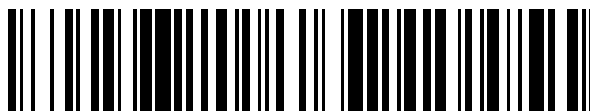


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 763**

51 Int. Cl.:

B01D 15/30 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2012 E 12704758 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2673065**

54 Título: **Método para la purificación de un glicano y/o un glicoconjugado mediante cromatografía usando un algodón que comprende la fase estacionaria**

30 Prioridad:

10.02.2011 EP 11250152

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

16.03.2016

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

WUHRER, MANFRED;
HEMAYATKAR, MAHDI y
SELMAN, MAURICE HENRICUS JOHANNES

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 563 763 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 la purificación de un glicano y/o un glicoconjugado mediante cromatografía usando un algodón que comprende la fase estacionaria

5 La presente invención se refiere a un método de purificación. En particular, la presente invención se refiere a un método para purificar un glicano o un glicoconjugado.

10 Debido a su velocidad, resolución y sensibilidad, la espectrometría de masas moderna ofrece grandes oportunidades para la caracterización estructural detallada de la glicosilación de proteínas que incluye la identificación de proteínas, determinación de perfiles de glicosilación específicos de sitio, y la caracterización estructural de glicanos en el nivel de glicopéptidos o glicanos liberados.

15 Para la ionización eficiente y detección de glicopéptidos y glicanos, se requieren a menudo pasos de purificación o enriquecimiento. La cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC) se ha encontrado que es particularmente adecuada para este propósito, después de la extracción de carbón grafitado en fase sólida (SPE), el acoplamiento de hidrazina, y la cromatografía de afinidad de lectina o de anticuerpo (como se describe en Mechref et al., Chem. Rev. 2002, 102, 321-369).

20 Si bien la especificidad de lectinas y anticuerpos a menudo sólo permite el aislamiento de un subconjunto de glicanos o glicopéptidos de un conjunto, se puede emplear HILIC y SPE de carbón grafitado para el aislamiento de una amplia gama de glicoconjugados, haciendo que estos métodos de cromatografía de adsorción se puedan aplicar en una amplia gama de estudios glicómicos y glicoproteómicos.

25 Se ha encontrado el HILIC SPE particularmente útil para el enriquecimiento de N-glicopéptidos tripticos. Para este propósito, se han aplicado fases estacionarias de ZIC-HILIC en el modo de emparejamiento iónico utilizando ácido trifluoroacético como un aditivo de fase móvil (como se describe en Mysling et al., Anal. Chem. 2010, 82, 5598-5609).

30 Alternativamente, las fases estacionarias basadas en carbohidratos, tales como Sepharose y la celulosa microcristalina se han aplicado para el aislamiento de N-glicopéptidos (como se describe en Wada, Y et al.; Anal. Chem. 2004, 76, 6560-6565).

35 Una característica importante de estas fases estacionarias basadas en carbohidratos es que no son iónicas. La adsorción HILIC está, por lo tanto, dominada por los enlaces de hidrógeno de las porciones de glicanos con la fase estacionaria, mientras que los péptidos no glicosilados, lípidos, sales y detergentes tienden a mostrar ninguna o baja retención (como se describe en Wührer et al., Mass Spectrom. Rev. 2009, 28, 192-206).

40 La retención de glicoconjugados se consigue normalmente con concentraciones de acetonitrilo en el rango de 80%, mientras que la elución se realiza con alto contenido de agua. Las condiciones de elución requeridas hacen de HILIC muy compatible con la espectrometría de masas, tanto en el modo en línea como fuera de línea.

45 Se sabe que los perfiles de N-glicosilación de Fc de IgG pueden ser analizados de una manera reproducible y robusta mediante MALDI-MS después de HILIC SPE con Sepharose, así como con celulosa microcristalina realizado en modo por lotes o en formato de alto rendimiento en placa de 96 pocillos (Selman et al.; Anal. Chem. 2010, 82, 1073-1081).

50 Sigue existiendo la necesidad de métodos eficientes y eficaces para la purificación de moléculas tales como glicanos y glicoconjugados.

55 Se ha encontrado por el presente solicitante que puede utilizarse el algodón para preparar dispositivos que permiten la purificación sencilla y rápida de moléculas tales como glicoconjugados y glicanos. La presente invención permite el uso de micropuntas de algodón como una parte clave de procedimientos de purificación simples, rápidos y robustos, como para realizar perfiles de N-glicosilación de Fc de IgG y para la eliminación exitosa de detergentes y sales en la extracción de N-glicanos después del tratamiento de glicoproteínas con N-glicosidasa F (PNGasa F).

De acuerdo con la invención, se proporciona un método de purificación de un glicano y/o un glicoconjugado que comprende los pasos de:

- 60 (a) proporcionar una fase estacionaria que comprende algodón;
 (b) aplicar una muestra de que contiene glicano y/o glicoconjugado a la fase estacionaria;
 (c) lavar la fase estacionaria con un primer disolvente; y
 (d) eluir los glicanos y/o glicoconjugado de la fase estacionaria con un segundo disolvente.

Preferiblemente, en el paso (b) la muestra que contiene glicano y/o glicoconjugado comprende un disolvente orgánico; en el que el disolvente orgánico comprende acetonitrilo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, o tetrahidrofurano.

- 5 Preferiblemente, el disolvente orgánico está entre 70% y 88% v/v de acetonitrilo en agua; más preferiblemente en el que el disolvente orgánico está entre 75% y 85% v/v de acetonitrilo en agua; más preferiblemente en el que el disolvente orgánico está en un 83% v/v de acetonitrilo en agua.

- 10 Preferiblemente, en el paso (c) el primer disolvente es una mezcla de disolventes que comprende agua, un disolvente orgánico y un ácido. Más preferiblemente, el disolvente orgánico es acetonitrilo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol o tetrahidrofurano y el ácido es ácido trifluoroacético, ácido fórmico, ácido acético, ácido pentafluoropropiónico, o ácido heptafluorobutírico.

- 15 Preferiblemente, la mezcla de disolventes anterior comprende entre un 75% y 90% v/v de disolvente orgánico, y entre un 0,1% y 1% v/v de ácido en agua. Alternativamente, la mezcla de disolvente comprende entre un 70% y 95% v/v de disolvente orgánico y entre un 0,1% y 3% v/v de ácido en agua. Preferiblemente, la mezcla de disolvente comprende un 83% v/v de acetonitrilo y 0,1% de ácido trifluoroacético en agua.

- 20 Preferiblemente, en el paso (d) el segundo disolvente comprende un disolvente polar. Más preferiblemente, el disolvente polar es agua, dimetilsulfóxido o dimetilformamida.

Opcionalmente, el segundo disolvente comprende más disolvente polar que el primer disolvente.

- 25 Preferiblemente, en el paso (c) el lavado elimina las sales, péptidos no glicosilados, lípidos, detergentes, exceso de marcador final reductor, agentes reductores, desnaturalizantes, y proteínas desnaturalizadas de la fase estacionaria.

Opcionalmente, el glicoconjugado es una glicoproteína, glicolípido o glicopéptido. Preferiblemente, el método es para la purificación de un glicano o un glicopéptido.

- 30 Convenientemente, el glicopéptido es un glicopéptido IgG.

Preferiblemente, el glicopéptido IgG es un tríptico N-glicopéptido IgG Fc.

Opcionalmente, el glicano es un N-glicano.

- 35 Convenientemente, la fase estacionaria es reutilizable.

Preferiblemente, la fase estacionaria comprende algodón.

- 40 Opcionalmente, la fase estacionaria consiste de algodón.

Convenientemente, la fase estacionaria contiene aproximadamente 500 µg de algodón. La fase estacionaria puede contener aproximadamente 250 a 750 µg de algodón.

- 45 Preferiblemente, el método comprende además el paso de realizar el análisis de espectrometría de masas o detección de la fluorescencia en el glicano y / o glicoconjugado eluido.

Opcionalmente, el análisis de espectrometría de masas es la detección MALDI-TOF MS.

- 50 Preferiblemente, los glicanos marcados mediante aminación reductiva con un colorante fluorescente se analizan mediante HPLC con detección de fluorescencia, o electroforesis en gel capilar con detección de fluorescencia inducida por láser (CGE-LIF).

- 55 Convenientemente, el método comprende además el paso de realizar perfiles de glicosilación a nivel de glicopéptido de los glicopéptidos eluidos.

Preferiblemente, la fase estacionaria se lleva a cabo en un recipiente abierto. El recipiente puede estar abierto en un extremo, o en ambos extremos. Preferiblemente, el recipiente está abierto en ambos extremos.

- 60 Opcionalmente, el recipiente abierto es una pipeta, una pipeta multicanal o una punta de pipeta.

Convenientemente, el método de purificación puede ser utilizado para extraer glicanos después del tratamiento de glicoproteínas con PNGasa F, extraer los glicanos después del marcaje fluorescente por aminación reductiva, o enriquecer los N-glicopéptidos de las digestiones proteolíticas.

65

También se describe aquí un equipo para la purificación de un glicano y/o glicoconjugado, el equipo comprende una fase estacionaria que comprende algodón y las instrucciones para la purificación de un glicano y/o glicoconjugado de acuerdo con el método de la invención. El equipo puede comprender además un recipiente para la albergar la fase estacionaria. Preferiblemente, el equipo comprende una fase estacionaria situada en un recipiente abierto.

Opcionalmente, el equipo comprende una punta de pipeta que sostiene una fase estacionaria de algodón.

A continuación se describirá la presente invención, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras que se acompañan, en los que:

La Figura 1 comprende cuatro fotografías que muestran la preparación de una micropunta con algodón para HILIC SPE. De un disco de algodón (A), se toma aproximadamente 500 μ g (B) y se empuja en una punta de pipeta de 10 μ l utilizando una aguja metálica roma (C). El algodón se empuja hacia abajo hasta la parte final de la punta (D);

La figura 2 muestra dos perfiles de espectrometría de masas MALDI-TOF de glicopéptidos de IgG preparados usando micropuntas con algodón para HILIC SPE. Los espectros de masas se registraron modo positivo de reflectrón utilizando la matriz CHCA (A) y en el modo positivo lineal utilizando la matriz DHB (B). Los glicopéptidos IgG1 e IgG2 están representados por flechas continuas y discontinuas, respectivamente: cuadrado, N-acetilglucosamina; triángulo, fucosa; círculo oscuro, manosa; círculo claro, galactosa; rombo, ácido N-acetilneuramínico; pep, porción peptídica;

La Figura 3 muestra los perfiles de N-glicosilación de Fc de IgG1 registrados por MALDI-TOF-MS de repetición de los perfiles de glicopéptido IgG1 aplicados a micropuntas con algodón para HILIC SPE. Los glicopéptidos IgG1 fueron detectados por MALDI-TOF-MS en el modo reflectrón utilizando la matriz CHCA (A, C) y en el modo lineal utilizando la matriz DHB (B, D). Las muestras fueron preparadas después de la digestión usando el método de neutralización seguido de desalación con micropuntas con algodón para HILIC SPE preparados a partir de tres marcas diferentes de discos de algodón (A, B). Los perfiles resultantes se compararon con el patrón de glicoformas purificados mediante perlas de Sepharose o micropuntas con algodón para HILIC SPE después del secado por centrifugación al vacío, y la digestión con tripsina de grado de secuenciación (C, D). Para cada experimento independiente, las intensidades relativas y RSD se calcularon a partir de 8 repeticiones;

La figura 4 muestra la repetibilidad de micropuntas con algodón para HILIC SPE para la desalinización y purificación de glicopéptidos IgG. El análisis se realizó mediante MALDI-TOF-MS en modo reflectrón con matriz de CHCA. Un conjunto de digestiones con tripsina de IgG se desaló 8 veces, ya fuera con una micropunta con algodón para HILIC (A y B) o con ocho micropuntas de algodón para HILIC diferentes (C y D). El experimento se repitió en cuatro días distintos;

La figura 5 muestra la repetibilidad de perfiles de glicopéptido IgG2 aplicando micropuntas con algodón para HILIC SPE. Los glicopéptidos de IgG2 se detectaron mediante MALDI-TOF-MS en el modo reflectrón utilizando la matriz CHCA (A, C) y en el modo lineal utilizando la matriz DHB (B, D). Las muestras se prepararon después de la digestión usando el método de neutralización seguido de desalación con micropuntas con algodón para HILIC SPE preparados a partir de tres marcas diferentes de discos de algodón (A, B). Los perfiles resultantes se compararon con el patrón de glicoformas purificados mediante perlas de Sepharose o micropuntas con algodón para HILIC SPE después del secado por centrifugación al vacío, y la digestión con tripsina de grado de secuenciación (C, D). Para cada experimento independiente, las intensidades relativas y RSD se calcularon a partir de 8 repeticiones.

La Figura 6 muestra RP-MALDI-TOF-MS de N-glicanos liberados de IgG capturada por Proteína A antes de algodón para HILIC (A) y después de la purificación de algodón para HILIC (B);

La Figura 7 muestra LP-MALDI-TOF-MS de N-glicanos liberados de IgG capturada por Proteína A antes de algodón para HILIC (A) y después de la purificación de algodón para HILIC (B);

La Figura 8 muestra MALDI-TOF-MS en el modo lineal negativo de N-glicanos liberados de IgG capturada por Proteína A antes de algodón para HILIC (A) y después de la purificación de algodón para HILIC (B);

La figura 9 muestra MALDI-TOF-MS en el modo lineal negativo de N-glicanos liberados de transferrina antes de algodón para HILIC (A) y después de algodón (B);

La figura 10 muestra un espectro MALDI-TOF-MS en modo de ion lineal negativo de N-glicanos liberados mediante PNGasa F a partir de proteínas plasmáticas humanas marcadas con ácido 2-aminobenzoico (AA) mediante aminación reductiva y posteriormente se purificó usando micropuntas con algodón para HILIC SPE;

La Figura 11 muestra un espectro MALDI-TOF-MS en modo de ion lineal negativo de glicopéptidos trópticos (A) y N-glicanos liberados mediante PNGasa F (B) de fetuina bovina, después de la purificación usando micropuntas con algodón para HILIC SPE; y

La Figura 12 muestra el modo de ion lineal negativo MALDITOF- MS espectros de glicopéptidos trípticos (A) y PNGasa F libera N-glicanos (B) de glicopéptidos apotransferrina humanos, después de la purificación usando SPE micropuntas HILIC algodón.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento con micropuntas con algodón para HILIC SPE para la extracción de glicoconjugados y/o glicanos. Un glicoconjugado es una porción que comprende un carbohidrato unido covalentemente a otra porción. Los glicoconjugados incluyen glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, peptidoglicanos y lipopolisacáridos. Los glicoconjugados preferidos son glicoproteínas, glicopéptidos y peptidoglicanos. Preferiblemente, el glicoconjugado es un glicopéptido. Preferiblemente, el glicoconjugado es una glicoproteína.

Este procedimiento muestra buena capacidad de repetición y no parece depender de una marca específica o lote de discos de lana de algodón. Las micropuntas de algodón son baratas y se pueden preparar rápida y fácilmente en un laboratorio.

Las micropuntas se han introducido con varias fases estacionarias incluyendo micropuntas ZIC-HILIC. En contraste con otras micropuntas, la fase estacionaria de algodón se mantiene en su posición, tanto con la aspiración de líquido como en la dispensación. Por otra parte, la fase estacionaria parecía ser compatible con las condiciones ácidas y de acetonitrilo altas (como se describe en Craft et al., J. Proteome Res. 2002, 1, 537-547).

Próximos a establecer las micropuntas HILIC SPE, se introdujeron dos modificaciones adicionales en un protocolo de N-glicosilación de perfiles de Fc de IgG (descrito anteriormente en Craft, et al., J. Proteome Res. 2002, 1, 537-547). En primer lugar, la escisión tríptica se realizó utilizando tripsina tratada con TPCK en lugar de tripsina de grado de secuenciación más cara. En segundo lugar, el paso de centrifugación al vacío bastante laborioso, que se aplicó para eliminar el ácido fórmico a partir de las eluciones con proteína A, se ha sustituido por una simple neutralización, por lo que el protocolo es más fácil y más conveniente para la automatización.

El algodón crudo se compone principalmente de celulosa (más del 90%) (Fan Qinguo, Editor, 2005, Chemical testing of textiles, 336pp; Woodhead Publishing ISBN: 1855739178). El algodón se utiliza en una variedad de productos comerciales tales como ropa, hisopos de algodón (Q-tips) y discos de algodón. Para la fabricación de algodón para los discos y los bastoncillos de algodón, el algodón en bruto se sometió a un blanqueo extenso después de lo cual las fibras se cardan, se aleatorizan y se tratan con agua a alta presión para cruzar y atar las fibras. Durante el proceso de fabricación, las trazas de cera y proteína se eliminan del algodón, y como resultado los discos de algodón se componen de celulosa prácticamente pura.

De manera similar a las fases estacionarias Poli HEA y de carbohidratos HILIC tales como Sepharose y celulosa microcristalina, el algodón es una fase estacionaria no iónico, neutral, y se espera que la retención HILIC esté causada únicamente por enlaces de hidrógeno. Por el contrario, las interacciones iónicas pueden contribuir a la retención HILIC en ZIC-HILIC, así como con las fases estacionarias basadas en amina, que pueden ser moduladas por la adición de sal y/o reactivos de emparejamiento iónico (como se describe en Wuhrer et al., Mass Spectrom. Rev. 2009, 28, 192-206).

La Sepharose y la celulosa microcristalina se han aplicado con éxito para realizar perfiles reproducibles de N-glicosilación de Fc de IgG, y pueden utilizarse micropuntas de algodón para HILIC para el mismo fin, con la ventaja específica de su facilidad de uso, su idoneidad para pequeñas cantidades de muestras, y la posibilidad de eluir directamente las muestras sobre la placa de MALDI.

En particular, los presentes inventores han encontrado que las micropuntas de algodón para HILIC no sólo son adecuadas para la eliminación de sales y la mayoría de los péptidos no glicosilados, sino también para la eliminación de detergentes tales como SDS de digestiones trípticas. Por lo tanto, las micropuntas de algodón pueden servir como dispositivos de limpieza de muestras en aplicaciones glicómicas y proteómicas en las que se añade desnaturizantes y agentes tensioactivos con frecuencia para mejorar la solubilidad de la proteína y la escisión proteolítica.

Las fases estacionarias de HILIC basadas en carbohidratos, se pueden utilizar además para el análisis de N-glicoma en plasma total mediante espectrometría de masas (como se describe en Ruhaak et al., Anal. Bioanal. Chem. 2010, 397, 3457-3481). Los N-glicanos marcados con AA se purifican a partir de la mezcla de marcaje que contiene exceso de marcador, agente reductor, diversas sales, lípidos del plasma, y grandes cantidades de detergentes, junto con las proteínas desnaturizadas, seguido por la detección de glicanos usando MS. Las micropuntas de algodón son igualmente adecuadas para la eliminación de sales y detergentes después de la liberación enzimática de N-glicanos que, junto con las condiciones de elución de SPE favorables, dio como resultado la detección de espectrometría de masas eficiente de los N-glicanos (figuras 6, 7 y 9).

Las micropuntas de algodón de la presente invención son dispositivos adecuados para la preparación de muestras sencilla y rápida de digestiones trípticas de IgG, y permiten la determinación de las características de N-glicosilación

de Fc de IgG tales como galactosilación, sialilación, fucosilación, y la incidencia de N-acetilglucosamina bisectada mediante análisis de MALDI-MS.

5 La actividad biológica de IgG está modulada por la N-glicosilación de Fc, lo que influye tanto en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y en citotoxicidad dependiente de complemento. Por lo tanto, la N-glicosilación de Fc de IgG producidas biotecnológicamente está siendo diseñada con el fin de maximizar la eficacia en, por ejemplo la terapia contra el cáncer (próxima generación de anticuerpos terapéuticos).

10 Las micropuntas de algodón para HILIC son herramientas particularmente convenientes para la preparación de pequeñas cantidades de muestras para el análisis de espectrometría de masas y se pueden aplicar en (1) perfiles de N-glicosilación de Fc de IgG de muestras clínicas que a menudo muestran cambios de glicosilación en IgG asociados a la enfermedad, y (2) el análisis de IgG expresada de forma recombinante.

15 De manera similar a otras fases estacionarias HILIC, las micropuntas de algodón también son útiles en otras aplicaciones típicas de HILIC SPE tales como el enriquecimiento de N-glicopéptidos de digestiones proteolíticas complejas, la extracción de N-glicanos después del tratamiento de glicoproteínas o glicopéptidos con PNGasa F, o la limpieza de los glicanos después del marcaje fluorescente mediante aminación reductiva. Las puntas de algodón se preparan a mano. Por consiguiente la variación de la capacidad de cada punta tiene que ser tomado en cuenta. El requisito de capacidad varía con la muestra y puede establecer fácilmente una aplicación propia del usuario.

20 Mientras que las micropuntas de algodón para HILIC son una buena opción para el tratamiento de un número reducido de muestras, también son aplicables a un número mayor de muestras mediante el uso de pipetas multicanal o transfiriendo el método SPE a una plataforma robótica.

25 Fase experimental

Purificación de IgG

30 Las IgG policlonales humanas se purificaron a partir de plasma mediante cromatografía de afinidad con proteína A inmovilizada (de acuerdo con la técnica descrita en Wuhrer et al., Proteomics 2007, 7, 4070-4081, con modificaciones menores).

35 Se lavaron tres veces las cuentas de rProteína A-Sepharose™ (GE Healthcare, Eindhoven, Países Bajos) con solución salina de tampón fosfato (PBS). Para cada pocillo de una placa de filtro de 96 pocillos OF1100 (Orochem Technologies Inc., Lombard, IL) se aplicaron 50 µl de PBS, 50 µl de suspensión que contiene aproximadamente 5 µl de cuentas y 2 µl de plasma humano. La placa se cubrió con una tapa y se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 hora.

40 Después de la incubación, las cuentas se lavaron con 3 x 200 µl de PBS y 3 x 200 µl de agua en un colector de vacío. Las IgG policlonales humanas capturadas se liberaron de la proteína A y se eluyeron en una placa con fondo en V de polipropileno de 96 pocillos de (micropocillo V96; NUNC, Roskilde, Dinamarca) durante 5 minutos de incubación con 40 µl de ácido fórmico 100 mM (Fluka, Steinheim, Alemania) y centrifugación (1 min a 18 g), respectivamente. Después de la centrifugación, se neutralizaron los eluidos (pH final > 7) con 20 µl de bicarbonato de amonio 300 mM. Alternativamente, los eluidos se secaron por centrifugación al vacío durante 2 horas.

45 Digestión con tripsina

50 La tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) tratada con tripsina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) se disolvió en ácido acético 20 mM enfriado con hielo (Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de 0,05 µg de tripsina por µl y se almacenó en alícuotas a -80 °C hasta su uso. Para cada una de las muestras de IgG neutralizadas se añadieron 8 µl de tripsina (400 µg en total) y 12 µl de agua. Las muestras se agitaron durante 3 min y se incubaron durante la noche a 37 °C. Las digestiones de IgG con tripsina se almacenaron a -20 °C hasta su desalación y purificación con micropuntas para HILIC SPE.

55 Se disolvió 1 mg de fetuina (Sigma-Aldrich) en 200 µl de bicarbonato de amonio 50 mM que contiene ditiotretitol (DTT) 10 mM y se redujo a 60 °C durante 40 minutos. La alquilación de cisteína se logró mediante 30 µl de yodoacetamida 100 mM disuelta en bicarbonato de amonio 50 mM seguido de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción de alquilación se detuvo poniendo la muestra bajo una lámpara fluorescente (lámpara de descarga de gas) durante 30 minutos. La digestión con tripsina se consiguió durante la noche a 37 °C con 20 µg de tripsina modificada de grado de secuenciación (Promega, Madison, WI).

60 Liberación de N-glicanos

65 Los N-glicanos de las IgG purificadas a partir de proteína A fueron liberados (como se describe en Ruhaak et al., Anal. Chem. 2008, 80, 6119-6126). Brevemente, las muestras secas de IgG se desnaturalizaron con 2 µl de dodecil

sulfato de sodio (SDS) (2%) a 60 °C durante 10 min. Posteriormente, se aplicó 2 µl de una mezcla de liberación que contiene 2% NP-40 de tipo Tergitol (NP-40), 2,5 X PBS y 0,05 mU PNGasa F (Roche, Mannheim, Alemania). Las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C para la liberación de N-glicanos.

La apo-transferrina humana (0,1 mg; Sigma-Aldrich) se disolvió en 21 µl de bicarbonato de amonio 50 mM que contenía DTT 10 mM y se redujo a 60 °C durante 40 min. La alquilación de cisteína se logró mediante 4 µl de yodoacetamida 200 mM disuelta en bicarbonato de amonio 50 mM seguido por 30 min. de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad. La alquilación se detuvo poniendo la muestra bajo una lámpara fluorescente (lámpara de descarga de gas) durante 30 min. Se aplicó a la muestra, PNGasa F 6 mU y se incubó durante la noche a 37 °C para la liberación de N-glicanos.

Preparación de micropuntas con algodón para HILIC SPE

Se adquirieron discos de lana de algodón de tres marcas diferentes (Da, Dynaretail, Leusden, Países Bajos; Etos, Etos BV, Beverwijk, Países Bajos, Bella, Groupe Lemoine, París, Francia) en las tiendas locales y se utilizaron para la preparación de micropuntas HILIC SPE. De acuerdo con los fabricantes de las almohadillas de lana de algodón estaban hechas de algodón puro 100%. Un pequeño trozo de algodón con un peso medio de 500 µg se tomó de un disco de algodón y se empujó en la parte final de una punta de pipeta de 10 µl (Rainin, Tiel, Países Bajos) utilizando una aguja de punta roma. Las micropuntas se almacenaron en una caja cerrada hasta su uso.

HILIC SPE algodón de N-glicanos y glicopéptidos trípticos de IgG

Las micropuntas de HILIC SPE de algodón se lavaron 5 veces con 10 µl de agua y se acondicionaron 3 veces con acetonitrilo al 83% (Biosolve BV, Valkenswaard, Países Bajos) mediante la aspiración y dispensación de la solución. Para una cantidad inferior al 10% de las puntas preparadas se encontró que el flujo de aspiración de disolvente era lento e insuficiente, y por lo tanto tales puntas se descartaron. Para la aplicación de la muestra en la micropunta con algodón para HILIC SPE, se añadieron 39 µl de acetonitrilo a 8 µl de una digestión tríptica de IgG o una muestra de liberación de N-glicanos, y la mezcla se pipeteó arriba y abajo 20 veces para permitir la adsorción de los glicopéptidos. Los glicanos o glicopéptidos adsorbidos se lavaron 3 veces con 10 µl de acetonitrilo al 83% que contenía TFA al 0,1% y se eluyeron directamente sobre una placa de MALDI con 2 µl de agua.

MALDI-TOF-MS

Para realizar el perfil de N-glicopéptidos del Fc de IgG mediante MALDI-TOF-MS en modo reflectrón positivo, los glicopéptidos se eluyeron directamente de las micropuntas con algodón para HILIC SPE sobre una placa MALDI de acero inoxidable pulido (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), utilizando 2 µl de agua y se dejaron secar al aire. Las muestras se cubrieron con 2 µl de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, 5 mg/ml en acetonitrilo al 50%; Bruker Daltonics) y se dejaron secar al aire.

Para realizar los perfiles de glicosilación en modo lineal positivo, los glicopéptidos de IgG se eluyeron directamente sobre una placa MALDI AnchorChip 600/384 (Bruker Daltonics) y se dejaron secar al aire. Las muestras se cubrieron con 1 µl de ácido dihidrobenzoico (DHB, 5 mg/ml en acetonitrilo al 50% con un 0,1% de TFA; Bruker Daltonics). La placa AnchorChip se cubrió con una tapa perforada que contiene 5 orificios de aproximadamente 5 mm (diámetro interno), lo que permite que la matriz DHB se seque al aire a temperatura ambiente de manera controlada.

Las muestras se analizaron en un Ultraflex II MALDI-TOF/ TOF-MS (Bruker Daltonics) y los espectros de masas se procesaron con el programa flexAnalysis (Bruker Daltonics). Del mismo modo, los glicanos se eluyeron de las micropuntas con algodón para HILIC SPE directamente sobre una placa AnchorChip para MALDI, se dejaron secar al aire y se cubrieron con 1 µl de DHB.

Resultados

Purificación de IgG y escisión tríptica

Las IgG se capturaron por afinidad a partir de 2 µl de plasma humano (aproximadamente 20 µg de IgG) en placas con filtro de 96 pocillos que contenían 5 µl de cuentas de Proteína A-Sepharose, seguido de la elución de las IgG con 40 µl de ácido fórmico 100 mM. Mientras que en la versión previamente descrita, el protocolo implica el secado de la muestra por centrifugación al vacío (Wuhrer et al., 2007 Proteomica, 7, 4.070-4.081), este procedimiento se sustituyó por una etapa de neutralización con bicarbonato de amonio en el protocolo actual.

La escisión tríptica de las IgG se realizó mediante una incubación durante la noche a 37°C, con 200 µg de tripsina modificada de grado de secuenciación o 400 µg de tripsina tratada con TPCK. Los glicopéptidos de las IgG se purificaron con Sepharose HILIC SPE en formato de placa de 96 pocillos y se analizaron por MALDI-TOF-MS en modo reflectrón positivo. Los perfiles de los N-glicopéptidos del Fc de las IgG obtenidos mediante el procedimiento de neutralización fueron muy similares a los observados con el procedimiento anteriormente descrito de centrifugación al vacío, independiente de la tripsina utilizada (datos no mostrados).

Purificación de los glicopéptidos usando micropuntas con algodón para HILIC SPE

Se evaluó el potencial del algodón como fase estacionaria en la HILIC SPE de los glicopéptidos de IgG. Con este fin, un pequeño trozo de un disco de lana de algodón (aproximadamente 500 µg) se envasó en el extremo de una punta de pipeta (Figura 1). Del disco de algodón (A), se toman aproximadamente 500 µg (B) y se empujan en una punta de pipeta de 10 µl utilizando una aguja metálica roma (C). El algodón se empuja hacia abajo hasta la parte final de la punta (D).

Las micropuntas de SPE obtenidas se probaron para el modo de enriquecimiento HILIC de los glicopéptidos de IgG. Específicamente, se añadió acetonitrilo a una alícuota de una digestión triptica de IgG de plasma humano, y los glicopéptidos se adsorbieron a la fase estacionaria de HILIC SPE. Tras tres lavados con 10 µl de acetonitrilo al 83% que contenían un 0,1% de TFA, los glicopéptidos retenidos se eluyeron directamente sobre una placa MALDI con 2 µl de agua, seguido de la realización del perfil en MALDI-TOF-MS de los N-glicopéptidos del Fc de IgG.

Ejemplos de los perfiles de glicopéptidos registrados por MALDI-TOF MS en modo reflectrón y en modo lineal se muestran en la Figura 2. Los perfiles de N-glicosilación de IgG1 e IgG2 obtenidos fueron muy similares a los obtenidos previamente tras la preparación de los glicopéptidos de IgG en placas de muestras de 96 pocillos usando un desalado de SPE de fase inversa o una purificación con Sepharose HILIC SPE (Figura 3).

La Figura 2 muestra los perfiles de espectrometría de masas MALDI-TOF de los glicopéptidos de IgG preparados usando micropuntas con algodón para HILIC SPE. Los espectros de masas se registraron en modo reflectrón utilizando como matriz CHCA (A) y en modo lineal usando como matriz DHB (B). Los glicopéptidos de IgG1 e IgG2 están representados por flechas continuas y discontinuas, respectivamente: cuadrado, N-acetilglucosamina; triángulo, fucosa; círculo oscuro, manosa; círculo claro, galactosa; rombo, ácido N-acetilneuramínico; pep, porción peptídica.

Los perfiles de MALDI-TOF-MS obtenidos a partir de eluciones en blanco utilizando las micropuntas con algodón para HILIC SPE se encontró que eran prácticamente idénticos a los controles de matriz MALDI (solamente matriz, sin muestra añadida), y no se detectaron picos contaminantes relacionados con la lana de algodón en el perfil de MALDI-TOF-MS (datos no mostrados).

Validación de algodón para HILIC SPE

Una micropunta con algodón para HILIC SPE se utilizó 8 veces para la purificación de glicopéptidos de una agrupación de digestiones tripticas de IgG seguido de un MALDI-TOF-MS en modo reflectrón de los glicopéptidos eluidos (como se muestra en las Figuras 4A y 4B).

Este experimento se repitió en cuatro días diferentes, utilizando una nueva punta de HILIC SPE de algodón para cada experimento. En otro conjunto de experimentos, se utilizaron 8 puntas diferentes para realizar los perfiles de N-glicosilación del Fc de IgG de la agrupación de digestiones tripticas de IgG mencionada (como se muestra en las Figuras 4C y 4D). Este experimento se repitió en cuatro días diferentes utilizando puntas nuevas para cada experimento. Se obtuvieron perfiles de N-glicosilación del Fc de IgG altamente reproducibles con HILIC SPE de algodón, independientemente de la utilización de la misma punta varias veces o de si se usaron diferentes puntas para la purificación y enriquecimiento a escala micro.

La figura 4 muestra la repetibilidad de las micropuntas con algodón para HILIC SPE para la desalinización y purificación de glicopéptidos de IgG. El análisis se realizó por MALDI-TOF-MS en modo reflectrón con una matriz de CHCA. Una agrupación de digestiones tripticas de IgG se desaló 8 veces, con una sola micropunta HILIC de algodón (A y B) o con ocho micropuntas HILIC de algodón diferentes (C y D). El experimento se repitió en cuatro días diferentes.

Validación del método completo

Los perfiles de N-glicosilación del Fc de las IgG se llevaron a cabo en paralelo en ocho alícuotas de plasma de un individuo control. Esto implicó la captura en proteína A, la neutralización del eluato, la escisión usando TPCK-tripsina, HILIC SPE con algodón, y el análisis de MALDI-TOF-MS. Este procedimiento se repitió en tres días diferentes. Se realizaron análisis de espectrometría de masas en modo reflectrón y modo lineal, y se demostró que los perfiles de N-glicosilación del Fc tanto de la IgG1 (como se muestra en las figuras 3A y 3B) como de IgG2 (como se muestra en las figuras 5A, 5B, 6A y 6B) pudieron registrarse con una baja variabilidad intradía e interdía.

Junto al material de algodón que se ha mencionado anteriormente, se utilizaron otras dos marcas de discos de lana de algodón para la preparación de las micropuntas de HILIC SPE y la realización de los perfiles de N-glicosilación del Fc de las IgG. Las tres marcas de discos de algodón proporcionaron resultados muy similares tanto para IgG1 (Figuras 3A y 3B) como para IgG2 (como se muestra en las figuras 5A, 5B, 6A y 6B).

Además, el método se comparó con un enfoque descrito previamente por Selman et al *Anal.Chem.* 2010, 82, 1073-1081. Las principales diferencias en comparación con este método anterior son que (1) el secado de los eluidos de Proteína A por centrifugación al vacío se sustituyó por una fase de neutralización, (2) la tripsina de grado de secuenciación se reemplazó por tripsina tratada con TPCK, y (3) se llevó a cabo la HILIC SPE en micropunta de algodón en lugar de en una HILIC SPE en placa de 96 pocillos usando cuentas de Sepharose.

Un tercer enfoque combinó la preparación de muestras descrita previamente por Selman et al (es decir, la captura en proteína A, el secado por centrifugación al vacío y la digestión de la IgG con tripsina de grado de secuenciación) con la purificación HILIC SPE con algodón y el modo de análisis en reflectrón de MALDI-TOF-MS. Con todos los diferentes protocolos, se obtuvieron perfiles de N-glicosilación del Fc de la IgG1 (Figura 3C y 3D) e IgG2 (como se muestra en las figuras 5A, 5B, 7A y 7B) muy similares mediante modo reflectrón y modo lineal de MALDI-TOF-MS.

La Figura 3 muestra la repetibilidad de los perfiles de glicopéptidos de IgG1 aplicando las micropuntas de HILIC SPE con algodón. Los glicopéptidos de la IgG1 fueron detectados por MALDI-TOF-MS en modo reflectrón utilizando como matriz CHCA (A, C) y en modo lineal usando como matriz DHB (B, D). Las muestras fueron preparadas después de la digestión usando el método de neutralización seguido de la desalinización con las micropuntas de HILIC SPE con algodón preparadas a partir de tres marcas diferentes de discos de algodón (A, B).

La Figura 5 muestra la repetibilidad de los perfiles de glicopéptidos de la IgG2 aplicando las micropuntas de HILIC SPE con algodón. Los glicopéptidos de la IgG2 se detectaron por MALDI-TOF-MS en modo reflectrón utilizando como matriz CHCA (A, C) y en modo lineal usando como matriz DHB (B, D). Las muestras se prepararon después de la digestión usando el método de neutralización seguido de la desalinización con las micropuntas HILIC SPE con algodón preparadas a partir de tres marcas diferentes de discos de algodón (A, B). Los perfiles resultantes se compararon con el patrón de glicoformas purificadas mediante cuentas de Sepharose o las micropuntas de HILIC SPE con algodón después de un secado por centrifugación al vacío y la digestión con tripsina de grado de secuenciación (C, D). Para cada experimento independiente, se calcularon las intensidades relativas y las RSD a partir de 8 replicados.

Los perfiles resultantes se compararon con el patrón de glicoformas purificadas mediante cuentas de Sepharose o las micropuntas de HILIC SPE con algodón después de un secado por centrifugación al vacío y la digestión con tripsina de grado de secuenciación (C, D). Para cada experimento independiente, se calcularon las intensidades relativas y las RSD a partir de 8 replicados.

Purificación de glicanos usando las micropuntas con algodón para HILIC SPE

Como otro campo de aplicación de las micropuntas de HILIC SPE con algodón se analizó la preparación de muestras de glicanos para MALDI-TOF-MS después de su liberación con PNGasa F. Los N-glicanos se liberaron enzimáticamente a partir de muestras de IgG humana y transferrina humana que contenían detergentes (SDS, NP-40) y sales (PBS). Se detectaron tanto N-glicanos neutros como ácidos (sialilados) mediante MALDI-TOF-MS después de la purificación con micropuntas HILIC SPE con algodón, mientras que el análisis directo de MALDI-TOF-MS de las muestras de glicanos liberados sin una purificación SPE no registró N-glicanos sino que era dominado por grupos de detergentes (Figuras 6, 7, 8 y 9).

Las Figuras 6, 7, 8 y 9 muestran los espectros de MALDI-TOF-MS de los N-glicanos después de la purificación con micropuntas de HILIC SPE con algodón. Los N-glicanos enzimáticamente liberados de la IgG (Figuras 6, 7 y 8, espectros A-F) y de la transferrina humana (Figura 9, espectros G, H) se analizaron por MALDI-TOF-MS en modo reflectrón positivo (Figura 6, espectros A, B), modo lineal positivo (Figura 7, espectros C, D), y modo lineal negativo (Figuras 8 y 9, espectros E-H) y sin purificación previa (paneles de la izquierda: espectros A, C, E, G) y con purificación previa (paneles de la derecha: espectros B, D, F, H) con micropuntas de HILIC SPE con algodón. Los glicanos se registraron como aductos de sodio en el modo ion positivo y como especies desprotonadas en el modo de ion negativo: *, aducto de potasio; cuadrado, N-acetilglucosamina; triángulo, fucosa; círculo oscuro, manosa; círculo claro, galactosa; rombo púrpura, ácido N-acetilneuramínico.

La Figura 10 muestra un espectro de MALDI-TOF-MS en modo de ion negativo lineal de N-glicanos liberados con PNGasa F a partir de proteínas plasmáticas humanas marcadas con AA. Los N-glicanos se liberaron de las proteínas plasmáticas humanas (2 µl de plasma) con PNGasa F como se ha descrito previamente (Ruhaak et al. 2008, *Anal Chem.*, 80, 6119-6126), se purificaron con micropuntas SPE HILIC de algodón, y se midieron en una placa para la diana AnchorChip con DHB; cuadrado, N-acetilglucosamina; triángulo, fucosa; círculo oscuro, manosa; círculo claro, galactosa; rombo, ácido N-acetilneuramínico; *, productos de desintegración post-fuente.

La Figura 11 (espectros A y B) muestra los espectros de MALDI-TOF-MS en el modo de ion negativo lineal de los glicopéptidos tripticos (A) y los N-glicanos liberados con PNGasa F (B) de la fetuina bovina (número de registro SwissProt: P12763). Los glicopéptidos y glicanos se purificaron mediante micropuntas con algodón para HILIC SPE y se midieron en una placa para la diana AnchorChip con DHB. (A) flechas continuas, glicopéptido de masa molecular pequeña (L145CPDCPLLAPLNDNR159); flechas discontinuas, glicopéptido de masa molecular intermedia (V160VHAVEVALATFNAESNGSYLQLVEISR187); flechas de puntos, glicopéptido de masa molecular grande

(R72PTGEVYDIEIDTLETTCHVLDPTPLANCSVR103); (B) ~, péptido de la fetuina H313TFSGVASVESSSGEAFHVG K333; *, aducto de sodio; ¥, aducto de potasio; cuadrado, N-acetilglucosamina; triángulo, fucosa; círculo oscuro, manosa; círculo claro, galactosa; rombo, ácido N-acetilneuramínico.

- 5 La Figura 12 (espectros A y B) muestra los espectros de MALDI-TOF-MS en el modo de ion negativo lineal de los glicopéptidos trípticos (A) y los N-glicanos liberados con PNGasa F (B) de los glicopéptidos de la apo-transferrina humana (número de registro SwissProt: P02787). Los glicopéptidos y glicanos se purificaron mediante micropuntas con algodón para HILIC SPE y se midieron en una placa para la diana AnchorChip con DHB. (A) flechas continuas, glicopéptido de masa molecular pequeña (C421GLVPVLAENYNK433); flechas discontinuas, glicopéptido de masa molecular grande (Q622 (QQHLFGSNVTDCSGNFCLFR642); ¥, productos de desintegración post-fuente; *, pérdida de amoníaco por la degradación peptídica en N-terminal durante la digestión proteolítica (B) *, aducto de sodio; ¥, aducto de potasio; cuadrado, n-acetilglucosamina; triángulo, fucosa; círculo oscuro, manosa; círculo claro, galactosa, rombo, ácido N-acetilneuramínico.
- 10
- 15 Por lo tanto, estos experimentos demostraron el éxito de la limpieza de las muestras de N-glicano liberadas mediante HILIC SPE con algodón para el análisis MALDI-TOF-MS, eliminándose los detergentes y las sales.

El listado o la discusión en esta especificación de un documento claramente publicado previamente no necesariamente debe tomarse como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o que es de conocimiento general común.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de un glicano y/o glicoconjugado que comprende los pasos de:
 - 5 (a) proporcionar una fase estacionaria que comprende algodón;
 - (b) aplicar una muestra que contiene un glicano y/o glicoconjugado a la fase estacionaria;
 - (c) lavar la fase estacionaria con un primer disolvente; y
 - (d) eluir el glicano y/o glicoconjugado de la fase estacionaria con un segundo disolvente.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que en la etapa (b) la muestra que contiene glicano y/o glicoconjugado comprende un disolvente orgánico; en el que el disolvente orgánico comprende acetonitrilo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol o tetrahidrofurano; preferiblemente en el que el disolvente orgánico es acetonitrilo entre el 70% y 88% v/v en agua; más preferiblemente en el que el disolvente orgánico es acetonitrilo entre el 75% y 85% v/v en agua; más preferiblemente en el que el disolvente orgánico es acetonitrilo al 83% v/v en agua.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que en la etapa (c) el primer disolvente es una mezcla de disolventes que comprende agua, un disolvente orgánico y un ácido; preferiblemente en el que el disolvente orgánico es acetonitrilo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol o tetrahidrofurano, y el ácido es ácido trifluoroacético, ácido fórmico, ácido acético, ácido pentafluoropropiónico o ácido heptafluorobutírico; más preferiblemente en el que la mezcla de disolventes comprende entre el 75% y 90% v/v de disolvente orgánico y entre el 0,1% y 1% v/v de ácido en agua; o entre el 70% y 95% v/v de disolvente orgánico y entre el 0,1% y el 3% v/v de ácido en agua, más preferiblemente la mezcla de disolventes comprende un 83% v/v de acetonitrilo y un 0,1% v/v de ácido trifluoroacético en agua.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que en la etapa (d) el segundo disolvente comprende un disolvente polar; preferiblemente el disolvente polar es agua, dimetilsulfóxido o dimetilformamida.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el segundo disolvente comprende más disolvente polar que el primer disolvente.
- 30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el glicoconjugado es una glicoproteína, glicolípido o glicopéptido; preferiblemente en el que el glicopéptido es un glicopéptido de IgG; y más preferiblemente en el que el glicopéptido de IgG es un N-glicopéptido tríptico del Fc de IgG.
- 35 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el glicano es un N-glicano.
8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la fase estacionaria es reutilizable.
- 40 9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la fase estacionaria comprende lana de algodón; preferiblemente en el que la fase estacionaria consiste en lana de algodón.
- 45 10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el método comprende además la etapa de realizar el análisis de espectrometría de masas del glicano y/o glicoconjugado eluido; preferiblemente en el que el análisis de espectrometría de masas es la detección MALDI-TOF MS.
11. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el método comprende además el paso de realizar perfiles de glicosilación a nivel de glicopéptido de los glicopéptidos eluidos.
- 50 12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la fase estacionaria se lleva a cabo en un recipiente abierto; preferiblemente en el que el recipiente abierto es una pipeta, una pipeta multicanal o punta de una pipeta.
- 55 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 para extraer glicanos tras el tratamiento con PNGasa F de las glicoproteínas, el extracto de glicanos tras el marcaje fluorescente por aminación reductora, o el enriquecimiento de N-glicopéptidos a partir de digestiones proteolíticas.

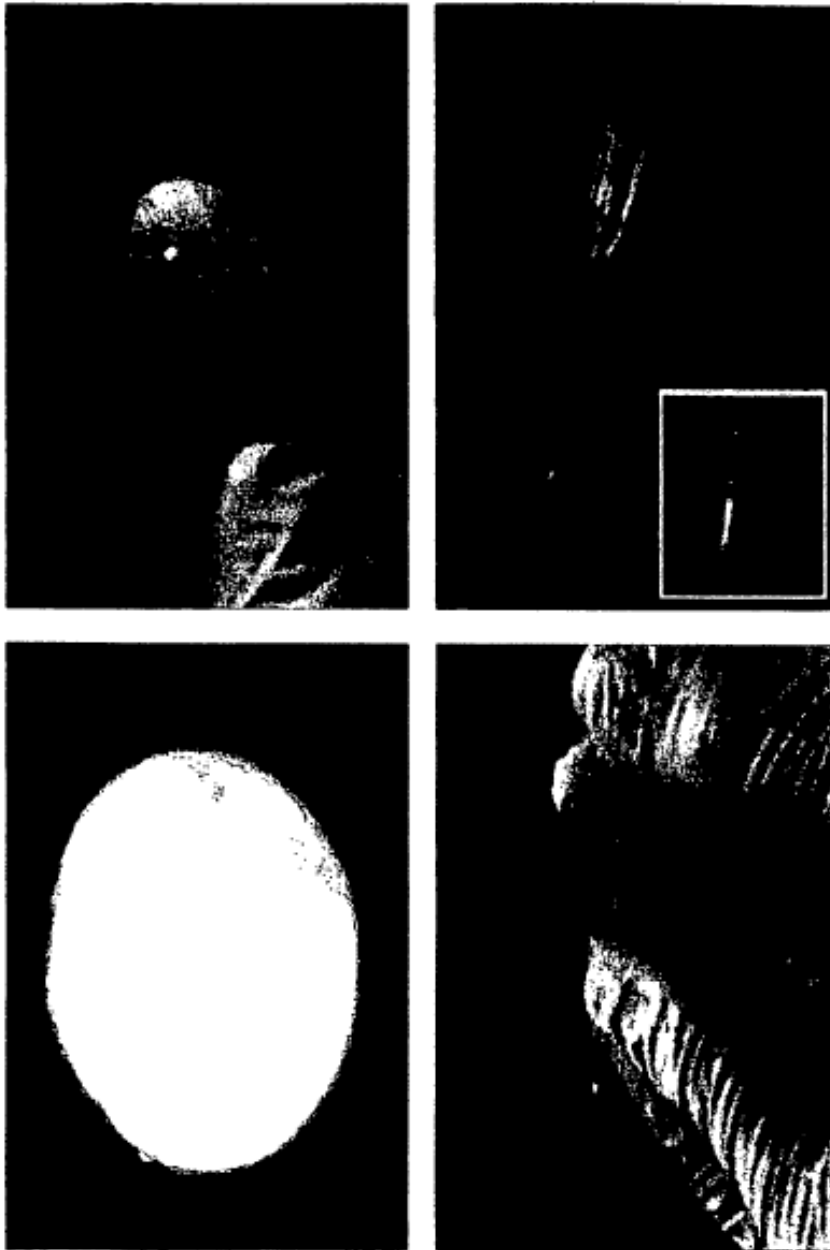


Figura 1

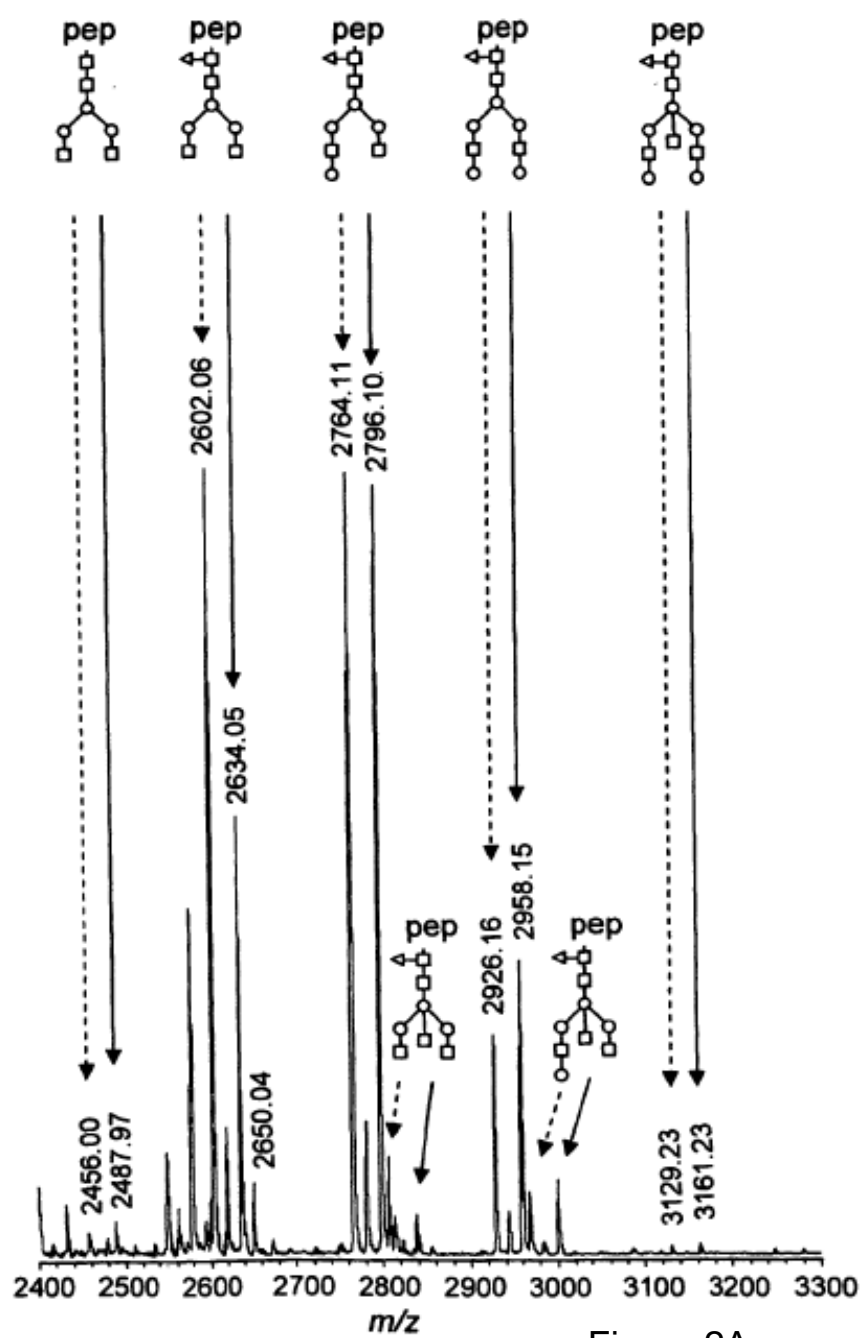


Figura 2A

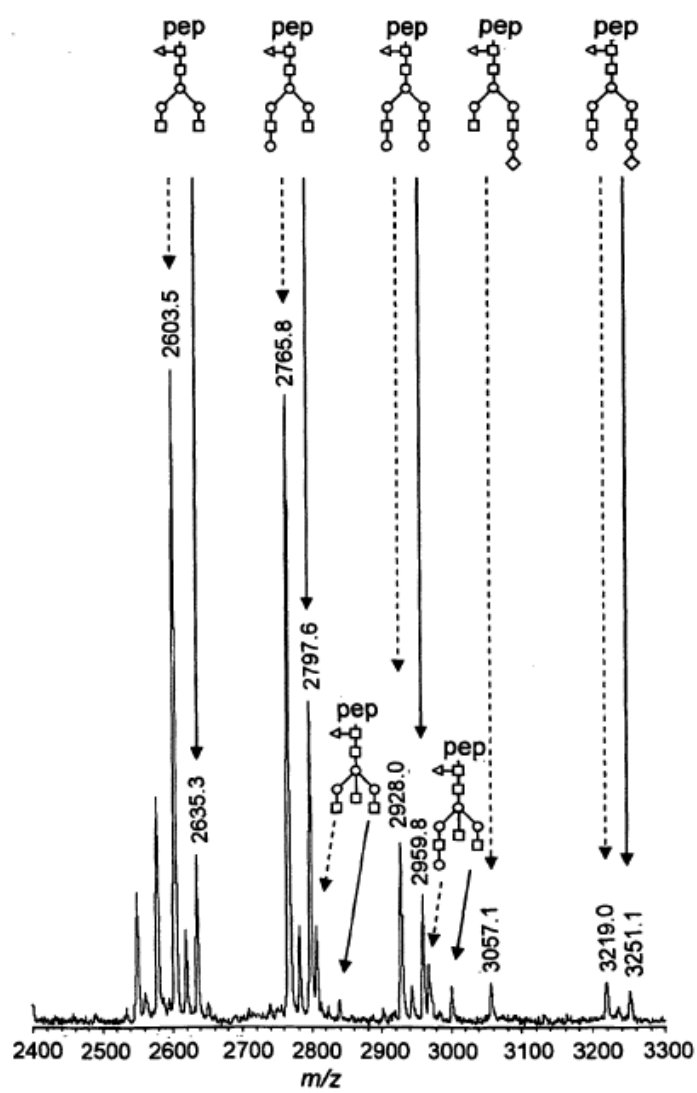


Figura 2B

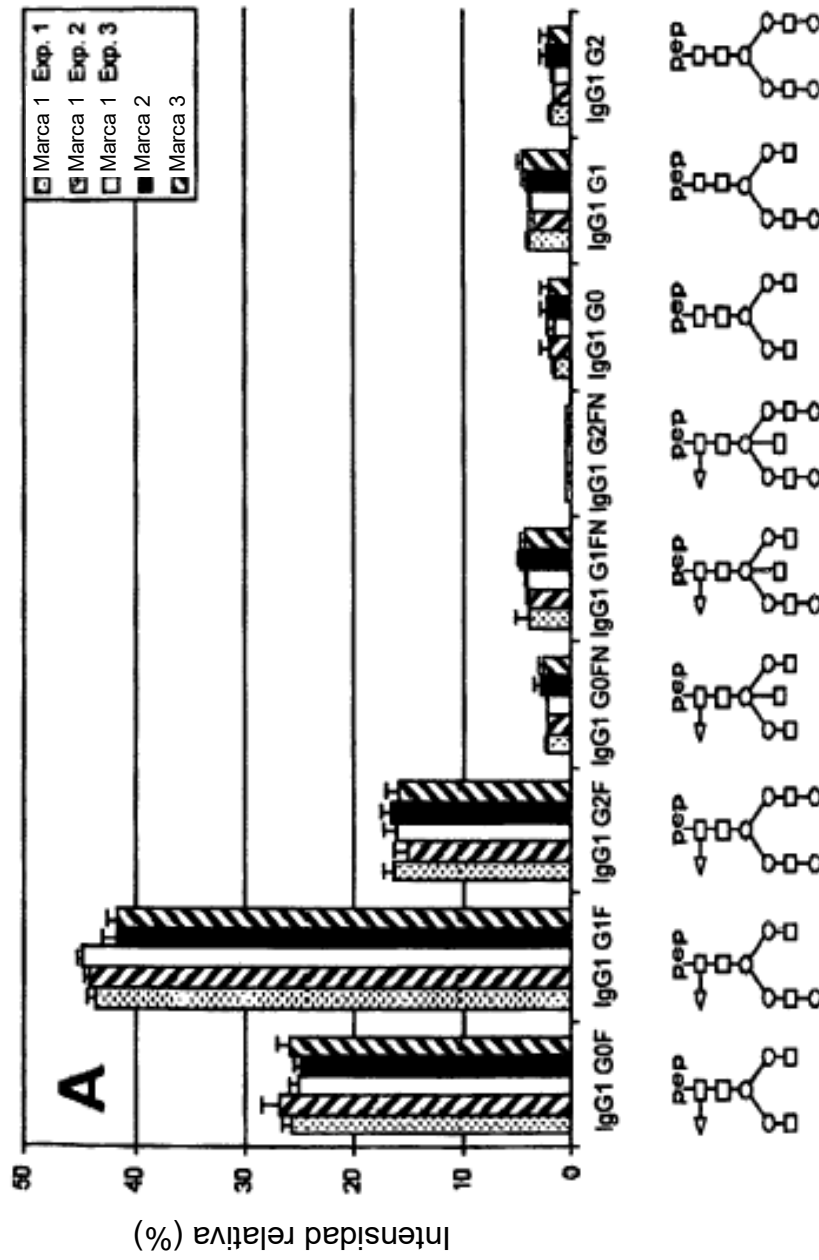


Figura 3A

Picos de fusión

Picos de fusión

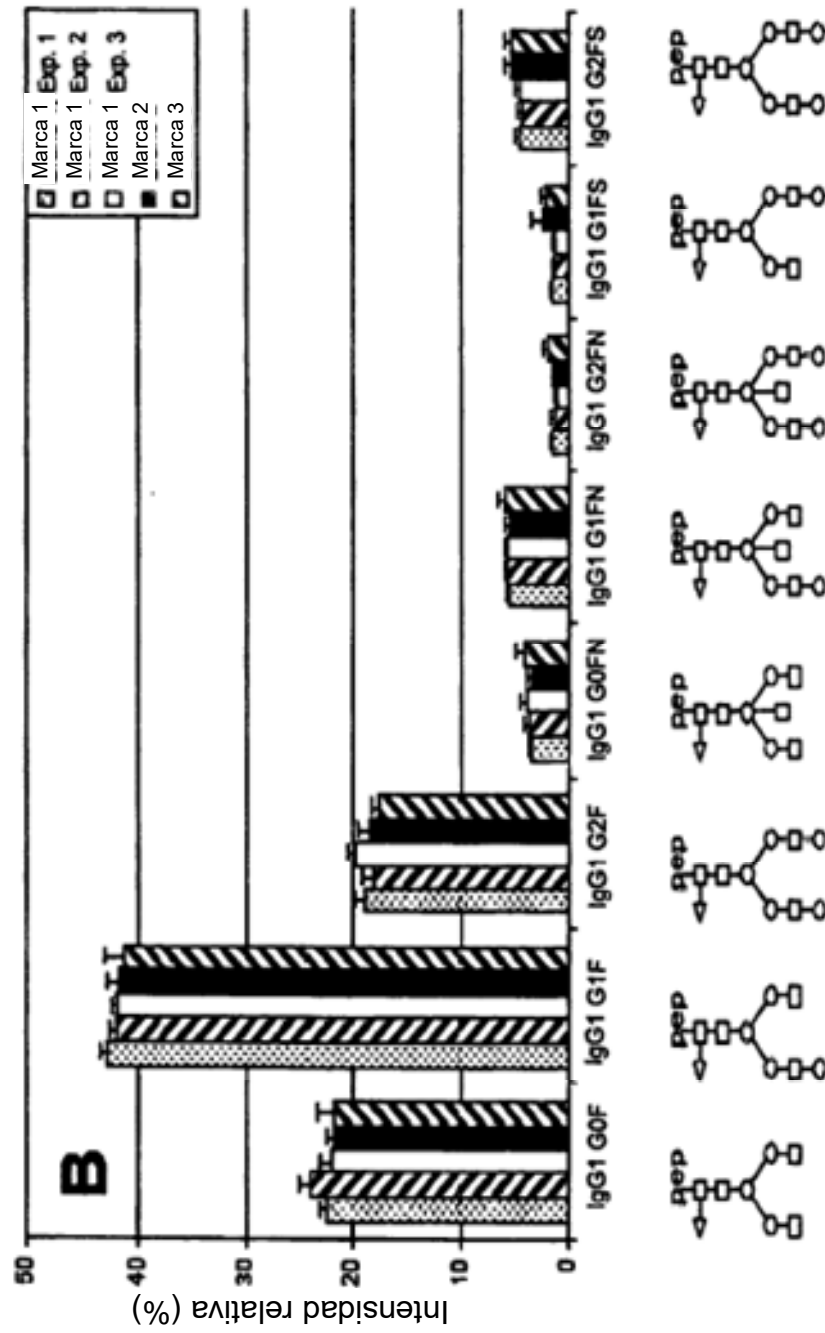


Figura 3B



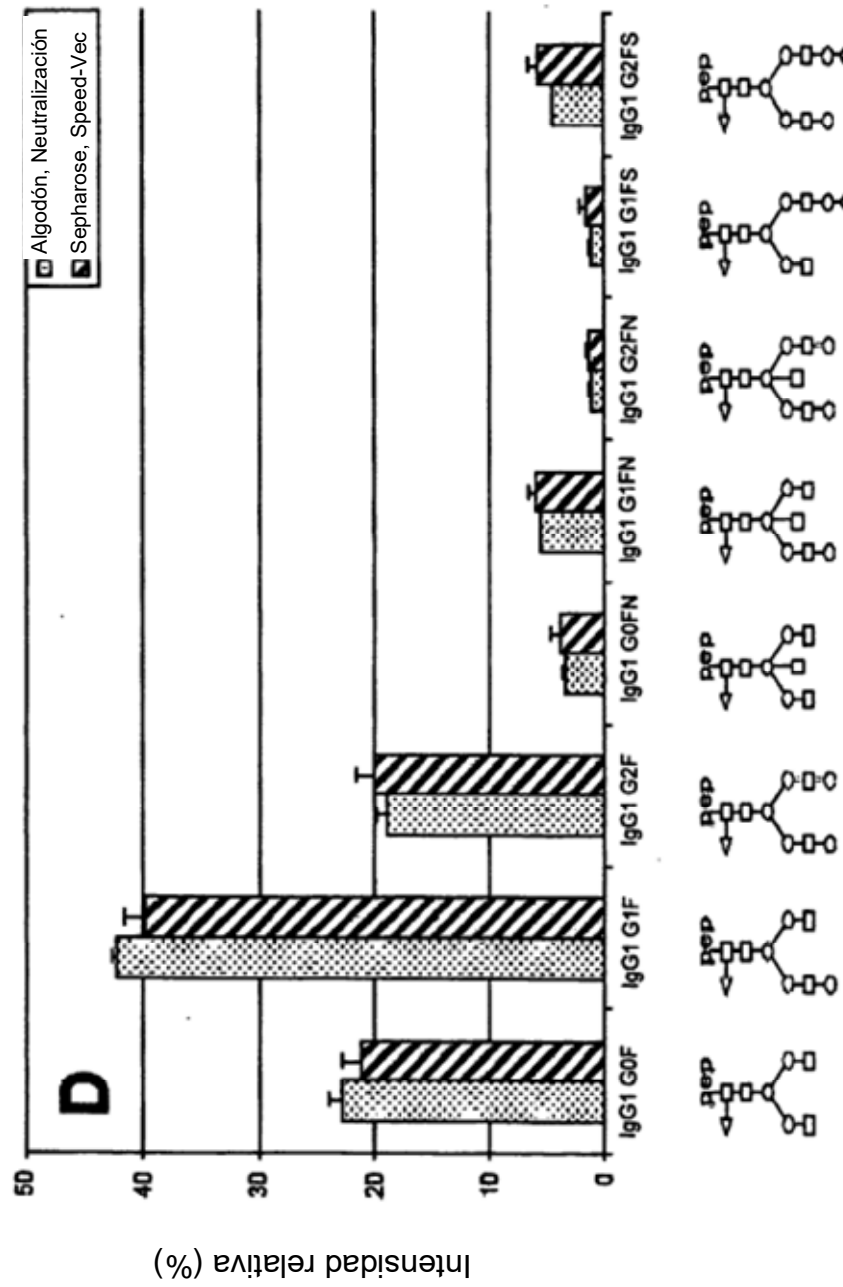


Figura 3D

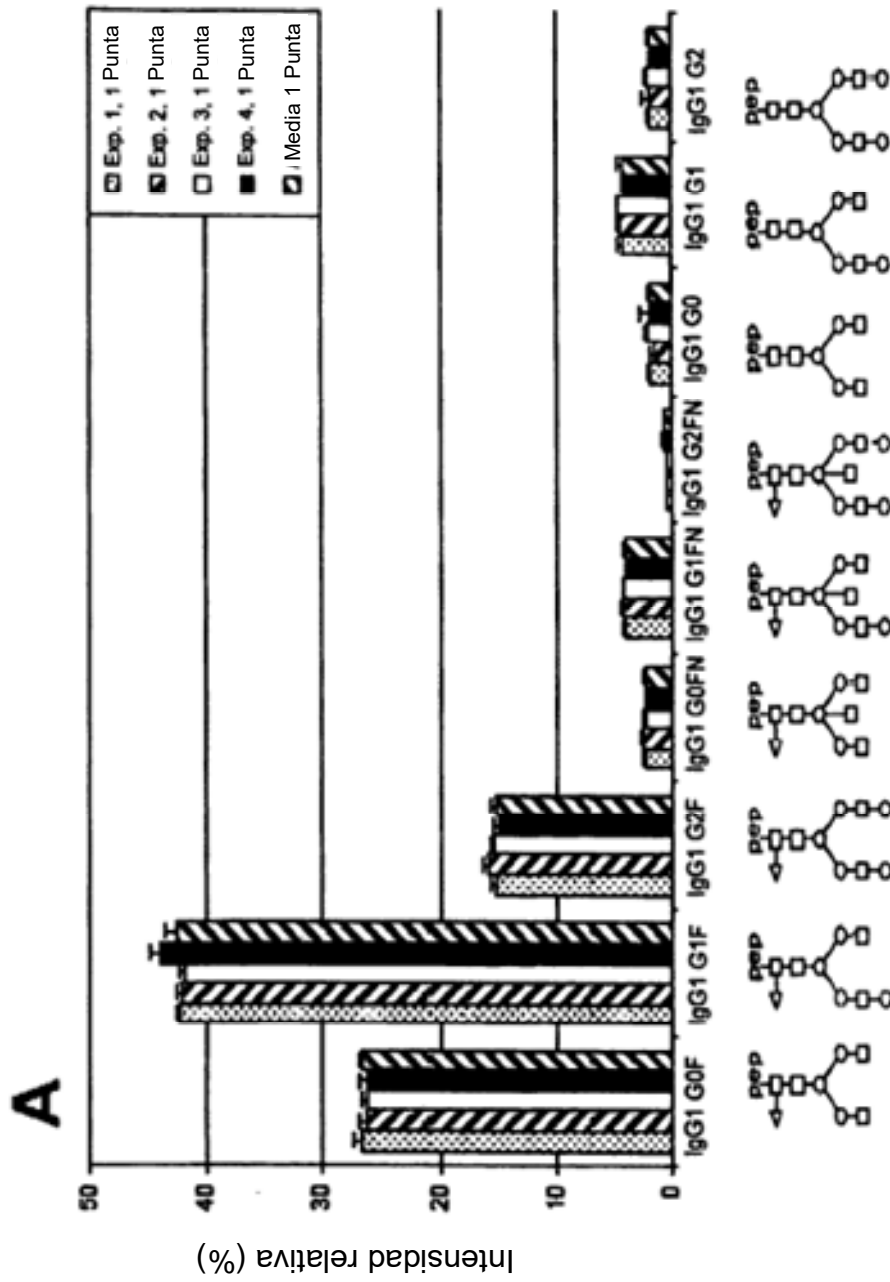


Figura 4A

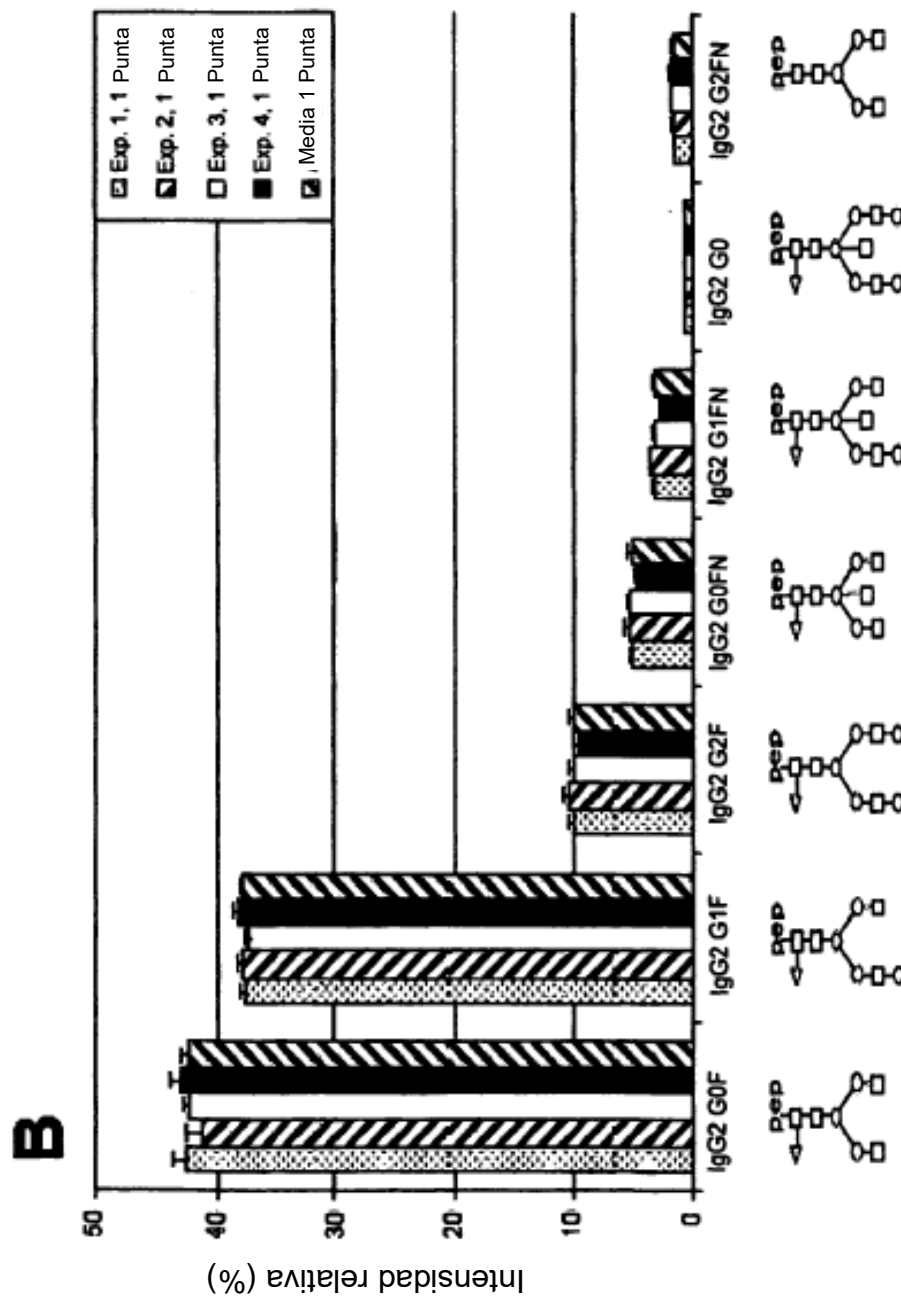


Figura 4B

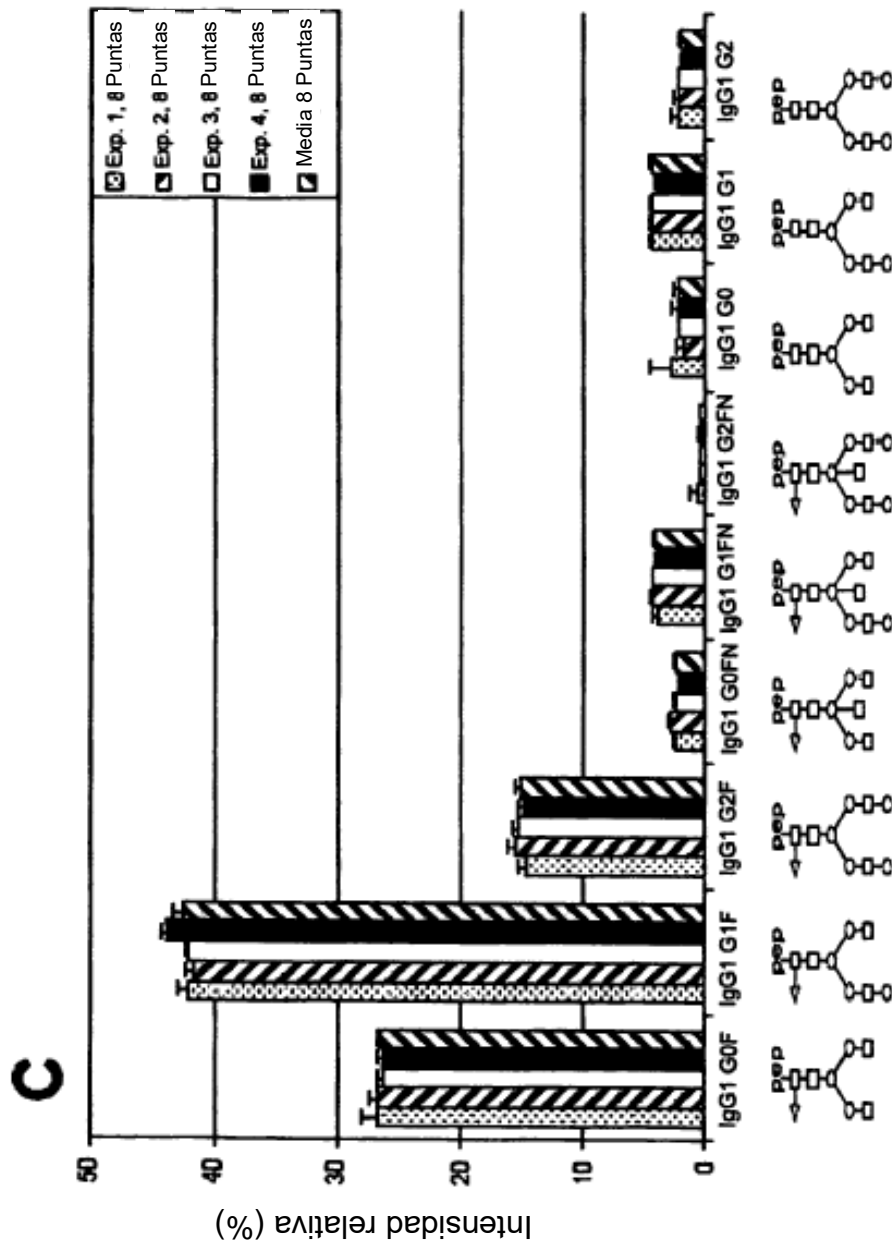


Figura 4C

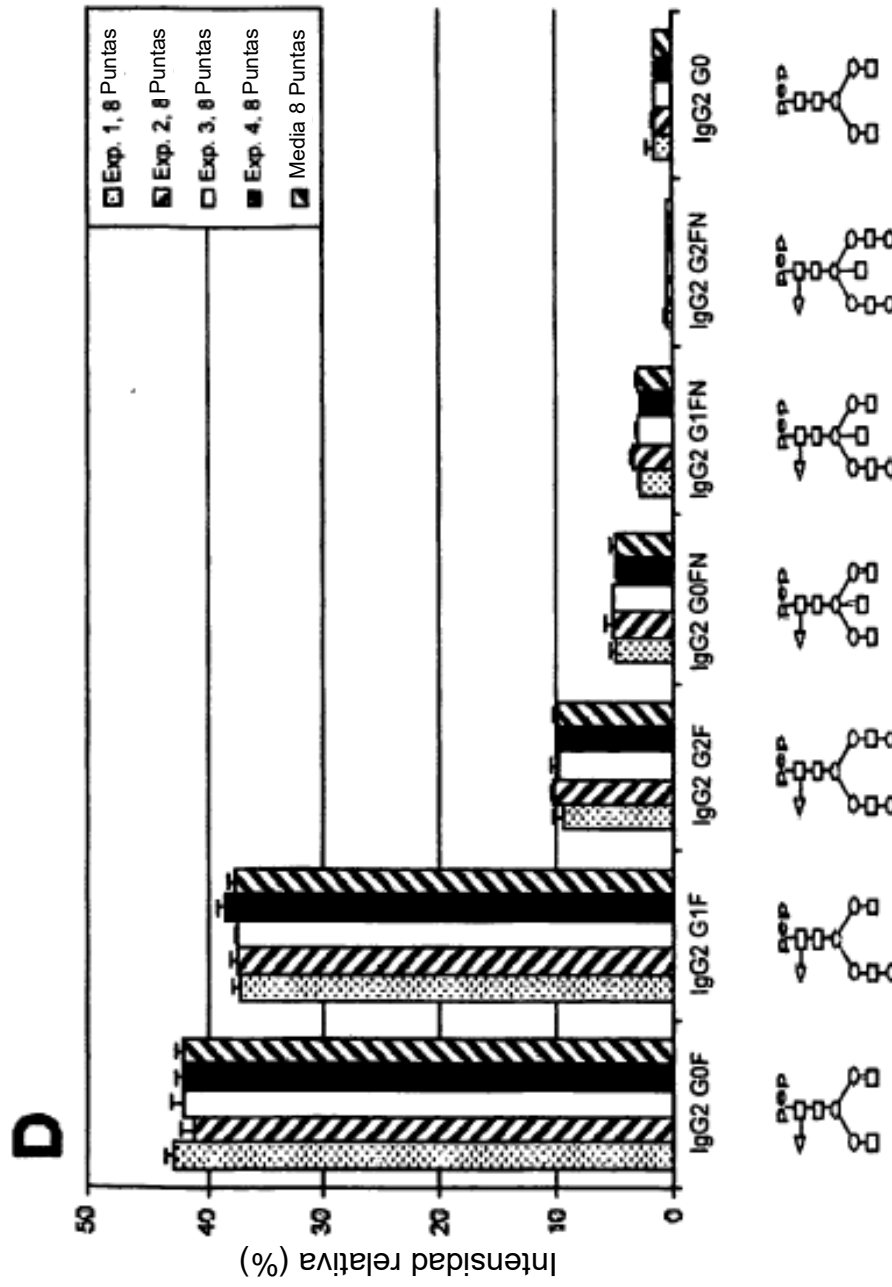


Figura 4D

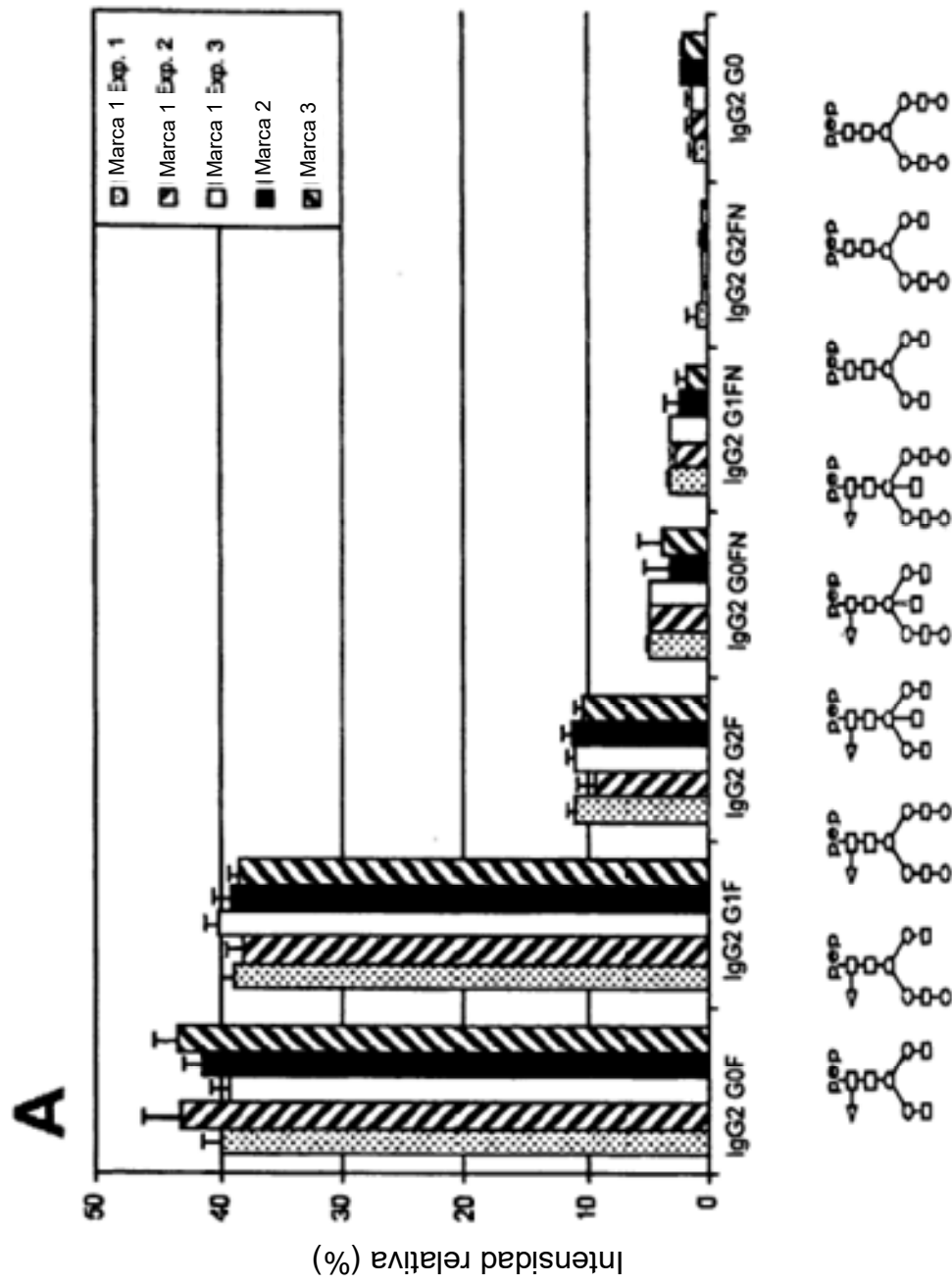


Figura 5A

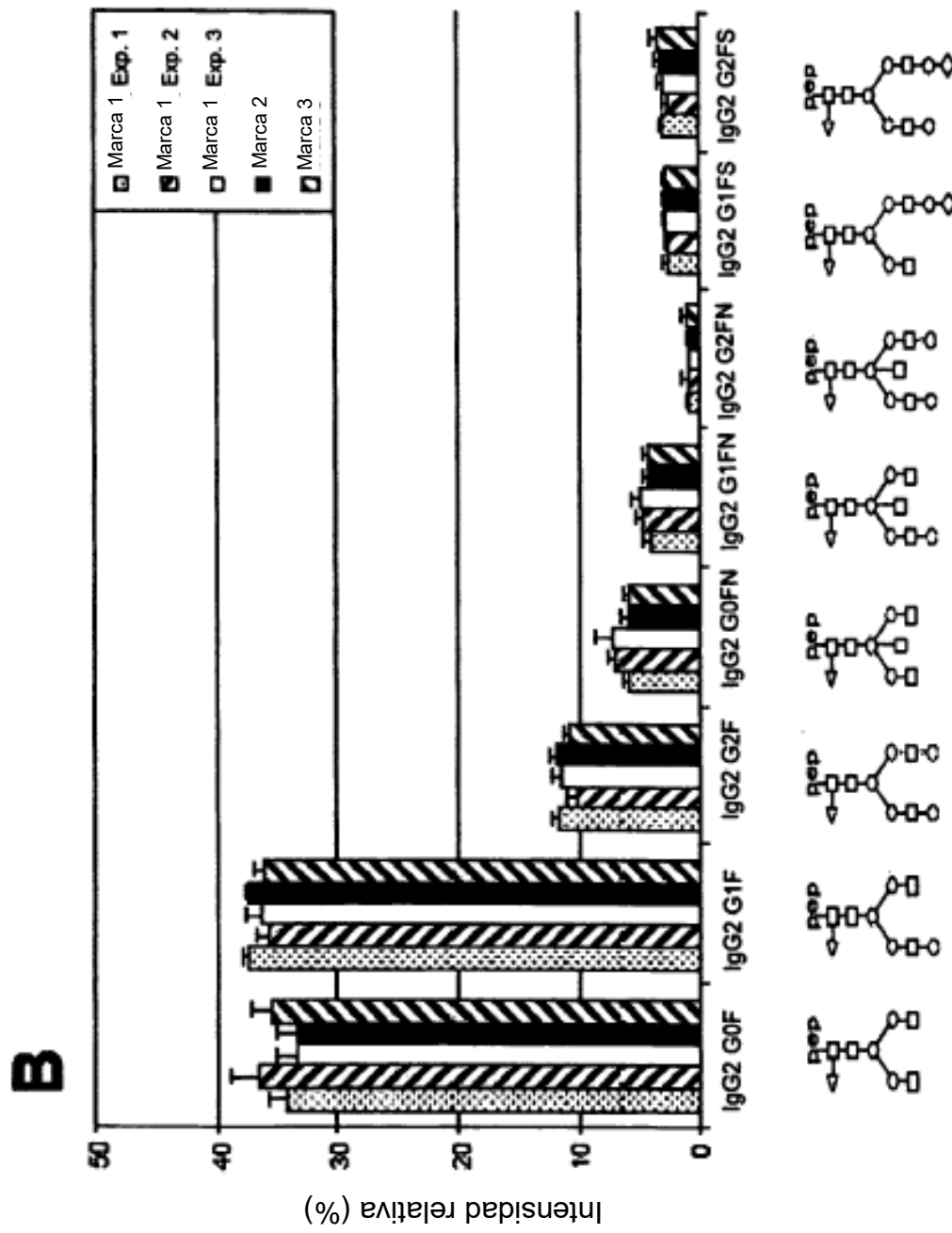


Figura 5B

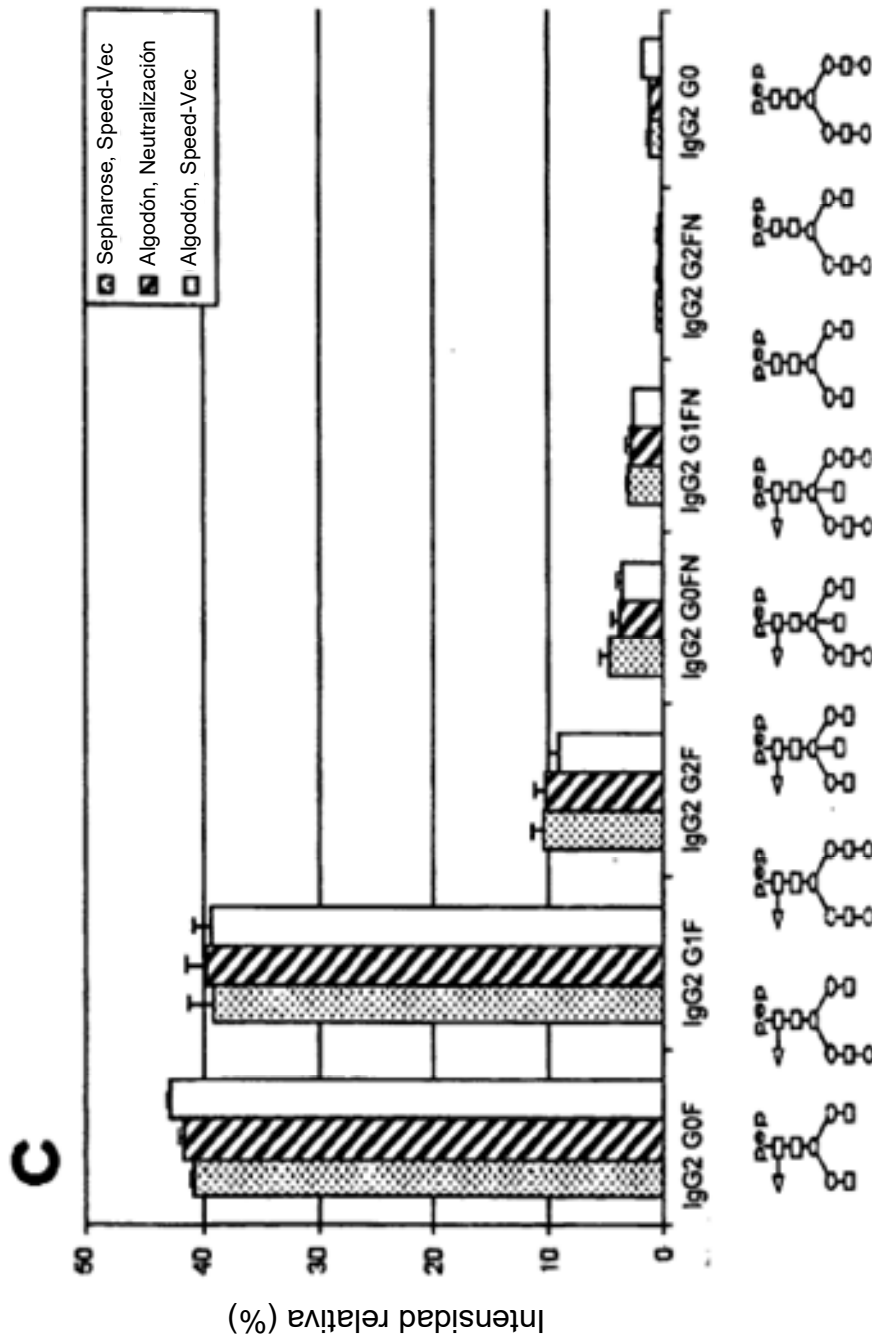


Figura 5C

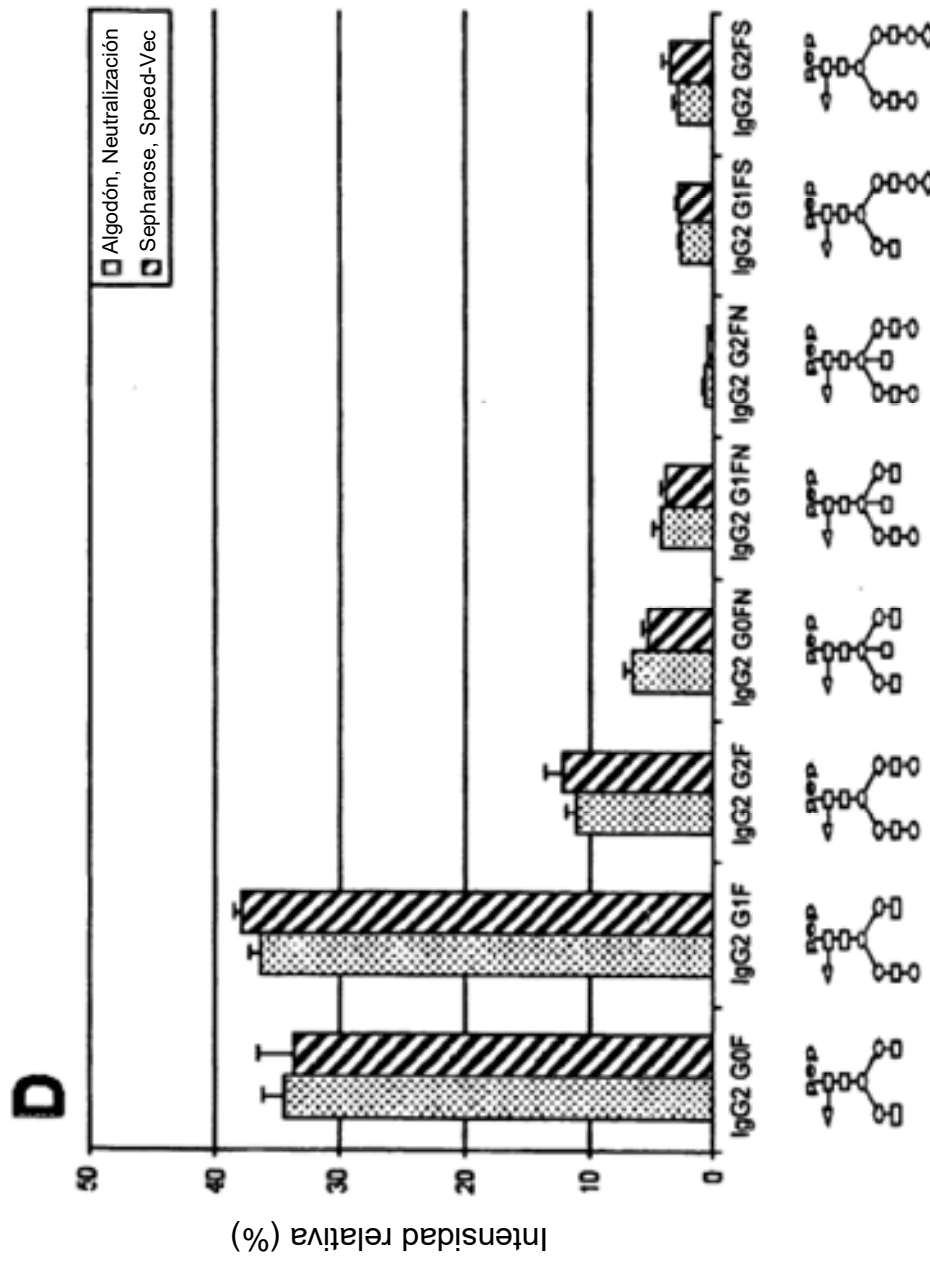


Figura 5D

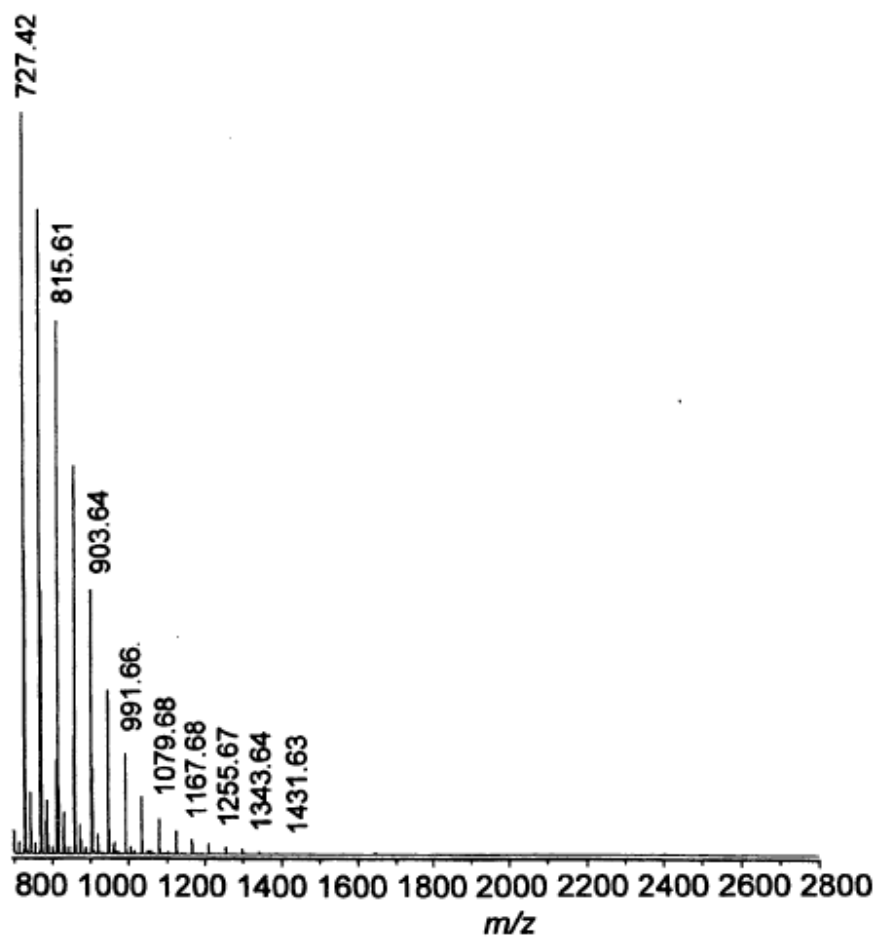
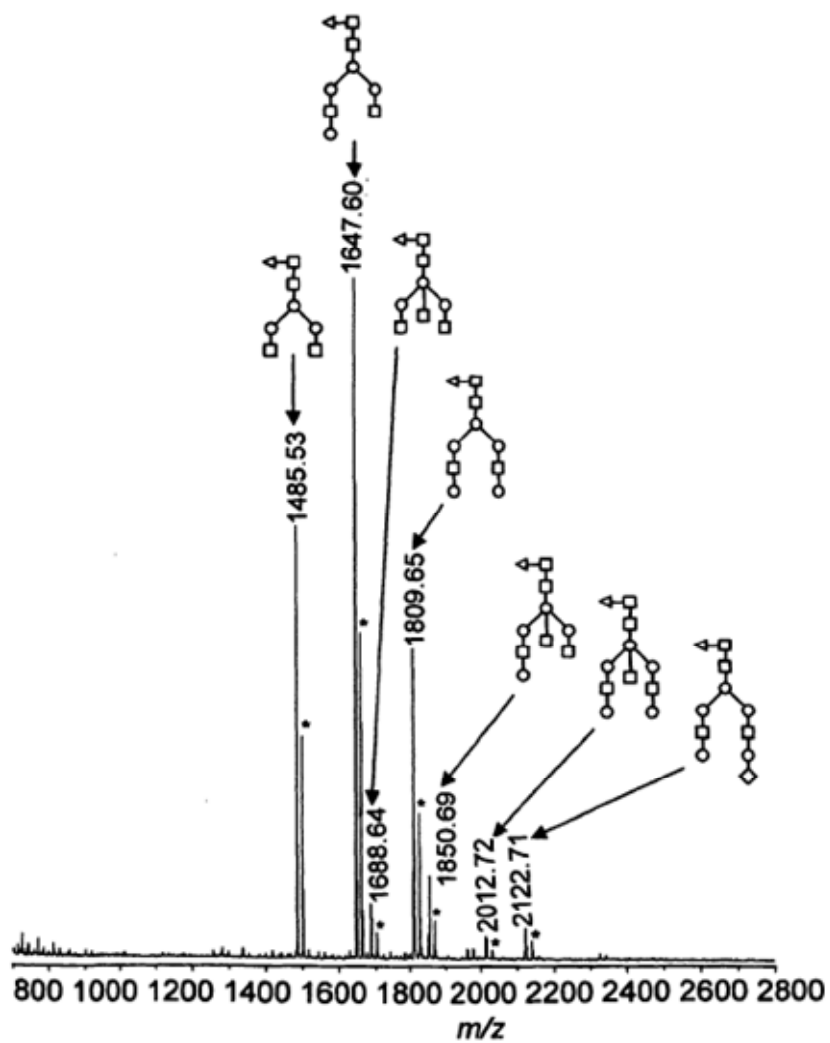


Figura 6A



* Aductos de potasio

Figura 6B

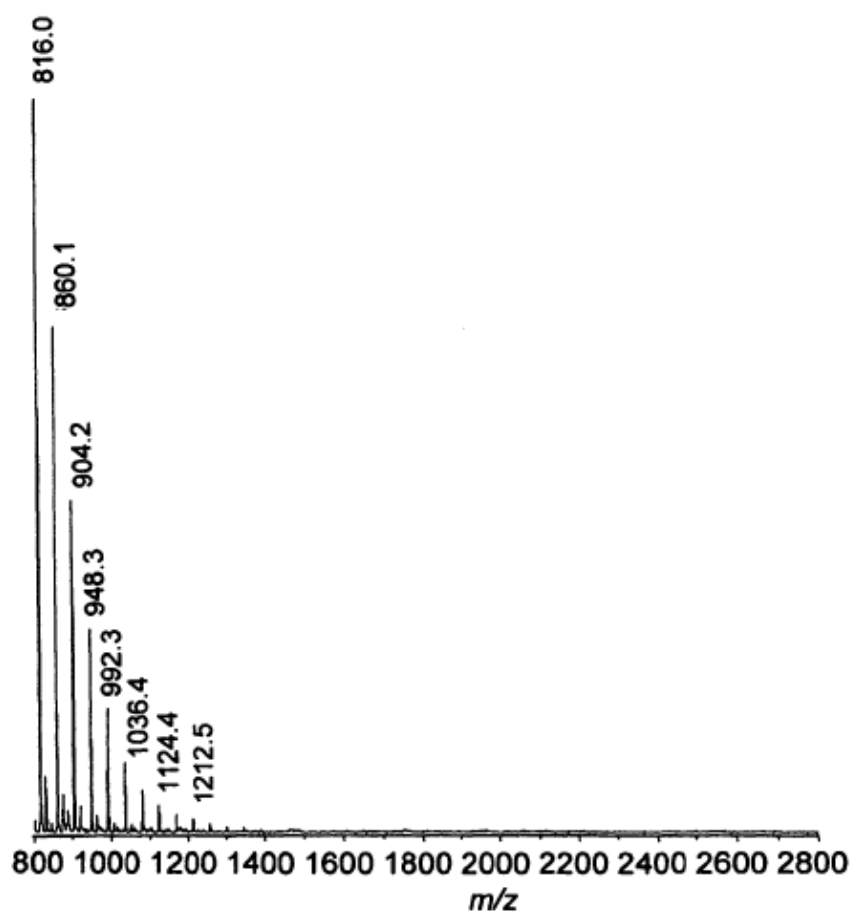
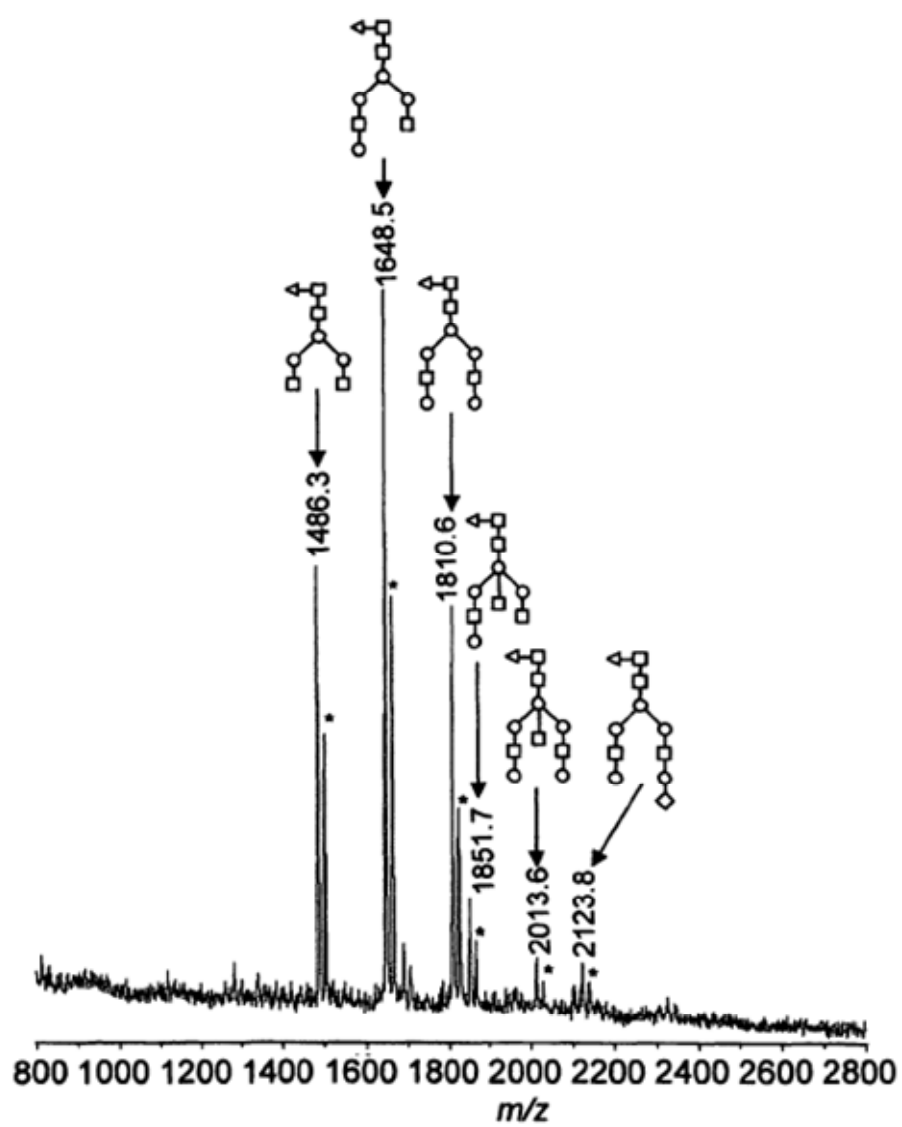


Figura 7A



* Aduetos de potasio

Figura 7B

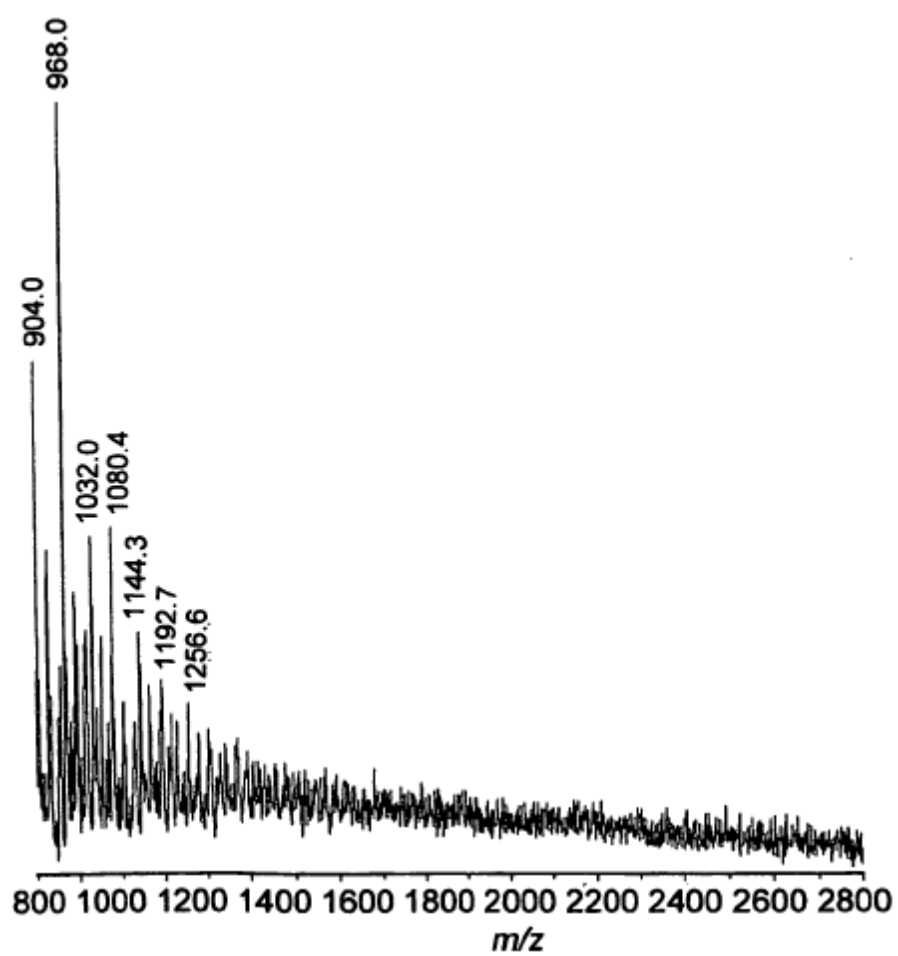


Figura 8A

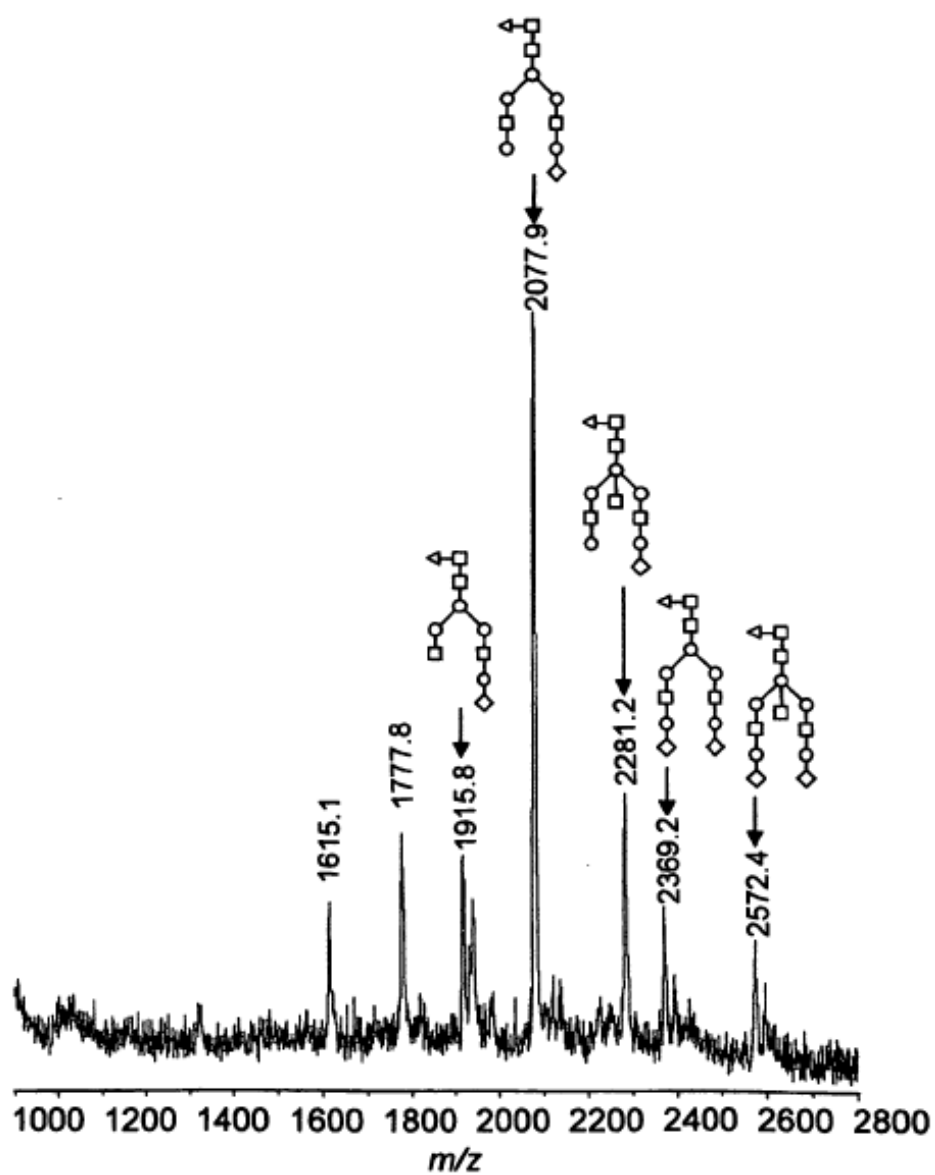


Figura 8B

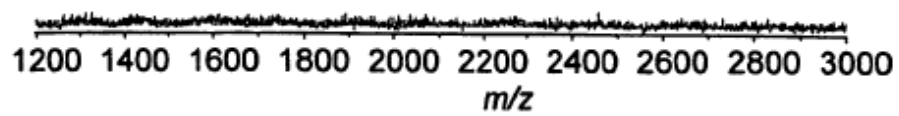


Figura 9A



Figura 9B

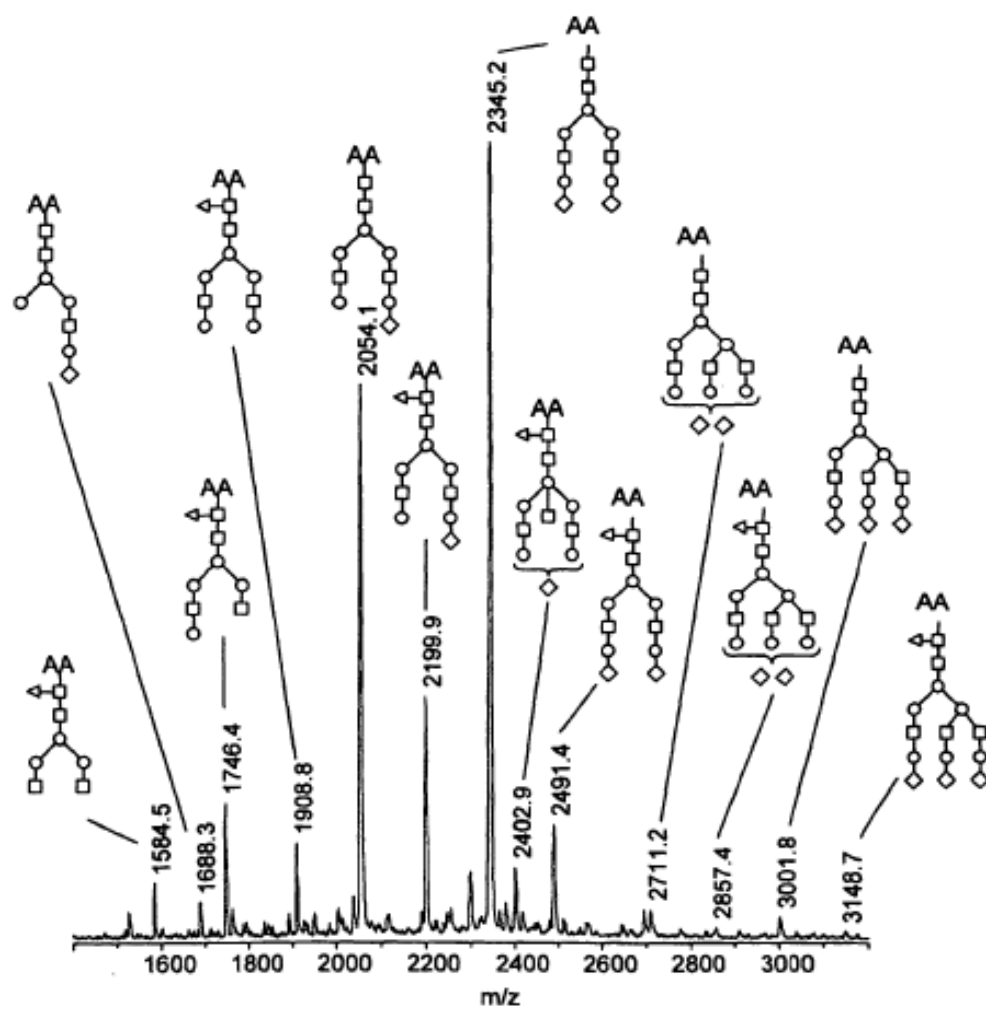


Figura 10

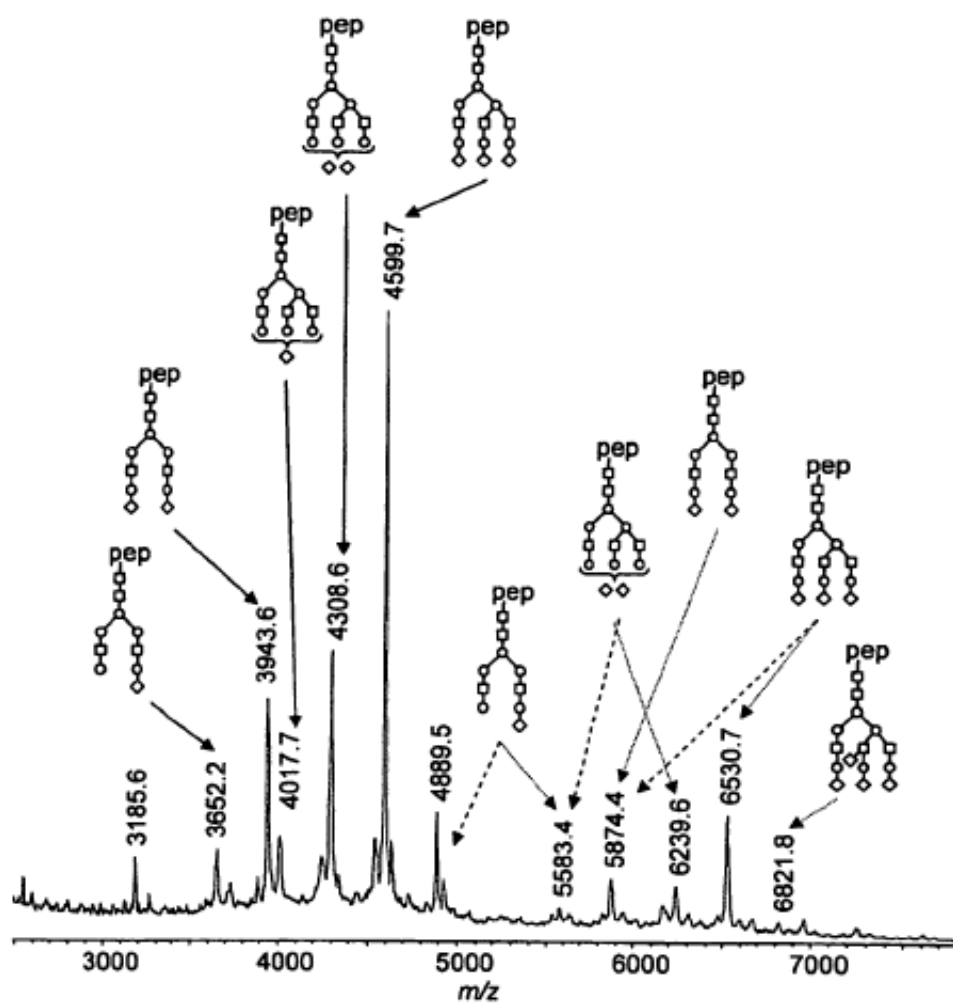
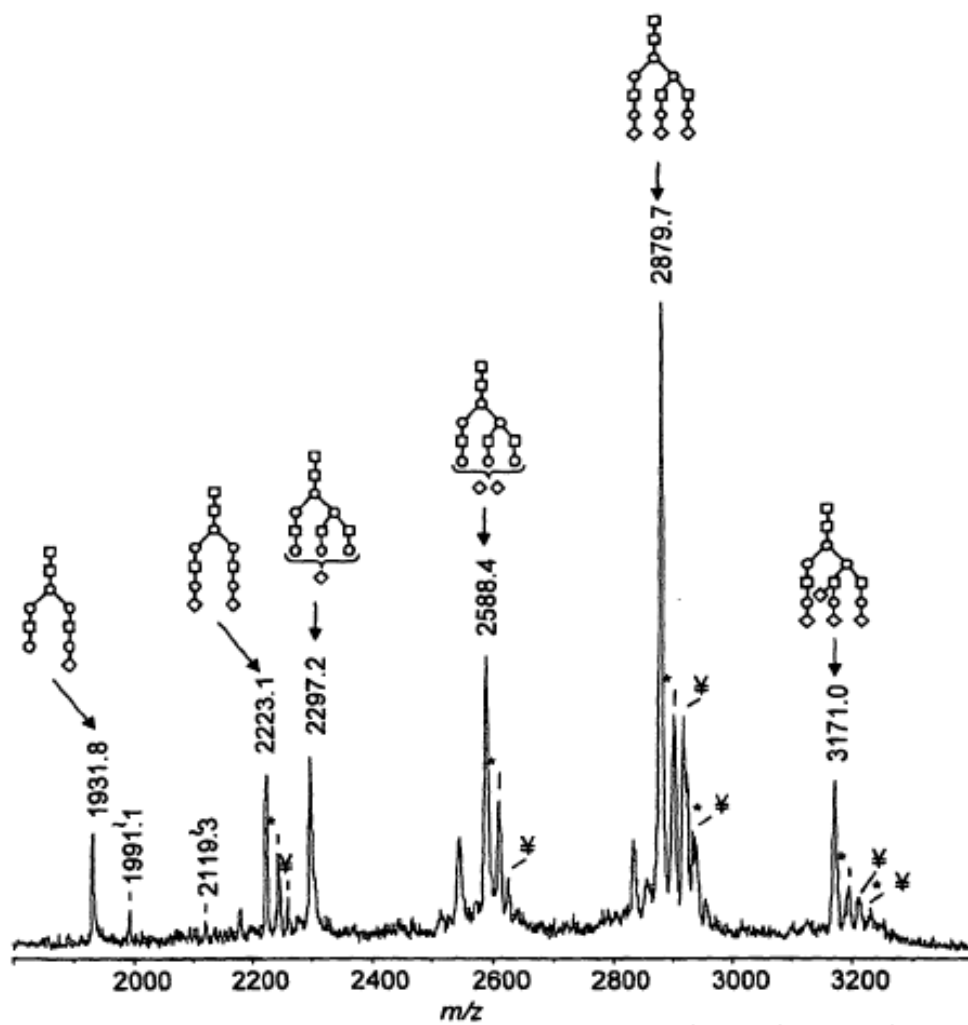


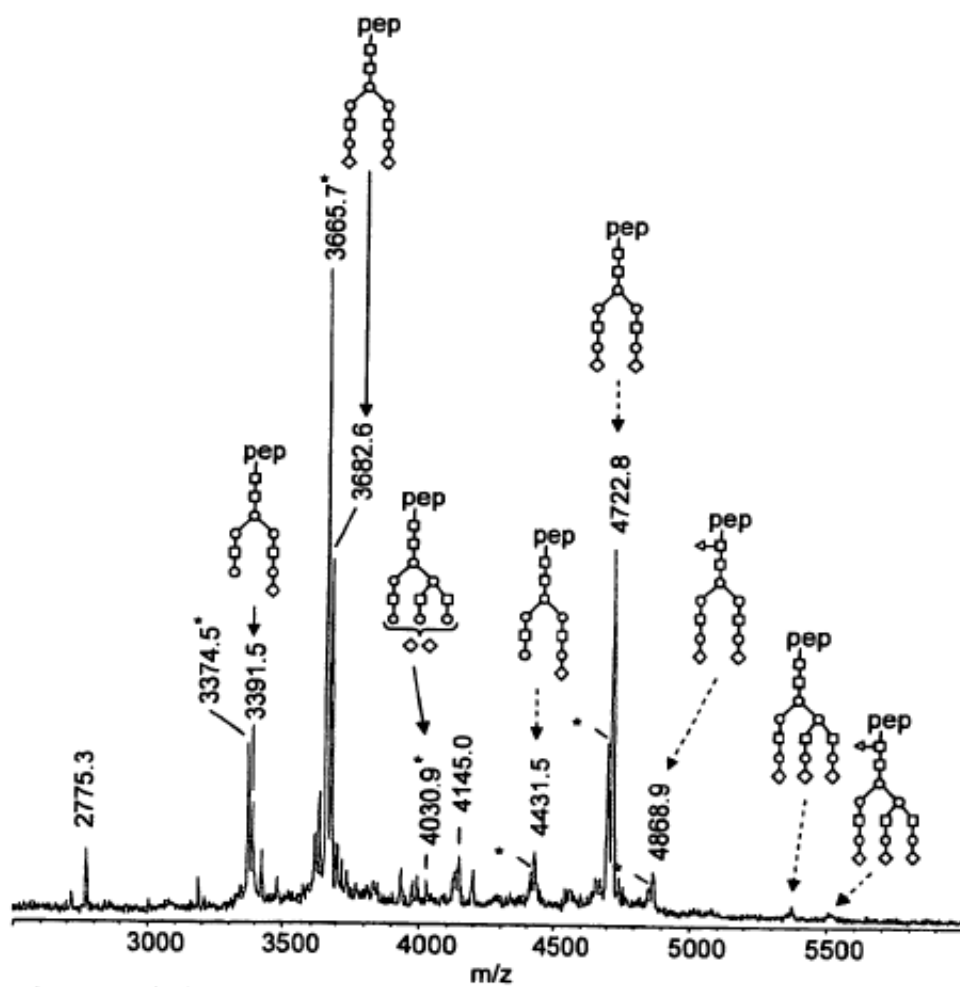
Figura 11A



* aducto de sodio

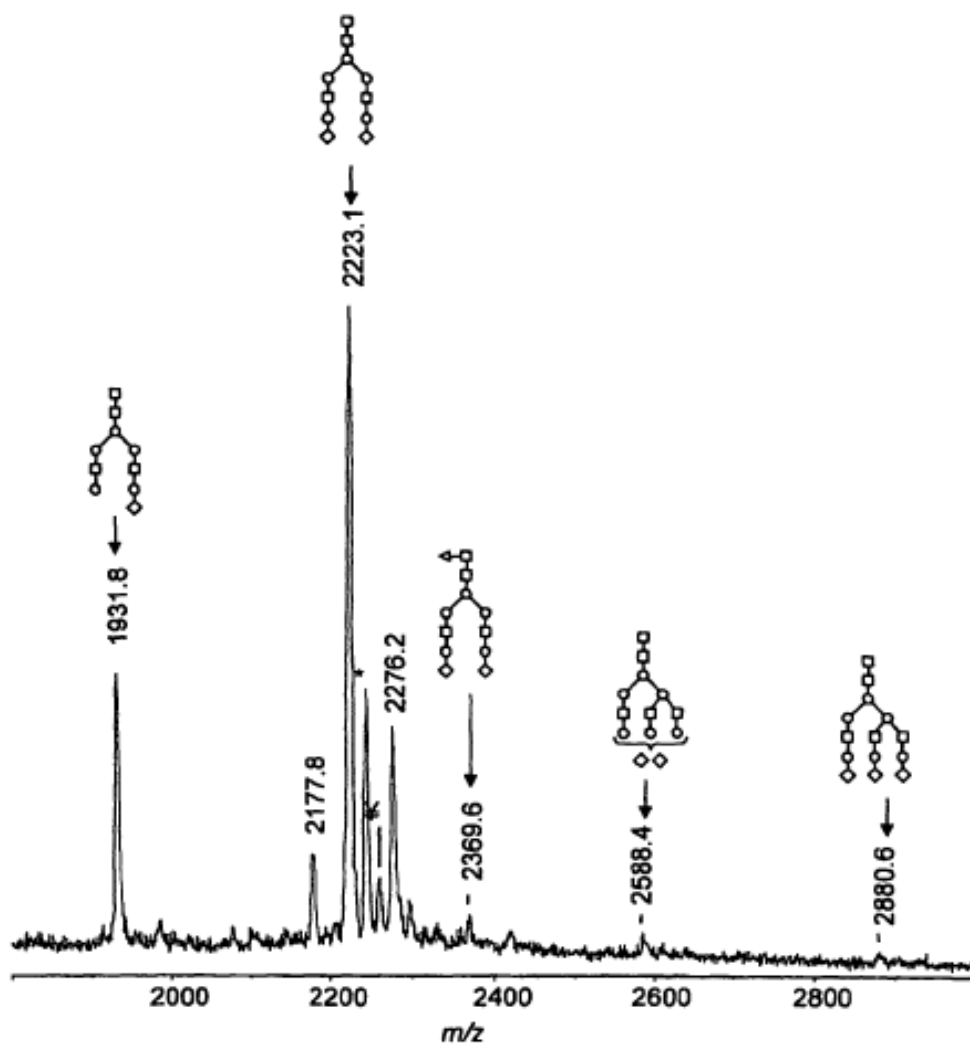
Figura 11B

† aducto de potasio



* pérdida de amoníaco

Figura 12A



* aducto de sodio

Figura 12B

✧ aducto de potasio