее 8 лет, менее 9 лет, менее 10 лет, менее 15 лет или менее 18 лет, или любой промежуточный возраст. Возраст
 5 взрослого может составлять, например, более 18 лет, более 20 лет, более 25 лет, более 30 лет, более 40 лет, более 50 лет, более 60 лет, более 70 лет, более 80 лет или более, или любой промежуточный возраст, например, от 18 до 25 лет, от 25 до 30 лет, от 30 до 35 лет, от 35 до 40 лет, от 40 до 50 лет или от 50 до 60 лет.

10 Применения

Предложенные в данном документе различные способы для определения уровня одного или более ГАГ (например, ГС) или их компонентов (например, составляющих дисахаридов), или их продуктов расщепления можно применять, например, для отслеживания различных связанных с ГАГ патологических состояний, определения тяжести состояния пациентов,
 15 имеющих различные связанные с ГАГ патологические состояния, отслеживания ответа различных связанных с ГАГ патологических состояний на лечение или диагностирования различных связанных с ГАГ патологических состояний.

Разрабатываются варианты лечения различных связанных с ГАГ патологических состояний. Например, важным вариантом лечения синдрома Хантера является
 20 ферментозаместительная терапия (ФЗТ). Например, ФЗТ для лечения синдрома Хантера может включать введение заместительного фермента I2S пациентам с синдромом Хантера. ЭЛАПРАЗА®, производимая Shire plc, представляет собой очищенную рекомбинантную форму I2S, одобренную FDA (Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств) в качестве ферментозаместительной терапии для лечения синдрома Хантера. В
 25 другом примере болезнь Санфилиппо В можно лечить с помощью ферментозаместительной терапии рекомбинантными белками Naglu. Другое связанное с ГАГ патологическое состояние, СанА, может являться результатом aberrантного катаболизма ГС вследствие мутации в расщепляющем ферменте гепаран-*N*-сульфатазе (HNS). Одной из стратегий лечения пациентов с СанА является ферментозаместительная терапия (ФЗТ), нацеленная на замещение недостатка
 30 гидролазы рекомбинантной формой гепаран-*N*-сульфатазы (HNS). Другие варианты лечения

связанных с ГАГ патологических состояний могут включать применение заместителей арилсульфатазы, таких как НАГЛАЗИМ® (галсульфаза; арилсульфатаза b), или заместителей альфа-L-идуронидазы, таких как АЛЬДУРАЗИМ® (ларонидаза).

5 Существует потребность в способах диагностирования, отслеживания и оценки лечения этих и других патологических состояний, связанных с уровнями одного или более ГАГ. В настоящем изобретении предложены, помимо прочего, такие способы.

В различных вариантах реализации изобретения способы и композиции согласно настоящему изобретению применяют для определения уровня одного или более ГАГ в образце, например, биологическом образце, например, клиническом образце.

10 В определенных случаях настоящее изобретение применяют для определения уровня одного или более ГАГ в образце, полученном от пациента, имеющего патологическое состояние, связанное с уровнями ГАГ, таким образом, что указанный способ применим для отслеживания прогрессирования патологического состояния путем оценки уровня одного или более ГАГ по меньшей мере в двух образцах, полученных от пациента в разное время.

15 В определенных случаях настоящее изобретение применяют для определения уровня одного или более ГАГ в образце, полученном от пациента, имеющего патологическое состояние, связанное с уровнями ГАГ, и проходящего терапевтическое лечение. В таких случаях настоящее изобретение можно применять, чтобы определить эффективность лечения путем оценки уровня одного или более ГАГ по меньшей мере в двух образцах, полученных от
20 пациента в разное время, при этом по меньшей мере один образец получают от пациента после начала лечения.

В определенных случаях настоящее изобретение применяют для корреляции уровня одного или более ГАГ с одним или более дополнительными биомаркерами, например, биомаркером, связанным с заболеванием, связанным с уровнями ГАГ. Например, уровни
25 биомаркера можно определять до или вначале курса лечения (например, в качестве базового или контрольного уровня). Уровни биомаркера можно определять в один или более моментов времени в течение курса лечения и сравнивать с уровнем до лечения или с более ранним моментом времени в течение курса лечения. Информацией, полученной в этих способах, можно руководствоваться для определения или выбора соответствующего лечения,
30 определения того, демонстрирует ли пациент положительный ответ на лечение, и/или для оптимизации лечения.

Отслеживание связанных с ГАГ патологических состояний

Предложенные в данном документе способы определения уровня одного или более ГАГ, одного или более их компонентов (например, составляющих дисахаридов) или одного или более продуктов расщепления ГАГ можно применять для отслеживания связанных с ГАГ патологических состояний, например, отслеживания прогрессирования или определения тяжести связанных с ГАГ патологических состояний. Например, можно получать образцы от конкретного субъекта или группы субъектов по меньшей мере в первый момент времени и второй, отличный, момент времени (т.е. два или более разных моментов времени), а уровень одного или более ГАГ, одного или более их компонентов или одного или более продуктов расщепления ГАГ можно определять для каждого образца способом согласно настоящему изобретению. Изменение или тенденция к изменению между любыми двумя или более разными моментами времени может свидетельствовать о прогрессировании связанного с ГАГ патологического состояния. В одном варианте реализации изобретения повышение уровня одного или более ГАГ, одного или более их компонентов или одного или более продуктов расщепления ГАГ в течение времени может свидетельствовать об увеличении тяжести заболевания (т.е. прогрессировании в сторону большей тяжести). В альтернативном варианте в другом варианте реализации изобретения снижение уровня одного или более ГАГ, одного или более их компонентов или одного или более продуктов расщепления ГАГ в течение времени может свидетельствовать об уменьшении тяжести заболевания.

Для специалистов в данной области техники очевидно, что эффективность способа отслеживания прогрессирования или определения тяжести связанного с ГАГ патологического состояния зависит, по меньшей мере частично, от правильного выбора диагностического ГАГ, компонента ГАГ или продукта расщепления ГАГ. В различных вариантах реализации, предложенных в настоящем изобретении, уровень ГАГ можно рассчитать на основании определения продуктов расщепления ГАГ, которое обеспечивает замену прямому определению ГАГ. В других случаях уровень компонента ГАГ или продукта расщепления ГАГ может являться в достаточной мере диагностическим, например, поскольку уровень любого компонента ГАГ или продукта расщепления ГАГ может в разной степени давать информацию об уровне ГАГ, из которого он был получен или мог быть получен.

Отслеживание лечения связанных с ГАГ патологических состояний

Предложенные в данном документе способы определения уровня одного или более ГАГ, одного или более их компонентов или одного или более продуктов расщепления ГАГ можно применять для отслеживания ответа связанных с ГАГ патологических состояний на лечение, например, для отслеживания влияния известного или экспериментального варианта

5 лечения на прогрессирование связанного с ГАГ патологического состояния у одного или более субъектов. Например, можно получать образцы от конкретного субъекта или группы субъектов, которые проходили лечение или служат в качестве контрольной группы для группы лечения (например, группы без лечения или плацебо-группы). Образцы можно получать от

10 одной или более таких групп способом, согласующимся и принятой медицинской практикой, по меньшей мере в первый момент времени и второй, отличный, момент времени (т.е. два или более разных моментов времени), а уровень одного или более ГАГ, одного или более их компонентов или одного или более продуктов расщепления ГАГ можно определять для

каждого образца способом согласно настоящему изобретению. Изменение или тенденция к изменению между любыми двумя или более разными моментами времени может

15 свидетельствовать о прогрессировании связанного с ГАГ патологического состояния, например, в присутствии или отсутствие лечения. Например, повышение, одинаковое снижение, статистически неразличимое изменение или более сильное повышение уровня одного или более ГАГ у одного или более субъектов или у группы субъектов, проходящих

лечение, по сравнению с таким же или большим количеством ГАГ у одного или более

20 субъектов или у группы субъектов в контрольной группе в течение времени может свидетельствовать о неэффективности лечения. В альтернативном варианте статистически значимое снижение или меньшее повышение уровня одного или более ГАГ у одного или более субъектов, или у группы субъектов, проходящих лечение, по сравнению с таким же или

большим количеством ГАГ у одного или более субъектов, или у группы субъектов в

25 контрольной группе в течение времени может свидетельствовать об эффективности лечения. В таких вариантах реализации изобретения лечение может являться экспериментальным лечением.

В других вариантах реализации способы согласно настоящему изобретению применяют для получения данных, свидетельствующих об эффективности лечения, например, известного

30 лечения, для индивида или группы индивидов. Например, можно получать образцы от конкретного субъекта по меньшей мере в первый момент времени и второй, отличный, момент времени (т.е. два или более разных моментов времени), а уровень одного или более ГАГ,

одного или более их компонентов или одного или более продуктов расщепления ГАГ можно определять для каждого образца способом согласно настоящему изобретению. Изменение или тенденция к изменению между любыми двумя или более разными моментами времени может свидетельствовать о прогрессировании связанного с ГАГ патологического состояния.

- 5 Сравнение тенденции в прогрессировании патологического состояния может свидетельствовать об эффективности лечения для субъекта. Например, повышения уровня соответствующего ГАГ может свидетельствовать о неэффективности лечения. Снижение уровня соответствующего ГАГ может свидетельствовать об эффективности лечения. В других случаях, например, когда лечение снижает скорость роста уровней ГАГ и замедляет
- 10 прогрессирование связанного с ГАГ патологического состояния (даже если общей тенденцией является повышение уровней ГАГ), результаты могут свидетельствовать об эффективности лечения.

В одном варианте реализации изобретения для специалистов в данной области техники очевидно, что эффективность способа отслеживания прогрессирования или определения

15 тяжести связанного с ГАГ патологического состояния зависит, по меньшей мере частично, от правильного выбора диагностического ГАГ, компонента ГАГ или продукта расщепления ГАГ. В различных вариантах реализации, предложенных в настоящем изобретении, уровень ГАГ можно рассчитать на основании определения продуктов расщепления ГАГ, которое обеспечивает замену прямому определению ГАГ. В других случаях уровень компонента ГАГ

20 или продукта расщепления ГАГ может являться в достаточной мере диагностическим, например, поскольку уровень любого компонента ГАГ или продукта расщепления ГАГ может в разной степени давать информацию об уровне ГАГ, из которого он был получен или мог быть получен.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном документе

25 способы согласно изобретению можно применять, чтобы отслеживать ответ на лечение у пациента с синдромом Санфилиппо или синдромом Хантера. Как правило, например, уровни одного или более биомаркеров у пациента с синдромом Санфилиппо или синдромом Хантера измеряют после прохождения лечения этого заболевания. Затем измеренные уровни сравнивают с контрольным уровнем, чтобы определить, демонстрирует ли пациент

30 положительный ответ на лечение. В контексте данного документа «положительный ответ» на лечение включает снижение тяжести симптомов заболевания, замедление прогрессирования,

уменьшение или излечение заболевания. Подходящий контрольный уровень может представлять собой уровень одного или более биомаркеров, полученных от того же пациента до прохождения лечения (например, базовый уровень) или измеренных в более ранний момент времени в течение лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий

5 контрольный уровень представляет собой уровень одного или более биомаркеров у контрольного пациента с синдромом Санфилиппо или синдромом Хантера без лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения такой контрольный уровень можно определить для достаточного количества контрольных пациентов и получить среднее или усредненное значения. Как правило, контрольный пациент имеет сопоставимое заболевание или находится

10 на сопоставимой стадии. Как правило, статистически значимое снижение или повышение уровня одного или более биомаркеров по сравнению с подходящим контрольным уровнем свидетельствует о том, что пациент демонстрирует положительный ответ на лечение. Для определения статистической значимости можно использовать различные статистические методы и методики, такие как те, что описаны в данном документе. В некоторых вариантах

15 реализации изобретения биомаркер имеет сниженный уровень, если уровень биомаркера, измеренный в биологическом образце, полученном в соответствующий представляющий интерес момент времени, снижен более чем на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах реализации изобретения биомаркер имеет повышенный уровень, если уровень биомаркера, измеренный в

20 биологическом образце более чем на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, в 1 раз, 1,2 раза, 1,5 раза, 1,75 раза, 2 раза, 2,25 раза, 2,5 раза, 2,75 раза или 3 раза превышает контрольный уровень.

Способы согласно настоящему изобретению можно применять в случае всех типов синдрома Санфилиппо (например, синдрома Санфилиппо типа А, В, С и D), синдрома Хантера

25 и различных вариантов лечения любого из заболеваний. В частности, описанные в данном документе способы согласно изобретению можно применять для определения ферментозаместительной терапии в качестве соответствующего лечения синдрома Санфилиппо или синдрома Хантера. Используя в качестве неограничивающего примера синдром Санфилиппо типа А, лечащий врач может порекомендовать в качестве лечения

30 введение пациенту рекомбинантного белка гепаран-N-сульфатазы (HNS) на основании уровня одного или более биомаркеров, определяемых с помощью описанных в данном документе способов. Например, лечащий врач может определить терапевтически эффективное

количество терапевтических агентов (например, заместительных ферментов, таких как белки HNS), интервалы и/или пути введения, по меньшей мере частично, на основании уровней биомаркера в соответствии с настоящим изобретением. Используя в качестве неограничивающего примера синдром Хантера, лечащий врач может порекомендовать в качестве лечения введение пациенту рекомбинантного белка идуронат-2-сульфатазы (I2S) на основании уровня одного или более биомаркеров, определяемых с помощью описанных в данном документе способов. Например, лечащий врач может определить терапевтически эффективное количество терапевтических агентов (например, заместительных ферментов, таких как белок идуронат-2-сульфатазы), интервалы и/или пути введения, по меньшей мере частично, на основании уровней биомаркера в соответствии с настоящим изобретением.

В определенных случаях настоящее изобретение включает способ отслеживания лечения лизосомной болезни накопления, в котором пациент, имеющий лизосомную болезнь накопления, проходит лечение путем введения заместительного фермента, например, в терапевтически эффективной дозе. Такое лечение может сопровождаться измерением в один или более моментов времени уровня одного или более гликозаминогликанов в соответствии с любым способом, таким как предложенный в данном документе способ. Уровень гликозаминогликанов может быть измерен в любом биологическом образце, полученном от пациента, включая любой образец ткани, как описано в данном документе. В конкретных случаях образец может быть репрезентативным для момента времени до, в течение или после лечения или курса лечения лизосомной болезни накопления.

Примеры таких лизосомных болезней накопления включают, например, МПСІ, МПСІІ, МПСІІІА, МПСІІІВ, МПСІІІС, МПСІІІD, МПСІVА, МПСІVВ, МПСVІ, МПСVІІ, МПСІХ, альфа-маннозидоз, аспартилглюкозаминурию, болезнь Фабри, фукозидоз, галактосиалидоз, болезнь Гоше, GM1-ганглиозидоз, недостаток активатора GM2, сиалидоз, болезнь Краббе, метахроматическую лейкодистрофию, муколипидоз IV, множественную сульфатазную недостаточность, болезнь Помпе, болезнь Сандхоффа, болезнь Тей-Сакса, вариант АВ болезни Шиндлера, болезнь Салла, бета-маннозидоз и глобоидно-клеточную лейкодистрофию.

Заместительный фермент, вводимый для лечения лизосомной болезни накопления, может представлять собой, например, рекомбинантный фермент, такой как, в одном конкретном примере, рекомбинантная человеческая гепаран-N-сульфатаза или рекомбинантная идурсульфатаза.

Лечение, применяемое в случае пациента, имеющего лизосомную болезнь накопления, может включать введение лизосомального заместительного фермента в любой дозировке, такой как терапевтически эффективная доза и/или доза, выбранная из 1-500 мг, такая как 1 мг, 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг или более.

Введение терапевтического средства для лечения лизосомной болезни накопления, например, заместительного фермента для лечения лизосомной болезни накопления, может происходить с любым интервалом. Типовые интервалы введения включают суточные, недельные, двухнедельные, месячные, двухмесячные, годовые интервалы или по необходимости, а также любые их комбинации. Таким образом, дозы можно повторять, например, еженедельно, ежемесячно или с другими интервалами времени или по необходимости.

Уровни гликозаминогликанов можно измерять в любом из множества биологических образцов, включая любой описанный в данном документе образец. Типовые ткани включают, например, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ), цельную кровь, клетки, ткань, плазму, сыворотку, кровь, мочу и их комбинации.

В различных вариантах реализации изобретения результаты отслеживания или измерения уровней гликозаминогликанов могут влиять на курс лечения (например, вводимую дозу или интервал введения). Например, если измеренный уровень гликозаминогликанов снижен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, вводимую дозу и/или интервал введения можно сохранить. В частности, в определенных случаях, если измеренный уровень гликозаминогликанов снижен, например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, вводимую дозу и/или интервал введения можно сохранить.

В некоторых примерах, если измеренный уровень гликозаминогликанов снижен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, вводимую дозу и/или интервал введения можно скорректировать. В различных таких вариантах реализации изобретения уровень ГАГ снижен на 1% или менее, 2% или менее, 3% или менее, 4% или менее, 5% или менее, 6% или менее, 7% или менее, 8% или менее, 9% или менее или 10% или менее по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов. В некоторых примерах, если

измеренный уровень гликозаминогликанов снижен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, вводимую дозу можно увеличить (например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более). В некоторых примерах, если измеренный уровень гликозаминогликанов снижен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, вводимую дозу можно уменьшить (например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более). В некоторых примерах, если измеренный уровень гликозаминогликанов снижен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, интервал введения можно уменьшить (например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более). В некоторых примерах, если измеренный уровень гликозаминогликанов снижен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, интервал введения можно увеличить (например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более).

В некоторых примерах, если измеренный уровень гликозаминогликанов повышен (например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более) по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, вводимую дозу и/или интервал введения можно скорректировать. В различных таких вариантах реализации изобретения уровень ГАГ повышен по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более. В некоторых примерах, если измеренный уровень гликозаминогликанов повышен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, вводимую дозу можно увеличить (например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более). В некоторых примерах, если измеренный уровень гликозаминогликанов повышен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, вводимую дозу можно уменьшить (например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 2 раз, 3 раз, 4 раз, 5 раз или 10 раз или более). В некоторых примерах, если измеренный уровень гликозаминогликанов повышен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, интервал введения можно уменьшить (например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более). В некоторых примерах, если измеренный уровень гликозаминогликанов повышен по сравнению с контрольным уровнем гликозаминогликанов, интервал введения можно увеличить (например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более).

В различных вариантах реализации изобретения контрольный уровень ГАГ может представлять собой, например, уровень ГАГ у субъекта, страдающего лизосомной болезнью накопления, уровень ГАГ у субъекта, страдающего лизосомной болезнью накопления, измеренный в более ранний момент времени, или уровень ГАГ у не проходящего лечение

5 контрольного субъекта.

Диагностирование связанных с ГАГ патологических состояний

Предложенные в данном документе способы определения уровня одного или более

10 ГАГ, одного или более их компонентов (например, составляющих дисахаридов) или одного или более продуктов расщепления ГАГ можно применять для диагностирования связанных с ГАГ патологических состояний, например, определения, демонстрирует ли субъект уровень ГАГ, который вероятно свидетельствует о наличии патологического состояния. ГАГ включают, например, гиалуронан, кератансульфат (КС), хондроитинсульфат (ХС),

15 дерматансульфат (ДС), гепарансульфат (ГС), гепарин, хондроитинсульфат/дерматансульфат (ХС/ДС) и гепарансульфат (ГС)/гепарин. Определение патологического уровня ГАГ может включать отслеживание уровней ГАГ в течение периода времени и определение любой тенденции уровней ГАГ в течение отслеживаемого периода. Определение патологического уровня ГАГ может включать измерение уровня одного или более ГАГ в один или более

20 моментов времени и сравнение измеренного уровня с установленным стандартным значением. Стандартное значение может быть установлено, например, как в случае предложенного в данном документе способа, путем получения образцов от статистически значимых количеств субъектов, имеющих данное связанное с ГАГ патологическое состояние, и субъектов, не имеющих связанное с ГАГ патологическое состояние, и сравнение, изучение или обработку

25 полученных значений.

Для специалистов в данной области техники очевидно, что эффективность способа отслеживания прогрессирования или определения тяжести связанного с ГАГ патологического состояния зависит, по меньшей мере частично, от правильного выбора диагностического ГАГ, компонента ГАГ или продукта расщепления ГАГ. В различных вариантах реализации,

30 предложенных в настоящем изобретении, уровень ГАГ можно рассчитать на основании количественного определения продуктов расщепления ГАГ, которое обеспечивает замену

прямому количественному определению ГАГ. В других случаях уровень компонента ГАГ или продукта расщепления ГАГ может являться в достаточной мере диагностическим, например, поскольку уровень любого компонента ГАГ или продукта расщепления ГАГ может в разной степени давать информацию об уровне ГАГ, из которого он был получен или мог быть

5 получен.

Определение схемы лечения

С помощью описанных в данном документе способов практикующие медики могут выбрать и прописать варианты лечения, подходящие для каждого индивидуального пациента, на основании диагноза и определения стадии заболевания пациента, сделанных посредством

10 определения уровней экспрессии и/или активности одного или более описанных в данном документе биомаркеров (например, биомаркеров синдрома Санфилиппо или синдрома Хантера, таких как ГАГ). Выбор соответствующей терапевтической схемы для данного пациента может быть осуществлен только на основании диагноза/определения стадии,

15 сделанных с помощью описанных в данном документе способов согласно изобретению. В альтернативном или дополнительном варианте практикующий медик также может учитывать другие клинические или патологические параметры, применяемые в существующих способах для диагностирования синдрома Санфилиппо или синдрома Хантера, и оценить прогрессирование заболевания.

Дозы и частоту лечения можно корректировать, чтобы оптимизировать эффективность

20 лечения. Подходящие образцы для отслеживания ответа на лечение могут включать, но не ограничиваются этим, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ), клетки, ткань, цельную кровь (например, образец периферической крови), плазму, сыворотку, кровь, мочу и их комбинации. Также можно использовать описанные выше дополнительные биологические образцы.

Как понятно из настоящего описания, настоящее изобретение включает множество вариантов реализации, в которых ГАГ расщепляют на продукты расщепления, для которых

25 проводят количественное определение так, что количественное определение продуктов расщепления, например, методом масс-спектрометрии, обеспечивает определение уровня ГАГ, из которого получены продукты расщепления. Это значение можно использовать в

30 различных применениях, как описано в данном документе. Различные способы согласно настоящему изобретению могут включать, без ограничений в отношении количества, повторения, исключения конкретных этапов или порядка конкретных этапов, экстракцию,

обессоливание, расщепление, дериватизацию, необязательную гликан-специфическую экстракцию, разделение и выявление.

ПРИМЕРЫ

Описанные в данном документе примеры демонстрируют применение масс-спектрометрии для определения уровня гликозаминогликанов. Настоящее изобретение частично основано на приведенных ниже примерах, которые демонстрируют применение методов масс-спектрометрии для определения уровня гликозаминогликанов.

По меньшей мере в некоторых примерах описан способ, в котором проводили анализ 50 мкл образца цереброспинальной жидкости способом, включающим ионообменную твердофазную экстракцию гепарансульфата, эксклюзионное обессоливание, расщепление гепариназами, химическую дериватизацию полученных в результате дисахаридов и твердофазную экстракцию. По меньшей мере в некоторых примерах шесть дисахаридов гепарансульфата, обозначаемых I-S, II-S, III-S, IV-S, II-A и IV-A, дериватизировали 4-бутиланилином. В определенных примерах количественное определение аналитов проводили с помощью жидкостной хроматографии (ЖХ), например, обращено-фазовой жидкостной хроматографии, и последующей масс-спектрометрии (МС).

Пример 1: Метод жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии для количественного определения гепарансульфата в цереброспинальной жидкости пациентов с мукополисахаридозом.

Количественное определение гепарансульфата проводили в образце человеческой цереброспинальной жидкости способом, в котором проводили количественное определение полученных из гепарансульфата дисахаридов в образце, используя многоэтапную процедуру. В частности, многоэтапная процедура в настоящем примере включала ионообменную твердофазную экстракцию, эксклюзионное обессоливание, расщепление гепариназой, химическую дериватизацию и гликан-специфическую твердофазную экстракцию. После гликан-специфической твердофазной экстракции проводили анализ дисахаридов методом жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией, используя

тройной квадрупольный масс-спектрометр API 5000™, работающий в режиме электрораспыления негативных ионов.

Экстракция ГС из ЦСЖ

Диэтиламиноэтиловую (ДЭАЭ) смолу (175 мкл) добавляли в лунки 96-луночного планшета с 20 мкм стеклом. Смолу уравнивали добавлением 300 мкл загрузочного/промывочного буфера (20 мМ Трис-НСl, 0,1 М NaCl, pH 7,4) и центрифугировали в течение одной минуты при 50 ОЦУ. ЦСЖ (50 мкл) смешивали с 175 мкл загрузочного/промывочного буфера, загружали в смолу и центрифугировали. Лунки дважды промывали 300 мкл загрузочного/промывочного буфера и элюировали ГС из смолы в планшет для образцов, используя 140 мкл элюирующего буфера (20 мМ Трис-НСl, 1 М NaCl, pH 7,4). Элюаты обессоливали, используя планшеты для гель-фильтрации G-25 Multitrap в соответствии с протоколом производителя, и высушивали путем центрифужного выпаривания.

Расщепление ГС на дисахариды

ГС в каждой экстрагированной лунке разводили в 50 мкл буфера для расщепления, содержащего гепариназы (25 мМ ацетата аммония, 1 мМ ацетата кальция, pH 7,0). Расщепление на дисахариды, проводили, применяя 12 Е гепариназы I, 4 Е гепариназы II и 1,4 Е гепариназы III. Реакцию оставляли на ночь при 30°C, а затем высушивали путем центрифужного выпаривания при подготовке к последующему мечению дисахаридов.

Мечение и очистка дисахаридов

ГС содержит линейный полимер, состоящий из повторяющихся дисахаридных субъединиц, имеющих остов из гексурановой кислоты (HexA) α/β 1-4 глюкозамина (GlcN) α 4. Дисахаридный остов можно биосинтетически модифицировать разными химическими группами. Например, единицу HexA можно сульфатировать в позиции 2-O, а карбоксильную группу можно эпимеризировать в двух противоположных ориентациях в отношении плоскости кольца. GlcN может быть сульфатированным в 6 и, реже, в 3 гидроксильных атомах кислорода. Аминный атом азота очень редко остается свободным и более часто замещен посредством сульфатации или ацетилирования. Частично вследствие такой гетерогенности цепи ГС очень трудно анализировать. Анализ и количественное определение составляющих дисахаридов способствуют разрешению этих трудностей. Мечение дисахаридов является этапом, который,

по меньшей мере в некоторых из настоящих способов, может дополнительно повышать практическую ценность таких способов, как дополнительно описано ниже.

Проводили количественное определение дисахаридов в качестве заменителей родительского полимера путем ферментативной деполимеризации ГС с применением бактериальных гепариназ I, II и III. Ферменты разрывают связь между дисахаридами, приводя к получению различных продуктов расщепления, из которых обычно можно было выявить по меньшей мере восемь изоформ (**Фиг. 1**). Многие из высвобожденных дисахаридов, такие как ПС/ШС и ПА/ША, являются изомерными и, следовательно, выявляются масс-спектрометрией с одинаковым соотношением масса-заряд (m/z). Следовательно, в настоящем Примере для того, чтобы провести индивидуальное количественное определение этих дисахаридов, важно разделить их в хроматографическом масштабе перед проведением масс-спектрометрического выявления.

Модификация гидрофильных дисахаридов посредством восстановительного аминирования гидрофобной меткой улучшает или делает возможной их разделение методом ОФ-хроматографии. 4-бутиланилин (4-NBA) являлся перспективным кандидатом для мечения вследствие своей гидрофобности, коммерческой доступности в дейтерированной форме и легкости органического синтеза в больших количествах в ^{13}C -версии (**Фигура 2А**).

Дисахариды ГС метили ^{12}C -4-NBA посредством восстановительного аминирования. Реакцию проводили путем добавления 13 мкл 0,57 М раствора цианоборгидрида натрия, растворенного в 7:3 (об./об.) растворе диметилсульфоксида (ДМСО):ледяной уксусной кислоты, и 2 мкл 4-NBA в каждую лунку с высушенными дисахаридами. Планшет инкубировали при 37°C с периодическим встряхиванием в течение 2 часов. Реакцию мечения разводили в 200 мкл 98:2 смеси ацетонитрил:вода, содержащей 0,58 мкМ смеси дисахаридов, предварительно дериватизированных ^{13}C -меченым 4-NBA, чтобы служить в качестве внутреннего стандарта (I_{std}). Молярный состав смеси I_{std} идентичен составу калибраторов, применяемых для построения калибровочной кривой (смотрите ниже). Раствор, содержащий меченые дисахариды и их I_{std} , очищали от избыточных реагентов реакции мечения путем твердофазной экстракции (ТФЭ). Для этой цели использовали картриджи GlykoClean S-Plus HILIC (Prozyme, Hayward, CA) в 96-луночном формате в соответствии с вакуумным протоколом производителя. Вкратце, в смолу загружали 1 мл воды с последующим уравниванием 1 мл ацетонитрила. 200 мкл меченых дисахаридов в 98:2 смеси

ацетонитрил:вода, содержащей I_{std} , загружали в смолу, промывали 500 мкл ацетонитрила с последующим элюированием 500 мкл чистой воды. К элюатам добавляли 10 мкл трибутиламина (0,5% в ацетонитриле) и непосредственно анализировали образцы методом ЖХ/МС.

5 ЖХ/МС

Дисахариды ГС разделяли методом обращено-фазовой (ОФ) хроматографии с параллельным масс-спектрометрическим выявлением. Применяемой колонкой была HSS T3RP18 (1,7 мкм, 2,1 x 100 мм) (Waters, Milford, MA), работающая на Waters Acquity, со скоростью потока 0,3 мл/мин и температурой колонки 25°C. Подвижной фазой А служил 60 мМ ацетат аммония, pH 5,4, а подвижной фазой В служил ацетонитрил. Градиент включал начальное 1-минутное уравнивание при 98% А с последующим снижением до 60% А в течение 8 минут для элюирования дисахаридов. Колонку промывали 20% А в течение 1 минуты перед повторным уравниванием 98% А в течение 1 минуты. Общее время анализа составляло 12 минут.

Масс-спектрометрическое выявление проводили на масс-спектрометре API 5000 (AB Sciex, Concord, Ontario), оборудованном тройным квадрупольным анализатором, работающим при отрицательной полярности в режиме мониторинга множественных реакций. Источник настраивали на выявление дисахаридов в следующих условиях: газовая завеса 20, GS1 50, GS2 50 и температура капиллярного переноса 450°C. Переходы, используемые для выявления меченых ^{12}C -4-NBA дисахаридов, были следующими: $\Delta\text{UA}, 2\text{S} - \text{GlcNS}, 6\text{S}$ (I-S или IS)(709,1/549,2), $\Delta\text{UA} - \text{GlcNS}, 6\text{S}$ (II-S или IIS)(629,1/549,2), $\Delta\text{UA}, 2\text{S} - \text{GlcNS}$ (III-S или IIIS)(629,1/549,2), $\Delta\text{UA} - \text{GlcNS}$ (IV-S или IVS)(549,2/391,2), $\Delta\text{UA} - \text{GlcNAc}, 6\text{S}$ (II-A или IIA)(591,2/433,2) и $\Delta\text{UA} - \text{GlcNAc}$ (IV-A или IVA) (511,2/157,0). Переходы, используемые для выявления меченых ^{13}C -4-NBA дисахаридов I_{std} , были следующими: IS (715,1/555,2), IIS (635,1/555,2), IIIS (635,1/555,2), IVS (555,2/397,2), IIA (597,2/439,2) и IVA (517,2/157,0).

Построение калибровочной кривой

Для получения калибраторов шесть коммерчески доступных дисахаридов, которые являются наиболее распространенными в человеческой ЦСЖ, а именно IS, IIS, IIIS, IVS, IIA и IVA, смешивали вместе в следующем молярном процентном соотношении: 10%, 5%, 15%,

10%, 10% и 50%. Использовали восемь ненулевых калибраторов с увеличивающимися концентрационными уровнями дисахаридов (0,1 мкМ, 0,25 мкМ, 0,8 мкМ, 2,5 мкМ, 6,0 мкМ, 17,5 мкМ, 40 мкМ и 50 мкМ). Нижняя граница количественного определения и верхняя граница количественного определения составляли соответственно 0,1 мкМ и 50 мкМ. Каждый уровень вносили в 50 мкл ЦСЖ, которая уже была подвергнута ДЭАЭ-экстракции и обессоливанию. Добавление гепариназы в матрицу не проводили, чтобы избежать расщепления эндогенного ГС. Калибровочную смесь метили ^{12}C -4-NBA и очищали методом ТФЭ в присутствии I_{std} , как описано выше. Сумму нормированных интенсивностей шести ^{12}C -дисахаридов относительно их соответствующего ^{13}C I_{std} наносили на график в виде функции общей концентрации дисахаридов калибраторов. Для построения калибровочной кривой использовали линейную регрессионную модель наилучшего соответствия с навешиванием $1/x^2$.

Проверочные испытания

Для получения контролей качества дисахаридов (КК ДС) готовили имитирующие калибраторы дисахаридные смеси, соответствующие нижнему пределу количественного определения (НПКО) и более высоким концентрационным уровням, соответствующим калибровочной кривой (0,3 мкМ, 2 мкМ, 15 мкМ и 37,5 мкМ). Количественное определение КК проводили на основании калибровочной кривой. Определяли достоверность (%ошибки) и точность (%CV; $n = 6$).

Для получения контролей качества ГС (КК ГС) проводили определение дисахаридного эквивалента высококонцентрированного 2 мг/мл маточного раствора ГС из бычьих почек на основании калибровочной кривой для дисахаридов. КК ГС с низкой, средне низкой, средней и высокой концентрацией готовили из маточного раствора, а соответствующие концентрации составляли 0,3 мкМ, 2,0 мкМ, 15,0 мкМ и 37,5 мкМ. Номинальные концентрации дисахаридов КК ГС рассчитывали путем добавления доли дисахаридов эндогенного ГС из матричной партии, применяемых для повышения концентрации дисахаридов. КК ГС подвергали всем этапам протокола приготовления образцов и рассчитывали достоверность и точность ($n = 6$).

Чтобы проверить возможность разведения образцов, превышающих верхний предел количественного определения (ВПКО), проводили количественное определение высококонцентрированных КК ГС (400 мкМ; $n = 6$) после разведения пустой матрицей до количественно определяемого уровня в диапазоне калибровочной кривой. Определяли

достоверность и точность.

Чтобы оценить влияние матрицы, низкие и высокие уровни КК ДС вносили в шесть разных партий экстрагированной/обессоленной матрицы, а затем метили и очищали. Средний масс-спектрометрический ответ сравнивали с ответом дисахаридов, вводимых и обрабатываемых при той же концентрации в чистом растворе. Матричный фактор (МФ) представляет собой соотношение среднего сигнала в матрице к сигналу в чистом растворе.

Чтобы оценить степень наличия предыдущих образцов после анализа высококонцентрированных образцов, после калибраторов с наибольшей концентрацией вводили пустые образцы и оценивали наличие аналитов.

10 Избирательностью можно назвать способность метода анализа выявлять желаемые аналиты без примесей других матричных компонентов. Чтобы проверить избирательность анализа, оценивали шесть разных партий пустой матрицы в отношении примесных пиков при таком же времени переноса и удержания, как и в случае дисахаридов ГС. Так как ГС является эндогенным, используют только нерасщепленную матрицу.

15 Примесь I_{std} в аналите оценивали путем повышения содержания I_{std} в матрице в концентрации, применяемой в анализе, и отслеживания сигналов при характерных временах переноса и удержания аналитов.

Воспроизводимость в случае повторного ввода обрабатываемых образцов определяли путем повторного ввода ранее приемлемых калибровочных стандартов и образцов контроля качества, которые хранили в специальных условиях испытаний. Концентрации контроля качества рассчитывали по калибровочной кривой для повторного ввода и сравнивали с теоретическими значениями.

20 Стабильность экстрактов обрабатываемых образцов определяли путем повторного ввода ранее приемлемых образцов контроля качества, которые хранили в специальных условиях испытаний, наряду со стандартной кривой для свежеекстрагированных образцов и аналитическими образцами контроля качества. Концентрации контроля качества рассчитывали по калибровочной кривой для свежеекстрагированных образцов и сравнивали с теоретическими значениями.

Стабильность матрицы оценивали в отношении нескольких конкретных аспектов, включая стабильность при замораживании-размораживании, стабильность в условиях приготовления и промежуточную стабильность.

Стабильность раствора определяли путем сравнения ответа, полученного от раствора, хранимого в условиях испытаний (например, температуры, освещения и т.д.), с ответом, полученным от аликвоты того же раствора (контроля), который не подвергали условиям испытаний. Долгосрочную стабильность раствора определяли путем сравнения ответа, полученного от свежеприготовленных растворов (контролей), с ответом, полученным от раствора, хранимого в условиях испытаний (например, сниженной температуры, защиты от света).

Химическое мечение дисахаридов ГС тяжелым 4-NBA

Меченая изотопом версия этой метки была предпочтительной, так как она давала возможность получить I_{std} для отслеживаемых дисахаридов. Внесение I_{std} во время приготовления образцов и анализа ЖХ/МС было важным, так как оно компенсировало экспериментальную вариабельность, тем самым повышая точность и достоверность количественного определения. Коммерчески доступную версию 4-NBA дейтерировали на бутиловом углеводном хвосте, который взаимодействует с обращено-фазовой смолой. Это приводило к появлению небольшого, полуминутного сдвига во времени удержания дейтерированных дисахаридов во время ЖХ-разделения по сравнению с дисахаридами, мечеными гидрогенизованной меткой. Чтобы решить эту проблему, синтезировали ^{13}C -4-NBA, меченый в анилиновом кольце (Фиг. 2А). Дисахариды, меченые этой версией, элюировались вместе со своими ^{12}C -версиями, демонстрируя при этом 6-дальтонный сдвиг в m/z в случае однозарядности, во время масс-спектрометрического выявления (Фиг. 2В). Следовательно, меченые ^{13}C -4-NBA дисахариды были оптимальными аналитами, чтобы служить в качестве I_{std} в настоящем Примере.

Обращено-фазовое разделение дисахаридов

Ковалентное соединение 4-NBA с дисахаридами ГС ослабляет их гидрофильность и делает их поддающимися разделению методом ОФ C18 жидкостной хроматографии. Фиг. 3 иллюстрирует разделение шести коммерческих стандартных дисахаридов ГС, которые

представляют распространенные дисахариды, полученные из ГС человеческой ЦСЖ. Двенадцатиминутный метод ЖХ/МС повышает оборот образцов во время анализа крупных партий образцов. Шесть дисахаридов были разделены и элюированы в порядке повышения гидрофобности. Трижды сульфатированный дисахарид (IS) был элюирован первым на 6,46 минуте, в то время как несulfатированный/ацетилированный (IVA) демонстрировал самое сильное взаимодействие со смолой и, следовательно, наибольшее время удержания, составляющее 8,33 минуты. Изомерные дисахариды IIS и IIIS с одинаковым m/z были разрешены с полным разделением пиков и элюированы на 6,65 и 6,94 минуте соответственно, что облегчает их индивидуальное выявление и количественное определение. Аналогично, пара изомеров ПА/ША была разделена с помощью хроматографии, однако, так как ША является малочисленным компонентом человеческого ГС в ЦСЖ, он был исключен из анализа. В целом, описанная в данном документе платформа ЖХ/МС способна разделять дисахариды ГС, включая изомеры, с использованием небольшого градиента, который повышает производительность анализа образцов. Для специалистов в данной области техники очевидно, что характеристики элюирования могут варьироваться в зависимости от вариаций в методологии.

Протокол приготовления образцов

Протокол обработки образцов ЦСЖ проводится в формате 96-луночного планшета, что обеспечивает функциональность во время высокопроизводительного анализа образцов (Фиг. 4). Он начинается с экстракции отрицательно заряженных ГАГ слабым анионным обменом. Удержанные в смоле аналиты элюировали буфером с высоким содержанием соли, а затем проводили обессоливание элюата, используя гель-фильтрационные картриджи. ГС-фракцию экстракта деполимеризовали на дисахаридные блоки, используя ГС-специфический коктейль из ферментов, содержащий гепариназы I, II и III. Проводили восстановительное аминирование полученных в результате дисахаридов с помощью ^{12}C -4-NBA и очистку их от избытка мешающих реагентов, которые мешают при последующей хроматографии, используя планшеты для твердофазной экстракции (ТФЭ), с помощью жидкостной хроматографии с гидрофильным взаимодействием (ЖХГВ). Дисахариды ГС элюировались водой и легко анализировались методом ОФ ЖХ/МС. Смесь дисахаридов, предварительно меченых ^{13}C -4-NBA, вносимых в образцы в качестве I_{std} после этапа мечения, служила для компенсации экспериментальных вариаций от образца к образцу, которые возникали на последующих этапах (Фиг. 4). Протокол

многоэтапного анализа был тщательно проверен. Некоторые результаты проверки обобщены в **Таблице 1**.

Таблица 1: Обобщенные результаты проверочных испытаний.

Проверочное испытание	Результаты
Линейность/достоверность калибровочных кривых	R^2 0,9827-0,9950 %ошибки от -6,4% до 6,0%
Достоверность/Точность КК дисахаридов (КК ДС)	Межаналитическая достоверность (%ошибки) от -15,7% до 16,0% Межаналитическая точность (%CV) от 2,2% до 16,0%
Достоверность/Точность КК ГС	Межаналитическая достоверность (%ошибки) от -12,8% до 7,9% Межаналитическая точность (%CV) от 4,6% до 18,3%
Восстановление аналита	R(Низк.) 58,3% R(Средн.-Низк.) 45,4% R(Средн.) 43,8% R(Выс.) 47,3%
Достоверность/Точность разведения КК	%ошибки= -0,8% %CV= 7,8%
Влияние матрицы	МФ (Низк.)=0,789 МФ (Выс.)=0,970
След предыдущих образцов в анализе	След предыдущих образцов наблюдали только в трех экспериментах с соотношением пиковой площади > 25% для наименьшего калибратора
Избирательность	Способ является избирательным в нерасщепленной матрице
Влияние I_{std} на аналит	Не было обнаружено существенного влияния

5

Линейность и достоверность калибровочной кривой наилучшего соответствия

Чтобы построить калибровочную кривую для количественного определения дисахаридов в ЦСЖ пациента, дисахаридные калибраторы в разной концентрации вносили в матрицу, которая имитирует матрицу образца пациента. Чтобы приготовить такую матрицу,

коммерческую пустую ЦСЖ подвергали экстракции и обессоливанию. В отличие от обработки образцов пациентов, матрицу, применяемую для приготовления калибратора, не подвергали ферментативному расщеплению. Эта модификация исключает влияние низких уровней эндогенного ГС на номинальную концентрацию вносимых калибраторов. Дисахаридные калибраторы добавляли в приготовленную матрицу после обессоливания и перед мечением, метили ^{12}C -4-NBA и очищали методом ЖХГВ в присутствии меченого изотопом $\text{I}_{\text{стд}}$. Калибратор представлял собой смесь, содержащую шесть приобретенных на коммерческой основе дисахаридов, которые представляют наиболее распространенные виды в структуре ГС человеческой ЦСЖ, а именно IS, IIS, IIS, IVS, ПА и IVA. С помощью ортогональных методов молярные соотношения подгоняли так, чтобы они имитировали приблизительный дисахаридный состав накапливаемого ГС в ЦСЖ пациентов с синдромом Санфилиппо А. Применяемые концентрации включали диапазон, для которого ожидалось снижение общей концентрации дисахаридов в ЦСЖ пациентов. Исследуемый диапазон составлял от 0 мкМ до 50 мкМ общего содержания дисахаридов с нижним пределом количественного определения (НПКО) 0,1 мкМ и верхним пределом количественного определения (ВПКО) 50 мкМ. Абсолютный масс-спектрометрический ответ каждого дисахарида в калибровочной смеси нормировали относительно его соответствующего ^{13}C $\text{I}_{\text{стд}}$. Сумму нормированных интенсивностей шести дисахаридов наносили на график в виде функции общей концентрации дисахаридов в смеси (**Фиг. 5**). Полученная калибровочная кривая была линейной с уравнением наилучшего соответствия $y = 0,9613x + 0,2005$ и значением коэффициента детерминации (R^2) 0,99.

Чтобы проверить достоверность регрессионной модели наилучшего соответствия, нормированную интенсивность для каждого калибровочного уровня пересчитывали обратно в концентрацию с помощью уравнения наилучшего соответствия. Достоверность определяли по отклонению обратно пересчитанной концентрации от теоретической номинальной концентрации калибратора и математически представляли в виде процента ошибки (%ошибки) (**Таблица 2**). Как показано в **Таблице 2**, ошибка обратно пересчитанной средней концентрации менялась в диапазоне от -7% до 12,4%. Когда эксперимент повторяли в другие дни со свежеприготовленными калибраторами, достоверность при разных уровнях оставалась $\leq 20\%$.

Таблица 2: Проверка линейной регрессионной модели в отношении достоверности путем обратного пересчета нормированного детекторного ответа при

каждом калибровочном уровне в значение концентрации с помощью уравнения линейной кривой.

Номинальная концентрация	СТД1 0,100 мкМ	СТД2 0,250 мкМ	СТД3 0,800 мкМ	СТД4 2,50 мкМ	СТД5 6,00 мкМ	СТД6 17,5 мкМ	СТД7 40,0 мкМ	СТД8 50,0 мкМ
Среднее по обратно- рассчитанной концентрации	0,0953	0,281	0,776	2,64	5,58	18,2	39,3	47,4
Средний %ошибки	-4,7	12,4	-3,0	5,6	-7,0	4,0	-1,8	-5,2
n	2	2	2	2	2	2	2	2

Определение достоверности и точности количественного определения с помощью

5 калибровочной кривой

Контролями качества (КК) были образцы, применяемые для оценки достоверности и точности количественного определения на основании калибровочной кривой. Контроль качества дисахаридов (КК ДС) готовили таким же способом, что и калибратор, используя свежеприготовленные смеси дисахаридов. Количественное определение КК ДС проводили на основании калибровочной кривой, чтобы оценить достоверность и точность количественного определения. Использовали пять разных уровней КК, соответствующих диапазону калибровочной кривой, каждый в шести повторностях: НПКО КК ДС (0,1 мкМ), низкий КК ДС (0,3 мкМ), средне-низкий КК ДС (2 мкМ), средний КК ДС (15 мкМ) и высокий КК ДС (37 мкМ). В **Таблице 3** приведены внутрисуточные данные по достоверности и точности для количественного определения КК ДС. Для НПКО и низкого КК ДС %ошибки среднего составлял соответственно 16% и 9%, при этом соответствующие %CV составляли 11,7% и 6,7%. Для более высоких уровней КК параметры достоверности и точности оставались ≤ 20 %. Этот эксперимент повторяли в три разных дня, а межаналитическая достоверность и точность для пяти уровней КК ДС менялась в диапазоне от -15,7-16% до 2,2-16% соответственно.

Таблица 3: Внутрисуточная достоверность и точность количественного определения дисахаридов с использованием КК ДС.

Теоретическая концентрация	номинальная	КК ДС НПКО 0,100 мкМ	КК ДС Низк. 0,300 мкМ	КК ДС Средн.- низк. 2,00 мкМ	КК ДС Средн. 15,0 мкМ	КК ДС Выс. 37,5 мкМ
Внутрианалитическое среднее		0,116	0,327	2,02	14,3	35,5
Внутрианалитический %CV		11,7	6,7	5,4	2,2	4,3
Внутрианалитический %ошибки		16	9	1	-4,7	-5,3
n		6	6	6	6	6

Извлечение

5 Извлечение (R) может представлять собой соотношение между количеством извлеченного продукта и изначальным количеством исходного материала, применяемого в аналитическом анализе. В случае настоящего аналитического анализа R определяли путем деления нормированного детекторного ответа образца, в котором ГС был добавлен в пустую ЦСЖ без МПС перед начальным этапом экстракции, на ответ другого образца, в котором ГС

10 вносили в такую же матрицу после экстракции/обессоливания и непосредственно перед расщеплением. Соотношение позволяет определить количество материала, потерянного во время экстракции и обессоливания. В целях этого примера рассчитывали на коммерческую доступность ГС из бычьих почек. R рассчитывали для низкого, средне-низкого, среднего и

15 высокого уровней концентрации ГС, которые после расщепления давали общую концентрацию дисахаридов в количественно определяемом диапазоне калибровочной кривой. Интересно, что значения извлечения анализа не демонстрировали сильного несовпадения при разных концентрационных уровнях (%CV=13,6) и соответствовали диапазону 44-58% (Таблица 4). В оставшихся примерах и там, где это применимо, использовали среднее значение R для четырех уровней ГС.

Таблица 4: Извлечение

	Низк. ГС	Средн. - низк. ГС	Средн. ГС	Выс. ГС
Рассчитанная концентрация ГС, внесенного после экстракции (мкМ)	0,477	2,29	15,9	36,8
Рассчитанная концентрация ГС, внесенного перед экстракцией (мкМ)	0,278	1,04	6,96	17,4
R%	58,3	45,4	43,8	47,3

Достоверность и точность всего аналитического анализа

Во время приготовления КК ДС, как описано выше, смесь дисахаридов вносили в матрицу на этапе мечения. Следовательно, используя такие КК, оценивали достоверность и точность количественного определения только для части анализа, так как не учитывались вариации на этапах экстракции, обессоливания и расщепления. Двумя факторами, связанными с начальными этапами протокола, которые могут влиять на достоверность и точность анализа, являются: вариабельность между извлечением образцов во время этапов экстракции и обессоливания и неустойчивая ферментативная активность лиаз во время ферментативного расщепления ГС. Чтобы оценить комбинированное влияние этих факторов, использовали образцы контроля качества для гепарансульфата (КК ГС). Готовили четыре разных уровня КК ГС путем внесения ГС из бычьих почек в ЦСЖ донора без МПС при разных концентрационных уровнях перед начальным этапом анионообменной экстракции. КК ГС подвергали полному протоколу приготовления образцов от экстракции до масс-спектрометрического выявления. Количественное определение полученных в процессе дисахаридов проводили на основании калибровочной кривой и корректировали значение с помощью среднего извлечения R. Внутрисуточная достоверность рассчитанной средней концентрации КК попадала в диапазон от -12,8% до 7,9% (**Таблица 5**). Диапазон внутрисуточного %CV составлял от 5,0% до 11,4%. Для трех разных экспериментов внутрисуточная достоверность соответствовала диапазону от -12,8% до 7,9%, а точность составляла от 4,6% до 18,3%.

КК ГС использовали для проверки достоверности и точности всего аналитического анализа от этапа экстракции до конечного масс-спектрометрического выявления (**Таблица 5**).

Использовали низкий, средне-низкий, средний и высокий уровни КК ГС с соответствующими вносимыми концентрациями 0,3 мкМ, 2 мкМ, 15 мкМ и 37,5 мкМ. Количественно определенный уровень дисахаридов из эндогенного ГС для применяемой в этом эксперименте партии ЦСЖ составлял 0,407 мкМ. Это значение добавляли к вносимой концентрации, чтобы

5 рассчитать общую номинальную концентрацию.

Таблица 5: Внутрисуточная достоверность и точность всего анализа с использованием КК ГС.

Теоретическая номинальная концентрация + Эндогенный	КК ГС Низк. 0,707 мкМ	КК ГС Низк.- Средн. 2,41 мкМ	КК ГС Средн. 15,4 мкМ	КК ГС Выс. 37,9 мкМ
Внутрианалитическое среднее	0,656	2,45	16,4	41
Внутрианалитический %CV	11,3	5	11,4	5,1
Внутрианалитический %ошибки	-12,8	0	5,8	7,9
n	6	6	6	6

Воспроизводимость при повторном вводе

10 Воспроизводимость при повторном вводе определяет количество ранее приемлемого калибровочного стандарта и значение контроля качества после повторного ввода. Значения сравнивали с теоретическими значениями (**Таблица 6**).

Таблица 6: Обобщенные данные по аналитическому КК для дисахаридов гепарансульфата (134 часа)

	ДС НПКО КК 0,1 мкМ	ДС Низк. КК 0,3 мкМ	ДС Низк.- Средн. КК 2,0 мкМ	ДС Средн. КК 15,0 мкМ	ДС Выс. КК 37,5 мкМ
Среднее	0,0811	0,287	1,93	14,4	35,2
СО	0,00513	0,0124	0,0653	0,963	1,38
%CV	6,3	4,3	3,4	6,7	3,9
%ошибки	-18,9	-4,3	-3,5	-4,0	-6,1
n	6	6	6	6	6

Стабильность экстракта

5 Стабильность экстракта гепарансульфата в обрабатываемых образцах определяли через 192 часа путем повторного ввода образцов ранее приемлемого контроля качества, которые хранили в специальных условиях испытаний, вместе со стандартной кривой для свежеекстрагированных образцов и аналитическими образцами контроля качества (Таблица 7). Концентрации контроля качества рассчитывали по калибровочной кривой для свежеекстрагированных образцов и сравнивали с теоретическими значениями.

Таблица 7: Стабильность экстракта для гепарансульфата (192 часа)

	НИЗК. КК (ГС ЦСЖ) ЭНДОГ + 0,3 мкМ	СРЕДН. КК (ГС ЦСЖ) ЭНДОГ + 15,0 мкМ	ВЫС. КК (ГС ЦСЖ) ЭНДОГ + 37,5 мкМ
Внутрианалитическое среднее	0,601	13,8	32,8
Внутрианалитическое СО	0,0183	1,22	3,43
Внутрианалитический %CV	3,0	8,8	10,5
Внутрианалитический %ошибки	-14,5	-10,4	-13,5
N	6	6	6

Стабильность матрицы

Чтобы оценить стабильность при замораживании-размораживании, после начального периода замораживания, составляющего по меньшей мере 24 часа, каждый цикл замораживания-размораживания включал хранение в замороженном виде в течение по меньшей мере 12 часов (**Таблица 8**). Образцы контроля качества для оценки стабильности матрицы размораживали и хранили в условиях согласно способу, которые применяли для исследуемых образцов. Интервал времени для каждого цикла размораживания составлял по меньшей мере 30 минут.

Таблица 8: Стабильность при замораживании-размораживании для гепарансульфата (5 циклов)

	Низк. КК (ГС ЦСЖ) ЭНДОГ + 0,3 мкМ	Выс. КК (ГС ЦСЖ) ЭНДОГ + 37,5 мкМ
Внутрианалитическое среднее	0,642	36,3
Внутрианалитическое СО	0,0330	4,01
Внутрианалитический %CV	5,1	11,0
Внутрианалитический %ошибки	2,9	-4,0
n	6	6

Чтобы оценить стабильность при производстве, образцы контроля качества для оценки стабильности матрицы помещали в условия, соответствующие экспериментальному размораживанию и аликвотированию исследуемых образцов (**Таблица 9**).

Таблица 9: Стабильность при производстве гепарансульфата в матрице (23 часа)

	Низк. КК (ГС ЦСЖ) ЭНДОГ + 0,3 мкМ	Выс. КК (ГС ЦСЖ) ЭНДОГ + 37,5 мкМ
Внутрианалитическое среднее	0,664	37,9
Внутрианалитическое СО	0,0407	0,88

Внутрианалитический %CV	6,1	2,3
Внутрианалитический %ошибки	6,4	0,3
N	6	6

Промежуточная стабильность была продемонстрирована во время курса проверки текущим анализом образцов контроля качества в сравнении со свежеполученными кривыми. Продолжительность периода стабильности рассчитывали по времени от приготовления 5 контроля качества до завершения экстракции во время последней проверки достоверности и точности (не должно превышать пяти недель) (Таблица 10).

Таблица 10: Образцы контроля качества для гепарансульфата в человеческой цереброспинальной жидкости

	ГС ЦСЖ НИЗК. КК ЭНДОГ+ 0,3 мкМ	ГС ЦСЖ СРЕДН.- НИЗК. КК ЭНДОГ+ 2,0 мкМ	ГС ЦСЖ СРЕДН. КК ЭНДОГ+ 15,0 мкМ	ГС ЦСЖ ВЫС. КК ЭНДОГ+ 37,5 мкМ
1 ^{ый} анализ				
Внутрианалитическое среднее	0,656	2,45	16,4	41,0
Внутрианалитическое СО	0,0743	0,122	1,87	2,08
Внутрианалитический %CV	11,3	5,0	11,4	5,1
Внутрианалитический %ошибки	-12,8	0,0	5,8	7,9
n	6	6	6	6
2 ^{ой} анализ				
Внутрианалитическое среднее	0,624	2,27	16,3	40,0
Внутрианалитическое СО	0,114	0,244	1,67	1,84

Внутрианалитический %CV	18,3	10,7	10,2	4,6
Внутрианалитический %ошибки	-6,4	-4,2	5,8	5,5
n	6	6	6	6
3 ^{ий} анализ				
Внутрианалитическое среднее	0,677	2,42	15,8	38,1
Внутрианалитическое СО	0,0417	0,215	1,39	3,90
Внутрианалитический %CV	6,2	8,9	8,8	10,2
Внутрианалитический %ошибки	-3,7	0,8	2,6	0,5
n	6	6	6	6

Стабильность раствора

Стабильность раствора была продемонстрирована путем сравнения ответа, полученного для раствора, хранимого в условиях испытаний (например, температуры, освещения и т.д.), с ответом, полученным для аликвоты такого же раствора (контроль), который не подвергали условиям испытаний. Долгосрочную стабильность раствора определяли путем сравнения ответа, полученного для свежеприготовленных растворов (контроль), с ответом, полученным для раствора, хранимого в условиях испытаний (например, при сниженной температуре, с защитой от света). Стабильность раствора при производстве для дисахаридов, меченых $^{13}\text{C}_6$ -4-бутиланилином, в течение 25-часового периода была приемлемой с 1,6% разницей между контрольным и исследуемым раствором. Стабильность при производстве для маточного раствора гепарансульфата в течение 25-часового периода была приемлемой с 1,9% разницей между исследуемым и контрольным раствором. Стабильность рабочего раствора при производстве для раствора дисахаридов в течение 21-часового периода была приемлемой с 0,3% разницей между исследуемым и контрольным раствором. Долгосрочная стабильность маточного раствора (27 дней) для гепарансульфата была приемлемой с 2,0% разницей между исследуемым и контрольным раствором. Долгосрочная стабильность маточного раствора для дисахаридов гепарансульфата (56-81 дней) была приемлемой для I-S с 3,0% разницей между исследуемым и контрольным раствором; для II-S с 11,5% разницей между исследуемым и контрольным раствором; IV-S с 2,9% разницей между исследуемым и контрольным раствором; IV-A с 8,8% разницей между исследуемым и контрольным раствором. Долгосрочная стабильность маточного раствора для

дисахарида гепарансульфата III-S (81 дней) была приемлемой с -2,4% разницей между исследуемым и контрольным раствором. Долгосрочная стабильность маточного раствора (56 дней) для дисахаридов гепарансульфата в высокой концентрации (50,0 мкМ) была приемлемой с -1,5% разницей между исследуемым и контрольным раствором.

5 Выводы

Эти данные обеспечивают новую ЖХ/МС-платформу на основе 96-луночного планшета для разделения и количественного определения дисахаридов, получаемых при ферментативном расщеплении ГС. Эффективные хроматографические методы, такие как сильная анионообменная хроматография (САО), применяли ранее для анализа дисахаридов ГС. Несмотря на свою эффективность, многие предыдущие хроматографические методы могут сталкиваться с техническими проблемами. Высокое содержание нелетучих солей, применяемых во время разделения САО, может помешать прямому соединению с масс-спектрометрами без специальных обессоливающих устройств. ИПОФ-хроматография может требовать больших, времязатратных градиентов и может основываться на применении микромолярной концентрации солей алкиламмония в подвижной фазе, что приводит к риску загрязнения масс-спектрометрических детекторов. Часто для этого может требоваться ограничение работы устройства одним применением. ПГХ может по-разному удерживать разные дисахарида ГС с затрудненным элюированием высокосульфатированных дисахаридов, что приводит к их потере (Gill, V.L. et al., Anal. Chem. (2013) 85(2):1138-1145). Для ЖХГВ необходимы большие времена разделения (>30 минут) для достижения максимального разделения за счет производительности. Настоящий способ частично решает многие из этих проблем и, в определенных случаях, путем применения обычных буферов для масс-спектрометрии, таких как ацетат аммония, сохраняя в то же время эффективность разделения. Этот способ может обеспечить относительно быстрый 12-минутный способ ЖХ/МС и высокую производительность.

Настоящий Пример включает применение подхода мечения, в котором для выбранных аналитов получают внутренние стандарты, используя меченую изотопом версию метящего агента. Приведенные в качестве примеров способы также могут иметь преимущество, заключающееся в том, что они включают I_{std} . Такой I_{std} решает проблему идентификации одной молекулы для имитации поведения всех дисахаридов и/или продуктов расщепления ГС.

Применение очищенных дисахаридов в построении калибровочной кривой обеспечивает надежный источник стандартов и делает возможной подгонку калибровочной смеси к составу, который отображает состав соответствующего образца ГС человеческой ЦСЖ, для достоверного количественного определения.

5

Пример 2: Концентрация гепарансульфата в цереброспинальной жидкости не проходящих лечение пациентов с синдромом Санфилиппо А.

Анализировали образцы ЦСЖ от 25 не проходящих лечение пациентов с синдромом Санфилиппо А с помощью метода анализа ГС на основе ЖХ/МС, описанного выше. Концентрации ГС сравнивали с концентрациями 156 контрольных здоровых индивидов, ЦСЖ которых получали из биорепоzitория и анализировали тем же методом. В группе пациентов концентрации ГС соответствовали диапазону от 1,94 мкМ до 9,71 мкМ со средней концентрацией ГС 4,9 мкМ (Фиг. 6). В противоположность этому, 33% контрольных образцов характеризовались уровнями ГС ниже аналитического предела количественного определения (НПКО). Те, которые находились в количественно определяемом диапазоне, имели среднюю концентрацию 0,37 мкМ, а самая низкая и самая высокая концентрации составляли 0,229 мкМ и 0,648 мкМ соответственно. Таким образом, наблюдается значимое 13-кратное повышение (t-критерий; $P < 0,001$) в уровнях ГС в ЦСЖ пациентов с синдромом Санфилиппо типа А по сравнению с контрольными субъектами.

20

Пример 3: Изменение в концентрации ГС после интратекальной ферментозаместительной терапии у пациентов с синдромом Санфилиппо А.

Настоящий пример частично относится к применению способа согласно настоящему изобретению для отслеживания статуса пациентов и эффективности лечения. Пациентам с синдромом Санфилиппо А ежемесячно вводили 10 мг, 45 мг или 90 мг рекомбинантной гепаран-N-сульфатазы путем интратекального введения в течение 22 недель. Образец ЦСЖ брали перед введением каждой дозы рекомбинантной гепаран-N-сульфатазы, а ГС в ЦСЖ определяли с помощью метода анализа ГС на основе ЖХ/МС, описанного выше. Изменение в ГС ЦСЖ в течение 22-недельного периода лечения проиллюстрировано на Фиг. 7. При всех

25

дозировочных количествах концентрация ГС в образце ЦСЖ снижена на 50% по сравнению с исходной (т.е. в образце, полученном перед введением первой лечебной дозы). Эти данные демонстрируют, помимо прочего, что уровни ГС ЦСЖ оставались стабильными во время курса лечения, а самые низкие уровни ГС ЦСЖ были достигнуты при дозе 90 мг.

5

Пример 4: Концентрация гепарансульфатазы в цереброспинальной жидкости не проходящих лечение пациентов с синдромом Хантера.

Анализировали образцы ЦСЖ от 9 не проходящих лечение пациентов с синдромом Хантера с помощью метода анализа ГС на основе ЖХ/МС, описанного в Примере 1. Концентрации ГС сравнивали с концентрациями 156 контрольных здоровых индивидов, ЦСЖ которых получали из биорепоzitория и анализировали тем же методом. В группе пациентов концентрации ГС соответствовали диапазону от 0,8 мкМ до 9,5 мкМ со средней концентрацией ГС 2,9 мкМ (Фиг. 8). В противоположность этому, 33% контрольных образцов характеризовались уровнями ГС ниже аналитического предела количественного определения (НПКО). Те, которые находились в количественно определяемом диапазоне, имели среднюю концентрацию 0,37 мкМ, а самая низкая и самая высокая концентрации составляли 0,229 мкМ и 0,648 мкМ соответственно. Таким образом, наблюдается значимое, 7,8-кратное повышение (t-критерий; $P < 0,001$) в уровнях ГС в ЦСЖ пациентов с синдромом Хантера по сравнению с контрольными субъектами.

20

Пример 5: Получение и анализ цереброспинальной жидкости от педиатрических и взрослых пациентов с синдромом Хантера.

Пациенты

Были включены взрослые пациенты возрастом ≥ 18 лет и педиатрические пациенты возрастом < 18 лет с подтвержденным диагнозом МПС II. Всех пациентов лечили с помощью внутривенной ФЗТ идурсульфазой. Педиатрических пациентов допускали к участию только в случае, если перед проведением исследования у них было запланировано прохождение не относящейся к исследованию люмбальной пункции (ЛП) или другой медицинской или

25

диагностической процедуры, требующей применения общей анестезии. Взрослые пациенты могли на добровольной основе выбрать прохождение ЛП. Для взрослых пациентов требовалось наличие коэффициента умственного развития ≥ 78 , определяемого с помощью когнитивного оценивания во время или в течение 3 месяцев перед исследованием/базовым периодом. Для педиатрических пациентов не требовалось никаких формальных когнитивных исследований.

Из исследования исключали пациентов с осложнениями после предыдущих ЛП в анамнезе или техническими сложностями ее проведения; перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток; принимавших аспирин, нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты или другие лекарственные средства, которые могут влиять на свертываемость крови, в течение 7 дней перед ЛП, или принимавших такие лекарственные средства в течение 7 дней перед любой связанной с исследованием процедурой, в которой потенциальное изменение свертываемости крови может быть вредным.

Дизайн исследования

Запланированная продолжительность участия пациентов составляла приблизительно 3 недели: она состояла из 2-недельного периода исследования/базового периода, приблизительно 1 дня для проведения лабораторных и когнитивных оценок и 1 дня для получения ЦСЖ (путем ЛП или другой ранее запланированной процедуры, дающей доступ к ЦСЖ, такой как введение устройства для отслеживания внутричерепного давления (процедура с применением прижимного болта), или во время декомпрессии шейного отдела позвоночника). Последующее наблюдение для оценки безопасности проводили в телефонном режиме приблизительно через 1 неделю после получения ЦСЖ (8 день).

Процедуры исследования/базовые процедуры включали физическое исследование, исследование истории заболевания и жизненно важных функций для всех пациентов. Биохимические исследования сыворотки, гематологию и анализ мочи также проводили только для взрослых пациентов, факультативно проходивших ЛП. Взрослые пациенты также проходили когнитивное оценивание дипломированным психологом или квалифицированным персоналом под наблюдением лицензированного психолога с применением шкалы интеллекта взрослых Векслера, четвертое издание (WAIS-IV) (Wechsler, D. (2008) Wechsler Adult Intelligence Scale. 4 ed. San Antonio, TX: The Psychological Corporation). Хотя когнитивное

оценивание педиатрических пациентов не требовалось, исследователи запротоколировали свое мнение относительно когнитивного статуса пациентов. Для тех педиатрических пациентов, которые не могли пройти все процедуры исследования/базовые процедуры из-за ранее запланированной не относящейся к исследованию процедуры, историю заболевания и данные по безопасности получали из медицинской карты. Пациентов, прошедших ЛП, наблюдали в течение по меньшей мере 2 часов после процедуры перед тем, как отпустить.

Результаты и меры безопасности

Основным результатом была общая концентрация ГАГ в ЦСЖ. Меры безопасности состояли в документировании неблагоприятных явлений (НЯ).

Анализ фармакодинамики/биомаркеров

Уровень общего ГС в ЦСЖ определяли методом жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Вкратце, сначала экстрагировали ГС из ЦСЖ, используя анионообменную смолу, а затем расщепляли комбинацией ферментов, включающей гепариназы I, II и III. Полученные в результате дисахариды ГС метили ^{12}C -4-*N*-бутиланилином путем восстановительного аминирования, а затем анализировали методом ЖХ-МС/МС. Общий уровень ГС ЦСЖ получали по смешанной интенсивности сигнала от 6 наиболее распространенных (исходя из интенсивности их сигналов) дисахаридов, используя в качестве контроля очищенный бычий ГС.

Распределение пациентов

Десять пациентов отвечали критериям включения в исследование и были привлечены к исследованию в 7 центрах – 5 в Соединенных Штатах и 2 в Великобритании (Фиг. 9). Все 10 привлеченных пациентов полностью прошли исследование. Из этих пациентов 8 имели подлежащие оценке образцы ЦСЖ и были включены как в группы исследования безопасности, так и в группы исследования фармакодинамики. Из оставшихся 2 пациентов у одного пациента была неудачная ЛП, а второй дал согласие на получение ретроспективного образца ЦСЖ для анализа ГАГ. Первый пациент с неудачной ЛП был включен в группу оценки безопасности, но не в группу оценки фармакодинамики, а второй пациент был включен в группу оценки фармакодинамики, но не в группу оценки безопасности. Таким образом, в обеих группах –

оценки безопасности и фармакодинамики – было по 9 пациентов, при этом 8 из них перекрывались.

Характеристики пациентов

Базовые демографические и клинические характеристики пациентов приведены в

5 **Таблице 11.** Группа исследования включала 5 взрослых пациентов возрастом ≥ 18 лет и 5

педиатрических пациентов возрастом < 18 лет. Общий средний возраст в базовый период

(получение образцов ЦСЖ и мочи) составлял 17,9 лет (диапазон 4,1-36,8 лет). Среди 5

взрослых средний возраст составлял 27,9 лет, а среди 5 педиатрических пациентов средний

возраст составлял 7,8 лет. Оценка по WAIS-IV, применяемая только в случае взрослых

10 пациентов, соответствовала диапазону 88-111 со средней оценкой 99,6. Когнитивный статус

среди педиатрических пациентов, запрототолированный как нормальный или аномальный,

был аномальным у 3 пациентов и нормальным у 2 пациентов.

Таблица 11: Базовые характеристики пациентов и результаты ЦСЖ/uГАГ.

Пациент	Возраст (л) на момент:			Рост (см)	Масса (кг)	Когнитивное оценивание (метод)	ГАГ ЦСЖ (нг/мл)	не-ДС ЦСЖ (нг/мл)	ГС ЦСЖ (мкМ)
	Начало симптома в МПС II	Диагностирование МПС II	Получение образцов ЦСЖ/мочи						
1.	3,0	4,2	8,0	127,6	23,9	Нормальный ^a	373,4	$< 36,7^b$	1,74
2.	4,0	5,8	16,2	148,4	67,2	Нормальный ^a	356,8	$< 36,7^b$	0,80
3.	н/и	4,8	21,4	160,4	61,6	88 (WAIS-IV) ^c	459,3	$< 36,7^b$	1,42
4.	0,8	1,4	25,4	137,0	56,8	93 (WAIS-IV) ^c	455,2	61,2	9,57
5.	3,0	3,9	26,5	152,5	63,2	105 (WAIS-IV) ^c	1181,1	$< 36,7^b$	1,48
6.	6,9	6,9	29,5	131,2	57,2	101 (WAIS-IV) ^c	381,5	$< 36,7^b$	1,38
7. ^c	н/и	3,5	36,8	166,9	87,4	111 (WAIS-IV) ^c	--	--	--
Медиана	3 (0,8–6,9)	3,7 (1,3–6,9)	18,8 (4,1–36,8)	134,1	57,0	-	418,4	$< 36,7^b$	1,45

(диапазон)				(110,0–166,9)	(23,0–87,4)		(356,8–1181,1)	(<36,7–63,1)	(0,80–9,57)
8.	1,0	1,3	4,1	114,0	23,0	Аномальный ^е	842,9	<36,7 ^б	2,94
9. ^г	п/к	3,3	4,6	110,0	23,8	Аномальный ^е	2360,9	63,1	4,26
10.	1,0	3,5	6,3	120,0	30,8	Аномальный ^е	939,7	<36,7 ^б	2,32
Медиа на (диапазон)	2,8	3,9	17,9	136,8	49,5	-	939,7 (842,9–2360,9)	<36,7 ^б	2,94 (2,32–4,26)

^аКогнитивный статус всех педиатрических пациентов (возрастом <18 лет) определяли по оценке исследователя;

^бНижний предел количественного определения;

^вПо критериям отбора для исследования взрослые пациенты (возрастом ≥18 лет) должны иметь IQ ≥78;

^дПациент, прошедший 2 процедуры люмбальной пункции, из которых вторая была удачной, и от которого получено 2 образца мочи с определением ГАГ в каждом;

^еПациент, подлежащий только оценке безопасности;

^гПациент, подлежащий только оценке фармакодинамики;

10 н/и, не известно; WAIS-IV, шкала интеллекта взрослых Векслера.

Все 9 пациентов, включенные в группу безопасности, внутривенно получали идурсульфазу. Другие обычно применяемые лекарственные средства по терапевтическому классу (≥3 [33%] пациентов) включали анилиды и природные опиумные алкалоиды, антагонисты серотонина, амиды, производные бензодиазепаина, агонисты рецепторов мелатонина и другие общие анестетики. Обычно применяемые лекарственные средства отображали профиль хирургического/медицинского лечения группы.

Анализ ГАГ

Все 5 взрослых пациентов проходили ЛП, хотя получение ЦСЖ было неудачным для 1 из этих пациентов, который был включен только в группу безопасности; для другого пациента

понадобилось 2 ЛП, из которых удачной была вторая (**Таблица 11**). Среди 9 пациентов, включая всех 5 детей, с образцами ЦСЖ (группа фармакодинамики) объем полученной на пациента ЦСЖ соответствовал диапазону 1,5-16,0 мл. Общая концентрация ГАГ соответствовала диапазону 356,8-2360,9 нг/мл. Только среди детей общая концентрация ГАГ в ЦСЖ соответствовала диапазону 356,8-2360,9 нг/мл. Только для взрослых концентрация ГАГ составляла 381,5–1181,1 нг/мл.

У 3 детей с когнитивными нарушениями уровни ГАГ в ЦСЖ составляли 842,9 нг/мл, 939,7 нг/мл и 2360,9 нг/мл по сравнению с диапазоном 356,8-1181,1 нг/мл у 6 оставшихся пациентов с нормальной когнитивной функцией (4 взрослых и 2 детей). На **Фиг. 10** приведен график рассеяния этих уровней ГАГ в ЦСЖ в зависимости от возраста и базового когнитивного статуса. Наблюдали некоторую корреляцию между результатом когнитивного оценивания и общим уровнем ГАГ в ЦСЖ.

Не-ДС уровни ГАГ в ЦСЖ были ниже нижнего предела количественного определения (36,7 нг/мл) у 7 из 9 пациентов; у 2 других пациентов не-ДС уровень ГАГ в ЦСЖ составлял 61,2 нг/мл у взрослого и 63,1 нг/мл у ребенка. Это дает основание предположить, что ДС является основным компонентом ГАГ ЦСЖ как у взрослых, так и у педиатрических пациентов с МПС II.

Уровни ГС ЦСЖ определяли методом масс-спектрометрии. Уровни ГС были количественно определяемы во всех анализируемых образцах. Все пациенты имели уровни, превышающие нормальный диапазон, по предварительным данным составляющие 0,4-0,5 мкМ. Когнитивно здоровые пациенты в целом имели более низкие уровни ГС (5 из 6 пациентов имели уровни 0,2-1,5 мкМ), чем пациенты с когнитивными нарушениями (2,3-4,3 мкМ); наибольшее зафиксированное значение (9,57 мкМ) было у когнитивно здорового взрослого пациента.

25 Выводы

Эти данные демонстрируют, что пациенты с нормальным когнитивным развитием/слабо выраженным МПС II в общем случае могут иметь более низкие уровни ГАГ ЦСЖ, чем пациенты с тяжелым фенотипом. Из 6 пациентов (взрослых и педиатрических), чей когнитивный статус был оценен как нормальный, 5 имели значения ГАГ ЦСЖ в диапазоне от

360 нг/мл до 460 нг/мл, тогда как значение ГАГ у оставшегося пациента составляло 1181,1 нг/мл. В противоположность этому, все 3 педиатрических пациента с аномальной когнитивной функцией имели значения >840 нг/мл. Уровни ГС, определенные методом масс-спектрометрии, в общем случае имеют сходный профиль, когда все пациенты с МПС II имеют аномально высокие значения по сравнению со здоровыми субъектами, а самые высокие значения имеют пациенты с тяжелым фенотипом. Однако, наивысшее значение наблюдалось у когнитивно здорового взрослого (но который не являлся тем же субъектом, что и когнитивно здоровый взрослый с наивысшим значением общего ГАГ в ЦСЖ).

Биохимические средства прогнозирования фенотипа МПС II настолько рано, насколько это возможно, вносят ценный вклад в оптимальное наблюдение пациентов. Прогнозирование того, разовьются ли у ребенка с МПС II когнитивные нарушения, может быть трудной задачей для врача (Martin, R. *et al.*, *Pediatrics* (2008) 121(2):e377-386; Burton, B.K. *et al.*, *Eur. J. Pediatr.* (2012) 171(4):631-639; Scarpa, M. *et al.*, *Orphanet J. Rare Dis.* (2011)6(1):72). Генетический мутационный анализ часто является ограниченным (Martin, R. *et al.*, *Pediatrics* (2008) 121(2):e377-386) и, хотя с точки зрения клинической перспективы были выявлены некоторые ранние признаки неврологического поражения, включая нарушение сна, повышенную активность, поведенческие проблемы, припадочное поведение, персеверативное жевание и неуспешную тренировку кишечника и мочевого пузыря (Holt, J. *et al.*, *J. Pediatr.* (2011)159(2):320-326), их польза ограничена недостаточной специфичностью. Аналогично, хотя визуализация головного мозга выявила высокую скорость атрофии головного мозга, гидроцефалию и тяжелые поражения белого вещества у пациентов с когнитивными нарушениями по сравнению с когнитивно здоровыми пациентами, эти проявления не были диагностическими в случае тяжелого фенотипа, так как они также проявляются у пациентов с когнитивными нарушениями (Muenzer, J. *et al.*, *Pediatrics* (2009)124(6):e1228-e1239; Vedolin, L. *et al.*, *Neurology* (2007)69(9):917-924). Таким образом, в отсутствие семейного анамнеза МПС II и столкнувшись с новой или очень редкой мутацией, врачи часто занимают выжидательную позицию с тщательным отслеживанием когнитивного развития.

Представленные в настоящем документе данные свидетельствуют о том, что врачи могут идентифицировать МПС II с неврологическим поражением биохимическим путем, измеряя уровни ГАГ в ЦСЖ. Анализ уровней ГАГ в ЦСЖ и моче пациентов с МПС II

свидетельствует о том, что у педиатрических пациентов с аномальной когнитивной функцией уровни были выше, чем у когнитивно здоровых взрослых и педиатрических пациентов.

Пример 6: Лечение пациентов с синдромом Санфилиппо А рекомбинантной человеческой N-сульфатазой.

Этот пример в общем случае относится, помимо прочего, к применению метода масс-спектрометрии для ГС при оценке и/или отслеживании терапевтического лечения. В этом примере описано многоцентровое, многодозовое исследование с повышением дозы, разработанное для оценки безопасности, переносимости и клинической активности трех дозировочных уровней рекомбинантной человеческой гепаран-N-сульфатазы (rhHNS), вводимой интратекально пациентам с МПС ША (*m.e.* синдромом Санфилиппо А). Пациентов с синдромом Санфилиппо А лечили 10 мг, 45 мг или 90 мг rhHNS один раз в 4 недели. Пациенты ранее не проходили лечение лекарственным препаратом или с помощью устройства для лечения синдрома Санфилиппо А, хотя те пациенты, которые попали в дополнительное исследование, получали 5 или 6 запланированных доз rhHNS в предыдущем исследовании. Продолжительность лечения составляла 6 месяцев, а для тех пациентов, которые попали в дополнительное исследование, продолжительность лечения составила 48 месяцев.

Критерий включения включал подтвержденный недостаток активности фермента сульфамидазы, составляющей менее или равной 10% нижнего предела нормального диапазона и измеренной в фибробластах или лейкоцитах, и а) нормальный уровень ферментативной активности по меньшей мере одной другой сульфатазы (чтобы исключить множественную сульфатазную недостаточность), измеренной в фибробластах или лейкоцитах, или б) две подтвержденные мутации. Для включения в исследование пациенты также должны были иметь возраст 3 года или старше с возрастом развития 1 год или старше. Также пациенты должны были быть стабильными с медицинской точки зрения.

Пациентов исключали из исследования, если они имели существенные не связанные с МПС ША нарушения ЦНС или поведенческие нарушения, которые искажали бы научную достоверность или интерпретацию оценок исследования. Пациентов также исключали из исследования, если они перенесли трансплантацию гемопоэтических клеток или костного

мозга или если они проходили лечение каким-либо экспериментальным лекарственным препаратом или устройством, предназначенным для лечения МПС ША, в течение 30 дней перед участием в исследовании.

Клинические параметры, оцениваемые в исследовании, включали определение (1) изменения относительно базовых значений и (2) сравнение значений, полученных во время продолжительного 24-месячного исследования естественного развития заболевания у не проходящих лечение пациентов с МПС ША. Клинические параметры включали концентрацию rhHNS в ЦСЖ и сыворотке, концентрацию биомаркеров безопасной и потенциальной заместительной эффективности в ЦСЖ, моче и сыворотке, концентрацию гепарансульфата и производных гепарансульфата в ЦСЖ, измеряемые приблизительно в течение 6 месяцев. Дополнительные параметры включали стандартизированные нейрокогнитивные и поведенческие параметры, специфическую в отношении синдрома Санфилиппо шкалу оценки поведения, параметры крупной и мелкой моторики, шкалу оценки функциональной адаптации, опросники по качеству жизни и шкалу оценки особенностей сна детей, MPT и ABR головного мозга.

Уровни гепарансульфата

Гепарансульфат является основным накапливаемым метаболитом при МПС ША и ключевой фармакодинамической конечной точкой, свидетельствующей об *in vivo* активности rhHNS в центральной нервной системе. В течение всего исследования измеряли уровень гликозаминогликана (ГАГ) гепарансульфата в ЦСЖ. Также оценивали общее содержание ГАГ в моче.

Общий уровень гепарансульфата в ЦСЖ измеряли проверенным методом на основании ЖХ-МС, как описано выше в Примере 1, и на основании шести распространенных получаемых из ГС дисахаридов после ферментативного расщепления ГС. Количественное определение дисахаридов проводили на основании калибровочной кривой, используя шесть приобретенных на коммерческой основе стандартных дисахаридов, которые распространены в ГС человеческой ЦСЖ.

В течение исследования средние общие уровни гепарансульфата в ЦСЖ были снижены при каждом из трех уровней дозирования по сравнению с базовым значением (*т.е.* перед

5 введением первой лечебной дозы) (Фиг. 11). Снижение было очевидным после первой интратекальной дозы rhHNS (*m.e.* наблюдалось через четыре недели после первой дозы и непосредственно перед второй дозой). Дозы 45 мг и 90 мг снижали общие уровни гепарансульфата в ЦСЖ сходным образом, но в большей степени, чем доза 10 мг. В течение исследования от 24 до 45 месяцев снижение гепарансульфата в ЦСЖ сохранялось.

10 Эти данные свидетельствуют о том, что общее содержание гепарансульфата в ЦСЖ снижается в ответ на терапию всеми тремя дозировочными уровнями, при этом большее влияние наблюдается при более высоких дозировочных уровнях. Наибольшее снижение происходило после первой дозы (6 неделя), а в течение оставшегося периода лечения уровни
15 оставались относительно стабильными. Влияние на содержание гепарансульфата в ЦСЖ может свидетельствовать о терапевтической пользе rhHNS и демонстрирует, что интратекально вводимая rhHNS проявляет биологическую активность.

Другие варианты реализации изобретения

15 Хотя в данном документе описано большое число вариантов реализации данного изобретения, в настоящее описание и примеры можно вносить изменения для получения других способов и композиций согласно данному изобретению. Следовательно, должно быть очевидно, что объем данного изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения в
20 дополнение к конкретным вариантам реализации, которые были представлены в качестве примера. Все приведенные в тексте ссылки включены в данный документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения уровня гликозаминогликанов (ГАГ) в биологическом образце, включающий этапы:
 - a) инкубации биологического образца с одним или более ферментами в условиях, которые обеспечивают расщепление гликозаминогликана, чтобы получить смесь дисахаридов;
 - b) химическую дериватизацию смеси дисахаридов, полученной на этапе a);
 - c) измерение количества каждого индивидуального дериватизированного дисахарида;
 - d) определение уровня гликозаминогликанов (ГАГ) в биологическом образце на основании количества каждого индивидуального дериватизированного дисахарида, измеренного на этапе c).
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что гликозаминогликан включает гепарансульфат.
3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что один или более ферментов включают одну или более гепариназ.
4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что одна или более гепариназ включает гепариназы I, II и/или III.
5. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что один или более ферментов включают один или более ферментов, выбранных из группы, состоящей из хондроитиназы AC, хондроитиназы B, хондроитиназы C, хондроитиназы ABC и кератаназ.
6. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что смесь дисахаридов содержит дисахарида I-S (Δ UA,2S-GlcNS,6S), II-S (Δ UA-GlcNS,6S), III-S (Δ UA,2S-GlcNS), IV-S (Δ UA-GlcNS), II-A (Δ UA-GlcNAc,6S) и/или IV-A (Δ UA-GlcNAc).
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что измерение включает измерение количества каждого из дериватизированного I-S (Δ UA,2S-GlcNS,6S), дериватизированного II-S (Δ UA-GlcNS,6S), дериватизированного III-S (Δ UA,2S-GlcNS), дериватизированного IV-S (Δ UA-

GlcNS), дериватизированного II-A (Δ UA-GlcNAc,6S) и дериватизированного IV-A (Δ UA-GlcNAc).

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что смесь дисахаридов дериватизируют гидрофобным соединением.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что смесь дисахаридов дериватизируют 4-бутиланилином, 2-аминобензамидом (2-АБ), 2-аминобензойной кислотой (антраниловой кислотой; 2-АК) или 2-аминоакридоном (АМАК).

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что этап с) включает
(i) разделение индивидуальных дериватизированных дисахаридов методом хроматографии; и
(ii) определение каждого отдельного дисахарида методом масс-спектрометрии.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что хроматография является обращено-фазовой жидкостной хроматографией.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что количество каждого индивидуального дериватизированного дисахарида определяют в сравнении с внутренним стандартом.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что каждый индивидуальный дисахарид дериватизируют 4-бутиланилином, а внутренний стандарт для каждого соответствующего дисахарида метят $^{13}\text{C}_6$ -4-бутиланилином.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что уровень гликозаминогликанов (ГАГ) в биологическом образце определяют по суммарному значению концентрации дисахаридов на основании измеренного количества каждого индивидуального дисахарида.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что биологический образец представляет собой образец цереброспинальной жидкости (ЦСЖ).
16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что образец ЦСЖ имеет объем в диапазоне от около 10 мкл до 100 мкл.
17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что образец ЦСЖ имеет объем в диапазоне от около 45 мкл до 55 мкл.
18. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что биологический образец представляет собой образец крови.
19. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что биологический образец представляет собой образец плазмы или образец мочи.
20. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что биологический образец сначала обрабатывают, чтобы выделить гликозаминогликан.
21. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что биологический образец содержит гликозаминогликан в концентрации, превышающей 0,1 мкМ.
22. Способ отслеживания лечения лизосомной болезни накопления, включающий лечение субъекта, страдающего от лизосомной болезни накопления, с помощью курса лечения, включающего введение субъекту терапевтически эффективной дозы заместительного фермента с определенным интервалом введения, и
измерение уровня гликозаминогликанов (ГАГ) в биологическом образце, полученном от субъекта во время курса лечения, способом по любому из предыдущих пунктов.
23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что лизосомная болезнь накопления выбрана из группы, состоящей из МПСІ, МПСІІ, МПСІІІА, МПСІІІВ, МПСІІІС, МПСІІІD, МПСІVА, МПСІVВ, МПСVІ, МПСVІІ, МПСІХ, альфа-маннозидоза, аспартилглюкозаминурии, болезни Фабри, фукозидоза, галактосиалидоза, болезни Гоше, GM1-ганглиозидоза, недостатка

активатора GM2, сиалидоза, болезни Краббе, метахроматической лейкодистрофии, муколипидоза IV, множественной сульфатазной недостаточности, болезни Помпе, болезни Сандхоффа, болезни Тея-Сакса, варианта АВ болезни Шиндлера, болезни Салла, бета-маннозидоза и глобоидно-клеточной лейкодистрофии.

24. Способ по п. 22 или 23, отличающийся тем, что введение представляет собой интратекальное введение или внутривенное введение.

25. Способ по любому из пп. 22-24, отличающийся тем, что доза выбрана из группы, состоящей из 10 мг, 45 мг, 90 мг и их комбинаций.

26. Способ по любому из пп. 22-25, отличающийся тем, что заместительный фермент представляет собой рекомбинантную человеческую гепаран-N-сульфатазу или рекомбинантную идурсульфазу.

27. Способ по любому из пп. 22-26, отличающийся тем, что интервал введения является суточным, недельным, двухнедельным, месячным, двухмесячным, годичным или представляет собой их комбинации.

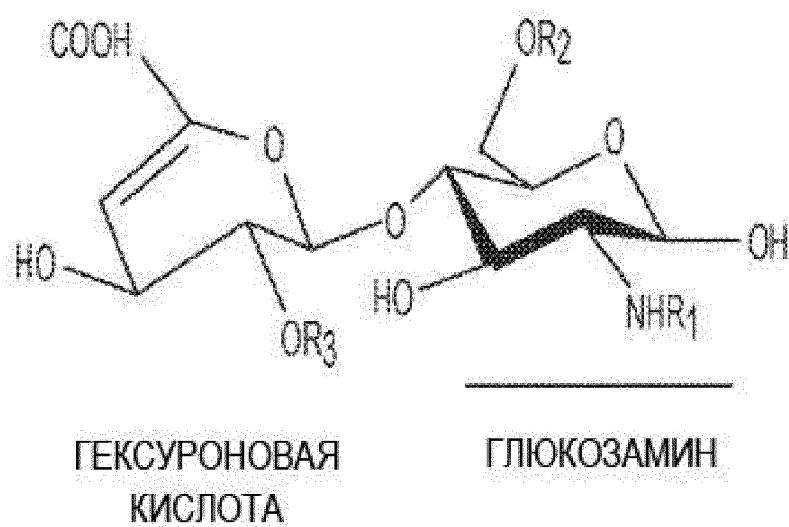
28. Способ по любому из пп. 22-27, отличающийся тем, что биологический образец выбран из группы, состоящей из цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), цельной крови, клеток, ткани, плазмы, сыворотки, крови, мочи и их комбинаций.

29. Способ по любому из пп. 22-28, дополнительно включающий поддержание терапевтически эффективной дозы и/или интервала введения, если уровень ГАГ снижен по сравнению с контрольным уровнем ГАГ.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что уровень ГАГ снижен по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более.

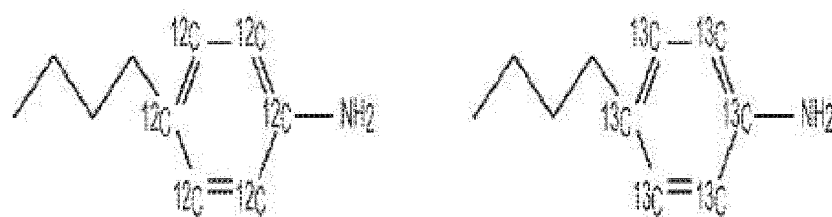
31. Способ по любому из пп. 22-28, дополнительно включающий корректировку терапевтически эффективной дозы и/или интервала введения, если уровень ГАГ снижен по сравнению с контрольным уровнем ГАГ.
32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что корректировка терапевтически эффективной дозы и интервала введения включает увеличение дозы и/или уменьшение интервала введения.
33. Способ по п. 31, отличающийся тем, что уровень ГАГ снижен на 1% или менее, 2% или менее, 3% или менее, 4% или менее, 5% или менее, 6% или менее, 7% или менее, 8% или менее, 9% или менее или 10% или менее.
34. Способ по любому из пп. 22-28, дополнительно включающий корректировку терапевтически эффективной дозы и/или интервала введения, если уровень ГАГ повышен по сравнению с контрольным уровнем ГАГ.
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что корректировка терапевтически эффективной дозы и интервала введения включает увеличение дозы и/или уменьшение интервала введения.
36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что уровень ГАГ повышен по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более.
37. Способ по любому из пп. 29-36, отличающийся тем, что контрольный уровень ГАГ представляет собой i) уровень ГАГ у субъекта, страдающего лизосомной болезнью накопления, ii) уровень ГАГ у субъекта, страдающего лизосомной болезнью накопления, измеренный в более ранний момент времени в течение лечения, или iii) уровень ГАГ у не проходящего лечение контрольного субъекта.
38. Способ лечения синдрома Хантера, включающий периодическое интратекальное введение нуждающемуся в лечении субъекту терапевтически эффективной дозы рекомбинантной идуронат-2-сульфатазы (I2S) так, чтобы уровень гликозаминогликанов (ГАГ)

в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) был снижен более чем на 85% по сравнению с базовым уровнем ГАГ до лечения согласно определению способом по любому из предыдущих пунктов.

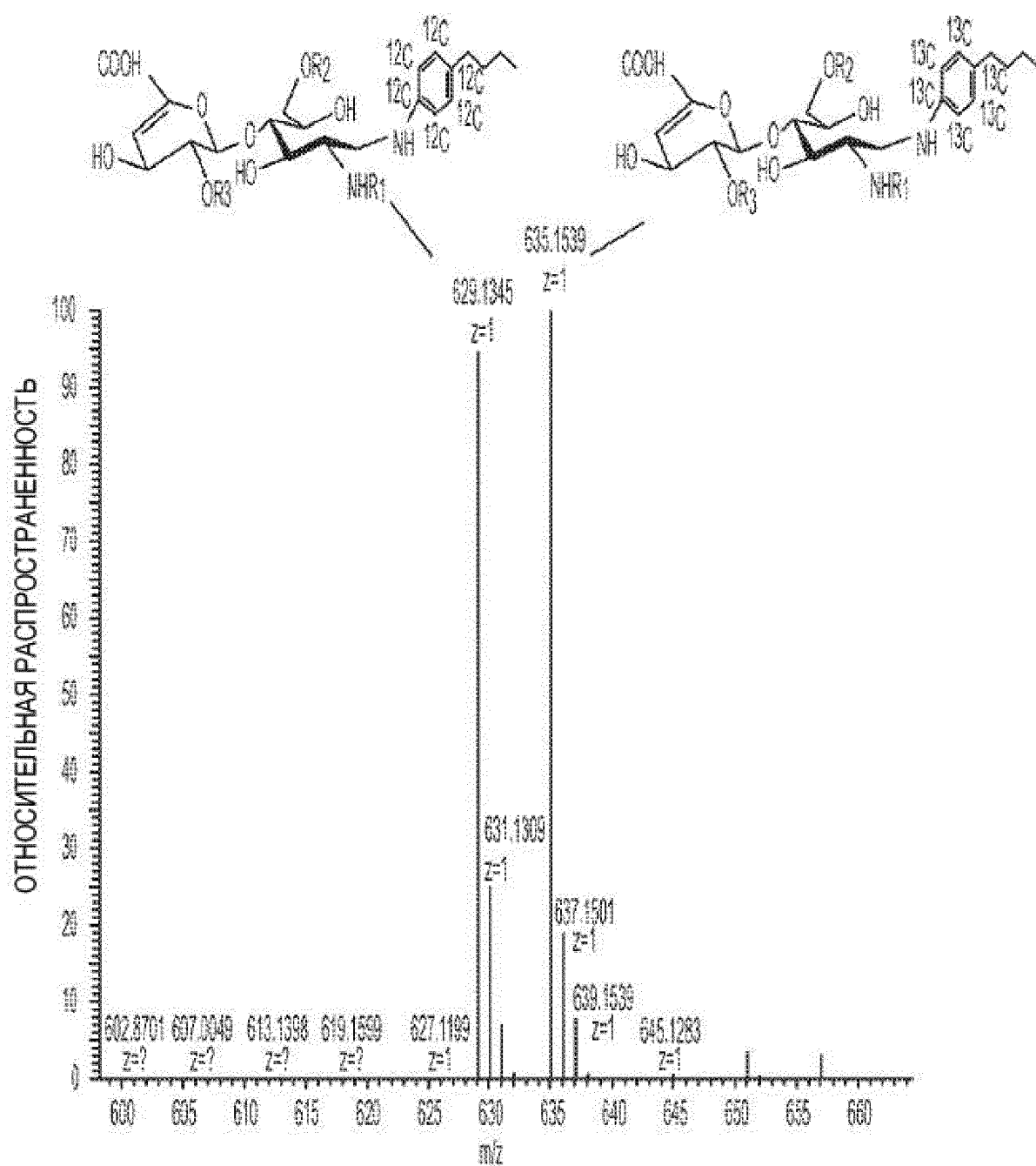


ДИСАХАРИД	R1	R2	R3
I S	SO ₃ H	SO ₃ H	SO ₃ H
II S	SO ₃ H	SO ₃ H	H
III S	SO ₃ H	H	SO ₃ H
IV S	SO ₃ H	H	H
I A	Ac	SO ₃ H	SO ₃ H
II A	Ac	SO ₃ H	H
III A	Ac	H	SO ₃ H
IV A	Ac	H	H

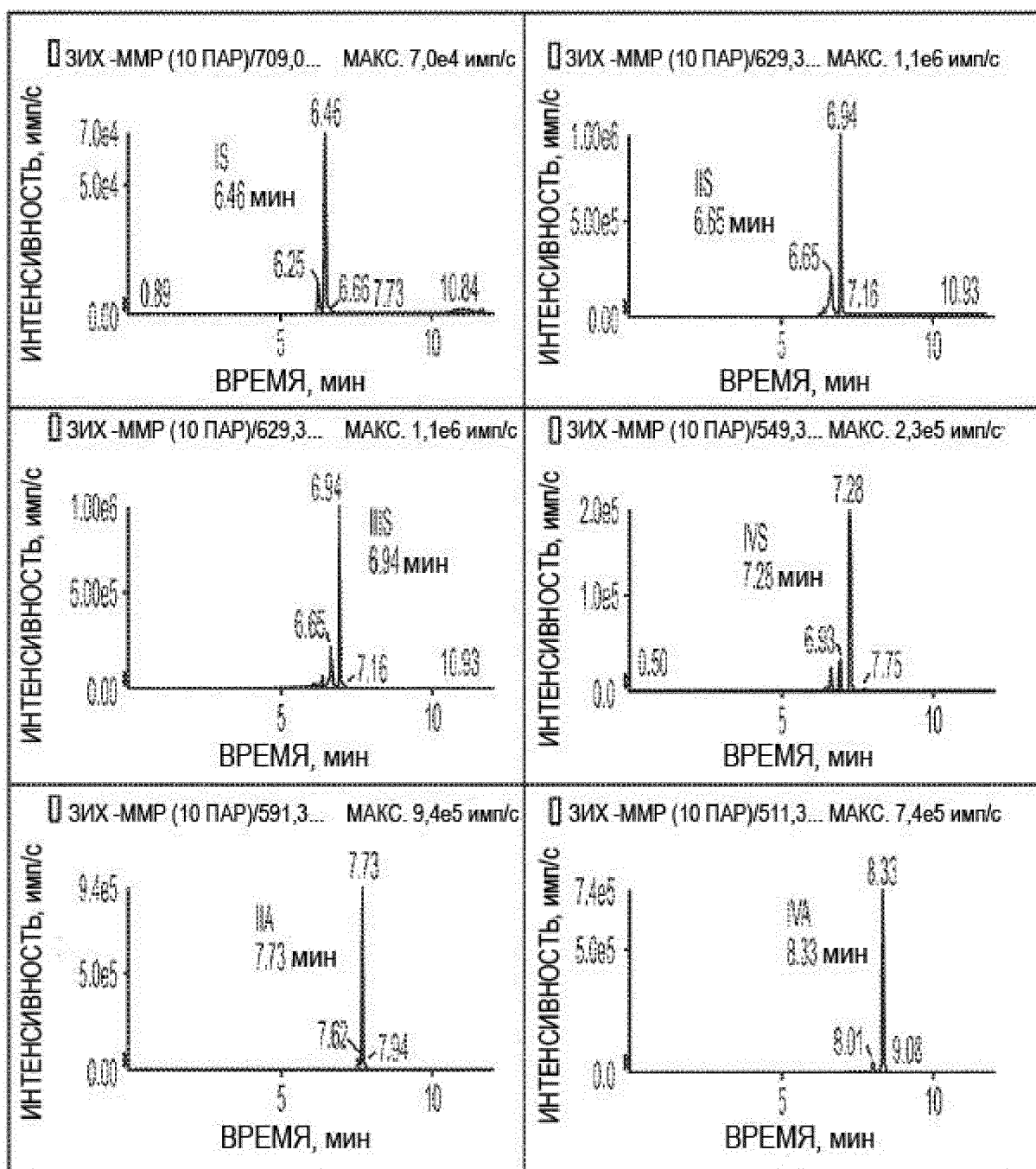
ФИГ. 1



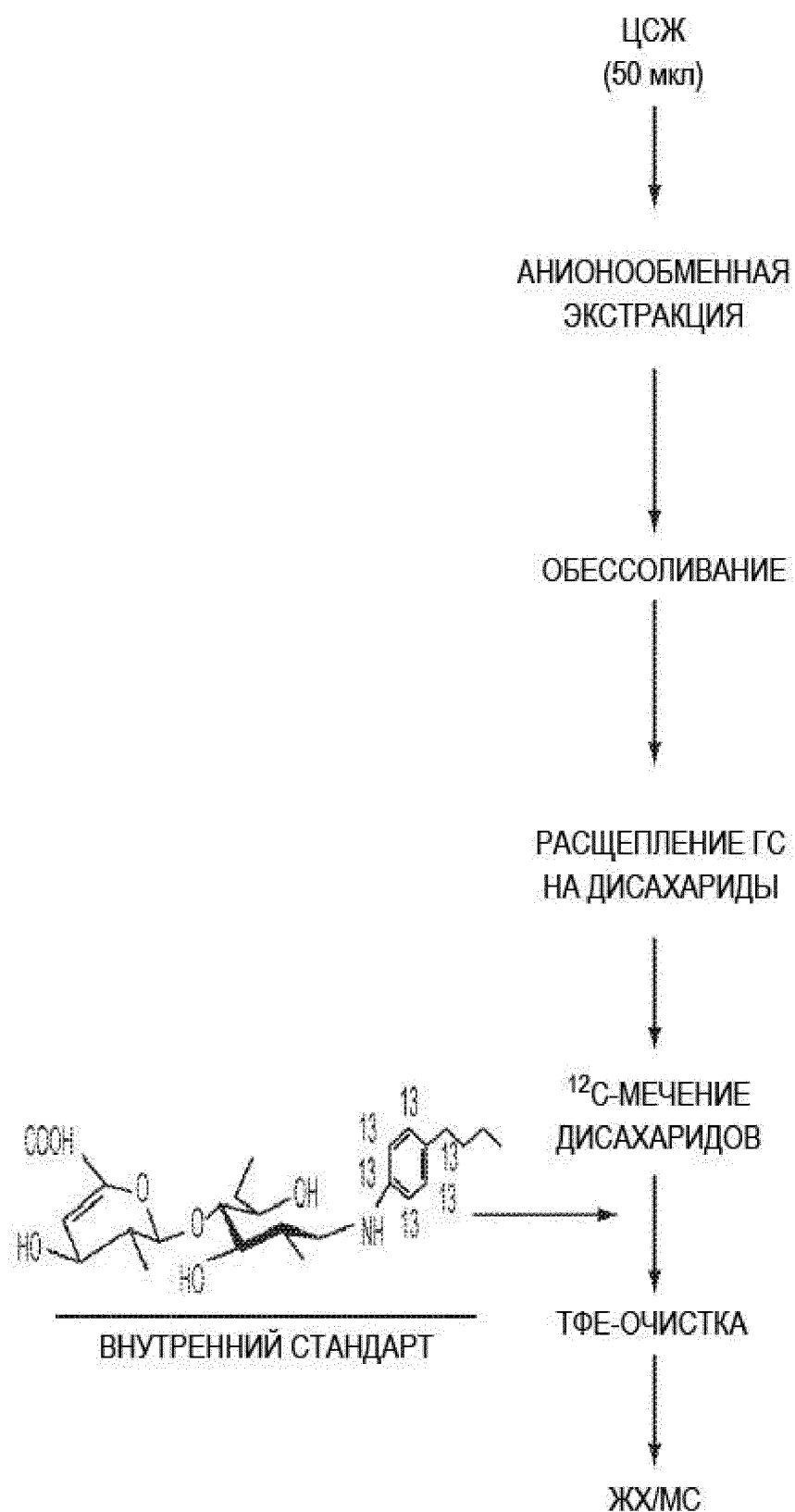
ФИГ. 2А



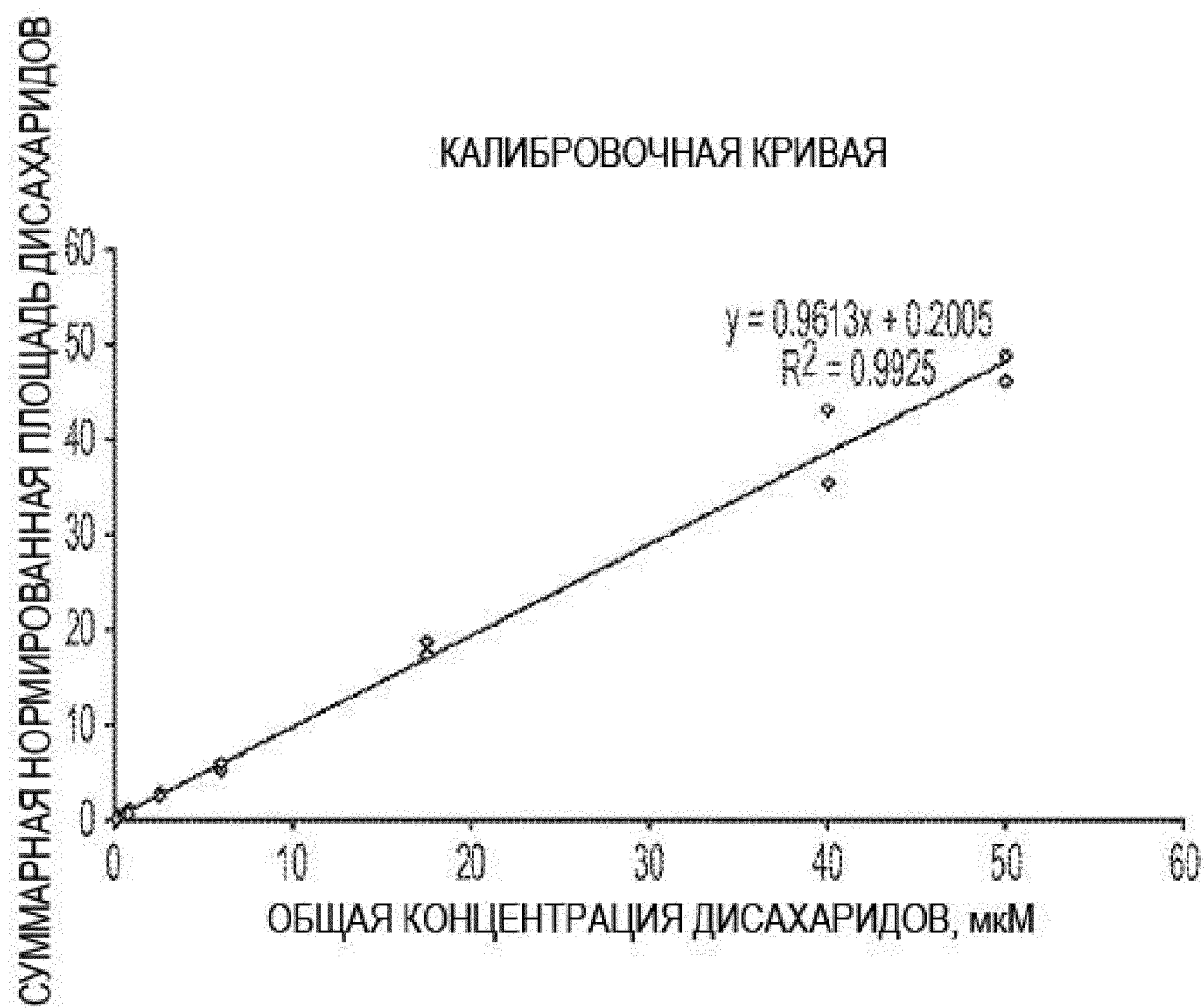
ФИГ. 2В



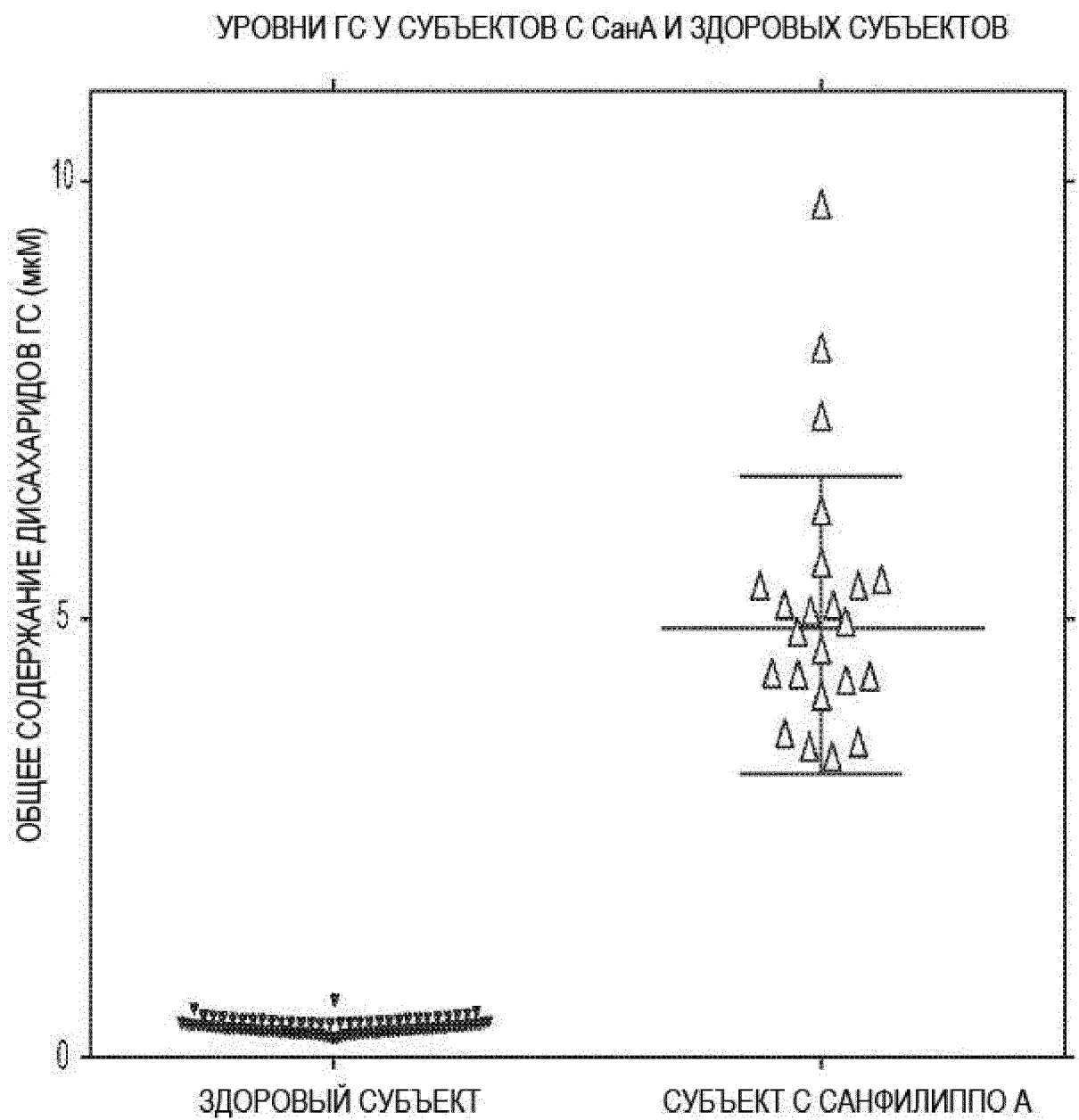
ФИГ. 3



ФИГ. 4

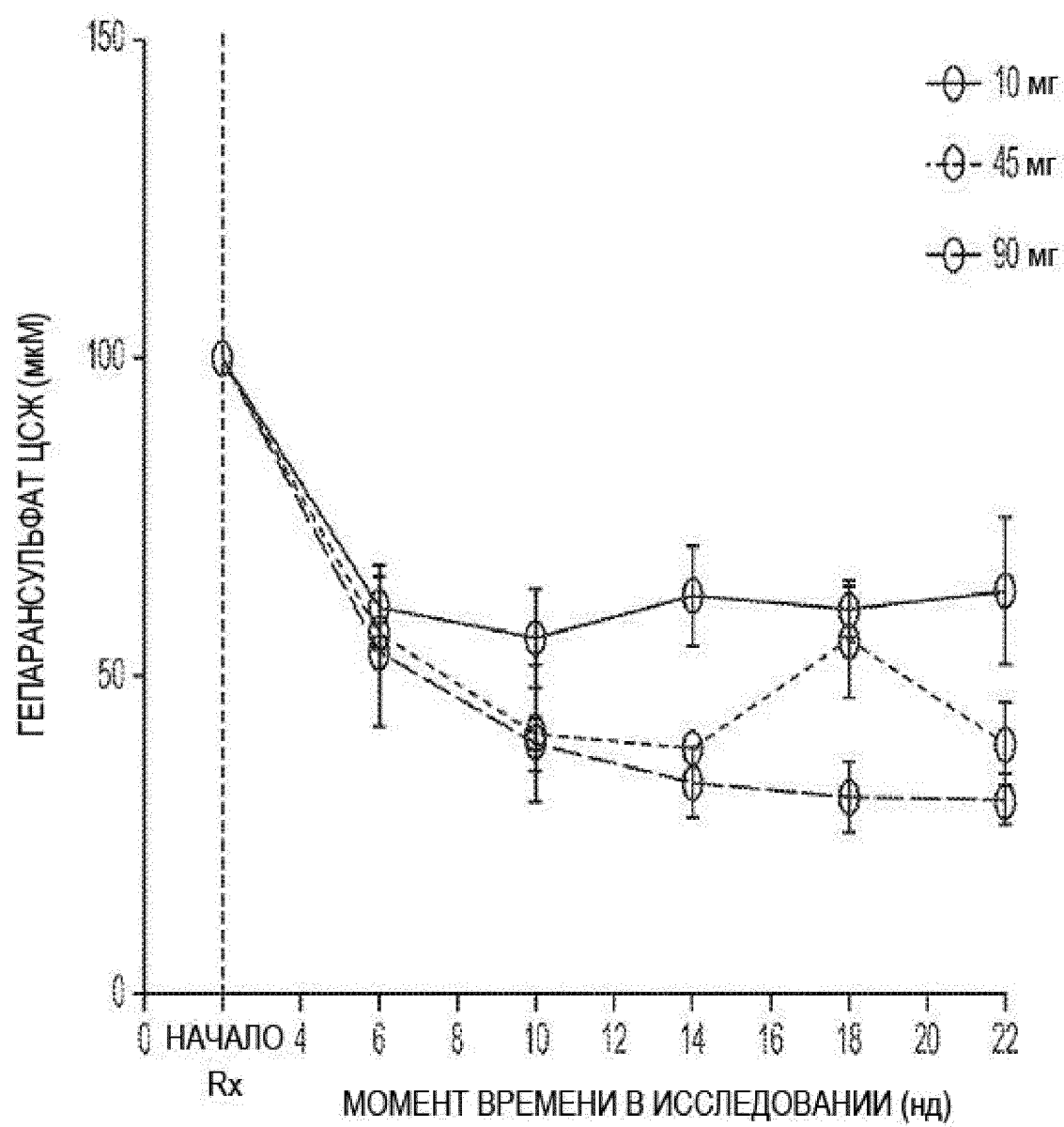


ФИГ. 5

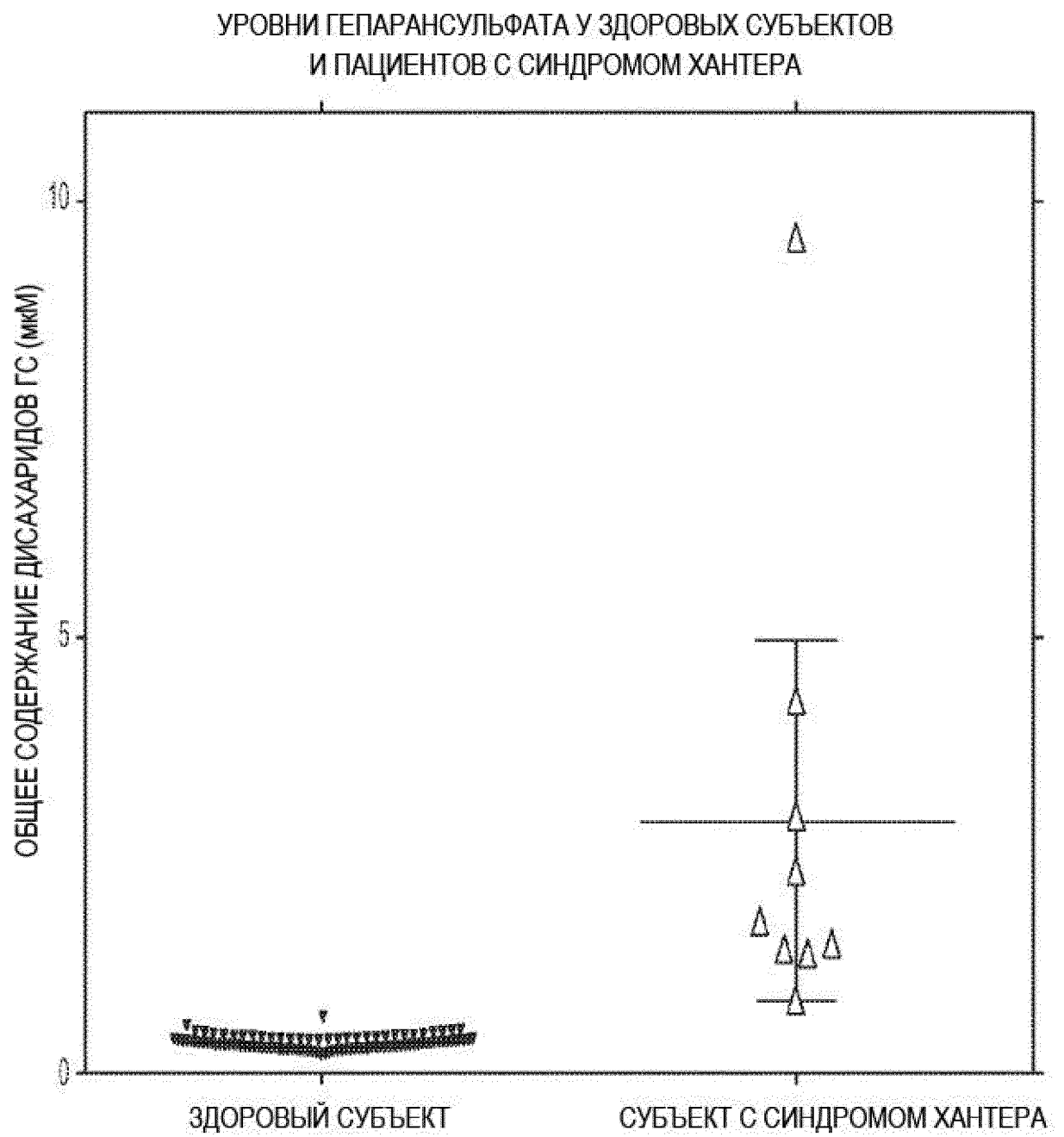


ФИГ. 6

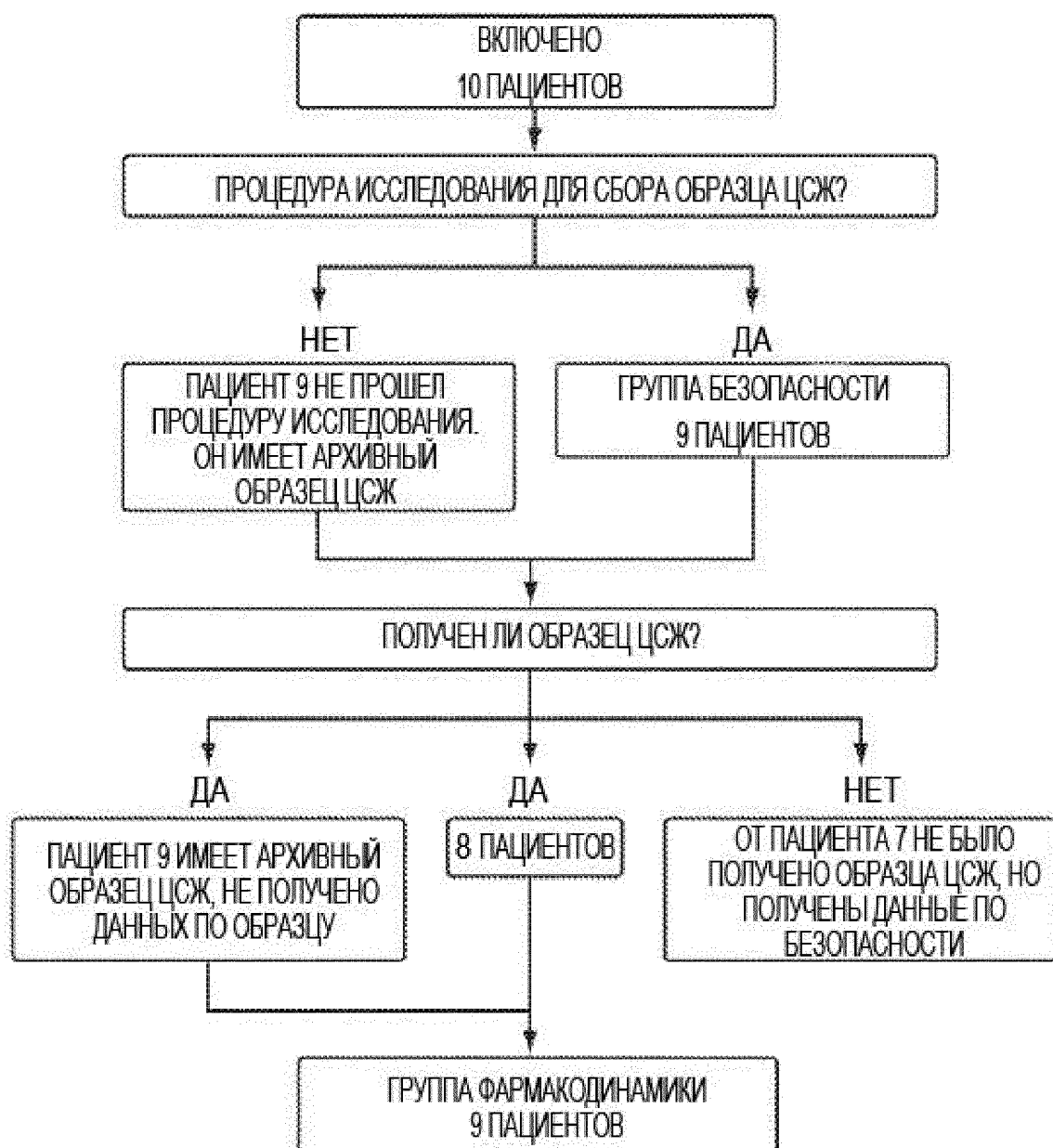
НОРМИРОВАННЫЕ ДАННЫЕ ПО ГРУППЕ



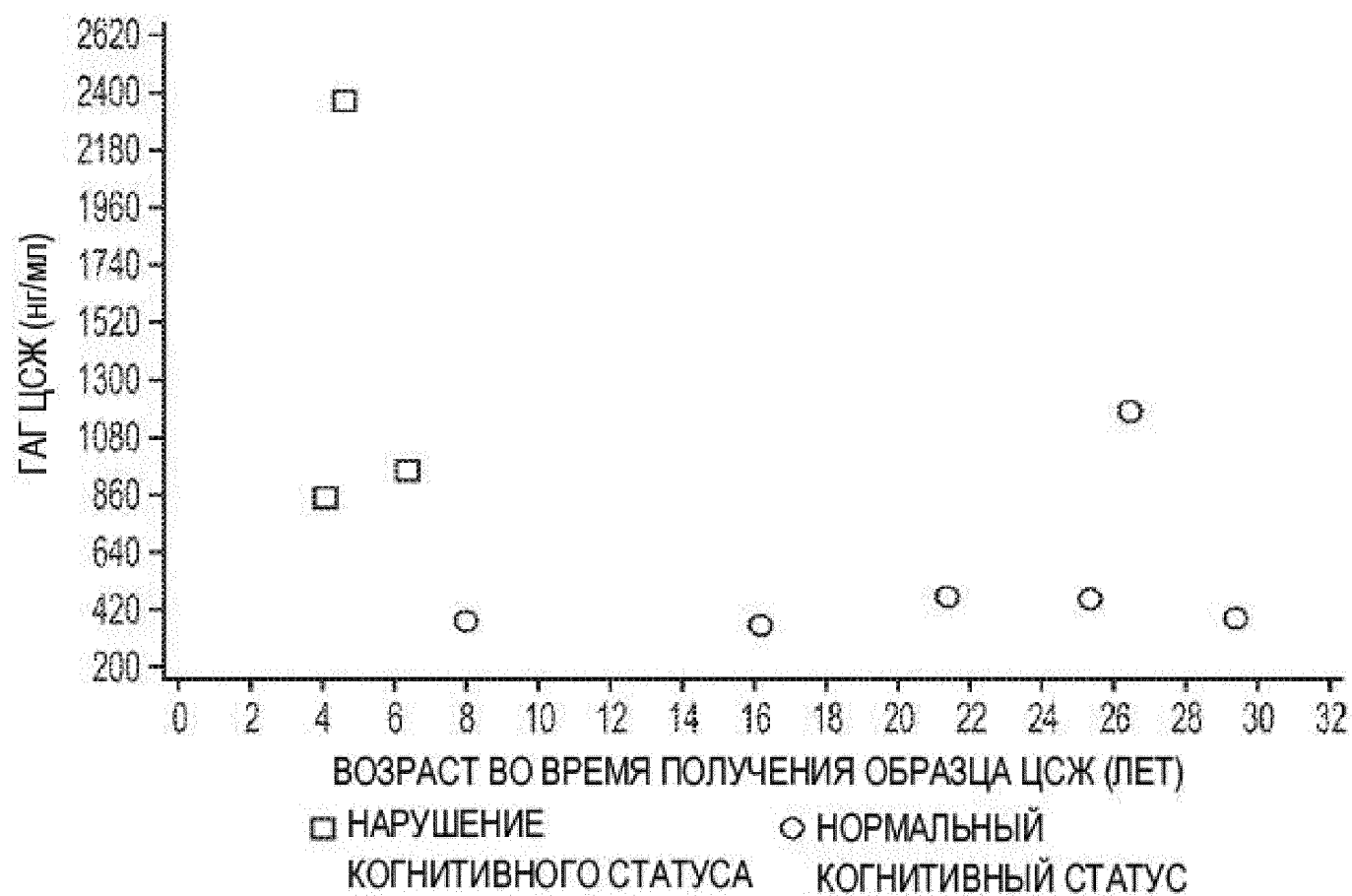
ФИГ. 7



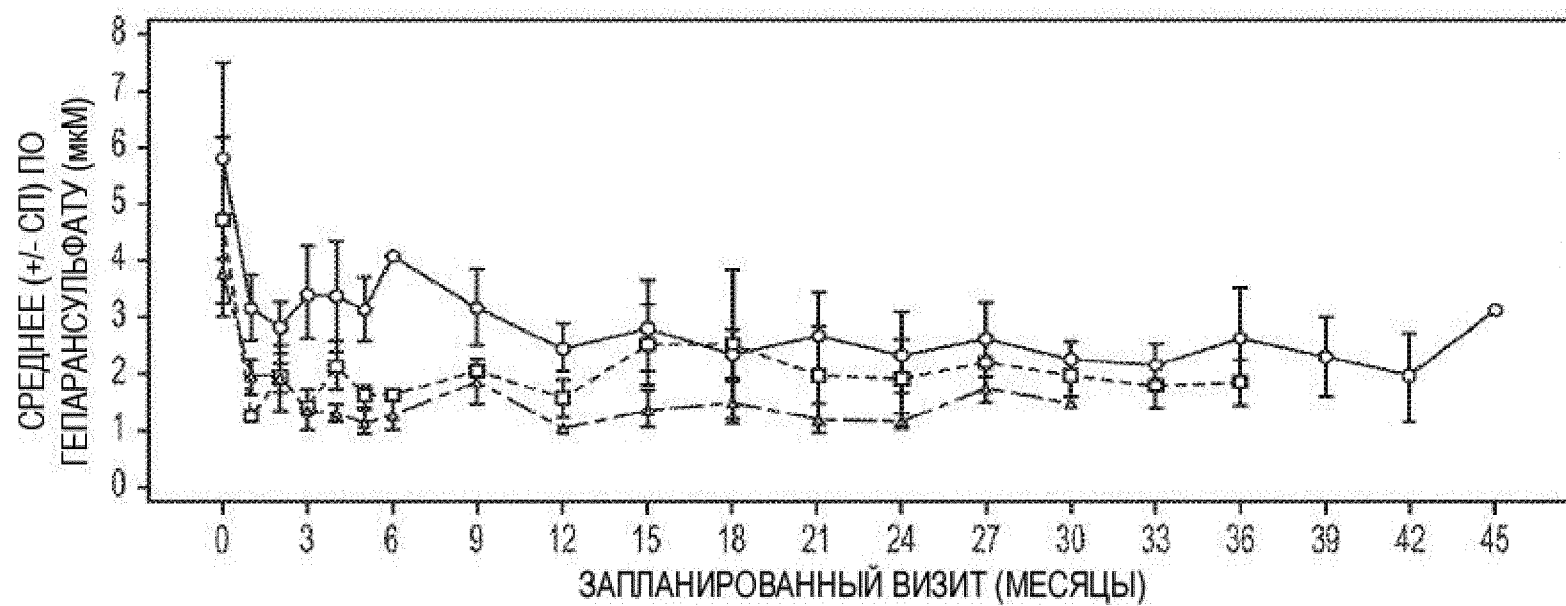
ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10



ЧИСЛО СУБЪЕКТОВ																					
		—○— 10 мг --□-- 45 мг —△— 90 мг																			
10 мг		4	4	4	4	4	1	4	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	1
45 мг		4	1	4	3	3	4	1	4	4	3	3	4	4	4	4	4	2			
90 мг		4	2	3	3	3	3	2	4	3	4	4	3	3	2	1					

ФИГ. 11