

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 353**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2008 E 08007887 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2112506**

54 Título: **Método para la identificación de alta productividad de carbohidratos y de los patrones de composición de mezclas de carbohidratos así como sistemas para el mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2016

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(100.0%)
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE**

72 Inventor/es:

**RAPP, ERDMANN, DR.;
SCHWARZER, JANA;
REICHL, UDO, PROF. DR. y
BOHNE, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 572 353 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 identificación de alta productividad de carbohidratos y de los patrones de composición de mezclas de carbohidratos así como sistemas para el mismo

5 La presente invención se refiere a métodos para la identificación de composiciones de carbohidratos, por ej., de mezclas complejas de carbohidratos, así como para la determinación de patrones de composición de mezclas de carbohidratos (por ej.: de patrones de glicosilación) basados en determinar los índices del tiempo de migración usando electroforesis capilar en gel - fluorescencia inducida por láser e identificar dichos componentes carbohidrato basándose en comparar dichos índices del tiempo de migración con índices estándar del tiempo de migración de una base de datos. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para perfilar el patrón de composición de mezclas de carbohidratos (por ej.: para perfilar el patrón de glicosilación) usando electroforesis capilar en gel - fluorescencia inducida por láser (CGE-LIF) generando electroferogramas de dichas mezclas. En otro aspecto, se describe un sistema para la determinación y/o identificación automática de carbohidratos y/o de patrones de composición de mezclas de carbohidratos, (por ej.: patrones de glicosilación). Finalmente, se menciona un paquete informático para el procesamiento de datos y la visualización de los resultados, que tiene una base de datos integrada que contiene tiempos de migración normalizados de carbohidratos.

Antecedentes de la invención

20 La importancia de la glicosilación en muchos procesos biológicos es comúnmente aceptada y ha sido tratada en detalle en toda la bibliografía durante los últimos 30 años. La glicosilación es una modificación postranslacional común y muy diversa de proteínas en células eucariotas. Se han descrito varios procesos celulares, que implican carbohidratos sobre la superficie de la proteína. En la bibliografía se ha demostrado la importancia de los glicanos en la estabilidad de las proteínas, el plegamiento de las proteínas y la resistencia a las proteasas. Además, en la técnica se ha demostrado el papel de los glicanos en la transmisión de señales celulares, la regulación celular y los procesos de desarrollo celulares.

25 Los oligosacáridos están principalmente unidos a la cadena principal de las proteínas, mediante enlaces N- (vía Asn) u O-glicosídicos (vía Ser-Thr), mientras que la N-glicosilación representa el tipo más común encontrado en glicoproteínas. Variaciones en la ocupación de los sitios de glicosilación (macro-heterogeneidad), así como variaciones en estos residuos complejos de azúcares unidos a un sitio de glicosilación (micro-heterogeneidad) dan lugar a una serie de diferentes glicofomas de proteínas. Estas tienen propiedades físicas y bioquímicas diferentes, lo cual da además lugar a diversidad funcional. En la fabricación de proteínas terapéuticas en cultivos de células de mamíferos se demostró que la macro- y la micro-heterogeneidad afectaban a propiedades como la solubilidad, la estabilidad estructural, la resistencia a las proteasas, o la actividad biológica y clínica de las proteínas, véase por ejemplo Butler, M., Cytotechnology, 2006, 50, 57-76. Por ejemplo, la relevancia del perfil de glicosilación para el perfil terapéutico de anticuerpos monoclonales está bien documentada; véase por ej. Parekh, et al., Nature, 1985, 316,452-457.

35 La biosíntesis de glicanos es un proceso no basado en plantillas, que implica a la maquinaria celular de la glicosilación. Las estructuras de los N-glicanos también dependen de varios factores durante el proceso de producción, como las concentraciones de los sustratos y otras condiciones de cultivo. Por tanto, la fabricación de glicoproteínas no sólo depende de la maquinaria de glicosilación de la célula anfitrión sino también de parámetros externos, como las condiciones de cultivo, y el medio ambiente extracelular. Los parámetros de cultivo que afectan a la glicosilación incluyen la temperatura, el pH, la aireación, el suministro de sustratos o la acumulación de subproductos tales como amoníaco y lactato. En el caso de la fabricación de glicoproteínas o anticuerpos recombinantes, la caracterización de los perfiles de glicosilación atrae un interés creciente. En particular, debido a razones regulatorias, tiene que determinarse el perfil de glicosilación de fármacos.

45 Actualmente, como aditivos de nutrición o en productos farmacéuticos se usan mezclas de carbohidratos complejos solubles pero también mezclas de carbohidratos oligómeros y/o polímeros, obtenidos sintéticamente o a partir de fuentes naturales, como plantas o leche de ser humano o animal. La ocurrencia de ácidos siálicos o derivados de ácidos siálicos y la ocurrencia de monosacáridos que tienen un grupo fosfato, sulfato o carboxilo dentro de los carbohidratos complejos naturales está incluso aumentando su complejidad. Debido a esta complejidad, los oligo o polisacáridos prebióticos, como los galacto-oligosacáridos neutros o ácidos, los fructo-oligosacáridos de cadena larga, los cuales pueden tener efectos nutricionales y/o biológicos, están ganado interés creciente para la industria alimentaria y farmacéutica.

55 Se han establecido una amplia gama de estrategias y técnicas analíticas para analizar glicoproteínas, glicopéptidos y N-glicanos u O-glicanos liberados, que incluyen, por ej., perfilado mediante 2D-HPLC, espectrometría de masas y cromatografía de afinidad por lectinas, como ha sido revisado por Geyer y Geyer, Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 2006, 1764, 1853-1869, y Domann et al., Practical Proteomics, 2007, 2, 70-76.

Para obtener datos estructurales de moléculas complejas, actualmente los carbohidratos se analizan por espectrometría de masas (MS) o espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) que en general son

técnicas laboriosas y que consumen tiempo con respecto a la preparación de muestras y a la interpretación de datos.

5 Cada una de estas técnicas tiene ventajas así como inconvenientes. Escoger una, respectivamente a una serie de estos métodos para un problema dado, puede llegar a ser una tarea intensiva en tiempo y trabajo. Por ejemplo, la RMN proporciona información estructural detallada, pero es un método relativamente insensible (nmol), que no puede usarse como un método de alta productividad. El uso de la MS es más sensible (fmol) que la RMN. Sin embargo, la cuantificación puede ser difícil y solo puede obtenerse información estructural no específica sin redireccionar los enlaces de compuestos tipo azúcares monómeros. Ambas técnicas requieren una preparación extensiva de las muestras y también el fraccionamiento de mezclas complejas de glicanos antes del análisis para permitir la evaluación de los espectros correspondientes. Además, se requiere una plantilla de científicos muy expertos para asegurar que estas dos técnicas pueden llevarse a cabo apropiadamente.

10 Aunque en la técnica anterior se consideraron las técnicas de separación basadas en el principio de la electroforesis capilar, como la electroforesis capilar en gel, para la separación de carbohidratos complejos, por ej. Callewaert, N. et al, *Glycobiology* 2001, 11, 275-281, documento WO 01/92890, Callewaert, N. et al, *Nat Med*, 2004, 429-434, o Khandurina et al., *Electrophoresis* 2004, 25, 3122-3127, aún hay una continua necesidad de un sistema rápido y fiable que permita el análisis automatizado de alta productividad de carbohidratos.

20 Como Domann et al identificaron, la cromatografía en fase normal y la electroforesis capilar en gel tienen una excelente selectividad para el análisis de glicanos fluorescentemente marcados. Se ha informado de graves inconvenientes con respecto al límite de detección y el intervalo dinámico lineal de CGE-LIF en comparación con la cromatografía en fase normal con detección por fluorescencia. Además, con respecto a CGE-LIF, en la técnica no se describe ningún método que permita monitorizar rápidamente las alteraciones en los patrones de composición de mezclas de carbohidratos (por ej. patrones de glicosilación) incluyendo la elucidación estructural rápida y sencilla, sin necesidad de una evaluación compleja de los datos. Además, existe una necesidad en la técnica de facilitar medios y métodos que permitan la determinación e identificación de mezclas de carbohidratos de composición desconocida que permitan la identificación de las estructuras de los carbohidratos. En particular, existe la necesidad de un sistema sensible pero reproducible y robusto y de un método que permita la identificación o determinación de patrones de composición de mezclas de carbohidratos (por ej.: patrones de glicosilación) así como de composiciones de carbohidratos de constitución desconocida en un modo automatizado de alta productividad.

Descripción de los dibujos

30 La figura 1 proporciona un diagrama de trabajo del análisis de carbohidratos según la presente invención (lado derecho) y de la técnica anterior (lado izquierdo).

La figura 2 proporciona una comparación de las huellas digitales de conjuntos de glicanos de la membrana o de la glicoproteína "hemaglutinina" de dos cepas diferentes del virus de la gripe.

35 La figura 3 muestra la estandarización de tiempos de migración respecto a índices de patrones internos (bp = par de bases).

La figura 4 muestra la estandarización de los índices de migración calculados como "índices bp".

La figura 5 muestra un análisis de una composición desconocida de carbohidratos obtenida a partir de glicanos junto con la identificación de los componentes carbohidrato, basados en la coincidencia de los índices bp usando la base de datos según la presente invención.

40 La figura 6 muestra el ajuste polinómico de los picos de patrón interno.

La figura 7 proporciona una superposición de electroferogramas de las muestras de varios experimentos, ajustados unos con otros vía un ajuste polinómico.

Descripción detallada de la presente invención

45 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método que se describe en la reivindicación 1 para la determinación y/o identificación automática de carbohidratos y/o de un perfilado del patrón de composición de mezclas de carbohidratos (por ej.: perfilar el patrón de glicosilación), que comprende las etapas de:

a) Obtener una muestra que contenga al menos un carbohidrato;

b) Marcar dicho(s) carbohidrato(s) con un marcador fluorescente;

c) Proporcionar un patrón o patrones de composición conocida;

50 d) Determinar el o los tiempos de migración de dicho(s) carbohidrato(s) y del patrón o patrones de una composición conocida usando electroforesis capilar en gel - fluorescencia inducida por láser;

e) Normalizar el o los tiempos de migración de la etapa d) a índices basados en el o los índices estándar del tiempo de migración dados del o de los patrones;

f) Comparar el o los índices del tiempo de migración del o de los carbohidratos con el o los índices del tiempo de migración estándar de una base de datos;

5 g) Identificar o determinar el o los carbohidratos y/o los patrones de composición de la mezcla de carbohidratos. La composición patrón se añade a la muestra que contiene la composición desconocida de la mezcla de carbohidratos y el patrón de composición conocida es una escalera de pares de bases estándar.

10 En lo que sigue el término "carbohidrato(s)" se refiere a monosacárido(s), como glucosa, galactosa, manosa, fructosa, fucosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico; disacárido(s), como lactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa; oligosacárido(s), como N-glicanos, O-glicanos, galacto-oligosacáridos, fructo-oligosacáridos; y polisacárido(s), como amilasa, amilopectina, celulosa, glicógeno, glicosaminoglicano, o quitina.

Cuando se usa en la presente memoria, el término "glicoconjugado(s)" quiere decir compuesto(s) que contienen un resto carbohidrato, ejemplos de glicoconjugados son glicoproteínas, glicopéptidos, proteoglicanos, péptidoglicanos, glicolípidos, anclajes-GPI, lipopolisacáridos.

15 Cuando se usa en la presente memoria, la expresión "perfilado del patrón de composición de mezclas de carbohidratos" quiere decir establecer un patrón específico de la composición de mezcla de carbohidratos examinada basado en el número de carbohidratos diferentes presente en la mezcla, la cantidad relativa de dichos carbohidratos presente en la mezcla y el tipo de carbohidrato presente en la mezcla y perfilar dicho patrón, por ej., en un diagrama o en un gráfico, por ej., como un electroferograma. Así, se obtienen huellas digitales ilustradas, por
20 ej., en forma de un electroferograma, un gráfico, o un diagrama. Por ejemplo, perfilar el patrón de glicosilación basado en huellas digitales cae en el alcance de dicha expresión. A este respecto, cuando se usa en la presente memoria, la expresión "huella digital" se refiere a electroferogramas que son específicos de un carbohidrato o mezcla de carbohidratos, un diagrama o un gráfico.

25 La expresión "determinación cuantitativa" o "análisis cuantitativo" se refiere a la cuantificación relativa y/o absoluta de los carbohidratos. La cuantificación relativa puede hacerse de manera sencilla vía las alturas de los picos individuales de cada compuesto que son lineales (dentro de un intervalo dinámico lineal del detector LIF) con su concentración. La cuantificación relativa perfila la relación de cada compuesto carbohidrato a otro u otros compuestos carbohidratos presentes en la composición o el patrón. Además, es posible un análisis absoluto (semi-)cuantitativo.

30 Los presentes inventores encontraron que el uso de la electroforesis capilar en gel con fluorescencia inducida por láser (CGE-LIF) permite un rápido pero robusto y fiable análisis e identificación de carbohidratos y/o patrones de composición de mezclas de carbohidratos (por ej.: patrones de glicosilación de glicoproteínas). Los métodos según la presente invención usados en el contexto del análisis de glicoproteínas permiten visualizar las composiciones de mezclas de carbohidratos (por ej.: conjuntos de glicanos de glicoproteínas) incluyendo el análisis estructural de los
35 carbohidratos mientras evitan el uso de equipos caros y complejos, como espectrómetros de masas o instrumentos de RMN. Debido a su superior eficacia y eficiencia de separación en comparación con otras técnicas de separación, las técnicas de electroforesis capilar, en particular la electroforesis capilar en gel, se consideraron antes para la separación de carbohidrato complejos pero dichas técnicas no fueron recomendadas en la técnica debido a inconvenientes que pretendidamente deberían aparecer cuando se usara dicho método, véase, por ej., Domann et al., o el documento W02006/114663. Sin embargo, cuando se aplica el método según la presente invención, la técnica de CGE-LIF permite una determinación e identificación sensible y fiable de estructuras de carbohidratos. En particular, el uso de un secuenciador capilar de DNA (por ej., 4-Secuenciadores capilares: 3100-Avant Genetic Analyzer y 3130 Genetic Analyzer; 16-Secuenciadores capilares: 3100 Genetic Analyzer y 3130xl Genetic Analyzer; 48-Secuenciadores capilares: 3730 DNA Analyzer; 96-Secuenciadores capilares: 3730xl DNA Analyzer de Applied
40 Biosystems) permite la realización del método según la presente invención. El método avanzado de la invención permite la caracterización de variaciones en mezclas complejas compuestas de carbohidratos naturales o sintéticos y la caracterización de patrones de composición de mezclas de carbohidratos (por ej.: patrones de glicosilación de proteínas), directamente mediante alineamiento de "huellas digitales" de carbohidratos en el caso de comparar muestras con composiciones conocidas de mezclas de carbohidratos.

50 El método según la presente invención es un método de análisis relativamente simple y robusto pero no obstante muy sensible y reproducible con alto rendimiento en la separación.

Especialmente, la combinación de los instrumentos anteriormente mencionados con hasta 96 capilares en paralelo y la herramienta programa informático/base de datos incluida dentro de la invención permite un análisis automatizado de alta productividad.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método según la reivindicación 2 para un perfilado automatizado del patrón de composición de mezclas de carbohidratos, que comprende las etapas de:

a) Proporcionar una muestra que contiene una composición de una mezcla de carbohidratos;

- b) Marcar dicha composición de una mezcla de carbohidratos con un marcador fluorescente;
- c) Proporcionar una segunda muestra que tiene un patrón de composición conocido de la mezcla de carbohidratos para comparar con el mismo;
- d) Generar electroferogramas (huellas digitales) de las composiciones de las mezclas de carbohidratos de la primera y de la segunda muestra usando electroforesis capilar en gel - fluorescencia inducida por láser;
- e) Comparar los índices estándar de los tiempos de migración calculados a partir de los electroferogramas obtenidos de la primera y de la segunda muestra;
- f) Analizar la identidad y/o diferencias entre los electroferogramas (huellas digitales) de la primera y de la segunda muestra. Los índices estándar del tiempo de migración de los carbohidratos presentes en la muestra se calculan sobre la base de patrones internos de composición conocida. El patrón de composición conocida es una escalera patrón de pares de bases que se añade a las muestras a analizar.

Como se muestra en la figura 1 que esboza un diagrama de trabajo del análisis de carbohidratos, después de procesar las muestras, se generan electroferogramas - "huellas digitales" - y, según el método de la presente invención, es posible la investigación e identificación estructural simple y sencilla de los carbohidratos de una muestra de ensayo (por ej., un conjunto de glicanos de glicoproteínas) vía la coincidencia automática de sus tiempos CGE de migración normalizados (índices del tiempo de migración) con los tiempos de migración CGE normalizados de carbohidratos con estructuras conocidas derivadas de una base de datos. La base de datos que es un elemento de la presente invención, también denominada como la "biblioteca de huellas digitales", contiene información estructural de carbohidratos conocidos que tienen asignados índices del tiempo de migración normalizados específicos, es decir tiempos de migración CGE. Esta base de datos permite la identificación estructural automatizada, rápida y sencilla de carbohidratos de glicoproteínas naturales y recombinantes después del procesado, o de cualquier otra muestra que contenga mono-, oligo-, o polisacáridos mediante simple asignación de los picos de las huellas digitales a carbohidratos con estructuras conocidas. Esto puede hacerse vía la coincidencia completamente automatizada del tiempo de migración de las muestras de ensayo con los tiempos de migración normalizados (índices del tiempo de migración) de carbohidratos de la base de datos correspondiente en un modo de alta productividad usando un sistema CGE-LIF con, por ej., hasta 96 capilares o más en paralelo.

En una realización preferida, la muestra de ensayo contiene una mezcla de carbohidratos. Preferiblemente, dichos carbohidratos a identificar o determinar son oligosacáridos. Por ejemplo, dichos oligosacáridos/glicanos son obtenidos a partir del procesado de glicoproteínas, como, por ej., se muestra en la figura 1. Esto es, la muestra representa una extracción de glicanos y el método según la presente invención permite la identificación de un perfil del patrón de glicosilación.

La invención se basa en la separación y detección de dicha mezcla de carbohidratos (por ej.: conjuntos de glicanos) utilizando la técnica CGE-LIF, por ej., usando un secuenciador capilar de DNA el cual permite la generación de huellas digitales del patrón de composición de carbohidratos, el análisis estructural automático de los carbohidratos separados vía la coincidencia del tiempo de migración CGE normalizado de la base de datos de cada compuesto de la mezcla de la muestra de ensayo. El método reivindicado en la presente memoria permite perfilar la composición de una mezcla de carbohidratos de fuentes sintéticas y naturales, como perfilar el patrón de glicosilación de glicoproteínas. La normalización de los tiempos de migración de los carbohidratos respecto a los índices del tiempo de migración está basada en el uso de un patrón de composición conocida. En particular, dicho patrón de composición conocida es una escalera patrón de pares de bases, convencionalmente usada en un secuenciador de DNA. El uso de dicha escalera patrón de pares de bases permite normalizar cada experimento del secuenciador de DNA. Por tanto, se obtiene un índice bp individual para cada una de las moléculas de carbohidrato.

El uso de dicho método en combinación con el sistema también permite analizar cuantitativamente las composiciones de mezclas de carbohidratos. Por tanto, el método según la presente invención así como el sistema representa una poderosa herramienta para monitorizar las variaciones de la composición de una mezcla de carbohidratos como el patrón de glicosilación de proteínas sin que se requiera investigaciones estructurales complejas. Para carbohidratos marcados fluorescentemente, la detección LIF permite un límite de detección inferior al intervalo attomolar.

El patrón necesario para la normalización de cada experimento puede estar contenido en la muestra de carbohidratos a analizar.

La marca fluorescente usada para marcar los carbohidratos puede ser, por ej., las marcas fluorescentes ácido 8-amino-1,3,6-pirenotrisulfónico también denominado ácido 9-aminopireno-1,4,6-trisulfónico (APTS), ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico (ANTS) u otros colorantes fluorescentes preferiblemente con múltiples cargas.

Basándose en la presencia del patrón puede efectuarse un análisis cualitativo y cuantitativo. La cuantificación relativa puede hacerse fácilmente justo vía las alturas de los picos individuales de cada compuesto, las cuales se corresponden linealmente (dentro del intervalo dinámico lineal del detector LIF) con su concentración.

- La presente invención resuelve los inconvenientes de otros métodos conocidos en el análisis de carbohidratos, como la cromatografía, la espectrometría de masas y la RMN. La RMN y la espectrometría de masas representan métodos que son tecnologías que consumen tiempo y mano de obra. Además, se requieren instrumentos caros para realizar dichos métodos. Además, la mayoría de dichos métodos no son susceptibles de ser escalados hasta métodos de alta productividad, como las técnicas de RMN. El uso de la espectrometría de masas permite una alta sensibilidad. Sin embargo, la configuración puede ser difícil y solo podría obtenerse información estructural no específica con vínculos de direccionamiento de compuestos tipo azúcares monómeros. La HPLC es también bastante sensible dependiendo del detector y también permite la cuantificación. Pero como se mencionó anteriormente, análisis reales de alta productividad sólo son posibles con el empleo masivo y caro de sistemas de HPLC y disolventes.
- 5
- Otras técnicas conocidas en la técnica están basadas en el tratamiento enzimático el cual puede ser muy sensible y da lugar a una información estructural detallada, pero requiere una combinación con otros métodos como HPLC, MS y RMN. Otras técnicas conocidas en la técnica se refieren a la afinidad por lectinas o anticuerpos monoclonales que sólo proporciona datos preliminares sin dar una información estructural definitiva.
- 10
- Los métodos según la presente invención permiten la identificación de alta productividad de mezclas de carbohidratos que tienen una composición desconocida o la identificación de alta productividad o el perfilado de patrones de composición de mezclas de carbohidratos (por ej.: patrones de glicosilación de glicoproteínas). En particular, la presente invención permite determinar cuantitativamente los componentes de la composición de una mezcla de carbohidratos.
- 15
- El método de la presente invención permite la medida rápida y fiable incluso de composiciones de mezclas complejas, y por lo tanto permite determinar y/o identificar los carbohidratos y/o los patrones de composición de mezclas de carbohidratos (por ej.: patrón de glicosilación) independientemente de los aparatos usados pero solamente se refiere a los tiempos de migración normalizados (índices del tiempo de migración).
- 20
- La invención permite la aplicación en campos diversos. Por ejemplo, el método puede usarse para analizar la glicosilación de moléculas derivadas de cultivos de células de mamíferos, por ej., proteínas recombinantes, anticuerpos o virus o componentes de virus, por ej., glicoproteínas del virus de la gripe A. La información sobre patrones de glicosilación de dichos compuestos es de particular importancia para productos alimentarios y farmacéuticos. Comenzando con la separación de mezclas complejas de proteínas por electroforesis-gel-1D/2D, el método de la presente invención podría también usarse para el análisis de glicanos de cualquier otro glicoconjugado. Por otra parte, las glicoproteínas pre-purificadas, por ej., por cromatografía o captura por afinidad, pueden manipularse también por el método según la presente invención, sustituyendo la separación en gel y la etapa de desglicosilación en gel por una desglicosilación en disolución, continuando después con la precipitación de proteínas y enzimas. Finalmente, pueden analizarse mezclas complejas solubles de sacáridos oligómeros y/o polímeros, obtenidos sintéticamente o de fuentes naturales los cuales son actualmente importantes aditivos/sustitutos en nutrición o que se usan en o como productos farmacéuticos.
- 25
- 30
- Por tanto, pueden realizarse dos tipos de análisis a la mezcla de carbohidratos. Por una parte, puede realizarse el perfilado del patrón de composición de mezclas de carbohidratos, como perfilar el patrón de glicosilación, y, por otra parte, es posible la identificación de carbohidratos basándose en la coincidencia de los índices del tiempo de migración de carbohidratos con datos de una base de datos.
- 35
- Por lo tanto, el método según la presente invención tiene una amplia gama de aplicaciones potenciales que varía desde el control de la producción y/o de calidad al diagnóstico temprano de enfermedades que se producen o son provocadas por cambios en los patrones de glicosilación de glicoproteínas.
- 40
- En particular, el método puede aplicarse en el diagnóstico médico, por ej., el reconocimiento de la inflamación crónica o el diagnóstico temprano del cáncer, donde los cambios en los patrones de glicosilación de proteínas son fuertes indicadores de la enfermedad. Las variaciones en el patrón de glicosilación podrían identificarse simplemente comparando las huellas digitales obtenidas respecto al número de picos, las alturas de los picos y los tiempos de migración. Por tanto, pueden identificarse los marcadores de la enfermedad, como está descrito en enfoques proteómicos similares. Es similar a comparar los proteomas de un individuo en momentos consecutivos, podría analizarse el glicoma de individuos como indicador de una enfermedad o para la identificación de pacientes con riesgo.
- 45
- Además, el método permite la diferenciación de compuestos recombinantes vis-a-vis con compuestos naturales. Por ejemplo, dicho método puede usarse en ensayos de dopaje. Los sistemas para determinar y/o identificar patrones de composición de mezclas de carbohidratos, como perfilar el patrón de glicosilación, comprenden un aparato de electroforesis capilar en gel-fluorescencia inducida por láser; una unidad de procesamiento de datos que comprende una memoria que contiene una base de datos; y una unidad de salida.
- 50
- Preferiblemente, el aparato de electroforesis capilar en gel-fluorescencia inducida por láser es un secuenciador capilar de DNA. La base de datos contiene los tiempos de migración normalizados (índices del tiempo de migración dados, por ej. como índices de pares de bases). En la unidad de procesamiento de datos se extraen los datos primarios del aparato CGE-LIF, como el secuenciador capilar de DNA (rastros de muestras y rastro de la escalera de patrones
- 55

internos), por ej., se extraen en un formato ASCII y se archivan en variables. Se identifican los picos dentro del electroferograma del patrón interno de cada muestra. Para una comparación directa de los diferentes experimentos, los picos del patrón interno de los diferentes experimentos se ajustan unos con otros vía un ajuste polinómico, véase también la figura 6. Los electroferogramas de las muestras se normalizan a la escala de tiempo ajustada de sus patrones internos, cada uno con su ajuste polinómico individual previamente determinado y, por lo tanto, pueden compararse directamente vía una simple superposición, véase también la figura 7, que muestra una superposición de electroferogramas de muestras de varios experimentos ajustados unos con otros vía un ajuste polinómico.

Esto quiere decir que cada electroferograma medido de una muestra, que siempre se ejecuta junto con el patrón interno, la escalera patrón interno de pares de bases, se traslada/formatea mediante un algoritmo desde el tiempo de migración al índice de patrón interno y por lo tanto se normaliza e indexa. Los datos procesados y normalizados permiten la comparación directa de diferentes experimentos y permiten la identificación o exclusión de estructuras de carbohidratos mediante simple coincidencia del índice del tiempo de migración de los picos de carbohidratos de la muestra con los ya depositados dentro de la base de datos. La invención permite el análisis cualitativo y cuantitativo y la comparación directa de muestras de carbohidratos de ensayo, independientemente del operador, instrumento o laboratorio.

Por tanto, se describe una base de datos que contiene tiempos de migración normalizados (índices) de carbohidratos, dichos índices del tiempo de migración están basados en la medida por CGE-LIF y se obtienen:

- a) Analizando estructuras conocidas de carbohidratos en una muestra junto con un patrón interno al mismo tiempo con un medio de electroforesis capilar en gel – fluorescencia inducida por láser;
- b) Determinado el tiempo de migración de dicho o dichos compuestos tipo carbohidratos y el patrón;
- c) Normalizando los tiempos de migración de la etapa b) sobre la base del o de los tiempos de migración estándar del patrón interno;
- d) Asignando los tiempos de migración normalizados de los compuestos tipo carbohidrato a índices estándar del tiempo de migración.

La base de datos desarrollada internamente está integrada en, por ej., una herramienta informática desarrollada internamente y puede ser instalada por el propio usuario. Dicha base de datos puede ser proporcionada como una herramienta externa o desde un servidor central.

La base de datos/biblioteca de estructuras con los tiempos de migración CGE normalizados asignados, por ej., índices de pares de bases, se genera midiendo carbohidratos individuales de estructura conocida. La base de datos/biblioteca general en la que se depositan las estructuras de carbohidratos conocidos junto con sus índices del tiempo de migración, permiten la casación de la muestra y la base de datos independiente del sistema de los patrones (huellas digitales) de composición de la mezcla de carbohidratos como conjuntos de glicanos a partir de las muestras de ensayo.

Los datos del CGE-LIF se extraen en forma legible por un ordenador y se archivan en variables. Los picos dentro del electroferograma del patrón interno de cada muestra se identifican y anotan. Las escalas de tiempo de los electroferogramas de las muestras se normalizan y transfieren desde el tiempo al dominio del patrón interno, por ej., la anotación de los pares de bases, cada una con su correspondiente rastro al patrón interno, cada una con su ajuste polinómico individual previamente determinado, y, por lo tanto, los picos de los compuestos se normalizan.

Los datos de la base de datos de patrones de carbohidratos de conocidas estructuras permiten identificar compuestos desconocidos con idénticos tiempos de migración normalizados, justo vía la coincidencia de sus índices del tiempo de migración con los de la biblioteca.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación y/o identificación automatizada de carbohidratos y/o perfilar el patrón de composición de mezclas de carbohidratos, que comprende las etapas de:
 - a) Obtener una muestra que contenga al menos un carbohidrato;
 - 5 b) Marcar dicho(s) carbohidrato(s) con una marca fluorescente;
 - c) Proporcionar un patrón de composición conocida;
 - d) Determinar el o los tiempos de migración de dicho(s) carbohidrato(s) y del patrón de una composición conocida usando electroforesis capilar en gel – fluorescencia inducida por láser;
 - 10 e) Normalizar el o los tiempos de migración al índice o índices del tiempo de migración basados en el o los índices del tiempo de migración estándar dado(s) del patrón;
 - f) Comparar este o estos índices del tiempo de migración del o de los carbohidratos con el o los índices estándar del tiempo de migración de una base de datos;
 - g) Identificar o determinar los carbohidratos y/o los patrones de composición de la mezcla de carbohidratos.

15 donde la composición estándar se añade a la muestra que contiene la composición desconocida de la mezcla de carbohidratos y donde el patrón de composición conocida es una escalera patrón de pares de bases.
2. Un método para el perfilado automatizado del patrón de composición de mezclas de carbohidratos, que comprende las etapas de
 - 20 a) Proporcionar una muestra que contiene una composición de una mezcla de carbohidratos;
 - b) Marcar dicha composición de una mezcla de carbohidratos con un marcador fluorescente;
 - c) Proporcionar una segunda muestra que tiene un patrón conocido de composición de una mezcla de carbohidratos para comparar con el mismo;
 - 25 d) Generar electroferogramas de la composición de una mezcla de carbohidratos de la primera y de la segunda muestra usando electroforesis capilar en gel-fluorescencia inducida por láser;
 - e) Comparar los índices estándar de los tiempos de migración calculados a partir de los electroferogramas obtenidos de la primera y de la segunda muestra;
 - 30 f) Analizar la identidad y/o diferencias entre los perfiles de los patrones de composición de las mezclas de carbohidratos de la primera y de la segunda muestra.

30 donde los índices estándar del tiempo de migración de los carbohidratos presentes en la muestra se calculan basados en patrones internos de composición conocida, donde el patrón de composición conocida es una escalera patrón de pares de bases y donde el patrón se añade a las muestras a analizar.
3. El método según la reivindicación 1 ó 2, donde la muestra contiene una mezcla de carbohidratos.
- 35 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la muestra es una extracción de glicanos y el método permite la identificación de un perfil del patrón de glicosilación.
5. El método según la reivindicación 4, donde se identifica el patrón de glicosilación de una glicoproteína.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el marcador fluorescente es ácido 8-amino-1,3,6-pirenotrisulfónico.
- 40 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el método permite la identificación de alta productividad de mezclas de carbohidratos que tienen composiciones desconocidas.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los componentes de la mezcla de carbohidratos se determinan cuantitativamente.

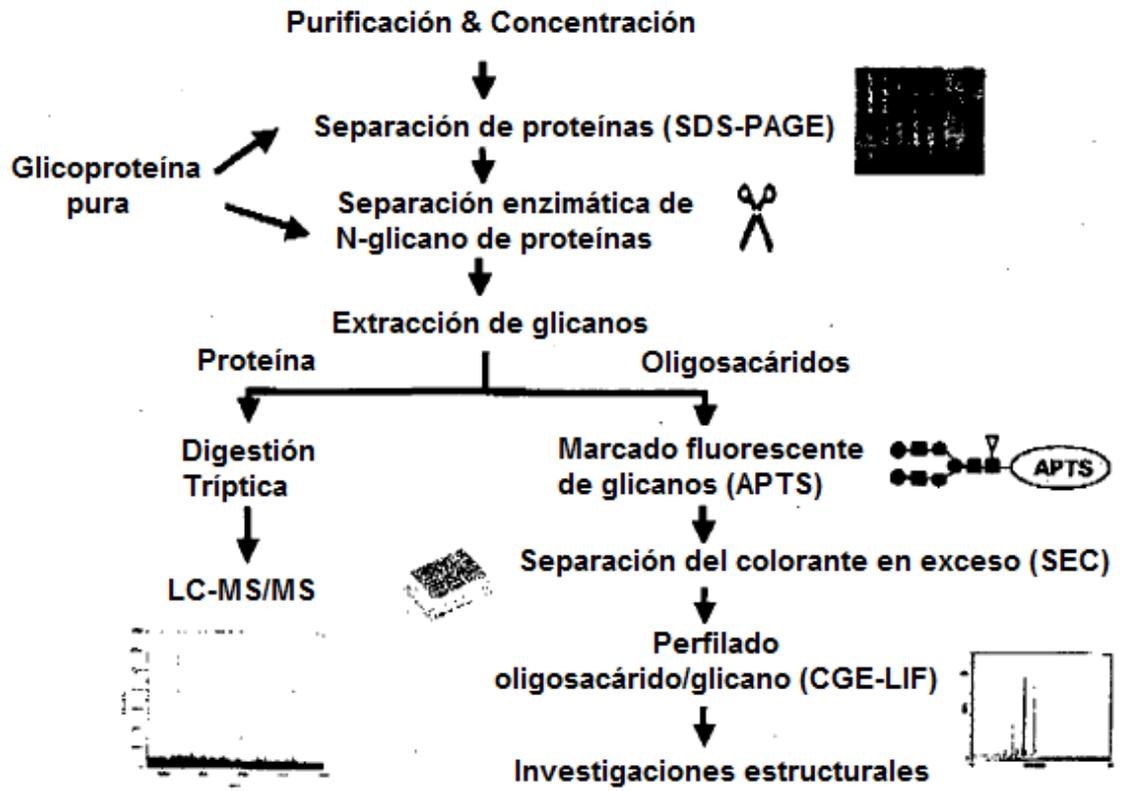


Figura 1

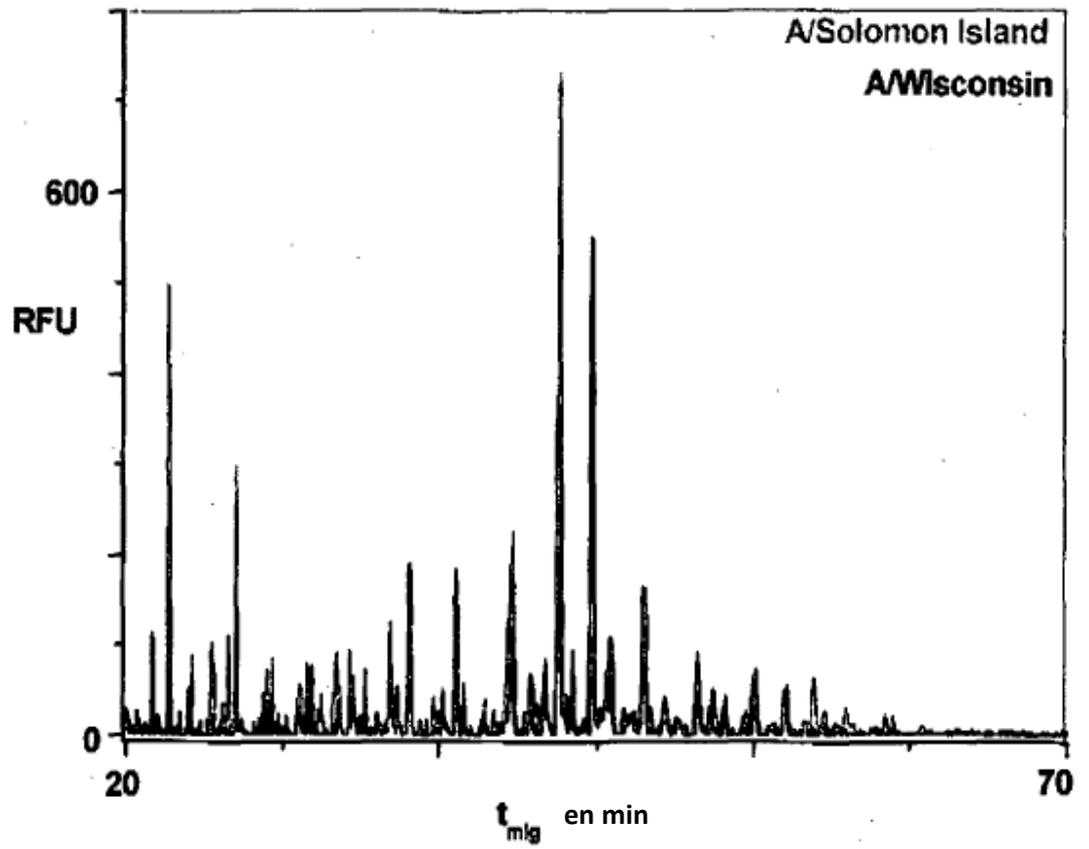
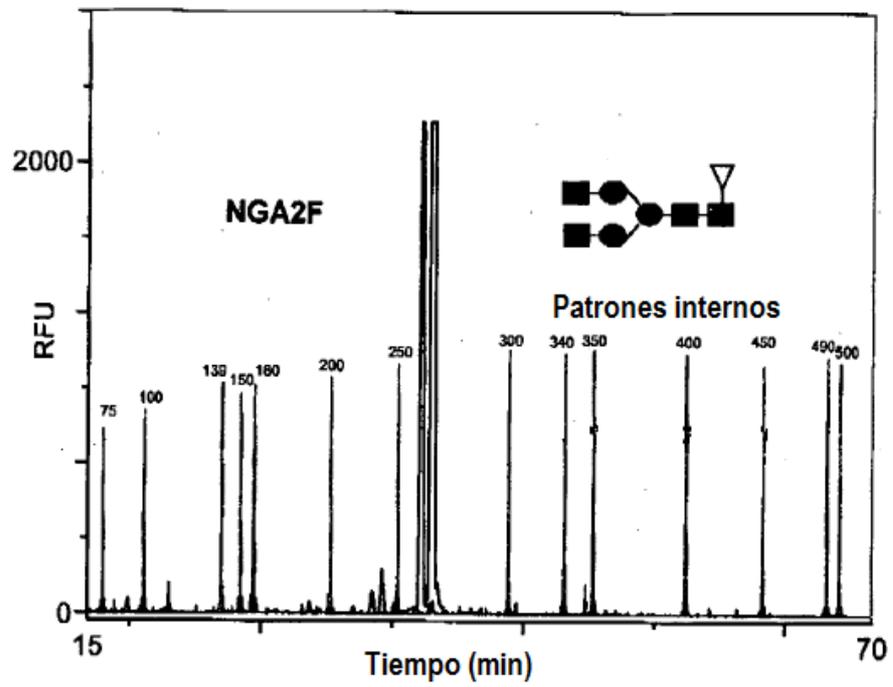


Figura 2



Tamaño de fragmento patrón en pares de bases (bp)	Tiempo de migración en puntos de datos (DP)
50	5292
75	6103
100	6641
139	7652
150	7892
160	8066
200	9054
250	9914
300	11345
340	12066
350	12427
400	13594
450	14532
490	15284
500	15432

Figura 3

t_{mig} IgG N-glicanos (DP)	t_{mig} IgG N-glicanos (bp)
5767	59
8352	174
8429	177,5
8927	200
9203	212
9248	214
9584	229
9705	234,5
9827	240
9869	241,8
9880	242,3
10359	264
10573	273

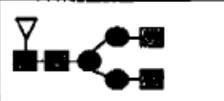
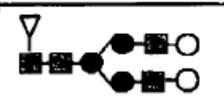
Patrón N-	t_{mia} (bp)
	200
	264

Figura 4

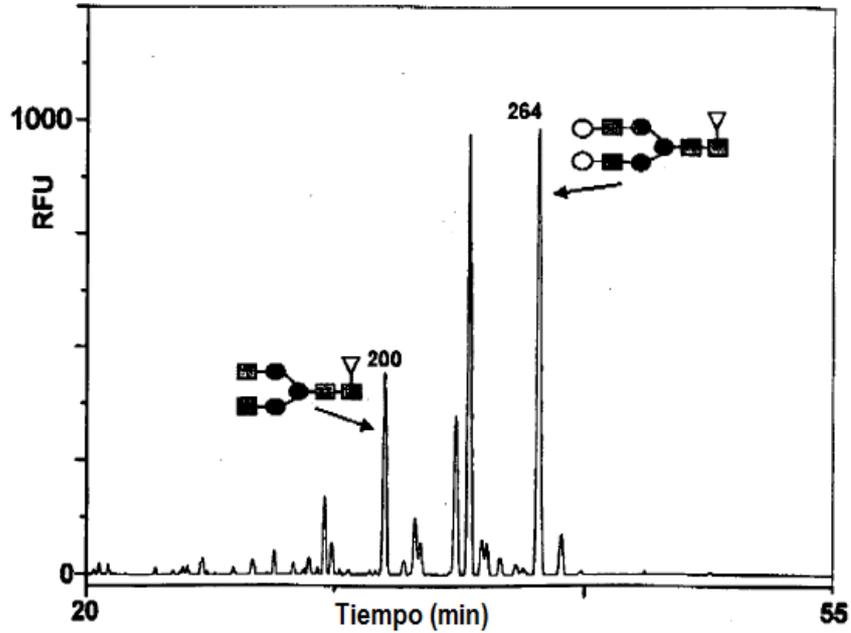


Figura 5

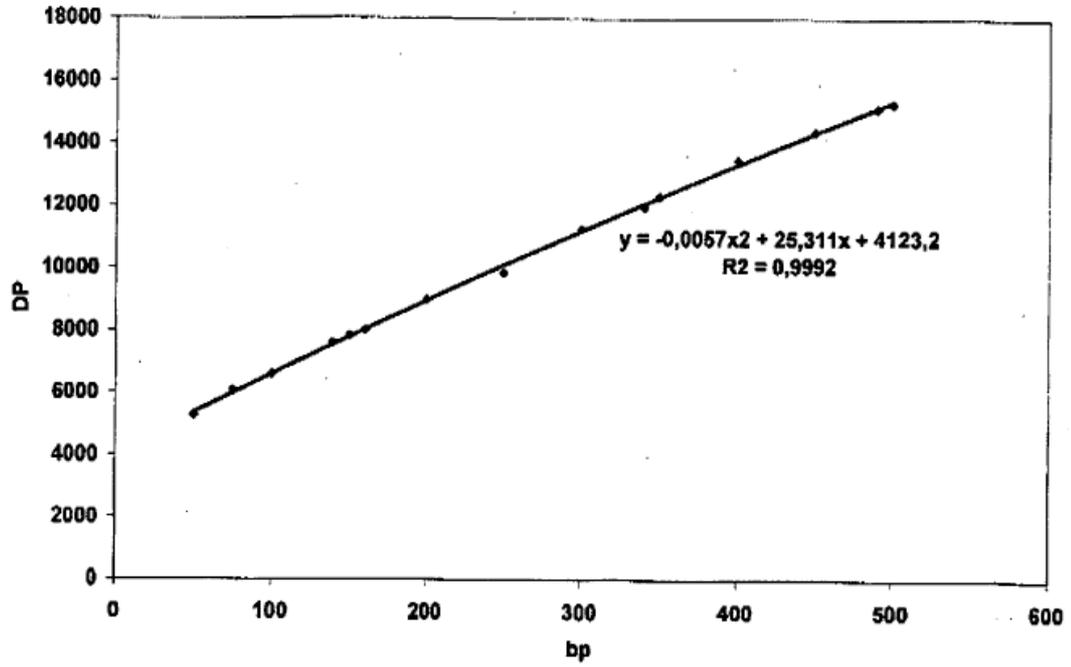


Figura 6

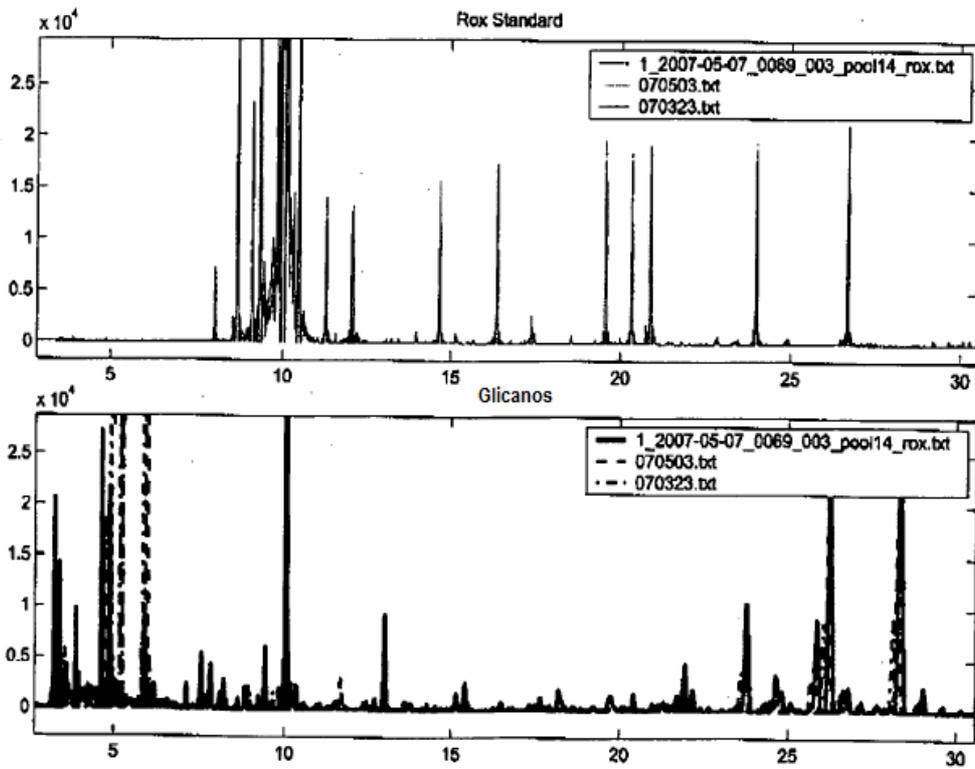


Figura 7