(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 878 194**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2016** **PCT/ES2016/070637**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017** **WO17042416**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2016** **E 16843721 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021** **EP 3349007**

(54) Título: **Método para separar la fracción asociada con glucosaminoglicanos y usos del mismo**

(30) Prioridad:

10.09.2015 ES 201531297

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2021

(73) Titular/es:

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (33.3%)
Área de Valorización Transferencia y Emprendimentio Edificio Emprendía Campus Vida, s/n
15782 Santiago de Compostela (a Coruña), ES;
SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (SERGAS) (33.3%)
y
FUNDACION INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (33.3%)

(72) Inventor/es:

ALONSO SAMPEDRO, MANUELA;
ÁLVAREZ GONZÁLEZ, VÍCTOR;
COLÓN MEJERAS, CRISTÓBAL;
GARCÍA GONZÁLEZ, MIGUEL A. y
LAMAS GONZÁLEZ, OLAYA

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 878 194 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para separar la fracción asociada con glucosaminoglicanos y usos del mismo

Campo de la invención

La presente invención está comprendida en el campo de la glucobiología. En particular, se refiere a un método para separar, en muestras biológicas, la fracción asociada con glucosaminoglicanos sulfatados, particularmente una fracción que contiene exosomas, y las aplicaciones del mismo en biomedicina.

Antecedentes de la invención

Los glucosaminoglicanos (GAG) son polisacáridos grandes no ramificados formados por la repetición de secuencias de disacáridos, en los que uno de los componentes es siempre un aminoazúcar (D-galactosamina o D-glucosamina) y el otro componente es un ácido urónico, tal como L-glucurónico o L-idurónico, con la excepción del queratán sulfato. Excepto por ácido hialurónico, todos los GAG tienen grupos sulfato, tales como O-ésteres o N-sulfato.

Los GAG son parte de proteoglicanos y lípidos. Los proteoglicanos son un tipo específico de glicoproteínas que tienen al menos una cadena de GAG unida a la proteína, y se clasifican basándose en la cadena de GAG presente.

La glicosilación de moléculas es un proceso enzimático postraduccional llevado a cabo en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Las reacciones de glicosilación se realizan por enzimas denominadas glicosiltransferasas a partir de precursores de monosacáridos de origen endógeno y exógeno.

Las enfermedades relacionadas con alteraciones congénitas en la glicosilación incluyen mucopolisacaridosis (MPS). Las MPS son un grupo heterogéneo de errores del metabolismo innato provocados por la deficiencia de cualquiera de las enzimas necesarias para la degradación de los GAG. Los GAG no degradados generalmente se excretan parcialmente en la orina, pero el resto se acumula en los lisosomas. Esta acumulación provoca alteraciones celulares e interferencias en otros procesos metabólicos con graves consecuencias para el cuerpo humano, conduciendo a daño de células, tejidos y órganos.

Hasta ahora se han descrito siete tipos de MPS con varios subtipos que implican 11 enzimas específicas. Cada tipo de MPS tiene signos y síntomas no específicos, y algunas alteraciones consideradas “características”, aunque aún requieren realizar un diagnóstico preciso de estas enfermedades mediante la determinación de la actividad enzimática implicada, y en el mejor de los casos, realizar la identificación molecular del gen afectado. Por lo general, son difíciles de detectar en recién nacidos, y un diagnóstico temprano y preciso de MPS es crítico para proporcionar una atención paliativa adecuada, y cuando sea posible, un tratamiento específico para la enfermedad (terapia de reemplazo enzimático, trasplante de células madre hematopoyéticas, entre otros).

El diagnóstico de la mayoría de las MPS no es fácil y se basa principalmente en hallazgos clínicos. Una vez que se establece una sospecha, el médico puede contar con ciertas pruebas analíticas tales como análisis de GAG en orina y cuantificación de la actividad enzimática en tejidos (sangre o fibroblastos). Finalmente, el médico puede solicitar la realización de técnicas de biología molecular para confirmar la posible alteración genética.

Se han usado métodos colorimétricos que miden el aumento de GAG en comparación con los niveles esperados de GAG en individuos normales de la misma edad para cuantificar GAG totales en orina. Para este propósito, se han usado colorantes tales como azul alcián (Bhavanandan *et al.* 1996. Clin. Chim. Acta, 251(2):207-214). También se han descrito varios ensayos en los que se usa azul de dimetilmetileno (DMB) como colorante. Los GAG se unen a DMB y el compuesto que se forma se detecta por medio de espectrofotometría. No obstante, el aislamiento del complejo GAG-DMB que se forma no tiene lugar (Whitley C. Am.B. *et al.* 1989. Clin. Chem. 35(3):374-379; Jong J.G.N. *et al.* 1992. Clin. Chem. 38(6):803-807; Colón Mejeras C. 2015. Acta Pediatr. Esp. 73(3):56-59). Sin embargo, tienen un alto porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, y debido a su baja especificidad, no permiten discriminar entre los diferentes tipos de GAG.

El contenido de GAG también se ha cuantificado usando DMB en muestras de miocardio (Braunlin E. *et al.* 2006. Pediatric Res. 59(1):27-32), corteza cerebral y cerebelo (Salim S. Clin. El-Amouri *et al.* 2014. Mol Ther, 22(12):2028-2037), piel y tejido muscular (Barbosa I. *et al.* 2003. Glycobiology, 13(9):647-653), y cartílago (Müller G. *et al.* 1996. Conn. Tissue Res. 33(41):243-248).

Se han dado a conocer métodos mejorados para cuantificar GAG (Farndale R. Clin. *et al.* 1986. Biochimica et Biophysica Acta, 883(2):173-177) basados en el uso de DMB junto con polisacaridasas para cuantificar GAG sulfatados individuales.

Se han desarrollado kits que comprenden DMB para detectar y cuantificar GAG (Biocolor: “Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay; Manual de Internet”, 2012: 1-12) en el que el tinte azul DMB se vuelve rosa brillante cuando se une a GAG sulfatados.

Sin embargo, ninguno de estos métodos da a conocer el uso de DMB para separar exosomas de una muestra biológica.

También se han desarrollado métodos para someter a ensayo GAG específicos que buscan identificar los tipos de GAG que se excretan en exceso y ayudar a proporcionar un mejor diagnóstico, dado que los diferentes tipos de MPS están asociados con el aumento de la excreción de GAG específicos. Los que destacan más entre estos métodos son los métodos cromatográficos, tales como HPLC, que, a pesar de ser sensibles y específicos, no son adecuados para el cribado masivo debido al alto coste y al largo tiempo de análisis requerido; métodos de ELISA que están disponibles comercialmente para ciertos tipos de GAG, pero no se han desarrollado para detectar todos los GAG; y métodos de espectrometría de masas en tándem que tienen el inconveniente de ser complejos debido a la heterogeneidad molecular de los GAG y la dificultad de aplicarlos para el cribado en masa.

También se han desarrollado métodos de despolimerización de GAG que miden los residuos de ácido hexurónico que tienen todos los GAG (excepto el queratán sulfato). Esta medición se realiza directamente en el líquido de diálisis, después de fraccionar la muestra en una columna de celulosa ECTEOLA (que separa GAG sulfatados de GAG no sulfatados), o después de precipitarla con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de cetilpiridinio (CPC) o aminoacridina. Estos métodos consumen mucho tiempo y proporcionan resultados apenas reproducibles debido a la interferencia de otros cromógenos, o debido a la pérdida de algunas fracciones de GAG en tratamientos previos.

También existen enfermedades relacionadas con alteraciones adquiridas en la glicosilación, tales como enfermedades renales. Las enfermedades renales adquiridas o congénitas son una preocupación de salud pública importante en todo el mundo. Un estudio prospectivo reciente realizado en los Estados Unidos indica que el 54% de los adultos entre 30-49 años de edad, el 52% de los adultos entre 50-64 años de edad y el 42% de los adultos mayores de 65 años de edad, se ven afectadas por enfermedad renal crónica, y se espera un aumento de entre el 13,2 % y el 14,4 % en 2020, y se espera un aumento del 16,7 % en 2030. El diagnóstico de dicha enfermedad se basa en medir una serie de parámetros clínicos en orina (tasa de filtración glomerular o TFG calculada a través de los niveles de creatinina, cistatina C o inulina, proteinuria, hematuria, etc.), técnicas de obtención de imágenes (principalmente ultrasonidos, tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética nuclear (RMN)), y patología anatómica (por medio de biopsias obtenidas de manera invasiva). Todos ellos tienen un poder de diagnóstico diferencial limitado y ninguno es capaz de anticipar la progresión de la enfermedad renal con el tiempo de una manera precisa y eficaz. Estas herramientas tienen además especificidad y sensibilidad limitadas.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos métodos para detectar y separar las fracciones asociadas con los GAG que contienen exosomas que superen los inconvenientes de los métodos conocidos hasta ahora, que permitan un diagnóstico rápido, sensible, fiable, rentable y menos invasivo en las primeras etapas de la enfermedad, que puedan usarse para el cribado masivo en recién nacidos y que permitan detectar y/o pronosticar enfermedades tales como MPS o una enfermedad renal.

Breve descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un nuevo método para separar la fracción asociada con glucosaminoglicanos sulfatados (GAG) en muestras biológicas. Este método permite estudiar alteraciones en la glicosilación de GAG de una manera que es simple, rápida y rentable y requiere una cantidad muy pequeña de muestra (microlitros). Este método tiene diversas aplicaciones en biomedicina, tal como en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades que se producen con alteraciones en los niveles de GAG, en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico de estas enfermedades, en el seguimiento de la patología o del tratamiento de las mismas, etc. Los métodos convencionales requieren grandes volúmenes de muestra y muchas etapas previas.

El método de la presente invención se basa en el hecho de que los GAG, dependiendo del tejido en el que se encuentran, tienden a asociarse con otras moléculas, ya sea por motivos funcionales o como resultado de interacciones mecánicas. Aunque las interferencias en las mediciones debidas a otras moléculas que se purificaron invariablemente junto con GAG ya se han descrito en algunos ensayos del estado de la técnica, nadie ha examinado una aplicación práctica posterior con respecto a esta asociación.

Particularmente, la presente invención se refiere a la capacidad del colorante azul de dimetilmetileno (DMB) a pH ácido para producir complejos con GAG sulfatados, dando lugar a la formación de turbidez, seguido rápidamente por la precipitación de este complejo DMB-GAG en aproximadamente 15 minutos. Después de la centrifugación, el precipitado contiene solo la fracción unida o asociada con GAG sulfatados. El resto se elimina de la muestra. Este precipitado puede usarse entonces para analizar la fracción mediante diversas técnicas, tales como electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción con un colorante para ver proteínas, tal como Sypro Ruby. Las bandas obtenidas en la electroforesis pueden identificarse por medio de inmunotransferencia de tipo Western o también pueden escindirse para su identificación por medio de proteómica.

El método de la invención combina la propiedad de DMB de unirse específicamente a y precipitar GAG sulfatados con técnicas de análisis de proteínas y/o lípidos. Al detectar fracciones específicamente glicosiladas con GAG, este método

tiene un potencial muy alto, ya que puede usarse en estudios en los que la glicación/glicosilación desempeña un papel importante y puede permitir descubrir nuevos biomarcadores de diagnóstico, biomarcadores de pronóstico o biomarcadores para el seguimiento de patologías, nuevas dianas terapéuticas y nuevas vías de comunicación celular.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para separar glucosaminoglicanos (GAG) sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra tal como se define en las reivindicaciones 1 a 3.

Los aspectos segundo y tercero de la invención se refieren a un método de identificación *in vitro* para identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra tal como se define en las reivindicaciones 4 y 5.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método de identificación *in vitro* para identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados de una muestra tal como se define en la reivindicación 6.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para detectar una alteración en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados de una muestra tal como se define en la reivindicación 7.

La invención también se refiere a métodos de diagnóstico, métodos para determinar el pronóstico o para monitorizar la progresión de enfermedades asociadas con una alteración (aumento o disminución) de uno o más GAG sulfatados tal como se define en las reivindicaciones 8 a 12.

La invención también se refiere al uso del método de los aspectos segundo, tercero, cuarto o quinto para identificar biomarcadores de proteínas o lípidos asociados con GAG sulfatados.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit que comprende azul de dimetilmetileno (DMB) a una concentración comprendida entre 0,01 y 100 mM a un pH comprendido entre 2 y 6,9 para separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra, siendo dicha fracción una fracción que contiene exosomas; para identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra en un método según la invención; para identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados de una muestra en un método según la invención; para detectar una alteración en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados en un método según la invención; para diagnosticar una enfermedad en un método según la invención; para determinar el pronóstico de una enfermedad en un método según la invención; para monitorizar la progresión de una enfermedad en un método según la invención; o para detectar complejos formados por exosomas, GAG sulfatados y una proteína.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Estructuras moleculares de los glucosaminoglicanos (GAG) condroitín sulfato, queratán sulfato, hialuronato, dermatán sulfato y heparán sulfato.

Figura 2: Estructura molecular del DMB. A) cloruro de 3,7-bis-(dimetilamino)-1,9-dimetildifenotiazin-5-io, B) sal de cloruro de zinc de 3,7-bis-(dimetilamino)-1,9-dimetildifenotiazin-5-io doble.

Figura 3: Diagrama de la invención y sus aplicaciones en biomedicina. DMB, azul de dimetiletileno; min, minutos; ta, temperatura ambiente; GAG: glucosaminoglicanos.

Figura 4: SDS-PAGE que representa el patrón de bandas de proteínas unidas a GAG en la orina de individuos de control (16 varones y 16 mujeres, 30-49 años de edad), y la identificación de la uromodulina por medio de inmunotransferencia de tipo Western.

Figura 5: Electroforesis bidimensional (tiras de pH 3-6 y geles de PAGE al 7,5 %) de la orina precipitada con DMB en dos controles masculinos individuales, y la identificación de la uromodulina por medio de inmunotransferencia de tipo Western.

Figura 6: El patrón de las bandas de proteínas totales y las bandas de proteínas en la fracción unida a GAG en la orina y el suero de los individuos de control con insuficiencia renal (izquierda). Identificación de la albúmina unida a GAG presente por medio de inmunotransferencia de tipo Western. IR, individuos con insuficiencia renal; ST, marcador de peso molecular; Alb, albúmina; S, suero no precipitado; O, orina no precipitada; D, suero u orina precipitados con DMB.

Figura 7: Unión de uromodulina y/o albúmina comerciales con GAG comerciales (heparán, condroitín y dermatán sulfato) en PBS (c y d) u orina libre de uromodulina (a y b) de un paciente con una mutación de truncamiento en el gen de la uromodulina. a) Carril 1, orina no precipitada; carril 2, orina precipitada con DMB; carril 3, orina con uromodulina comercial añadida y precipitada con DMB; carriles 4, 5 y 6, orina con uromodulina comercial añadida, incubada con heparán, condroitín y dermatán sulfato, respectivamente, y precipitada con DMB; b) carril 1, orina no precipitada; carril 2, orina precipitada con DMB; carril 3, orina con albúmina comercial añadida y precipitada con DMB; carriles 4, 5 y 6, orina con albúmina comercial añadida, incubada con heparán, condroitín y dermatán sulfato, respectivamente, y precipitada con DMB; c) carril 1, uromodulina no precipitada comercial; carril 2, uromodulina

comercial precipitada con DMB; carriles 3, 4 y 5, uromodulina comercial incubada en PBS con heparán, condroitín o dermatán sulfato, respectivamente, y precipitada con DMB; d) carril 1, albúmina no precipitada comercial; carril 2, albúmina comercial precipitada con DMB; carriles 3, 4 y 5, albúmina comercial incubada en PBS con heparán, condroitín y dermatán sulfato, respectivamente, y precipitada con DMB; St, marcador de peso molecular.

Figura 8: El patrón de bandas de proteínas unidas a glucosaminoglicano en la orina de pacientes con mucopolisacaridosis (MPS) y sus respectivos controles (sexo y edad similares a los pacientes), así como la identificación de uromodulina y albúmina por medio de inmunotransferencia de tipo Western. A) MPS I, paciente femenino de 4 años de edad con MPS I; I-1, I-2, I-3 y I-4, controles sanos de la misma edad y sexo que el paciente con MPS I; MPS VII, paciente femenino de 6 años de edad con MPS VII; VII-1, control sano de la misma edad y sexo que el paciente con MPS VII. MPS II, pacientes masculinos de 6 y 8 años con MPS-II; II-1, II-2, II-3, II-4, II-5, controles sanos de la misma edad y sexo que los pacientes con MPS-II. B). MPS III, pacientes masculinos de 1 y 10 años con MPS III, respectivamente; III-1, III-2, III-3, III-4, III-5 y III-6, controles sanos de la misma edad y sexo que los pacientes con MPS III. MPS IV, paciente masculino de 17 años de edad, y dos pacientes masculinos de 14 años con MPS IV, respectivamente; IV-1, IV-2, IV-3, IV-4, controles sanos de la misma edad y sexo que los pacientes con MPS IV. Los niveles totales de glucosaminoglicano (mg/mmol de creatinina) medidos por el método convencional con DMB se muestran en la parte superior, los valores que son más altos que el valor de referencia se muestran en gris, y los valores normales se muestran en negro. ST, marcador de peso molecular.

Figura 9: Electroforesis bidimensional (tiras de pH 3-6 y gel de SDS-PAGE al 7,5 %) de la orina precipitada con DMB de pacientes con MPS.

Figura 10: El perfil de proteínas asociadas con GAG en la orina de individuos de control, pacientes con PKD de tipo 1 y pacientes con PKD de tipo 2. La primera columna representa los marcadores de peso molecular. Las siguientes siete columnas muestran la uromodulina precipitada con GAG después de la incubación con DMB y la desnaturalización (se cargan 30 μl de proteína precipitada por columna) en muestras de diferentes pacientes con PKD1 o PKD2. Creat, creatinina.

Figura 11: Diferencias observadas en el perfil de proteínas unidas a GAG entre los sobrenadantes de orina y sus respectivos sedimentos celulares a medida que la función renal se deteriora gradualmente.

Figura 12: La identificación y caracterización de los complejos UMOD-GAG-exosoma (UGE) por medio de imágenes de microscopía electrónica (a), tamaño (b), potencial zeta (c) e inmunotransferencia de tipo Western (d) de exosomas purificados y precipitados con DMB, donde se cargan 30 μl de proteína precipitada por columna. Las primeras 3 columnas de la figura 12(d) pertenecen a exosomas purificados por ultracentrifugación, y las columnas 4 y 5 pertenecen a exosomas purificados por medio de gradiente con un kit comercial (ExoQuick_TC, System Biosciences). ID, código de paciente, Creat, creatinina; Pel, sedimento de células de orina de un voluntario sano; Ur, sobrenadante de orina de un voluntario sano; C-, sobrenadante de orina de un individuo con ADMCKD (enfermedad renal quística medular autosómica dominante con mutación conocida en el gen de la uromodulina); C+, control positivo con 1 μg de uromodulina comercial (glicoproteína Tamm Horsfall humana, Biomedical-BTI).

Figura 13: La purificación de complejos UGE por medio de diversos enfoques tales como precipitación por centrifugación o gravedad (a) y aislamiento en gradiente (b)

Figura 14: Ensayos de rotura de complejos UGE por medio de tratamiento con DTT (a) y/o filtración (b y c). a) Carriles 1 y 5, exosomas purificados no precipitados con DMB; carriles 2 y 6, exosomas purificados precipitados con DMB, carriles 3 y 7, sobrenadante de las fracciones de exosomas; carriles 4 y 8, los mismos sobrenadantes precipitados con DMB. b) Carril 1, exosomas purificados y filtrados no precipitados con DMB; carril 2, exosomas purificados y filtrados precipitados con DMB; carriles 3 y 4, sobrenadantes de las fracciones de exosomas filtrados que se filtran y precipitan con DMB, respectivamente; carriles 5 y 6, exosomas purificados no precipitados y precipitados con DMB, respectivamente; carriles 7 y 8, sobrenadantes de las fracciones de exosomas no precipitados y precipitados con DMB, respectivamente. c) Carriles 1-4, fracción celular restante después de la purificación de exosomas que se precipitan con DMB, se tratan con DTT, o se tratan con DTT y se precipitan con DMB, respectivamente; carril 5, exosomas purificados y filtrados tratados con DTT; carril 6, exosomas purificados y filtrados tratados con DTT y precipitados con DMB; carriles 7 y 8, sobrenadantes de las fracciones de exosomas filtrados y tratados con DTT con o sin precipitación con DMB, respectivamente.

Figura 15: Representación esquemática de los complejos UGE con las posibles asociaciones entre los tres elementos que los forman. a) Exosomas asociados con GAG a través de uromodulina, b) exosomas asociados directamente con GAG sin necesidad de uromodulina como puente.

Figura 16: Los complejos UGE desaparecen a medida que progresa la enfermedad renal. Se muestra un gel representativo de 3 pacientes con enfermedad renal poliquística provocada por mutaciones en el gen de PKD2; a) carriles 1, 4 y 7, sobrenadantes de la fracción de exosomas no precipitados; carriles 2, 5 y 8, fracción de exosomas no precipitados; carriles 3, 6 y 9, fracción de exosomas precipitados con DMB; St, marcador de peso molecular. b) Imágenes de microscopía electrónica de los complejos UGE en un individuo con función renal normal (izquierda) y la

ausencia de complejos UGE en un individuo sin uromodulina y con daño renal (derecha).

Figura 17: Separación de los GAG libres en orina precipitada con DMB en geles de acetato de celulosa. C+, mezcla de condroitín sulfato (Con), dermatán sulfato (Der) y heparán sulfato (Hep) comercial precipitados con DMB; carriles MPS I, MPS II, MPS III y MPS IV, orina de pacientes con mucopolisacaridosis I, II, III y IV, respectivamente, precipitada con DMB; carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, orina de individuos sin mucopolisacaridosis de diferentes edades (1 mes de edad, 7 meses de edad, 1 año de edad, 3 años de edad, de 4 años de edad, de 6 años de edad y 7 años de edad, respectivamente) precipitada con DMB, donde el único GAG presente es condroitín sulfato. Que, la banda correspondiente al queratán sulfato característico de MPS IV.

Descripción detallada de la invención

Método de separación para separar GAG sulfatados

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* (denominado “primer método de la invención”) para separar los glucosaminoglicanos (GAG) sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) poner en contacto una muestra con el colorante azul de dimetilmetileno (DMB) a un pH ácido comprendido entre 2 y 6,9;

b) incubar la mezcla de a) a una temperatura comprendida entre 0ºC y 40ºC durante el tiempo requerido para la formación de un precipitado;

c) retirar el sobrenadante; y

d) recuperar el precipitado que contiene GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados,

en el que la fracción asociada con GAG sulfatados es una fracción que contiene exosomas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “glucosaminoglicano” o “GAG”, también denominado mucopolisacárido, se refiere a un heteropolisacárido formado por repeticiones de unidades de disacárido. Los glucosaminoglicanos son cadenas lineales en las que los enlaces β 1 $\rightarrow$ 3 se alternan con enlaces β 1 $\rightarrow$ 4 de un ácido urónico (D-glucurónico o L-idurónico) unido por medio de un enlace β 1 $\rightarrow$ 3 a un aminoazúcar (N-acetil-glucosamina o N-acetilgalactosamina). Los GAG se diferencian según la naturaleza de las unidades de disacárido que los forman, la longitud de la cadena de disacáridos (10-150 unidades), y sus modificaciones (N-sulfatación, O-sulfatación, N-acetilación, o epimerización de las unidades de sacáridos). Los siguientes siete GAG destacan entre los de interés biológico: ácido hialurónico (HA), condroitín-4-sulfato (C4S), condroitín-6-sulfato (C6S), dermatán sulfato (DS) o condroitín sulfato B, queratán sulfato (KS), heparán sulfato (HS) y heparina (HEP). Tienen una alta densidad de carga eléctrica negativa debido a la introducción de grupos ácidos (carboxilo, sulfatos esterificados y sulfamida) en su estructura. Experimentan grados variables de sulfatación, donde el sulfato esterificado a OH alcohólico aumenta su carácter polianiónico. El número de cargas negativas por unidad de disacárido varía entre 1, en el caso de ácido hialurónico y queratán sulfato, y 4 en el caso de heparina. La figura 1 muestra la estructura de los GAG mejor conocidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “glucosaminoglicano sulfatado” o “GAG sulfatado”, también denominado mucopolisacárido sulfatado, se refiere a aquellos GAG que tienen al menos un grupo sulfato. Con la excepción del ácido hialurónico, todos los GAG están sulfatados. Por lo tanto, los GAG sulfatados que pueden separarse según el método de la presente invención incluyen, sin limitación, condroitín-4-sulfato (C4S), condroitín-6-sulfato (C6S), dermatán sulfato (DS) o condroitín sulfato B, queratán sulfato (KS), heparán sulfato (HS) y heparina (HEP).

Los GAG sulfatados pueden encontrarse en una muestra en forma libre, o unidos o asociados con otros componentes. Los “GAG sulfatados libres” se entienden como los GAG que no están unidos ni asociados con ningún otro componente. Además, sin embargo, también pueden encontrarse GAG sulfatados unidos a otros compuestos, formando glicoconjugados, tales como glicoproteínas, proteoglicanos y lípidos unidos o asociados con GAG.

Tal como se usa en el presente documento, el término “glicoproteína” o “glucoproteína” se refiere a una molécula que habitualmente está formada por uno o más oligosacáridos unidos covalentemente a cadenas polipeptídicas laterales específicas. Habitualmente, tienen un mayor porcentaje de proteínas que hidratos de carbono. En el contexto de la presente invención, al menos uno de los hidratos de carbono que forman la glicoproteína debe ser un GAG sulfatado. Los tipos más comunes de glicoproteínas que se encuentran en las células eucariotas se definen según la naturaleza de las regiones de unión a proteína, donde los de tipo N y O son los más comunes. Los N-glicanos son una cadena de oligosacáridos unida covalentemente a un residuo de asparagina de una cadena polipeptídica dentro de una secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, generalmente a través de N-acetilglucosamina (Glc-NAc). Los O-glicanos son una cadena de oligosacáridos unida covalentemente a un residuo de serina o treonina (Ser/Thr-O), generalmente a través

de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

Tal como se usa en el presente documento, el término “proteoglicano” o “PG” se refiere a un tipo específico de glicoproteínas que tienen al menos una cadena de GAG unida a la proteína y se clasifican basándose en la cadena de GAG presente. En el contexto de la presente invención, los GAG unidos a la proteína deben ser GAG sulfatados. El heparán sulfato y el condroitín sulfato son los GAG más comunes de los proteoglicanos. Muchos proteoglicanos contienen además otros glicanos unidos por enlaces de tipo N- u O-glucosídico. Estos compuestos pueden variar en cuanto a su distribución tisular, la naturaleza de la proteína central, su función y los GAG fijados a los mismos. El contenido de hidratos de carbono es mayor que el contenido de glucoproteínas, alcanzando hasta el 95 % del peso del mismo en algunos casos, y tanto la secuencia como la disposición de los dominios estructurales que los forman están altamente conservadas y ligeramente glicadas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “lípido unido a o asociado con GAG” se refiere a una molécula formada por uno o más GAG sulfatados unidos a lípidos por medio de un enlace covalente, o asociados con ellos de cualquier otra manera.

Tal como se usa en el presente documento, “fracción unida a GAG sulfatados de una muestra” se entiende como cualquier compuesto que está unido a GAG sulfatados por medio de un enlace covalente. Ejemplos de estos compuestos son, sin limitación, glucoproteínas que contienen GAG sulfatados y proteoglicanos. La fracción unida a GAG sulfatados puede ser una fracción proteica. La fracción unida a GAG sulfatados puede ser una fracción lipídica.

Tal como se usa en el presente documento, “fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra” se entiende como cualquier compuesto o estructura que no está unido a GAG sulfatados por medio de un enlace covalente, sino que más bien los GAG sulfatados y el compuesto o la estructura se mantienen juntos por medio de interacciones de otro tipo, tales como interacciones iónicas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones de Van der Waals o puentes de hidrógeno, entre otros. En el contexto de la presente invención, la fracción asociada con GAG sulfatados es una fracción que contiene exosomas, más preferiblemente una fracción que contiene exosomas y una o más proteínas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “exosomas” se refiere a nanovesículas extracelulares pequeñas (50-200 nm) rodeadas por una membrana, originándose dichas nanovesículas a partir de la ruta endocítica y liberándose por diferentes tipos de células en la mayoría de los fluidos biológicos, incluyendo orina. También se secretan por células *in vitro*. Sus funciones incluyen, entre otros, tráfico de receptores de membrana y ARN intercelular, inducción de inmunidad y presentación de antígenos, modulación de la mineralización ósea y respuestas antiapoptóticas. Sus membranas son ricas en proteínas implicadas en el transporte y la fusión, así como lípidos tales como colesterol, esfingolípidos, ceramidas, etc. Los exosomas se identifican porque muestran un intervalo de densidad de entre 1,13 y 1,19 g/ml cuando se separa en un gradiente de sacarosa, y porque poseen una serie de marcadores tales como CD63, CD81, CD9, ALIX, FLOT1, ICAM1, EpCam, ANXA5, TSG101 y Hsp70 que pueden detectarse, por ejemplo, por medio de anticuerpos. La fracción asociada con GAG sulfatados de la invención puede ser un exosoma de cualquier tipo de muestra, por ejemplo, sin limitación, un exosoma de medios de cultivo celular, sangre, orina, líquido amniótico y fluido ascítico. En una realización preferida, los exosomas se aislaron de la orina. Los métodos para aislar exosomas de muestras y fluidos biológicos los conoce bien un experto en la técnica.

Los inventores han identificado diversos complejos formados por exosomas y una o más proteínas en muestras de orina, tal como se demuestra en la tabla II en la parte experimental. En una realización particular, la fracción asociada con GAG sulfatados es un complejo formado por uromodulina (o una variante de la misma) y exosomas. En otra realización particular, la fracción asociada con GAG sulfatados es un complejo formado por albúmina (o una variante de la misma) y exosomas. En otra realización particular, la fracción asociada con GAG sulfatados es un complejo formado por IgA (o una variante de la misma) y exosomas. En otra realización particular, la fracción asociada con GAG sulfatados es un complejo formado por IgG (o una variante de la misma) y exosomas.

En el contexto del primer método de la invención, el término “muestra” se refiere a cualquier tipo de muestra que contiene o es susceptible de contener GAG sulfatados. En una realización preferida, la muestra es una muestra biológica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra biológica” se refiere a cualquier material que se origina de un ser humano, animales o plantas que puede almacenar información relacionada con su dotación genética. Ejemplos de muestras biológicas que pueden usarse en la presente invención son, sin limitación, muestras de orina, suero, plasma, tejidos, células, exosomas, líquido sinovial, humor vítreo, líquido cefalorraquídeo, piel, mucosa intestinal, fluido peritoneal, pared arterial, hueso, cartílago, tejido embrionario y cordón umbilical, etc. En una realización preferida, la muestra biológica es una muestra de orina. En otra realización preferida, la muestra biológica es una muestra de exosomas, preferiblemente una muestra de exosomas previamente aislados de un sujeto, más preferiblemente una muestra de exosomas aislados de la orina de un sujeto. En otra realización preferida, la muestra biológica es una muestra de suero o plasma.

La muestra se obtiene en las condiciones y en el receptáculo que funcionan mejor para preservar la integridad de dicha muestra. En el caso de la orina, debe recogerse la segunda orina de la mañana, desechando la primera orina,

en recipientes libres de proteasa. En el caso de la sangre, debe recogerse en un tubo adecuado dependiendo de si el trabajo se realizará con suero (un tubo STII o bioquímico) o con plasma (tubo con anticoagulante, por ejemplo, heparina).

Después de la recogida, la muestra de partida se procesa según su naturaleza, y particularmente antes del posible almacenamiento. En el caso de orina, debe realizarse la separación de la fracción celular no soluble y su sobrenadante. En el caso de muestras de sangre, la fracción celular debe separarse del suero o plasma según condiciones estándar.

La muestra debe conservarse a bajas temperaturas, idealmente a -80ºC. Los ciclos de congelación-descongelación pueden comprometer la integridad de la muestra y dar lugar a subestimaciones del contenido de GAG y de la fracción unida o asociada de los mismos.

Se obtienen muestras de otro tipo, se procesan y se conservan según técnicas estándar conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, se obtienen exosomas del sobrenadante de orina obtenido tal como se describió anteriormente sometiendo el sobrenadante a centrifugación a 5.000 g durante 20 minutos, seguido de filtración a través de filtros de baja adsorción de proteínas de 0,22 μm, y después ultracentrifugación a 100.000 g durante 2 horas. Los exosomas se resuspenden en un tampón, por ejemplo PBS, y se almacenan a -20ºC. Los exosomas también pueden aislarse por medio de kits comerciales.

Para muestras clínicas, la muestra debe obtenerse con tanta información como sea posible sobre el historial clínico del paciente, así como todos los parámetros bioquímicos disponibles para la correcta interpretación de los resultados. Se recomienda realizar una clasificación preliminar del estadio patológico del individuo antes de tomar la muestra.

Inmediatamente antes de separar los GAG sulfatados usando el método de la invención, a veces es necesario preparar la muestra por medio de dilución, particularmente para muestras de suero o plasma, diluyendo la muestra según la concentración prevista de GAG sulfatados y la fracción unida o asociada con ellos.

La primera etapa del primer método de la invención consiste en poner en contacto la muestra a partir de la cual los GAG sulfatados libres o la fracción asociada con GAG sulfatados deben separarse con el colorante azul de dimetilmetileno (DMB) a un pH ácido comprendido entre 2 y 6,9.

Este contacto implica mezclar la muestra y DMB hasta obtener una mezcla homogénea.

Tal como se usa en el presente documento, el término “azul de dimetilmetileno” o “DMB” se refiere a un colorante catiónico, también conocido como azul de 1,9-dimetilmetileno, que comprende el compuesto 3,7-bis-(dimetilamino)-1,9-dimetildifenotiazin-5-io y cualquier sal del mismo. Las sales del mismo incluyen, entre otros, sales con aniones derivados de ácidos inorgánicos, por ejemplo y sin limitación, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido difosfórico, ácido bromhídrico, yoduro, ácido nítrico, y ácidos orgánicos, por ejemplo y sin limitación, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido mandélico, ácido ascórbico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido benzoico, ácido acético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido ciclámico o ácido p-toluenosulfónico. En una realización preferida, el DMB es cloruro de 3,7-bis-(dimetilamino)-1,9-dimetildifenotiazin-5-io, cuya estructura se muestra en la parte superior de la figura 2. El término DMB también incluye sales mixtas. En una realización preferida, DMB es una sal de cloruro de zinc de 3,7-bis-(dimetilamino)-1,9-dimetildifenotiazin-5-io doble, cuya estructura se muestra en la parte inferior de la figura 2. Estos compuestos pueden adquirirse comercialmente.

A pH ácido, DMB es capaz de unirse específicamente a GAG sulfatados debido a la carga negativa de los mismos. Se ha usado DMB para cuantificar GAG, pero siempre se ha considerado que una limitación importante de este método es que los complejos de DMB-GAG sulfatados son inestables en disolución y precipitan. Hasta ahora, nadie ha pensado en utilizar esta característica como una ventaja para separar los GAG de una muestra.

DMB es una sustancia en polvo que se disuelve en un disolvente adecuado, tales como, por ejemplo, etanol, hasta alcanzar una concentración adecuada. En una realización preferida, DMB está a una concentración que oscila entre 0,01 y 100 mM, preferiblemente entre 0,29 y 0,35 mM, más preferiblemente a 0,29 mM. En una realización preferida, el disolvente en el que se disuelve el colorante es etanol.

El DMB usado en el primer método de la invención debe estar a un pH ácido comprendido entre 2 y 6,9.

El término “pH” se refiere a la medición de la acidez o alcalinidad de una disolución. El pH varía normalmente desde 0 hasta 14 en una disolución acuosa, donde las disoluciones con un pH inferior a 7 son ácidas y las disoluciones que tienen un pH superior a 7 son alcalinas. pH=7 indica la neutralidad de la disolución, donde el disolvente es agua. El pH de una disolución puede determinarse con precisión por medio de un potenciómetro (o pH-metro), y también puede estimarse por medio de indicadores, por métodos que se conocen bien en el estado de la técnica. Dado que el valor de pH puede variar con la temperatura, en el contexto de esta invención, el pH se mide a 20ºC. El DMB usado en el primer método de la invención tiene un pH medido a 20ºC comprendido entre 2 y 6,9; preferiblemente comprendido entre 3 y 4; más preferiblemente comprendido entre 3,3 y 3,6. En una realización preferida, el pH medido a 20ºC es

3,5.

Para que el DMB disuelto en un disolvente adecuado tenga un pH ácido, debe añadirse un agente tamponante. En el contexto de la presente invención, “agente tamponante” se entiende como un agente capaz de controlar el pH ácido de la disolución y mantenerlo constante a un pH comprendido entre 2 y 6,9. Agentes tamponantes adecuados para la presente invención son, sin limitación, tampón acetato, tampón fosfato-citrato, tampón difosfato, tampón formiato, y una combinación de los mismos. En una realización preferida de la invención, el agente tamponante es formiato de sodio, preferiblemente formiato de sodio 0,2 M a pH 3,5. En una realización preferida, el agente tamponante se mezcla con DMB previamente disuelto en un disolvente adecuado tal como etanol, en una razón de DMB disuelto/tampón de 1/99 a 10/90, preferiblemente, la razón de DMB disuelto/tampón es 1/99.

La muestra a analizar que contiene los GAG sulfatados libres y GAG unidos o asociados con otros componentes debe mezclarse con DMB tamponado en una razón adecuada de muestra:DMB tamponado de modo que se produzca saturación, tal como la razón comprendida en el intervalo de 1:1 a 1:5. Preferiblemente, se mezclan en una razón de 1:2.

En la etapa b) del primer método de la invención, la mezcla de la etapa a) se incuba a una temperatura comprendida entre 0ºC y 40ºC durante el tiempo requerido para la formación de un precipitado. En esta etapa, el colorante azul de dimetilmetileno se une específicamente a GAG libres y GAG asociados con otros compuestos, formando complejos con los mismos y dando lugar a la formación de turbidez, seguido rápidamente por la precipitación del complejo que se forma. La incubación puede realizarse a una temperatura comprendida entre 0ºC y 40ºC, preferiblemente entre 4ºC y 30ºC, más preferiblemente entre 10ºC y 28ºC, incluso más preferiblemente entre 15ºC y 25ºC, aún más preferiblemente entre 20ºC y 25ºC. La incubación se realizará en un entorno frío, en un entorno templado o en un horno dependiendo de la temperatura a alcanzar usando métodos conocidos por un experto en la técnica. En una realización preferida, la incubación se realiza a temperatura ambiente (entre 20ºC y 25ºC).

En el contexto del primer método de la invención, “precipitado” se entiende como el sólido insoluble que se produce por el complejo formado entre los GAG sulfatados presentes en la muestra a analizar y DMB. En la mayoría de los casos, el precipitado cae al fondo de la disolución y su formación puede verse a simple vista. En otros casos, el precipitado puede flotar o permanecer en suspensión, dependiendo de si es menos denso o tan denso como el resto de la disolución.

El tiempo de incubación es el tiempo requerido para la formación del precipitado y puede determinarse por un experto en la técnica por simple observación de la disolución o por métodos conocidos en el estado de la técnica. Una vez que se forma el precipitado, puede permanecer sin cambios durante días en un intervalo de temperatura comprendido entre 0ºC y 40ºC. En una realización preferida, el tiempo de incubación está comprendido entre 1 minuto y 2 horas, donde es preferiblemente al menos 1 minuto, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 40 minutos, al menos 50 minutos, al menos 60 minutos, al menos 90 minutos. En una realización más preferida, el tiempo requerido para la formación del precipitado es de al menos 15 minutos.

En la etapa c) del método de la invención, el sobrenadante se elimina después de la precipitación. Esta eliminación puede realizarse por medio de cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por filtración, decantación o mediante un proceso para la centrifugación y succión del sobrenadante. En una realización preferida, la centrifugación se realiza después de la etapa b). En una realización preferida, la eliminación se realiza por centrifugación y posterior decantación o succión del sobrenadante, más preferiblemente por centrifugación y posterior succión del sobrenadante, incluso más preferiblemente por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos a 4ºC y posterior succión del sobrenadante. Después de la centrifugación, el precipitado contiene solo GAG sulfatados libres unidos a DMB y la fracción asociada con GAG sulfatados. El sobrenadante contiene el sobrante, que se elimina de la muestra.

En la etapa d) del primer método de la invención, se recupera el precipitado que contiene GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados. Esta recuperación puede consistir simplemente en obtener el precipitado aislado por separado del sobrenadante después de la etapa c). Opcionalmente, el precipitado obtenido después de la etapa c) puede disolverse o mezclarse con un disolvente o disolución adecuada dependiendo del uso posterior que vaya a hacerse del precipitado. Por ejemplo, si el precipitado va a analizarse por medio de electroforesis de proteínas, puede resuspenderse en un tampón de carga para electroforesis con o sin SDS. En una realización preferida, el precipitado se resuspende en SDS al 7,5 %. Si el precipitado va a analizarse por medio de cromatografía o secuenciación de proteínas, puede resuspenderse en un tampón adecuado para llevar a cabo estas técnicas. La figura 3 muestra un diagrama con diferentes posibilidades de análisis.

<u>Método de identificación para identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados</u>

Cuando la fracción asociada con GAG sulfatados precipitados por medio del primer método de la invención es una fracción proteica, el precipitado obtenido puede usarse para identificar patrones o perfiles de proteínas característicos de una afección específica, ya sea patológica o no, o de una muestra específica.

El análisis de la fracción proteica puede analizarse mediante diversas técnicas tales como, por ejemplo, sin limitación, electroforesis de proteínas, cromatografía, espectrometría de masas o secuenciación de proteínas.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método de identificación *in vitro* (a continuación en el presente documento "segundo método de la invención") para identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) separar la fracción proteica asociada con GAG sulfatados de una muestra según el primer método de la invención;

b) separar el producto obtenido en a) mediante electroforesis; y

c) identificar el perfil electroforético obtenido en b).

En el contexto del segundo método de la invención, el término "proteína" se refiere a cualquier molécula formada por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y, por lo tanto, incluye péptidos y proteínas, así como fragmentos de los mismos, incluyendo aquellos que están modificados postraduccionalmente. Cualquier proteína modificada postraduccionalmente con GAG o asociada de otro modo con GAG puede identificarse por medio del segundo método de la invención. En una realización preferida, la proteína se selecciona del grupo que consiste en uromodulina, albúmina, IgA, IgG o una variante de las mismas y fragmentos de las mismas.

En el contexto del segundo método de la invención, "perfil de proteínas" se entiende como el patrón específico de proteínas formado por la fracción asociada con GAG. El perfil de las proteínas puede ser cualitativo, cuantitativo, o ambos. En este documento, el perfil de proteínas se refiere no solo al conjunto de proteínas de una naturaleza conocida que se han identificado por medio de un anticuerpo específico (perfil específico), sino que también se refiere al patrón de bandas obtenido después de la separación electroforética, aunque no sea posible relacionar cada banda con una proteína específica (perfil inespecífico).

Estas proteínas pueden asociarse directamente con GAG sulfatados o indirectamente a través de otros compuestos asociados con GAG sulfatados, tales como exosomas.

La primera etapa (etapa a) del segundo método de la invención comprende separar la fracción proteica asociada con GAG sulfatados según el primer método de la invención.

El precipitado obtenido en la etapa a) debe resuspenderse en un medio adecuado para usarse en la etapa b) del método. Cualquier tampón de carga para electroforesis puede ser adecuado para la resuspensión. Ejemplos de medios en los que puede resuspenderse son, sin limitación, SDS al 7,5 %; tampón Laemli; tampón Laemli con β-mercaptoetanol y SDS al 7,5 % en una razón 1:1; tampón TBE (Tris-borato 100 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) con sacarosa 2 M y azul de bromofenol al 0,02%; tampón TAE (Tris 40 mM, CH3COONa 5 mM, EDTA 0,9 mM, pH 7,9); tampón TBE con sacarosa 2 M; etc. El tampón preferido para la resuspensión del precipitado es SDS al 7,5 % (dodecilsulfato de sodio) que posteriormente se combina con el tampón de carga a una razón variable de 1:1 a 1:10, Si la cantidad de precipitado es muy grande, puede ser necesario agitar con vórtex la mezcla para lograr una homogeneización completa.

La etapa b) del segundo método de la invención es la separación electroforética del producto obtenido en la etapa a). "Separación electroforética" o "electroforesis" se entiende como un método de separación para separar los componentes de una muestra mediante la aplicación de un campo eléctrico. En el contexto del segundo método de la invención, la separación electroforética es electroforesis de proteínas. Dependiendo del tipo de separación utilizada, la separación electroforética puede ser electroforesis de zona (separación dependiendo de la carga), isoelectroenfoque (separación dependiendo del punto isoeléctrico) y exclusión por tamaño en un tamiz molecular. Ejemplos de separación electroforética son, sin limitación, electroforesis de zona (en papel, acetato de celulosa, agarosa, poliacrilamida y electroforesis capilar), isoelectroenfoque, electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (PAGE) o electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). Un experto en la técnica reconocerá que la separación electroforética puede ser unidimensional o bidimensional, por ejemplo, cuando se usa isoelectroenfoque como primera dimensión y se usa electroforesis en gel de poliacrilamida como segunda dimensión. La separación electroforética o electroforesis se lleva a cabo mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

En una realización preferida, la electroforesis es SDS-PAGE. En otra realización preferida, la electroforesis es una electroforesis bidimensional.

En una realización preferida, la electroforesis es electroforesis en gel de poliacrilamida. En otra realización preferida, la electroforesis es electroforesis en gel de acetato de celulosa.

En la etapa c) del método de la invención, se identifica el perfil electroforético obtenido en b).

En el contexto del segundo método de la invención, el término "perfil electroforético" se refiere al patrón específico de

bandas o puntos producidos por la fracción proteica asociada con GAG cuando las proteínas se separan por electroforesis. Este patrón específico puede deberse a varias causas: a) cada tipo de GAG se une a una fracción diferente; b) la unión del GAG a las proteínas y péptidos significa que esta fracción se secreta en un fluido o, por ejemplo, se excreta en la orina; y c) el exceso de GAG significa que se forman isoformas específicas.

"Identificar el perfil electroforético" requiere o bien presentar un patrón de bandas o manchas proteicas que pueden identificarse por medio de su peso molecular, aunque su naturaleza sea desconocida, o bien identificar las bandas o manchas proteicas mediante el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína específica, por medio de secuenciación de proteínas, o por medio de espectrometría de masas.

En una realización preferida, la etapa c) del segundo método de la invención se realiza por medio de inmunotransferencia de tipo Western, es decir, mediante el uso de anticuerpos que reconocen específicamente una proteína específica. Esta técnica la conoce bien un experto en la técnica.

En otra realización preferida, la etapa c) se realiza por medio de tinción con un colorante específico para observar proteínas.

En el contexto del segundo método de la invención, "tinción" se refiere a la acción de tinción de las bandas proteicas de modo que adquieren un color o fluorescencia y pueden detectarse. Los protocolos de tinción de proteínas los conoce bien un experto en la técnica.

El término "tinte específico para observar proteínas" se refiere a un compuesto que tiene una afinidad específica por proteínas y que, tras unirse a dichas proteínas, permite observar las bandas proteicas de un gel después de la separación electroforética o bien observando el color de las mismas a simple vista o bien detectando la emisión de fluorescencia después de iluminar con luz UV, luz azul o láser. Ejemplos de colorantes específicos para proteínas son, sin limitación, tinción con plata, azul de Coomassie, Blue Silver o Coomassie G250, tinción negativa (con zinc o cobre), Ponceau S y tinción fluorescente. Ejemplos de tinciones fluorescentes son, sin limitación, Sypro Ruby, Emerald (específicamente tiñe proteínas glicadas), Flamingo™ (Bio-Rad), Oriole™ (Bio-Rad), Pro-Q, marcaje con Cy2, Cy3 y/o Cy5, etc. En una realización preferida, el colorante específico para la visualización de proteínas es Sypro Ruby.

Como sabe un experto en la técnica, el colorante que va a usarse dependerá del análisis posterior al que va a someterse la muestra. Por ejemplo, la tinción con plata no se usa si el análisis va a realizarse por medio de espectrometría de masas; mientras que la tinción fluorescente o la tinción de Coomassie G250 son compatibles con la espectrometría de masas.

En una realización preferida, después de la tinción con un colorante específico para observar proteínas, las bandas o manchas obtenidas se escinden del gel y se identifican por medio de proteómica. Entre esas, las técnicas de proteómica que pueden usarse son, sin limitación, técnicas no colorimétricas, tales como espectrometría de masas, secuenciación de proteínas, espectroscopía de índice de refracción, espectroscopía ultravioleta (UV), análisis de fluorescencia, análisis radioquímico, espectroscopía de infrarrojo cercano, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), pirólisis por espectrometría de masas, espectroscopía de dispersión Raman, espectroscopía de pulverización iónica combinada con espectrometría de masas y electroforesis capilar. Preferiblemente, las técnicas usadas se seleccionan del grupo que consiste en espectrometría de masas y secuenciación de proteínas.

La "espectrometría de masas" o el análisis de MS se entiende como una técnica analítica para identificar compuestos desconocidos que incluye: (1) ionizar los compuestos y fraccionar potencialmente los iones parentales de los compuestos formados en iones hijos; y (2) detectar los compuestos cargados y calcular una razón de masa con respecto a carga (m/z). Los compuestos pueden ionizarse y detectarse por cualquier medio adecuado. Un "espectrómetro de masas" incluye medios para ionizar compuestos y compuestos cargados detectados.

Preferiblemente, se usa espectrometría de masas, particularmente cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría de masas por infusión directa o espectrometría de masas por resonancia de ciclotrón iónico de transformada de Fourier (FT-ICR-MS), electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS), cromatografía de líquidos de alto rendimiento acoplada con espectrometría de masas (HPLC-MS), espectrometría, cualquier espectrometría de masas acoplada secuencialmente, tal como MS-MS o MS-MS-MS, espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), pirólisis-espectrometría de masas (Py-MS), espectrometría de masas de movilidad iónica o espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF), espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS), ESI-MSMS, ESI-MS/(MS)n, espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS), desorción/ionización por láser mejorada en superficie tiempo de espectrometría de masas de vuelo (SELDITOF-MS), desorción/ionización en silicio (DIOS), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), tiempo de vuelo de cuadrupolo (Q-TOF), espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica (APCI-MS), APCI-MSIMS, APCI-(MS)n, espectrometría de masas por fotoionización a presión atmosférica (APPI-MS), APPI-MSIMS y APPI-(MS)n, espectrometría de masas de cuadrupolo, espectrometría de masas por transformada de Fourier (FTMS) y espectrometría de masas por trampa de iones, donde n es un número entero mayor de cero. Dichas técnicas se dan a conocer en, por ejemplo, Nissen, Journal of Chromatography A, 703, 1995: 37-57, documento US 4540884 o US

5397894.

Los métodos de ionización mencionados anteriormente generalmente producen un ion resultante de la adición de uno o más átomos o por medio de la ruptura de la molécula. Estos iones pueden usarse más tarde como marcadores sustitutos de la molécula que va a medirse. Tal como se usa en el presente documento, el término "marcador sustituto" significa un parámetro biológico o clínico que se mide en lugar del parámetro biológicamente definitivo o clínicamente más significativo.

Los iones se producen normalmente mediante la adición de un protón o un núcleo de hidrógeno, [M+H]+ donde M significa la molécula de interés y H significa el ion hidrógeno, que es lo mismo que un protón. Algunos métodos de ionización también producirán iones análogos. Pueden surgir iones análogos debido a la adición de un catión de metal alcalino, en mayor medida que los producidos por el protón comentado anteriormente. Una especie típica puede ser [M+Na]+ o [M+K]+. El análisis de las moléculas ionizadas es similar independientemente de si tiene algo que ver con un ion protonado, como se comentó anteriormente, o si está ocupado con un catión de metal alcalino añadido. La principal diferencia es que la adición de un protón añade una unidad de masa (normalmente denominada Dalton), en el caso del ion hidrógeno (es decir, protón), 23 Daltons en el caso de sodio o 39 Daltons en el caso de potasio. Estos pesos o masas adicionales se añaden simplemente al peso molecular de la molécula de interés y el pico de MS se produce en el punto para el peso molecular de la molécula de interés más el peso del ion que se ha añadido. Estos métodos de ionización también pueden producir iones negativos. La señal molecular más común es la molécula desprotonada [M-H]-, en este caso, la masa es un Dalton menor que el peso molecular de la molécula de interés. Además, se producirán iones de carga múltiple para algunos compuestos. Estos tienen el tipo general de identificación [M+nH]n+, donde n minúscula identifica el número de protones adicionales que se han añadido.

En una realización preferida, la técnica de proteómica utilizada es la espectrometría de masas, preferiblemente MALDI-TOF o espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

En otra realización, se usa cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas, cromatografía de líquidos combinada con espectrometría de masas o MALDI combinado con espectrometría de masas.

En otra realización preferida, la espectrometría de masas es espectrometría de masas en tándem.

Otra posibilidad para identificar la fracción asociada con GAG es secuenciar los péptidos o proteínas. En el contexto del segundo método de la invención, "secuenciación de proteínas" se entiende como la determinación de la secuencia de aminoácidos de una proteína. Puede usarse cualquier método de secuenciación de proteínas en el método de la invención, por ejemplo y sin limitación, secuenciación por medio del método de degradación de Edman, secuenciación por medio de espectrometría de masas o bien directamente o bien después de la digestión de los fragmentos peptídicos, etc. Estos métodos los conoce bien un experto en la técnica.

El precipitado obtenido por medio del primer método de la invención también puede estudiarse mediante microscopía electrónica. Para ese fin, el precipitado se resuspende en un tampón específico para la observación por microscopía electrónica, por ejemplo, resinas tales como resina Epon acrílica o resina epoxídica, o glutaraldehído al 2 % en tampón de cacodilato 0,1 M a pH 7,4. En este caso, DMB actúa como un agente de contraste.

"Microscopía electrónica" se entiende como una técnica que usa un microscopio electrónico, que es un microscopio que usa electrones en lugar de fotones o luz visible para formar las imágenes de los objetos. Las técnicas de microscopía electrónica útiles en la presente invención incluyen tanto microscopía electrónica de transmisión como microscopía electrónica de barrido, entre otros. Esta técnica permite estudiar las fracciones asociadas con GAG sulfatados, tales como exosomas, por ejemplo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de identificación *in vitro* (a continuación en el presente documento "tercer método de la invención") para identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) separar la fracción proteica asociada con GAG sulfatados de una muestra según el primer método de la invención, y

b) identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados mediante cromatografía o espectrometría de masas de la fracción obtenida en a). Preferiblemente, la espectrometría de masas es espectrometría de masas en tándem.

La primera etapa del tercer método de la invención implica separar la fracción proteica asociada con GAG sulfatados de una muestra usando el primer método de la invención.

El precipitado obtenido en la etapa a) puede analizarse directamente por medio de cromatografía o espectrometría de masas, preferiblemente espectrometría de masas en tándem. Para ese fin, dicho precipitado se resuspende en el medio adecuado para llevar a cabo la siguiente etapa del tercer método de la invención.

En una realización preferida, después de la etapa a), el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados se identifica por medio de cromatografía. “Cromatografía” se entiende como un método para separar los componentes de una mezcla que se basa en las diferencias en el comportamiento de flujo de varios componentes de una mezcla/disolución transportada por una fase móvil a través de un soporte/columna recubierto con una determinada fase estacionaria. Específicamente, algunos componentes se unen fuertemente a la fase estacionaria y pasan más tiempo en el soporte, mientras que otros componentes están predominantemente en la fase móvil y pasan a través del soporte más rápidamente. El criterio en el que se basa el hecho de que varios compuestos se separan a través de la columna se define por el problema particular que se está investigando y se impone por la estructura, composición y capacidad de unión de la fase estacionaria. Por ejemplo, podría formarse una fase estacionaria de modo que moléculas lineales y de bajo peso molecular se eluyen más rápidamente que las moléculas aromáticas y de alto peso molecular. A medida que los componentes se eluyen del soporte, pueden analizarse inmediatamente por medio de un detector o pueden recogerse para análisis adicionales. Actualmente hay una gran cantidad de métodos de separación disponibles, particularmente métodos de cromatografía, incluyendo cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos (LC), cromatografía iónica (IC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de fluidos supercríticos (SCF), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y electroforesis capilar (CE). Puede usarse cromatografía de gases para separar compuestos volátiles. La cromatografía de líquidos (LC) es una técnica cromatográfica alternativa útil para separar iones o moléculas que se disuelven en un disolvente. El principio de separación por GC y LC es el mismo, siendo la principal diferencia la fase con la que se produce la separación (fase de vapor frente a fase líquida). Además, se usa GC principalmente para separar moléculas de hasta 650 unidades atómicas de peso, mientras que, en principio, la LC puede separar compuestos de cualquier peso molecular. Los tipos adecuados de cromatografía de líquidos que pueden aplicarse en el método de la invención incluyen, sin limitación, cromatografía de fase inversa, cromatografía de fase normal, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC), cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía quiral. Estos métodos se conocen bien en la técnica y pueden aplicarse fácilmente por un experto en la técnica.

En otra realización preferida, después de la etapa a) el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados se identifica por medio de espectrometría de masas, preferiblemente espectrometría de masas en tándem.

“Espectrometría de masas de tándem” se entiende como el método de espectrometría en el que se usan dos analizadores acoplados, de modo que el primer analizador se usa para seleccionar el compuesto de interés y luego este ion se mueve hacia la celda de colisión donde se induce la disociación del ion. Esta técnica la conoce bien un experto en la técnica y es adecuada para la cuantificación y para el cribado de muestras.

Cualquier realización descrita en el contexto del primer método de la invención también es aplicable a los métodos segundo y tercero.

Método de identificación para identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados

Cuando la fracción asociada con GAG sulfatados precipitados por medio del primer método de la invención es una fracción lipídica, el precipitado obtenido puede usarse para identificar patrones o perfiles de lípidos característicos de una afección específica, ya sea patológica o no, o de una muestra específica.

El análisis de la fracción lipídica puede analizarse mediante diversas técnicas tales como, por ejemplo, sin limitación, electroforesis de lípidos, cromatografía o cromatografía acoplada con espectrometría de masas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de identificación *in vitro* (a continuación en el presente documento “cuarto método de la invención”) para identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) separar la fracción lipídica asociada con GAG sulfatados de una muestra según el primer método de la invención; y

b) identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados mediante electroforesis o cromatografía de la fracción obtenida en a).

En el contexto del cuarto método de la invención, el término “lípidos” se refiere a cualquier molécula orgánica compuesta principalmente por carbono e hidrógeno y, en menor medida, oxígeno, aunque también puede contener fósforo, azufre y nitrógeno, que son hidrófobos y solubles en disolventes orgánicos tales como benzina, benceno y cloroformo. El término “lípidos” incluye cualquier tipo de lípidos tales como, sin limitación, triglicéridos, fosfolípidos, hormonas esteroideas, etc. Cualquier lípido asociado con GAG puede identificarse por medio del cuarto método de la invención.

En el contexto del cuarto método de la invención, “perfil de lípidos” se entiende como el patrón específico de lípidos formado por la fracción asociada con GAG. El perfil de lípidos puede ser cualitativo, cuantitativo o ambos. En este documento, el perfil de lípidos se refiere no solo al conjunto de lípidos de una naturaleza conocida que se han

identificado específicamente (perfil específico), sino que también se refiere al patrón obtenido después de la separación electroforética, aunque no sea posible relacionar cada banda con un lípido específico (perfil inespecífico).

El cuarto método de la invención consiste en una primera etapa en la que la fracción lipídica asociada con GAG sulfatados de una muestra se separa según el primer método de la invención.

El precipitado obtenido en la primera etapa puede identificarse por medio de electroforesis o cromatografía.

En una realización preferida, el perfil de lípidos se identifica por medio de electroforesis de lípidos. El término "separación electroforética" o "electroforesis" se ha definido en relación con los métodos segundo y tercero de la invención, y en el contexto del cuarto método de la invención se refiere a electroforesis de lípidos.

En otra realización preferida, el perfil de lípidos se identifica por medio de cromatografía. El término "cromatografía" se ha definido en relación con los métodos segundo y tercero de la invención, y en el contexto del cuarto método de la invención se refiere a cromatografía de lípidos.

Los términos restantes se han definido en el contexto de los aspectos anteriores. Cualquier realización descrita para los métodos primero, segundo y tercero de la invención también son aplicables al cuarto método de la invención.

Métodos para detectar alteraciones en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados

El método de la invención también es útil para detectar alteraciones en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados de lípidos o proteínas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* (a continuación en el presente documento "quinto método de la invención") para detectar una alteración en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra según el segundo o tercer método de la invención y/o identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados de una muestra según el cuarto método de la invención; y

b) comparar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados obtenidos en a) con el perfil obtenido para una muestra de referencia y/o comparar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados obtenido en a) con el perfil obtenido para una muestra de referencia, en el que una diferencia en el perfil obtenido en a) con respecto al perfil obtenido en la muestra de referencia indica una alteración en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados.

En el contexto del quinto método de la invención, "patrón de glicosilación" se entiende como el patrón específico de glicosilación por GAG sulfatados de los componentes de una muestra, donde se añade un GAG sulfatado a otra molécula, particularmente a una proteína o lípido.

En el contexto del quinto método de la invención, "alteración en el patrón de glicosilación" se entiende como cualquier diferencia en el patrón de glicosilación con respecto a una muestra de referencia, ya sea un aumento o una disminución en la glicosilación por GAG sulfatados.

En la primera etapa del quinto método de la invención, el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra se identifica por medio del segundo o tercer método de la invención, y/o el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados de una muestra se identifica por medio del cuarto método de la invención, como se describió anteriormente.

La segunda etapa del quinto método de la invención consiste en comparar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados obtenido en a) con el perfil obtenido para una muestra de referencia, y/o comparar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados obtenido en a) con el perfil obtenido para una muestra de referencia, en el que una diferencia en el perfil obtenido en a) con respecto al perfil obtenido en la muestra de referencia indica una alteración en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados.

En el contexto del quinto método de la invención, "muestra de referencia" se entiende como una muestra del mismo tipo que la muestra que va a analizarse utilizada como base para la comparación. En una realización preferida, la muestra de referencia proviene de individuos sanos normales que no están afectados por ninguna enfermedad. La muestra de referencia también puede obtenerse del mismo sujeto que va a analizarse. En una realización preferida de la invención, la muestra de referencia se obtuvo de individuos sanos de la misma edad y sexo que la muestra que va a analizarse.

El patrón de glicosilación de la muestra que va a analizarse se compara con el patrón de glicosilación de la muestra de referencia, y esto permite la detección de alteraciones cuantitativas y/o cualitativas en este patrón.

Los términos restantes se han definido en el contexto de los aspectos anteriores. Cualquier realización descrita para los métodos primero, segundo, tercero y cuarto de la invención también es aplicable al quinto método de la invención.

Usos de los métodos de la invención

Los métodos de la invención, que permiten analizar la fracción asociada con GAG, tienen diferentes aplicaciones en biomedicina. En ese sentido, sin limitación, pueden usarse para la identificación de nuevos biomarcadores o perfiles de biomarcadores a nivel de proteína que funcionan como indicadores de pronóstico o diagnóstico, o para el seguimiento de una patología o afección específica. Del mismo modo, permiten monitorizar una terapia y diseñar una terapia personalizada en un sujeto que padece una enfermedad, o seleccionar un paciente susceptible de tratarse con una terapia específica. También puede ser útil para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Otra aplicación es el uso de los mismos en el estudio de nuevas rutas de comunicación celular o mecanismos moleculares.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de los métodos segundo, tercero, cuarto y quinto de la invención para identificar biomarcadores de proteínas o lípidos asociados con GAG sulfatados.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “biomarcador” o “marcador biológico” se refieren a una sustancia usada como indicador de un estado biológico, que debe poder medirse objetivamente y evaluarse como un indicador de un proceso biológico normal, una afección patógena o de una respuesta a un tratamiento farmacológico.

En una realización, dichos biomarcadores son útiles para el diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de la progresión de una enfermedad.

En otra realización, dichos biomarcadores son útiles para monitorizar el efecto de una terapia para el tratamiento de una enfermedad.

En otra realización, dichos biomarcadores son útiles para predecir la respuesta a una terapia.

“Predecir la respuesta a una terapia” se entiende como la posibilidad de saber antes de la administración de una terapia si un individuo responderá bien o mal a dicha terapia.

En otra realización, dichos biomarcadores son útiles para diseñar una terapia personalizada.

En otra realización, dichos biomarcadores son útiles para identificar compuestos adecuados para el tratamiento de una enfermedad.

En una realización preferida, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad renal y mucopolisacaridosis. En otra realización más preferida, la enfermedad renal es enfermedad renal poliquística autosómica dominante de tipo 1 o tipo 2.

Los términos “diagnóstico”, “pronóstico”, “monitorización de la progresión”, “monitorización del efecto de una terapia”, “diseño de una terapia personalizada” e “identificación de compuestos adecuados para el tratamiento” se explican a continuación.

Métodos de diagnóstico de la invención

Los autores de la presente invención han identificado una serie de marcadores presentes en la orina de sujetos que padecen mucopolisacaridosis y enfermedad renal, y marcadores que están ausentes o presentes en una proporción diferente en individuos que no padecen tales enfermedades. Estos marcadores pueden usarse en un método de diagnóstico rápido para diagnosticar mucopolisacaridosis en recién nacidos, en métodos de diagnóstico temprano para diagnosticar enfermedad renal o en métodos de diagnóstico para diagnosticar enfermedad renal avanzada.

En un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados en un sujeto, que comprende:

a) separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra biológica de dicho sujeto por medio del primer método de la invención,

b) detectar el nivel de uno o más GAG sulfatados separados en a), y

c) comparar dicho nivel con un valor de referencia para dicho uno o más GAG sulfatados,

en el que un nivel aumentado o disminuido de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece una enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados.

En el contexto de la presente invención, “método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad asociada con una alteración

de uno o más GAG sulfatados" se entiende como un método que permite mostrar la existencia de cualquier enfermedad en la que se produce una alteración patógena de los niveles de GAG sulfatados, es decir, cuando dicho proceso es perjudicial o no se desea en un sujeto, mediante la detección de estos niveles. "Diagnosticar" se refiere a evaluar la probabilidad según la cual un sujeto padece una enfermedad.

Los métodos se llevan a cabo "*in vitro*", es decir, no se ponen en práctica en un cuerpo humano o animal.

Como entenderán los expertos en la técnica, tal evaluación puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que van a diagnosticarse, aunque preferiblemente es correcta para el 100% de ellos. El término, sin embargo, requiere poder identificar que una parte estadísticamente significativa de los sujetos padecen la enfermedad. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente si una parte es estadísticamente significativa usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %. Los valores de p son preferiblemente 0,2, 0,1, 0,05.

"Enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados" se entiende como cualquier enfermedad que se produce con un aumento o con una disminución en los niveles de GAG sulfatados con respecto a los niveles de un individuo normal. Las enfermedades en las que hay una alteración en uno o más glucosaminoglicanos de una manera primaria o secundaria son, sin limitación, mucopolisacaridosis, amiloidosis renal (Tencer J. Amiloidosis. *et al.* Nephrol Dial Transplant. 1997.12(6):1161-6), glomerulonefritis (Tencer J. Am. *et al.* Clin Nephrol. 1997; 48(4):212-9), síndrome nefrótico congénito (Vermylen C. Am. *et al.* Pediatr Nephrol. 1989; 3(2):122-9), nefropatía endémica de los Balcanes (Jurétic D. Clin. *et al.* Nephron. 1993; 65(4):564-7), trasplante de riñón (Rodríguez-Cuartero *et al.*. Clin Nephrol. 1997; 47(4):274-6), enfermedad de cálculos renales (Hesse *et al.* Urol. Int. 1986; 41(2):81-7), nefropatía diabética (Pérez Blanco *et al.*. Nephron. 1996; 73(2):344-5), hipotiroidismo (Tokoro T. Am. y Eto Y. Eur J Pediatr. Mayo de 1985; 144(1):84-6), diabetes (Nikiforovskaia LF, e Ivanova LN. Vopr Med Khim. 1987; 33(1):91-6), artritis reumatoide ((Kéry V. Am. *et al.* Clin Chem. 1992; 38(6):841-6) y siringomielia (Elaev N.R. y Bakhtiarova KZ. Biull Eksp Biol Med. 1992; 114(9):271-2).

En una realización preferida, la enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados se selecciona del grupo que consiste en:

a) una mucopolisacaridosis seleccionada del grupo que consiste en síndrome de Hurler (deficiencia de alfa-L-iduronidasa), síndrome de Scheie (deficiencia de alfa-L-iduronidasa), síndrome de Hunter (deficiencia de iduronato-2-sulfatasa), síndrome de Sanfilippo A (deficiencia de heparán sulfamidasa), síndrome de Sanfilippo B (deficiencia de alfa-N-acetilglucosaminidasa), síndrome de Sanfilippo C (deficiencia de heparán-alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa), síndrome de Sanfilippo D (deficiencia de N-acetilglucosamina-6-sulfatasa), síndrome de Morquio A (deficiencia de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa), síndrome de Morquio B (deficiencia de beta-D-galactosidasa), síndrome de Maroteaux-Lamy (deficiencia de arilsulfatasa B) y síndrome de Sly (deficiencia de beta-glucuronidasa);

b) una enfermedad renal seleccionada del grupo que consiste en enfermedad renal poliquística autosómica dominante de tipo 1 o tipo 2, glomerulonefritis, síndrome nefrótico, nefropatía endémica de los Balcanes, trasplante de riñón, enfermedad de cálculos renales y nefropatía diabética;

c) una endocrinopatía seleccionada del grupo que consiste en hipotiroidismo y diabetes;

d) un trastorno reumático seleccionado del grupo que consiste en osteoartritis, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide y siringomielia; y

e) una enfermedad oncológica.

En una realización, la enfermedad oncológica se selecciona de cáncer de próstata y cáncer de colon.

En una realización incluso más preferida, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en mucopolisacaridosis y enfermedad renal.

Tal como se usa en el presente documento, el término "mucopolisacaridosis" o "MPS" designa un grupo heterogéneo de errores del metabolismo innato provocados por la deficiencia de cualquiera de las enzimas necesarias para la degradación de GAG, es decir son alteraciones congénitas en la glicosilación. Los GAG no degradados habitualmente se excretan parcialmente en la orina, pero el resto se acumula en los lisosomas. Esta acumulación provoca alteraciones celulares e interferencias en otros procesos metabólicos con graves consecuencias para el cuerpo humano, conduciendo daño de células, tejidos y órganos. Por ejemplo, la acumulación en el cerebro es responsable del retraso mental y el retraso psicomotor, y la acumulación de estas sustancias en otros tejidos en general ofrece una amplia variedad de hallazgos y formas que oscilan entre signos fenotípicamente leves y apenas perceptibles y formas únicas y distorsionadas que afectan considerablemente a los individuos que padecen dicha alteración. Hasta ahora se han descrito siete tipos de mucopolisacaridosis con varios subtipos que implican 11 enzimas específicas. La tabla I

describe los diferentes tipos de MPS y el tipo de GAG que se excreta.

Tipo de MPS	Otros nombres	Tipo de GAG excretado
MPS I	Hurler, Hurler-Scheie, Scheie	DS, HS
MPS II	Hunter	DS, HS
MPS III	Sanfilippo tipos A-D	HS
MPS IV	Morquio tipos A y B	A: KS, CS B: KS
MPS VI	Maroteaux-Lamy	DS
MPS VII	Sly	DS, HS, CS
MPS IX	Deficiencia de hialuronidasa	Desconocido

Tabla I. Tipos de MPS y GAG excretados. DS: dermatán sulfato; HS: heparán sulfato; CS: condroitín-4 y -6-sulfato; KS: queratán sulfato.

Todos los tipos de MPS se heredan de una manera autosómica recesiva, con la excepción del síndrome de Hunter (MPS II), que está ligado al cromosoma X.

El término “enfermedad renal” se refiere a una afección caracterizada por una disminución significativa y progresiva de la función renal, expresada por una filtración glomerular estimada o aclaramiento de creatinina < 60 ml/min/1,73 m^2 o como la presencia de daño renal persistente durante al menos 3 meses. El daño renal se diagnostica habitualmente por medio de marcadores en lugar de por una biopsia renal, por lo que el diagnóstico del mismo puede realizarse sin conocer la causa. En una realización preferida, la enfermedad renal es enfermedad renal poliquística autosómica dominante de tipo 1 o tipo 2. El término “enfermedad renal poliquística autosómica dominante de tipo 1 o tipo 2” o “ADPKD1 o ADPKD2” se refiere a una enfermedad genética progresiva de los riñones caracterizada por la presencia de múltiples quistes en ambos riñones. Esta enfermedad también puede dañar el hígado, vesículas seminales, páncreas, aracnoides y, rara vez, el corazón y el cerebro. Las manifestaciones de esta enfermedad incluyen anomalías en la función renal, hipertensión, dolor renal e insuficiencia renal. Los síntomas iniciales son hipertensión, fatiga, dolores intensos en la espalda y los costados, e infecciones del tracto urinario. La enfermedad a menudo conduce al desarrollo de insuficiencia renal crónica y puede dar como resultado la pérdida completa de la función renal, que requiere un cierto tipo de diálisis. En el 85% de los pacientes, esta enfermedad está provocada por la mutación del gen de PKD1 (locus 16p13.3-p13.1), y en el 15 % restante, la causa es la mutación del gen de PKD2 (locus 4q21q23).

En una realización, la alteración de uno o más GAG sulfatados es un aumento en uno o más GAG. En una realización, la enfermedad asociada con un aumento en uno o más GAG sulfatados es una enfermedad que se produce con una acumulación no deseada de uno o más GAG sulfatados seleccionados de mucopolisacaridosis, mucolipidosis, síndrome nefrótico congénito, nefropatía endémica de los Balcanes, artritis reumatoide y siringomielia.

En otra realización, la alteración de uno o más GAG sulfatados es una disminución en uno o más GAG. En una realización, la enfermedad asociada con una disminución en uno o más GAG sulfatados se selecciona del grupo que consiste en amiloidosis renal, glomerulonefritis, síndrome nefrótico, hipotiroidismo y diabetes.

La primera etapa del método de diagnóstico de la invención comprende separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra biológica de un sujeto por medio del primer método de la invención.

El término “muestra biológica” se ha definido en el contexto del primer método de la invención. En una realización preferida, la muestra biológica es una muestra de orina, suero o plasma. En otra realización preferida, la muestra biológica es una muestra de exosomas, preferiblemente exosomas aislados de una muestra de orina.

En la presente invención, “sujeto” se entiende como cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, pero no se limita a, mascotas o animales de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano de sexo masculino o femenino de cualquier raza o edad. En el contexto de este aspecto de la invención, el sujeto es un sujeto que posiblemente padece una enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados.

La segunda etapa del método de diagnóstico comprende detectar el nivel de uno o más GAG sulfatados separados en a).

Los niveles de GAG pueden detectarse por medio de métodos descritos en el estado de la técnica y conocidos por un experto en la técnica. Dichos métodos incluyen métodos colorimétricos de detección espectrofotométrica; métodos de ensayo de GAG específicos que permiten identificar los tipos de GAG que se producen o se excretan en exceso, tales como HPLC, ELISA y espectrometría de masas en tándem; y métodos basados en la despolimerización de GAG (Tomatsu S. Clin. *et al.* 2013, Mol. Genet. Metab. 110(0):42-53).

En una realización preferida, la etapa (b) se realiza por medio de tinción de GAG sulfatados con el colorante DMB. Preferiblemente, la tinción se realiza por medio de DMB al 0,02 % en agua. El gel debe entonces desteñirse, preferiblemente usando ácido acético al 10%.

Un experto en la técnica verá que el método de la invención puede ponerse en práctica usando tanto el nivel absoluto como el nivel relativo de GAG sulfatados. Por lo tanto, en la presente invención, la expresión “nivel de uno o más GAG sulfatados” se usa para referirse tanto a los niveles absolutos como a los niveles relativos de GAG sulfatados.

La expresión “niveles absolutos” se refiere a la cantidad total de GAG sulfatados en una muestra. Dicho valor puede determinarse como la concentración de GAG sulfatados expresada en unidades de masa por unidad de volumen (por ejemplo, en ng/ml de muestra), en número de moléculas de GAG sulfatados por unidad de volumen (por ejemplo, en pmol de GAG sulfatados/ml de muestra), en unidades de masa de GAG sulfatados por unidad de masa de GAG totales (pg de GAG sulfatados/mg de GAG totales), o en número de moléculas de GAG sulfatados por unidad de masa de GAG totales (por ejemplo, en pmol de GAG sulfatados/mg de GAG totales).

La expresión “niveles relativos” se refiere a la relación entre los niveles de GAG sulfatados y de un GAG de referencia, es decir, se define como la concentración de GAG sulfatados en forma normalizada con respecto a dicho GAG de referencia.

Con el fin de normalizar los valores de GAG sulfatados entre las diferentes muestras, es posible comparar los niveles de GAG sulfatados en las muestras que van a analizarse con la expresión de un GAG de control. “GAG de control” se entiende en el presente documento como un GAG cuya concentración no cambia o solo cambia en cantidades limitadas en células enfermas con respecto a las células normales. Preferiblemente, el GAG de control es condroitín sulfato.

El experto observará que el nivel de GAG sulfatados totales o el nivel de GAG sulfatados libres o el nivel de GAG sulfatados asociados con una fracción proteica o lipídica puede detectarse en la etapa b). En una realización preferida, se detecta el nivel de uno o más GAG sulfatados libres.

Una vez que se ha determinado el nivel de uno o más GAG sulfatados en una muestra, se lleva a cabo la etapa (c) del método de la invención, que consiste en comparar los niveles de GAG sulfatados obtenidos en la etapa (b) con un valor de referencia para cada GAG sulfatado.

El “valor de referencia” proviene de un conjunto de muestras que consisten preferiblemente en una mezcla del mismo tipo de muestra que va a analizarse de individuos normales no afectados por enfermedades de este tipo. Dicho valor de referencia puede determinarse mediante técnicas que se conocen bien en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, determinación del valor medio de GAG sulfatados medidos en muestras de sujetos sanos. El valor de referencia también puede obtenerse del mismo sujeto que va a analizarse. En una realización preferida de la invención, el valor de referencia se obtuvo de muestras de individuos sanos de la misma edad y sexo que el sujeto.

Una vez que se establece el valor de referencia, el valor de los niveles de GAG sulfatados obtenidos en la etapa (a) puede compararse con este valor de referencia, y por lo tanto permite la detección de alteraciones en los niveles de GAG sulfatados del sujeto con respecto al valor de referencia. En el método de la invención, un nivel aumentado o disminuido de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece una enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados. Más específicamente, en el método de la invención, un aumento en los niveles de GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece una enfermedad asociada con un aumento en los niveles de GAG sulfatados.

En el contexto de la presente invención, “aumento en los niveles” o “nivel aumentado” con respecto al valor de referencia se entiende como una variación de los niveles por encima del valor de referencia de al menos el 5%, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110%, al menos el 120%, al menos el 130 %, al menos el 140%, al menos el 150 %, o más, en comparación con el valor de referencia.

En una realización preferida, la enfermedad es mucopolisacaridosis, y:

(i) un nivel aumentado de dermatán sulfato de libre con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece mucopolisacaridosis de tipo I, tipo II, tipo VI o tipo VII;

(ii) un nivel aumentado de heparán sulfato libre con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece mucopolisacaridosis de tipo III; y

(iii) un nivel aumentado de queratán sulfato libre con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto

padece mucopolisacaridosis de tipo IV.

Por otro lado, en el método de la invención, una disminución en los niveles de GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativa de que el sujeto padece una enfermedad asociada con una disminución en los niveles de GAG sulfatados.

De manera similar, “disminución en los niveles” o “nivel disminuido” con respecto al valor de referencia se entiende como una variación de los niveles por debajo del valor de referencia de al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o en al menos el 100 % (es decir, ausente) en comparación con el valor de referencia.

En una realización, se realiza una separación electroforética de la muestra después de la etapa (a). Dicha separación electroforética puede llevarse a cabo en cualquier tipo de gel incluyendo, sin limitación, gel de agarosa, gel de poliacrilamida y gel de acetato de celulosa. En una realización preferida, el gel es un gel de acetato de celulosa. En una realización incluso más preferida, el tampón de electroforesis es acetato de bario.

Por lo tanto, una realización preferida de la invención es un método *in vitro* para diagnosticar mucopolisacaridosis en un sujeto, que comprende:

a) separar los GAG sulfatados libres de una muestra de orina de dicho sujeto por medio del primer método de la invención,

b) someter el precipitado obtenido en la etapa anterior a electroforesis, preferiblemente en gel de acetato de celulosa,

c) detectar el nivel de uno o más GAG sulfatados libres separados en b) por medio de tinción con colorante DMB, y

d) comparar dicho nivel con un valor de referencia para dicho uno o más GAG sulfatados libres,

en el que un nivel aumentado de dermatán sulfato libre con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece mucopolisacaridosis de tipo I, tipo II, tipo VI o tipo VII;

en el que un nivel aumentado de heparán sulfato libre con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece mucopolisacaridosis de tipo III; y

en el que un nivel aumentado de queratán sulfato libre con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece mucopolisacaridosis de tipo IV.

En la búsqueda intensiva de nuevos biomarcadores de riñón asociados con exosomas, es común realizar estrategias de agotamiento de uromodulina o usar listas de exclusión de uromodulina a nivel bioinformático. Sin embargo, los inventores han descubierto un complejo formado por uromodulina, GAG sulfatados y exosomas. Estos complejos pueden monitorizarse de manera fácil y económica en orina para su uso como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico para una enfermedad renal dada la identificación de su perfil de expresión característico.

La separación de uromodulina y/o albúmina unida a o asociada con GAG sulfatados y la separación de los complejos de uromodulina-o variante de uromodulina-GAG sulfatados-exosomas de la muestra de orina se realiza según el primer método de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término “uromodulina” se refiere a una glicoproteína que se secreta en la orina después de la escisión proteolítica, donde contribuye a la presión osmótica previniendo la infección del tracto urinario y modulando la formación de cristales. Es la proteína más abundante presente en la orina. También se denomina glicoproteína Tamm-Horsfall (THP). Se expresa específicamente en el asa de Henle en el riñón y está relacionada con diferentes patologías renales. En seres humanos, está codificada por el gen UMOD (UniGene Hs. 654425). La uromodulina humana es la proteína definida por la secuencia de la base de datos Uniprot con número de registro P07911 del 22 de julio de 2015. La secuencia P07911 corresponde al precursor de uromodulina, cuyo péptido señal ocupa las posiciones 1 a 24, y cuyo propéptido (posiciones 615 a 640) se elimina en la forma madura. La uromodulina madura está formada de ese modo por los aminoácidos 25 a 614; mientras que la forma secretada está formada por los aminoácidos 25 a 587 de la secuencia P07911,

Tal como se usa en el presente documento, el término “albúmina” se refiere a un miembro de la familia de proteínas de albúmina, proteínas que son proteínas globulares que son solubles en agua, moderadamente soluble en disoluciones salinas concentradas y experimentan desnaturalización por calor. Las albúminas se encuentran normalmente en el plasma sanguíneo. La albúmina sérica se produce por el hígado, se disuelve en plasma sanguíneo y es la proteína sanguínea más abundante en mamíferos. En algunas patologías renales, la albúmina se pierde a través de la orina. Particularmente, el término “albúmina” se refiere a una proteína globular que está codificada en

humanos por el gen ALB (UniGene Hs. 418167). La albúmina sérica humana es la proteína definida por la secuencia de la base de datos Uniprot con número de registro P02768 del 22 de julio de 2015.

El término “complejos de uromodulina-o variante de uromodulina-GAG sulfatado-exosomas” se refiere a un complejo formado por la asociación de al menos tres componentes: la proteína uromodulina, GAG sulfatados y exosomas. También se incluyen aquellos complejos en los que la uromodulina se ha reemplazado por una variante de uromodulina. Estos tres componentes pueden encontrarse unidos o asociados entre sí de muchas maneras diferentes (véase la figura 15), pero esta unión o asociación es específica, es decir, va más allá de interacciones mecánicas simples debido a la proximidad o abundancia, tal como se demuestra por los ensayos reflejados en las figuras 7, 10 y 12.

Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína” también incluye todas las formas fisiológicamente relevantes de modificación química después de la traducción. Las modificaciones postraduccionales incluyen, por ejemplo, escisión del péptido señal, glicosilación, acetilación, fosforilación, isoprenilación, proteólisis, miristoilación, plegamiento de proteínas y procesamiento proteolítico, etc. Además, las proteínas pueden incluir aminoácidos no naturales formados por modificaciones después de la traducción, o por medio de introducción de aminoácidos no naturales durante la traducción. La proteína detectada es aquella que corresponde a la especie a la que pertenece el sujeto del que se ha tomado la muestra que va a analizarse.

Las “variantes de proteínas” también pueden usarse para medir los niveles de proteína. Las variantes de proteína pueden ser: (i) aquellas en las que uno o más de los residuos de aminoácidos se reemplazan por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un aminoácido conservado), y tal residuo de aminoácido reemplazado puede o no estar codificado por el código genético, (ii) aquellas en las que hay uno o más residuos de aminoácidos modificados, por ejemplo, residuos que se modifican mediante el acoplamiento de grupos sustituyentes, (iii) aquellas en las que la proteína es una variante de corte y empalme alternativo de la proteína, y/o (iv) los fragmentos proteicos. Los fragmentos incluyen proteínas generadas a través del procesamiento proteolítico (incluyendo proteólisis en múltiples sitios) de una secuencia original. Dichas variantes se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Las variantes incluyen secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 60%, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o el 96 % de similitud o identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos original. Como se sabe, la “similitud” entre dos proteínas se determina mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos de una proteína con una secuencia de una segunda proteína. El grado de “identidad” entre dos proteínas se determina usando algoritmos informáticos y métodos que conoce bien un experto en la técnica, preferiblemente usando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S. *et al.* NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S. *et al.* J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)].

La variante puede ser una variante de mamífero, preferiblemente una variante humana, más preferiblemente con al menos el 60%, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o el 96 % de similitud o identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos original.

Estos métodos pueden consistir esencialmente en las etapas mencionadas anteriormente, o pueden incluir etapas adicionales.

Los términos restantes se han definido en aspectos anteriores. Cualquier realización descrita anteriormente es aplicable a los métodos de diagnóstico de la invención.

Métodos para determinar el pronóstico o para monitorizar la progresión de una enfermedad

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el pronóstico o para monitorizar la progresión de una enfermedad asociada con un aumento en uno o más GAG sulfatados en un sujeto, que comprende:

a) separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra biológica de dicho sujeto por medio del primer método de la invención;

b) detectar el nivel de uno o más GAG sulfatados separados en a); y

c) comparar dicho nivel con un valor de referencia para dicho uno o más GAG sulfatados obtenidos del mismo sujeto en un punto de tiempo anterior,

en el que una disminución en el nivel de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativa de que la enfermedad asociada con un aumento en uno o más GAG sulfatados tiene un buen pronóstico, o

en el que un aumento en el nivel de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativo de que la enfermedad asociada con un aumento en uno o más GAG sulfatados tiene un mal pronóstico.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el pronóstico o para monitorizar la progresión de una enfermedad asociada con una disminución en uno o más GAG sulfatados en un sujeto, que comprende:

a) separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra biológica de dicho sujeto por medio del primer método de la invención;

b) detectar el nivel de uno o más GAG sulfatados separados en a); y

c) comparar dicho nivel con un valor de referencia para dicho uno o más GAG sulfatados obtenidos del mismo sujeto en un punto de tiempo anterior,

en el que una disminución en el nivel de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativa de que la enfermedad asociada con una disminución en uno o más GAG sulfatados tiene un mal pronóstico, o

en el que un aumento en el nivel de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativo de que la enfermedad asociada con una disminución en uno o más GAG sulfatados tiene un buen pronóstico.

La progresión de la enfermedad puede seguirse fácilmente según estos métodos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “monitorizar la progresión” de una enfermedad, que es equivalente a “determinar el pronóstico”, se refiere a la determinación de uno o más parámetros que indican la progresión de la enfermedad en un paciente diagnosticado con dicha enfermedad. Parámetros adecuados para determinar la progresión de un sujeto diagnosticado con una enfermedad son, sin limitación, riesgo de recaída, supervivencia libre de enfermedad y/o supervivencia global del sujeto. En esta memoria descriptiva, la expresión “riesgo de recaída” se entiende como la probabilidad de que un sujeto desarrolle la enfermedad después de un período libre de enfermedad; “supervivencia libre de enfermedad” se entiende como el período de tiempo después del tratamiento en el que no se detecta la enfermedad; y la “supervivencia global del sujeto” se entiende como el porcentaje de sujetos que sobreviven, desde el momento del diagnóstico o tratamiento, después de un período de tiempo definido.

Según estos aspectos de la invención, los niveles de uno o más GAG sulfatados en una muestra biológica de un sujeto que tiene la enfermedad se obtienen en un primer período de tiempo (primera muestra del sujeto), y los niveles de uno o más GAG sulfatados en una muestra biológica del mismo sujeto se obtienen en un segundo período de tiempo (segunda muestra del sujeto) y se comparan, lo que permite monitorizar la progresión de la enfermedad. La segunda muestra del sujeto puede tomarse del mismo sujeto del que se deriva la primera medición en un segundo período de tiempo, es decir, en cualquier momento después del primer período de tiempo, por ejemplo, un día, una semana, un mes, dos meses, tres meses, 1 año, 2 años o más después de la primera muestra del sujeto. En una realización particular, la primera muestra del sujeto se toma antes de recibir el tratamiento, y la segunda muestra del sujeto se toma después del tratamiento. En otra realización particular, la primera muestra del sujeto se toma después de que el sujeto haya comenzado a recibir tratamiento, y la segunda muestra del sujeto se toma más tarde en diferentes períodos de tiempo durante el transcurso del tratamiento.

El término “buen pronóstico” significa que la enfermedad no está progresando. “Buen pronóstico” también se refiere a un resultado positivo para el paciente y depende del tipo de pronóstico; por ejemplo, un buen pronóstico de un año de supervivencia significa que el paciente sobrevivirá durante al menos un año. En una realización preferida, un buen pronóstico se refiere a una probabilidad de más del 40% de supervivencia 5 años después del diagnóstico de la enfermedad.

El término “mal pronóstico” significa que la enfermedad está progresando y que la terapia administrada al sujeto en estudio debe cambiarse, y debe diseñarse una nueva terapia para tratar la enfermedad. “Mal pronóstico” también se refiere a un resultado negativo para el paciente y depende del tipo de pronóstico; por ejemplo, un mal pronóstico de un año de supervivencia significa que el paciente no sobrevivirá durante al menos 1 año. En una realización preferida, un mal pronóstico se refiere a una probabilidad de menos del 40% de supervivencia 5 años después del diagnóstico de la enfermedad.

Preferiblemente, la separación de uromodulina y/o albúmina asociada con GAG sulfatado o la separación de los complejos de uromodulina-o variante de uromodulina-GAG sulfatado-exoxomas de la muestra de orina se realiza según el primer método de la invención.

Los niveles de GAG sulfatados pueden determinarse tal como se describió anteriormente.

Los términos “aumento de los niveles” y “disminución de los niveles” aplicados al nivel de GAG sulfatados se han definido anteriormente en el contexto de los métodos de diagnóstico de la invención.

En una realización preferida, la enfermedad renal es enfermedad renal poliquística autosómica dominante de tipo 1 o tipo 2, preferiblemente enfermedad renal poliquística autosómica dominante de tipo 1 o tipo 2 asociada con mutaciones

conocidas en el gen de PKD1 (chr16:41711del18bp; chr16:28907c>g; chr16:37060c>t) y el gen de PKD2 (chr4:88995974c>t).

La mayoría de los términos se han definido anteriormente en el contexto del método de diagnóstico de la invención y también se aplican a este aspecto de la invención.

Las realizaciones descritas para los aspectos de la invención anteriores también son aplicables a los métodos de pronóstico de la invención.

Complejos

Los inventores han descubierto la existencia de complejos formados por uromodulina, GAG sulfatados y exosomas en la orina de sujetos sanos, y también en la orina de sujetos que padecen enfermedad renal. Estos complejos pueden incluir otras proteínas.

Basándose en la purificación de exosomas, precipitación de GAG específicos y estudios de secuenciación de proteínas, los inventores han determinado que los exosomas y GAG junto con la uromodulina forman un complejo que puede estar dirigiendo la comunicación entre los diferentes segmentos de la nefrona.

Por lo tanto, se da a conocer un complejo formado por la asociación de uromodulina o una variante de uromodulina, GAG sulfatados y exosomas.

Preferiblemente, el complejo se aísla, es decir, se libera sustancialmente de otros componentes presentes en la orina.

Usos de los kits de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit que comprende azul de dimetilmetileno (DMB) a una concentración comprendida entre 0,01 y 100 nM a un pH comprendido entre 2 y 6,9 para separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra, siendo dicha fracción una fracción que contiene exosomas; para identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra en un método según la invención; para identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados de una muestra en un método según la invención; para detectar una alteración en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados en un método según la invención; para diagnosticar una enfermedad en un método según la invención; para determinar el pronóstico de una enfermedad en un método según la invención; para monitorizar la progresión de una enfermedad en un método según la invención; para o para detectar complejos formados por exosomas, GAG sulfatados y una proteína.

En una realización preferida, la enfermedad es una enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados; preferiblemente la alteración es un aumento o una disminución en uno o más GAG sulfatados.

En otra realización, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en mucopolisacaridosis y una enfermedad renal. Más preferiblemente, la enfermedad renal es enfermedad renal poliquística autosómica dominante de tipo 1 o tipo 2.

En una realización preferida, el pH está comprendido entre 3 y 4; preferiblemente entre 3,3 y 3,6; más preferiblemente es 3,5.

En otra realización preferida, la concentración de DMB está comprendida entre 0,29 y 0,35 mM, y en el que el pH está comprendido entre 3,3 y 3,6, y el agente tamponante es tampón formiato.

Tal como se usa en el presente documento, el término “kit” se refiere a una combinación de un conjunto de reactivos adecuados para separar los GAG sulfatados libres y la fracción unida a GAG sulfatados de una muestra junto con uno o más tipos de elementos o componentes para llevar a cabo los métodos de la invención, particularmente para analizar el patrón de proteínas o lípidos de la fracción unida a GAG sulfatados, y opcionalmente reactivos adecuados para detectar los niveles de GAG sulfatados, uromodulina madura o secretada, el péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 de uromodulina, albúmina, IgA y/o IgG. El kit incluye opcionalmente otros tipos de reactivos bioquímicos, recipientes, envases adecuados para la venta comercial, componentes electrónicos de hardware y software, etc. Los reactivos se envasan para permitir su transporte y almacenamiento. Los materiales adecuados para envasar los componentes del kit incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato, y similares), botellas, viales, papel, bolsitas, y similares. Adicionalmente, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los diferentes componentes del kit. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de modo que puedan leerse por un sujeto, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas, y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD), y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionan dichas instrucciones.

En otra realización preferida, el kit comprende además un gel seleccionado del grupo que consiste en un gel de

poliacrilamida y un gel de acetato de celulosa.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gel de poliacrilamida” se refiere a un hidrogel que está formado por un homopolímero de acrilamida y es uno de los geles más comúnmente usados para realizar electroforesis de proteínas, específicamente electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Estos geles son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio intervalo de pH, temperatura y fuerza iónica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gel de acetato de celulosa” se refiere a un medio usado para la separación y caracterización de proteínas y otras moléculas según su densidad de carga. El soporte consiste en tiras delgadas de acetato de celulosa con propiedades de adsorción mínimas, por lo que se logra la separación en bandas bien definidas.

En otra realización preferida, el kit comprende además un tampón de carga.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tampón de carga” se refiere al tampón que se añade a la muestra que se cargará en el pocillo del gel de poliacrilamida o en el soporte de acetato de celulosa. Generalmente, este tampón contiene agua, sacarosa y un colorante (por ejemplo, xileno cianol, azul de bromofenol, verde de bromocresol, etc.). Los ejemplos de tampones de carga pueden ser, sin limitación, tampón Laemli; tampón Laemli con β-mercaptoetanol y SDS al 7,5 % a una razón 1:1; tampón TBE (Tris-borato 100 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) con sacarosa 2 M y azul de bromofenol al 0,02%; tampón TAE (Tris 40 mM, CH_3COONa 5 mM, EDTA 0,9 mM, pH 7,9); y tampón TBE con sacarosa 2 M. En una realización preferida, el tampón de carga es SDS al 7,5 %.

En otra realización preferida, el kit comprende además un tampón de electroforesis.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tampón de electroforesis” se refiere al tampón en el que se sumerge el gel para realizar la electroforesis. Ejemplos de tampón de electroforesis son, sin limitación, TAE 1x o 0,5X, TBE 1x, Tris-glicina 1x y acetato de bario 0,05 M. En una realización preferida, el tampón de electroforesis es acetato de bario 0,05 M.

En otra realización, el kit comprende además un colorante específico para ver proteínas tal como se define en el contexto del primer método de la invención. En una realización incluso más preferida, el colorante es Sypro Ruby.

En otra realización, el kit comprende además un agente de desteñido, preferiblemente ácido acético, más preferiblemente ácido acético al 10%.

En otra realización, el kit comprende además un reactivo capaz de detectar una proteína.

En una realización, el reactivo es una enzima capaz de reconocer específicamente una secuencia de aminoácidos del péptido o proteína y escindirla. En una realización, el reactivo es una enzima capaz de reconocer específicamente una secuencia de aminoácidos del péptido de la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma y escindirla, e incapaz de reconocer una secuencia de aminoácidos de uromodulina madura o secretada y escindirla. En otra realización, el reactivo es una enzima seleccionada del grupo que consiste en una enzima capaz de reconocer específicamente una secuencia de aminoácidos de uromodulina madura o secretada o de una variante de la misma y escindirla, una enzima capaz de reconocer específicamente una secuencia de aminoácidos de albúmina o de una variante de la misma y escindirla, una enzima capaz de reconocer específicamente una secuencia de aminoácidos de IgA o de una variante de la misma y escindirla, una enzima capaz de reconocer específicamente una secuencia de aminoácidos de IgG o de una variante de la misma y escindirla, y combinaciones de los mismos.

En una realización, el reactivo es un aptámero. En una realización, el reactivo es un aptámero capaz de detectar específicamente un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante del mismo, e incapaz de detectar uromodulina madura o secretada, o un fragmento de dicho aptámero con la capacidad de unirse a la secuencia SEQ ID NO: 1 o a una variante de la misma. En otra realización, el reactivo es un aptámero seleccionado del grupo que consiste en un aptámero capaz de reconocer específicamente la uromodulina madura o secretada o una variante de la misma, un aptámero capaz de reconocer específicamente albúmina o una variante de la misma, un aptámero capaz de reconocer específicamente IgA o una variante de la misma, un aptámero capaz de reconocer específicamente IgG o una variante de la misma, y combinaciones de los mismos. Los métodos para producir tales aptámeros se conocen bien en la técnica.

En una realización incluso más preferida, el reactivo es un anticuerpo. En una realización incluso más preferida, el anticuerpo es un anticuerpo capaz de detectar específicamente un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante del mismo, e incapaz de detectar uromodulina madura o secretada, o un fragmento de dicho anticuerpo con la capacidad de unirse a la secuencia SEQ ID NO: 1 o a una variante de la misma. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo capaz de reconocer específicamente la uromodulina madura o secretada o una variante de la misma, un anticuerpo capaz de reconocer específicamente albúmina o una variante de la misma, un anticuerpo capaz de reconocer específicamente IgA o una variante de la misma, un anticuerpo capaz de reconocer específicamente IgG o una variante de la misma, y combinaciones de los

mismos. Los métodos para producir tales anticuerpos se conocen bien en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “detectar específicamente” o “reconocer específicamente” se refiere a que dicho reactivo solo reconoce ese péptido o proteína de interés y no muestra ninguna reacción si dicho péptido o proteína de interés no está presente. Cuando se hace referencia a un péptido o proteína, se refiere a que el reactivo es capaz de reaccionar con al menos un epítopo del péptido o la proteína, en contraste con la interacción inespecífica.

Como entenderá un experto en la técnica, los anticuerpos del kit pueden usarse en todas las técnicas conocidas para determinar los niveles de proteína que son adecuadas para analizar una muestra, tales como inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, RIA, EIA competitiva, DAS-ELISA, técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips, microalineamientos de proteínas, ensayos de precipitación coloidal en tiras reactivas, etc.

Los anticuerpos y aptámeros pueden fijarse a un soporte sólido tal como una membrana, un plástico o un vidrio, opcionalmente tratado para facilitar la fijación de dichos anticuerpos y aptámeros al soporte. Dicho soporte sólido comprende al menos un conjunto de anticuerpos o aptámeros que reconocen los niveles de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, o uromodulina madura o secretada, o albúmina, o IgA, o IgG, o una variante de los mismos, y que puede usarse para detectar los niveles de expresión de estas proteínas.

Los kits comprenden además reactivos para detectar una proteína codificada por un gen constitutivo. La disponibilidad de dichos reactivos adicionales permite normalizar las mediciones tomadas en diferentes muestras (por ejemplo, la muestra que va a analizarse y la muestra de control) para descartar que las diferencias en la expresión de los biomarcadores se deban más a una diferencia en la cantidad total de proteínas en la muestra que a diferencias reales en los niveles de expresión relativos. Los genes constitutivos en la presente invención son genes que están siempre activos o se transcriben constantemente, y codifican proteínas que se expresan constitutivamente y llevan a cabo funciones celulares esenciales. Las proteínas que se expresan constitutivamente y pueden usarse en la presente invención incluyen, sin limitación, β-2-microglobulina (B2M), ubiquitina, proteína ribosómica 18S, ciclofilina, GAPDH, PSMB4, tubulina y actina.

En otra realización, el kit comprende además un reactivo capaz de detectar un lípido. Ejemplos no limitativos de reactivos capaces de detectar un lípido son, sin limitación, reactivos para tinción con azul rápido luxol, técnica de hematina ácida de Baker, tinción con aceite rojo O, tinción con negro de Sudán B, Sudan II, III y IV.

En otra realización, el kit comprende además un reactivo capaz de detectar un GAG sulfatado. Ejemplos no limitativos de reactivos capaces de detectar un GAG sulfatado son, sin limitación, DMB, azul alcián, albúmina ácida y cloruro de cetilpiridinio (CPC). En una realización preferida, el reactivo capaz de detectar un GAG sulfatado es DMB, preferiblemente DMB al 0,02 % en agua.

En otra realización, el kit comprende además un programa informático para ejecutar un método según cualquiera de los aspectos de la invención descritos en esta invención.

Todas las realizaciones particulares de los métodos de la presente invención son aplicables a los kits y a los usos de los mismos.

La invención se describe en detalle a continuación por medio de los siguientes ejemplos, que debe interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Descripción del procesamiento de muestras antes del aislamiento de la fracción asociada con glucosaminoglicanos y/o exosomas

En el caso de orina, el proceso comenzó con la segunda orina de la mañana (desechando la primera corriente para evitar contaminaciones del sistema genitourinario externo) recogida en recipientes libres de proteasa, y se desechó orina con la presencia visible de hematuria e infección del tracto urinario. Las muestras de orina deben almacenarse a -20ºC hasta su uso si no se usan el mismo día.

En el caso de muestras de sangre, deben recogerse en un tubo adecuado dependiendo de si va a obtenerse suero o plasma. En el caso del plasma, la muestra de sangre debe recogerse en un tubo con anticoagulante, por ejemplo, heparina o EDTA, y se centrifuga a una velocidad máxima durante 10 minutos. En el caso del suero, la muestra debe recogerse en un tubo STII o bioquímico, dejarse reposar durante al menos 30 minutos y centrifugarse a una velocidad máxima durante 10 minutos. Tanto el plasma como el suero deben almacenarse a -80ºC hasta su uso si no se usan el mismo día.

Ejemplo 2: Descripción del método de aislamiento de exosomas

Las muestras se procesaron siguiendo una modificación del método que está bien establecido en la bibliografía (Paperson *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2013, 110:17380-5; Hogan *et al.* J Am Soc Nephrol 2009, 20:278-288). En el caso de orina, el método comenzó con el sobrenadante de orina obtenido por medio de centrifugación de orina a 1000 g durante 5 minutos. Brevemente, los sobrenadantes de orina se centrifugaron a 5.000 g durante 20 minutos, se sometieron a filtración a través de filtros de baja adsorción de proteínas que tienen un tamaño de poro de 0,22 μm y se sometieron a ultracentrifugación a 100.000 g durante 2 horas. Los sedimentos de exosomas se resuspendieron en un volumen adecuado de tampón (por ejemplo, PBS 1X) y se mantuvieron a -20ºC hasta su uso.

Ejemplo 3: Descripción del método de separación para separar la fracción unida a glucosaminoglicanos

Se usó azul de dimetilmetileno (Serva) a una concentración de 0,29 mM disuelto en etanol, y se añadió tampón formiato 0,2 M pH 3,5 a una razón 1:99. Entonces se mezcló con la muestra biológica a una razón 1:2. Posteriormente, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4ºC. El sobrenadante se eliminó y se recuperó el precipitado que contenía la fracción unida a los glucosaminoglicanos.

Ejemplo 4: Identificación de proteínas unidas a glucosaminoglicanos en muestras de orina

La presencia de dos proteínas conocidas que están glicosiladas en hasta un 30 %, es decir, albúmina y uromodulina, en muestras de orina se identificó por medio de proteómica (identificación por medio de secuenciación por MALDI-TOF/TOF).

La figura 4 muestra el patrón de bandas de proteínas unidas a GAG en la orina (50 μl) de individuos sanos (16 varones y 16 mujeres, de 20 a 49 años de edad) usando el método de la invención. La proteína unida a GAG más abundante en individuos de control es la uromodulina, como se muestra en la parte izquierda del dibujo, y otras proteínas están presentes en menor medida. Se usaron protocolos convencionales de inmunotransferencia de tipo Western y un anticuerpo específico de uromodulina (Biomedical-BTI) en una dilución de 1:3000 para identificar la uromodulina. Se observó usando FITC (Abcam IgG-FITC, dilución 1:1000) y el sistema Molecular Imager (Bio-Rad) con el software Quantity One (Bio-Rad).

Para separar mejor las proteínas que estaban unidas a GAG en la orina, se usó electroforesis 2D que permite ver diferentes isoformas de la misma proteína. Después de varias pruebas, se observó que no había proteínas presentes en la orina precipitadas con DMB por encima de pH 6. La figura 5 muestra el patrón de proteínas unidas a GAG en la orina (300 μl) de dos individuos de control (varones de 23 y 26 años de edad) usando tiras de pH 3-6 y SDS-PAGE al 7,5 %, seguido de tinción con Sypro Ruby. Se observó la presencia de varias manchas, donde las más abundantes son las diferentes isoformas de la uromodulina. La inmunotransferencia de tipo Western se realizó tal como se describió anteriormente.

La figura 6 muestra la aplicación de la invención en la búsqueda de diferentes patrones de proteínas unidas a GAG en la orina y el suero de individuos de control e individuos con insuficiencia renal (izquierda), y la identificación de albúmina unida a GAG presente por medio de inmunotransferencia de tipo Western (derecha). Para la muestra de suero, Se preparó una dilución 1:100 en PBS y se precipitaron 50 μl con DMB siguiendo el método de la invención descrito anteriormente. Para la inmunotransferencia de tipo Western de albúmina, se usó un anticuerpo de Origene a una dilución 1:4000, y se observó con un anticuerpo unido a Cy5 (IgG-Cy5 Abcam, dilución 1:5000) usando el equipo descrito anteriormente. Se observó que el paciente con insuficiencia renal casi no tenía uromodulina en la orina, pero tenía mucha albúmina, aunque solo una pequeña cantidad estaba glicada.

Ejemplo 5: Descripción de los ensayos para reconstituir la unión entre diferentes proteínas y glucosaminoglicanos

La figura 7 demuestra que el método de la invención es capaz de separar aquellas proteínas que tienen glucosaminoglicanos unidos a las mismas.

Para demostrar esto, se usaron uromodulina comercial (glicoproteína Tamm Horsfall humana, Biomedical-BTI) y albúmina (Bio-Rad), incubándose dichos compuestos con glucosaminoglicanos comerciales (heparán, condroitín y dermatán sulfato de Sigma) tanto en PBS (figuras 7c y 7d) como en la orina (figuras 7a y 7b) de un paciente con una mutación por truncamiento (C255Y) en el gen de la uromodulina que conlleva niveles prácticamente indetectables de uromodulina en la orina, y con una enfermedad quística medular autosómica dominante (ADMCKD) en curso. Se incubó un microgramo de albúmina sérica bovina (BSA) (Bio-Rad) o uromodulina (Biomedical-BTI) en PBS con 100 μg de GAG comerciales durante 1 hora a 37ºC para permitir la unión de GAG a proteínas. Luego se añadió azul de dimetilmetileno y se siguió el método de separación para separar la fracción unida a GAG descrito anteriormente.

El precipitado se resuspendió en SDS al 7,5 % y se preparó siguiendo el protocolo convencional para el uso de SDS-PAGE. Se observó que la albúmina comercial y la uromodulina están ligeramente glicadas, y después de la incubación con GAG, se produce glicación y aparecen nuevas bandas de proteínas.

El experimento se repitió usando 20 μl de orina de un paciente sin uromodulina, observándose la ausencia de uromodulina y la presencia de albúmina (figuras 7a y 7b, carril 1), ambos de las cuales estaban ligeramente glicadas con GAG (figuras 7a y 7b, carril 2). Después de incubar la orina con GAG comerciales (100 μg) y con BSA y uromodulina (1 μg), se observó la aparición de nuevas bandas unidas a GAG. Puede verse en las imágenes de los geles que se produce una superposición de bandas entre la uromodulina y la albúmina. Se ha demostrado que la albúmina tiene una mayor afinidad por los GAG y está ocultando el descubrimiento de otras proteínas, por lo que sería útil el uso de métodos de agotamiento de albúmina para tratar de desenmascarar otras proteínas.

Ejemplo 6: Identificación de los patrones de bandas de proteínas unidas a GAG específicas en individuos que padecen mucopolisacaridosis

La figura 8 muestra los patrones de bandas de proteínas unidas a GAG en la orina de pacientes que padecen diferentes tipos de mucopolisacaridosis (MPS I, MPS II, MPS III, MPS IV y MPS VII) y en individuos de control de la misma edad y sexo que los pacientes. También se muestran los niveles de GAG en orina (por encima del nivel de referencia en pacientes) medidos por el método convencional con DMB (Whitley C. Am.B *et al.* Clin. Chem. 1989, 35:2074-2081), y la identificación de las proteínas, uromodulina y albúmina, por medio de inmunotransferencia de tipo Western realizada en las condiciones ya descritas anteriormente.

La figura 9 muestra la electroforesis 2D en las condiciones descritas anteriormente en la orina de pacientes con mucopolisacaridosis confirmada. En comparación con los controles de la figura 5, se observa la desaparición de isoformas de alto peso molecular correspondientes a proteínas glicadas de bajo peso y uromodulina.

Ejemplo 7: Biomarcador de diagnóstico de mucopolisacaridosis

Tras realizar estudios de secuenciación de uromodulina por medio de MALDI-TOF/TOF, se encontró que el péptido señal SEQ ID NO: 1 (MGQPSLTWML MVVVASWFIT TAAT) se mantiene en pacientes con mucopolisacaridosis, detectándose específicamente el péptido de SEQ ID NO: 2 (MGQPSLTWML MVVVASWFIT TAATDTSEAR), que está ausente en las muestras de individuos de control. Por lo tanto, sería posible usar tecnología de espectrometría de masas en tándem para cuantificar este péptido señal de uromodulina y usarlo como marcador de diagnóstico para MPS.

Ejemplo 8: Diagnóstico de enfermedad renal, seguimiento de la enfermedad renal y la búsqueda de nuevos biomarcadores para una enfermedad renal

La invención se usó en el estudio de pacientes o futuros pacientes con enfermedad renal poliquística autosómica dominante asociada con mutaciones conocidas en genes de PKD1 (chr16: 41711del18bp; chr16:28907c>g; chr16:37060c>t) y PKD2 (chr4:88995974c>t). Se estudiaron veintitrés pacientes con PKD1, 10 pacientes con PKD2 y 17 voluntarios sanos cuyos diagnósticos y funciones renales fueron evaluados por expertos en nefrología. La enfermedad renal se diagnosticó basándose en los niveles de creatinina sérica, así como la medición de otros parámetros renales preestablecidos que son rutinarios en la práctica clínica y el diagnóstico genético. La función renal normal de voluntarios sanos se evaluó a través de creatinina sérica y anamnesis.

Los sobrenadantes y los sedimentos obtenidos del fraccionamiento por centrifugación se sometieron a precipitación específica con DMB a una razón 1:2 tal como se describe, y los precipitados se resuspendieron y desnaturalizaron a 95ºC durante 5 minutos en tampón Laemli con β-mercaptoetanol y SDS al 7,5 % a una razón 1:1. Se cargaron entre 15-30 μl en un gel de SDS-PAGE al 7,5 % y las proteínas se separaron a 100 V durante aproximadamente 1 hora 30 minutos y se observaron por medio de tinción con agentes de contraste de proteínas (por ejemplo, Sypro Ruby Protein-Gel Stain 1X).

La figura 10 muestra que hay un perfil de proteínas asociadas con GAG en individuos de control, y que el perfil de proteínas de orina unidas a GAG está alterado en pacientes con enfermedad renal, por ejemplo PKD, y que esta alteración depende de su función renal (determinada por los niveles de creatinina sérica y proteinuria). Los pacientes futuros que tienen una mutación conocida y no presentan ningún síntoma en el momento de los ensayos ya muestran una deficiencia en el complejo. Esta observación da a conocer el uso del mismo como biomarcador de diagnóstico y pronóstico para una enfermedad renal y daño renal, donde los cambios en los niveles de creatinina se anticipan varios años antes.

A nivel de proteínas, esta huella urinaria parece estar asociada con uromodulina y GAG (se ha demostrado para condroitín, dermatán y heparán sulfato) que se sabe que son parte de la membrana basal glomerular de la matriz extracelular, y la capa de mucopolisacárido de la superficie uroepitelial. La uromodulina parece tener un patrón de expresión inverso con respecto a los niveles de creatinina, donde tiende a disminuir progresivamente en pacientes con enfermedad renal avanzada. De esta manera, se ha observado que cuanto mayor es el daño y la progresión de la insuficiencia renal, incluso sin cambios significativos en los niveles de creatinina, menor es la presencia de uromodulina asociada con GAG en la orina (figuras 10 y 11). Esta alteración es más obvia en pacientes con PKD de tipo 2 (gen de PKD2 mutado) que en pacientes con PKD de tipo 1 (gen de PKD1 mutado), donde la uromodulina

asociada con GAG desaparece prácticamente a altos niveles de creatinina, mientras que otras proteínas asociadas con GAG aparecen gradualmente (figura 10).

Al comparar los perfiles observados entre los sobrenadantes y sus respectivos sedimentos celulares (figura 11), puede determinarse que, a medida que la insuficiencia renal crónica se vuelve más grave, se observan menos proteínas asociadas con GAG al nivel intracelular y aparecen más proteínas asociadas con GAG a nivel extracelular.

Se realizó un estudio similar, pero a menor escala, en plasma de 14 pacientes con cáncer (9 con cáncer de próstata y 5 con cáncer de colon), así como en la orina y los sueros de otros 14 pacientes con enfermedad renal adecuadamente validada (10 con enfermedades glomerulares y 4 con nefropatía por IgA), en fluidos peritoneales de 9 pacientes de riñón en terapia de reemplazo renal (diálisis peritoneal), y en la orina de tres modelos animales con ADPKD y ARPKD. Se obtuvieron resultados similares al primer estudio, observándose una alteración del perfil de proteínas asociadas con GAG en comparación con la homogeneidad observada en las muestras de los controles respectivos. También se observó precipitación de proteínas asociadas con GAG en medios de cultivo de diferentes líneas celulares renales. Por lo tanto, la aplicación de esta huella de proteínas asociadas con GAG como biomarcador de diagnóstico/pronóstico se extiende a cualquier enfermedad con o sin implicación renal y en diferentes tipos de muestras biológicas.

Ejemplo 9: Descripción de las condiciones para identificar uromodulina asociada con glucosaminoglicanos y exosomas mediante inmunotransferencia de tipo Western

La identificación y caracterización de complejos de exosomas purificados se realizó mediante técnicas de obtención de imágenes por microscopía electrónica, validación del tamaño/carga global (basándose en el potencial zeta), precipitación específica con DMB como se describió anteriormente, separación en geles de SDS-PAGE al 7,5% e inmunotransferencia de tipo Western.

Las fracciones de exosomas purificados, los sobrenadantes y/o los sedimentos de orina se precipitaron con DMB, se procesaron y se separaron en un gel de SDS-PAGE como se describió anteriormente. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF-FL a 100 V durante una hora y media, la unión inespecífica se bloqueó con caseína al 1% o leche desnatada al 4%; se incubaron con el anticuerpo primario (anti-glicoproteína Tamm Horsfall humana de conejo, Biomedical-BTI) en una dilución 1:3000, y finalmente se reveló por medio de incubación con el anticuerpo secundario marcado con agente fluorescente adecuado.

La figura 12 muestra la caracterización de los complejos UGE (uromodulina-GAG-exosoma) por medio de imágenes de microscopía electrónica (a), tamaño (b), potencial zeta (c) e inmunotransferencia de tipo Western de uromodulina (d).

La figura 12(d) muestra la identificación de uromodulina asociada con las fracciones de exosomas purificadas usando diferentes enfoques y en diferentes pacientes con PKD, así como en células no fraccionadas y sedimentos de orina.

Se usó también un kit comercial (ExoQuick_CT, System Biosciences) para obtener exosomas siguiendo las instrucciones del fabricante (figura 13).

Ejemplo 10. Descripción de los ensayos para romper la unión entre diferentes proteínas, glucosaminoglicanos, y exosomas

La especificidad de los complejos de exosomas se validó por medio de la rotura y reconstitución de la unión entre sus componentes, UMOD-exosoma-GAG en diferentes medios (por ejemplo, orina o tampón PBS) y usando diferentes enfoques (por ejemplo, precipitación por gravedad, purificación en gradiente, tratamiento con ditiotreitol, filtración o incubación con glucosaminoglicanos comerciales).

Se usaron exosomas previamente purificados de la orina de diferentes pacientes con PKD por medio de purificación en gradiente (ExoQuick_CT, System Biosciences).

La rotura de los complejos UGE se realizó por medio de tratamiento con 100 mg/ml de ditiotreitol (DTT) a 37ºC durante 10 minutos y/o filtración con filtros de baja adsorción de proteínas que tienen un tamaño de poro de 0,22 μm (Millex, Millipore) (figura 14).

La funcionalidad de los complejos de UMOD-exosoma-GAG se sometió a prueba según estudios proteómicos. Según esto, varias bandas de proteínas se escindieron de geles de SDS-PAGE y se procesaron para su identificación por medio de secuenciación por MALDITOF/TOF.

Las diferentes proteínas asociadas con los complejos UGE se identificaron por medio de secuenciación por MALDI-TOF/TOF, describiéndose dichas proteínas en detalle en la tabla II.

LOCALIZACIÓN POR SDS-PAGE	NÚMERO DE REGISTRO	NOMBRE DE PROTEÍNA
250 KDa	P02768-ALBU_HUMAN	Albúmina
250 KDa	P13645-K1C10_HUMAN	Queratina citoesquelética 10, tipo I
250 KDa	P01877-IGHA2_HUMAN	Región de cadena C de Ig A2
250 KDa	P01876-IGHA1_HUMAN	Región de cadena C de Ig A1
250 KDa	P04264-K2C1_HUMAN	Queratina citoesquelética 1, tipo II
180 KDa	P01834-IGKC_HUMAN	Región de cadena C de Ig Kappa
80 KDa	P07911-UROM_HUMAN	Uromodulina
60 KDa	P04264-K2C1_HUMAN	Queratina citoesquelética 1, tipo II
50 KDa	P02768-ALBU_HUMAN	Albúmina
37 KDa	P02768-ALBU_HUMAN	Albúmina

Tabla II. Proteínas asociadas con complejos UGE identificados por medio de secuenciación por MALDI-TOF/TOF.

Los exosomas aislados de orina parecen formar un complejo con uromodulina y GAG tanto en muestras de voluntarios sanos como en pacientes de riñón.

Además, se demuestra que la asociación de uromodulina-glucosaminoglicano-exosoma es específica (figura 13) y que la integridad/funcionalidad de estos complejos depende de la presencia adecuada de sus tres elementos constitutivos (figura 14).

La figura 15 muestra las posibles asociaciones entre los tres elementos que forman los complejos UGE.

Ejemplo 11: Los complejos UGE se pierden cuando el daño/insuficiencia renal progresa.

Se usaron exosomas previamente purificados de la orina de diferentes pacientes con una enfermedad renal, específicamente de 6 pacientes con ADPKD y 3 pacientes con ADMCKD con las mutaciones previamente indicadas. La figura 16 muestra cómo se pierden los complejos UGE a medida que progresa el daño renal (correspondiente con niveles aumentados de creatinina).

Ejemplo 12: Separación de GAG libres en orina en geles de acetato de celulosa para el diagnóstico de mucopolisacaridosis

Los inventores han desarrollado un método que permite mejorar el diagnóstico de mucopolisacaridosis usando la separación de GAG libres (condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato) en muestras de orina. Para ese fin, se usó la segunda orina de la mañana, y se precipitaron 0,5 ml de orina con 1 ml de DMB 0,29 mM en tampón formiato de sodio 0,2 M a pH 3,5. Se mezcló y se dejó precipitar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 10 minutos a las 13.000 rpm a 4ºC, el sobrenadante se eliminó por succión o decantación, y el precipitado se resuspendió en 50 microlitros de SDS al 7,5 %. También se preparó una mezcla de condroitín sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato comercial, que se usó como control positivo (C+ en la figura 17). Se cargaron cuatro microlitros en un gel de acetato de celulosa (Cellogel Electrophoresis Co. Srl; Cod. 01A32-25; 5,7x14 cm/200 μm) y se usó acetato de bario fresco 0,05 M como tampón. Para la separación, el gel se ejecutó a 150 V durante 1 hora y 15 minutos, y después se tiño con DMB al 0,02 % en agua durante 10 minutos bajo agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó desteñido usando ácido acético al 10% durante 10 minutos bajo agitación a temperatura ambiente. Como puede verse en la figura 17, se observó la aparición de bandas de GAG libres azules definidas y separadas y permitió diferenciar individuos con mucopolisacaridosis de controles que no padecen ninguna enfermedad. En controles sanos, solo se observó la banda de condroitín sulfato; sin embargo, en individuos enfermos, dependiendo del tipo de mucopolisacaridosis, se observaron la banda de queratán sulfato característica de mucopolisacaridosis IV, la banda de heparán sulfato característica de mucopolisacaridosis III o la banda de dermatán sulfato característica de mucopolisacaridosis I, II, VI y VII.

Conclusiones:

Los resultados de las figuras 8 y 9 muestran que es posible diagnosticar mucopolisacaridosis de una manera simple usando el método de la invención. Por un lado, la identificación de otras proteínas glicosiladas/glicadas con GAG y la caracterización de las diferentes isoformas de uromodulina y albúmina glicadas permitiría mejorar el conocimiento relacionado con la fisiopatología de la enfermedad, y puede conducir al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

El método de la invención también es útil para encontrar otros péptidos dentro de cualquier proteína que puedan estar alterados en ciertas patologías y que puedan usarse como biomarcadores en patologías relacionadas con la glicosilación/glicación.

El perfil urinario homogéneo observado en la población general está alterado en pacientes con enfermedad renal a nivel de proteína y podría usarse como biomarcador de la función renal y de pronóstico, donde los cambios en los niveles de creatinina, el biomarcador de referencia actual para el daño renal, se anticipan varios años antes ya que el 50% de la función renal puede haberse perdido antes de que los niveles de creatinina cambien significativamente.

Sabiendo que los exosomas interaccionan con el cilio primario y que se captan por al menos las células del túbulo colector, se sugiere que el complejo UGE (uromodulina-glucosaminoglicano-exosomas) puede estar dirigiendo la comunicación entre los diferentes segmentos de la nefrona. Esta comunicación puede estar relacionada con el sistema inmunitario como resultado de la identificación del contenido de los exosomas, así como de la función descrita anteriormente de la uromodulina como agente inmunitario (trampa para patógenos, mediador de la inflamación o activador de macrófagos y granulocitos).

Con el descubrimiento de los complejos uromodulina-glucosaminoglicano-exosomas, ahora se muestra claramente el papel que desempeñan la uromodulina y los GAG tanto en la comunicación como en el sistema inmunitario a un nivel renal que se desconoce hasta ahora y que además puede monitorizarse de manera fácil y rentable en la orina para su uso como biomarcadores de diagnóstico/pronóstico para una enfermedad renal dada la identificación de un perfil característico. Se sugiere que estos complejos UGE y, por lo tanto, este mecanismo de comunicación, se pierden cuando el daño/insuficiencia renal progresa, provocando la desregulación de los segmentos de la nefrona y alteraciones en el sistema inmunitario. Estos mecanismos establecen además la base para el desarrollo de posibles terapias y la aplicación de medidas correctivas antes de alcanzar una estadio avanzado de la enfermedad renal. Esta técnica y el descubrimiento de este complejo de señalización de PGE pueden extrapolarse además a cualquier fluido biológico.

La divulgación además permite, partiendo de una muestra de orina de 1 ml y usando un gel de acetato de celulosa, diferenciar individuos que padecen mucopolisacaridosis de individuos sanos; y también permite diferenciar entre las diferentes mucopolisacaridosis como se demuestra en la figura 17. El método comúnmente utilizado para el diagnóstico de mucopolisacaridosis es extremadamente laborioso y difícil, requiriendo el uso de aproximadamente dos días; mientras que el método dado a conocer permite que dicho diagnóstico se realice de una manera rápida y simple donde necesita solo aproximadamente 4 horas.

Lista de secuencias

<110> Fundación Ramón Domínguez
Universidade de Santiago de Compostela
Servizo Galego de Saúde

<120> Método para separar la fracción unida a glucosaminoglicanos y aplicaciones del mismo

<130> P12162PC00

<150> ES P201531297
<151> 10-09-2015

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 24
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Gly Gln Pro Ser Leu Thr Trp Met Leu Met Val Val Val Ala Ser
1 5 10 15

Trp Phe Ile Thr Thr Ala Ala Thr
20

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2
Met Gly Gln Pro Ser Leu Thr Trp Met Leu Met Val Val Val Ala Ser
1 5 10 15

Trp Phe Ile Thr Thr Ala Ala Thr Asp Thr Ser Glu Ala Arg
20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para separar glucosaminoglicanos (GAG) sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) poner en contacto una muestra con el colorante azul de dimetilmetileno (DMB) a un pH ácido comprendido entre 2 y 6,9;

b) incubar la mezcla de a) a una temperatura comprendida entre 0ºC y 40ºC durante el tiempo requerido para la formación de un precipitado;

c) retirar el sobrenadante; y

d) recuperar el precipitado que contiene GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados, en el que la fracción asociada con GAG sulfatados es una fracción que contiene exosomas.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la fracción asociada con GAG sulfatados es un complejo seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un complejo formado por uromodulina o una variante de la misma y exosomas,

(ii) un complejo formado por albúmina o una variante de la misma y exosomas,

(iii) un complejo formado por IgA o una variante de la misma y exosomas, y

(iv) un complejo formado por IgG o una variante de la misma y exosomas.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la muestra es una muestra de exosomas.

4. Método de identificación *in vitro* para identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) separar la fracción proteica asociada con GAG sulfatados de una muestra según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

b) separar el producto obtenido en a) mediante electroforesis; y

c) identificar el perfil electroforético obtenido en b).

5. Método de identificación *in vitro* para identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) separar la fracción proteica asociada con GAG sulfatados de una muestra según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y

b) identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados por medio de cromatografía o espectrometría de masas de la fracción obtenida en a).

6. Método de identificación *in vitro* para identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) separar la fracción lipídica asociada con GAG sulfatados de una muestra según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

b) identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados por medio de electroforesis o cromatografía de la fracción obtenida en a).

7. Método *in vitro* para detectar una alteración en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados de una muestra, que comprende:

a) identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra según el método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 y/o identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados de una muestra según el método de la reivindicación 6; y

b) comparar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados obtenidos en a) con el perfil obtenido para una muestra de referencia y/o comparar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados obtenidos en a)

con el perfil obtenido para una muestra de referencia, en el que una diferencia en el perfil obtenido en a) con respecto al perfil obtenido en la muestra de referencia indica una alteración en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados.

8. Método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados en un sujeto, que comprende:

a) separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra biológica de dicho sujeto por medio de un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,

b) detectar el nivel de uno o más GAG sulfatados separados en a), y

c) comparar dicho nivel con un valor de referencia para dicho uno o más GAG sulfatados,

en el que un nivel aumentado o disminuido de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece una enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados.

9. Método según la reivindicación 8, en el que la enfermedad asociada con una alteración de uno o más GAG sulfatados se selecciona del grupo que consiste en:

a) una mucopolisacaridosis seleccionada del grupo que consiste en síndrome de Hurler (deficiencia de alfa-L-iduronidasa), síndrome de Scheie (deficiencia de alfa-L-iduronidasa), síndrome de Hunter (deficiencia de iduronato-2-sulfatasa), síndrome de Sanfilippo A (deficiencia de heparán sulfamidasa), síndrome de Sanfilippo B (deficiencia de alfa-N-acetil-glucosaminidasa), síndrome de Sanfilippo C (deficiencia de heparán-alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa), síndrome de Sanfilippo D (deficiencia de N-acetilglucosamina-6-sulfatasa), síndrome de Morquio A (deficiencia de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa), síndrome de Morquio B (deficiencia de beta-D-galactosidasa), síndrome de Maroteaux-Lamy (deficiencia de arilsulfatasa B) y síndrome de Sly (deficiencia de beta-glucuronidasa);

b) una enfermedad renal seleccionada del grupo que consiste en enfermedad renal poliquística autosómica dominante de tipo 1 o tipo 2, glomerulonefritis, síndrome nefrótico, nefropatía endémica de los Balcanes, trasplante de riñón, enfermedad de cálculos renales y nefropatía diabética;

c) una endocrinopatía seleccionada del grupo que consiste en hipotiroidismo y diabetes;

d) un trastorno reumático seleccionado del grupo que consiste en osteoartritis, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide y siringomielia; y

e) una enfermedad oncológica.

10. Método *in vitro* para determinar el pronóstico o para monitorizar la progresión de una enfermedad asociada con un aumento en uno o más GAG sulfatados en un sujeto, que comprende:

a) separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra biológica de dicho sujeto por medio de un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

b) detectar el nivel de uno o más GAG sulfatados separados en a); y

c) comparar dicho nivel con un valor de referencia para dicho uno o más GAG sulfatados obtenidos del mismo sujeto en un punto de tiempo anterior,

en el que una disminución en el nivel de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativa de que la enfermedad asociada con un aumento en uno o más GAG sulfatados tiene un buen pronóstico, o

en el que un aumento en el nivel de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativo de que la enfermedad asociada con un aumento en uno o más GAG sulfatados tiene un mal pronóstico.

11. Método *in vitro* para determinar el pronóstico o para monitorizar la progresión de una enfermedad asociada con una disminución en uno o más GAG sulfatados en un sujeto, que comprende:

a) separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra biológica de dicho sujeto por medio de un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

b) detectar el nivel de uno o más GAG sulfatados separados en a); y

c) comparar dicho nivel con un valor de referencia para dicho uno o más GAG sulfatados obtenidos del mismo sujeto en un punto de tiempo anterior,

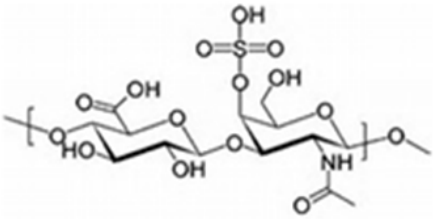
en el que una disminución en el nivel de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativa de que la enfermedad asociada con una disminución en uno o más GAG sulfatados tiene un mal pronóstico, o

en el que un aumento en el nivel de uno o más GAG sulfatados con respecto al valor de referencia es indicativo de que la enfermedad asociada con una disminución en uno o más GAG sulfatados tiene un buen pronóstico.

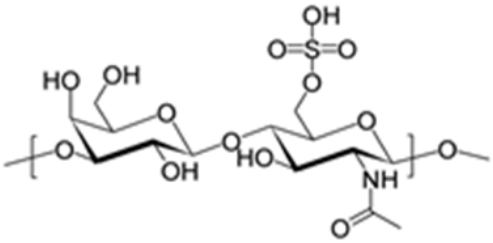
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que la enfermedad asociada con un aumento en uno o más GAG sulfatados es una enfermedad que se produce con una acumulación no deseada de uno o más GAG sulfatados seleccionados de mucopolisacaridosis, mucolipidosis, síndrome nefrótico congénito, nefropatía endémica de los Balcanes, artritis reumatoide y siringomielia; y en el que la enfermedad asociada con una disminución en uno o más GAG sulfatados se selecciona del grupo que consiste en amiloidosis renal, glomerulonefritis, síndrome nefrótico, hipotiroidismo y diabetes.

13. Uso del método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para identificar biomarcadores de proteínas o lípidos asociados con GAG sulfatados.

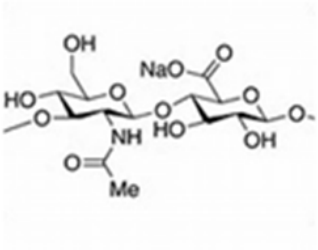
14. Uso de un kit que comprende azul de dimetilmetileno (DMB) a una concentración comprendida entre 0,01 y 100 mM a un pH comprendido entre 2 y 6,9 para separar los GAG sulfatados libres y la fracción asociada con GAG sulfatados de una muestra, siendo dicha fracción una fracción que contiene exosomas; para identificar el perfil de proteínas asociadas con GAG sulfatados de una muestra en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5; para identificar el perfil de lípidos asociados con GAG sulfatados de una muestra en un método según la reivindicación 6; para detectar una alteración en el patrón de glicosilación por GAG sulfatados en un método según la reivindicación 7; para diagnosticar una enfermedad en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9; para determinar el pronóstico de una enfermedad en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12; para monitorizar la progresión de una enfermedad en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12; o para detectar complejos formados por exosomas, GAG sulfatados y una proteína.



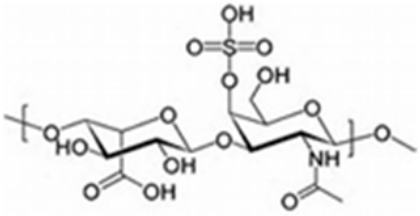
Condroitín sulfato



Queratán sulfato



Hialuronato



Dermatán sulfato

Heparán Sulfato

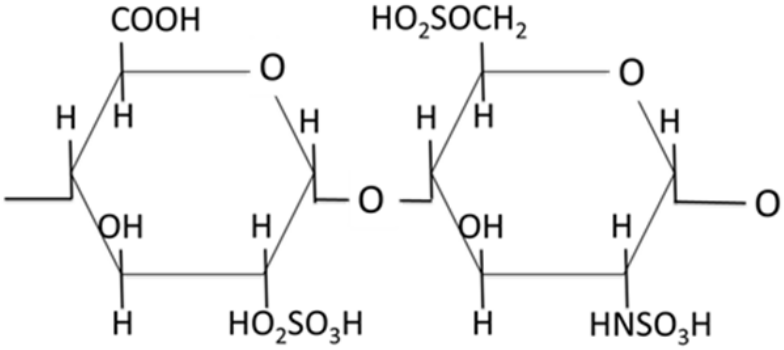
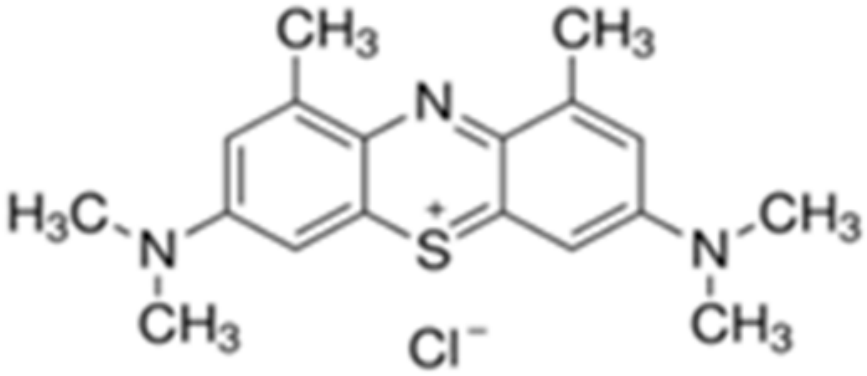
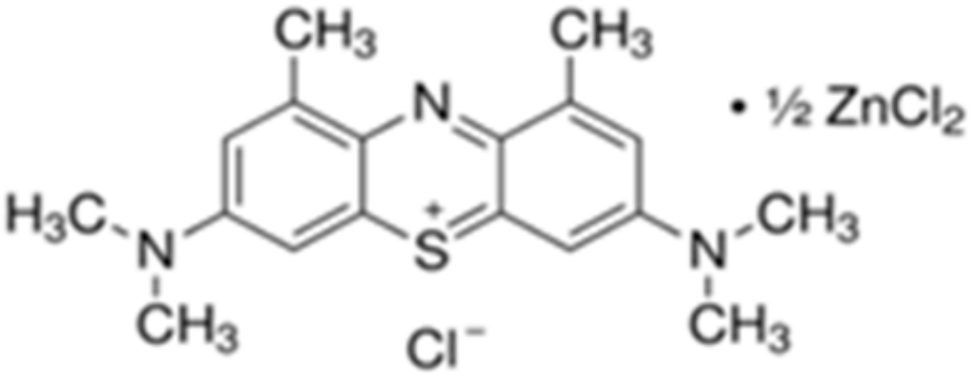


Figura 1



Azul de dimetilmetileno



Sal de cloruro de zinc de azul de dimetilmetileno doble

Figura 2

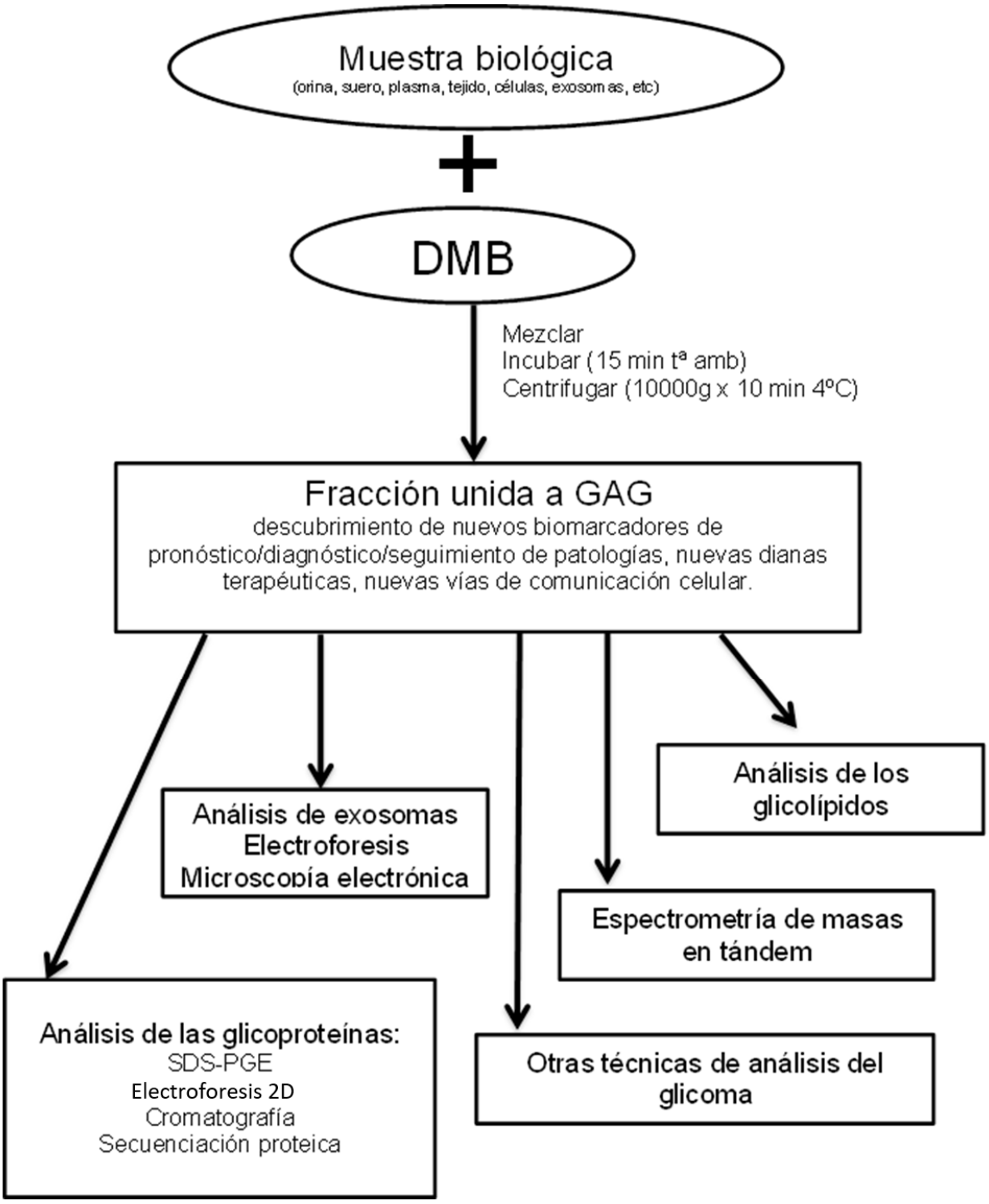

Muestra biológica
(orina, suero, plasma, tejido, células, exosomas, etc)
DMB
Mezclar
Incubar (15 min tª amb)
Centrifugar (10000g x 10 min 4ºC)
Fracción unida a GAG
descubrimiento de nuevos biomarcadores de pronóstico/diagnóstico/seguimiento de patologías, nuevas dianas terapéuticas, nuevas vías de comunicación celular.
Análisis de exosomas
Electroforesis
Microscopía electrónica
Análisis de los glicolípidos
Espectrometría de masas en tándem
Análisis de las glicoproteínas:
SDS-PGE
Electroforesis 2D
Cromatografía
Secuenciación proteica
Otras técnicas de análisis del glicoma

Figura 3

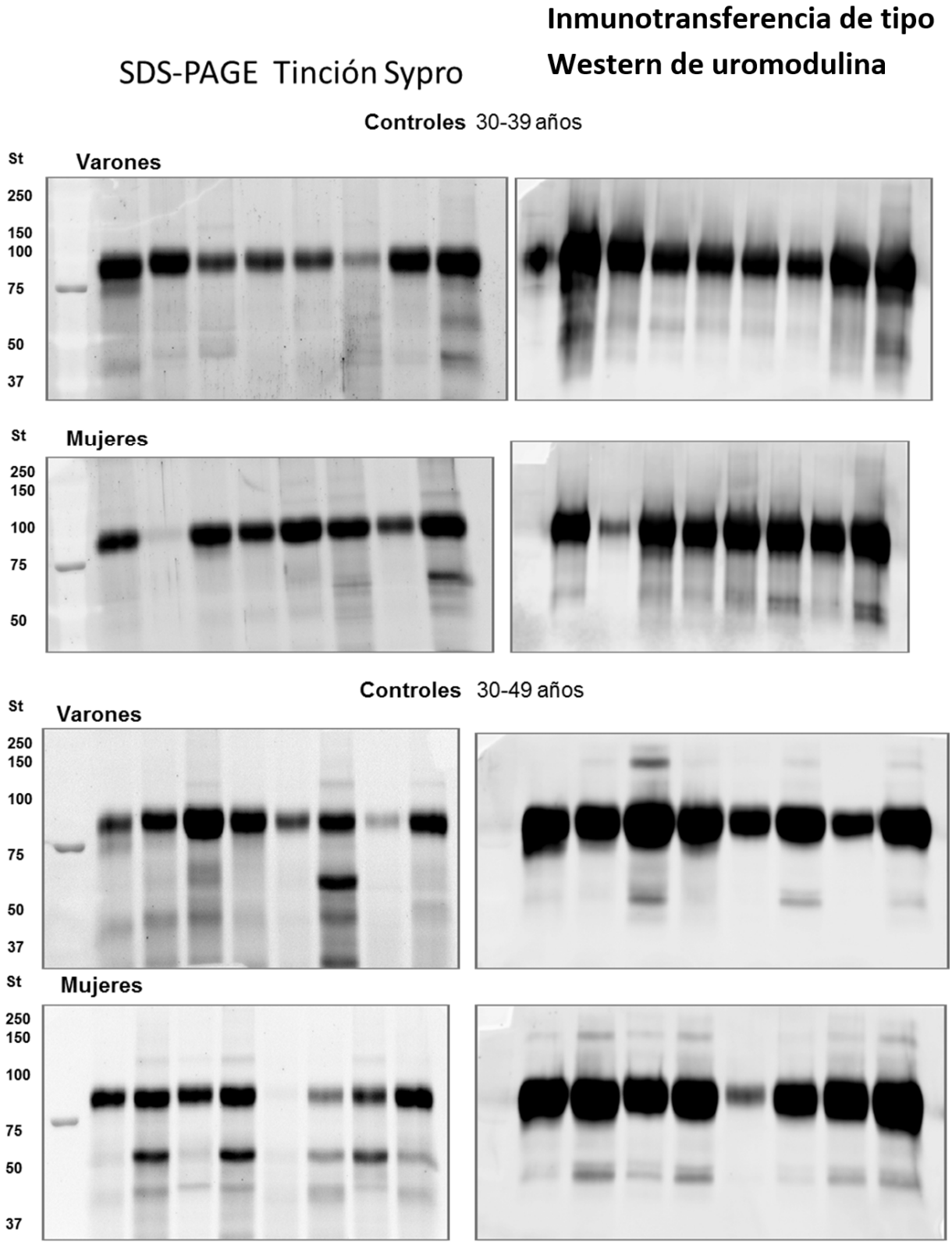

Inmunotransferencia de tipo
Western de uromodulina
SDS-PAGE Tinción Sypro
Controles 30-39 años
St
Varones
250
150
100
75
50
37
St
Mujeres
250
150
100
75
50
Controles 30-49 años
St
Varones
250
150
100
75
50
37
St
Mujeres
250
150
100
75
50
37

Figura 4

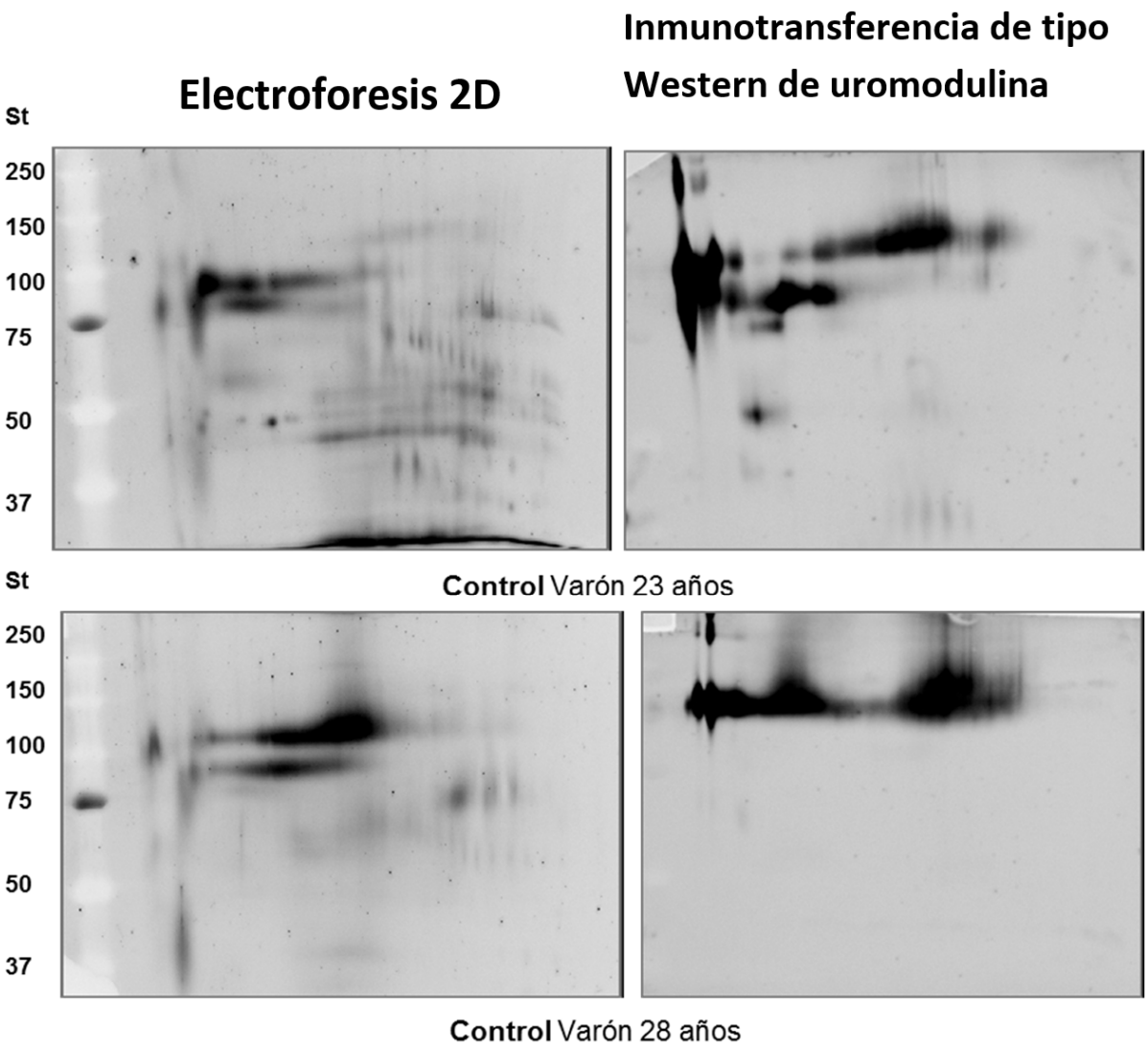

Electroforesis 2D
Inmunotransferencia de tipo Western de uromodulina
St
250
150
100
75
50
37
Control Varón 23 años
St
250
150
100
75
50
37
Control Varón 28 años

Figura 5

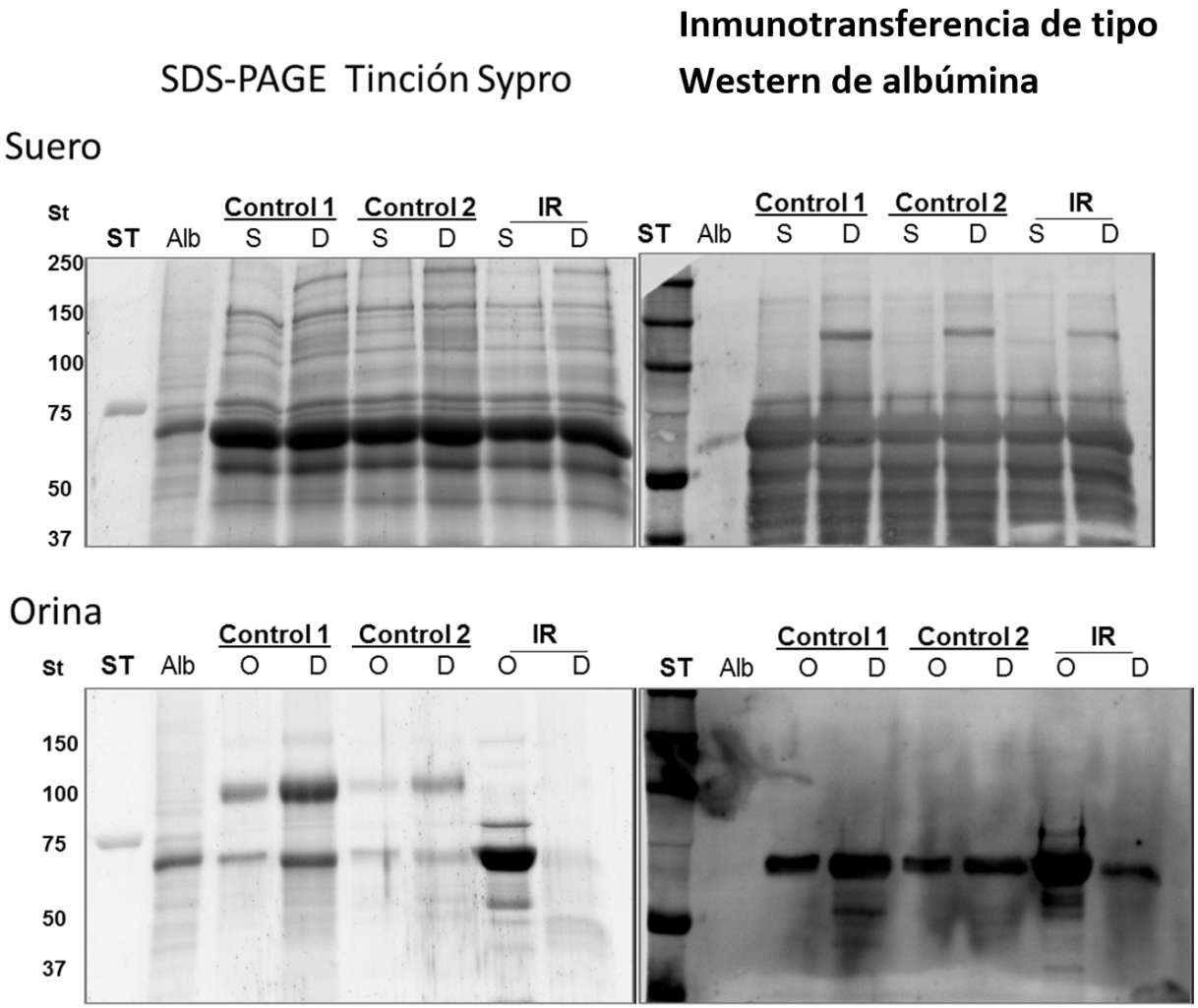

Inmunotransferencia de tipo
Western de albúmina
SDS-PAGE Tinción Sypro
Suero
St
ST
Alb
Control 1
Control 2
IR
S
D
250
150
100
75
50
37
Orina
O

Figura 6

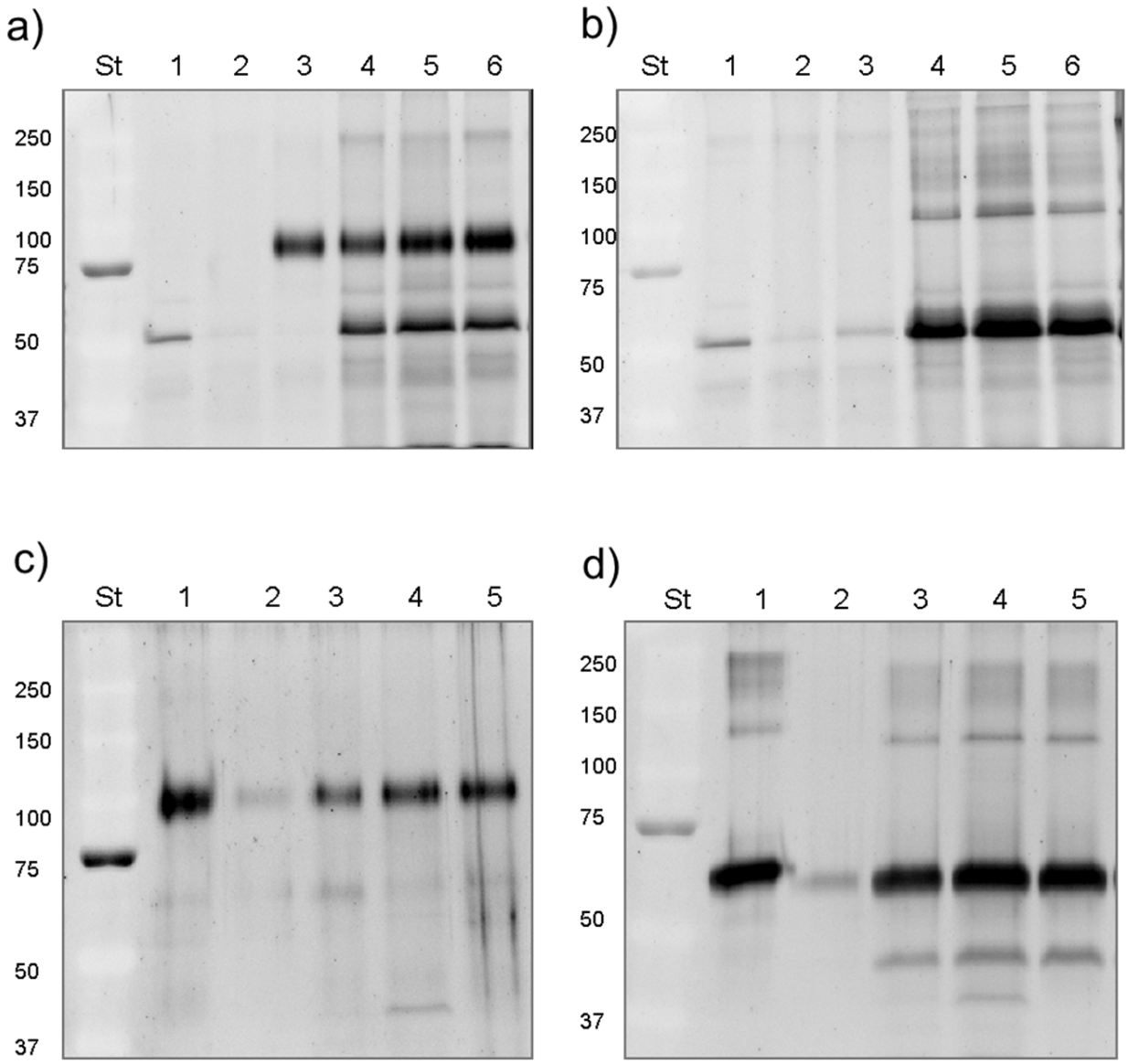
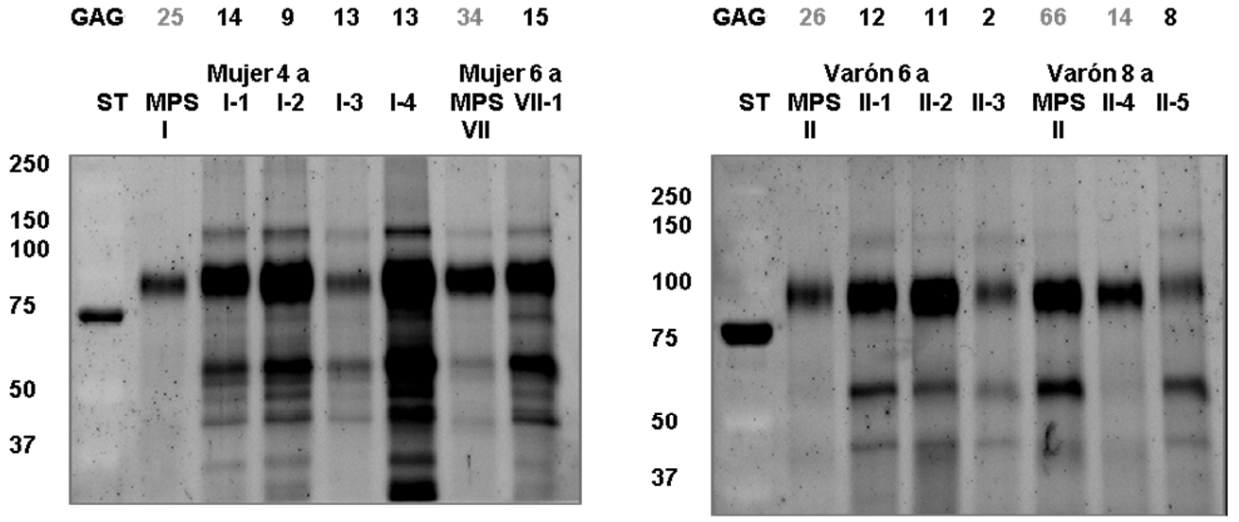

a)
St 1 2 3 4 5 6
250
150
100
75
50
37
b)
St 1 2 3 4 5 6
250
150
100
75
50
37
c)
St 1 2 3 4 5
250
150
100
75
50
37
d)
St 1 2 3 4 5
250
150
100
75
50
37

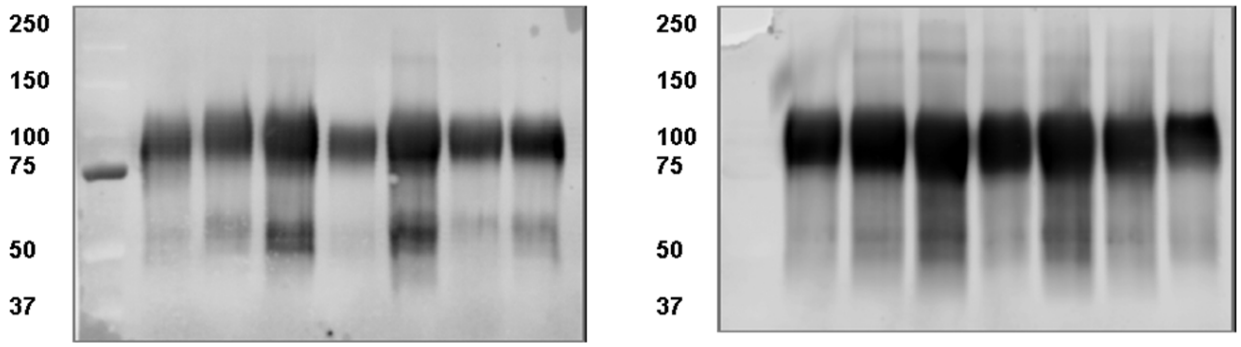
Figura 7

A)

SDS-PAGE Tinción Sypro



Inmunotransferencia de tipo Western de uromodulina



Inmunotransferencia de tipo Western de albúmina

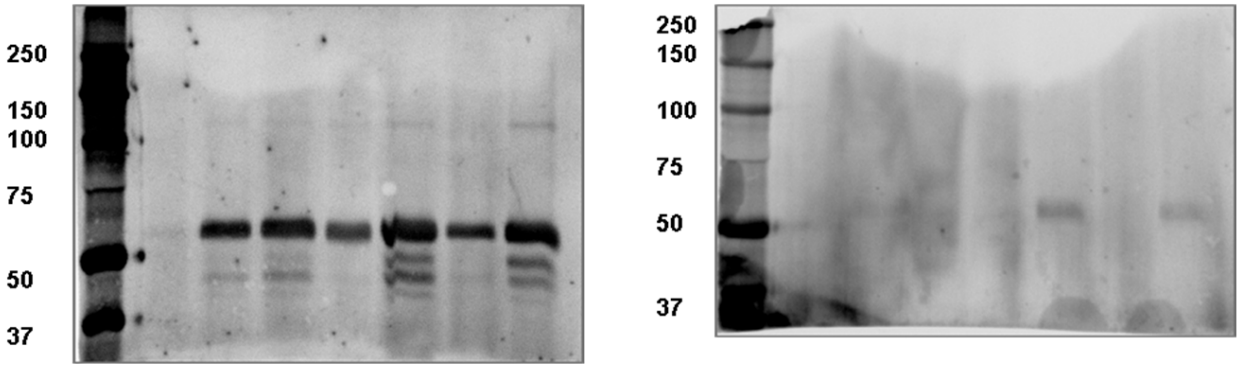


Figura 8

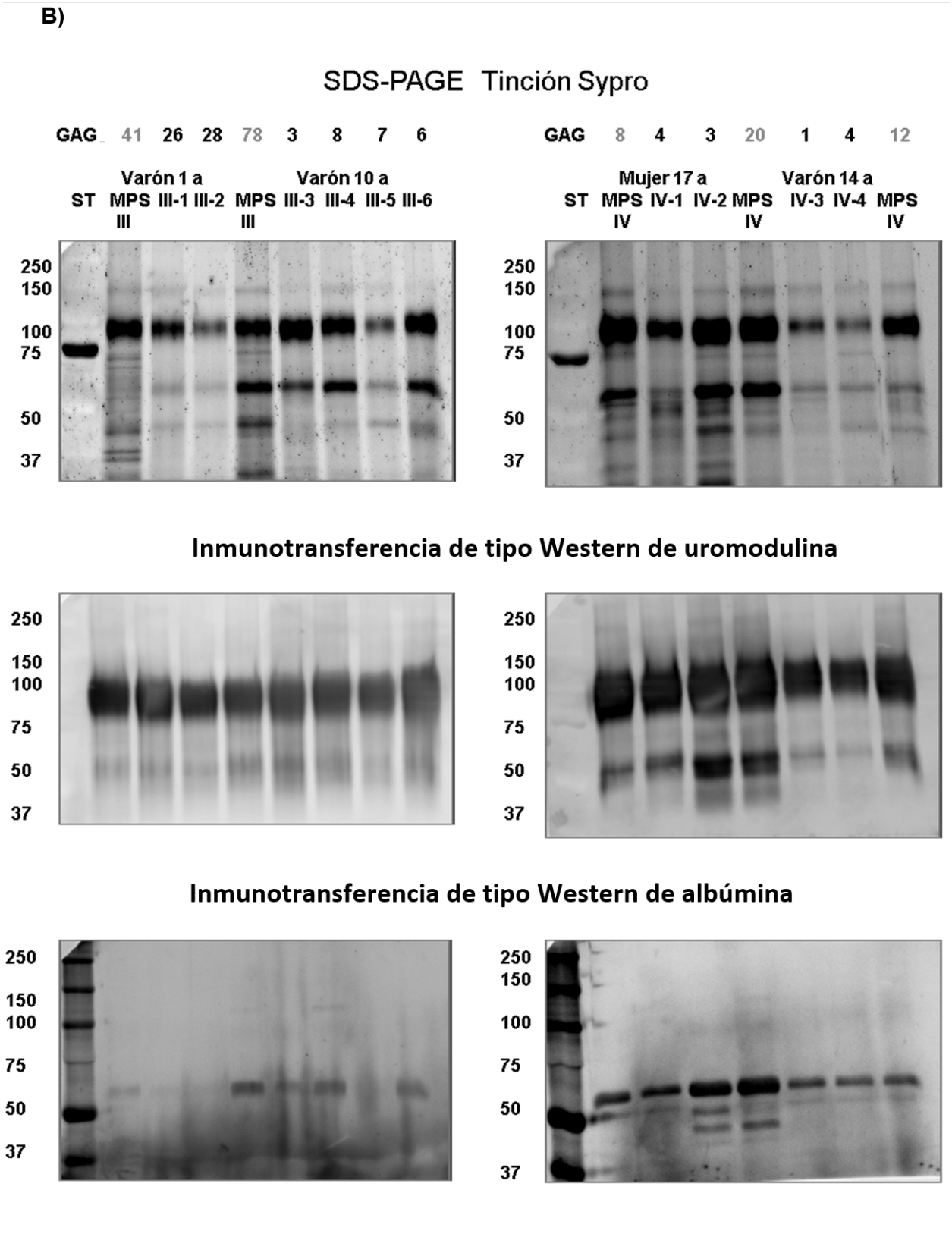

B)
SDS-PAGE Tinción Sypro
GAG 41 26 28 78 3 8 7 6
Varón 1 a
Varón 10 a
ST MPS III-1 III-2 MPS III-3 III-4 III-5 III-6
III III
250
150
100
75
50
37
GAG 8 4 3 20 1 4 12
Mujer 17 a
Varón 14 a
ST MPS IV-1 IV-2 MPS IV-3 IV-4 MPS
IV IV IV
250
150
100
75
50
37
Inmunotransferencia de tipo Western de uromodulina
250
150
100
75
50
37
250
150
100
75
50
37
Inmunotransferencia de tipo Western de albúmina
250
150
100
75
50
37
250
150
100
75
50
37

Figura 8

Electroforesis 2D

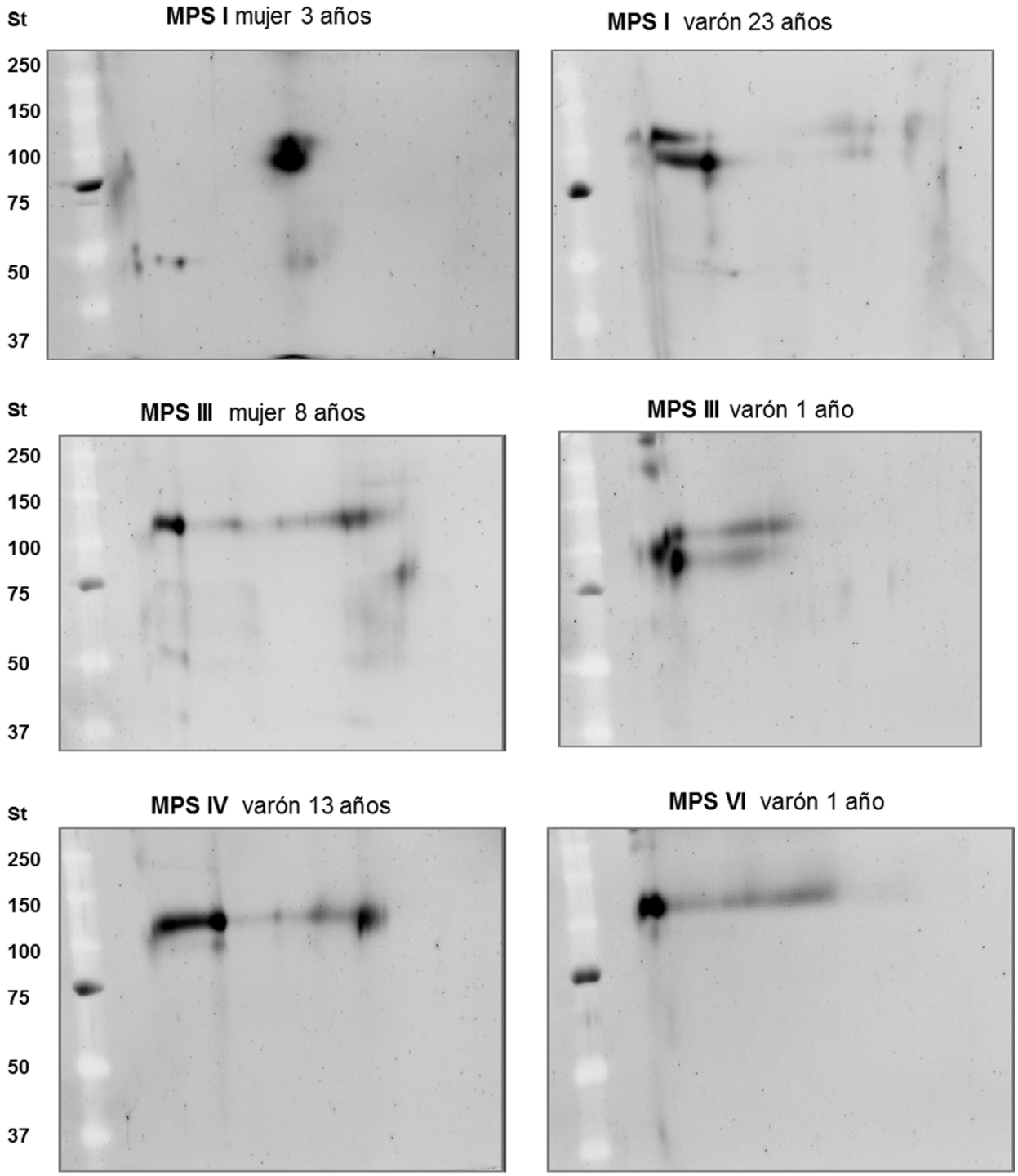


Figura 9

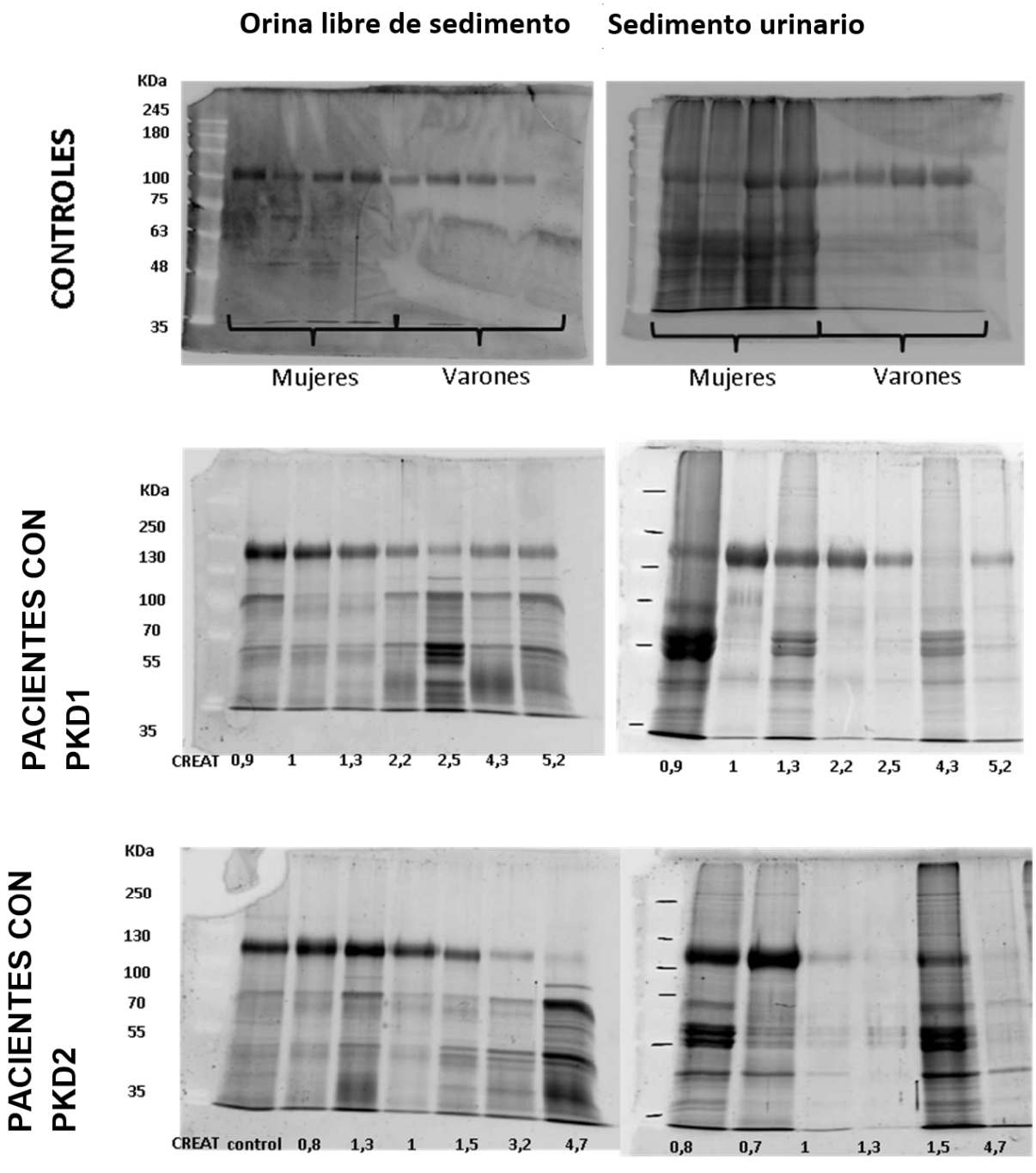
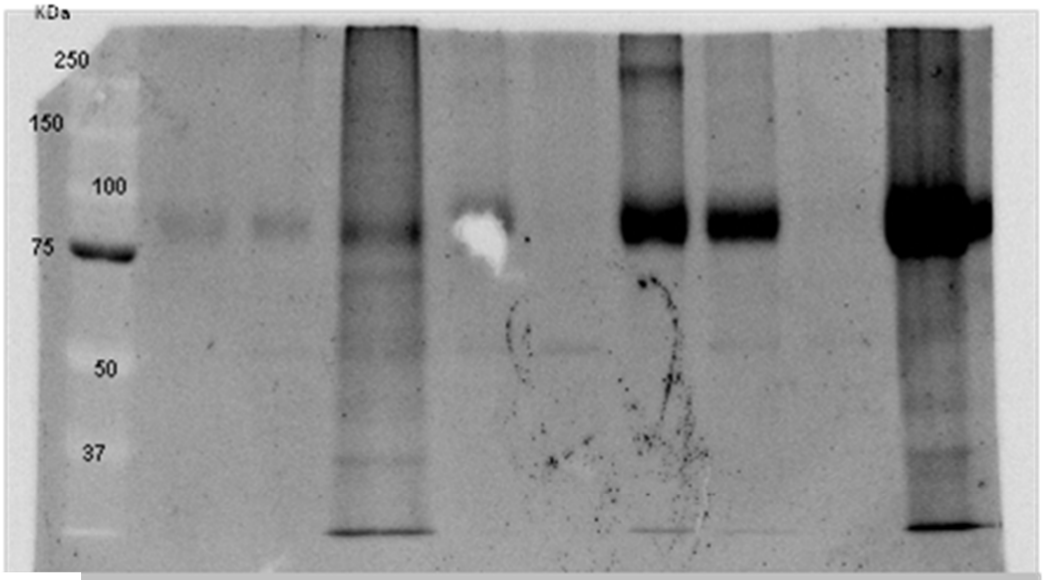

Orina libre de sedimento
Sedimento urinario
CONTROLES
KDa
245
180
100
75
63
48
35
Mujeres
Varones
Mujeres
Varones
PACIENTES CON PKD1
KDa
250
130
100
70
55
35
CREAT 0,9 1 1,3 2,2 2,5 4,3 5,2
0,9 1 1,3 2,2 2,5 4,3 5,2
PACIENTES CON PKD2
KDa
250
130
100
70
55
35
CREAT control 0,8 1,3 1 1,5 3,2 4,7
0,8 0,7 1 1,3 1,5 4,7

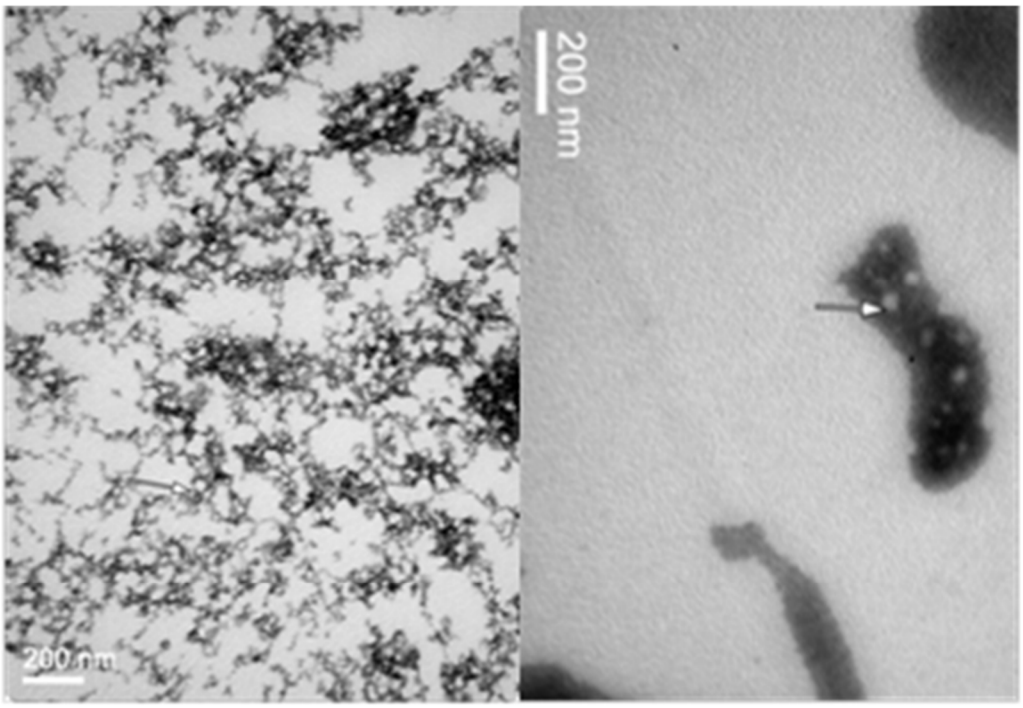
Figura 10



Sedimento urinario	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Sobrenadante urinario	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Orina completa	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Creatinina	1,5	1,5	1,5	0,9	0,9	0,9	0,6	0,6	0,6

Figura 11

a)

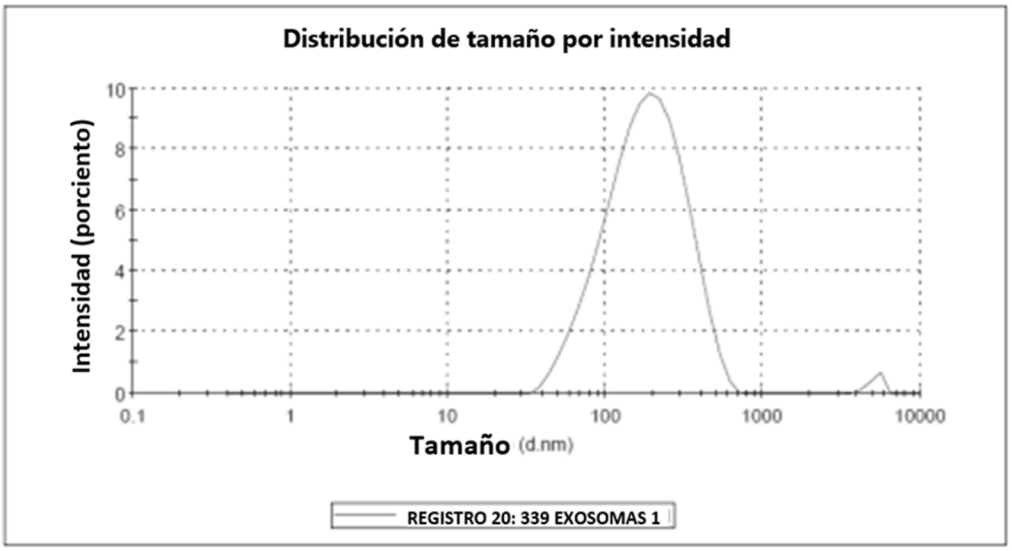


b)

Resultados

			Tamaño (d.n...	% de intensidad:	Dev. Est. (d.n...
Promedio Z (d.nm):	157,3	Pico 1:	202,8	98,7	109,7
PdI:	0,269	Pico 2:	5131	1,3	522,6
Ordenada en el origen:	0,898	Pico 3:	0,000	0,0	0,000

Calidad del resultado: Bueno



Tamaño medio complejos UGE: 199,5 ± 69,31 nm

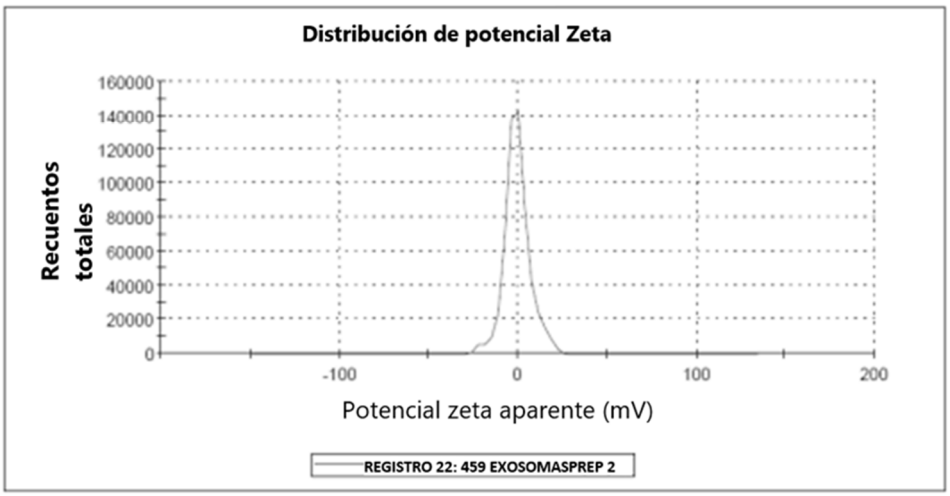
Figura 12

c)

Resultados

			Media (mV)	Área (%)	Dev. Est. (mV)
Potencial Zeta (mV):	-0,349	**Pico 1:**	-0,0858	97,9	6,97
Desviación Zeta (mV):	7,34	**Pico 2:**	-20,8	2,1	2,37
Conductividad (mS/cm):	0,155	**Pico 3:**	0,00	0,0	0,00

Calidad de los resultados: Véase el informe de calidad de los resultados



Carga media de complejos UGE: neutra

d)

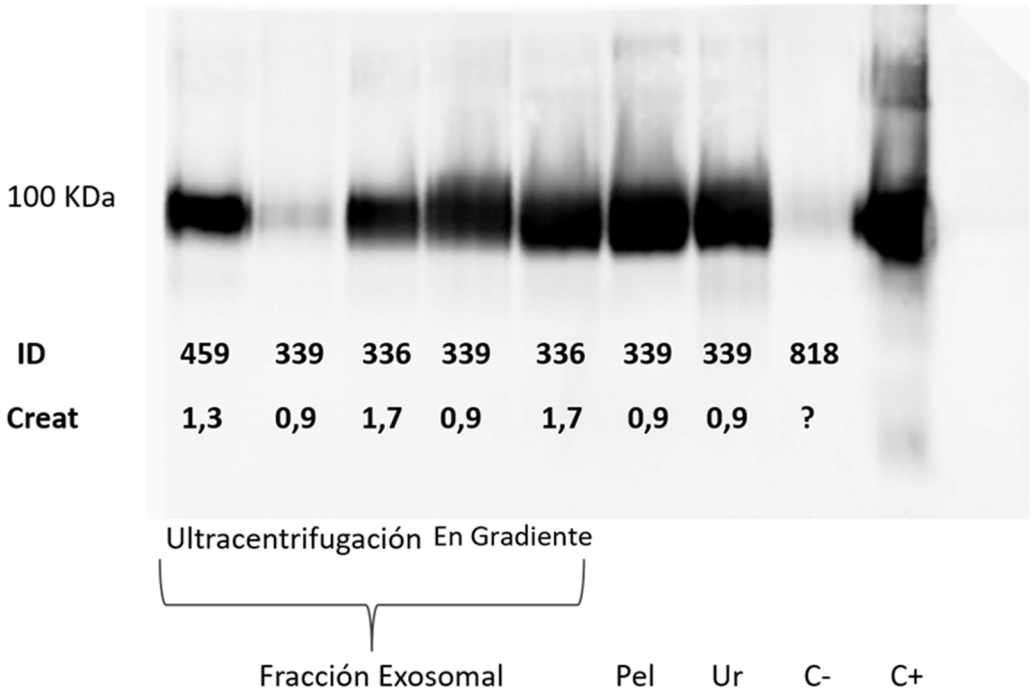
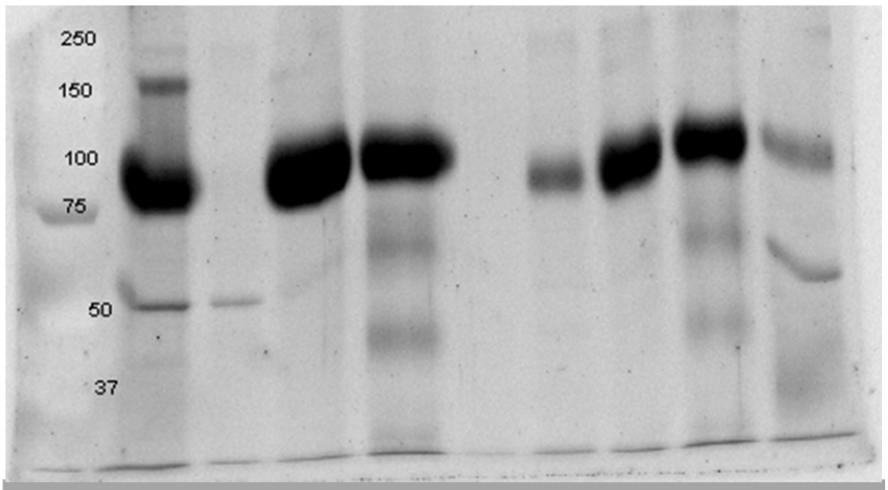


Figura 12

a)

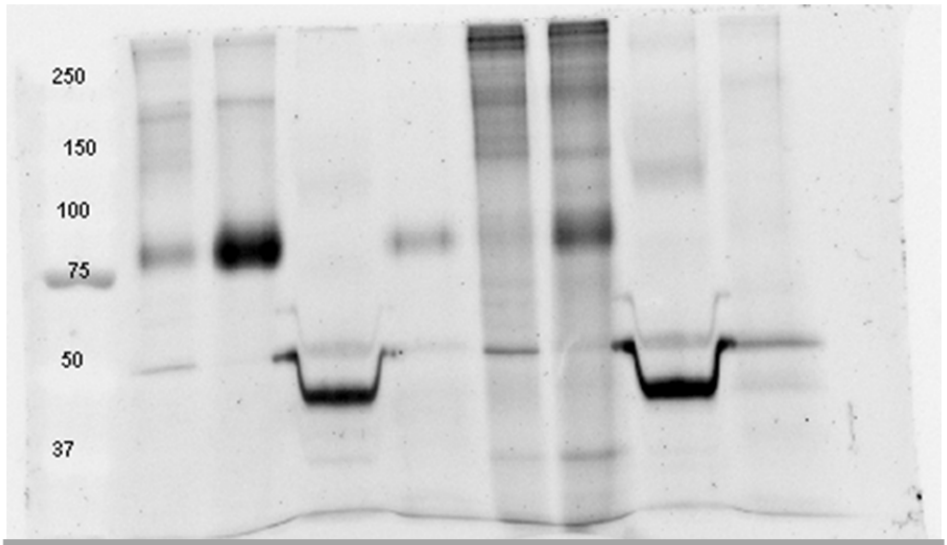


Sedimento de orina	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Sobrenadante urinario	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Orina completa	+	-	-	-	-	-	-	-	+
DMB	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Desnaturalización	-	-	-	+	-	-	-	+	-

Precipitación por centrifugación

Precipitación por gravedad

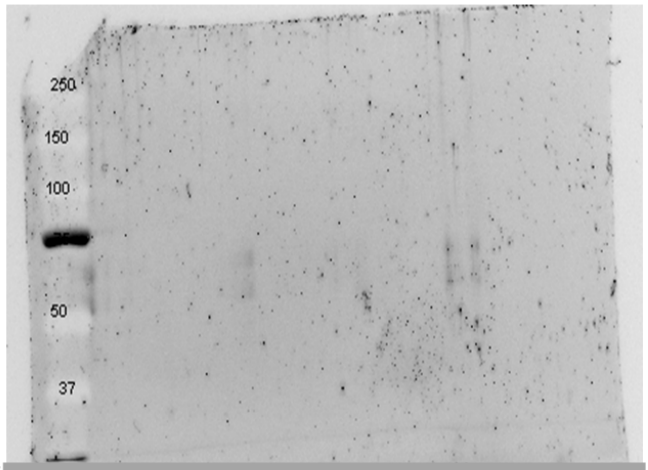
b)



Fracción de UGE	+	+	-	-	+	+	-	-
Sobrenadante de UGE	-	-	+	+	-	-	+	+
DMB	-	+	-	+	-	+	-	+
Creatinina	1,5	1,5	1,5	1,5	0,9	0,9	0,9	0,9

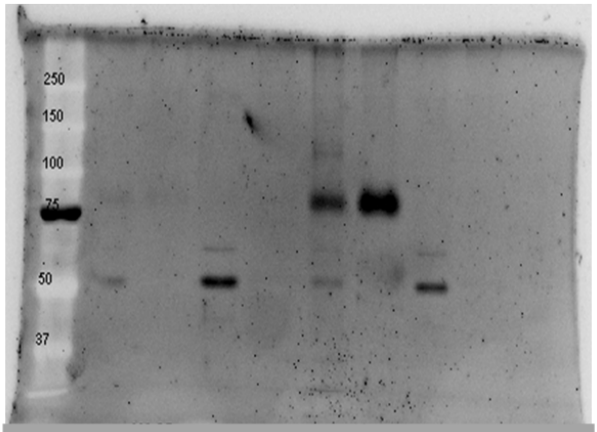
Figura 13

a)



	1	2	3	4	5	6	7	8
Fracción de UGE	+	+	-	-	+	+	-	-
Sobrenadante de UGE	-	-	+	+	-	-	+	+
DTT	+	+	+	+	+	+	+	+
DMB	-	+	-	+	-	+	-	+
Creatinina	1,5	1,5	1,5	1,5	0,9	0,9	0,9	0,9

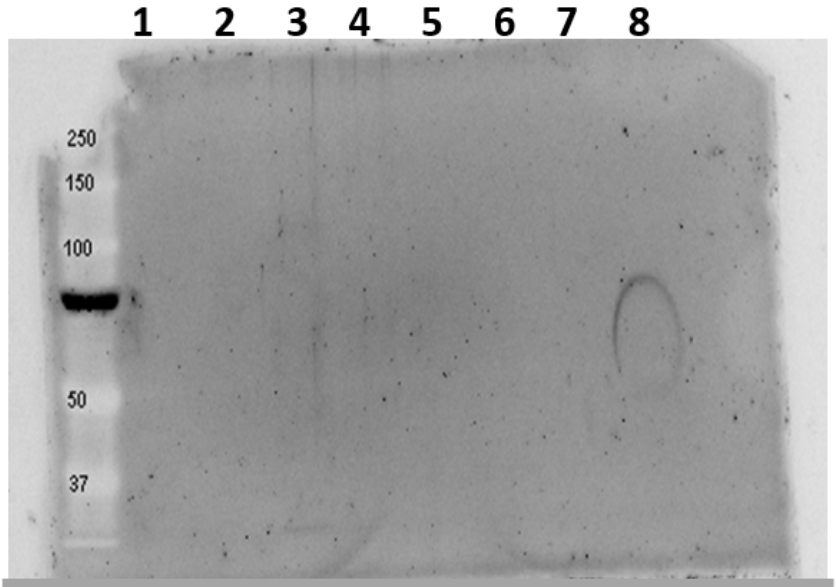
b)



	1	2	3	4	5	6	7	8
Fracción de UGE	+	+	-	-	+	+	-	-
Sobrenadante de UGE	-	-	+	+	-	-	+	+
Filtración	+	+	+	+	-	-	-	-
DMB	-	+	-	+	-	+	-	+
Creatinina	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Figura 14

c)



	1	2	3	4	5	6	7	8
Fracción celular	+	+	+	+	-	-	-	-
Fracción de UGE	-	-	-	-	+	+	-	-
Sobrenadante de UGE	-	-	-	-	-	-	+	+
Filtración	-	-	-	-	+	+	+	+
DTT	-	-	+	+	+	+	+	+
DMB	-	+	-	+	-	+	-	+
Creatinina	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Figura 14

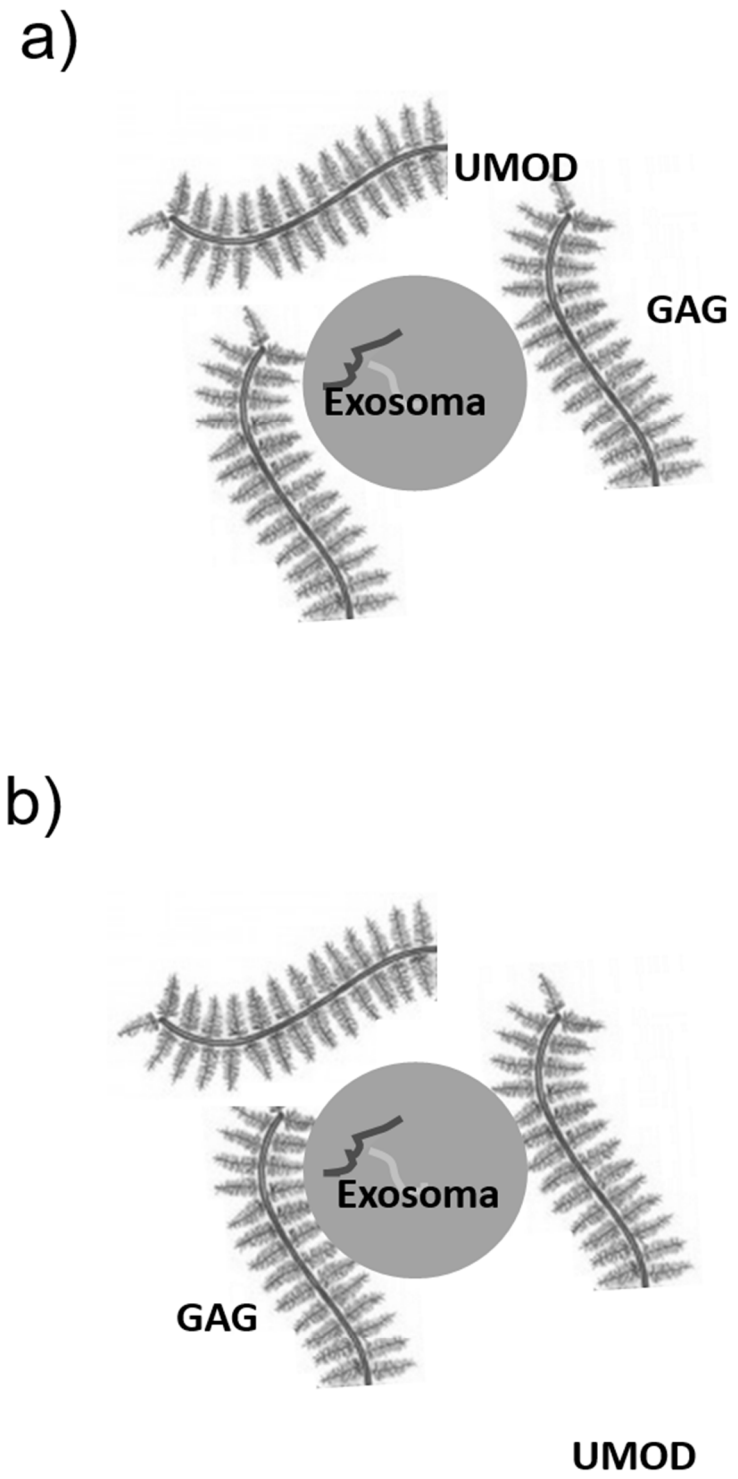
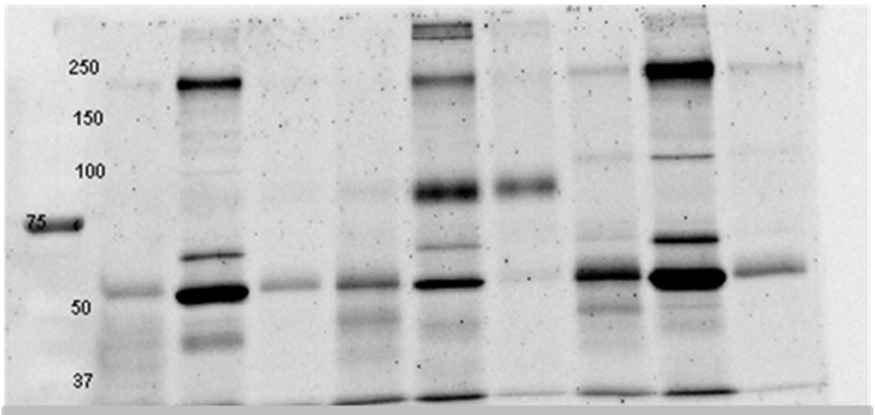


Figura 15

a)



	St	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fracción de UGE		-	+	+	-	+	+	-	+	+
Sobrenadante de UGE		+	-	-	+	-	-	+	-	-
DMB		-	-	+	-	-	+	-	-	+
Creatinina		3,2	3,2	3,2	1,3	1,3	1,3	4,70	4,7	4,7

b)

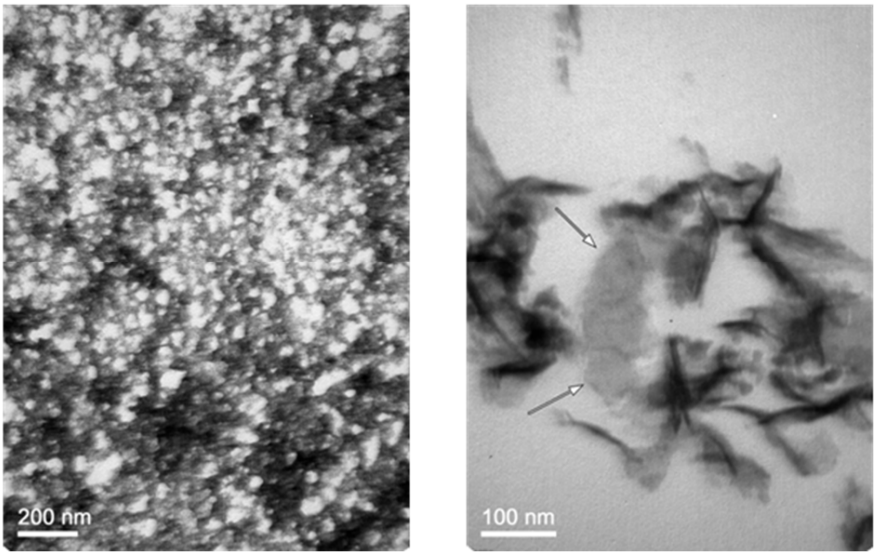


Figura 16

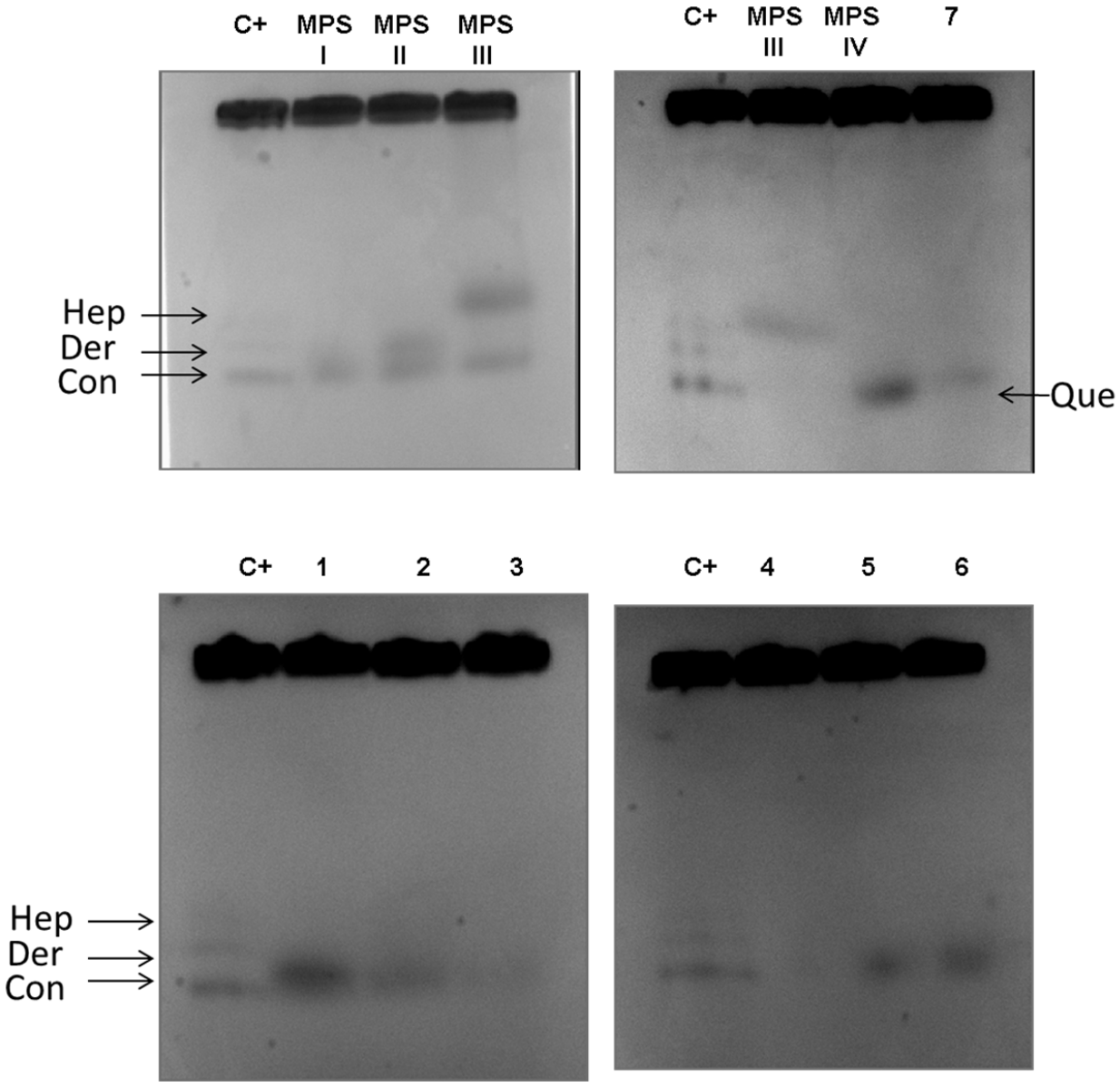

C+
MPS I
MPS II
MPS III
Hep
Der
Con
C+
MPS III
MPS IV
7
Que
C+
1
2
3
Hep
Der
Con
C+
4
5
6

Figura 17