

發明專利說明書 200400351

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：

※申請日期： 2013.6.13

※IPC 分類： G01N33/50

壹、發明名稱：(中文/英文)

用於黏多醣症及其它相關疾病的寡醣生物標記

OLIGOSACCHARIDE BIOMARKERS FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSES AND OTHER RELATED DISORDERS

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

婦女及兒童醫院/Women's and Children's Hospital

代表人：(中文/英文) 溫蒂·沙克/Wendy Salk

住居所或營業所地址：(中文/英文)

澳洲·南澳·北阿得雷德·金威廉路 72 號

72 King William Road, North Adelaide, 5006, South Australia, Australia

國籍：(中文/英文)澳洲/ Australia

參、發明人：(共 5 人)

姓名：(中文/英文)

- 1) 彼得·約翰·梅可 / MEIKLE, Peter John
- 2) 瑪利亞·富勒 / FULLER, Maria
- 3) 史帝夫·路易士·雷姆西 / RAMSEY, Steve Lewis
- 4) 恩佐·雷尼利 / RANIERI, Enzo
- 5) 約翰·約瑟夫·荷伍 / HOPWOOD, John Joseph

住居所地址：(中文/英文)

1) 澳洲·南澳·紅木公園·米納姆拉道 31 號

31 Minnamurra Drive, Redwood Park, 5097, South Australia, Australia

2) 澳洲·南澳·期望·查爾斯街 24 號

24 Charles Street, Prospect, 5082, South Australia, Australia

3) 澳洲·澳洲首區·洋恩·貝克里克路 18 號

18 Backcreek Road, Young, 2594, Australian Capital Territory, Australia

4) 澳洲·南澳·木村·畢佛街 8 號

8 Beaufort Street, Woodville, 5011, South Australia, Australia

5) 澳洲·南澳·落石·蒙納透街 2 號

2 Monarto Court, Stonyfell, 5066, South Australia, Australia

國 籍：(中文/英文) 1.-5. 澳洲/Australia

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項 第一款但書或 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 澳洲；2002/6/14；PS 2930

2.

3.

4.

5.

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

本申請主張於 2002 年 6 月 14 日申請的澳大利亞臨時專利申請案 SN PS2930 的優先權。

發明所屬之技術領域

本發明主要與黏多糖症(“MPS”)及相關基病的診斷有關。更為特殊的是，本發明是關於對患者體液或組織內的寡糖進行識別及定量分析的方法，可作為對 MPS 進行定性、監測、以及臨床處理的生化標記(“生物標記”)。

先前技術

溶酶體貯積症(“LSD”)為一組通常累及幼小兒童的 40 多種不同遺傳性疾病。LSD 受累個體依其特有病症和所涉及的獨特基因型而表現出一廣範臨床症狀。與 LSD 有關的臨床症狀對患兒及受累患者的家庭具有災難性影響。例如，中樞神經系統功能異常、行為障礙、以及嚴重的智力低下是許多 LSD 的特徵。在一組被稱為 MPS 的特殊 LSD 患者中，其他臨床症狀可能包括骨骼異常、臟器腫大、角膜雲翳、以及肢體畸形。患者出生時常常無明顯可見的 MPS 臨床症狀，但可逐步發展出現臨床症狀。在嚴重病例，受累兒童需要進行持續治療，但患者仍然往往死於青春期前。

當將 LSD 疾病組的發病率(1:5000 新生兒)與人們已熟知、並進行深入研究的其他遺傳性疾病，諸如苯丙酮酸尿症(1:14,000)及囊性纖維化(1:2,500)的發病率相比(數位反

應的是白種人的發病率)，LSD 對於衛生保健的意義是顯而易見的。MPS 是 LSD 中主要一類，在澳大利亞新生兒中總體發病率為 1:22,000 新生兒。共有 6 種類型的 MPS，分類如下：(1)MPS I(Hurler 或 Scheie 綜合症)由 α -L-艾杜糖醛酸苷酶缺陷所致，並導致溶酶體胺基葡糖多聚糖(“GAG”)、硫酸軟骨素、以及硫酸乙醯肝素蓄積；(2)MPS II(Hurler 綜合症)是由於艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶的缺乏所致，如 MPS I 表現一樣，導致 GAG 蓄積於溶酶體內；(3)MPS III(Sanfilippo 綜合症)具有 4 種亞型，並均導致 GAG、硫酸乙醯肝素在溶酶體內的蓄積，但是，MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIIC 以及 MPS IIID 分別是由於硫醯胺酶(sulfamidase)、乙醯葡糖胺糖苷酶、胺基葡萄糖乙醯輔酶 A： α -N-乙醯基轉移酶、胺基葡萄糖-6-硫酸酯酶的缺乏所致；(4)MPS IV(Morquio 綜合症)，有兩種亞型，MPS IVA 和 IVB，分別是由於胺基葡萄糖-6-硫酸酯酶和 β -半乳糖苷酶的缺陷所導致的 GAG 硫酸角質素在溶酶體內蓄積所致；(5)MPS VI(Maroteaux Lamy 綜合症)，是由於胺基葡萄糖-4-硫酸酯酶的缺乏導致溶酶體 GAG 硫酸軟骨素蓄積所致；以及(6)MPS VII(Sly 綜合症)是由於 β -葡糖醛酸糖苷酶缺乏，導致溶酶體硫酸軟骨素及硫酸肝素蓄積所致。

在過去的 20 年裏，LSD 的診斷取得了很大的進展。例如，基於色層分析技術對 MPS 和寡糖異常患者進行尿液篩檢的引進和發展易化了對臨床選定的這類疾病患者進行篩選。對於疑似 MPS 和某些寡糖異常的患者，進一步診斷涉

及到尿液檢查，然後對於其中尿液篩檢“陽性”患者進行特定酶學分析。儘管篩檢方法簡單易行，但這些檢查屬於勞動強度密集型操作，而且也往往需要一定經驗才能對結果進行精確地分析。因此，基於色層分析技術的 LSD 篩檢方法無法在某些中心使用。而且，這些篩檢方法無法進行自動化處理，進一步限制了這些篩檢方法在新生兒診斷中的應用。

針對所產生的某些特異性底物及抗體進行捕獲分析技術，已經使得對特定 LSD 患者進行的酶學分析更加精確。但是，很多這些分析仍然是耗時長、有創傷性、操作複雜、並需要對培養細胞或組織進行活檢，更使得這些方法昂貴而難以進行。結果，導致了 LSD 首選檢查方法上的限制而嚴重影響了對患兒在症狀初期的診斷。LSD 的臨床診斷往往需要諸多專家多次會診才能夠做出，這通常需要數月甚至數年的時間。如此漫長的過程，給患者及其家庭帶來了巨大壓力。因此，需要開發一種快速、準確、以及經濟的早期診斷 LSD 的方法。

治療 LSD 的許多新方法也改變了對 LSD 早期診斷的要求。例如，許多計劃治療方案的有效性，也大大依賴於對疾病的早期發現及早期治療。理想地，治療應該在不可逆病理過程發生之前，對新生兒進行 LSD 篩選可一定程度上提供早期發現。但是，如果新生兒在症狀出現之前診斷得以明確，與患者、疾病以及與治療相關的幾個因素則是解決該問題的關鍵。例如，許多 LSD 所表現的廣泛臨床特點

將使得在缺乏疾病表型和疾病進展速度詳細資料的情況下選擇適當的治療方法變得更加困難。而且，缺乏對 LSD 患者臨床症狀嚴重性的詳細描述資料，則難以確定合理的治療藥物或進行合理酶替代療法（“ERT”），對患者是潛在的危險。因此，也需要一些方法來監測疾病進展、確定特殊表型和監測對臨床前診斷和臨床診斷患者的治療效果。

即便是在 LSD 開始出現典型臨床症狀後，對其做出客觀臨床診斷仍然是一個複雜的過程。例如，檢測涉及到對尿樣、血液、進行一系列分析，在某些疾病，還需要對皮膚成纖維細胞進行檢查。這些分析過程費時、昂貴、並具有創傷性，使這些檢查方法不適用於對新生兒進行大面積臨床普查。基於這樣的原因，需要一些技術探索診斷 LSD 更好的診斷生物標記。這些生物標記已經應用於新生兒普查計劃的發展和，並且有對上述著重指出的大量其他疾病進行標記的潛能。而 LSD 的新生兒普查為該疾病的早期診斷提供了良好的應用前景，但是需要對所有患兒進行檢查，以檢測在那些受累者中的該疾病。具有 LSD 家族史的患者，是進行 LSD 症狀前檢查一個正當原因。但是對沒有家族史的 LSD 患者進行症狀前檢查，這種花費可能就是不夠經濟的。因此，針對新生兒 LSD 的任何普查過程必須在經濟上可行，這一點是必要的。

幾篇已發表論文描述了在 MPS 及寡糖代謝異常患者中，對特異性寡糖生物標記進行檢測及監控的方法。例如，在 1980 年 Kimura A, Hayashi S, Tsurumi K 在 Tohoku J

Exp Med 131(3):241-7 上發表了題為：“從 Hunter 綜合症患者尿內提取的硫酸軟骨素的化學結構”的文章。該文描述了如何檢測 Hunter 綜合症患者尿內提取硫酸軟骨素 (“DS”) 化學結構的方法，利用 Dowex 1 分離及軟骨素酶 ABC 消化，對患者尿液內提取的 DS 進行寡糖化學結構分析。DS 主要由艾杜糖 N-乙醯葡萄糖胺-4-硫酸鹽重復雙糖結構組成。大約 90% 過量硫酸鹽連接到艾杜糖醛酸上，作為該結構單位中額外的硫酸鹽殘基。N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸鹽及 N-乙醯葡萄糖胺-4, 6-二硫酸鹽殘基是最基本構成單位。在消化的產物中沒有檢測到非硫酸二聚糖結構單位的存在。僅硫酸艾杜糖醛酸鹽殘基被發現是 DS 分子非還原型葡萄糖末端殘基，這與該病艾杜糖硫酸鹽硫酸酯酶的缺乏一致。

1981 年，Koseki M, Ino S, Kimura A, Tsurumi K 在 Tohoku J Exp Med 135(4):431-9 發表了一篇題為“黏多糖症患者尿內唾液酸複合糖分泌異常”的文章。在 4 例 MPS 患者中發現尿內有異常唾液酸複合糖分泌。利用 Sephadex G-25, G-50 凝膠柱過濾及 Dowex 1 離子交換色層分析，尿唾液酸複合糖被裂解為 8 個片斷。對這些片斷的量進行比較分析顯示，富含甘露糖及胺基葡萄糖的片斷有助於增加 MPS 患者尿內唾液酸複合糖的分泌。該片段的主要成分為 disialyl-oroso-N-octaose，是一代表性的糖蛋白寡糖側鏈結構，該糖蛋白具有天冬醯胺-N-乙醯胺基葡萄糖 (GlcNAc) 連接。儘管並不缺乏理論依據，該異常屬於 MPS

繼發性損傷，但是可以想象的是唾液酸複合糖代謝異常與本病的發病機制密切相關。

1983年，Purkiss P, Gibbs DA, Watts RW 在 Clin. Chim. Acta. 131(1-2): 109-21 上發表了題為“有關接受成纖維細胞移植治療黏多醣症患者尿胺基葡糖多聚糖及寡醣成分的研究”的文章。該研究報告的內容是有關接受成纖維細胞移植治療 MPS 患者尿 GAG 及寡醣構成成分的研究。利用胺基吡啶沈澱尿 GAG，而寡醣則被遺留在溶液內，然後對該兩種成分利用凝膠過濾的方法進一步分離。對 GAG 進行有關艾杜糖醛酸、葡糖醛酸、半乳糖胺、以及胺基葡萄糖含量測定。儘管不缺乏理論依據，但在接受 4.5 年重復成纖維細胞移植治療的患者中，未發現這些參數的變化。測定了寡醣片斷中的胺基葡萄糖成分，並未顯示改變。除此之外，也未發現 4 例 Hurler 病和 2 例 Hunter 病患者，與接受移植治療有關的特殊尿特異性 GAG 成分硫酸鹽化程度的改變。作者據此認為，成纖維細胞移植並不能產生可檢測到的尿 GAG 及寡醣中碳水化合物或硫酸鹽的含量或程度的改變。

1984年，Elliott H, Hopwood JJ 在 Anal. Biochem. 138(1): 205-9 上發表了一篇題為“利用放射性標記硫酸單糖作為底物測量 N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶水平診斷 Sanfilippo D 綜合症的方法”一文。該文討論了如何利用將放射性標記的單糖 N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸鹽($1-^{14}\text{C}$ 6-硫酸鹽)與淋巴細胞和培養的皮膚成纖維細胞的組織勻

漿以及尿濃縮物共同孵育來分析 N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶的活性，該組織勻漿和尿濃縮物來自正常個體、N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶缺乏患者 (Sanfilippo D 綜合症，MPS III D)、以及其他 MPS 受累患者。該分析清晰地顯示，正常對照純合子與 MPS 其他類型之間所存在差異。GlcNAc6S 酶活性水平與從肝素中製備的硫酸雙糖以及硫酸三糖的活性水平相似。雙糖脫硫酸的速率與單糖相似，但三糖脫硫酸的速度是單糖的 30 倍。對於葡萄糖-6-硫酸鹽和乙醯甘露糖胺，硫酸酯酶的活性未進行測定。在成纖維細胞組織勻漿 GlcNAc6S 內硫酸酯酶的活性，所顯示的最適為 pH 6.5，表觀 K_m 值為 $330 \mu\text{mol/l}$ ，既可以被硫酸根離子也可以被磷酸根離子所抑制。推薦使用放射性標記 GlcNAc6S 底物的方法，用於 Sanfilippo D 綜合症患者淋巴細胞，及皮膚成纖維細胞 N-乙醯胺基葡萄糖-6-硫酸硫酸酯酶活性的常規測定。

1984 年，Kimura A， Hayashi S， Koseki M， Kochi H， Tsurumi K 等在 *Tohoku. J. Exp. Med.* 144(3)：227-36 上發表了一篇題為“Sanfilippo 綜合症患者尿中提取硫酸乙醯肝素的功能及特徵”的文章。該文所討論的是如何利用 Dowex 1 色層分析及 Sephadex G-50 分離兩個同胞兄弟 MPS III-B 患者尿中的硫酸肝素 (“HS”)。它們的分子量範圍在 1600 到 8000 之間，其中 95% 分子量在低於 5,000。低分子量片斷部分包含大量 O-和 N-硫酸鹽。對 HS 化學分析及去胺基裂解分析表明，一個完整的 HS 分子由某些富含

GlcNAc、葡萄糖醛酸(GlcUA)、以及其他富含胺基葡萄糖-N-硫酸鹽(GlcNS)、艾杜糖醛酸(IdUA)以及 O-硫酸鹽的成分片斷組成。GlcNAc-UA-GlcNS-UA-GlcNAc-UA-GlcNAc 被發現是分子量低於 1800 的主要 HS 寡糖片斷。三聚糖，GlcNAc-GlcUA-無水甘露糖(anMan)以及 GlcNAc-IdUA-anMan，來源於 HS-寡糖脫胺基過程中非還原末端。這些分子攜帶 0-3 個硫酸酯。其中 GlcNAc-IdUA-anMan 較其他分子攜帶更多的硫酸鹽。能釋放顯著數量的非硫酸化三糖，證實該病存在酶的缺陷。對來自另一 MPS III 患者尿 HS 也利用同樣的方法進行了分析。儘管該患者未進行酶學檢查，但對患者尿 GAG 分子結構分析顯示，患者存在 α -N-乙醯葡萄糖胺糖的缺陷。

1984 年，Kodama C， Ototani N， Isemura M， Yosizawa Z， 在 J. Biochem. (Tokyo) 96(4)：1283-7 上發表了一篇題為“利用高效液相色層分析軟骨素酶催化硫酸軟骨素產生非飽和雙糖嘧啶胺衍生物”一文。該文對所開發的利用高效液相色層分析技術進行 4 種非飽和雙糖(δ Di-0S、 δ Di-4S、 δ Di-6S、以及 δ Di-diS)，進行分離及定量分析的高敏感度方法進行了探討。將不飽和雙糖與熒光化合物嘧啶胺相偶聯。利用 muBondapak-C18 色層分析柱和 8 mM KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 6.0)/甲醇(30/1 體積比)作為流動相，對所產生的嘧啶胺衍生物進行徹底分離。熒光發射光譜強度(峰高)與偶聯反應所使用的雙糖真實數量之間存在線性關係。本方法可用於對市售硫酸軟骨素 A、

C、DS，以及從 MPS 患者尿中所獲得的 GAG，經過軟骨素酶消化後進行分析。研究資料表明，該方法可用於對硫酸軟骨素同分異構體經過軟骨素酶酶解後產生的非飽和雙糖進行皮摩爾到納摩爾水平的分離及定量分析，並可用於其結構特徵的闡述。

1985 年，Hopwood JJ， Elliott H 在 *Biochem. J.* 229(3)：579-86 上發表了一篇題為“各種黏多醣症患者尿 N-乙醯己糖胺硫酸鹽分泌物分析”一文。從患者尿內分離 N-乙醯己糖胺硫酸鹽，並初步鑒定為 N-乙醯葡萄糖胺 (GlcNAc6S)、N-乙醯半乳糖胺 6-硫酸鹽 (GalNAc6S)、N-乙醯半乳糖胺 4-硫酸鹽 (GalNAc4S) 以及 N-乙醯半乳糖胺 4，6-二硫酸鹽 (GalNAc4，6diS)。來源於 MPS-IIID、-IVA 以及 -VI 型患者尿內 GlcNAc6S、GalNAc6S、以及 GalNAc4S 較正常健康對照者分別升高 380 倍、180 倍、以及 420 倍。來源於 MPS-VI 患者尿內 GalNAc4，6diS 含量也較健康對照者高 600 倍以上。來源於 II 型粘膜炎脂質沈積症患者、多重硫酸鹽缺乏症患者、以及在通常情況下對所有 MPS 患者的研究發現，這些患者尿內 N-乙醯己糖胺水平較健康對照者及甘露糖苷貯積症患者至少升高 5-10 倍。臨床上發現，輕型患者尿內 N-乙醯己糖胺水平較嚴重型 MPS 患者水平為低。4 種類型的 N-乙醯己糖胺硫酸鹽來源未知。但是，將來自硫酸角質素、軟骨素 6-硫酸鹽以及包含 β -非還原型末端的 N-乙醯己糖胺 6-硫酸鹽殘基的一系列寡醣底物，與培養的皮膚成纖維細胞勻漿共孵育表明，分別可以釋放

GlcNAc6S 和 GalNAc6S。同樣將來自軟骨素 4-硫酸鹽與包含非還原型末端的 β -GalNAc4S 殘基，與寡醣底物共孵育，並未顯示 GalNAc4S 的釋放。我們推測，即便不是全部，存在於人類尿內的 N-乙醯己糖胺硫酸鹽來自於硫酸角質素、硫酸皮質素、硫酸軟骨素非還原末端，在 β -N-胺基己糖酯酶的作用下，裂解 GlcNAc 或 GalNAc 硫酸鹽殘基的 β 連接所產生。

1995 年，Murata K， Murata A， Yoshida K 在 J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 670(1)：3-10 上發表了題為“乙醯肝素酶降解乙醯肝素硫酸鹽同分異構體 8 種結構雙糖成分的高效液相色層分析鑒定”一文。該文所闡述的是，利用特異性乙醯肝素硫酸鹽裂解酶、肝素酶 I、乙醯肝素酶、以及肝素酶，對 HS 同分異構體及肝素進行降解，然後利用磺酸化乙烯苯-二乙烯基苯異分子聚合物高效液相色層分析技術(“HPLC”)，對結構型非飽和(δ Di-SHS)進行鑒定。共對來自 HS 同分異構體中的 8 種 δ Di-SHS 產物進行了鑒定。利用乙醯肝素酶 I 和肝素酶，將異源性 HS 同分異構體硫酸鹽及肝素轉化為不同的 δ Di-SHS。使用特異性酶及 HPLC 技術對這些酶的實際作用進行測定。對 1 例 Hurler 綜合症患者尿內的 8 種 δ Di-SHS 成分進行了鑒定。

1996 年，Toma L， Dietrich CP， Nader HB 在 Lab Invest.， 75(6)：771-81 上發表了一篇題為“利用細菌乙醯肝素酶證實從黏多糖症患者體內提取的乙醯肝素硫酸鹽

非還原型末端之間的差異：一種結構研究及 Sanfilippo's 與 Hunter's 綜合症之間鑒別診斷的新工具”一文。本文闡述的是對從 Sanfilippo's 及 Hunter's 綜合症患者尿內提取的 HS 酶解及化學分析問題，結果顯示，其非還原型末端之間彼此差異，反映了這些綜合症之間酶缺陷之間的差異。將來源於不同綜合症乙醯肝素硫酸鹽使用乙醯肝素酶 II，一種從肝黃桿菌內粗提取酶，及亞硝酸進行降解。來自 Sanfilippo A 患者(乙醯肝素 N-硫酸酯酶缺乏)及 Sanfilippo B 患者(α -N-乙醯葡萄糖胺糖苷酶缺乏)的 HS 使用乙醯肝素酶 II 降解，分別產生除了非飽和雙糖外，還產生一定數量的葡萄糖胺 N-硫酸鹽。來源於 Hunter's 綜合症患者(艾杜糖醛酸硫酸酯酶缺乏)的 HS，使用乙醯肝素酶 II，和酶粗提取物降解，產生幾種包括在其非還原型末端含有飽和糖醛酸的兩種飽和雙糖。來源於 Sanfilippo's C 綜合症患者(乙醯輔酶 A 缺乏：胺基葡萄糖苷乙醯轉移酶缺乏所致)的 HS，在乙醯肝素酶 II 的作用下，在所產生的其他產物內包含兩種飽和三糖成分，該三糖成分內含有胺基酸殘基不可替換的胺基葡萄糖。除了為 MPS 提供新的鑒別診斷工具，這些結果還為闡述肝黃桿菌來源的乙醯肝素酶的特異性提供了新的依據。

1998 年，Byers， S. Rozaklis， T. Brumfield， L. K. Ranieri， E. and Hopwood， J 在 *Mol Genet Metab.* 1998 Dec；65(4)：282-90 上發表了一篇題為“胺基葡萄糖多聚糖積聚及黏多糖症患者的分泌：特徵及 MPS 診斷檢測的基

礎”一文。在該研究中，作者將離子交換色層分析與30-40%梯度聚丙烯醯胺凝膠電泳(梯度-PAGE)相結合，對各種 MPS 患者尿內提取的 GAG 進行了純化及定性分析。來自不同類型 MPS 患者的尿 GAG 在梯度 PAGE 上顯示了不同的分佈模式，經過適當的 MPS 消化後利用電泳漂移技術，不同的 MPS 類型顯示了不同的結合模式。他們在報告中指出，特殊類型的 MPS 因其缺乏酶所導致的積聚底物的差異，導致了 GAG 非還原型末端具有獨特的構成分佈圖譜。特殊 MPS 非還原型末端的結構與重組溶酶體酶有效性絕對相關，為個體 MPS 快速、準確診斷提供了有效的手段。

2003 年，在遞交了澳大利亞臨時專利申請 SN PS2930 文獻後，Ramsay SL, Meikle PJ, Hopwood JJ 在 *Mol. Genet. Metab.* 78(3): 193-204 發表了題為“利用電噴霧離子解析質譜測定患者的單糖及雙糖”一文。本文對如何根據積聚 GAG 的特徵對 MPS 進行分類的問題。除了 Hunters 綜合症外(MPS II)，該綜合症為 X-連鎖伴性遺傳，是由於常染色體過量遺傳，所導致的溶酶體內代謝 GAG 所需 10 種溶酶體中的任何一種酶的缺乏所致。蓄積在溶酶體內 GAG 種類及數量由所缺乏的酶的特異性所決定。這些升高的 GAG 隨後可以在組織、迴圈以及尿內被觀察到。所提出的用於對患者標本內硫酸化 N-末端含有乙醯己糖胺的單糖及雙糖進行差異及定量分析的方法，是通過電噴霧電離串聯質譜進行的。大多數類型 MPS 患者尿內雙硫化及單硫化 N-乙醯己糖胺(GalNAc4,6S、GalNAc6S、GalNAc4S、或 GlcNAc6S)

以及單硫化 N-乙醯己糖胺糖醛酸雙糖 (GalNAc6S-UA、GalNAc4S-UA、或 GlcNAc6S-UA) 含量顯著增加。對患者血漿以及從 MPS 患者樣本處理濾紙上採集的乾燥血液斑點分析表明，總單硫化 N-乙醯己糖胺水平升高，但低於尿內水平。接受骨髓移植患者、MPS IVA、以及 MPS VI 患者，尿液標本中 HexNAcS、HexNAcS(2)/GalNAc4, 6S、以及 HexNAcS-UA 水平在接受移植後降低。降低的程度與明確診斷患者症狀緩解程度相一致。

上述所列舉的參考文獻的整個內容因此被包括在內作為本申請的參考文獻。

據此，需要開發一種快速、精確、以及經濟地早期診斷 LSD 的方法，該方法也應該能進行自動化處理。而且，該普查方法應該能夠為臨床受累個體及臨床未受累個體提供療效監控。因此，用於 LSD 診斷的這樣不同臨床生物標記的鑒定，對針對該病進行新生兒普查專案具有重大影響，並能夠闡述許多與 LSD 診斷和治療相關的許多其他問題。本發明提供了用於檢測、定量、以及監控在 MPS 及其他寡醣貯積症患者中所發現的特異性寡醣生物標記的方法。

發明內容

本發明與 MPS 及相關疾病的診斷方法有關。屬於對出現在 MPS 或相關疾病患者體液、組織中的生化標記(“生物標記”)進行鑒定及定量分析的方法，作為 MPS 或相關

疾病臨床或臨床前期診斷的一種措施。

本發明的首要方面屬於一種對 MPS 疾病及目標動物進行臨床、或臨床前期診斷的一種方法。本發明包括對來自 MPS 目標動物體內所採集的目標生物標本中目標 MPS 生物標記進行定量分析方法，然後將目標生物標記的量與參考 MPS 生物標記的量進行比較。在 1 例實施例中，目標 MPS 生物標記為同一或等同於參考 MPS 生物標記，目標 MPS 生物標記及參考 MPS 生物標記對應於特異性寡糖。參考數量從參考動物或具有已知 MPS 臨床狀態參考動物組測定。從參考 MPS 生物標記參考數量中所獲得目標生物標記的目標數量的差值，是反映 MPS 疾病臨床或臨床前期狀態，或是 MPS 疾病臨床進展程度，或是該疾病臨床緩解程度的指標。在首選實施例中，目標 MPS 生物標記及參考生物標記是通過將 MPS 生物標記與衍生試劑反應衍生而來，該衍生試劑的量在測定目標數量及參考數量之前進行測定。衍生試劑可能包含 1-噻吩甲基-3-薄荷基-5-吡啶酮(“PMP”)。在首選實施例中，MPS 寡糖生物標記目標數量及參考數量，使用串聯質譜法進行測定。但是，其他實施例中的鑒定方法可以從色層分析、免疫分析、液相色層分析、離子交換色層分析、分子排阻色層分析、MALDI-TOF 質譜、質譜，或通過相應的結合手段分析。

在首選實施例中，MPS 生物標記對用於特殊的寡糖，其中，寡糖包含硫酸化的或非硫酸化的分子，該分子糖鏈的長度在 1-12 糖殘基之間。這些寡糖包括從目的生物標本

中所識別的 GAG 分解產物，其中，GAG 為 HS、DS、硫酸角質素、或硫酸軟骨素。在另外 MPS 首選實施例中，MPS 生物標記包含在目標生物標本中，而將該標本首先使用決定 MPS 疾病亞型特徵的相應缺陷功能酶進行消化。例如，在 MPS-I 中的缺陷酶，包括 α -L-艾杜糖醛酸苷酶為相應首選功能酶。在對目標 MPS 生物標記的目標數量進行測定之前，首先進行消化以增加量化的敏感性。

在一例具體實施例中，MPS 寡醣生物標記被用於目的動物或患者 MPS 診斷，通過將目標生物標記寡醣的數量與同一或相似 MPS 生物標記的參考數量進行比較，獲得動物或患者的生物標記的數量。例如，當目的 MPS 疾病動物 MPS 寡醣生物標記的數量，超過了未患有 MPS 疾病動物寡醣生物標記的數量參考範圍，則目標動物可以診斷為 MPS。除此之外，當與患有相似而較輕表型的 MPS 動物比較的參考動物寡醣生物標記比較，目標 MPS 寡醣生物標記的數量超過了患有 MPS 疾病的動物寡醣生物標記的數量，也可診斷目標動物患有 MPS。相應的，當與同一患有 MPS 疾病目標動物，接受了一定時間有效 MPS 治療後 MPS 寡醣生物標記的數量相比較，其中有效的 MPS 療法包括骨髓移植(“BMT”)，或 MPS 缺陷酶替代療法，目標動物寡醣生物標記數量在治療前較高，則該療法有效。將目標的數量與參考數量相比較，可被用於決定適當的治療方法或擴展適當的治療方法。

在另外一個特殊實施例中，內部標準被用於目標動物

MPS 生物標記或參考 MPS 生物標記的精確定量。在首選實施例中，含重氫的 N-乙醯胺基葡萄糖-6-硫酸鹽 (“GlcNAc6S(*d3*)”) 被用做內部標準。其他的內部標準包括無生理活性寡糖，而這些寡糖與被測定寡糖相似。諸如，來自硫酸軟骨素在軟骨素酶消化後產物的無生理活性寡糖，在非還原末端具有不飽和糖醛酸。

測定所用的生物標本可以從尿、細胞提取物、血液、血漿、腦脊液、或羊水中選擇，但是，實施例中優先使用尿液。該方法所選擇的生物標記用於 MPS 亞型疾病的診斷，其中 MPS 疾病包括 MPS-I、MPS-II、MPS-IIIA、MPS-IIIB、MPS-VI、MPS-IIIC、MPS-IIID、MPS-IV，或上述亞型相應的聯合。該方法可用於新生兒 MPS 疾病的普查診斷。

本發明的第二個方面也屬於一種 MPS 疾病動物臨床前及臨床狀態診斷方法。本方法包括：從患有 MPS 疾病的動物內獲取含有生物標記的生物標本，利用差異分析顯示試劑、或溶液對 MPS 生物標記進行差異顯示分析，以計算 MPS 生物標記的差值，以形成示差 MPS 生物標記，將該生物標記與與固相提取柱相互作用；利用清洗液清洗固相提取柱；利用沖提液將該示差分析標記從固相提取柱上沖提；沖提液中 MPS 生物標記測定；以及將沖提生物標記的數量與參考生物標記的數量進行比較。參考生物標記的數量源自對參考組動物，或參考動物組，即具有已知 MPS 臨床狀態動物的測量值。就該方法而言，MPS 生物標記是同一種或等同於參考 MPS 生物標記，而且每一種生物標記即

參考 MPS 生物標記是一種寡糖。除此之外，MPS 生物標記的數量是經過標準化處理的數量，而且在某個特定的實施例中，將每個數量標準化為肌酐或其他寡糖。當與參考 MPS 生物標記數量相比較時，沖提 MPS 標記的數量差值考慮為 MPS 疾病的臨床前、臨床指標、表明 MPS 疾病的進展或緩解。

生物標本中的 MPS 生物標記在進行示差分析之前，也可將其凍幹，其中，首選示差分析溶液中含有 PMP。MPS 生物標記對用於特殊的寡糖，其中，寡糖包含一個硫酸鹽分子，其攜帶的糖鏈長度在 1-12 殘基之間。這些寡糖包含從目標生物樣本中所識別的 GAG 的裂解產物，其中 GAG 為 HS、DS、硫酸角質素、或硫酸軟骨素。在另外特殊實施例中，將包含在目標生物樣本中的 MPS 寡糖生物標記，使用特殊 MPS 疾病亞型相應缺陷的首要功能酶進行消化。例如，在 MPS-I 疾病中所缺乏的首要功能酶包括 α -L-艾杜糖醛酸苷酶。當在進行目標 MPS 生物標記測定前使用消化步驟，可以增加定量的敏感性。

本發明的第三方面是作為用於目標動物進行 MPS 疾病臨床前期狀態、或臨床狀態診斷的一個試劑盒。在首選實施例中，試劑盒包括：用於改變目標 MPS 生物

標記化學成分的寡糖衍生試劑；在衍生反應後用於中和衍生試劑的酸性溶液；用於精確測定目標 MPS 生物標記含量的內部標準對照；用於純化目標 MPS 衍生生物標記的固相萃取柱；用於從已經結合目標生物標記的固相萃取柱

內清除雜質的固相萃取柱清洗液；用於從固相萃取柱內洗提目標 MPS 生物標記的寡糖洗提溶液；以及一系列使用該試劑盒的說明書。

在一個特殊實施例中，寡糖衍生溶液包括 PMP。首選酸性溶液包含甲酸。衍生寡糖 MPS 生物標記吸附於固相萃取柱內。首選萃取柱包括一根 C18 反相萃取柱，首選提取柱清洗液包括 CHCl_3 。為了將寡糖從結合柱上清除，首選清洗液包括 CHCl_3 所使用的甲酸。

該試劑盒液包括一份內部標準對照，其中 $\text{GlcNAc6S}(d3)$ 為首選內部標準對照。但是，與被檢測寡糖相似的無生理活性寡糖液可以用作內部標準對照。例如，無生理活性的寡糖液可以從具有不飽和糖醛酸的硫酸軟骨素在非還原性末端，利用軟骨素酶消化衍生而來。

實施方式

術語：

這裏所運用的術語“一個”或“某個”可能意味著一個或更多。如如申請專利範圍第項內所使用，當與單詞“包括”聯合使用時，“一個”或“某個”可能意味著一個或更多。當使用“另一個”時，可能意味著至少第二個或更多。

這裏所運用的術語“動物”、“被觀察物件”、“個體”、或“患者”在此可以互換使用，並指的是任何來自動物界標本，包括人類標本。

這裏所運用的術語“臨床狀態”，是指被研究或被觀察 MPS 患者的生理狀態。

這裏所運用的術語“包括”，或其變化形式諸如“包含”或“由……組成”，在這裏使用可能意味著包含所陳述的要素或整體或一組要素或整體，但不排除其他的要素或整體或一組其他要素或整體。

這裏所使用的術語“黏多醣症(MPS)”指的是溶酶體儲存障礙(“LSD”)的亞型，該類疾病以溶酶體內 GAG 積聚和過量蓄積為特徵。

這裏所使用的術語“MPS 生物標記”指的是從一個個體樣本生物體液內所檢測到的一種寡醣。該 MPS 生物標記的數量是某個 MPS 疾病個體臨床和臨床前狀態指標。

這裏所使用的術語“MPS 酶替換療法”，指的是針對 MPS 患者體內缺陷酶所給予的任何藥物或療法，以替換其體內缺乏或缺陷的酶。

這裏所使用的術語“標準化”，指的是將一個目標、參考值或其他標本，轉化成與某個標準、模式、模型等相一致的方法。例如，在一個實施例中，通過使用每個樣本中的 $1\mu\text{mol}$ 等價肌酐將 MPS 患者劑非 MPS 患者的尿液標本進行標準化處理。

這裏所使用的術語“表型”，指的是對某個生物體整體所表現出的特徵，包括遺傳和環境因素的共同影響所形成的解剖及心理上的特點。

這裏所使用的術語“臨床前狀態”指的是，在疾病任

何症狀出現之前的一段時期。

這裏所使用的術語“參考數量”指的是，生物體液內 MPS 生物標記標準化以後的數量。參考數量是針對一個動物、或已經明確其臨床狀態、臨床前期狀態、或具有 MPS 疾病表型一組動物的測定值。參考數量可能指的是，來自各種動物或生物體液內 MPS 生物標記相對數量之間具有相關性的一組動物編輯資料表，而且這些動物的臨床狀態、臨床前狀態或表型已知。

LSD 的共同特點之一是在溶酶體內有過多的物質儲存和積聚。這就是通常所觀察到的因溶酶體內過多的物質儲存和積聚，導致 LSD 受累個體細胞內溶酶體數量的增加及體積的增大，以至於細胞總體體積增加大約 1%~50%。在未受累個體內，這樣的物質在通常狀態下在溶酶體內被降解，然後通過溶酶體膜排除細胞外。發明人既往的研究發現，受累個體溶酶體內特定的溶酶體蛋白升高 (Meikle et al 1997; Hua et al 1998)。這些已經明確的蛋白可以被用作所有 LSD 早期診斷的有用生物標記。例如，溶酶體相關的膜蛋白 (“LAMPs”)，皂素 (saposins) 以及 α -葡萄糖 酶已經被鑒定並被用作生物標記，敏感的免疫定量分析的方法已經被用於這些蛋白水平的監測。儘管對“高危”個體組單獨檢測 LAMP-1 或 LAMP-2 水平，即可識別大約 65% 的 LSD 受累個體，但是，聯合檢測 LAMP 與皂素則可增加 LSD 受累個體的識別率達 85%。

LSD 的第二個特點是，溶酶體內所儲存的底物最終將

從細胞內釋放，或通過出胞作用或因細胞思維後膜的破裂。因此，各種生物體液內(舉例來說，血液、尿液)特殊底物的鑒定及定量有助於 LSD 受累個體的確診。而且，特殊底物的定量也有助於所涉及疾病特殊類型的識別。所儲存底物的水平與疾病的嚴重程度相一致，而對水平的監測有助於疾病臨床、臨床前狀態的判斷以及(如動物和人)治療後療效和預後的判斷。

在 MPS 疾病組中，溶酶體內主要儲存的物質包括 GAG，尤其是 HS、DS、硫酸角質素、硫酸軟骨素。因內切糖苷酶可以清除 GAG，發明者認定較小的寡糖片斷可以用作 MPS 疾病系列診斷的生物標記。因此，發明者已經鑒定出了從 MPS “高危” 個體中所採集的生物標本內水平升高的特殊寡糖(尤其是寡糖硫酸鹽)，該寡糖是 MPS 的觀察指標或多個硫酸酯酶缺陷的指標。感興趣的寡糖通常包括 1 到 12 個葡萄糖殘基(也就是說範圍從單糖到十二糖)。儘管缺乏理論依據，但這些寡糖來自於罹患這些疾病患者體內所儲存和積聚的 GAG 降解產物是無疑的。

相應地，測定動物標本內某種寡糖的數量(舉例來說，單糖至十二糖硫酸鹽)，可以為 MPS 和多重硫酸酯酶缺陷性疾病的普查及監控提供有效方法。儘管缺乏理論依據，寡糖含量的升高是該病存在的標誌，寡糖的形成是由於一種和多種 GAG 降解清除的結果。寡糖可能來自以下一種或多種 GAG：HS、DS；硫酸角質素；硫酸軟骨素，任何方法，只要能特異性地鑒定寡糖(例如，串聯質譜、質譜、液相色

層分析及/或免疫分析法)，即可用於 MPS 或“高危人群”多重硫酸酯酶缺陷的鑒別診斷。

本發明的目的在於生物標本內水平升高了的寡醣可以用作新生兒 MPS 的普查標記，或用作 MPS 患者治療過程中病情監控的指標。該目的可以用於已經或尚未獲得診斷的 MPS 患者(也就是說臨床前期或臨床狀態)。被觀察物件的臨床狀態可以通過這些方法進行評價，以明確治療措施的有效性(舉例來說，酶替代療法、基因療法、及/或日常飲食療法)。除此之外，可以通過以下一個或多個舉例來更好地理解本發明，這些舉例是本發明某些實施例的代表，但並非試圖限制本發明的涵義。

實施例 1

樣本製備：從生物樣本內分離寡醣：本發明的一個實施例包括，對從目標動物或參考動物體內所獲得的生物標本內寡醣含量的測定。生物標本可能包括尿、血液、細胞、或任何含有感興趣寡醣的生物標本。因為尿液標本的採集是一種方便、非侵入性方法，因此，以下某些舉例中把尿液作為生物標本。但是，利用尿液標本作為生物標本的目的並非為了排除利用其他生物標本進行寡醣測定。而且，熟悉該項技術者將發現，以下舉例中所使用的某些試劑可因處理生物標本的類型不同而有所變化，但並不偏離本發明的範圍及主旨。

在下述給出的舉例中，在患者同意的情況下獲得其尿

液標本並按照下述方法處理：清除碎片，收集 500 毫升尿液，2000 x g 離心澄清 10 分鐘。然後將澄清後的尿液流經 50ml 的 DEAE-Sephacel 分離柱，該柱使用前預先使用 pH 5.0 0.1M NaCOOCH₃ 在重力作用下預平衡。然後使用 10 倍柱體積的平衡緩衝液沖洗 DEAE-Sephacel 柱。利用含有 1.2 M NaCl 的 0.1 M NaCOOCH₃ (pH 5.0) 溶液沖提尿 GAG。DEAE-Sephacel 柱的沖提餾分用於糖醛酸分析。餾分內包含的糖醛酸的量濃縮、凍幹，並重新融解在 4 毫升水內。然後將濃縮後的 GAG's 在 Bio-Gel P2 柱(1.5 釐米內徑 x 170 釐米長)上進一步分餾，該柱預先使用 0.5 M NH₄COOH 預平衡。採集 55 份 4 毫升的 Bio-Gel P2 柱餾分，並進行第二次糖醛酸分析。圖 1 顯示的是從 MPS 患者(實心菱形)及對照(灰色線段)尿液標本內沖提的寡糖曲線。

如前所述，餾分 31 至 54 用於隨後質譜分析。但是，熟悉該項技術者將發現，以下舉例中所使用的某些試劑可因處理生物標本的類型不同而有所變化，但並不偏離本發明的範圍及主旨。

GlcNAc6S(*d*3)的製備：利用葡萄糖胺-6-硫酸酶 (GlcN6S)的選擇性乙醯化作用製備含重氫的內部標準 GlcNAc6S(*d*3)。利用超聲降解法，將單糖 GlcN6S (25 毫克)溶解于無水吡啶(700 微升)、二甲替甲醯胺(700 微升)以及甲醇(50 微升)溶液內。將溶液在冰上攪動並在 30 分鐘時加入無水乙酸(*d*₆) (2 x 20 微升)。1 小時後，加入 4% 的氨水(500 微升)終止反應，然後將其放置在氮氣內移走溶劑。

該步驟需要重復。將剩餘的殘留物溶解在水(500 微升)內，並載入到離子交換柱(AG1-X8，H⁺型，100-200 目，5 毫升液體床)，並用去離子水洗滌(4 倍於柱體積)。使用 LiCl (2.5 M)沖提單糖，餾分使用二辛可寧酸分析微孔板放置(BCA™，Pierce 化學試劑公司，羅克福德，伊利諾斯州)。將包含 GlcNAc6S(*d3*)的餾分濃縮，並使用 P2 精細顆粒排阻柱(50 x 1 釐米)進行脫鹽。將除鹽後的餾分濃縮凍幹製備 5.5 毫克的白色固體(18.7%的獲取率)。通過於不含重氫的 GlcNAc6S 比較，在質譜分析儀內測定 GlcNAc6S(*d3*)的純度。中性丟失(NL374) ESI/MSMS 實驗顯示，GlcNAc6S(*d3*)化合物的純度為 83.95 %(w/w)。但是，熟悉該項技術者將發現，許多用於製備含重氫內部標準 GlcNAc6S(*d3*)的試劑可以使用，而並不偏離本發明的範圍和宗旨。

寡糖的衍生：純化後的寡糖標本、細胞裂解液、以及尿液(0.5-1.0 μmol 等價肌酐)在衍生前首先凍幹，全血標本乾燥在濾紙(S&S 903，Schleicher & Schuell，Dassel，德國)上，打孔 3 mm 並直接進行衍生反應。每個標本添加 50-100 μL 的衍生溶液(250 mmol/L 的 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(“PMP”)，400 mmol/L NH_3 ，pH 9.1，包含 1 nmol 的硫化單糖及 1 nmol 的 GlcNAc6S(*d3*))，使用旋渦振蕩器劇烈震蕩該溶液，隨後在微波爐內 70°C 加熱 90 分鐘。隨後將標本使用 2 倍摩爾的甲酸(50 μL ，800 mmol/L)進行酸化，並加水至 500 μL 。每個標本使用 500 μL 的 CHCl_3 以清除過量的 PMP 並離心(13,000xg，5 分鐘)。固相提取

柱(25 毫克, C18)使用 1 毫升的 100% CH₃CN、50% CH₃CN/0.025%FA 以及水連續初始化。每個 CHCl₃ 提取標本(400 μL)的水溶液,均使用初始化的 C18 柱處理,並使其徹底進入固相。將該柱用水沖洗(1 X 500 μL,隨後 2 X 1000 μL)並在 Supelco, Visiprep24 真空多重乾燥設備內乾燥(15 分鐘)(Sigma-Aldrich, St Louis, 美國),如果置於 96 孔板內或在凍幹設備內乾燥(45 分鐘)。然後將乾燥的 C18 柱使用 CHCl₃ (2 X 1000 μL)清洗,以清除任何未結合的 PMP,然後再次充分徹底乾燥。使用 50% CH₃CN/ 0.025% 甲酸水溶液(3 X 200 μL)將衍生寡糖從 C18 柱上沖提,然後在氮氣流內乾燥。然後將每個標本重新使用 500 μL of 50% CH₃CN / 0.025% 甲酸水溶液稀釋,用於注射到質譜監測儀內。

質譜檢測:寡糖的分析在 PE Sciex API 3000 三極杆 ESI-MS/MS 質譜分析儀內進行,該質譜分析儀具有離子源及 Analyst 1.1 資料分析系統(PE Sciex)。既可以使用 Harvard 儀器泵以 10 μl/min 的速度將標本直接混合,液可以使用 Gilson 233 自動上樣器以 50 μl/min 將標本溶解於 50% (v/v)乙腈/0.025% (v/v)甲酸水溶液內混合注射。寡糖的鑒定是基於其在 Q1 掃描器內質/荷比(m/z)進行的,然後以負離子模式進行負離子特徵掃描。在負離子模式下使用多重反應監控設備(MRM)進行寡糖定量。每個 MRM 對在分辨設備內監測 100 毫秒。每次測量 100 次掃描,平均及相對濃度比根據 PMP-寡糖與內部標準對照的相對峰高比計

算。

HPLC 定量。儘管質譜是本發明內寡醣定量的首選方法，本發明的另外方面涉及到利用 HPLC 對 GAGs 衍生寡醣進行定量。例如，如前所述，已經衍生來自尿液標本內的寡醣，液可以使用離子對反相 HPLC 進行分離。可將衍生寡醣溶解在具有合適離子對試劑(1 mM 三乙胺)的水溶液內，並注射到 C18 反向色層分析柱內。可以使用包含離子對試劑(1 mM 三乙胺)乙腈/水溶液將硫化寡醣從分離柱內沖提，在 260 nm 吸光值下對其進行定量。但是，熟悉該項技術者將會發現，許多 HPLC 試劑及方法可以變更，以對本發明的寡醣進行測量而並不偏離本發明的範圍及宗旨。

免疫定量分析。另外一種對特殊寡醣進行檢測及定量的方法是使用單克隆抗體免疫定量分析的方法。例如，可以將寡醣偶聯到蛋白載體上，用以包被微孔滴定板的內部。單克隆抗體直接與寡醣反應，而寡醣可以使用合適的報告分子標記，並添加到微孔板內。而且，可將包含感興趣寡醣的標本添加到微孔板內，這將導致部分抑制單克隆抗體與固化在微孔板表面上寡醣的結合。已知寡醣數量的計算曲線然後可用以計算未知標本內寡醣的水平。熟悉該項技術者將會發現，許多免疫試劑及方法可以變更，以對本發明的寡醣進行測量而並不偏離本發明的範圍及宗旨。

實施例 2

寡醣的定性：從 MPS I 及 MPS II 患者尿內分離的寡

醣根據其片斷分佈模式而使用串聯質譜分析(MS/MS)。儘管在本舉例內使用了質譜，應該明確的是其他定量的方法，包括色層分析法、免疫吸附法、液相色層分析-質譜、離子交換及顆粒排阻色層分析，也可以用作生物標本內寡醣的定量檢測。

產品離子掃描顯示，從母離子產生的產品離子，提供有關其結構的資訊並為MRM提供合適的離子對。圖2顯示的是在MPS I患者尿內所發現寡醣質譜圖。母離子質荷比(“ m/z ”)為806.2，代表一個 $[M-H]^{-1}$ 從MPS I患者尿內分離的硫化雙糖，顯示一個子離子排列，包括 m/z 256及295的子離子用於MRM對。

酶解清除。而且，特殊寡醣內葡萄糖殘基的性質，可以利用MPS患者所特異性缺乏酶的重組酶，對該患者特異性寡醣進行進一步酶解定性。利用5ng rhIDUA(50 mM NH_4 pH 4.0的醋酸鹽緩衝液)消化衍生寡醣(100 μl)，37°C消化24小時。將1/10的該消化產物進行質譜分析，而將其餘的產物使用另外5ng重組N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶(50 mM 醋酸銨緩衝液 pH 5.6)，或利用5ng N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸酯酶(50 mM 甲酸銨緩衝液，pH 5.0)，37°C消化24小時。這些消化產物也進行質譜分析。

利用ESI-MSMS對來自於Bio-Gel P2分離柱的#31到#41餾分內寡醣結構進行定性，以期闡述其部分結構，並為MRM監測系統識別合適的產品離子，圖3。圖3顯示的是MPS I患者尿內的寡醣，其中包括從MPS I患者尿內純

化的 5-、4-、3-、以及雙糖，以及根據顆粒大小從 Bio-Gel P2 柱餾分內所鑒定的寡糖。利用 MS/MS 對每個寡糖分子進一步定性，產品離子用於多重反應檢測系統(“MRM”)進行鑒定。片斷模式用於闡述其結構組成。在 MPS 患者尿分離餾分內所鑒定的寡糖，在對照尿液標本內質譜分析均沒有相應的發現。對照尿液標本內總 UA 含量低於 MPS I 患者尿內 UA 含量的 1/10。利用 rhIDUA 處理餾分 #32、#35、#37、#39 以及 #40，以明確 IdoA 是否存在非還原末端。在每個丟失 193 amu 的離子內，均可證實該末端殘基為 IdoA。利用 rhIDUA 消化後，將餾分 #35 及 #39 隨後使用重組 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶及 N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸酯酶處理。丟失 80 amu(推測可能為 SO_3)的離子使用重組 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶而不使用 N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸酯酶處理，以鑒定緊鄰 IdoA 的殘基為 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯。圖 4 內顯示的是四糖在酶消化後的質譜圖。圖 4 顯示，4 糖(m/z 632)在重組酶消化後的質譜圖。圖 4A 顯示的 m/z 為 632.6 的四糖。圖 4B 顯示的是在重組 α -L-艾杜糖醛酸苷酶消化後的同一寡糖分子。 m/z 544.5 對用於丟失的糖醛酸(176 amu)。圖 4C 顯示的是使用 α -L-艾杜糖醛酸苷酶消化後的寡糖，然後使用 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶消化後的質譜圖。 m/z 504.4 對應的可能是硫酸根的丟失(80 amu)。

在該質譜圖上另外一個例子顯示，從 MPS I 患者尿內所分離的三糖及四糖非還原末端的特徵，如圖 5 所示。來

自 Bio-Gel P2 柱的餾分富含三糖及四糖，易於使用重組 α -L-艾杜糖醛酸苷酶消化。圖 5A 圖譜顯示的在缺乏 α -L-艾杜糖醛酸苷酶的情況下， m/z 632.6 的四糖 $[M-H]^{2-}$ 、 m/z 982.4 的三糖 $[M-H]^-$ 及 m/z 490.9 的三糖 $[M-2H]^{2-}$ 。圖 5B 顯示的是使用 α -L-艾杜糖醛酸苷酶消化後每個離子的質/荷比為 632.6、982.4 以及 490.9，清除艾杜糖醛酸後，分別產生質/荷比為 544.4、806.4 以及 402.8 的信號。

圖 6 顯示的是從 MPS II 患者尿內純化的寡糖 Q1 質譜圖。在上述描述的 DEAE Sephacel 離子交換柱及 BioGel P4 顆粒排阻色層分析柱上純化該寡糖。圖 6A 顯示的是，糖成分 (UA_2 ，胺基己糖 (“HN”)) 信號為 m/z 509 三糖部分 Q1 質譜圖，該信號對應於所包含的 $[M-2H]^{2-}$ 2S 成分，而 m/z 1020 信號對應於 $[M-H]^-$ 成分。圖 6B 顯示的是具有 (UA_2 ，HNAc，HN) 組成的四糖成分色層分析圖。質荷比為 434 和 460 的信號分別對應於包含 $[M-3H]^{3-}$ 3S 和 4S 的成分。質荷比為 651 及 691 是對應 $[M-2H]^{2-}$ 成分所產生的信號。

圖 7 顯示的是從 MPS II 患者尿內所純化的寡糖 Q1 質譜圖。在上述描述的 DEAE Sephacel 離子交換柱及 BioGel P4 顆粒排阻色層分析柱上純化該寡糖。圖 7A 顯示的是具有 (UA_3 ，HNAc，HN) 成分的五糖片斷 Q1 色層分析圖，質荷比為 492 及 514 的信號分別對應於包含 $[M-3H]^{3-}$ 3S 及 4S 標本，而質荷比為 739 和 779 則對應於 $[M-2H]^{2-}$ 標本。圖 7B 顯示的是具有 (UA_3 ，HNAc₃) 成分的己糖片斷質譜圖，質荷比為 450、470 以及 490 分別對應於包含 $[M-4H]^{4-}$ 4S、

5S 以及 6S 的標本。圖 7C 顯示的是具有(UA₄, HNAc, HN₂)成分的七糖片斷質譜圖，質荷比為 473、493 以及 513 分別對應於包含[M-4H]⁴⁻ 4S、5S 以及 6S 標本。圖 7D 顯示的是含有(UA₄, HNAc₄)成分的己糖片斷質譜圖，質荷比為 451、468 以及 484 的信號分別對應於包含[M-5H]⁵⁻ 5S、6S 以及 7S 的標本。質荷比為 565 和 585 的信號對應於包含[M-4H]⁴⁻ 5S 及 6S 的標本。

實施例 3

寡糖的質譜鑒定：在一個實施例中，使用電噴霧串聯質譜(“ESI/MSMS”)對寡糖標記進行鑒定，其特徵在於酶解與 ESI/MSMS 的聯合應用。例如，使用 ESI/MSMS 測定寡糖標記，可以實現對 MPS 受累患者的體液或組織標本，諸如尿液、血漿、全血、或皮膚成纖維細胞標本中的標記進行鑒定。圖 8 顯示的是 MPS 患者寡糖鑒定分析結果。寡糖成分從 MPS 患者尿內純化並利用串聯質譜分析。對電壓進行優化並識別 MRM 離子對，以能夠對生物標本內的寡糖成分進行快速地鑒定與分析。

對來自對照、MPS 患者以及多重硫酸酯酶缺陷患者的尿液標本進行分析。來自對照者的尿液標本(0.5-1.0 μmol 肌酐等價物)(n=26)和 MPS 患者以及 MS 受累個體(70)按照上述衍生方法處理，然後在質譜分析儀上鑒定，27 個單糖至寡糖既往已經鑒定明確，圖 8 顯示的是 MPS 患者尿液標本處理後質譜圖特徵。PMP-衍生寡糖使用 MRM 模式定量

分析。離子對監測結果顯示在圖 8 內。使用 1.0 amu 半峰高解析度設置，對每個離子對監測 100 毫秒。對於每次定量監測，在注射期間及平均時間內持續掃描。通過 PMP-寡醣相對峰高與用於單糖或 PMP-硫化多糖(所有其他寡醣)的 PMP-GlcNAc6S- d_3 內部標準的相對峰高比，實現對寡醣的定量分析。用於對所選擇多糖進行 MRM 分析的 Q1/Q3 質荷比值的均數及標準差列舉在圖 8 內。圖 9 顯示的是，與 26 個對照標本比較每個 MPS 亞組內用於進行所選擇寡醣分析的 Mann Whitney U 值。MPS 患者的數量列舉在 MPS 類型下。對於每種亞型的 MPS 可見所提供的與對照人群進行鑒別的分析表。

基於 Mann Whitney U 值，9 個所選擇的分析結果可以將 MPS 患者及多重硫酸酯酶缺陷的患者最好地從對照人群內鑒別開。圖 10 顯示的是對照個體內寡醣衍生 GAG 相對水平的箱形圖。來自對照患者的尿液標本(26)如前述方法進行 GAG 寡醣衍生及分析，結果進行標準化處理，為每次分析的一個任意值指定一個均值。該箱形圖顯示的是每個對照組(中心線)每次分析的平均水平，第 25 及 75 次的百分數(箱形圖)以及上限和下限(上下線條)。圓形及星形分別代表的是較大值和最大值。如果某個動物的目標數量顯示疾病進展，或對某項特殊治療沒有反應，則表示需要更為積極的治療措施。例如，必要時可以增加劑量或療程，另一方面，如果目標數量顯示的是 MPS 已經緩解，或對特殊的治療有反應，則可使用同樣較為緩和的治療方案。例如，

較溫和的治療方案，降低劑量或縮短給藥時間。

圖 11 顯示的是每個 MPS 組所對應的分析值箱形圖。每個 MPS 組特徵性的圖形模式使得該組可以與對照組及其他 MPS 組得以鑒別。按照前述的方法對來自 MPS 受累患者的尿液標本進行寡糖 GAG 衍生分析，並根據對照人群數值進行結果的標準化處理，為每次分析的任意一個數值指定一個均值。箱形圖顯示的是 MPS I、II、IIIA、IIIB、IIIC、IIID、IVA、VI 以及多重硫酸酯酶缺陷的患者所進行選擇性分析結果(圖 11，分別為 A-H 方格)。該箱形圖顯示的是每個對照組(中心線)每次分析的平均水平，第 25 及 75 次的百分數(箱形圖)以及上限和下限(上下線條)。圓形及星形分別代表的是較大值和最大值。

儘管缺乏理論依據，但是每種 MPS 類型中與其缺陷酶特別相關的寡糖，是該疾病的主要異常儲存異常所在。本發明所鑒定的寡糖，當其水平升高時，即可作為某種特殊類型 MPS 疾病(如 MPS-I、MPS-II 等)的一個指標。基於這些研究，每種疾病所預測的儲存物質清單如下。在本清單內所使用的縮寫為，IdoA = 艾杜糖醛酸；GlcA = 葡萄糖醛酸；GalNAc = N-乙醯半乳糖胺；GlcNAc = N-乙醯葡萄糖胺；GlcN = 葡萄糖胺；UA = 糖醛酸；S = 硫酸鹽；Gal = 半乳糖。

MPS I

硫酸皮膚素片斷：

IdoA-(GalNAc-(UA-GalNAc)_n)(S)_m, n=0-5, m=0-11;

IdoA-(GalNAc-UA)_n(S)_m, n=1-6, m=0-12;

硫酸乙醯肝素片斷：

IdoA-(GlcNAc/GlcN-(UA-GlcNAc/GlcN)_n)(S)_m, n=0-5, m=0-17;

IdoA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n(S)_m, n=1-6, m=0-18.

MPS II

硫酸皮膚素片斷：

IdoA2S-(GalNAc-(UA-GalNAc)_n)(S)_m, n=0-5, m=0-11;

IdoA2S-(GalNAc-UA)_n(S)_m, n=1-6, m=0-12.

硫酸乙醯肝素片斷：

IdoA2S-(GlcNAc/GlcN-(UA-GlcNAc/GlcN)_n)(S)_m, n=0-5, m=0-17;

IdoA2S-(GlcNAc/GlcN-UA)_n(S)_m, n=1-6, m=0-18.

MPS IIIA

硫酸乙醯肝素片斷：

GlcNS-(UA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n)(S)_m, n=0-5, m=0-16;

GlcNS-(UA-GlcNAc/GlcN)_n(S)_m, n=1-6, m=0-18.

MPS IIIB

硫酸乙醯肝素片斷：

GlcNAc-(UA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n)(S)_m, n=0-5, m=0-16;

$\text{GlcNAc}-(\text{UA-GlcNAc/GlcN})_n(\text{S})_m$, $n=1-6$, $m=0-18$.

MPS IIIC

硫酸乙醯肝素片斷：

$\text{GlcN}-(\text{UA}-(\text{GlcNAc/GlcN-UA})_n)(\text{S})_m$, $n=0-5$, $m=0-16$;

$\text{GlcN}-(\text{UA-GlcNAc/GlcN})_n(\text{S})_m$, $n=1-6$, $m=0-18$.

MPS IIID

硫酸乙醯肝素片斷

$\text{GlcNAc6S/GlcN6S}-(\text{UA}-(\text{GlcNAc/GlcN-UA})_n)(\text{S})_m$, $n=0-5$,

$m=0-16$

$\text{GlcNAc6S/GlcN6S}-(\text{UA-GlcNAc/GlcN})_n(\text{S})_m$, $n=0-6$,

$m=0-18$

MPS IVA

硫酸角質素片斷：

$\text{Gal6S}-(\text{GlcNAc}-(\text{Gal-GlcNAc})_n)(\text{S})_m$, $n=0-5$, $m=0-11$;

$\text{Gal6S}-(\text{GlcNAc-Gal})_n(\text{S})_m$, $n=0-6$, $m=0-12$.

硫酸軟骨素片斷：

$\text{GalNAc6S}-(\text{UA}-(\text{GalNAc-UA})_n)(\text{S})_m$, $n=0-5$, $m=0-11$;

$\text{GalNAc6S}-(\text{UA-GalNAc})_n(\text{S})_m$, $n=0-6$, $m=0-12$.

MPS IVB

硫酸角質素片斷：

Gal-(GlcNAc-(Gal-GlcNAc)_n)(S)_m , n=0-5 , m=0-11 ;

Gal-(GlcNAc-Gal)_n(S)_m , n=1-6 , m=0-12.

MPS VI

硫酸皮膚素片斷：

GalNAc4S-(UA-(GalNAc-UA)_n)(S)_m , n=0-5 , m=0-12 ,

GalNAc4S-(UA-GalNAc)_n(S)_m , n=0-6 , m=0-13.

MPS VII

硫酸皮膚素片斷 s：

GlcA-GalNAc-(UA-GalNAc)_n(S)_m , n=0-5 , m=0-11 ;

GlcA-(GalNAc-UA)_n(S)_m , n=0-6 , m=0-12.

硫酸乙醯肝素片斷：

GlcA-(GlcNAcS/GlcNS-(UA-GlcNAc/GlcN)_n)(S)_m , n=0-5 ,
m=0-17 ;

GlcA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n(S)_m , n=0-6 , m=0-18.

本清單所包括的寡醣聚合化程度為 12 或 13 個葡萄糖殘基，熟知該項技術者將發現，這是一個從單糖到分子量超過 5000 Da 的一系列寡醣分子。另外，熟知該項技術者還將發現，其他非特異性寡醣(非特異性儲存)可因原始儲存的物質導致溶酶體儲存功能抑制而升高。清單中的舉例並非試圖限制該發明的範圍及主旨。

實施例 4

MPS 的診斷： 作為將寡糖從生物標本中區別開的功能舉例，對 8 例對照及 14 例 MPS I 患者尿液標本中的 6 種寡糖(舉例來說，HNAc(S)、UA-HN-UA(S)、UA-HN-UA(2S)、UA-HNAcS、UAHNAc-UA(S)、以及UA-HNAc-UA-HNAc(2S))的相對水平進行了測定。對 6 種寡糖中的 5 種進行了檢測，這些寡糖水平在對照人群及 MPS I 患者之間無重疊。對照及 MPS I 患者尿內寡糖相對濃度顯示在圖 12 中，如上所述，利用其與內部標準(GlcNAc6S(d3))的對照對其相對數量進行了計算。對具有 1 μmol 肌酐等價物的對照及 MPS I 患者尿液標本進行了衍生並在質譜儀上進行了分析。圖 12 中的每條曲線代表一種不同的寡糖，N 代表每組中的樣本數量(也就是說對照組及 MPS I 組)。水平中心線顯示的是每組的均值，白色箱形圖區顯示的是第 25 到第 75 百分位數。頂部及底部誤差線顯示的範圍，符號(“o”)代表的統計學限值。

實施例 5

MPS I 型的確定： 來自 2 例對照及 3 例 MPS I 患者的皮膚成纖維細胞在含有 10% 小牛血清的基礎混合培養基(BME)內培養 6 天。然後收穫細胞並製備細胞提取物，隨後進行質譜分析以對 MPS I 患者尿內的寡糖進行鑒定(圖 13)。從對照標本及 MPS I 患者細胞株標本內所觀察到的寡糖相對水平具有顯著性差異。舉例來說，來自一個對照患者細胞株 SF5344 每個細胞蛋白內 UA-HN-UA(2S)的含量為

0.034，而來自一例 MPS I 患者的細胞株 SF 2662 的 UA-HN-UA(2S)相對水平較上值高 3 倍(即 0.090)。2 例嚴重患者的差異更在 4 倍以上，1 例中度患者與對照的差異也顯著，顯示寡糖水平與患者病情延展性之間的相關性。

實施例 6

MPS II 型的測定。 MPS I 型患者尿內的寡糖水平與基因型也具有有良好的相關性。對於每個尿液標本，0.5 μmol 的肌酐等價物利用 PMP 衍生並使用質譜分析，對所選擇寡糖的測定結果給出在圖 8 內。採集的尿液標本為 MPS I 個體 ($n=7$) 及年齡匹配的對照標本 ($n=26$)。尿液標本利用質譜儀對所選定的寡糖進行分析。這些從 MPS I 患者採集的尿液標本具有一個臨床表型範圍，其基因型及臨床意義已有文獻記錄。如圖 14 所示，每個 MPS I 患者所選擇寡糖的 MRM 離子對水平平均高於對照標本的均值。

分子遺傳學分析對於疾病的嚴重性往往不能給出有意義資訊，但是瞭解疾病的嚴重性對於 MPS 型患者的治療卻具有至關重要的意義。如圖 14 所示，大多數寡糖水平與基因突變的嚴重性之間存在良好的相關性。例如，R89Q 等位基因較 W402X 等位基因突變較為溫和，而後者被認為是嚴重的突變狀態 (Scott *et al.*, 1993)。因此，具有 W402X 等位基因的患者其寡糖水平往往高於 R89Q 等位基因患者的寡糖水平，如圖 14 所示。適當內部標準的合成將使溶酶體內儲存的寡糖產物的可以進行精確地定量，因此可以用

作 LSD 疾病表型的有效預測。儘管缺乏理論基礎，利用其他生物資源標本，諸如血液、組織標本、或培養的細胞的同樣檢測方法將獲得同樣的相關性。

實施例 7

MPS I 療效監控： 作為如何利用寡糖水平對療效進行監控的例子，對接受治療的 MPS I 患者與對照者的寡糖水平進行比較。圖 15 顯示的是 MPS I 患者接受骨髓移植 (“BMT”) 前後寡糖的相對水平。在接受骨髓移植前採集 MPS I 患者的尿液標本，在接受骨髓移植後的第 3 天和第 8 天再次採集尿液標本。對每個尿液標本進行 MPS I 患者中所存在的 6 種寡糖 (即 UA-HN-UA(2S)、HNAc(S)、UA-HN-UA(S)、UA-HNAc(S)、UA-HNAc-UA(S)、以及 UA-HNAc-UA-HNAc(2S)) 進行分析。在所有這些寡糖中，可以觀察到相對濃度的持續降低。例如，骨髓移植前尿內 UA-HNAc(S) 的相對濃度為 13.93，而在骨髓移植後的第 3 天和第 8 天的相對濃度分別為 8.39 和 2.12。而且，在第 8 天對照標本內 UA-HNAc(S) 的相對濃度為 0.04。

實施例 8

療法 II 的監控。 尿液標本採集自 MPS IVA 及 MPS VI 患者在接受骨髓移植前後的某個關鍵時間點。對每個標本進行所選擇寡糖衍生及分析。結果(圖 16 及圖 17)顯示的是這些患者在接受骨髓移植治療長時間後所儲存寡糖的降

低。圖 16 所顯示的是 MPS IVA 受累患者接受骨髓移植前後尿內寡醣衍生 GAG 相對水平的變化。來自 1 例 MPS IVA 受累患者尿液標本的採集是在治療前(實線)、以及骨髓移植後 0.5、1.6 以及 11.6 年(條文線條、虛線以及透明線條)。對每個標本按照前述的方法進行寡醣衍生 GAG 分析，結果根據對照人群進行標準和化處理，其中計算每個分析的均值。

圖 17 顯示的是 MPS VI 受累個體接受骨髓移植前後尿內寡醣衍生 GAG 相對水平的變化。來自 MPS VI 受累個體的尿液標本在接受骨髓移植前(實線)以及接受移植後的 1.1、4.0 以及 4.9 年(條文線條、虛線以及透明線條)採集。對每個標本按照前述的方法進行寡醣衍生 GAG 分析，結果根據對照人群進行標準和化處理，其中計算每個分析的均值。

實施例 9

療法 III 的監控：有許多 LSD 動物模型。例如 MPS I 犬模型、MPS I 貓模型、MPS VI 貓模型、以及 MPS VII 小鼠模型。貓 MPS VI 異常已經被用作 MPS 疾病監測的有效模型，無論對有關疾病的發病機制還是治療結果的觀察都提供了價值無法估量的資訊。至於本例，利用 MPS IV 型貓模型闡述在該型疾病治療過程中，如何利用 MS/MS 質譜進行檢測硫化單糖及硫化雙糖，以便進行療效觀察。給予 MPS IV 型貓給予出生後第 1 個月高劑量(20 毫克/kg)的重

組貓 4-硫酸酯酶 (“rf4S”) 替換療法，隨後給予低劑量的 rf4S(1 毫克/kg) 治療 2 個月，並與接受低劑量(1 毫克/kg) 維持替換治療 3 個月的動物進行比較。

MPS IV 貓尿液和血液標本內硫化單糖 N-乙醯胺基己糖 (“HexNAc”) 及硫化雙糖 N-乙醯胺基己糖-糖醛酸 (“HexNAc-UA”) 升高。這些標記清晰地顯示了在治療後的最初第 4 周內治療組之間的差異，與未治療組相比，治療組 MPS VI 貓上述標記僅僅有輕度降低，而高劑量組上述標記的量接近正常值。但是，在高劑量治療停止的 2 個月內，在未治療組於未受累組之間寡糖水平差異很小。在試驗結束時，疾患者病的整體主觀症狀有輕微改善，在最初高劑量酶替代療法動物中組織溶酶體清空能力也有改善。初始高劑量酶替代治療可以降低動物溶酶體的儲存功能，但持續的低劑量治療動物並無臨床獲益。儘管缺乏理論依據，如果動物寡糖目標數量顯示 MPS 在進展中，或對特異性治療無反應，則需要更為積極的治療。例如，需要增加劑量和療程。另一方面，如果動物的寡糖目標數量顯示 MPS 已經緩解，或對特異性治療有反應，則可能需要同樣或較為緩和的治療方案。例如，較緩和的治療方案，減少劑量縮短治療時間等。

利用 1, 9-二甲基亞甲藍 (“DMB”) 分析法監測尿 GAG。低劑量和高劑量 ERT 治療貓尿總 GAGA 採用 MDB 分析法測定，並在未治療 MPS VI 動物與對照動物之間給出一個有用的中間值(圖 18)。高劑量治療貓 GAG 水平在大

約 25 天齡接近正常，與低劑量治療貓相比，在最初的 28 天內療效與持續高劑量的 rf4S 劑量一致。在大約第 55 天和 90 天，高劑量組和低劑量組動物尿內 GAG 水平相似。圖 18 顯示的是從正常動物(x)、MPS VI 未治療動物(□)、MPS VI 低劑量治療動物(O)、MPS VI 高劑量治療動物在所顯示的時間內寡糖水平。使用 DMB 染料分析法測定尿總 GAG 水平，並將其標準化為肌酐。

使用 ESI-MS/MS 分析法監測尿 GAG 衍生寡糖。對正常對照、MPS VI 受累貓、以及酶治療 MPS VI 貓，既往研究顯示兩個與人類 MPS VI 疾病狀態相關的寡糖(Ramsay 等，Mol Genet Metab 2003；78(3)：193-204)，其尿內水平進行了監測。在未經治療 MPS VI 貓尿單糖 HexNAcS 水平顯著增加。在 15—25 天齡貓該單糖水平是正常對照動物的 4—5 倍，在 90 天時是正常動物的 7 倍(圖 19)。低劑量治療組在最初 25 天硫化單糖的濃度與未經治療 MPS VI 貓相似。高劑量治療組寡糖水平與正常對照組非常接近。但是，在大約第 55 天齡(此時，兩組的劑量水平均在 1 毫克/kg)，兩個 ERT 劑量組硫化單糖水平彼此相似，水平接近正常與未經治療 MPS VI 貓中間值水平。圖 19 顯示的是從正常(x)、MPS VI 未治療動物(□)，MPS VI 低劑量治療動物(O)以及 MPS VI 高劑量治療動物(Δ)在所顯示時間點寡糖水平。HexNAcS 單糖濃度使用串聯質譜法測定，並標準化為肌酐。

可以觀察到硫化雙糖 exNAcS-UA 相似的排泌模式，在

15-25 天時為正常動物的 15 倍，而在第 90 天時大約為正常動物的 37 倍(圖 20)。與硫化雙糖所觀察到的結果相當，在高劑量組治療動物尿內硫化雙糖的最初含量與正常動物相似，而低劑量組尿內硫化雙糖的含量則與未經治療的 MPS VI 動物接近。在大約 55 天齡，兩個 ERT 劑量組動物尿內硫化雙糖的含量相似。圖 20 顯示的是從正常(x)、MPS I 未治療動物(□)，MPS VI 低劑量治療動物(O)以及 MPS VI 高劑量治療動物(Δ)在所顯示時間點雙糖濃度。

HexNAcS-UA 雙糖使用串聯質譜法測定，並標準化為肌酐。

26/173 MRM 離子對所代表的非硫化雙糖

HexNAc-UA，是一種非儲存性 GAG 衍生分析產物，獨立於 MPS VI 疾病臨床狀態，並能提供一個標準化為肌酐的替代檢測措施。當 HexNAcS-UA 硫化雙糖的數量作為 HexNAc-UA 比值曲線時，可以觀察到隨時間而變化的不同模式(圖 21)。圖 21 顯示的是從正常(x)、MPS VI 未治療動物(□)，MPS VI 低劑量治療動物(O)以及 MPS VI 高劑量治療動物(Δ)在所顯示時間點寡糖含量。HexNAcS-UA 及 HexNAc-UA 雙糖相對濃度使用串聯質譜法測定，並以比值表示。

HexNAcS-UA/HexNAc-UA 比值並不隨年齡的增加而降低，相反卻顯示輕度的增加。HexNAcS-UA/HexNAc-UA 比值在第 21 天時，是正常對照貓的 33 倍，而在 90 天時則是對照貓的 47 倍。早期可以觀察到不同 ERT 組動物之間的差異。高劑量組動物尿 HexNAcS-UA/HexNAc-UA 比值與

正常動物相似，而低劑量治療組動物與未經治療的 MPS VI 相似。與既往的研究結果相似，大約 55 天時尿 HexNAcS-UA/HexNAc-UA 比值在兩個治療組間相似。與既往的研究結果相似，尿內 HexNAcS-UA/HexNAc-UA 比值隨年齡的增加而增加。

血液 GAG 衍生寡糖的監測。未經治療 MPS VI 組動物 HexNAcS 濃度隨年齡的增加而增加，而對照組貓則維持於一個相對恒定的水平(圖 22)。高、低劑量組 ERT 貓血液 HexNAcS 水平顯示具有劑量相關性。與高劑量組相比，低劑量組顯示了較高的最初水平。然後在至 90 天時兩組維持一個恒定的平臺水平，介於大約未治療 MPS VI 組與對照組之間的中位水平。相似的迴圈分析物水平也見於正常、MPS VI 以及 MPS VI 未經治療動物(圖 22 與圖 19 比較)。但是，治療組間的差別不如在尿液標本所觀察到的結果顯著。儘管缺乏理論依據，但是同樣的方法也可以用於其他生物資源標本的分析，諸如血液、活檢組織活培養細胞，並將提供相似的相關性。圖 22 顯示的是從正常(□)，MPS VI 未經治療動物(■)，MPS VI 低劑量治療動物(●)以及 MPS VI 高劑量治療動物(▲)，所採集血液標本內單糖 HexNAcS 濃度。單糖 HexNAcS 濃度使用串聯質譜法測定。如年齡範圍所顯示，數值以均數±2 倍標準差表示。每個年齡段的資料點在 X 軸顯示。

實施例 10

儲存寡糖的酶消化/化學消化。酶消化法已經被用於 MPS 患者儲存寡糖純化後的定性監測。可供替換的方法為利用酶或化學消化的方法降解患者標本內所儲存的寡糖，因此，可提供有關 MPS 類型更進一步的資訊，並能改善對儲存物質進行定量分析的敏感性。

來自對照及 MPS I 患者的人類皮膚成纖維細胞在培養基內生長 1—8 周，然後超聲裂解並給予離心處理。然後在使用 α -L-艾杜糖醛酸苷酶消化之前將裂解液孵育 (100°C , 5 min) 以滅活任何溶酶體酶。然後使用 α -L-艾杜糖醛酸苷酶消化寡糖，MPS I 缺陷酶及所選擇的寡糖在酶處理前後使用 MSMS 測定。圖 23 顯示的是在使用 α -L-艾杜糖醛酸苷酶消化前後對照及 MPS I 患者細胞裂解液單糖及寡糖水平。對照及 MPS I 受累個體細胞裂解液使用 α -L-艾杜糖醛酸苷酶消化，並對消化前(透明線)後(實線)的相對寡糖水平進行測定。針對細胞蛋白質進行寡糖水平校正。圖 23A 顯示的是 MPS I 細胞株糖醛酸水平的顯著增加，如酶消化結果所示，對照細胞株並無增加。在 MPS I 細胞株 N-乙酰葡萄糖胺(圖 23B)僅僅有輕度增加，而對照細胞株未見增加。顯著增加的寡糖也見於 HNAcS、HNAc-UA、以及胺基己糖-N-硫化糖醛酸(HNS-UA)寡糖(圖 23 內分別為方格 C、D、E)。相對於這些具有 HNAc 非還原性末端的寡糖含量的增加，MPS I 患者細胞株 UA-HNAcS 濃度反而降低，但不見於對照細胞株(圖 23F)。圖 23A = UA，圖 23B = HNAc，圖 23C = HNAcS，圖 23D = HNAc-UA，圖

23E = HNS-UA，圖 23F= UA-HNAcS。這些結果顯示，儲存物質酶消化後的數值放大了來自這些物質的信號，因只有某些缺陷酶才能降解所儲存的物質，因此才能夠對 MPS 亞型進行定性。

儘管缺乏理論依據，但是其他 MPS 酶的缺陷也可以以相似的方式用於放大來自患者標本內所儲存寡糖的信號，並對 MPS 相似的亞型進行定性。同樣地，其他降解 GAG 的內切酶，諸如軟骨素酶、類肝素酶或透明質酸酶也可以用於消化來自單糖、雙糖、三糖、或四糖的較大分子的 GAG，並對該信號進行放大。該方法也可以用以從原始儲存物質內的較大的寡糖分子釋放雙糖、三糖、或四糖非還原末端，以對特殊 MPS 疾病進行定性。

除了內切酶，化學裂解的方法也可以用於降解較大的寡糖分子，既可以放大信號也可以產生雙糖、三糖、或四糖等具有 MPS 類型特異性的寡糖分子。例如利用硝酸降解 HS 可產生雙糖及其他具有還原末端的甘露糖糖酐寡糖。

實施例 11

MPS 患者寡糖 LC-MSMS 鑒定。利用 DEAE-Sephacree 色層分析柱 (NaCl 沖提至 0.1 到 2M) 離子交換色層分析，純化 MPS VI 患者尿液標本內的 GAG，隨後在 BioGel P10(200mM, pH 6.0 甲酸銨) 凝膠過濾。餾分內主要為所分離的己糖，並用於進行 LC-MSMS 序列測定。為了進行 LC-MSMS 分析，將 0.5 g 的糖醛酸等價己糖與 5 M O-(4-

硝基苄酯)-羥胺 HCl (pNO₂HA)，溶解於 200 mM 甲酸銨製備的 pH 4.2 緩衝液中 37°C 衍生孵育過夜。在進行 LC-MSMS 檢查前，材料凍幹並重新溶解在包含 0.5mM 三乙胺(TEA)的水溶液內。LC 在 Alltech C18(2mm x 150mm)柱上進行，並置於緩衝液 A(0.5mM TEA)和緩衝液 B (60%乙腈，0.5mM TEA)內。洗提液注入 API 3000 API-SCIEX 串聯質譜儀，流速為 0.2 毫升/分鐘。在衍生前利用 0.05μg 的重組 4-硫酸酯酶對 0.5μg UA 等價物進行酶消化，該酶溶解於 pH 4.2 甲酸銨溶液內。

在正常對照尿液標本內未觀察/檢測到該己糖。圖 24A 顯示的是質荷比為 514 的 [M-3H]³⁻峰代表己糖的質譜圖，主峰鑒定為

GalNAc4S-UA-GalNAc4S-UA-GalNAc4S-UA-pNo2HA，731 峰代表

GalNAc4S-UA-GalNAc-UA-GalNAc4S-UA-pNo2HA。圖 24B 顯示的是如圖 24A 所示，在利用重組 4-硫酸酯酶處理後的己糖。質荷比為 514 的峰消失，主峰質荷比為 487 和 731，對應於可見的 [M-3H]³⁻和 [M-2H]²⁻-二硫化己糖

(GalNAc-UA-GalNAc4S-UA-GalNAc4S-UA-pNo2HA)。

實施例 12

培養皮膚成纖維細胞 MPS I 表型校正。GAG 的分解代謝主要發生於兩處，首先，內酶將多聚糖分解為寡糖，然後外酶依次作用於這些寡糖的非還原性末端產生單糖及硫

酸鹽。在溶酶體儲存異常時，因外源性水解酶 α -L-艾杜糖醛酸苷酶缺陷所導致的稱之為 MPS I，已經證實兩種不同的 GAG 角質素及類肝素硫酸鹽片斷在溶酶體內積聚。寡糖，五糖、四糖、三糖以及雙糖衍生自兩種 GAG，利用離子交換色層分析與凝膠過濾相結合的方法，從 MPS I 患者尿液內分離。利用電噴霧離子解析串聯質譜對這些寡糖進行鑒定，根據其易感性利用 α -L-艾杜糖醛酸苷酶消化，顯示在其艾杜糖醛酸上具有非還原性末端。來自 MPS I 患者的培養皮膚成纖維細胞顯示同樣具有角質素及類肝素硫酸鹽積聚，源自患者尿內的雙糖及三糖，例外的是硫酸角質素源自四糖。通過在 MPS I 成纖維細胞的培養介質內添加重組 α -L-艾杜糖醛酸苷酶，可以降低那些未受累對照成纖維細胞內三糖及雙糖的水平，進而實現對 MPS I 表型的校正。而且，源自四糖的角質素水平最初增加，然後隨時間的延長而消退，提示存在一個中間代謝產物，不同於 α -L-艾杜糖醛酸苷酶的底物及其他寡糖，不能被有效地轉換。這些 GAG 寡糖被證實是 I 型黏多糖症臨床嚴重性判定及療效觀察的有用生物學標記。這些寡糖在 MPS I 患者尿液標本內升高的程度與其臨床嚴重性相關，並在接受骨髓移植後的患者體內水平降低。

實驗方案。所有的細胞培養實驗材料均來自生命技術/Gibco BRL 公司。重組人類 α -L-艾杜糖醛酸苷酶(rhIDUA)，人類 N-乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶以及山羊 N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸酯酶均從 CHO-K1 表達系統內製備。DEAE

Sephacel 購自 Pharmacia 公司，顆粒排阻 Bio-Gel P2 凝膠柱(精細)購自 Bio-Rad 公司。C18 包被的固相萃取柱購自國際吸附劑技術公司，PMP 購自 Tokyo Kasei Kogyo 公司。所有質譜儀使用的溶劑均為 HPLC 級，而其他所有使用試劑均為分析純級。送往本實驗室尿液診斷標本儲存於 -20°C 。

細胞培養。成纖維細胞培養自送往本院用於診斷的皮膚活檢標本。正常對照及 MPS I(中、重度)患者的皮膚成纖維細胞，使用含有 10% (v/v) 胎牛血清(FCS)的 BME 培養基在 75 釐米² 培養板在 37°C 潮濕的環境內含有 5% CO_2 培養箱內培養。培養後細胞胰蛋白酶消化離心(2000 g)收集。生理鹽水磷酸鹽緩衝液洗滌兩次後，重新將細胞懸浮在 20 mM TrisHCl, 0.5 M NaCl (pH 7) 中，超聲波裂解 15 秒。細胞總蛋白採用 Lowry 法測定。RhIDUA 添加到 MPS I 劑對照成纖維細胞中(混懸培養後 6 周)，在培養介質內添加 7 μg 的重組酶/板。每天更換培養基(+rhIDUA)共 5 天。MPS I 成纖維細胞每天採集，而對照成纖維細胞在第一天及第 5 天採集。

寡糖的儲存。許多 MPS I 及對照成纖維細胞混懸培養液在培養後的不同時間點進行細胞採集。使用內部標準(ISTD)製備細胞提取物衍生用於質譜分析，然後分析選擇 MRM 離子對。培養時間(混懸培養老化狀態後)對低分子量寡糖的影響顯示在圖 25 內。圖 25 顯示的是皮膚成纖維細胞混懸培養後細胞內 MRM 比值。許多 MPS I 及對照皮膚

成纖維細胞在混懸後培養 2 到 15 周。製備細胞提取物，衍生用於質譜分析並分析每個 MRM 離子對。圓形及十字線條分別代表 MPS I 患者及對照皮膚成纖維細胞。除了四糖二硫酸鹽 (m/z 632) 外，隨培養時間的增加與正常對照成纖維細胞相比，MPS I 患者成纖維細胞株內寡糖積聚增加。基於與 ISTD 的比值，皮膚成纖維細胞內所鑒定含量最為豐富的寡糖為 DS 衍生三糖 (m/z 490/982)。在培養 4 周後與培養對照成纖維細胞相比，該三糖單硫化物在 MPS I 患者皮膚成纖維細胞內升高。該增加量隨時間延長而增加，單對照成纖維細胞內在培養第 10 周細胞內該三糖水平仍然在可忽略的水平上。混懸培養後 6 周，MPS I 患者皮膚成纖維細胞內雙糖 (m/z 806) 是第二種常見的寡糖。戊糖 (m/z 720) 及源自三糖的 HS (m/z 1020/509 及 m/z 940) 在混懸培養後也在 MPS I 患者皮膚成纖維細胞內積聚。

儲存校正。在培養 5 天內每天向培養的 MPS I 成纖維細胞介質內添加 RhIDUA，在第 1 和第 5 天向對照成纖維細胞內添加，兩組細胞在混懸後培養 6 周至老化狀態。然後採集細胞製備細胞提取物用於質譜分析及 MRM 離子對分析。圖 26 顯示的是添加 α -L-艾杜糖醛酸 (rhIDUA) 後寡糖水平 MRM 離子對比值。MPS I 及對照皮膚成纖維細胞在分離混懸後培養 6 周。將 rhIDUA 添加到 MPS I 成纖維細胞培養介質內，然後每天更換培養液共 5 天。24 小時後採集細胞，衍生用於質譜分析及 MRM 離子對分析。對照成纖維細胞以灰色箱形圖顯示，每天添加 rhIDUA，但是細胞僅

僅在第 1 天及第 5 天採集。0 時間點代表的是 4 個值的均值。圖 26 說明的是在向培養介質內添加 rhIDUA 後，雙糖 (m/z 806) 三糖 (m/z 490/982 及 m/z 940) 即刻迅速地增加。戊糖 (m/z 720) 及 HS 三糖 (m/z 509) 五改變。如圖 25 所示，在培養 6 周後，這兩類寡糖在 MPS I 患者的成纖維細胞內無積聚。有趣的是，在有 rhIDUA 存在的條件下，四糖 (m/z 632) 的數量急劇增加。同樣地，如既往的研究顯示，硫化單糖 (m/z 630) 在某些 MPS 患者中也增加 (Hopwood 和 Elliott, 1985)。這是一種存在于尿及成纖維細胞內的硫化 HNAc，但是在 MPS I 及正常對照者中水平相當。

實施例 13

用於建議試劑盒內的材料。本發明的一個方面是包括一個包含 MPS 患者及目標動物臨床前狀態及臨床狀態診斷所需的所有試劑及材料的試劑盒。通常來說，一個有用的試劑盒應該包括：用於改變目標 MPS 生物標記化學組成的衍生試劑；在衍生反應後用於中和衍生試劑的酸性溶液；用於精確測定目標 MPS 生物標記數量的內部標準對照；用於純化目標 MPS 生物標記的固相萃取柱，以及用於從已經結合了目標生物標記的固相萃取柱內清除雜質的固相萃取柱清洗液。用於從固相萃取柱內沖提目標 MPS 生物標記的寡糖沖提液；以及一系列使用該試劑盒的說明。

寡糖衍生溶液包括 1-苯基-3 甲基-5-吡唑酮 (“PMP”) 及 NH_3 可能是首選試劑，但是，熟知該項技術者也可以使

用其他衍生試劑。同樣地，首選的酸性溶液包括甲酸，但是某些其他酸液具有同樣良好的作用。衍生 MPS 寡糖生物標記被吸附到固相萃取柱內。儘管用於純化衍生寡糖的 C18 反相色層分析柱是首選色層分析柱，其他合適的固相萃取柱，諸如離子交換柱或 C18/離子交換色層分析柱的結合也可發揮良好的作用。試劑盒內的每個包裝柱一次性或非一次性設備使用。首選色層分析柱清洗液包括 CHCl_3 ，但是熟悉該項技術者液可以使用其他清洗液。爲了從結合柱上沖提已經結合的寡糖需要使用沖提液。而且，首選試劑盒內的沖提液包括 CH_3CN 和所使用的甲酸，但是其他相似的溶液也可以使用。

本試劑盒內也包括內部標準，其中， $\text{GlcNAc6S}(d3)$ 是用於 GlcNAc6S 測定的首選內部標準，其他具有相同結構含重氫的標準，也可以首選用於其他寡糖的測定。與被測定寡糖相似的無生理活性寡糖，也可以用作內部標準。例如，在其非還原性末端具有含重氫糖醛酸結構，在硫酸軟骨素酶消化後來自硫酸軟骨素的無生理活性寡糖，也可以作內部標準使用。

包括在試劑盒內的說明書，可能是對用於進行質譜分析樣本製備的有關方法描述。其餘的資料也可能是有用資料。例如，有關存在其中寡糖結構的說明、每種 MPS 疾病類型的特徵描述，以及進行特殊 MPS 寡糖生物標記質譜分析的適當質譜儀設置等。

儘管在上述舉例中使用了質譜儀，熟悉該項技術者也

可以使用其他定量分析的方法，包括色層分析法，免疫分析法以及液相色層分析-質譜聯用分析法，也可以作為生物標本內寡醣水平定量分析的方法。這些資料對於 MPS 疾病的預測、疾病嚴重性的明確、MPS 患者病情進展的監控、以及療效的監控都是有用的。顯而易見的是，對熟悉本發明者，對本發明中所描述方法的替換及修正，並不背離本發明的應用範圍及主旨。

圖式簡單說明

圖 1 顯示的是來自餾柱 MPS I 糖醛酸(UA)等價物沖提設備剖面圖以及用於患者尿液分析的生物膠 P2 色層分析柱；

圖 2 顯示的是母離子源所產生的子離子源質譜圖，包含有關其結構資訊以及為多重反映監視器所提供的合適離子對(“MRM”)；

圖 3 顯示的是 MPS I 尿內的寡醣，其中，片斷的分佈模式用於闡述化學成分的結構，以及位於非還原末端的殘基；

圖 4 顯示的是重組酶消化後的四糖(m/z 632)質譜圖；

圖 5 顯示的是從 MPS I 患者尿內分離的一個三糖及一個四糖，在無 α -L-艾杜糖醛酸苷酶(圖 5A)及 α -L-艾杜糖醛酸苷酶存在(圖 5B)的條件下，Q1 質譜圖特徵；

圖 6 顯示的是在 MPS II 患者尿內所發現的寡醣 Q1 質譜圖；

圖 7 顯示的是 MPS II 患者尿內所發現的寡糖 Q1 質譜圖；

圖 8 顯示是用於進行所選擇寡糖 MRM 分析的內部標準值寡糖信號的平均比值及標準差(“SD”)列表；

圖 9 顯示是與 26 個對照樣本進行 MPS 亞組所選擇寡糖分析的 Mann Whitney U 值；

圖 10 所顯示的是對照樣本寡糖分析所產生的 9 GAG 相對水平箱型圖；

圖 11 所顯示的是不同 MPS 亞型患者寡糖分析所產生的 9 GAG 相對水平箱型圖；

圖 12 所顯示的是健康對照者及 MPS I 患者尿液樣本內寡糖相對濃度；

圖 13 顯示的是具有 MPS I 表型患者皮膚成纖維細胞內(舉例來說，寡糖/每個細胞蛋白中)寡糖相對水平，高於健康對照者體內相應水平；

圖 14 顯示的是所選擇寡糖每個 MRM 對的水平，該寡糖在與對照或參考水平相比較時，在各型 MPS I 患者中均升高；

圖 15 顯示的是與對照或參考水平相比較，MPS I 患者接受骨髓移植(“BMT”)前後寡糖的相對水平；

圖 16 顯示的是 MPS IVA 受累患者接受骨髓移植前後尿內寡糖衍生 GAG 的相對水平；

圖 17 顯示的是 MPS VI 受累患者接受骨髓移植前後尿內寡糖衍生 GAG 的相對水平；

圖 18 顯示的是正常動物、未治療 MPS VI 動物、MPS VI 低劑量治療動物、以及 MPS VI 高劑量治療動物尿內總 GAG 時間變化曲線，其中，GAG 的含量是使用 DMB 燃料結合分析法測定，並標準化為肌酐水平；

圖 19 顯示的是正常動物、未治療 MPS VI 動物、MPS VI 低劑量治療動物、以及 MPS VI 高劑量治療動物尿內 HexNAcS 單糖濃度時間變化曲線，其中，HexNAcS 單糖使用串聯質譜測定，並標準化為肌酐水平；

圖 20 顯示的是正常動物、未治療 MPS VI 動物、MPS VI 低劑量治療動物、以及 MPS VI 高劑量治療動物尿內 HexNAcS-UA 雙糖濃度時間變化曲線，其中，HexNAcS-UA 雙糖使用串聯質譜測定，並標準化為肌酐水平；

圖 21 顯示的是正常動物、未治療 MPS VI 動物、MPS VI 低劑量治療動物、以及 MPS VI 高劑量治療動物尿內 HexNAcS-UA、HexNAc-UA 雙糖相對濃度時間變化曲線，其中，HexNAcS-UA、HexNAc-UA 雙糖相對濃度使用串聯質譜測定，並以比值表示；

圖 22 顯示的是正常動物、未治療 MPS VI 動物、MPS VI 低劑量治療動物、以及 MPS VI 高劑量治療動物血液標本內 HexNAcS 單糖濃度時間變化曲線，其中，HexNAcS 單糖濃度使用串聯質譜測定；

圖 23 顯示的是在使用艾杜糖醛酸苷酶處理前後 MPS I 給對照樣本細胞裂解液內單糖及寡糖水平；

圖 24 顯示的是使用重組乙醯半乳糖胺-4-硫酸酯酶處

理前後，MPS 患者體內寡糖的 LC-MSMS 質譜鑒定結果；

圖 25 顯示的是融合後的皮膚成纖維細胞內寡糖 MRM 比值；

圖 26 顯示的是加入重組的 L-艾杜糖醛酸苷酶(rhIDUA)後寡糖 MRM 比值；

參考文獻

Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranieri E, Hopwood JJ. Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Mol Genet Metab* 1998;65(4):282-90.

Elliott H, Hopwood JJ. Detection of the Sanfilippo D syndrome by the use of a radiolabeled monosaccharide sulfate as the substrate for the estimation of N-acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase. *Anal Biochem* 1984;138(1):205-9.

Fluharty AL, Glick JA, Matuszewicz NM, Kihara H. High-performance liquid chromatography determination of unsaturated disaccharides produced from chondroitin sulfates by chondroitinases. *Biochem Med* 1982;27(3):352-60.

Hopwood JJ, Elliott H. Urinary excretion of sulfated N-acetylhexosamines in patients with various mucopolysaccharidoses. *Biochem J* 1985;229(3):579-86.

Hua CT, Hopwood JJ, Carlsson SR, Harris RJ, Meikle PJ. Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 1998;44(10):2094-102.

Kimura A, Hayashi S, Koseki M, Kochi H, Tsurumi K. Fractionation and characterization of urinary heparan sulfate excreted by patients with Sanfilippo syndrome. *Tohoku J Exp Med* 1984;144(3):227-36.

Kimura A, Hayashi S, Tsurumi K. Chemical structure of urinary dermatan sulfate excreted by a patient with the Hunter syndrome. *Tohoku J Exp Med* 1980;131(3):241-7.

Klein U, Kresse H, von Figura K. Evidence for degradation of heparan sulfate by endoglycosidases: glucosamine and hexuronic acid are reducing terminals of intracellular heparan sulfate from human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;69(1):158-66.

Klock JC, Starr CM. The different faces of disease. FACE diagnosis of disease. *Adv Exp Med Biol* 1995;376:13-25.

Kodama C, Ototani N, Isemura M, Yosizawa Z. High-performance liquid chromatography of pyridylamino derivatives of unsaturated disaccharides produced from chondroitin sulfate isomers by chondroitinases. *J Biochem (Tokyo)* 1984;96(4):1283-7.

Koseki M, Ino S, Kimura A, Tsurumi K. Abnormal urinary

excretion in sialoglycoconjugates in patients with mucopolysaccharidosis. *Tohoku J Exp Med* 1981;135(4):431-9.

Meikle PJ, Brooks DA, Ravenscroft EM, Yan M, Williams RE, Jaunzems AE, et al. Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin Chem* 1997;43(8 Pt 1):1325-35.

Murata K, Murata A, Yoshida K. High-performance liquid chromatographic identification of eight constitutional disaccharides from heparan sulfate isomers digested with heparitinases. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995;670(1):3-10.

Neufeld EF, Meunzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3421-52.

Purkiss P, Gibbs DA, Watts RW. Studies on the composition of urinary glycosaminoglycans and oligosaccharides in patients with mucopolysaccharidoses who were receiving fibroblast transplants. *Clin Chim Acta* 1983;131(1-2):109-21.

Ramsay SL, Meikle PJ, Hopwood JJ. Determination of monosaccharides and disaccharides in

mucopolysaccharidoses patients by electrospray ionisation mass spectrometry. *Mol Genet Metab* 2003;78(3):193-204.

Scott HS, Litjens T, Nelson PV, Thompson PR, Brooks DA, Hopwood JJ, et al. Identification of mutations in the alpha-L-iduronidase gene (IDUA) that cause Hurler and Scheie syndromes. *Am J Hum Genet* 1993;53(5):973-86.

伍、中文發明摘要：

本發明是關於黏多醣症(“MPS”)及相關疾病的診斷方法。本發明屬於對生化標記(“生物標記”)進行鑒定及定量分析的方法，這些生物標記存在於 MPS 或相關疾病的患者生物體液或組織內。本發明的一個方面包括測定從目標動物所採集的目標生物標本內的目標 MPS 寡醣生物標記，然後將目標數量與參考 MPS 生物標記數量進行比較，以用於 MPS 及相關疾病的診斷、定性、監控、以及臨床療效的觀察。本發明也描述了一個試劑盒，該試劑盒包括：寡醣衍生溶液；酸溶液；內部標準；固相萃取柱；固相萃取柱清洗液；寡醣沖提溶液；以及一系列使用該試劑盒進行 MPS 或相關疾病診斷的說明書。

陸、英文發明摘要：

The present invention is related to methods for diagnosing mucopolysaccharidoses (“MPS”) and related diseases. This invention pertains to methods for identifying and quantitating biochemical markers (“biomarkers”) that are present in biological fluids or tissues of a patient having a MPS or related disorder. One aspect of the method comprises determining a target quantity of a target MPS biomarker oligosaccharide from a target biological sample taken from the target animal, and then comparing the target quantity to a reference quantity of a reference MPS biomarker oligosaccharide for the diagnosis, characterization, monitoring, and clinical management of MPS and related disease. This invention also describes a kit comprising an oligosaccharide derivatization solution; an acid solution; an internal standard; a solid phase extraction column; a solid phase extraction column wash solution; an oligosaccharide elution solution; and a set of instructions for using the kit to diagnose a MPS or related disease.

拾、申請專利範圍：

1. 一種用於診斷目標動物黏多糖症(“MPS”)的臨床前狀態或臨床狀態的方法，該方法包括：

(a) 測定從目標動物採集的生物標本內 MPS 生物標記數量；以及

(b) 將 MPS 生物標記的參考數量與目標數量進行比較；

其中，

目標 MPS 生物標記是同一種或等同於 MPS 參考生物標記的，而且 MPS 的目標生物標記及 MPS 參考生物標記是一種寡糖；

參考數量是從已知具有臨床表現的一隻參考動物或一組參考動物中所測定的；及

目標 MPS 生物標記的目標數量與參考 MPS 生物標記參考數量之間的差值，是反應 MPS 疾病臨床前或臨床狀態的指標，是 MPS 疾病進展的指標，或 MPS 疾病緩解的指標。

2. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中目標生物標本或參考生物標本是從細胞提取物、血液、血漿或尿液標本內選擇。

3. 如申請專利範圍第 1 項的方法，還包括在測定 MPS 目標生物標記數量或參考 MPS 生物標記數量之前，利用衍生試劑衍生的目標生物標記及參考 MPS 的生物標記。

4. 如申請專利範圍第 3 項的方法，其中衍生試劑包括

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(“PMP”)。

5. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中寡醣包括一個具有 1 到 12 個殘基長度的糖的硫化分子。

6. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中從目標生物標本中所鑒定的寡醣包括一胺基葡糖多聚糖(“GAG”)的降解產物。

7. 如申請專利範圍第 6 項的方法，其中 GAG 為硫酸乙醯肝素、硫化皮質素、硫化角質素、或硫化軟骨素。

8. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中寡醣為硫化角質素片斷，該片斷包括：

IdoA-(GalNAc-(UA-GalNAc)_n)(S)_m，其中，n=0-5，m=0-11；

IdoA-(GalNAc-UA)_n(S)_m，其中，n=1-6，m=0-12；

IdoA2S-(GalNAc-(UA-GalNAc)_n)(S)_m，其中，n=0-5，

m=0-11；IdoA2S-(GalNAc-UA)_n(S)_m，其中，n=1-6，m=0-12；

GalNAc4S-(UA-(GalNAc-UA)_n)(S)_m，其中，n=0-5，m=0-12；

GalNAc4S-(UA-GalNAc)_n(S)_m，其中，n=0-6，m=0-13；

GlcA-GalNAc-(UA-GalNAc)_n(S)_m，其中，n=0-5，m=0-11；

或 GlcA-(GalNAc-UA)_n(S)_m，其中，n=0-6，m=0-12；

其中，

IdoA=艾杜醣酸；GlcA=葡萄糖醛酸；GalNAc=N-乙醯半乳糖胺；GlcNAc=N-乙醯葡萄糖胺；GlcN=葡萄糖胺；UA=糖醛酸；S=硫化物；及 al=半乳糖。

9. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中寡醣為硫酸乙醯肝素片斷，該片斷包括：

IdoA-(GlcNAc/GlcN-(UA-GlcNAc/GlcN)_n)(S)_m，其中
 $n=0-5$ ， $m=0-17$ ；IdoA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n(S)_m， $n=1-6$ ，
 $m=0-18$ ；IdoA2S-(GlcNAc/GlcN-(UA-GlcNAc/GlcN)_n)(S)_m，
 其中 $n=0-5$ ， $m=0-17$ ；IdoA2S-(GlcNAc/GlcN-UA)_n(S)_m，其
 中 $n=1-6$ ， $m=0-18$ ；GlcNS-(UA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n)(S)_m，
 其中 $n=0-5$ ， $m=0-16$ ；GlcNS-(UA-GlcNAc/GlcN)_n(S)_m，其
 中 $n=1-6$ ， $m=0-18$ ；

GlcNAc-(UA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n)(S)_m，其中 $n=0-5$ ，
 $m=0-16$ ；GlcNAc-(UA-GlcNAc/GlcN)_n(S)_m，其中 $n=1-6$ ，
 $m=0-18$ ；GlcN-(UA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n)(S)_m，其中 $n=0-5$ ，
 $m=0-16$ ；GlcN-(UA-GlcNAc/GlcN)_n(S)_m，其中 $n=1-6$ ，
 $m=0-18$ ；

GlcNAc6S/GlcN6S-(UA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n)(S)_m，其中
 $n=0-5$ ， $m=0-16$ ；

GlcNAc6S/GlcN6S-(UA-GlcNAc/GlcN)_n(S)_m，其中 $n=0-6$ ，
 $m=0-18$ ；

GlcA-(GlcNAcS/GlcNS-(UA-GlcNAc/GlcN)_n)(S)_m，其中
 $n=0-5$ ， $m=0-17$ ；或 GlcA-(GlcNAc/GlcN-UA)_n(S)_m，其中
 $n=0-6$ ， $m=0-18$ ；

其中，

IdoA=艾杜糖酸；GlcA=葡萄糖醛酸；GalNAc=N-乙醯
 半乳糖胺；GlcNAc=N-乙醯葡萄糖胺；GlcN=葡萄糖胺；UA=
 糖醛酸；S=硫化物；及 Gal=半乳糖。

10. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中寡糖為硫化

角質素片段，該片斷包括：

$\text{Gal6S}-(\text{GlcNAc}-(\text{Gal-GlcNAc})_n)(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-5$ ， $m=0-11$ ；

$\text{Gal6S}-(\text{GlcNAc-Gal})_n(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-6$ ， $m=0-12$ ；

$\text{Gal}-(\text{GlcNAc}-(\text{Gal-GlcNAc})_n)(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-5$ ， $m=0-11$ ；

或 $\text{Gal}-(\text{GlcNAc-Gal})_n(\text{S})_m$ ，其中 $n=1-6$ ， $m=0-12$ ；

其中，

IdoA=艾杜糖酸；GlcA=葡萄糖醛酸；GalNAc=N-乙醯半乳糖胺；GlcNAc=N-乙醯葡萄糖胺；GlcN=葡萄糖胺；UA=糖醛酸；S=硫化物；及 Gal=半乳糖。

11. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中寡糖為硫化軟骨素片段，該片斷從：

$\text{GalNAc6S}-(\text{UA}-(\text{GalNAc-UA})_n)(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-5$ ， $m=0-11$ ；

或 $\text{GalNAc6S}-(\text{UA-GalNAc})_n(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-6$ ， $m=0-12$ ；中選擇

其中，

IdoA=艾杜糖酸；GlcA=葡萄糖醛酸；GalNAc=N-乙醯半乳糖胺；GlcNAc=N-乙醯葡萄糖胺；GlcN=葡萄糖胺；UA=糖醛酸；S=硫化物；及 Gal=半乳糖。

12. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中目標及參考數量通過質譜分析法測定。

13. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中目標及參考數量通過色層分析法、免疫吸附法、液相色層分析法、離子交換色層分析法、顆粒排阻色層分析法，或這些方法聯合應用測定。

14. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中目標及參考數量標準化為肌酐或其他寡糖。

15. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中目標動物接受 MPS 療法治療。

16. 如申請專利範圍第 15 項的方法，其中 MPS 治療方法中包括骨髓移植(“BMT”)或 MPS 酶替換療法。

17. 如申請專利範圍第 1 項的方法，還包括使用 MPS 治療方法處理目標動物，其中，MPS 治療方法是基於目標數量與參考數量的差值。

18. 如申請專利範圍第 17 項的方法，其中 MPS 治療方法中包括骨髓移植(“BMT”)或 MPS 酶替換療法。

19. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中目標生物標本及參考生物標本包括內部標準。

20. 如申請專利範圍第 19 項的方法，其中內部標準包括含重氫的 N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸鹽(“GlcNAc6S(d3)”)。

21. 如申請專利範圍第 19 項的方法，其中內部標準包括非生理性寡糖，該寡糖與被測定寡糖相似。

22. 如申請專利範圍第 21 項的方法，其中非生理性寡糖源自硫酸軟骨素酶消化後在非還原末端具有一個不飽和糖醛酸的硫酸軟骨素。

23. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中 MPS 疾病是指 MPS-I、MPS-II、MPS-IIIA、MPS-IIIB、MPS-VI、MPS-IIIC、MPS-IIID、MPS-IV、或上述疾病的併發。

24. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中目標動物為

新生動物。

25. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中目標 MPS 生物標記與一種特異性 MPS 疾病亞型特徵性的酶相接觸，其中接觸發生在目標數量測定之前。

26. 如申請專利範圍第 25 項的方法，其中酶包括 α -L-艾杜糖醛酸苷酶。

27. 一種用於目標動物黏多醣症(“MPS”)疾病臨床前狀態，或臨床狀態診斷的方法，該方法包括：

- (a) 利用衍生試劑形成衍生目標 MPS 生物標記的方法衍生目標 MPS 生物標記；
- (b) 將衍生的目標生物標記結合到所提取的化合物上，得到一種結合的衍生目標 MPS 生物標記；
- (c) 利用可形成沖提目標 MPS 生物標記的沖提液從提取化合物中沖提結合的衍生目標生物標記；
- (d) 沖提的目標 MPS 生物標記目標數量的測定；及
- (e) 將目標數量與參考 MPS 生物標記的參考數量比較；
其中，

目標 MPS 生物標記從含有目標 MPS 生物標記的目標動物的生物標本內獲得；

目標 MPS 生物標記是同一種或等同於參考 MPS 生物標記；每種目標 MPS 生物標記及參考 MPS 生物標記為寡醣；

參考數量是從一隻參考動物，或一組有已知 MPS 臨床狀態的參考動物中測定；以及

當與參考數量相比較時，沖提目標 MPS 生物標記的偏差量是反應 MPS 疾病臨床前或臨床狀態的指標，MPS 疾病進展的指標、或 MPS 疾病緩解的指標。

28. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中目標生物標本或參考生物標本是從細胞提取物、血液、血漿或尿液標本中選擇。

29. 如申請專利範圍第 27 項的方法，進一步包括在衍生目標 MPS 生物標記之前對目標生物標本進行凍幹。

30. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中衍生試劑包括 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(“PMP”)。

31. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中寡糖包括一個具有 1 到 12 個殘基長度的糖的硫化分子。

32. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中從目標生物標本中所鑒定的寡糖包括一胺基葡糖多聚糖(“GAG”)的降解產物。

33. 如申請專利範圍第 32 項的方法，其中 GAG 為硫酸乙醯肝素、硫化皮質素、硫化角質素或硫化軟骨素。

34. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中寡糖為硫化皮膚素片斷，該片斷包括：

IdoA-(GalNAc-(UA-GalNAc)_n)(S)_m，其中，n=0-5，m=0-11；

IdoA-(GalNAc-UA)_n(S)_m，其中，n=1-6，m=0-12；

IdoA2S-(GalNAc-(UA-GalNAc)_n)(S)_m，其中，n=0-5，

m=0-11；IdoA2S-(GalNAc-UA)_n(S)_m，其中，n=1-6，m=0-12；

GalNAc4S-(UA-(GalNAc-UA)_n)(S)_m，其中，n=0-5，m=0-12；

$\text{GalNAc}_4\text{S}-(\text{UA-GalNAc})_n(\text{S})_m$ ，其中， $n=0-6$ ， $m=0-13$ ；

$\text{GlcA-GalNAc}-(\text{UA-GalNAc})_n(\text{S})_m$ ，其中， $n=0-5$ ， $m=0-11$ ；

或 $\text{GlcA}-(\text{GalNAc-UA})_n(\text{S})_m$ ，其中， $n=0-6$ ， $m=0-12$ ；

其中，

IdoA=艾杜糖酸；GlcA=葡萄糖醛酸；GalNAc=N-乙醯半乳糖胺；GlcNAc=N-乙醯葡萄糖胺；GlcN=葡萄糖胺；UA=糖醛酸；S=硫化物；及 Gal=半乳糖。

35. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中寡糖為硫化乙醯肝素片斷，該片斷包括：

$\text{IdoA}-(\text{GlcNAc/GlcN}-(\text{UA-GlcNAc/GlcN})_n)(\text{S})_m$ ，其中

$n=0-5$ ， $m=0-17$ ； $\text{IdoA}-(\text{GlcNAc/GlcN-UA})_n(\text{S})_m$ ， $n=1-6$ ，

$m=0-18$ ； $\text{IdoA}_2\text{S}-(\text{GlcNAc/GlcN}-(\text{UA-GlcNAc/GlcN})_n)(\text{S})_m$ ，

其中 $n=0-5$ ， $m=0-17$ ； $\text{IdoA}_2\text{S}-(\text{GlcNAc/GlcN-UA})_n(\text{S})_m$ ，其

中 $n=1-6$ ， $m=0-18$ ； $\text{GlcNS}-(\text{UA}-(\text{GlcNAc/GlcN-UA})_n)(\text{S})_m$ ，

其中 $n=0-5$ ， $m=0-16$ ； $\text{GlcNS}-(\text{UA-GlcNAc/GlcN})_n(\text{S})_m$ ，其

中 $n=1-6$ ， $m=0-18$ ； $\text{GlcNAc}-(\text{UA}-(\text{GlcNAc/GlcN-UA})_n)(\text{S})_m$ ，

其中 $n=0-5$ ， $m=0-16$ ； $\text{GlcNAc}-(\text{UA-GlcNAc/GlcN})_n(\text{S})_m$ ，

其中 $n=1-6$ ， $m=0-18$ ； $\text{GlcN}-(\text{UA}-(\text{GlcNAc/GlcN-UA})_n)(\text{S})_m$ ，

其中 $n=0-5$ ， $m=0-16$ ； $\text{GlcN}-(\text{UA-GlcNAc/GlcN})_n(\text{S})_m$ ，其中

$n=1-6$ ， $m=0-18$ ；

$\text{GlcNAc}_6\text{S/GlcN}_6\text{S}-(\text{UA}-(\text{GlcNAc/GlcN-UA})_n)(\text{S})_m$ ，其中

$n=0-5$ ， $m=0-16$ ；

$\text{GlcNAc}_6\text{S/GlcN}_6\text{S}-(\text{UA-GlcNAc/GlcN})_n(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-6$ ，

$m=0-18$ ；

$\text{GlcA}-(\text{GlcNAcS}/\text{GlcNS}-(\text{UA}-\text{GlcNAc}/\text{GlcN})_n)(\text{S})_m$ ，其中
 $n=0-5$ ， $m=0-17$ ；或 $\text{GlcA}-(\text{GlcNAc}/\text{GlcN}-\text{UA})_n(\text{S})_m$ ，其中
 $n=0-6$ ， $m=0-18$ ；

其中，

IdoA=艾杜糖酸；GlcA=葡萄糖醛酸；GalNAc=N-乙醯
 半乳糖胺；GlcNAc=N-乙醯葡萄糖胺；GlcN=葡萄糖胺；UA=
 糖醛酸；S=硫化物；及 Gal=半乳糖。

36. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中寡糖為硫化
 角質素片斷，該片斷包括：

$\text{Gal6S}-(\text{GlcNAc}-(\text{Gal}-\text{GlcNAc})_n)(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-5$ ， $m=0-11$ ；

$\text{Gal6S}-(\text{GlcNAc}-\text{Gal})_n(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-6$ ， $m=0-12$ ；

$\text{Gal}-(\text{GlcNAc}-(\text{Gal}-\text{GlcNAc})_n)(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-5$ ， $m=0-11$ ；

或 $\text{Gal}-(\text{GlcNAc}-\text{Gal})_n(\text{S})_m$ ，其中 $n=1-6$ ， $m=0-12$ ；

其中，

IdoA=艾杜糖酸；GlcA=葡萄糖醛酸；GalNAc=N-乙醯
 半乳糖胺；GlcNAc=N-乙醯葡萄糖胺；GlcN=葡萄糖胺；UA=
 糖醛酸；S=硫化物；及 Gal=半乳糖。

37. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中寡糖為硫化
 軟骨素片段，該片斷從：

$\text{GalNAc6S}-(\text{UA}-(\text{GalNAc}-\text{UA})_n)(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-5$ ， $m=0-11$ ；

或 $\text{GalNAc6S}-(\text{UA}-\text{GalNAc})_n(\text{S})_m$ ，其中 $n=0-6$ ， $m=0-12$ 中
 選擇；

其中，

IdoA=艾杜糖酸；GlcA=葡萄糖醛酸；GalNAc=N-乙醯

半乳糖胺；GlcNAc=N-乙醯葡萄糖胺；GlcN=葡萄糖胺；UA=糖醛酸；S=硫化物；及 Gal=半乳糖。

38. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中目標數量測定法中包括質譜分析法。

39. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中目標及參考數量通過色層分析法、免疫吸附法、液相色層分析法、離子交換色層分析法、顆粒排阻色層分析法，或這些方法聯合應用測定。

40. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中目標動物接受 MPS 療法治療。

41. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中 MPS 治療方法中包括骨髓移植(“BMT”)或 MPS 酶替換療法。

42. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中目標生物標本及參考生物標本包括內部標準。

43. 如申請專利範圍第 27 項的方法，進一步包括使用 MPS 治療方法處理目標動物，其中，MPS 治療方法是基於目標數量與參考數量的差值。

44. 如申請專利範圍第 43 項的方法，其中 MPS 治療方法中包括骨髓移植(“BMT”)或 MPS 酶替換療法。

45. 如申請專利範圍第 40 項的方法，其中內部標準包括含重氫的 N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸鹽(“GlcNAc6S(d3)”)。

46. 如申請專利範圍第 40 項的方法，其中內部標準包括非生理性寡糖，該寡糖與被測定寡糖相似。

47. 如申請專利範圍第 46 項的方法，其中非生理性寡

醣源自硫酸軟骨素酶消化後在非還原末端具有一個不飽和糖醛酸的硫酸軟骨素。

48. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中 MPS 疾病是指 MPS-I、MPS-II、MPS-IIIA、MPS-IIIB、MPS-VI、MPS-IIIC、MPS-IIID、MPS-IV、或上述疾病的併發。

49. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中目標動物為新生動物。

50. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中目標 MPS 生物標記與特異性 MPS 疾病亞型特徵性的酶相接觸，其中接觸發生在目標數量測定之前。

51. 如申請專利範圍第 50 項的方法，其中酶包括 α -L-艾杜糖醛酸苷酶。

52. 一種用於目標動物黏多醣症臨床前，或臨床狀態診斷的試劑盒，該試劑盒包括：

- (a) 寡醣衍生試劑；
- (b) 酸性溶液；
- (c) 內部標準；
- (d) 固相提取柱；
- (e) 固相萃取柱沖提液；及
- (f) 寡醣沖提液。

53. 如申請專利範圍第 48 項的試劑盒，其中寡醣衍生試劑為包含包括 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(“PMP”)的溶液。

54. 如申請專利範圍第 48 項的試劑盒，其中該酸性溶

液是一必要成分：甲酸。

55. 如申請專利範圍第 48 項的試劑盒，其中內部標準包括：含重氫的 N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸鹽 (“GlcNAc6S(d3)”)。

56. 如申請專利範圍第 48 項的方法，其中內部標準包括一種非生理性寡糖，該寡糖與被測定寡糖相似。

57. 如申請專利範圍第 52 項的方法，其中非生理性寡糖源自硫酸軟骨素酶消化後在非還原末端具有一個不飽和糖醛酸的硫酸軟骨素。

58. 如申請專利範圍第 48 項的方法，其中固相萃取柱包括一個反相 C18 色層分析柱。

59. 如申請專利範圍第 48 項的方法，其中固相萃取柱清洗液包括： CHCl_3 。

60. 如申請專利範圍第 48 項的方法，其中寡糖沖提溶液包括： CH_3CN 及甲酸。

61. 一種用於目標動物黏多醣症 (“MPS”) 疾病臨床前狀態，或臨床狀態診斷的方法，該方法包括：

(a) 測定從目標動物體內所獲得的目標 MPS 生物標本目標中的 MPS 生物標記；以及

(b) 將目標數量與參考 MPS 生物標記的參考數量比較；

其中，

目標生物標記為同一種或等同於參考生物標記，每種目標生物標記或參考生物標記是一種寡糖，該寡糖包括： HNAcS ； HNAcS_2 ； HNS-UA ； UA-HNAcS ； HNAcS-UA ；

UA-HNAc-UA-S；(HNAc-UA)₂-S；(HNAc-UA)₂(S)₂；或己醣，其中，UA = 糖醛酸；HNAc = N-乙醯胺基己醣；HN = 胺基己醣；Hex = 己醣；(S) = 硫酸鹽無限定的葡萄糖殘基；

目標生物標記及參考生物標記在進行目標生物標記及參考生物標記含量測定之前，使用衍生試劑進行衍生，其中，衍生試劑包括 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(“PMP”)；

目標數量及參考數量標準化為肌酐；

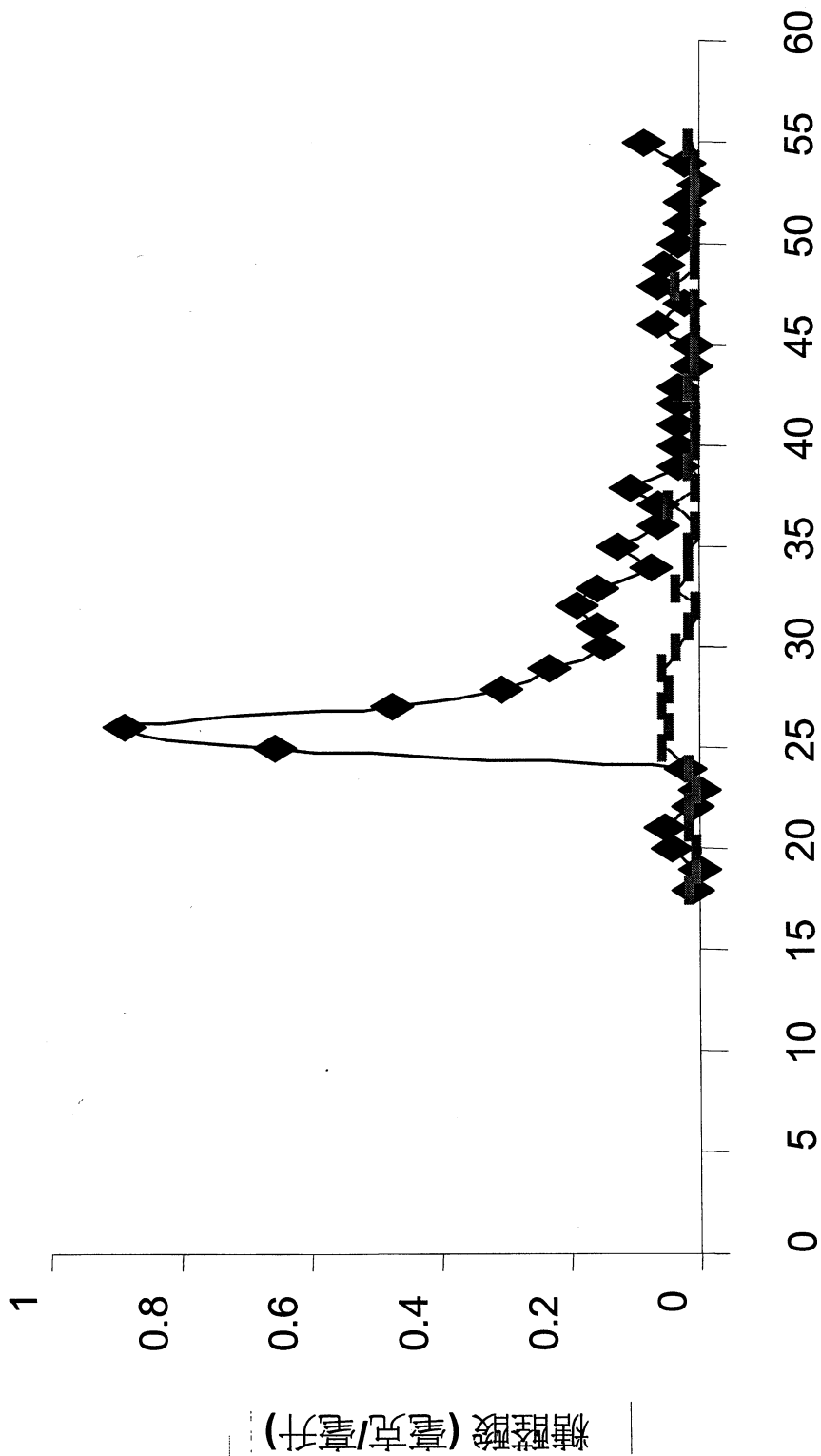
參考數量是從一隻參考動物，或一組有已知 MPS 臨床狀態的參考動物測定；

目標 MPS 生物標記的目標數量與參考 MPS 生物標記參考數量之間的差值，是反應 MPS 疾病臨床前或臨床狀態的指標，是 MPS 疾病進展的指標，或 MPS 疾病緩解的指標，MPS 疾病是從以下疾病中選擇，這些疾病包括：MPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIIC、MPS IIID、MPS IVA、MPS VI、或多重硫酸酯酶缺乏；

目標數量及參考數量使用質譜分析法測定；以及

內部標準是用於精確測定目標數量及參考數量的試劑，該內部標準包括：含重氫的 N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸鹽(“GlcNAc6S(d3)”)。

圖 1 / 26



留分編號

圖 2 / 26

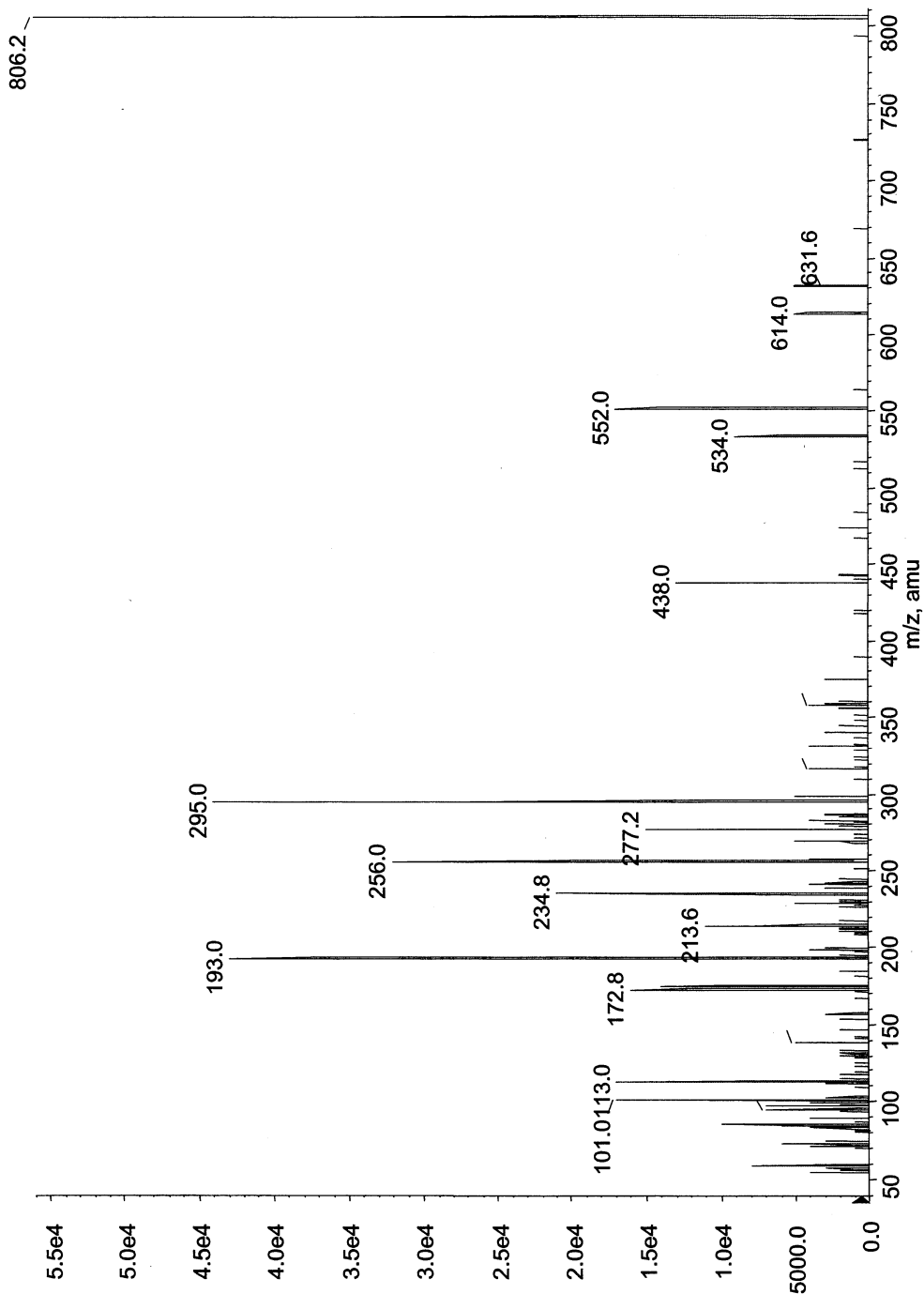


圖 3 / 26

寡糖 ^a	m/z	MRM	P2 離分 ^b	GAG ^c
IdoA- GalNAc4SQ- UA- GalNAc- UA (+SQ)	720	720/269	#31 and #32	DS
IdoA- GalNAc4SQ- UA- GalNAc (+SQ)	632	632/298	#34 and #35	DS
IdoA- GalNAc4SQ- UA	982	982/269	#38 and #39	DS
	490	490/173		
IdoA- HN- UA (+SQ)	940	940/269	#37	HS
IdoA- HN- UA (+2SQ)	1020	1020/940	#37	HS
	509	509/422		
IdoA- HNAc (+SQ)	806	806/295	#40 and #41	HS/DS

^a IdoA, 糖醛酸; GalNAc, N-乙醯半乳糖胺; GalNAc4SO, N₄ 乙醯半乳糖胺

^b 4 - 硫酸鹽; UA, 糖醛酸; HN, 己糖胺; HNAc, N 乙醯己糖胺。

^c 截留自 Bio-Gel P2 分離柱 離分 (參閱23)。

可能低聚糖 (DS, 硫酸皮膚素; HS, 硫酸乙酰肝素)。

圖 4 / 26

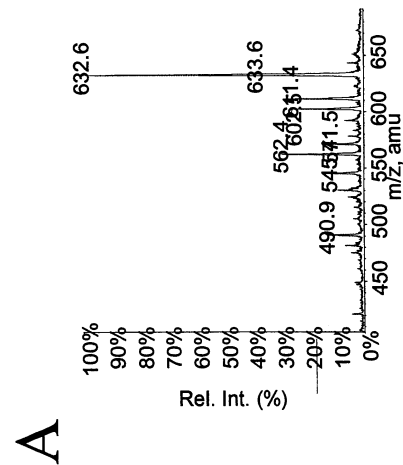
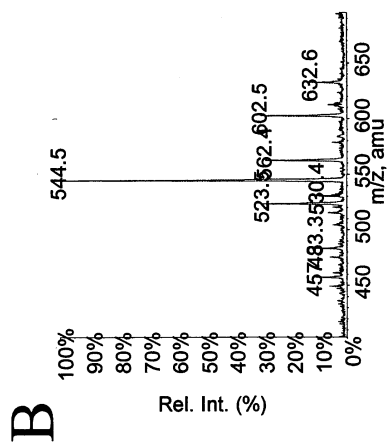
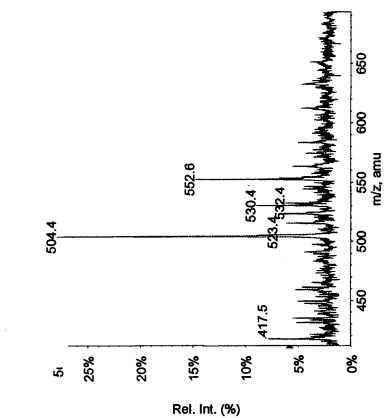


圖 5 / 26

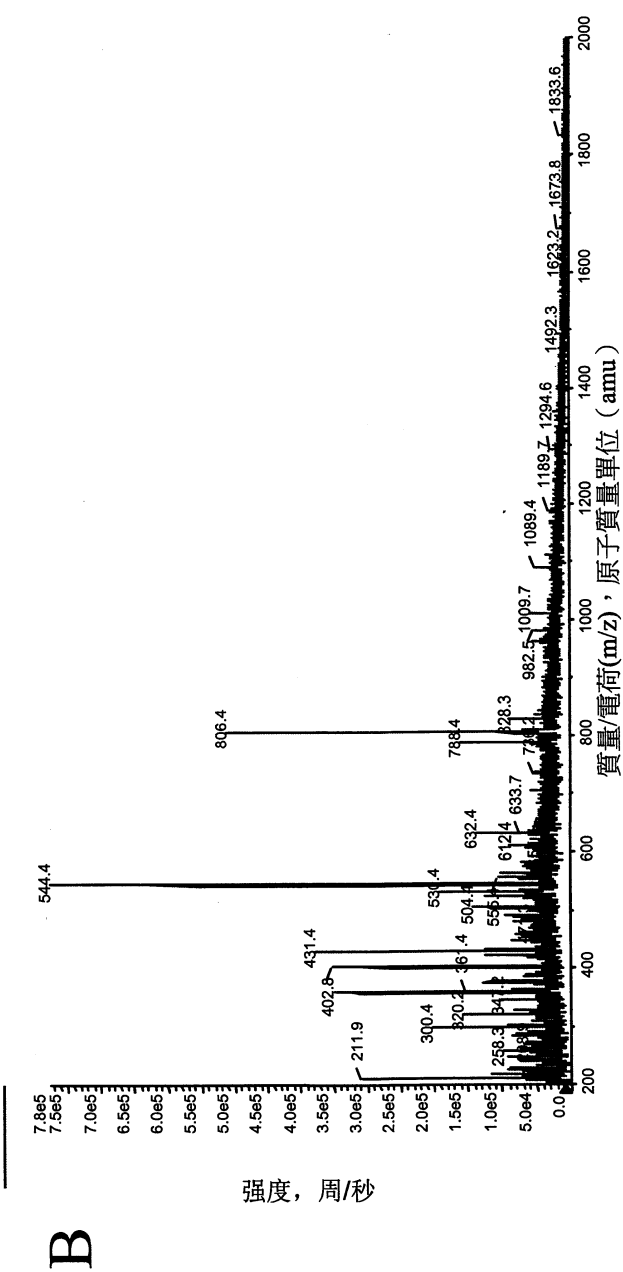
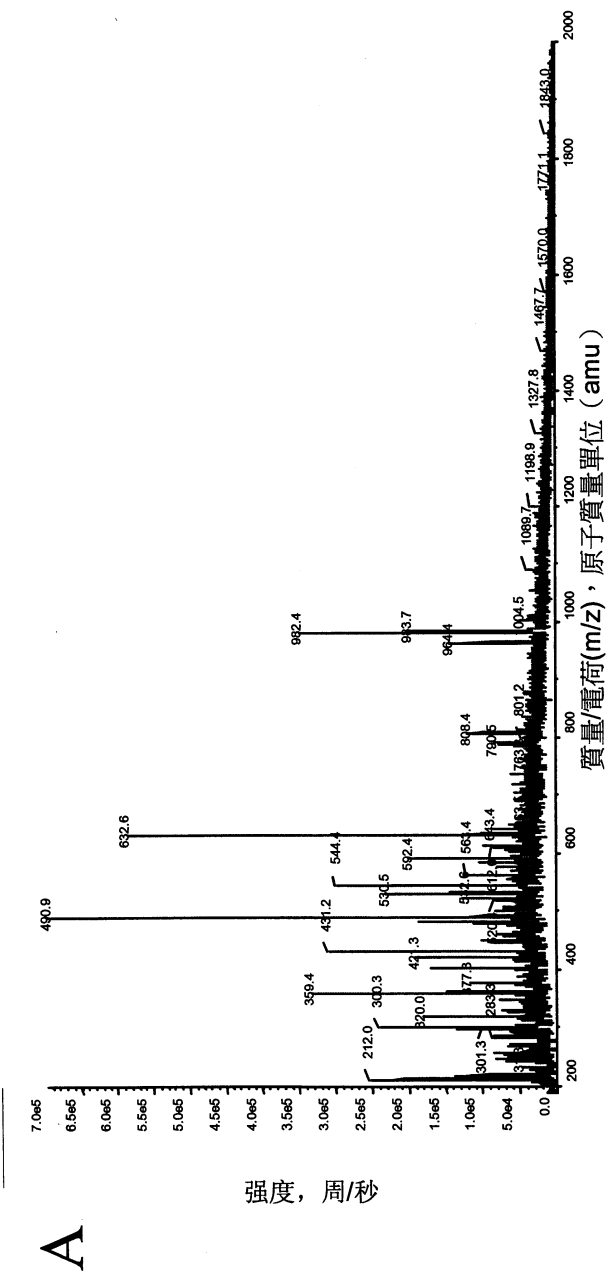
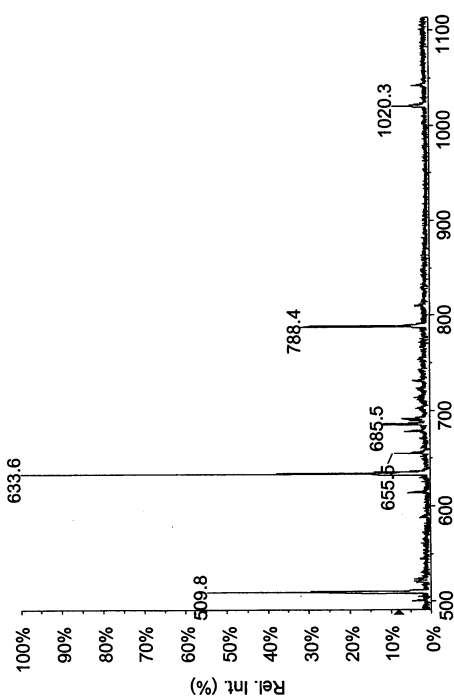
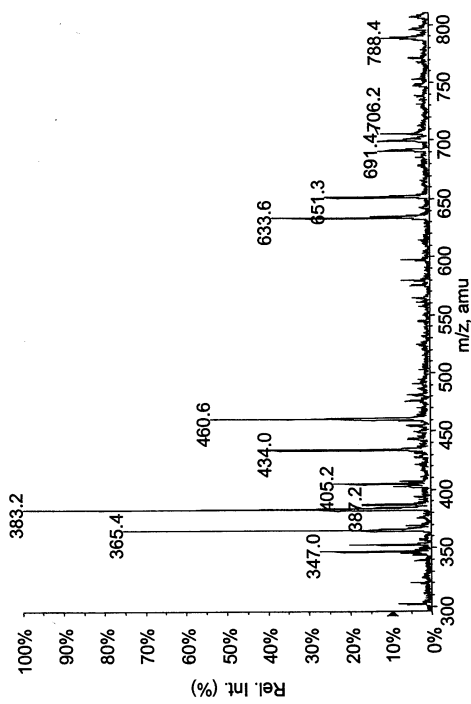


圖 6 / 26

A



B



7/26

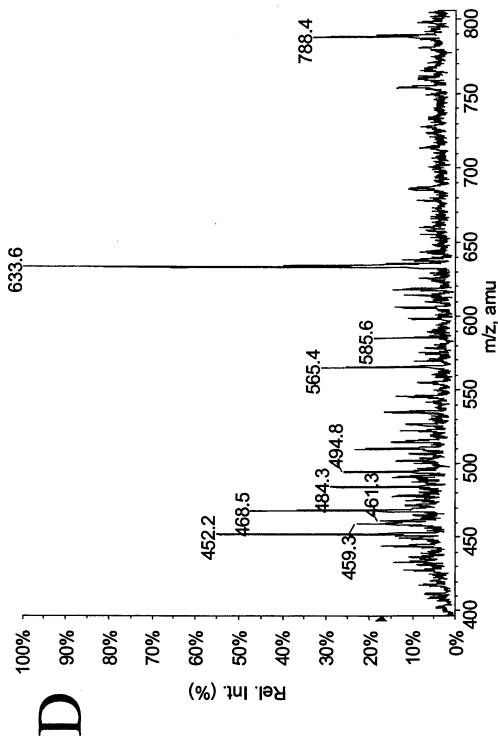
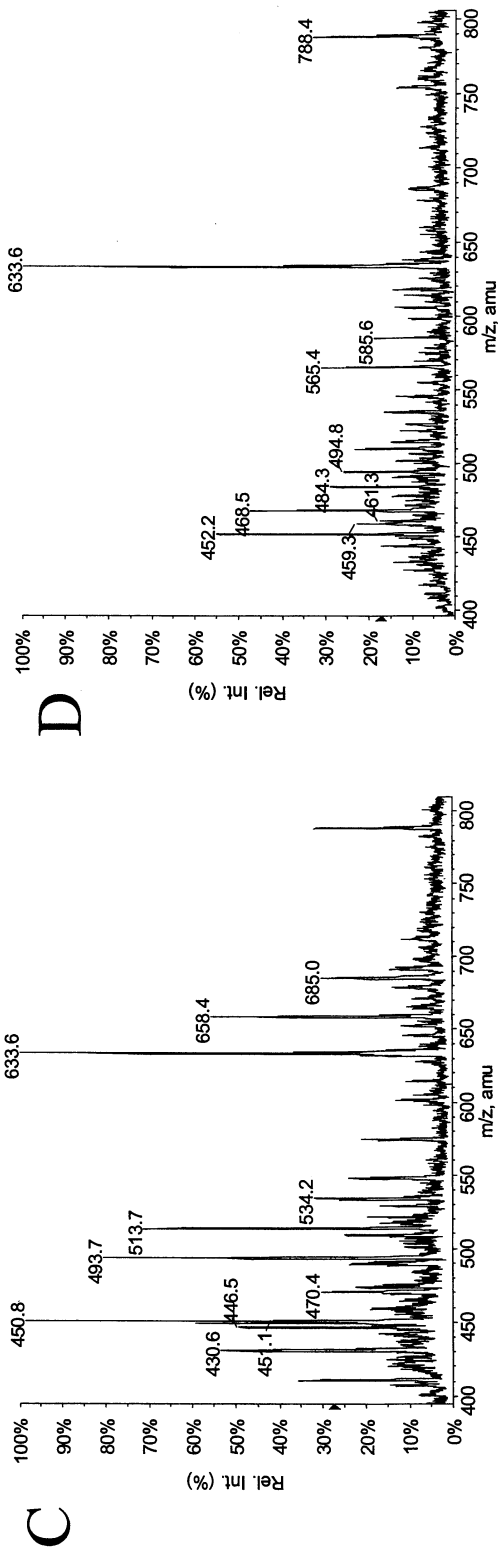
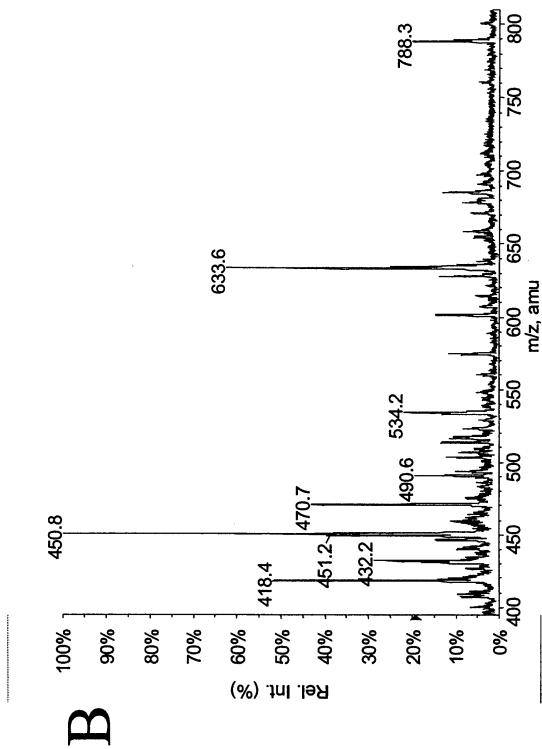
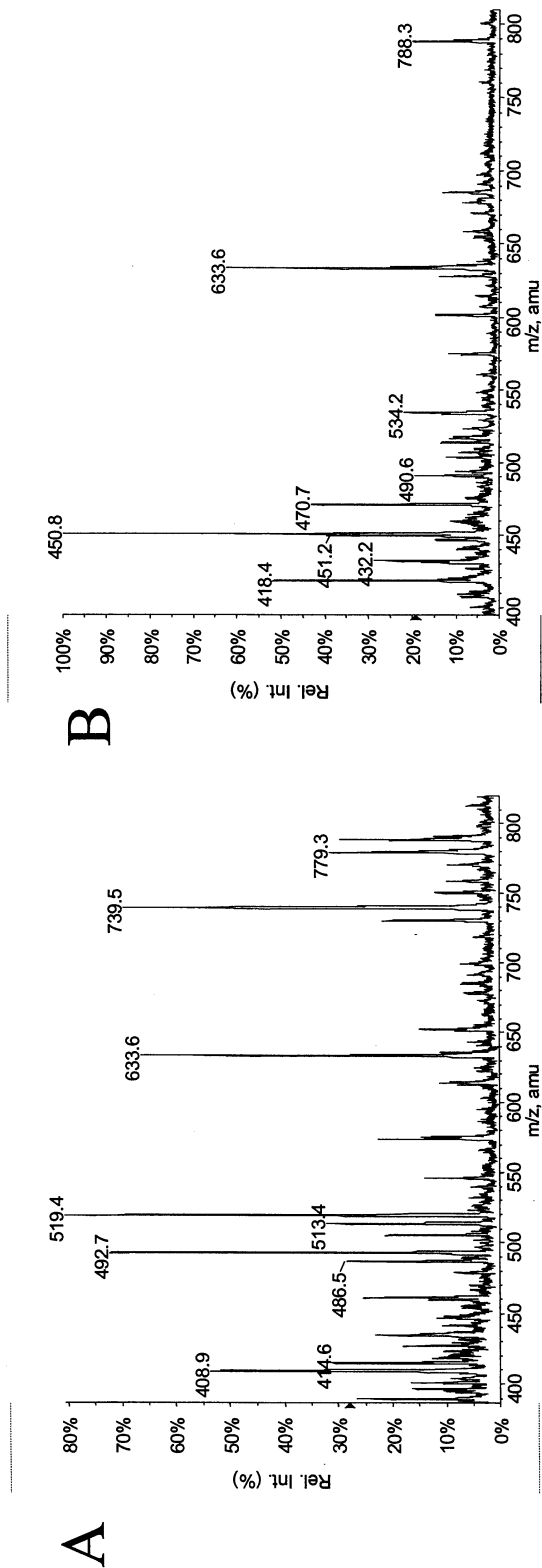


圖 8 / 26

對照者尿內a果糖相對水平

果糖 ^b	Q1/Q3 ^c	平均數 ^d	標準差
UA	523/173	0.1480	0.1119
HNac	550/173	0.0036	0.0028
HNacS	630/256	0.0016	0.0007
HNacS2	710/256	0.0030	0.0018
HNac-UA	726/331	0.0155	0.0196
(HNac, UA)	726/173	0.0063	0.0072
(HNS, UA)	764/173	0.0736	0.0295
HNS-UA	764/331	0.1148	0.1041
(HNac, UA, S)	806/173	0.0003	0.0003
UA-HNacS	806/295	0.1941	0.1198
HNacS-UA	806/331	0.0999	0.0882
UA-HN-UA (S)	940/269	0.0294	0.0106
UA-HNac-UA (S)	982/269	0.0111	0.0120
UA-HNac-UA (S)	490/173	0.0045	0.0029
UA-HNac-UA (S)	490/476	0.0305	0.0161
UA-HN-UA (S2)	1020/269	0.0026	0.0013
UA-HN-UA (S2)	1020/940	0.0018	0.0015
UA-HN-UA (S2)	509/422	0.0011	0.0018
HNac-UA-HNac (S2)	544/173	0.0507	0.0345
HNac-UA-HNac-UA (S)	1185/931	0.0099	0.0080
HNac-UA-HNac-UA (S)	591/173	0.2024	0.1818
HNac-UA-HNac-UA (S2)	632/298	0.0556	0.0358
UA-HNac-UA-HNac-UA (S2)	720/269	0.0024	0.0024
HNac-UA-HNac-UA-HNac	734/173	0.0044	0.0027
HNac-UA-HNac-UA-HNac (S3)	515/173	0.0291	0.0112
未知	528/448	0.0195	0.0082
己糖	764/256	0.0007	0.0006

^a 對照 = 26

^b UA=糖醛酸, HN=氨基己糖, HNac=N-乙醯己糖胺, S=硫酸鹽, 框架內結構序列未知

^c 用於進行對所選擇寡糖進行MRM分析的質荷比值。

^d 與內部標準相對比的寡糖信號參考比值

GlcNAc6S (d3) (用於單糖) 及二糖類軟骨素 α-AUA-[1-3]-GalNAc-6S (用於雙糖及更大分子寡糖的).

與對照組比較e MPS 亞型d用於寡糖分析的 Mann Whitney U值,

寡糖	MPS I	MPS II	MPS IIIA	MPS IIIB	MPS IIIC	MPS IIID	MPS IVA	MPS VI	MS
	15	13	12	7	2	2	6	10	1
UA	184	156.5	136	75	19.5 ^c	24.5	70	83	2
HNAC	128	123.5	99	79	40	26	53	106	5
HNACs	73 ^b	101 ^c	67 ^b	53	27	0 ^c	0 ^b	0 ^b	5.5
HNACs2	85 ^b	127	60 ^b	58	22	14	30 ^c	7 ^b	4
HNAC-UA	170.5	134.5	117	43 ^c	29	21	51	55 ^b	3
(HNAC, UA)	170	123	86 ^c	77	23.5	10	39	62 ^c	5
(HNS, UA)	5 ^b	4 ^b	31 ^b	49.5	25	1 ^c	32 ^c	104	0
HNS-UA	114.5 ^c	17 ^b	0 ^b	51	44.5	1 ^c	42	75.5	0
(HNAC, UA, S)	150	71.5 ^b	81.5 ^c	26 ^b	50	6	54	86	5
UA-HNACs	0 ^b	0 ^b	120.5	80	42	2 ^c	67	115	8
HNACs-UA	194	152	154	76	38	0 ^c	1 ^b	4 ^b	3
UA-HN-UA (S)	15.5 ^b	140	139.5	91	35.5	9	63	77	0
UA-HNAC-UA (S)	0 ^b	53 ^b	146	88	35	21	70.5	90	7
UA-HNAC-UA (S)	75.5 ^b	153	140	65	45	5	38	108	7
UA-HNAC-UA (S)	0 ^b	8 ^b	140	51	36	23	67.5	128	5
UA-HN-UA (S2)	169	52 ^b	66 ^b	40 ^c	7 ^b	21	37 ^c	48 ^b	9
UA-HN-UA (S2)	86.5 ^b	134	113.5	81	48	22	71	115	1
UA-HN-UA (S2)	24 ^b	136	69 ^b	76	46	22	75	96	0
HNAC-UA-HNAC (S2)	109 ^c	78 ^b	133.5	78	46	10	15.5 ^b	62 ^c	5
HNAC-UA-HNAC-UA (S)	0 ^b	134	64 ^b	0 ^b	22	3 ^c	10 ^b	29 ^b	0
HNAC-UA-HNAC-UA (S)	61 ^b	68 ^b	128	34 ^c	37	11	56	118.5	13
HNAC-UA-HNAC-UA (S2)	5 ^b	130	31 ^b	5 ^b	28	0 ^c	10.5 ^b	0 ^b	0
UA-HNAC-UA-HNAC-UA (S2)	61.5 ^b	131	101.5	71.5	31	8	70	122.5	2
HNAC-UA-HNAC-UA-HNAC	188	76.5 ^b	90 ^c	63	27	17	50	108	4
HNAC-UA-HNAC-UA-HNAC (S3)	167	55.5 ^b	125	44.5 ^c	50	17	68	105	11
未知	60.5 ^b	54 ^b	43 ^b	57	24	8.5	41	110	2
己糖	0 ^b	0 ^b	13 ^b	1 ^b	3 ^b	0 ^c	2 ^b	8 ^b	0

UA=糖醛酸, HN=己糖, HNAC=N-乙醯己糖, S=硫酸鹽, 框架內結構顯示的是未知序列。

b p<0.01

c p<0.5

d MP S 型曲線下方顯示的是患者標本數量。

圖 10 / 26

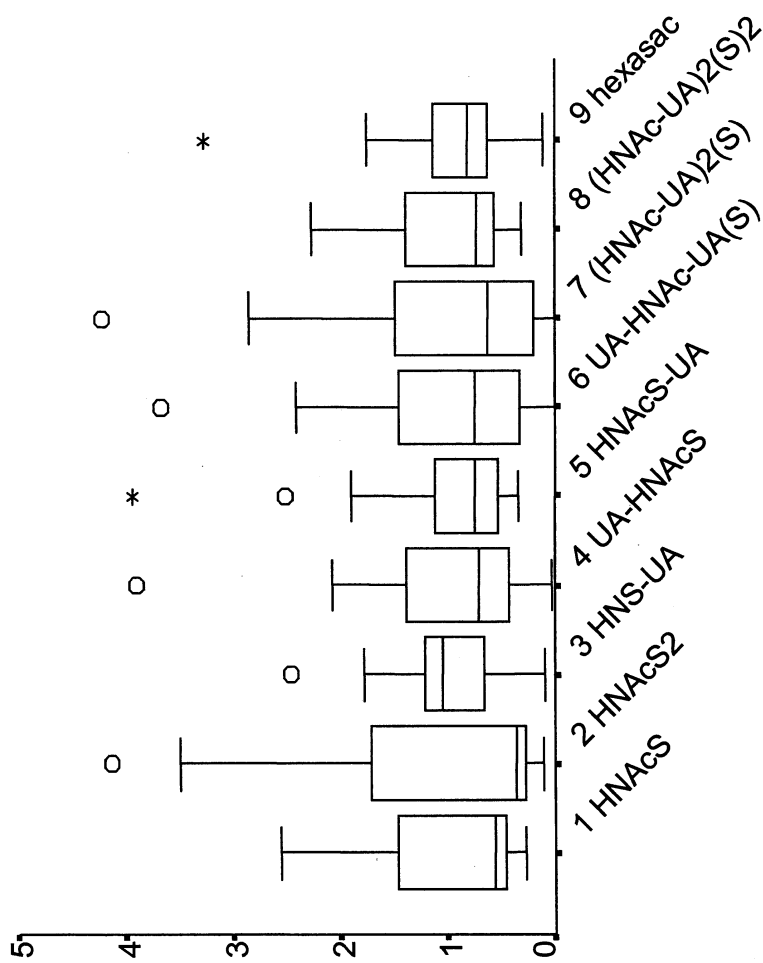


圖 11 / 26

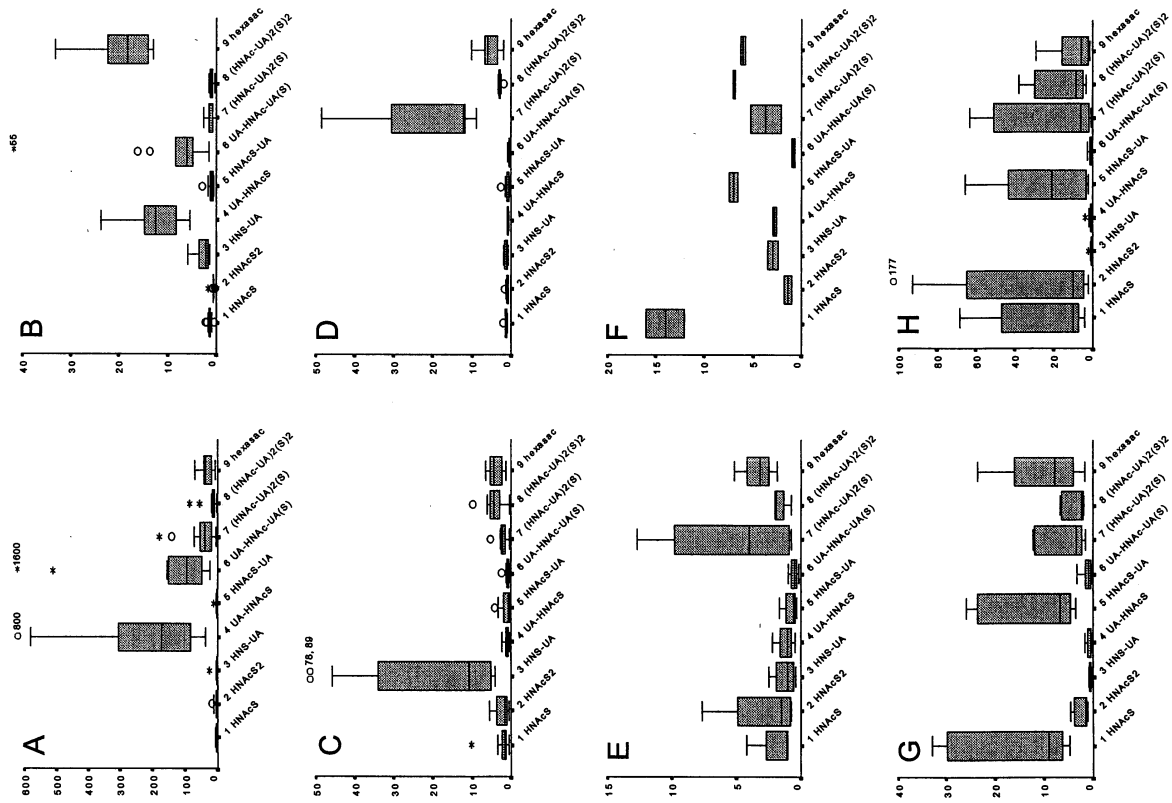


圖 12 / 26

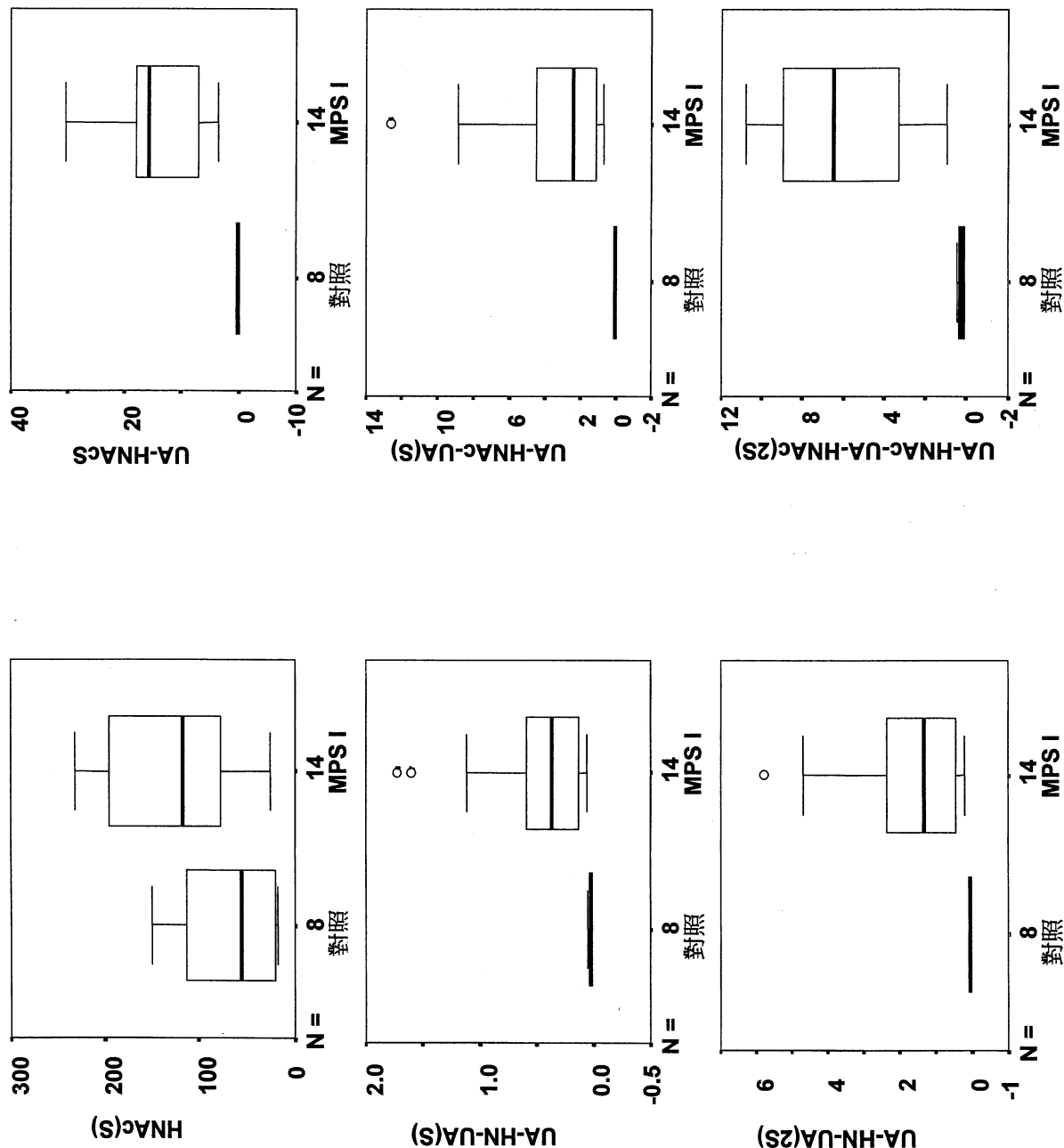


圖 13 / 26

細胞株	疾病	UAHNUA(Sx2)
SF 5344	對照	0.034
SF 5248	對照	0.030
SF 2662	MPS I (中度)	0.090
SF 5048	MPS I (重度)	0.379
SF 538	MPS I (重度)	0.387

1 每毫克細胞蛋白內寡糖相對水平

UA = 糖醛酸; HN = 己糖胺

圖 14 / 26

基因型	632/298 (MRM)	982/269 (MRM)	940/269 (MRM)	1020/269 (MRM)	509/422 (MRM)	806/295 (MRM)
W402X _{hom}	30.8	93.6	14.0	4.8	20.0	111.8
W402X, Q70X	5.4	10.9	1.0	3.3	1.0	51.4
W180X, c134-145del	5.6	5.7	0.55	0.69	1.6	25.2
P533R, W402X	4.4	5.7	0.67	0.32	1.1	40.9
R89Q, 1060+2t>c	3.4	2.7	0.13	0.33	0.89	11.3
R89Q, 1060+2t>c	5.4	2.2	0.19	0.19	1.0	10.5
L346R, c704ins5	2.7	1.5	0.21	0.18	0.68	9.1
對照範圍 (n=26)	0.07-0.9	0.07-0.6	0.02-0.2	0-4.0	0-0.6	0.03-0.5

圖 15 / 26

寡糖 ¹	MRM 離子對	骨隨移植前	骨隨移植後 (3個月)	骨隨移植後 (8個月)	對照 均數 (N=8)	對照 標準差
UA-HN-UA (S×2)	509/422	2.31	0.63	0.59	0.05	0.03
HNAc(S)	630/256	192	165	139	68	52
UA-HNAc(S)	806/295	13.93	8.39	2.12	0.04	0.02
UA-HN-UA (S)	940/269	0.49	0.21	0.19	0.03	0.02
UA-HNAc-UA (S)	982/269	2.58	1.86	1.05	0.06	0.04
UA-HNAc-UA-HNAc (S×2)	632/298	9.34	4.51	2.57	0.23	0.16

¹UA=糖醛酸; HN=己糖胺; S=硫酸鹽; HNAc=乙酰己糖胺

圖 16 / 26

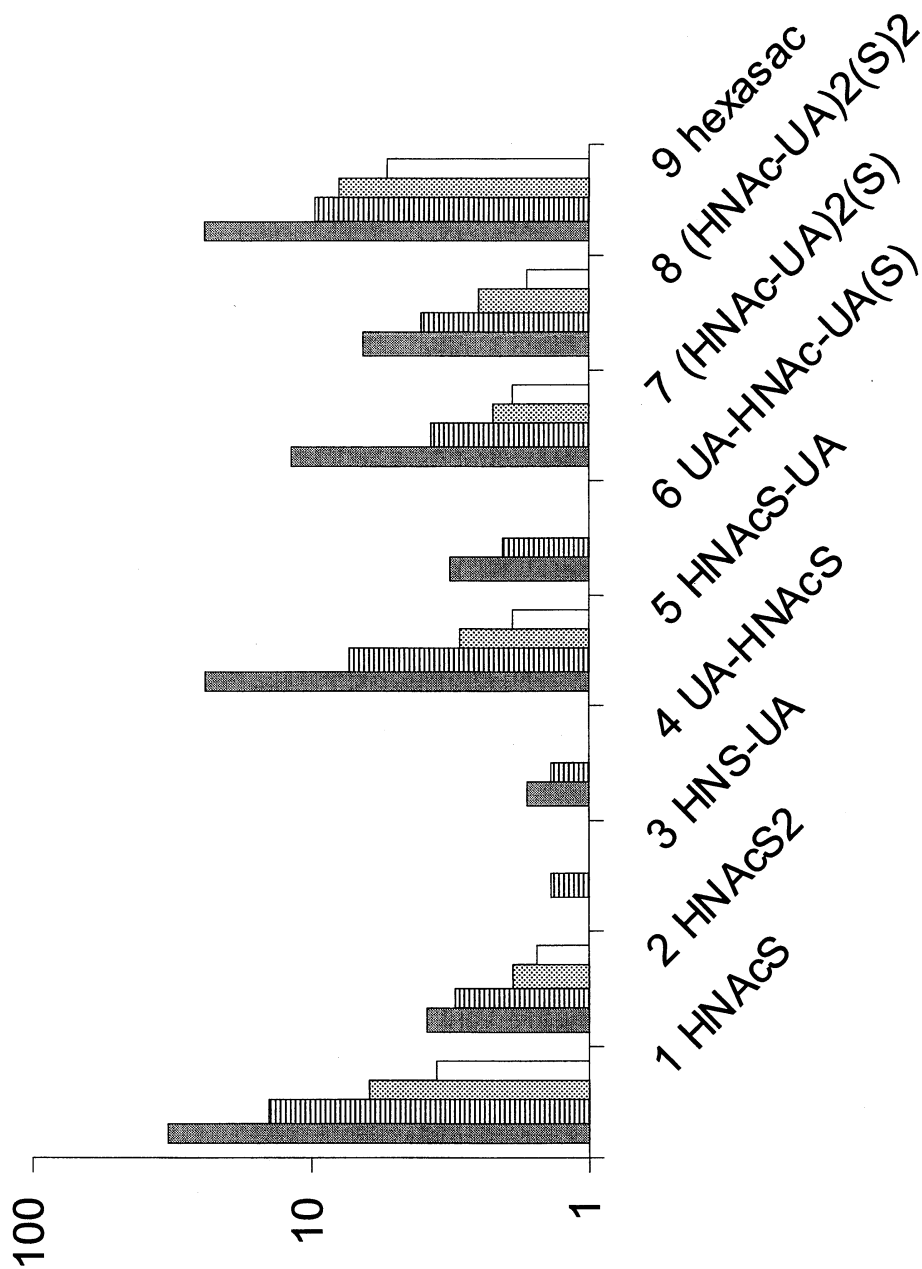


圖 17 / 26

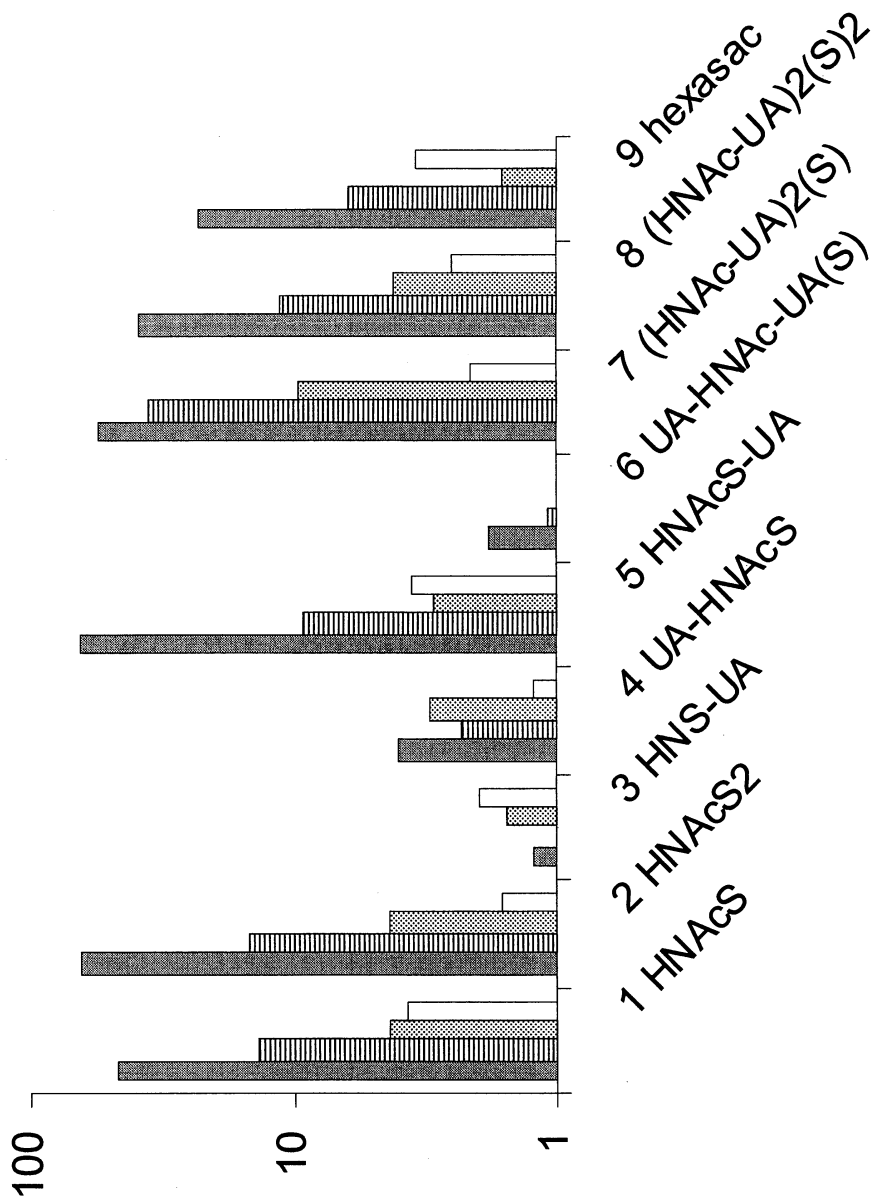


圖 18 / 26

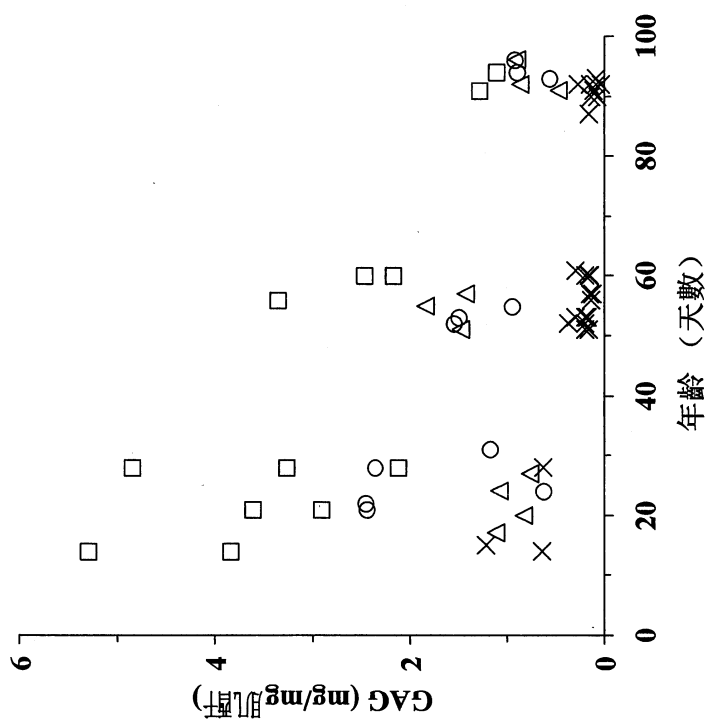


圖 19 / 26

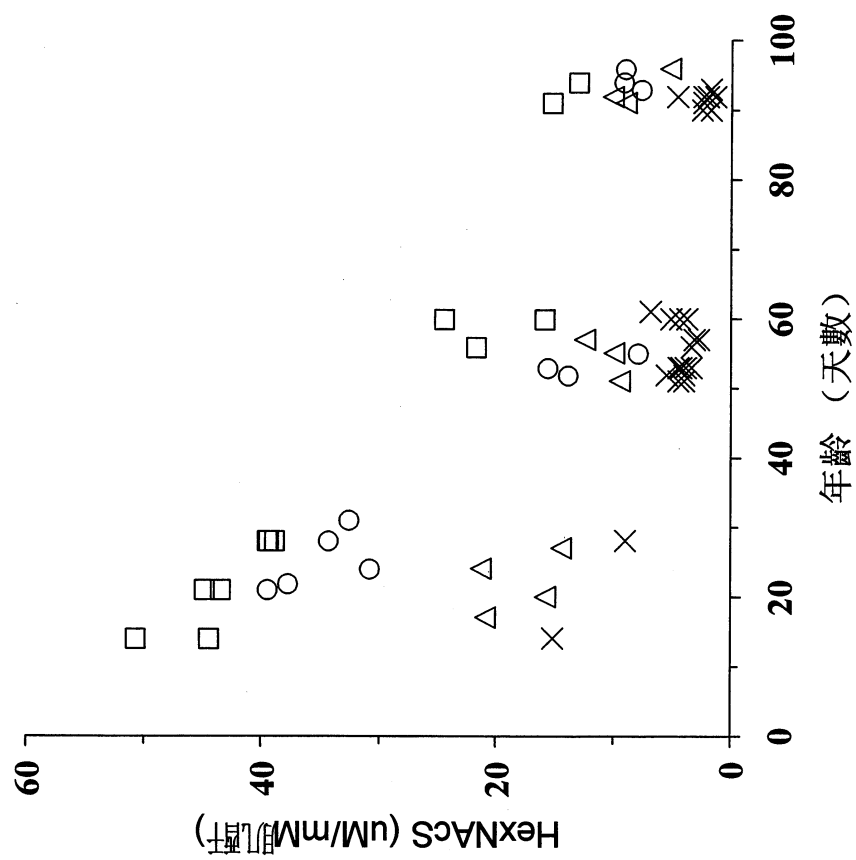


圖 20 / 26

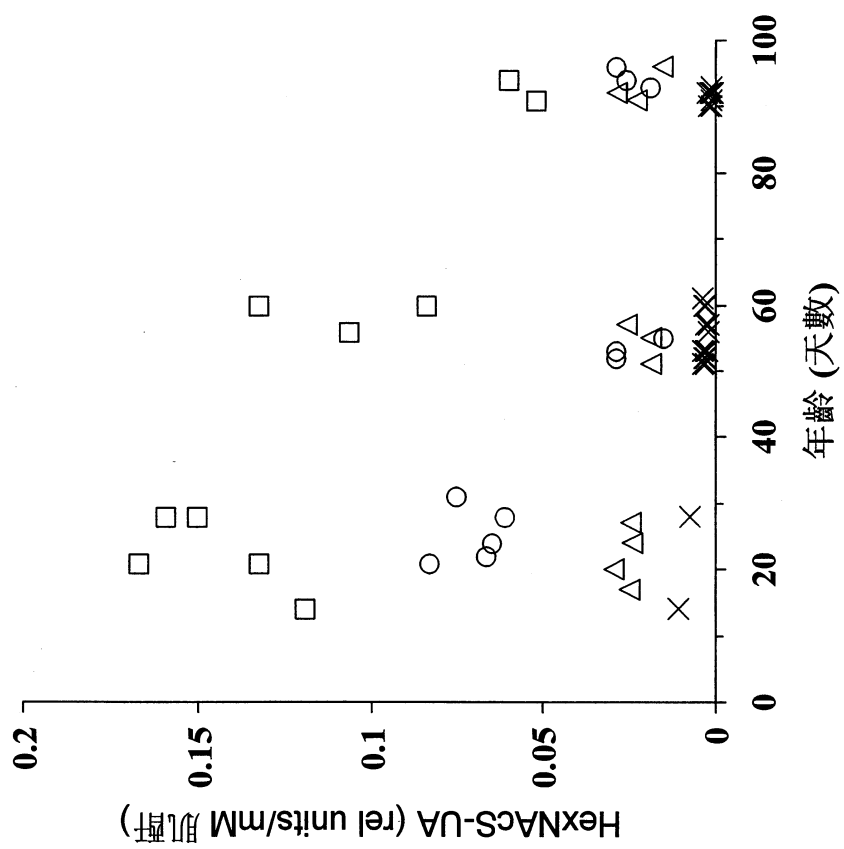


圖 21 / 26

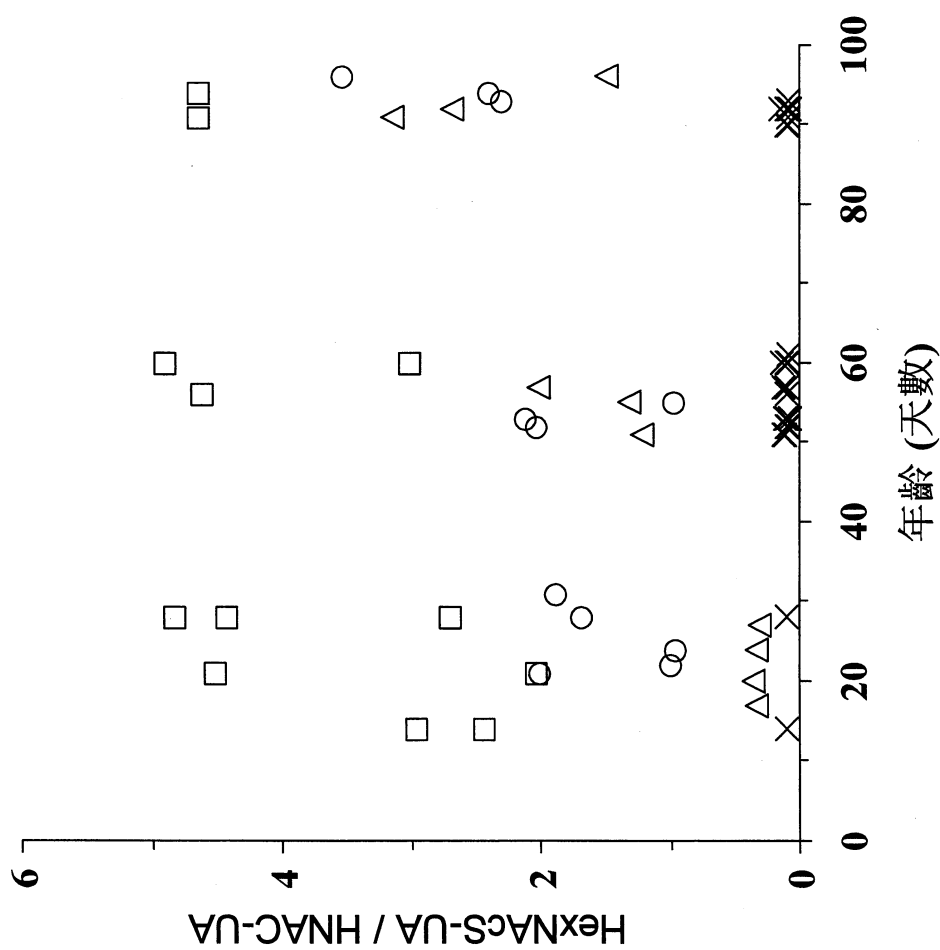


圖22 / 26

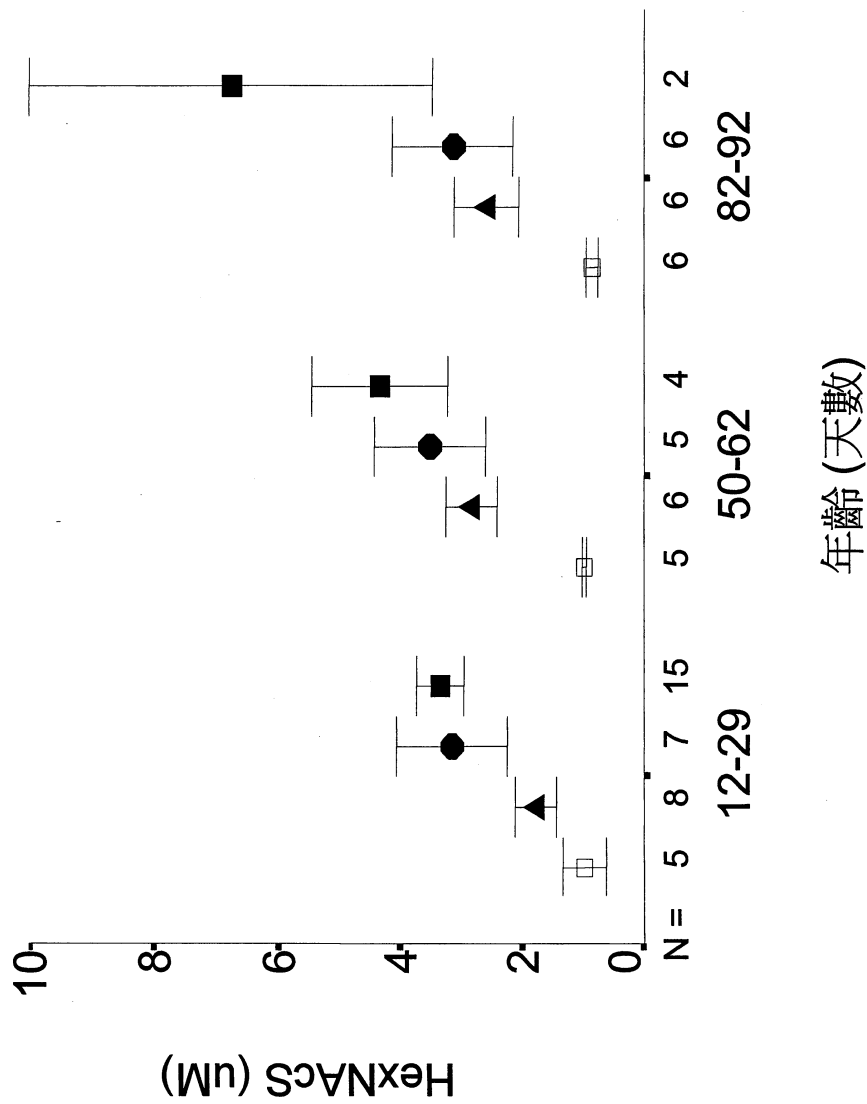


圖 23 / 26

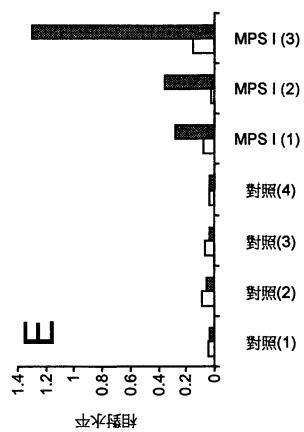
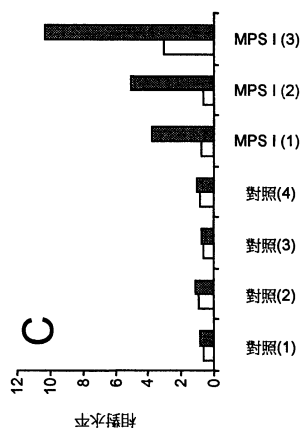
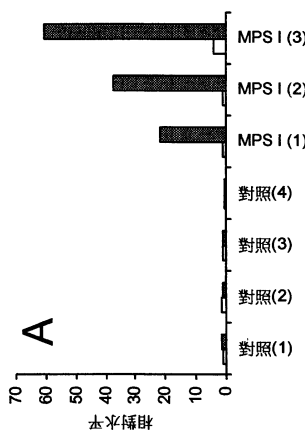
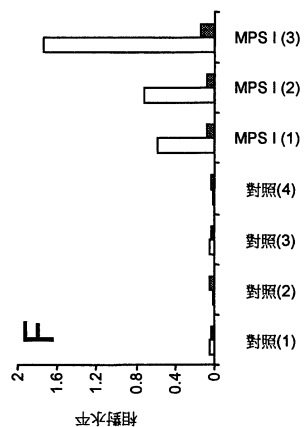
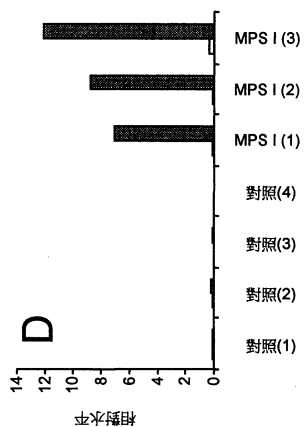
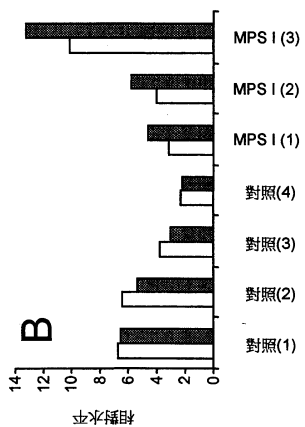


圖 24 / 26

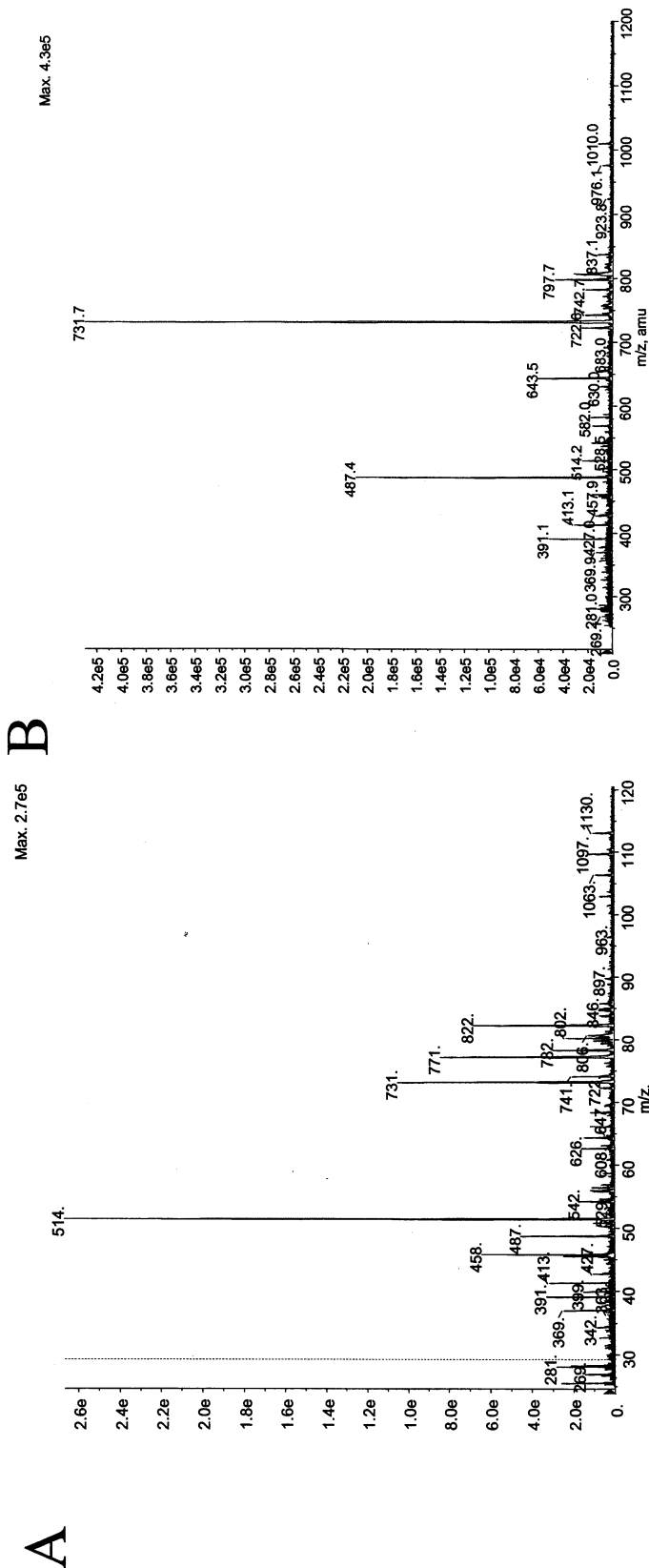


圖 25 / 26

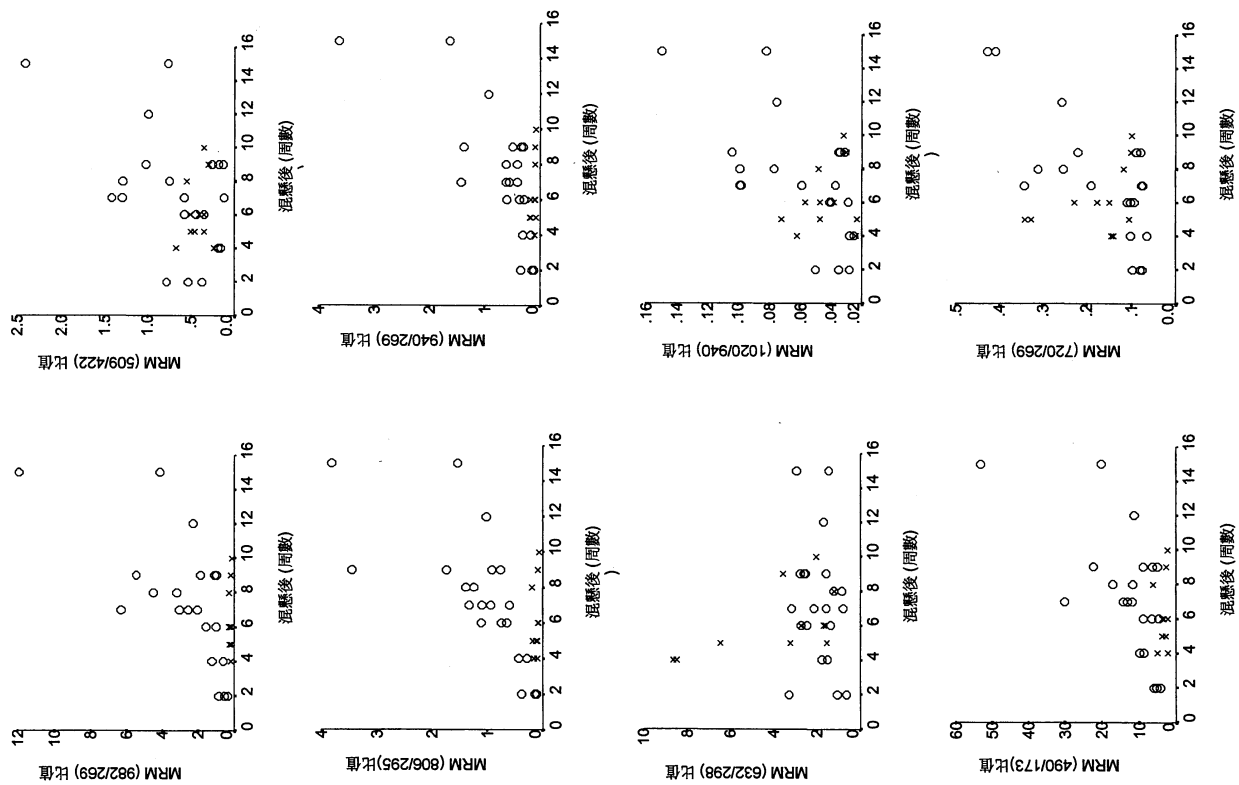
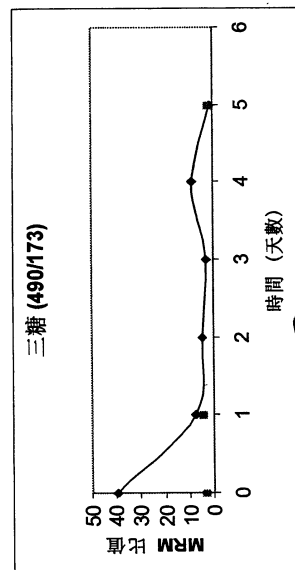
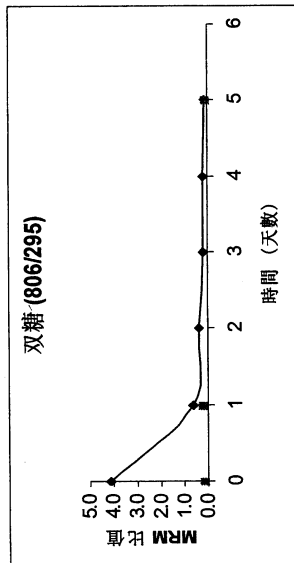
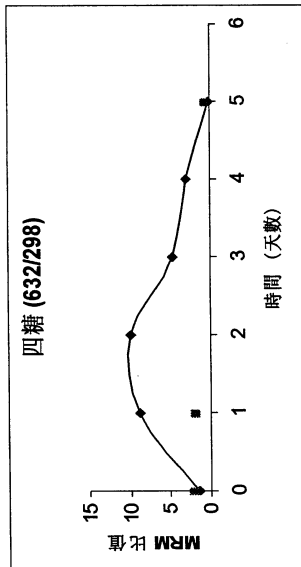
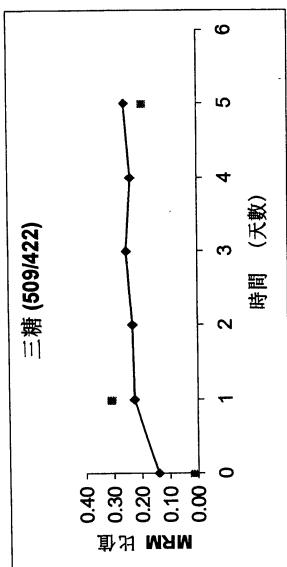
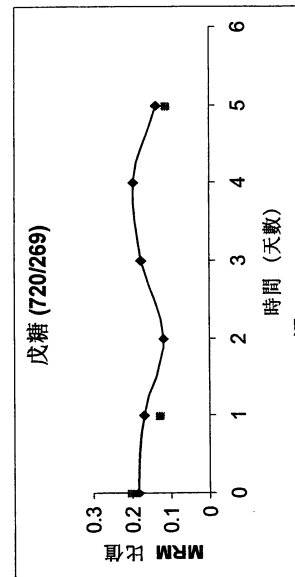
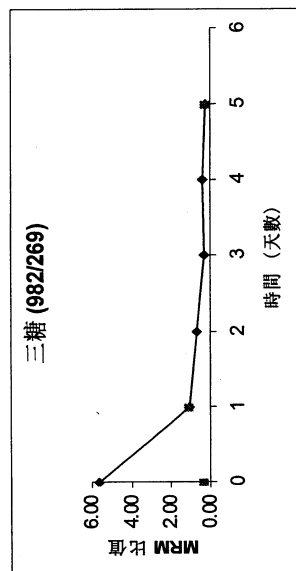
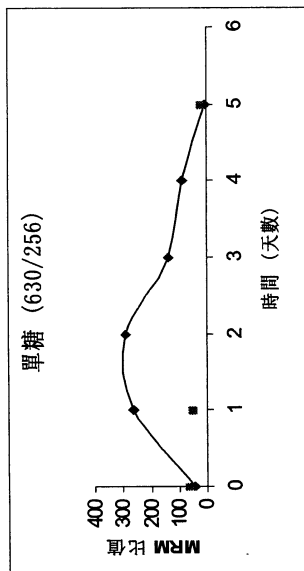
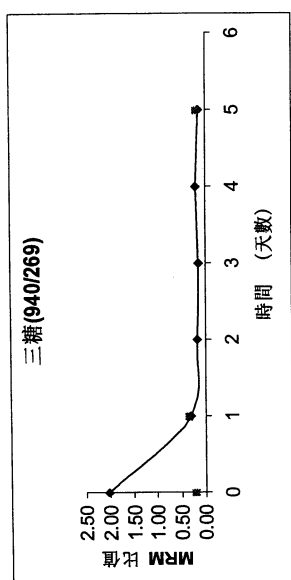


圖 26 / 26



柒、指定代表圖：

- (一)本案指定代表圖為：第(22)圖。
- (二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：