

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 080**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2008 PCT/US2008/060343**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008 WO08130926**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2008 E 08745865 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2135094**

54 Título: **Caracterización de N-glicanos utilizando exoglicosidasas**

30 Prioridad:

**16.04.2007 US 923688 P**

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

**21.07.2017**

73 Titular/es:

**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
675 West Kendall Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**PARSONS, IAN, CHRISTOPHER;  
BULIK, DOROTA, A.;  
BOSQUES, CARLOS, J.;  
THIRUNEELAKANTAPILLAI, LAKSHMANAN y  
COLLINS, BRIAN, EDWARD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 626 080 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

Caracterización de *N*-glicanos utilizando exoglicosidasas.

Antecedentes

5 El patrón de glicosilación de una glicoproteína a menudo tiene un rol importante en la función de dicha glicoproteína. Por mencionar solo algunos ejemplos, un patrón de glicosilación de una glicoproteína puede afectar su capacidad para plegarse de forma correcta, su estabilidad (por ejemplo, resistencia a la degradación proteolítica y/o de otro tipo), actividad catalítica, las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas, y/o la capacidad de dicha glicoproteína para interactuar de forma adecuada con otras moléculas. Alternativa o adicionalmente, un patrón de glicosilación de una glicoproteína puede afectar el transporte y la orientación de la glicoproteína. Por ejemplo, un patrón de glicosilación de glicoproteína puede determinar si la glicoproteína permanecerá intracelular (incluida, por ejemplo, la correcta orientación de la glicoproteína hacia el compartimento o compartimentos subcelulares adecuados), si la glicoproteína se unirá a la membrana y/o si la glicoproteína se secretará desde la célula.

15 Los métodos actuales, a menudo, no son capaces de detectar especies de glicanos que están presentes a niveles bajos dentro de una población de glicanos. Las principales especies de glicanos pueden evitar la detección e identificación de especies de glicanos que están presentes a niveles bajos. Además, los métodos actuales, generalmente, no pueden cuantificar de forma precisa los niveles relativos de especies de glicanos individuales dentro de una población de glicanos. Los métodos actuales pueden no ser capaces de detectar ligaduras no típicas dentro de una población de glicanos. Por consiguiente, se necesitan métodos para detectar especies de glicanos que están presentes a niveles bajos dentro de una población de glicanos. Se necesitan métodos para cuantificar los niveles relativos de especies de glicanos individuales dentro de una población de glicanos. Sutton *et al.* (Analytical Biochemistry 218, 34-46, 1994) describen la caracterización de glicanos mediante digestión por exoglicosidasa combinada con análisis de espectrometría de masas MALD. La fracción de glicopéptido se dividió en ocho alícuotas y se digirieron con diferentes mezclas de exoglicosidasas, posteriormente, los productos de la digestión se analizaron mediante MALD. 1

25 Compendio

La presente invención proporciona métodos según se definen en las reivindicaciones adjuntas.

30 De forma más general, la presente descripción proporciona métodos para analizar la composición y/o estructura de glicanos ligados por *N*. Los métodos descritos en la presente se pueden utilizar para analizar una preparación de *N*-glicanos (*p. ej.*, una mezcla de *N*-glicanos) y para medir los niveles relativos dentro de la preparación de grupos estructurales específicos y/o modificaciones inusuales (*p. ej.*, fucosa nuclear o antenaria, extensiones de lactosamina, manosa elevada y glicanos híbridos, sulfatación y fosforilación). Los métodos descritos en la presente pueden implicar, en general, las etapas de obtener una preparación de *N*-glicano; digerir los glicanos ligados por *N* con enzimas exoglicosidasas para escindir de forma específica los monosacáridos de los extremos no reductores; y analizar los productos de la escisión. Comparar los resultados de múltiples tratamientos con enzimas exoglicosidasas (*p. ej.*, tratamientos simultáneos y secuenciales diversos) puede proporcionar información sorprendente sobre la estructura de los glicanos, *p. ej.*, puede identificar las especies de glicanos que están presentes a niveles muy bajos en una preparación de *N*-glicanos.

40 Se puede obtener una preparación de glicano mediante cualquier método conocido en la técnica. En general, obtener una preparación de *N*-glicano comprende las etapas de (1) obtener una glicoproteína u otra preparación de glicoconjugado; y (2) obtener una preparación de *N*-glicano a partir de la preparación de glicoconjugado. Una preparación de glicoconjugado (*p. ej.*, glicoproteína) se puede obtener a partir de cualquier fuente que incluye, pero no se limita a, formulaciones terapéuticas, productos biológicos comerciales y muestras biológicas.

45 En algunas realizaciones de la descripción, se obtiene una preparación de *N*-glicano al proporcionar una población de glicoproteínas y extraer los *N*-glicanos de las glicoproteínas de la población de glicoproteínas. En algunas realizaciones, los *N*-glicanos se pueden asociar con una etiqueta detectable (*p. ej.*, un resto fluorescente y/o radioactivo).

50 En algunas realizaciones, las poblaciones de *N*-glicanos se digieren con una o más exoglicosidasas, y se analiza la estructura y/o composición de los productos de la digestión. En algunas realizaciones, las exoglicosidasas utilizadas según la presente descripción reconocen y escinden solo un tipo específico de ligadura glicosídica. En algunas realizaciones, las exoglicosidasas utilizadas según la presente descripción reconocen y escinden solo un tipo específico de ligadura glicosídica. Las exoglicosidasas de ejemplo que se pueden utilizar según la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa, fucosidasa y manosidasa.

55 Según la presente descripción, se puede digerir una población de *N*-glicanos con cualquier exoglicosidasa. En determinadas realizaciones, los *N*-glicanos se digieren al someter a la población de *N*-glicanos a una pluralidad de exoglicosidasas. Por ejemplo, la población de *N*-glicanos puede someterse a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más

exoglicosidasas. En algunas realizaciones, se administran múltiples exoglicosidasas de forma simultánea. En algunas realizaciones, se administran múltiples exoglicosidasas de forma secuencial. En algunas realizaciones, variar la identidad de las exoglicosidasas que se administran revela información sobre la estructura y/o composición de los *N*-glicanos. En algunas realizaciones, variar la secuencia en la que se administran múltiples exoglicosidasas revela información sobre la estructura y/o composición de los *N*-glicanos.

En algunas realizaciones, la digestión secuencial con múltiples exoglicosidasas revela información sobre la estructura y/o composición de los *N*-glicanos que es diferente de la información revelada mediante la digestión simultánea con el mismo conjunto de exoglicosidasas. En algunas realizaciones, la digestión secuencial con múltiples exoglicosidasas revela información sobre la estructura y/o composición de los *N*-glicanos que es la misma información revelada mediante la digestión simultánea con el mismo conjunto de exoglicosidasas.

En algunas realizaciones, tras llevar a cabo el tratamiento con exoglicosidasa hasta completarlo, se analiza la estructura y/o identidad de los glicanos escindidos. En algunas realizaciones, se puede extraer al menos una muestra de la preparación de glicano durante el transcurso del tratamiento con exoglicosidasa (p. ej., en cualquier punto de tiempo antes de completar el tratamiento con exoglicosidasa). En algunas realizaciones, las estructuras y/o identidades de los glicanos escindidos se analizan en al menos una de las muestras extraídas. En algunas realizaciones, la etapa de analizar comprende comparar la estructura y/o función de glicanos escindidos en una o más de las muestras extraídas con la estructura y/o función de glicanos escindidos en al menos una muestra extraída distinta. En algunas realizaciones, la etapa de analizar comprende comparar la estructura y/o función de los glicanos escindidos en una o más de las muestras extraídas con la estructura y/o función de glicanos escindidos en una muestra de referencia.

La estructura y composición de los *N*-glicanos digeridos se puede analizar mediante cualquier método disponible (p. ej., métodos cromatográficos, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, electroforesis capilar, etc.). En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente permiten la detección de especies de *N*-glicanos que están presentes a niveles bajos dentro de una población de *N*-glicanos. Por ejemplo, según la presente descripción, los métodos descritos en la presente permiten la detección de especies de *N*-glicanos que están presentes a niveles menores que 10 %, menores que 5 %, menores que 4 %, menores que 3 %, menores que 2 %, menores que 1,5 %, menores que 1 %, menores que 0,75 %, menores que 0,5 %, menores que 0,25 % o menores que 0,1 % dentro de una población de *N*-glicanos.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente permiten la detección de ligaduras específicas que están presentes a niveles bajos dentro de una población de *N*-glicanos. Por ejemplo, según la presente descripción, los métodos descritos en la presente permiten la detección de especies de ligaduras específicas que están presentes a niveles menores que 10 %, menores que 5 %, menores que 4 %, menores que 3 %, menores que 2 %, menores que 1,5 %, menores que 1 %, menores que 0,75 %, menores que 0,5 %, menores que 0,25 %, menores que 0,1 %, menores que 0,075 %, menores que 0,05 %, menores que 0,025 % o menores que 0,01 % dentro de una población de *N*-glicanos.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente permiten la detección de niveles relativos de especies de *N*-glicanos individuales dentro de una población de *N*-glicanos. Por ejemplo, se puede medir el área debajo de cada pico de un cromatógrafo de líquidos y expresar como un porcentaje del total. Dicho análisis proporciona una cantidad porcentual relativa de cada especie de *N*-glicano dentro de una población de *N*-glicanos.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente se pueden utilizar para analizar el patrón de glicosilación de las glicoproteínas que se utilizan como agentes terapéuticos (p. ej., interferones, factores estimulantes de colonias, factores de coagulación sanguínea, etc.). Como apreciará un experto en la técnica, los patrones de glicosilación de estos agentes de glicoproteína terapéuticos pueden afectar, potencialmente, sus propiedades terapéuticas. Por este motivo, es importante caracterizar de forma precisa el patrón de glicosilación de una glicoproteína de interés expresada. En determinadas realizaciones, los métodos según la descripción son útiles para la caracterización precisa del patrón de glicosilación de dichas glicoproteínas terapéuticas.

En determinadas realizaciones, una glicoproteína terapéutica de interés se produce en una célula y secreta desde la célula tras la producción. Los métodos según la descripción se pueden utilizar para predecir el patrón de glicosilación de dichas glicoproteínas terapéuticas secretadas.

En algunas realizaciones, los métodos según la descripción se pueden utilizar para monitorizar el patrón de glicosilación de glicoproteínas durante el transcurso de su producción por parte de las células. Por ejemplo, la producción de una glicoproteína (p. ej., producción comercial) puede implicar las etapas de (1) cultivar células que producen la glicoproteína, (2) obtener muestras a intervalos regulares o irregulares a lo largo del proceso de cultivo de las células y (3) analizar el patrón de glicosilación de glicoproteínas producidas en cada muestra obtenida. En algunas realizaciones, dichos métodos pueden comprender además una etapa de comparar los patrones de glicosilación de las glicoproteínas producidas en cada muestra obtenida entre sí. En algunas realizaciones, dichos

métodos pueden comprender además una etapa de comparar los patrones de glicosilación de las glicoproteínas producidas en cada muestra obtenida con el patrón de glicosilación de una muestra de referencia.

5 En determinadas realizaciones, una glicoproteína terapéutica de interés es una glicoproteína disponible en el mercado (p. ej., anticuerpos, polipéptidos, interleucinas, análogos de receptores, antagonistas de receptores, etc., y/o porciones características de estos que se utilizan para tratar una enfermedad, afección o trastorno). Los métodos según la descripción se pueden utilizar para determinar los patrones de glicosilación de dichas glicoproteínas disponibles en el mercado.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Estructuras de *N*-glicanos de ejemplo.

10 Figura 2: Una mezcla de *N*-glicanos etiquetados con 2AB se sometió a tratamiento con las enzimas sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa. Las muestras se aplicaron a una columna de amida y se eluyeron mediante cromatografía de fase normal. (A) Mezcla de *N*-glicanos separada en la columna de amida. (B) *N*-glicanos después del tratamiento escalonado con enzimas. Como se muestra en el cromatograma, los glicanos extendidos por lactosamina no se escinden completamente a M3N2 mediante este tratamiento. La identidad de los picos se confirmó mediante ionización mediante desorción por láser asistida por matriz y espectrometría de masas (MALDI-MS, por su sigla en inglés).

15 Figura 3: Cromatograma de una mezcla de *N*-glicanos tras una digestión exhaustiva de la mezcla con un tratamiento simultáneo con las enzimas sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa. Las muestras se aplicaron a una columna de amida y se eluyeron mediante cromatografía de fase normal. Recuadro: primer plano del cromatograma de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 minutos, ampliado para visualizar los picos menores.

20 Figura 4: Población de *N*-glicanos de ejemplo que se digirió de forma secuencial con sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa de amplia especificidad (tratamiento Rx05-C). Se muestra la población de diversos productos de digestión.

25 Figura 5: Comparación de productos de digestión obtenidos tras la digestión secuencial (izquierda) y simultánea (derecha) de una población de glicanos (representada por los dos glicanos que se muestran en la parte superior) con  $\alpha$ -2/3,6,8,9-sialidasa,  $\beta$ -1/3,4,6-galactosidasa y  $\beta$ -1,4-hexosaminidasa. La digestión simultánea proporciona el mismo producto de reacción (el núcleo de manosa) para ambos glicanos de la población de glicanos. La digestión secuencial proporciona dos productos de digestión diferentes. Este ejemplo muestra cómo la digestión secuencial puede revelar información que no se obtendría a partir de una digestión simultánea.

30 Figura 6: La fucosilación (representada mediante un triángulo) de glcNAc (cuadrados) evita que la hexosaminidasa sea capaz de escindir un glcNAc terminal. Aquí se muestran dos especies de glicanos, una con un glcNAc fucosilado antenarario (derecha) y una sin (izquierda). Después de la digestión con sialidasa, galactosidasa y hexosaminidasa, la especie de la izquierda se escinde hasta su núcleo de manosa. En cambio, no se puede extraer por escisión el glcNAc fucosilado mediante un tratamiento con exoglicosidasa idéntico.

35 Figura 7: Tratamiento con exoglicosidasa simultáneo y secuencial para revelar estructuras híbridas y de polilactosamina. Las mezclas de glicanos se trataron con exoglicosidasas y se etiquetaron. La comparación de las estructuras de glicanos que permanecen en la escisión simultánea con respecto a la secuencial se ilustra mediante HPLC (A). Las preparaciones de glicanos se hicieron de forma simultánea o secuencial con sialidasa, galactosidasa (panel superior), sialidasa, galactosidasa y hexosaminidasa (panel medio) o sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa (panel inferior). La comparación de las estructuras de glicanos que permanecen en la escisión simultánea con respecto a la secuencial para la reacción con sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa se ilustra mediante espectrometría de masas (MS, por su sigla en inglés) (B). Las estructuras de polilactosamina que permanecen tras la escisión secuencial se marcan en la HPLC y la correspondiente MS.

40 Figura 8: Identificación rápida de glicanos que comprenden polilactosamina a través de comparación lado a lado de cromatogramas que resultan de tratamientos enzimáticos secuenciales y simultáneos de la misma muestra de glicano. Se utilizaron sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa para las reacciones enzimáticas. Los tratamientos secuenciales y simultáneos se indican con flechas.

45 Figura 9: Identificación rápida de glicanos que comprenden polilactosamina a través de comparación lado a lado de espectros de MALDI-MS que resultan de tratamientos enzimáticos secuenciales (panel superior) y simultáneos (panel inferior) de la misma muestra de glicano. Se utilizaron sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa para las reacciones enzimáticas.

Definiciones

Aproximadamente, alrededor de, ca.: Como se utilizan en la presente, los términos «aproximadamente», «alrededor de» o «ca.», según se aplican a uno o más valores de interés, hacen referencia a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En determinadas realizaciones, los términos «aproximadamente», «alrededor de» o «ca.» hacen referencia a un intervalo de valores que está dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos del valor de referencia indicado.

Muestra biológica: El término «muestra biológica», como se usa en la presente, hace referencia a cualquier muestra de sólido o fluido obtenida de, excretada por o secretada por cualquier célula u organismo vivo, incluidos, pero no limitados a, cultivo tisular, muestra de biorreactor, tejido humano o animal, plantas, frutas, verduras, microorganismos unicelulares (como bacterias y levaduras) y organismos multicelulares. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser fluido biológico obtenido de, *p. ej.*, sangre, plasma, suero, orina, bilis, semen, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (*p. ej.*, fluido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación) o fluido obtenido de una articulación (*p. ej.*, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad tal como artritis reumatoide, osteoartritis, gota o artritis séptica). Una muestra biológica también puede ser, por ejemplo, una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (que incluye un espécimen de biopsia o autopsia), puede comprender células (ya sean células principales o células cultivadas), medio acondicionado por cualquier célula, tejido u órgano, cultivo tisular.

Glicoproteína de superficie celular: Como se usa en la presente, el término «glicoproteína de superficie celular» hace referencia a una glicoproteína, de la cual al menos una porción está presente en la superficie exterior de una célula. En algunas realizaciones, una glicoproteína de superficie celular es una proteína que está posicionada en la superficie celular de manera que al menos una de las estructuras de glicano esté presente en la superficie exterior de la célula.

Glicano de superficie celular: Un «glicano de superficie celular» es un glicano que está presente en la superficie exterior de una célula. En muchas realizaciones de la presente descripción, un glicano de superficie celular está ligado covalentemente a un polipéptido como parte de una glicoproteína de superficie celular. Un glicano de superficie celular también se puede ligar a un lípido de membrana celular.

Glicano: Como se conoce en la técnica y se utiliza en la presente, los «glicanos» son azúcares. Los glicanos pueden ser monómeros o polímeros de residuos de azúcar, pero típicamente contienen al menos tres azúcares y pueden ser lineales o ramificados. Un glicano puede incluir residuos de azúcar naturales (por ejemplo, glucosa, *N*-acetilglucosamina, ácido *N*-acetil neuramínico, galactosa, manosa, fucosa, hexosa, arabinosa, ribosa, xilosa, etc.) y/o azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, 2'-desoxirribosa, fosfomanosa, 6'sulfo *N*-acetilglucosamina, etc.). El término «glicano» incluye homo y heteropolímeros de residuos de azúcar. El término «glicano» también abarca un componente glicano de un glicoconjugado (*p. ej.*, de una glicoproteína, glicolípido, proteoglicano, etc.). El término también abarca glicanos libres, incluidos glicanos que han sido escindidos o liberados, de otra forma, de un glicoconjugado.

Preparación de glicano: El término «preparación de glicano», como se usa en la presente, hace referencia a un conjunto de glicanos obtenidos según un método de producción específico. En algunas realizaciones, preparación de glicano hace referencia a un conjunto de glicanos obtenidos de una preparación de glicoproteína (véase la definición de preparación de glicoproteína más adelante).

Glicoconjugado: El término «glicoconjugado», como se usa en la presente, abarca todas las moléculas en las que al menos un resto de azúcar está ligado covalentemente con al menos un resto distinto. El término abarca específicamente todas las biomoléculas con restos de azúcar acoplados covalentemente, incluidas, por ejemplo, glicoproteínas ligadas por *N*, glicoproteínas ligadas por *O*, glicolípidos, proteoglicanos, etc.

Glicofoma: El término «glicofoma» se utiliza en la presente para hacer referencia a una forma específica de un glicoconjugado. Es decir, cuando el mismo resto estructural (*p. ej.*, polipéptido, lípido, etc.) que es parte de un glicoconjugado tiene el potencial para ligarse a diferentes glicanos o conjuntos de glicanos, entonces cada versión diferente del glicoconjugado (es decir, donde la estructura se liga a un conjunto de glicanos específico) se denomina «glicofoma».

Glicolípido: El término «glicolípido», como se usa en la presente, hace referencia a un lípido que contiene uno o más restos de azúcar ligados covalentemente (es decir, glicanos). El o los restos de azúcar pueden estar en forma de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos. El o los restos de azúcar pueden comprender una cadena de residuos de azúcar no ramificada simple o pueden comprender una o más cadenas ramificadas. En determinadas realizaciones, los restos de azúcar pueden incluir grupos sulfato y/o fosfato. En determinadas realizaciones, las glicoproteínas contienen restos de azúcar ligados por *O*; en determinadas realizaciones, las glicoproteínas contienen restos de azúcar ligados por *N*.

Glicoproteína: Como se usa en la presente, el término «glicoproteína», hace referencia a una proteína que contiene una estructura peptídica ligada covalentemente a uno o más restos de azúcar (es decir, glicanos). Como entenderán los expertos en la técnica, la estructura peptídica típicamente comprende una cadena lineal de residuos

aminoácidos. En determinadas realizaciones, la estructura peptídica abarca la membrana celular, de manera que comprende una porción transmembranaria y una porción extracelular. En determinadas realizaciones, una estructura peptídica de una glicoproteína abarca la membrana celular que comprende una porción intracelular, una porción transmembranaria y una porción extracelular. En determinadas realizaciones, los métodos de la presente descripción comprender escindir una glicoproteína de superficie celular con una proteasa para liberar la porción extracelular de la glicoproteína, o una porción de la misma, donde dicha exposición no rompe sustancialmente la membrana celular. El o los restos de azúcar pueden estar en forma de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos. El o los restos de azúcar pueden comprender una cadena de residuos de azúcar no ramificada simple o pueden comprender una o más cadenas ramificadas. En determinadas realizaciones, los restos de azúcar pueden incluir grupos sulfato y/o fosfato. Alternativa o adicionalmente, los restos de azúcar pueden incluir acetilo, glicolilo, propilo u otras modificaciones alquilo. En determinadas realizaciones, las glicoproteínas contienen restos de azúcar ligados por O; en determinadas realizaciones, las glicoproteínas contienen restos de azúcar ligados por N. En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente comprenden una etapa de analizar cualquiera o todas las glicoproteínas de superficie celular, fragmentos liberados (p. ej., glicopéptidos) de glicoproteínas de superficie celular, glicanos de superficie celular acoplados a glicoproteínas de superficie celular, estructuras peptídicas de glicoproteínas de superficie celular, fragmentos de dichas glicoproteínas, glicanos y/o estructuras peptídicas y sus combinaciones.

Glicosidasa: El término «glicosidasa», como se usa en la presente, hace referencia a un agente que escinde un enlace covalente entre azúcares secuenciales en un glicano o entre el azúcar y el resto estructural (p. ej., entre el azúcar y la estructura peptídica de la glicoproteína). En algunas realizaciones, una glicosidasa es un enzima. En determinadas realizaciones, una glicosidasa es una proteína (por ejemplo, una enzima proteica) que comprende una o más cadenas polipeptídicas. En determinadas realizaciones, una glicosidasa es un agente de escisión química.

Patrón de glicosilación: Como se usa en la presente, el término «patrón de glicosilación» hace referencia a un conjunto de estructuras de glicano presentes en una muestra específica. Por ejemplo, un glicoconjugado específico (p. ej., glicoproteína) o conjunto de glicoconjugados (p. ej., conjunto de glicoproteínas) tendrá un patrón de glicosilación. En algunas realizaciones, se hace referencia al patrón de glicosilación de glicanos de superficie celular. Un patrón de glicosilación se puede caracterizar, por ejemplo, por las identidades de los glicanos, las cantidades (absolutas o relativas) de glicanos individuales o glicanos de tipos específicos, el grado de ocupación de los sitios de glicosilación, etc., o combinaciones de dichos parámetros.

Preparación de glicoproteína: Una «preparación de glicoproteína», como se utiliza dicho término en la presente, hace referencia a un conjunto de moléculas de glicoproteína individuales, donde cada una comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos específica (cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos un sitio de glicosilación) y al menos un glicano acoplado covalentemente con el al menos un sitio de glicosilación. Las moléculas individuales de una glicoproteína específica dentro de una preparación de glicoproteína típicamente tienen secuencias de aminoácidos idénticas, pero pueden diferir en la ocupación de al menos uno sitio de glicosilación y/o en la identidad de los glicanos ligados con el al menos un sitio de glicosilación. Es decir, una preparación de glicoproteína puede contener solo una glicoforma simple de una glicoproteína específica, pero más típicamente contiene una pluralidad de glicoformas. Preparaciones diferentes de la misma glicoproteína pueden diferir en la identidad de las glicoformas presentes (p. ej., un Glicoforma que está presente en una preparación puede estar ausente en otra) y/o en las cantidades relativas de glicoformas diferentes.

*N*-glicano: El término «*N*-glicano», como se usa en la presente, hace referencia a un polímero de azúcares que ha sido liberado de un glicoconjugado pero que anteriormente estaba ligado al glicoconjugado a través de una ligadura de nitrógeno (véase la definición de glicano ligado por N, a continuación).

Glicanos ligados por N: Los glicanos ligados por N son glicanos que están ligados a un glicoconjugado a través de una ligadura de nitrógeno. Existe una diversidad de glicanos ligados por N, pero típicamente se basan en el pentasacárido nuclear común (Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)(GlcNAc).

*O*-glicano: El término «*O*-glicano», como se usa en la presente, hace referencia a un polímero de azúcares que ha sido liberado de un glicoconjugado pero que anteriormente estaba ligado al glicoconjugado a través de una ligadura de oxígeno (véase la definición de glicano ligado por O, a continuación).

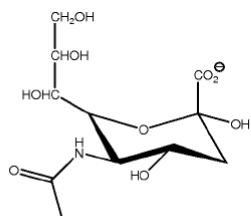
Glicanos ligados por O: Los glicanos ligados por O son glicanos que están ligados a un glicoconjugado a través de una ligadura de oxígeno. Los glicanos ligados por O típicamente se acoplan a proteínas a través de *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc) o a través de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) al grupo hidroxilo de L-serina (Ser) o L-treonina (Thr). Algunos glicanos ligados por O también tienen modificaciones tales como acetilación o sulfatación. En algunos casos los glicanos ligados por O se acoplan a glicoproteínas a través de fucosa o manosa al grupo hidroxilo de L-serina (Ser) o L-treonina (Thr).

Fosforilación: Como se usa en la presente, el término «fosforilación» hace referencia al proceso de agregar covalentemente uno o más grupos fosfato a una molécula (p. ej., a un glicano).

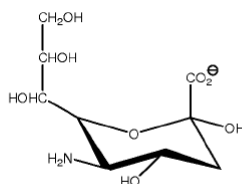
Proteasa: El término «proteasa», como se usa en la presente, hace referencia a un agente que escinde un enlace peptídico entre aminoácidos secuenciales en una cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, una proteasa es un enzima (es decir, una enzima proteolítica). En determinadas realizaciones, una proteasa es una proteína (por ejemplo, una enzima proteica) que comprende una o más cadenas polipeptídicas. En determinadas realizaciones, una proteasa es un agente de escisión química.

Proteína: En general, una «proteína» es un polipéptido (es decir, una serie de al menos dos aminoácidos ligados entre sí mediante enlaces peptídicos). Las proteínas pueden incluir restos que no sean de aminoácidos (p. ej., pueden ser glicoproteínas) y/o pueden procesarse o modificarse de otra forma. Los expertos en la técnica comprenderán que una «proteína» puede ser una cadena polipeptídica completa como la produce una célula (con o sin la secuencia señal) o puede ser una porción funcional de la misma. Los expertos en la técnica comprenderán además que una proteína algunas veces puede incluir más de una cadena polipeptídica, por ejemplo, ligadas mediante uno o más enlaces disulfuro o asociadas de otras formas.

Ácido siálico: El término «ácido siálico», como se usa en la presente, es un término genérico para los derivados sustituidos con *N* u *O* del ácido neuramínico, un monosacárido de nueve carbonos. El grupo amino del ácido neuramínico típicamente porta un grupo acetilo o glicolilo en un ácido siálico. Los sustituyentes hidroxilo presentes en el ácido siálico pueden modificarse mediante acetilación, metilación, sulfatación y fosforilación. El ácido siálico predominante es el ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac). Los ácidos siálicos imparten una carga negativa a los glicanos, debido a que el grupo carboxilo tiende a disociar un protón a pH fisiológico. Los ácidos siálicos desprotonados de ejemplo son los siguientes:



ácido *N*-acetilneuramínico (*Neu5Ac*)



ácido neuramínico (*Neu*)

Sustancialmente: Como se usa en la presente, el término «sustancialmente» hace referencia a una condición cualitativa de exhibir una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las técnicas biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente o nunca llegan a completarse y/o proceden hasta completarse o logran o evitan un resultado absoluto. El término «sustancialmente», por lo tanto, se usa en la presente para abarcar la posible falta de completud inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos. Para dar un ejemplo específico, cuando se dice que un tratamiento no rompe «sustancialmente» las membranas celulares, se pretende indicar que todas o la mayoría de las membranas celulares permanecen intactas durante y después del tratamiento, por ejemplo, de manera que las glicoproteínas o glicopéptidos intracelulares, por consiguiente, no se liberan desde las células. En determinadas realizaciones, el término «sustancialmente», según se aplica a membranas celulares no rotas, hace referencia a una condición en la 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos de las células sometidas a un tratamiento específico exhibe membranas celulares rotas medibles. En determinadas realizaciones, el término «sustancialmente», según se aplica a membranas celulares no rotas, hace referencia a una condición en la ninguna de las células sometidas a un tratamiento específico exhibe membranas celulares rotas medibles.

#### Descripción detallada de determinadas realizaciones

La presente descripción proporciona métodos para analizar la composición de glicanos ligados por *N*. Según la presente descripción, los métodos descritos en la presente se pueden utilizar para analizar una mezcla de *N*-glicanos y para medir los niveles relativos dentro de esta mezcla de grupos estructurales específicos y modificaciones inusuales (p. ej., fucosa nuclear o antenaria, extensiones de lactosamina, manosa elevada y glicanos híbridos, sulfatación, fosforilación, etc.). Por ejemplo, la Figura 6 demuestra cómo la fucosilación antenaria evita la digestión de glcNAc mediante hexosaminidasa. En muchas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos que implican las etapas de obtener una preparación de *N*-glicano; digerir los glicanos ligados por *N* con enzimas exoglicosidasas para escindir de forma específica los monosacáridos de los extremos no reductores; y analizar los productos de la escisión.

#### Glicanos ligados por *N*

En general, un glicano hace referencia a un resto carbohidrato que, en algunas realizaciones, se acopla covalentemente a una glicoproteína. Los restos carbohidrato (por ejemplo, cadenas de oligosacáridos) se ligan a glicoproteínas en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi a través de ligaduras de *N* o ligaduras de *O*.

Típicamente, las cadenas de oligosacáridos ligadas por *N* se agregan a las glicoproteínas en el lumen del retículo endoplasmático (véase Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 1994). Los restos carbohidrato se agregan al grupo amino en la cadena lateral de un residuo asparagina contenido dentro de la secuencia consenso objetivo de Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Enzimas glicosidasa específicas normalmente recortan la cadena de oligosacáridos inicial y esto resulta en un oligosacárido nuclear ramificado, corto compuesto por dos *N*-acetilglucosamina y tres residuos manosa.

Los *N*-glicanos se pueden subdividir en tres grupos distintos denominados «tipo manosa elevada», «tipo híbrido» y «tipo complejo», con un pentasacárido nuclear común (Manp( $\alpha$ 1,6)-(Manp( $\alpha$ 1,3))-Manp( $\beta$ 1,4)-GlcNAc( $\beta$ 1,4)-GlcNAc( $\beta$ 1,N)-Asn) presente en los tres grupos. Las modificaciones al núcleo incluyen, por ejemplo, glicosilación adicional, proporcionar una GlcNAc bisectante, acoplamiento de un residuo fucosilo en la GlcNAc más interna y recubrimiento con residuos ácido siálico (Neu). Los *N*-glicanos de ejemplo se representan en la Figura 1. Como se puede observar, la variación estructural de los *N*-glicanos se produce en su mayoría con respecto a las (hasta) 4 antenas en el lado izquierdo de los *N*-glicanos representados en la Figura 1. Los glicanos ligados por *N* se encuentran comúnmente como componentes de péptidos (es decir, un glicopéptido) y proteínas (es decir, una glicoproteína).

Después del procesamiento inicial en el retículo endoplasmático, las glicoproteínas a continuación se transportan al aparato de Golgi donde se puede producir un procesamiento adicional. Las cadenas de oligosacáridos ligadas por *N* recortadas se pueden modificar mediante la adición de varios residuos manosa, lo que resulta en un «oligosacárido con manosa elevada». Alternativa o adicionalmente, una o más unidades de monosacáridos de *N*-acetilglucosamina se pueden agregar a las subunidades de manosa nucleares para formar «oligosacáridos complejos». Se puede agregar galactosa a las subunidades de *N*-acetilglucosamina y se pueden agregar subunidades de ácido siálico a las subunidades de galactosa, lo que resulta en cadenas que terminan con cualquiera de un residuo ácido siálico, galactosa o *N*-acetilglucosamina. Se puede agregar un residuo fucosa a un residuo *N*-acetilglucosamina del oligosacárido nuclear. Cada una de estas adiciones se cataliza mediante glicosil transferasas específicas.

Los glicanos ligados por *N* participan en una variedad de procesos celulares. Por ejemplo, los *N*-glicanos contribuyen al plegado adecuado de las proteínas en las células eucariontes. Las proteínas chaperonas en el retículo endoplasmático (por ejemplo, calnexina y calreticulina) se unen a los tres residuos glucosa presentes en el núcleo del *N*-glicano. Las proteínas chaperonas típicamente auxilian en el plegado de la proteína a la cual está acoplado el glicano. Tras el plegado adecuado, los tres residuos glucosa se extraen y el glicano puede someterse a reacciones de procesamiento adicionales. Si la proteína no logra plegarse de forma adecuada, los tres residuos glucosa se vuelven a acoplar, permitiendo que la proteína se vuelva a asociar con las chaperonas. Este ciclo se puede repetir varias veces hasta que la proteína alcance su conformación adecuada. Si la proteína no logra plegarse de forma adecuada reiteradamente, se excreta, normalmente, del retículo endoplasmático y se degrada mediante proteasas citoplasmáticas.

Alternativa o adicionalmente, los *N*-glicanos contribuyen al plegado de las proteínas mediante efectos estéricos. Por ejemplo, se pueden bloquear residuos cisteína en un péptido de forma temporal para que no formen enlaces disulfuro con otros residuos cisteína, debido al tamaño de un glicano cercano. La presencia de un glicano ligado por *N*, por lo tanto, puede permitir que una célula controle qué residuos cisteína formarán enlaces disulfuro.

Los *N*-glicanos pueden participar en interacciones célula-célula. Por ejemplo, las células tumorales frecuentemente producen estructuras de *N*-glicano anormales que pueden ser reconocidas por el receptor CD337 en los linfocitos citolíticos naturales como una señal de que la célula en cuestión es cancerosa.

Los *N*-glicanos pueden participar en la orientación de enzimas lisosómicas degradantes hacia el lisosoma. En particular, la modificación de un *N*-glicano con un residuo manose-6-fosfato puede servir como señal de que la proteína a la cual está acoplado el glicano debería orientarse hacia el lisosoma.

Por lo tanto, la presente descripción abarca el reconocimiento de que es importante determinar el patrón de glicosilación de *N*-glicanos (por ejemplo, *N*-glicanos que se conjugan con glicoproteínas). Los métodos descritos en la presente se pueden usar para analizar las características (*p. ej.*, composición y/o estructura) de cualquier *N*-glicano.

#### Preparaciones de *N*-glicano

La presente descripción proporciona métodos para analizar la estructura y/o composición de glicanos individuales dentro de una preparación de glicano. Se puede obtener una preparación de glicano mediante cualquier método conocido en la técnica. En general, obtener una preparación de *N*-glicano comprende las etapas de (1) obtener una preparación de glicoproteína; y (2) obtener una preparación de *N*-glicano a partir de la preparación de glicoproteína. En algunas realizaciones, obtener una preparación de *N*-glicano comprende, opcionalmente, una etapa de etiquetado de la preparación de *N*-glicano con una etiqueta detectable.

#### Preparaciones de glicoproteínas



Una preparación de glicoproteína se puede obtener a partir de cualquier fuente que incluye, pero no se limita a, formulaciones terapéuticas (por ejemplo, eritropoyetina, insulina, hormona de crecimiento humana, etc.), productos biológicos comerciales (por ejemplo, los presentados en la Tabla 3) y muestras biológicas. Como se usa en la presente, el término «muestra biológica» hace referencia a cualquier muestra de sólido o fluido obtenida de, excretada por o secretada por cualquier célula u organismo vivo, incluidos, pero no limitados a, cultivo tisular, tejido humano o animal, plantas, frutas, verduras, microorganismos unicelulares (como bacterias y levaduras) y organismos multicelulares. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser fluido biológico obtenido de, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, bilis, semen, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (p. ej., fluido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación) o fluido obtenido de una articulación (p. ej., una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad tal como artritis reumatoide, osteoartritis, gota o artritis séptica). Una muestra biológica también puede ser, por ejemplo, una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (que incluye un espécimen de biopsia o autopsia), puede comprender células (ya sean células principales o células cultivadas), medio acondicionado por cualquier célula, tejido u órgano, cultivo tisular.

Una preparación de glicoproteína puede ser recibida por cualquier máquina, persona o entidad. En algunas realizaciones, una preparación de glicoproteína puede ser recibida por una máquina, que luego lleva a cabo una o más pruebas, procesos o refinamientos de la preparación de glicoproteína. En algunas realizaciones, una preparación de glicoproteína puede ser recibida por una persona. En algunas realizaciones, una preparación de glicoproteína puede ser recibida por una entidad externa. En algunas realizaciones, una preparación de glicoproteína puede ser recibida por una persona o negocio que lleva a cabo servicios de caracterización para una segunda persona o negocio. Por ejemplo, se puede operar un negocio en el que el negocio recibe de otros negocios o laboratorios preparaciones de glicoproteínas para que sean caracterizadas. Una preparación de glicoproteína se puede preprocesar de cualquier manera. Por ejemplo, una preparación de glicoproteína se puede preprocesar para aislar una o más Glicofomas.

#### Preparación de *N*-glicano

En algunas realizaciones, se obtiene una preparación de *N*-glicano al proporcionar una población de glicoproteínas y extraer los *N*-glicano de las glicoproteínas de la población de glicoproteínas.

En algunas realizaciones, los *N*-glicanos se extraen de las glicoproteínas mediante digestión. En general, las glicanasas que se utilizan según la presente descripción escinden entre los residuos GlcNAc-Asn, GlcNAc-GlcNAc o Man-GlcNAc del núcleo. Las enzimas de ejemplo que se pueden utilizar para extraer *N*-glicanos de glicoproteínas incluyen, pero no se limitan a, *N*-glicanasa F y/o *N*-glicanasa-A, O-glicanasa y/o Endo H.

En algunas realizaciones, los *N*-glicanos se extraen de las glicoproteínas mediante escisión química. Para proporcionar algún ejemplo, se pueden utilizar hidrazina, borohidruro de sodio y/o ácido trifluorometanosulfónico (TFMS) para extraer glicanos de una glicoproteína.

#### Etiquetar *N*-glicanos

En algunas realizaciones, los *N*-glicanos (p. ej., los *N*-glicanos que se extrajeron de una población de glicoproteínas) se pueden asociar con una o más etiquetas detectables. Las etiquetas detectables se asocian, típicamente, con los extremos reductores de los *N*-glicanos. En algunas realizaciones, las etiquetas detectables son restos fluorescentes. Los fluoróforos de ejemplo que se pueden usar según la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-aminobenzoico (2AA), 2-aminobenzamida (2AB) y/o 2-aminopurina (2AP). En general, los fluoróforos para uso según la presente descripción se caracterizan por tener reactividad con el extremo reductor de un oligosacárido y/o monosacárido en condiciones que no dañan y/o destruyen el glicano. En algunas realizaciones, los restos fluorescentes se acoplan directamente a los extremos reductores. Por ejemplo, el acoplamiento directo se puede lograr mediante conjugación directa mediante aminación reductora. En algunas realizaciones, los restos fluorescentes se acoplan indirectamente a los extremos reductores. Por ejemplo, el acoplamiento indirecto se puede lograr mediante un brazo conector reactivo.

En algunas realizaciones, las etiquetas detectables comprenden restos radioactivos o moléculas etiquetadas de forma isotópica. Los restos radioactivos que se pueden usar según la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, tritio ( $^3\text{H}$ ), deuterio ( $^2\text{H}$ ) y/o  $^{35}\text{S}$ . Típicamente, dichos restos se acoplan directamente o se asocian de otra forma con el fluoróforo. Para dar un ejemplo de un fluoróforo radioactivo, se puede modificar 2AP de manera que todos los hidrógenos se deutericen.

#### Digestión de glicanos ligados por N

La presente descripción proporciona métodos mejorados para determinar patrones de glicosilación de glicoproteínas. Dichos métodos implican, generalmente, someter una población de *N*-glicanos a una o más exoglicosidasas y analizar la estructura y/o composición de los productos de la digestión. En algunas realizaciones, las exoglicosidasas utilizadas según la presente descripción reconocen y escinden solo un tipo específico de

ligadura glicosídica. En algunas realizaciones, las exoglicosidasas utilizadas según la presente descripción reconocen y escinden solo un tipo específico de ligadura glicosídica.

Exoglicosidasas

5 Las exoglicosidasas son enzimas que escinden enlaces glicosídicos terminales de extremos no reductores de glicanos. Típicamente, son altamente específicas para ligaduras de monosacáridos específicas y anomericidad ( $\alpha/\beta$ ). En algunas realizaciones, los patrones ramificantes cercanos pueden afectar la especificidad de la exoglicosidasa. El tratamiento con exoglicosidasa resultan, normalmente, en glicanos de ligaduras antenarias típicas que se escinden hasta el núcleo de pentasacárido (M3N2) que contiene 3 residuos manosa y 2 glcNAc. Sin embargo, las especies modificadas normalmente (*por ejemplo*, especies fucosiladas antenarias o nucleares, glicanos con manosa elevada o híbridos, glicanos extendidos por lactosamina, glicanos fosforilados, etc.) son resistentes al tratamiento con exoglicosidasa y pueden resolverse y cuantificarse cromatográficamente con respecto al pentasacárido M3N2.

15 Las exoglicosidasas de ejemplo que se pueden utilizar según la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa, fucosidasa y manosidasa. Las exoglicosidasas se pueden obtener de cualquier fuente, incluidas fuentes comerciales (*por ejemplo*, QA-Bio, ProZyme, Roche, Sigma, NEB, EMD, Glyko, etc.). Alternativa o adicionalmente, las exoglicosidasas se pueden aislar y/o purificar a partir de una fuente celular (*p. ej.*, bacterias, levaduras, plantas, etc.).

20 En algunas realizaciones, las exoglicosidasas (*por ejemplo*, sialidasas, galactosidasas, hexosaminidasas, fucosidasas y manosidasas) se pueden dividir en múltiples categorías o «subconjuntos». En algunas realizaciones, los diferentes subconjuntos exhiben diferentes capacidades para escindir diferentes tipos de ligaduras. La Tabla 1 presenta algunas exoglicosidasas de ejemplo, sus especificidades de ligadura y el organismo de cual deriva cada una. Un experto en la técnica apreciará que se trata de una lista de exoglicosidasas de ejemplo, no exhaustiva, y que se puede utilizar cualquier exoglicosidasa que tenga cualquier especificidad de ligadura según la presente descripción.

Tabla 1. Exoglicosidasas

Clase de enzima	N.º de CE*	Actividad	Organismo
$\alpha$ -Sialidasa	3.2.1.18	$\alpha$ -2/3,6,8 (generalmente sin ligadura específica)	<i>Arthrobacter ureafaciens</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Clostridium perfringens</i>
		$\alpha$ -2,3 (NeuAc de oligosacáridos)	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Streptococcus pneumonia</i>
		$\alpha$ -2/3,6 (NeuAc de complejo)	<i>Clostridium perfringens</i>
$\beta$ -Galactosidasa	3.2.1.23	ligaduras $\beta$ -1/3,4,6 Gal	Testículo bovino Especies de <i>Xanthamonas</i> Especies de <i>Streptococcus</i> <i>E. coli</i>
		ligaduras $\beta$ -1/4,6 Gal	Frijol de sable
		ligadura $\beta$ -1,4 Gal	<i>Streptococcus pneumonia</i>
		ligadura $\beta$ -1,3-Gal	<i>E. coli</i> Especies de

Clase de enzima	N.º de CE*	Actividad	Organismo
			<i>Xanthomonas</i>
		ligaduras $\beta$ -1/3,6-Gal	Especies de <i>Xanthomonas</i> <i>E. coli</i>
$\beta$ -Hexosaminidasa	3.2.1.52	$\beta$ -1/2,3,4,6 hexosaminas	<i>Streptococcus plicatus</i> <i>Streptococcus pneumonia</i>
	3.2.1.30		<i>Bacteroides</i> Frijol de sable
$\alpha$ -Fucosidasa	3.2.1.51 3.2.1.111	$\alpha$ -1-3,4-Fuc (normalmente estructura de Lewis desglucosilada)	<i>Xanthomonas</i> Harina de almendras
		$\alpha$ -1/2,3,4,6-Fuc (normalmente tiene una amplia especificidad)	Riñón bovino <i>C. meningosepticum</i>
		$\alpha$ -1,6-Fuc	<i>E. coli</i>
		$\alpha$ -1,2-Fuc	<i>Xanthomonas</i>
$\alpha$ -Manosidasa	3.2.1.24	$\alpha$ -1/2,3,6-Man	Frijol de sable
		$\alpha$ -1/2,3-Man	<i>Xanthomonas manihotis</i>
		$\alpha$ -1,6-Man (típicamente una manosidasa nuclear)	Especies de <i>Xanthomonas</i>
		$\alpha$ -1,2-Man	<i>Aspergillus saitoi</i>
$\beta$ -Manosidasa	3.2.1.25	$\alpha$ -1,4-Man	<i>Helix pomatia</i>

\* «N.º de CE» hace referencia al número de registro en la Comisión de enzimas

5 Según la presente descripción, se puede digerir una población de N-glicanos con cualquier exoglicosidasa o cualquier conjunto de exoglicosidasas. En general, las reacciones con exoglicosidasa se producen en condiciones que son compatibles con la actividad enzimática. Por ejemplo, el pH, la temperatura, los componentes y la concentración de la solución de reacción (*por ejemplo*, sal, detergente, etc.) y la extensión del tiempo de reacción se pueden optimizar a efectos de lograr un nivel deseado de actividad de exoglicosidasa.

10 En general, las reacciones con exoglicosidasa se producen en condiciones neutras o ácidas. En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen en condiciones que son sustancialmente neutras. En algunas realizaciones, las condiciones neutras hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. En algunas realizaciones, las condiciones neutras hacen referencia a un pH de aproximadamente 7. En algunas realizaciones, las condiciones neutras hacen referencia a un pH de aproximadamente 6,5. En algunas realizaciones, las condiciones neutras hacen referencia a un pH de aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, las condiciones neutras hacen referencia a un pH de aproximadamente 6. En algunas realizaciones, las condiciones neutras hacen referencia a un pH de aproximadamente 8.

15 En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen en condiciones que son ácidas. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH menor que aproximadamente 7. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 1 y

- aproximadamente 7. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 2 y aproximadamente 7. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7.
- En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6.
- En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH que varía entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5.
- En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 6,5. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 6. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 5,5. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 5. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 4,5. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 4. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 3,5. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 3. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 2,5. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 2. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 1,5. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 1. En algunas realizaciones, las condiciones ácidas hacen referencia a un pH de aproximadamente 0,5.
- En determinadas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen a un pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 6. En determinadas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen a un pH de aproximadamente 5,5. En determinadas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen a un pH que varía de aproximadamente 6 a aproximadamente 8.
- En general, las reacciones con exoglicosidasa se producen a temperaturas que varían entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 45 °C, *p. ej.*, de aproximadamente 30 °C y aproximadamente 40 °C. En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen a temperaturas que varían entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 40 °C. En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen a aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 42 °C o aproximadamente 45 °C. En determinadas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen a temperaturas que varían entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 40 °C. En determinadas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen a temperaturas que varían entre aproximadamente 36 °C y aproximadamente 38 °C. En determinadas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se producen a temperaturas de aproximadamente 37 °C.
- En general, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo por extensiones de tiempo que varían entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 20 horas. En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo durante aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas o aproximadamente 48 horas. En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo durante toda la noche.
- En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo in presencia de detergente, *p. ej.*, hasta 25 % de detergente. Los detergentes de ejemplo que se pueden utilizar en reacciones con exoglicosidasa según la descripción incluyen dodecil sulfato sódico (SDS, por su sigla en inglés), lauril sulfato sódico (SLS, por su sigla en inglés), ésteres de ácidos grasos sorbitán (*por ejemplo*, Tween, Span, Myrj, *etc.*), ésteres de ácidos grasos polietilenglicol (por ejemplo, cremofor), Brij, Triton, nonil fenoxipolietoxietanol (NP-40). En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo en presencia de aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente

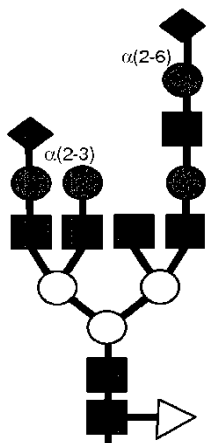
20 %, aproximadamente 25 % o más de 25 % de detergente. En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo en ausencia de cualquier detergente.

5 En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo en presencia de sal. Los detergentes de ejemplo que se pueden utilizar en las reacciones con exoglicosidasa según la descripción incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso y/o sus combinaciones. En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo en presencia de aproximadamente 1mM a aproximadamente 500 mM de sal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo en presencia de  
10 aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 500 mM de sal. En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo en presencia de aproximadamente 100 mM de sal. En algunas realizaciones, las reacciones con exoglicosidasa se llevan a cabo en ausencia de cualquier sal.

15 En determinadas realizaciones, los *N*-glicanos se digieren al someter una población de *N*-glicanos a una pluralidad de exoglicosidasas. Por ejemplo, la población de *N*-glicanos puede someterse a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más exoglicosidasas. En algunas realizaciones, una población de *N*-glicanos se digiere con dos o más exoglicosidasas que están todas presentes en cantidades sustancialmente iguales. En algunas realizaciones, una población de *N*-glicanos se digiere con dos o más exoglicosidasas que no están todas presentes en cantidades sustancialmente  
20 iguales. A modo de ejemplo, una población de *N*-glicanos se puede digerir con las exoglicosidasas A, B y C a una relación de 1:2:1. En algunas realizaciones, se administran múltiples exoglicosidasas de forma simultánea. En algunas realizaciones, se administran múltiples exoglicosidasas de forma secuencial.

#### Digestión simultánea con múltiples exoglicosidasas

25 En algunas realizaciones, se puede usar digestión simultánea con múltiples exoglicosidasas para analizar la estructura y/o función del glicano. En algunos casos, la digestión simultánea se puede llevar a cabo para determinar la presencia de tipos específicos de ligaduras y/o modificaciones de glicano. A modo de ejemplo, para la estructura de glicano hipotética que se muestra a continuación:



30 Se prevé que el tratamiento simultáneo con galactosidasa y hexosaminidasa deje solo una antena que contenía inicialmente los residuos ácido siálico terminales. Estos residuos ácido siálico a continuación puede extraerse opcionalmente y la mezcla de glicanos resultante se puede analizar mediante HPLC, para revelar el perfil de especies antenarias mono, di, tri y tetrasialadas que estaban presentes en la mezcla original. Los ejemplos de estrategias de digestión simultánea y análisis de dichas estrategias se describen en el Ejemplo 2.

#### 35 Digestión secuencial con múltiples exoglicosidasas

Como ejemplo adicional no limitante, los *N*-glicanos se pueden digerir al someter una población de *N*-glicanos a una primera exoglicosidasa durante un primer período de tiempo, después del cual la población de *N*-glicanos se somete a una segunda exoglicosidasa durante un segundo período de tiempo. Antes del tratamiento con la segunda exoglicosidasa, la primera exoglicosidasa se puede extraer y/o desactivar opcionalmente. A modo de ejemplo, la primera exoglicosidasa puede desactivarse incubando la exoglicosidasa a una temperatura durante un tiempo suficiente para desactivarla. Adicional o alternativamente, la primera exoglicosidasa se puede desactivar al incubarla con un inhibidor que es específico para la exoglicosidasa (por ejemplo, un anticuerpo u otra molécula que se une  
40

específicamente a la primera exoglicosidasa e inhibe su actividad catalítica). Otros métodos para desactivar la primera exoglicosidasa serán conocidos por los expertos en la técnica. En el caso donde la primera exoglicosidasa se desactiva al incubarla con un inhibidor específico, se apreciará que la presencia del inhibidor no debe inhibir sustancialmente la actividad de la segunda exoglicosidasa. En algunas realizaciones, los métodos para desactivar o extraer una primera exoglicosidasa antes de la adición de una segunda exoglicosidasa incluyen calentar la mezcla de reacción, enfriar la mezcla de reacción, agregar disolventes orgánicos, agregar proteasas y/o sus combinaciones. En algunas realizaciones, la primera exoglicosidasa se extrae de la reacción antes de la adición de una segunda exoglicosidasa, p. ej., mediante cromatografía, cartuchos de extracción de fase sólida, filtros de peso molecular, centrifugación, precipitación y/o sus combinaciones. Un experto en la técnica reconocerá que estos mismos principios son aplicables a una tercera, cuarta, quinta, sexta, etc. exoglicosidasa.

En algunas realizaciones, la digestión secuencial con múltiples exoglicosidasas revela información sobre la estructura y/o composición de los *N*-glicanos que es diferente de la información revelada mediante la digestión simultánea con el mismo conjunto de exoglicosidasas.

En algunas realizaciones, la digestión secuencial con múltiples exoglicosidasas revela información sobre la estructura y/o composición de los *N*-glicanos que es la misma información revelada mediante la digestión simultánea con el mismo conjunto de exoglicosidasas.

En algunas realizaciones, variar la secuencia en la que se administran múltiples exoglicosidasas revela información sobre la estructura y/o composición de los *N*-glicanos. A modo de ejemplo, someter un *N*-glicano específico a (1) una sialidasa, (2) una galactosidasa, (3) una hexosaminidasa, (4) una fucosidasa y (5) una manosidasa, en dicho orden específico, podría producir un conjunto de productos de digestión que es diferente de los productos de digestión obtenidos al someter el mismo *N*-glicano a (1) una hexosaminidasa, (2) manosidasa, (3) sialidasa, (4) fucosidasa y (5) una sialidasa, en dicho orden. Llevar a cabo ambas series de digestiones secuenciales y analizar los diferentes conjuntos de productos de digestión obtenidos mediante ambas digestiones secuenciales y comparar los diferentes conjuntos de productos de digestión (por ejemplo, entre sí y/o con respecto a una muestra de referencia) puede proporcionar información sobre la estructura y/o composición del *N*-glicano que no se habría obtenido al llevar a cabo solo una de las series de digestiones secuenciales y analizar los productos de digestión obtenidos de solo una de las series de digestiones secuenciales. Los ejemplos de estrategias de digestión secuencial y análisis de dichas estrategias se describen en el Ejemplo 3.

En algunas realizaciones, las enzimas individuales que constituyen un conjunto de enzimas para usar en las digestiones secuenciales y/o simultáneas se elige a efectos de maximizar la información que se puede obtener al llevar a cabo las digestiones. Los tratamientos que se muestran en la Tabla 2 ejemplifican la selección de tratamientos enzimáticos para identificar una modificación de glicano específico en glicanos sialiados.

Tabla 2. Tratamientos enzimáticos de ejemplo para identificar modificaciones en glicanos sialiados

Ejemplos de modificación de glicano a identificar	Ejemplos de tratamientos enzimáticos aplicables para la identificación de la modificación de glicano seleccionada*
Polilactosamina	Comparación entre reacciones secuenciales y simultáneas con sialidasa, galactosidasa, galactosidasa, hexosaminidasa sin sialidasa y <i>N</i> -acetilhexosaminidasa.
Fucosilación antenaria	Comparación entre tratamientos secuenciales y simultáneos con sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa.  Comparación entre tratamientos (por ejemplo, secuencial y/o simultáneo) con $\alpha$ -1,3 fucosidasa y $\alpha$ -1,6,3 fucosidasa.  Comparación entre tratamientos (por ejemplo, secuencial y/o simultáneo) con fucosidasa y posteriormente galactosidasa o galactosidasa y posteriormente fucosidasa.  Comparación entre tratamientos (por ejemplo, secuencial y/o simultáneo) con y sin fucosidasa.
Glicano híbrido	Comparación entre reacciones secuenciales y simultáneas con sialidasa, galactosidasa y <i>N</i> -acetilhexosaminidasa, hexosaminidasa y manosidasa.

Ejemplos de modificación de glicano a identificar	Ejemplos de tratamientos enzimáticos aplicables para la identificación de la modificación de glicano seleccionada*
Glicanos sulfatados	Comparación entre reacciones secuenciales y simultáneas con sialidasa, galactosidasa, galactosidasa, hexosaminidasa sin sialidasa y <i>N</i> -acetilhexosaminidasa.
Glicanos fosforilados	Comparación entre tratamientos (por ejemplo, secuencial y/o simultáneo) con y sin manosidasa.
Ácido siálico ligado a GlcNAc	Comparación entre reacciones secuenciales y simultáneas con sialidasa, galactosidasa, galactosidasa, hexosaminidasa sin sialidasa y <i>N</i> -acetilhexosaminidasa.

En algunas realizaciones, los tratamientos enzimáticos para identificar modificaciones en glicanos no sializados se pueden llevar a cabo según se describen en la Tabla 2, con la excepción de que la sialidasa se omite de las reacciones ejemplificadas en la Tabla 2.

#### Análisis de la estructura del glicano

- 5 En general, los métodos según la descripción comprenden someter una preparación de glicanos a un tratamiento con exoglicosidasa. En algunas realizaciones, tras llevar a cabo el tratamiento con exoglicosidasa hasta completarlo, se analiza la estructura y/o identidad de los glicanos escindidos. En algunas realizaciones, se puede extraer una muestra de la preparación de glicanos durante el transcurso del tratamiento con exoglicosidasa. En algunas realizaciones, se puede extraer una pluralidad de muestras, separadas en el tiempo (por ejemplo, a intervalos regulares o irregulares) de la preparación de glicanos durante el transcurso del tratamiento con exoglicosidasa (p. ej., en cualquier punto de tiempo antes de completar el tratamiento con exoglicosidasa). En algunas realizaciones, el tratamiento con exoglicosidasa comprende la administración de al menos una exoglicosidasa, y la etapa de extracción comprende extraer al menos una muestra durante el transcurso de la administración de al menos una exoglicosidasa (p. ej., después de que la exoglicosidasa se haya agregado a la preparación de glicanos, pero antes de que la exoglicosidasa se haya desactivado y/o extraído de la preparación de glicanos). En algunas realizaciones, el tratamiento de exoglicosidasa comprende administración secuencial de al menos una primera y una segunda exoglicosidasas (p. ej., primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y/o más exoglicosidasas), y la etapa de extracción comprende (i) extraer al menos una primera muestra después de la administración de la primera exoglicosidasa pero antes de la administración de la segunda exoglicosidasa; y (ii) extraer al menos una segunda muestra después de la administración de la segunda exoglicosidasa. En algunas realizaciones, la estructura y/o identidad de los glicanos escindidos se analizan en al menos una de las muestras extraídas. En algunas realizaciones, la etapa de analizar comprende comparar la estructura y/o función de glicanos escindidos en una o más de las muestras extraídas con la estructura y/o función de glicanos escindidos en al menos una muestra extraída distinta. En algunas realizaciones, la etapa de analizar comprende comparar la estructura y/o función de los glicanos escindidos en una o más de las muestras extraídas con la estructura y/o función de glicanos escindidos en una muestra de referencia.

La estructura y composición de los *N*-glicanos se puede analizar mediante cualquier método disponible. En algunas realizaciones, la estructura y composición del *N*-glicano se puede analizar mediante métodos cromatográficos, métodos de espectrometría de masas (MS), métodos cromatográficos y posteriormente MS, métodos electroforéticos, métodos electroforéticos y posteriormente MS, métodos de resonancia magnética nuclear (RMN) y sus combinaciones.

En algunas realizaciones, la estructura y composición del *N*-glicano se puede analizar mediante métodos cromatográficos que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía líquida (LC, por su sigla en inglés), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por su sigla en inglés), cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC, por su sigla en inglés), cromatografía de capa delgada (TLC, por su sigla en inglés), cromatografía de columna de amida y sus combinaciones.

En algunas realizaciones, la estructura y composición del *N*-glicano se puede analizar mediante espectrometría de masas (MS) y métodos relacionados que incluyen, pero no se limitan a, MS en tándem, LC-MS, LC-MS/MS, ionización mediante desorción por láser asistida por matriz y espectrometría de masas (MALDI-MS), espectrometría de masas con transformada de Fourier (FTMS, por su sigla en inglés), separación de movilidad iónica con espectrometría de masa (IMS-MS, por su sigla en inglés), disociación por transferencia de electrones (ETD-MS, por su sigla en inglés) y sus combinaciones.

- 5 En algunas realizaciones, la estructura y composición del *N*-glicano se puede analizar mediante métodos electroforéticos que incluyen, pero no se limitan a, electroforesis capilar (CE, por su sigla en inglés), CE-MS, electroforesis en gel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con posterior transferencia Western utilizando anticuerpos que reconocen estructuras de glicano específicas y sus combinaciones.
- 10 En algunas realizaciones, la estructura y composición del *N*-glicano se puede analizar mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y métodos relacionados que incluyen, pero no se limitan a, RMN unidimensional (1D-RMN, por su sigla en inglés), RMN bidimensional (2D-RMN, por su sigla en inglés), espectroscopía de correlación de giro de ángulo magnético RMN (COSY-RMN, por su sigla en inglés), espectroscopía correlacionada total RMN (TOCSY-RMN, por su sigla en inglés), coherencia cuántica heteronuclear RMN (HSQC-RMN, por su sigla en inglés), coherencia cuántica múltiple heteronuclear (HMQC-RMN, por su sigla en inglés), espectroscopía de efecto nuclear Overhauser en el sistema rotatorio RMN (ROESY-RMN, por su sigla en inglés), espectroscopía de Efecto nuclear Overhauser (NOESY-RMN, por su sigla en inglés) y sus combinaciones.
- 15 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente permiten la detección de especies de *N*-glicanos que están presentes a niveles bajos dentro de una población de *N*-glicanos. Por ejemplo, los presentes métodos permiten la detección de especies de *N*-glicano que están presentes a niveles menores que 10 %, menores que 5 %, menores que 4 %, menores que 3 %, menores que 2 %, menores que 1,5 %, menores que 1 %, menores que 0,75 %, menores que 0,5 %, menores que 0,25 %, menores que 0,1 %, menores que 0,075 %, menores que 0,05 %, menores que 0,025 % o menores que 0,01 % dentro de una población de *N*-glicanos.
- 20 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente permiten la detección de ligaduras específicas que están presentes a niveles bajos dentro de una población de *N*-glicanos. Por ejemplo, los presentes métodos permiten la detección de ligaduras específicas que están presentes a niveles menores que 10 %, menores que 5 %, menores que 4 %, menores que 3 %, menores que 2 %, menores que 1,5 %, menores que 1 %, menores que 0,75 %, menores que 0,5 %, menores que 0,25 %, menores que 0,1 %, menores que 0,075 %, menores que 0,05 %, menores que 0,025 % o menores que 0,01 % dentro de una población de *N*-glicanos.
- 25 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente permiten la detección de niveles relativos de especies de *N*-glicanos individuales dentro de una población de *N*-glicanos. Por ejemplo, se puede medir el área debajo de cada pico de un cromatograma de líquidos y expresar como un porcentaje del total. Dicho análisis proporciona una cantidad porcentual relativa de cada especie de *N*-glicano dentro de una población de *N*-glicanos.
- 30 **Aplicaciones**
- La presente descripción proporciona métodos para analizar la estructura y/o composición de cualquier glicano. A modo de ejemplo, la presente descripción proporciona métodos para analizar el patrón de glicosilación de una glicoproteína. La presente descripción abarca el reconocimiento de que determinar el patrón de glicosilación de una glicoproteína tiene muchas aplicaciones potenciales comerciales, industriales y/o terapéuticas.
- 35 Los métodos según la descripción se pueden aplicar a glicanos obtenidos de una variedad amplia de fuentes que incluye, pero no se limita a, formulaciones terapéuticas (por ejemplo, eritropoyetina, insulina, hormona de crecimiento humana, etc.), productos biológicos comerciales (por ejemplo, los presentados en la Tabla 3) y muestras biológicas. Una muestra biológica puede someterse a uno o más análisis y/o etapas de purificación antes de o después del análisis según la presente descripción. A modo de ejemplos, en algunas realizaciones, una muestra biológica se trata con una o más proteasas y/o exoglicosidasas (p. ej., de manera que se liberen los glicanos); en algunas realizaciones, los glicanos en una muestra biológica se etiquetan con uno o más marcadores detectables u otros agentes que pueden facilitar el análisis mediante, por ejemplo, espectrometría de masas o RMN. Cualquiera de una variedad de etapas de separación y/o aislamiento se puede aplicar a una muestra biológica según la presente descripción.
- 40 Los métodos de la presente descripción se pueden utilizar para analizar glicanos en cualquiera de una variedad de estados que incluyen, por ejemplo, glicanos libres, glicoconjugados (por ejemplo, glicopéptidos, glicolípidos, proteoglicanos, etc.), glicanos asociados a células (por ejemplo, glicanos asociados al núcleo, citoplasma, membrana celular, etc.); glicanos asociados con componentes celulares, extracelulares, intracelulares y/o subcelulares (por ejemplo, proteínas); glicanos en el espacio extracelular (por ejemplo, un cultivo celular), etc.
- 45 Los métodos de la presente descripción se pueden usar en una o más estadios del desarrollo del proceso para la producción de una glicoproteína terapéutica u otra relevante comercialmente de interés. Los ejemplos no limitantes de dichos estadios de desarrollo del proceso que pueden emplear métodos de la presente descripción incluyen selección celular, selección clonal, optimización de medios, condiciones de cultivo, condiciones de proceso y/o procedimiento de purificación. Los expertos en la técnica conocerán otros estadios de desarrollo del proceso.
- 50 La presente descripción también se puede utilizar para monitorizar la extensión y/o tipo de glicosilación que se produce en un cultivo celular específico, permitiendo así el ajuste o la posible terminación del cultivo a efectos de,
- 55



por ejemplo, lograr un patrón de glicosilación deseado específico o evitar el desarrollo de un patrón de glicosilación indeseado específico.

5 La presente descripción también se puede utilizar para evaluar características de glicosilación de células o líneas celulares que se contemplan para la producción de una glicoproteína deseada específica (por ejemplo, incluso antes de que las células o líneas celulares hayan sido manipuladas para producir la glicoproteína o para producir la glicoproteína a un nivel comercialmente relevante).

10 Por ejemplo, cuando la glicoproteína objetivo es una glicoproteína terapéutica, por ejemplo, que se ha sometido a revisión reglamentaria en uno o más países, a menudo será deseable monitorizar los cultivos para evaluar la probabilidad de que generarán un producto con un patrón de glicosilación lo más cercano posible al patrón de glicosilación establecido del producto farmacéutico, ya sea que se esté produciendo o no a través de exactamente la misma vía. Como se usa en la presente, «cercano» hace referencia a un patrón de glicosilación que tiene al menos alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de correlación con el patrón de glicosilación establecido del producto farmacéutico. En dichas realizaciones, las muestras del cultivo de producción típicamente se toman en múltiples puntos de tiempo y se comparan con un estándar establecido o con un cultivo testigo a efectos de evaluar la glicosilación relativa.

15 Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos para monitorizar la producción de una glicoproteína pueden comprender las etapas de (i) durante a producción de una glicoproteína, extraer al menos una primera y segunda muestras que contienen glicano del sistema de producción; (ii) someter cada una de la primera y segunda muestras que contienen glicano a un procedimiento con exoglicosidasa, para escindir específicamente monosacáridos de los extremos no reductores de los glicanos ligados por *N* en las muestras que contienen glicano; y (iii) comparar los productos de escisión obtenidos de la primera muestra que contiene glicano con los de la segunda muestra que contiene glicanos con el fin de determinar las diferencias y, por lo tanto, monitorizar el progreso de la producción de la glicoproteína.

20 En algunas realizaciones, los métodos para monitorizar la producción de una glicoproteína implican extraer al menos una muestra que contiene glicano en algún punto durante la reacción con exoglicosidasa (p. ej., procedimiento con exoglicosidasa). En algunas realizaciones, los métodos para monitorizar la producción de una glicoproteína implican extraer al menos una muestra que contiene glicano antes de que se complete la reacción con exoglicosidasa. En algunas realizaciones, los métodos para monitorizar la producción de una glicoproteína implican extraer al menos una muestra que contiene glicano luego de que se haya completado la reacción con exoglicosidasa. En algunas realizaciones, al menos una muestra que contiene glicano se extrae cuando el procedimiento con exoglicosidasa está alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 % completo, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 99 %, casi 100 %, sustancialmente 100 % o 100 % completo. En algunas realizaciones, se extrae al menos una muestra que contiene glicano cuando la reacción con exoglicosidasa está casi 100 % completa. En algunas realizaciones, se extrae al menos una muestra que contiene glicano cuando la reacción con exoglicosidasa está 100 % completa. En algunas realizaciones, se extrae al menos una muestra que contiene glicano antes de que la reacción con exoglicosidasa esté 100 % completa.

25 En algunas realizaciones, las muestras que contienen glicano comprenden glicoconjugados (p. ej., glicoproteínas). En algunas realizaciones, se extrae al menos una muestra que contiene glicano antes de que se haya escindido el 100 % de los glicoconjugados. En algunas realizaciones, se extrae al menos una muestra que contiene glicano cuando se ha escindido el 100 % de los glicoconjugados. En algunas realizaciones, al menos una muestra que contiene glicano se extrae cuando alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 % completo, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 99 %, casi 100 %, sustancialmente 100 % o 100 % de los glicoconjugados se ha escindido. En algunas realizaciones, se extrae al menos una muestra que contiene glicano cuando se ha escindido el 100 % de los glicoconjugados. En algunas realizaciones, se extrae al menos una muestra que contiene glicano antes de que se haya escindido el 100 % de los glicoconjugados.

30 En algunas realizaciones, las muestras que contienen glicano se extraen a intervalos regulares. En algunas realizaciones, las muestras que contienen glicano se extraen en intervalos de alrededor de 30 segundos, alrededor de 1 minuto, alrededor de 2 minutos, alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 5 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 12 horas o alrededor de 18 horas o en intervalos incluso más extensos. En algunas realizaciones, las muestras que contienen glicano se extraen a intervalos irregulares. En algunas realizaciones, las muestras que contienen glicano se extraen a intervalos de 5 horas.

35 En algunas realizaciones de la presente descripción, un patrón de glicosilación deseado será más extensivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado muestra elevada (por ejemplo, mayor que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más) ocupación de sitios de

glicosilación; en algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado muestra un grado de ramificación elevado (por ejemplo, mayor que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más tiene estructuras tri o tetra-antenarias).

- 5 En algunas realizaciones de la presente descripción, un patrón de glicosilación deseado será menos extensivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un patrón de glicosilación de superficie celular deseado muestra baja (por ejemplo, menor que alrededor de 50 %, alrededor de 45 %, alrededor de 40 %, alrededor de 35 %, alrededor de 30 %, alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 15 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos) ocupación de sitios de glicosilación; y/o un bajo grado de ramificación (por ejemplo, menor que  
10 alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos tiene estructuras tri o tetra-antenarias).

En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado será más extensivo en algunos aspectos y menos extensivo en otros. Por ejemplo, puede ser deseable emplear una línea celular que tiende a producir glicoproteínas con cadenas de oligosacáridos largas, no ramificadas. Alternativamente, puede ser deseable emplear una línea celular que tiende a producir glicoproteínas con cadenas de oligosacáridos cortas, altamente ramificadas.  
15

En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado estará enriquecido para un tipo específico de estructura de glicano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado tendrá niveles bajos (*por ejemplo*, menores que alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos) de estructuras con manosa elevada o híbridas, niveles altos (*por ejemplo*, mayores que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más) de estructuras con manosa elevada, niveles altos (*por ejemplo*, mayores que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más; por ejemplo, al menos una por glicoproteína) de manosa elevada fosforilada o niveles bajos (*por ejemplo*, menores que alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos) de manosa elevada fosforilada.  
20  
25

En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado incluirá al menos alrededor de un ácido siálico. En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado incluirá un nivel elevado (*por ejemplo*, mayor que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más) de extremos que están sialilados. En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación que incluye sialilación exhibirá al menos alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más de ácido *N*-acetilneuramínico y/o menos que alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos de ácido *N*-glicolilneuramínico.  
30

En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado exhibe especificidad de alargamiento de ramificaciones (*por ejemplo*, más de alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más de la extensión se produce en ramificaciones de  $\alpha$ 1,6 manosa; o más del alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más de la extensión se producen en ramificaciones de  $\alpha$ 1,3 manosa).  
35  
40

En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado incluirá un nivel bajo (*por ejemplo*, menor que alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos) o un nivel elevado (*por ejemplo*, mayor que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más) de fucosilación nuclear.  
45

En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado incluirá un nivel bajo (*por ejemplo*, menor que alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos) o un nivel elevado (*por ejemplo*, mayor que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más) de un glicano sulfatado.  
50

En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado incluirá un nivel bajo (*por ejemplo*, menor que alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos) o un nivel elevado (*por ejemplo*, mayor que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más) de un glicano fosforilado.  
55

En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado incluirá un nivel bajo (*por ejemplo*, menor que alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos) o un nivel

elevado (*por ejemplo*, mayor que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más) de un ácido siálico ligado a una *N*-acetilglucosamina.

5 En algunas realizaciones, un patrón de glicosilación deseado incluirá un nivel bajo (*por ejemplo*, menor que alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 1 % o menos) o un nivel elevado (*por ejemplo*, mayor que alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más) de un glicano acetilado.

10 Ya sea que se esté monitorizando o no la producción de una proteína objetivo específica con el fin de controlar la calidad, la presente descripción puede utilizarse, por ejemplo, para monitorizar la glicosilación en estadios específicos del desarrollo o en condiciones de crecimiento específicas.

15 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente se pueden usar para caracterizar y/o controlar o comparar la calidad de productos terapéuticos. A modo de ejemplo, las presentes metodologías se pueden usar para evaluar la glicosilación en células que producen un producto proteico terapéutico. En particular, dado que la glicosilación, a menudo, puede afectar la actividad, biodisponibilidad u otras características de un producto proteico terapéutico, los métodos para evaluar la glicosilación celular durante la producción de dicho producto proteico terapéutico son particularmente deseables. Entre otras cosas, la presente descripción puede facilitar el análisis en tiempo real de la glicosilación en los sistemas de producción para proteínas terapéuticas.

20 Los productos de glicoproteína terapéuticos representativos cuya producción y/o calidad se puede monitorizar según la presente descripción incluyen, por ejemplo, cualquiera de una variedad de agentes hematológicos (incluidos, por ejemplo, eritropoyetina, factores de coagulación sanguínea, etc.), interferones, factores estimulantes de colonias, anticuerpos, enzimas y hormonas.

Los productos de glicoproteína disponibles en el mercado representativos incluyen, por ejemplo, los que se presentan en la Tabla 3:

25 Tabla 3: Productos de glicoproteína disponibles en el mercado de ejemplo

Producto proteico	Fármaco de referencia
interferón gama-1b	Actimmune <sup>®</sup>
alteplasa; activador del plasminógeno tisular	Activase <sup>®</sup> /Cathflo <sup>®</sup>
Factor antihemofílico recombinante	Advate
albúmina humana	Albutein <sup>®</sup>
laronidasa	Aldurazyme <sup>®</sup>
interferón alfa-N3, derivado de leucocitos humanos	Alferon N <sup>®</sup>
factor antihemofílico humano	Alphanate <sup>®</sup>
factor de coagulación humano IX filtrado por virus	AlphaNine <sup>®</sup> SD
Alefcept; proteína de fusión dimérica LFA3-Ig recombinante	Amevive <sup>®</sup>
bivalirudina	Angiomax <sup>®</sup>
darbepoetina alfa	Aranesp <sup>™</sup>
Bevacizumab	Avastin <sup>™</sup>
interferón beta-1a; recombinante	Avonex <sup>®</sup>

ES 2 626 080 T3

Producto proteico	Fármaco de referencia
factor de coagulación IX	BeneFix <sup>™</sup>
Interferón beta-1b	Betaseron <sup>®</sup>
Tositumomab	Bexxar <sup>®</sup>
factor antihemofílico	Bioclata <sup>™</sup>
hormona de crecimiento humana	BioTropin <sup>™</sup>
toxina botulínica tipo A	Botox <sup>®</sup>
Alemtuzumab	Campath <sup>®</sup>
acritumomab; etiquetado con tecnecio-99	CEA-Scan <sup>®</sup>
alglucerasa; forma modificada de beta-glucocerebrosidasa	Ceredase <sup>®</sup>
imiglucerasa; forma recombinante de beta-glucocerebrosidasa	Cerezyme <sup>®</sup>
Fab inmune polivalente contra crotalidae, ovino	CroFab <sup>™</sup>
Fab inmune contra digoxina, ovino	DigiFab <sup>™</sup>
Rasburicasa	Elitek <sup>®</sup>
Etanercept	Enbrel <sup>®</sup>
epoetina alfa	Epogen <sup>®</sup>
Cetuximab	Erbix <sup>™</sup>
algasidasa beta	Fabrazyme <sup>®</sup>
Urofolitropina	Fertinex <sup>™</sup>
folitropina beta	Follistim <sup>™</sup>
teriparatida	Forteo <sup>®</sup>
somatropina humana	GenoTropin <sup>®</sup>
glucagón	GlucaGen <sup>®</sup>
folitropina alfa	Gonal-F <sup>®</sup>
factor antihemofílico	Helixate <sup>®</sup>
Factor antihemofílico; Factor XIII	Hemofil <sup>®</sup>

ES 2 626 080 T3

Producto proteico	Fármaco de referencia
insulina	Humalog <sup>®</sup>
factor antihemofílico/factor de von Willebrand complejo humano	Humate-P <sup>®</sup>
Somatotropina	Humatrope <sup>®</sup>
adalimumab	HUMIRA <sup>™</sup>
insulina humana	Humulin <sup>®</sup>
hialuronidasa humana recombinante	Hylenex <sup>™</sup>
interferón alfacon-1	Infergen <sup>®</sup>
Eptifibatida	Integrilin <sup>™</sup>
alfa-interferón	Intron A <sup>®</sup>
palifermina	Kepivance
anakinra	Kineret <sup>™</sup>
factor antihemofílico	Kogenate <sup>®</sup> FS
insulina glargina	Lantus <sup>®</sup>
factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos	Leukine <sup>®</sup> /Leukine <sup>®</sup> Líquido
lutropina alfa, para inyección	Luveris
OspA lipoproteína	LYMErix <sup>™</sup>
Ranibizumab	Lucentis <sup>®</sup>
gemtuzumab ozogamicina	Mylotarg <sup>™</sup>
Galsulfasa	Naglazyme <sup>™</sup>
Nesiritida	Natrecor <sup>®</sup>
Pegfilgrastim	Neulasta <sup>™</sup>
Oprelvekina	Neumega <sup>®</sup>
Filgrastim	Neupogen <sup>®</sup>
Fanolesomab	NeuroSpec <sup>™</sup> (anteriormente LeuTech <sup>®</sup> )
somatropina [ADNr]	Norditropin <sup>®</sup> /Norditropin Nordiflex <sup>®</sup>

ES 2 626 080 T3

Producto proteico	Fármaco de referencia
insulina; suspensión en cinc;	Novolin L <sup>®</sup>
insulina; suspensión en isofana	Novolin N <sup>®</sup>
insulina, regular;	Novolin R <sup>®</sup>
Insulina	Novolin <sup>®</sup>
factor de coagulación VIIa	NovoSeven <sup>®</sup>
Somatropina	Nutropin <sup>®</sup>
inmunoglobulina intravenosa	Octagam <sup>®</sup>
PEG-L-asparaginasa	Oncaspar <sup>®</sup>
abatacept, proteína de fusión soluble completamente humana	Orencia <sup>™</sup>
muromomab-CD3	Orthoclone OKT3 <sup>®</sup>
gonadotropina coriónica humana	Ovidrel <sup>®</sup>
peginterferón alfa-2a	Pegasys <sup>®</sup>
versión pegilada de interferón alfa-2b	PEG-Intron <sup>™</sup>
Abarelix (suspensión inyectable); antagonista hormonal liberador de gonadotropina	Plenaxis <sup>™</sup>
epoetina alfa	Procrit <sup>®</sup>
Aldesleucina	Proleucina, IL-2 <sup>®</sup>
Somatrem	Protropin <sup>®</sup>
dornasa alfa	Pulmozyme <sup>®</sup>
Efalizumab; bloqueador de linfocitos T reversible, selectivo	Raptiva <sup>™</sup>
combinación de ribavirina y alfa interferón	Rebetron <sup>™</sup>
Interferón beta 1a	Rebif <sup>®</sup>
factor antihemofílico	Recombinate <sup>®</sup>
rAHF/factor antihemofílico	ReFacto <sup>®</sup>
Lepirudina	Refludan <sup>®</sup>
Infliximab	Remicade <sup>®</sup>

Producto proteico	Fármaco de referencia
abciximab	ReoPro <sup>™</sup>
reteplasa	Retavase <sup>™</sup>
Rituximab	Rituxan <sup>™</sup>
interferón alfa-2a	Roferon-A <sup>®</sup>
Somatropina	Saizen <sup>®</sup>
secretina porcina sintética	SecreFlo <sup>™</sup>
Basiliximab	Simulect <sup>®</sup>
eculizumab	Soliris <sup>®</sup>
pegvisomant	Somavert <sup>®</sup>
Palivizumab; Abm humanizado, producido recombinantemente	Synagis <sup>™</sup>
tirotropina alfa	Thyrogen <sup>®</sup>
tenecteplasa	TNKase <sup>™</sup>
Natalizumab	Tysabri <sup>®</sup>
inmunoglobulina humana intravenosa soluciones al 5 % y 10 %	Venoglobulin-S <sup>®</sup>
interferón alfa-n1, linfoblastoide	Wellferon <sup>®</sup>
drotrecogina alfa	Xigris <sup>™</sup>
Omalizumab; anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante orientado a inmunoglobulina-E	Xolair <sup>®</sup>
Daclizumab	Zenapax <sup>®</sup>
ibritumomab tiuxetan	Zevalin <sup>™</sup>
Somatotropina	Zorbtive <sup>™</sup> (Serostim <sup>®</sup> )

5 En algunas realizaciones, la descripción proporciona métodos en los que se comparan entre sí glicanos de diferentes fuentes o muestras. En algunos de dichos ejemplos, se obtienen múltiples muestras de la misma fuente en el tiempo, con el fin de monitorizar los cambios en los patrones de glicosilación (y particularmente en los patrones de glicosilación de superficie celular). En algunas realizaciones, una de las muestras es una muestra histórica o un registro de una muestra histórica. En algunas realizaciones, una de las muestras es una muestra de referencia.

10 En algunas realizaciones, se comparan glicanos de diferentes muestras de cultivos celulares preparados en condiciones que difieren en uno o más parámetros seleccionados (p. ej., tipo de célula, tipo de cultivo [p. ej., alimentación continua con respecto a alimentación por lote, etc.], condiciones de cultivo [p. ej., tipo de medios, presencia o concentración de un componente específico de medio(s) específico(s), osmolaridad, pH, temperatura, momento o grado de desplazamiento en una o más componentes tales como osmolaridad, pH, temperatura, etc.], tiempo de cultivo, etapas de aislamiento, etc.) pero que de otra forma son idénticos, con el fin de determinar los efectos del parámetro seleccionado sobre los patrones de *N*-glicosilación. En determinadas realizaciones, se

comparan glicanos de diferentes muestras de cultivos celulares preparados en condiciones que difieren en un único parámetro seleccionado con el fin de determinar los efectos del único parámetro seleccionado sobre los patrones de glicosilación. Por consiguiente, entre otras aplicaciones, el uso de las técnicas descritas en la presente puede facilitar la determinación de los efectos de parámetros específicos sobre los patrones de glicosilación en las células.

5 En algunas realizaciones, se comparan glicanos de diferentes lotes de una glicoproteína de interés (p. ej., una glicoproteína terapéutica), ya sean preparados mediante el mismo método o mediante métodos diferentes y ya sean preparados de forma simultánea o por separado. En dichas realizaciones, la presente descripción facilita el control de la calidad de la preparación de glicoproteína. Alternativa o adicionalmente, algunas de dichas realizaciones facilitan la monitorización del progreso de un cultivo específico que produce una glicoproteína de interés (p. ej., cuando se extraen muestras del cultivo en puntos de tiempo diferentes y se analizan y comparan entre sí). En algunos ejemplos, se obtienen múltiples muestras de la misma fuente en el tiempo, con el fin de monitorizar los cambios en los patrones de glicosilación. En algunas realizaciones, las muestras que contienen glicano se extraen en intervalos de alrededor de 30 segundos, alrededor de 1 minuto, alrededor de 2 minutos, alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 5 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 12 horas o alrededor de 18 horas o en intervalos incluso más extensos. En algunas realizaciones, las muestras que contienen glicano se extraen a intervalos irregulares. En algunas realizaciones, las muestras que contienen glicano se extraen a intervalos de 5 horas.

20 En algunas realizaciones, los métodos según la descripción se pueden utilizar para monitorizar el patrón de glicosilación de glicoproteínas durante el transcurso de su producción por parte de las células. Por ejemplo, la producción de una glicoproteína (p. ej., producción comercial) puede implicar las etapas de (1) cultivar células que producen la glicoproteína, (2) obtener muestras a intervalos regulares o irregulares durante el cultivo, y (3) analizar el patrón de glicosilación de la o las glicoproteínas producidas en la o las muestras obtenidas. En algunas realizaciones, dichos métodos pueden comprender una etapa de comparar entre sí los patrones de glicosilación de la o las glicoproteínas producidas en las muestras obtenidas. En algunas realizaciones, dichos métodos pueden comprender una etapa de comparar los patrones de glicosilación de la o las glicoproteínas producidas en la o las muestras obtenidas con el patrón de glicosilación de una muestra de referencia.

30 En cualquiera de estas realizaciones, se pueden registrar las características del análisis de glicano, por ejemplo, en un registro de control de calidad. Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, se hace una comparación con un registro histórico de un lote anterior o estándar y/o con una muestra de referencia de glicoproteína.

35 En algunas realizaciones, se comparan glicanos de diferentes lotes de una glicoproteína de interés (p. ej., una glicoproteína terapéutica), ya sean preparados mediante el mismo método o mediante métodos diferentes y ya sean preparados de forma simultánea o por separado, entre sí y/o con una muestra de referencia. En algunas realizaciones, la comparación lote a lote puede comprender las etapas de (i) proporcionar una primera preparación de glicano a partir de un primer lote de la glicoproteína; (ii) proporcionar una segunda preparación de glicano a partir de un segundo lote de la glicoproteína; (iii) someter cada una de la primera y segunda preparación de glicano a un procedimiento con exoglicosidasa (p. ej., tratamiento secuencial y/o simultáneo con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más exoglicosidasas), para escindir específicamente monosacáridos de los extremos no reductores de glicanos ligados por *N* en las preparaciones de glicano; y (iv) comparar los productos de escisión obtenidos de la primera preparación de glicano con los productos de escisión obtenidos de la segunda preparación con el fin de evaluar la consistencia de los dos lotes. En algunas realizaciones, se pueden proporcionar preparaciones de glicano al extraer al menos un *N*-glicano de al menos una glicoproteína de un lote y, opcionalmente, aislar los *N*-glicanos extraídos. En algunas realizaciones, las preparaciones de glicano se pueden etiquetar como se describe en la presente (*por ejemplo*, fluorescentemente y/o radioactivamente; *por ejemplo*, antes y/o después del aislamiento).

45 En algunas realizaciones, la presente descripción facilita el control de la calidad de la preparación de glicoproteína. Las características del análisis de glicano se pueden registrar, *por ejemplo*, en un registro de control de calidad. Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, se hace una comparación con un registro histórico de un lote anterior o estándar de glicoproteína. En algunas realizaciones, se hace una comparación con una muestra de glicoproteína de referencia.

50 En determinadas realizaciones, la presente descripción se puede utilizar en estudios para modificar las características de glicosilación de una célula, *por ejemplo*, para establecer una línea celular y/o condiciones de cultivo con una o más características de deseables. Dicha línea celular y/o condiciones de cultivo luego se pueden utilizar, si se desea, para la producción de un glicoconjugado objetivo específico (p. ej., glicoproteína) para el cual se espera que dicha o dichas características de glicosilación sean beneficiosas.

55 En determinadas realizaciones, se aplican técnicas según la descripción a glicanos que están presentes en la superficie de las células. En algunas de dichas realizaciones, los glicanos analizados están sustancialmente libres de glicanos que no están en la superficie celular. En algunas de dichas realizaciones, los glicanos analizados, cuando están presentes sobre la superficie celular, están presentes en el contexto de uno o más glicoconjugados de



- 5 superficie celular (p. ej., glicoproteínas o glicolípidos). En determinadas realizaciones, el patón de glicosilación de una glicoproteína de superficie celular unida a la membrana o transmembranaria se puede determinar al (1) liberar la glicoproteína mediante tratamiento con una o más proteasas; (2) aislar una población de glicanos al digerir la glicoproteína liberada con glicanasa; (3) digerir la población de glicanos mediante digestión con exoglicosidasa según cualquiera de los métodos descritos en la presente; y (4) analizar los productos de digestión utilizando cualquier método disponible para un experto en la técnica.
- 10 En algunas realizaciones específicas, los glicanos de superficie celular se analizan a efectos de evaluar la glicosilación de una o más glicoproteínas de interés objetivo, particularmente cuando dichas glicoproteínas objetivo no son glicoproteínas de superficie celular. En algunas realizaciones, se puede monitorizar la glicosilación de una glicoproteína objetivo sin aislar la propia glicoproteína. En determinadas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos para usar glicanos de superficie celular como una lectura de o un sustituto para estructuras de glicano sobre una glicoproteína expresada de interés. En determinadas realizaciones, dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, proceso, lote, barrido o mediciones «en línea» posteriores de la calidad del producto. Dichos métodos pueden proporcionar una medición independiente del patrón de glicosilación de una glicoproteína de interés producida utilizando un subproducto de la reacción de producción (*por ejemplo*, las células) sin requerir el uso de la destrucción de ninguna glicoproteína producida. Además, los métodos según la descripción pueden evitar el esfuerzo necesario para el aislamiento del producto y la potencial selección de Glicofomas del producto que se puede producir durante el aislamiento.
- 15 En determinadas realizaciones, se aplican técnicas según la descripción a glicanos que se secretan a partir de células. En algunas de dichas realizaciones, los glicanos analizados son producidos por células en el contexto de un glicoconjugado (p. ej., una glicoproteína o glicolípidos).
- 20 Según la presente descripción, las técnicas descritas en la presente se pueden usar para detectar glicanos deseables o indeseables, por ejemplo, para detectar o cuantificar la presencia de uno o más contaminantes en un producto o para detectar o cuantificar la presencia de una o más especies activas o deseadas.
- 25 En diversas realizaciones, los métodos se pueden usar para detectar biomarcadores indicadores de, *p. ej.*, un estado de enfermedad, antes de la aparición de los síntomas y/o la evolución de un estado de enfermedad a una condición intratable o menos tratable, al detectar uno o más glicanos específicos cuya presencia o nivel (ya sea absoluto o relativo) se puede correlacionar con un estado de enfermedad específico (incluida la susceptibilidad a una enfermedad específica) y/o el cambio en la concentración de dichos glicanos en el tiempo.
- 30 En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente facilitan la detección de glicanos que están presentes a niveles muy bajos en una fuente (p. ej., una muestra biológica, preparación de glicano, etc.). En dichas realizaciones, es posible detectar y/u opcionalmente cuantificar los niveles de glicanos que están presentes a niveles menores que alrededor de 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1,5 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,1 %, 0,075 %, 0,05 %, 0,025 % o 0,01 % dentro de una población de glicanos. En algunas realizaciones, es posible detectar y/u
- 35 opcionalmente cuantificar los niveles de glicanos que comprenden entre 0,1 % y 5 %, p. ej., entre 0,1 % y 2 %, p. ej., entre 0,1 % y 1 % de una preparación de glicano. En determinadas realizaciones, es posible detectar y/u opcionalmente cuantificar los niveles de glicanos de superficie celular a entre alrededor de 0,1 fmol a alrededor de 1 mmol.
- 40 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente permiten la detección de ligaduras específicas que están presentes a niveles bajos dentro de una población de glicanos. Por ejemplo, los presentes métodos permiten la detección de ligaduras específicas que están presentes a niveles menores que 10 %, menores que 5 %, menores que 4 %, menores que 3 %, menores que 2 %, menores que 1,5 %, menores que 1 %, menores que 0,75 %, menores que 0,5 %, menores que 0,25 %, menores que 0,1 %, menores que 0,075 %, menores que 0,05 %, menores que 0,025 % o menores que 0,01 % dentro de una población de glicanos.
- 45 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente permiten la detección de niveles relativos de especies de glicanos individuales dentro de una población de glicanos. Por ejemplo, se puede medir el área debajo de cada pico de un cromatógrafo de líquidos y expresar como un porcentaje del total. Dicho análisis proporciona una cantidad porcentual relativa de cada especie de glicano dentro de una población de glicanos.
- 50 En algunas realizaciones, las técnicas descritas en la presente se pueden combinar con una o más tecnologías distintas para la detección, análisis y/o aislamiento de glicanos o glicoconjugados. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los glicanos se analizan según la presente descripción utilizando uno o más métodos disponibles (para dar algunos ejemplos, véase Anumula, Anal. Biochem. 350(1):1, 2006; Klein et al., Anal. Biochem., 179:162, 1989; y/o Townsend, R.R. Carbohydrate Analysis" High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis., Ed. Z. El Rassi, págs. 181-209, 1995). Por ejemplo, en algunas realizaciones, los glicanos se caracterizan usando uno o más métodos cromatográficos, métodos electroforéticos, métodos de resonancia magnética nuclear y sus combinaciones. Los ejemplos de dichos métodos incluyen, por ejemplo, RMN, espectrometría de masas, cromatografía líquida, cromatografía bidimensional, SDS-PAGE, tinción de anticuerpos,
- 55

cuantificación de monosacáridos, electroforesis capilar, electroforesis de carbohidrato asistida por fluoróforo (FACE, por su sigla en inglés), cromatografía electrocinética micelar (MEKC, por su sigla en inglés), tratamiento con exoglicosidasa o endoglicosidasa y sus combinaciones. Los expertos en la técnica conocerán otros métodos que se pueden utilizar para caracterizar glicanos junto con los métodos IMAC descritos en la presente.

- 5 En algunas realizaciones, la estructura y composición del glicano se puede analizar mediante métodos cromatográficos que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC), cromatografía de capa delgada (TLC), cromatografía de columna de amida y sus combinaciones.

- 10 En algunas realizaciones, la estructura y composición del glicano se puede analizar mediante espectrometría de masas (MS) y métodos relacionados que incluyen, pero no se limitan a, MS en tándem, LC-MS, LC-MS/MS, ionización mediante desorción por láser asistida por matriz y espectrometría de masas (MALDI-MS), espectrometría de masas con transformada de Fourier (FTMS), separación de movilidad iónica con espectrometría de masa (IMS-MS), disociación por transferencia de electrones (ETD-MS) y sus combinaciones.

- 15 En algunas realizaciones, la estructura y composición del glicano se puede analizar mediante métodos electroforéticos que incluyen, pero no se limitan a, electroforesis capilar (CE), CE-MS, electroforesis en gel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con posterior transferencia Western utilizando anticuerpos que reconocen estructuras de glicano específicas y sus combinaciones.

- 20 En algunas realizaciones, la estructura y composición del glicano se puede analizar mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y métodos relacionados que incluyen, pero no se limitan a, RMN unidimensional (1D-RMN), RMN bidimensional (2D-RMN), espectroscopía de correlación de giro de ángulo magnético RMN (COSY-RMN), espectroscopía correlacionada total RMN (TOCSY-RMN), coherencia cuántica heteronuclear RMN (HSQC-RMN), coherencia cuántica múltiple heteronuclear (HMQC-RMN), espectroscopía de efecto nuclear Overhauser en el sistema rotatorio RMN (ROESY-RMN), espectroscopía de Efecto nuclear Overhauser (NOESY-RMN) y sus combinaciones.

- 25 La presente descripción se entenderá más específicamente en referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, se entenderá que la presente descripción no está limitada por estos ejemplos en ningún sentido.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Digestión escalonada de *N*-glicanos con exoglicosidasas

- 30 Materiales y métodos

Preparación de muestras

- 35 Se liberaron *N*-glicanos de una glicoproteína de ejemplo purificada mediante *N*-glicanasa F y posteriormente una etapa de limpieza para extraer sales, detergentes, proteínas y material que no era glicano. Las proteínas primero se desnaturalizaron por calor y luego se tratar con un exceso de *N*-glicanasa F durante toda la noche a 37 °C en presencia de SDS. Los glicanos liberados se aislaron de las sales y enzimas utilizando una columna de carbón grafitizado (por ejemplo, EnviCarb). Los *N*-glicanos se etiquetaron de manera fluorescente en el extremo reductor (*N*-glicano-2AB) y el exceso de etiqueta se extrajo mediante una etapa de limpieza adicional. La etiqueta 2-AB primero se disolvió en ácido acético al 30 % en disolución de DMSO y se agregó cianoborohidruro de sodio hasta una concentración final de 1,2 M. Se agregaron alrededor de 5-10 µl de esta disolución de etiquetado a los glicanos secos y se calentaron hasta 65 °C durante 3 horas para permitir que se completase el etiquetado. A continuación, los glicanos etiquetados se aislaron de la etiqueta libre y las sales al aplicar la muestra a un cartucho Glycoclean S, lavaron con acetonitrilo al 96 % y eluir con agua.

Reacciones con exoglicosidasa

- 45 Las mezclas de glicano (0,25 nmol/µl - 0,5 nmol/µl) se sometieron a un tratamiento escalonado con al menos dos exoglicosidasas (1 µl - 2 µl de glicosidasa de grado de secuencia por 20 µl - 40 µl de volumen de reacción) seleccionadas del grupo que consiste en sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa. Típicamente, las reacciones se llevaron a cabo a pH ~5,5. Después de cada etapa de un análisis escalonado, la enzima se desactivó antes de agregar la siguiente enzima.

Análisis de productos de digestión

- 50 Los productos de digestión se resolvieron mediante cromatografía líquida (LC) sobre una columna de amida que se acopló para espectrometría de masas (MS). La identificación estructural de los picos de glicano se logró mediante

ionización mediante desorción por láser asistida por matriz y espectrometría de masas (MALDI-MS). Los tiempos de retención de glicano se compararon con los de estándares conocidos y con los de una escala de glucosa.

Resultados

5 Tras el tratamiento escalonado exhaustivo con exoglicosidasas, la mayoría de los *N*-glicanos se digirió hasta un núcleo M3N2 conservado con algunos picos menores que se eluyeron posteriormente en el cromatograma (Figura 2B). La espectrometría de masas (MS) confirmó que los picos menores correspondían a lactosamina (Figura 2B). La Figura 2A muestra el cromatograma del *N*-glicano antes de la digestión.

Ejemplo 2: Digestión simultánea de *N*-glicanos con múltiples exoglicosidasas

Materiales y métodos

10 Preparación de muestras y análisis de productos de digestión

Los *N*-glicanos se prepararon y los productos de digestión se analizaron según se describe en el Ejemplo 1.

Reacciones con exoglicosidasa

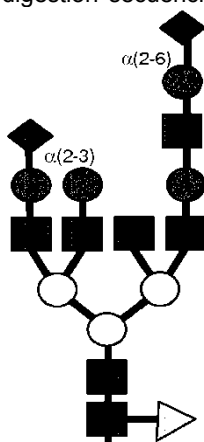
15 Las mezclas de glicano (0,25 nmol/μl - 0,5 nmol/μl) se sometieron a un tratamiento simultáneo con al menos dos exoglicosidasas (1 μ - 2 μl de glicosidasa de grado de secuencia por 20 μl - 40 μl de volumen de reacción) seleccionadas del grupo que consiste en sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa. Típicamente, las reacciones se llevaron a cabo a pH ~5,5.

Resultados

20 Cuando los *N*-glicanos se trataron de forma simultánea con dos o más exoglicosidasas, la mayoría de las estructuras de *N*-glicano colapsaron hasta un núcleo conservado (M3N2). Las extensiones de lactosamina se eliminan debido a la presencia simultánea de actividades de galactosidasa y hexosaminidasa. Como se muestra en la Figura 3, hay algunas especies con tiempos de retención LC de 30 - 70 minutos que fueron resistentes a todas las exoglicosidasas utilizadas. El hecho de que estas especies son refractarias al tratamiento con exoglicosidasa convencional indica que contienen modificaciones inusuales, que se pueden identificar mediante análisis MS y se pueden cuantificar midiendo las áreas de pico como un porcentaje del total.








25 Ejemplo 3: Determinación de la presencia de grupos lactosamina en un *N*-glicano utilizando digestión con exoglicosidasa simultánea y secuencial

30 Los protocolos de digestión con exoglicosidasa secuencial con respecto a simultánea se pueden utilizar para obtener información sobre la estructura y/o composición de *N*-glicanos en una preparación de glicano. Por ejemplo, se puede determinar la presencia de grupos lactosamina al comparar los productos de digestión generados mediante una digestión secuencial y una simultánea, como se señala en la Tabla 4 para la estructura de *N*-glicano hipotética:



35 Todas las exoglicosidasas que se muestran en la Tabla 4 tienen amplia especificidad de sustrato, es decir, eliminarán por escisión el azúcar terminal de un extremo no reductor independientemente del tipo de ligadura. Una comparación de los tratamientos secuencial (Q) y simultáneo (S) Rx04 o Rx05 permite confirmar la presencia de grupos polilactosamina en una preparación de glicano.

Tabla 4. Digestión secuencial con respecto a simultánea con exoglicosidasas

Enzima	Rx01	Rx02 S o Q	Rx03 S o Q	Rx04 S	Rx04 Q	Rx05 S	Rx05 Q
$\alpha$ -2/3,6,8,9-sialidasa	---	X	X	X	X	X	X
$\beta$ -1/3,4,6-galactosidasa	---	---	X	X	X	X	X
$\beta$ -1,4-hexosaminidasa	---	---	---	X	X	X	X
$\alpha$ -1/3,4,6-fucosidasa	---	---	---	---	---	X	X
Productos de digestión							

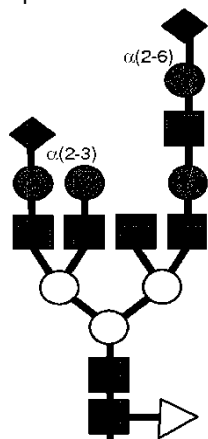
Como se muestra en la Tabla 4, Rx04 (S) y Rx04 (Q) representan cada uno la digestión del mismo *N*-glicano con conjuntos idénticos de enzimas (sialidasa, galactosidasa y hexosaminidasa de amplia especificidad). Sin embargo, las digestiones simultáneas (S) y secuenciales (Q) generan distintos productos de digestión. Asimismo, Rx05 (S) y Rx05 (Q) representan cada uno la digestión del mismo *N*-glicano con conjuntos idénticos de enzimas (sialidasa, galactosidasa, hexosaminidasa y fucosidasa de amplia especificidad). Sin embargo, las digestiones simultáneas (S) y secuenciales (Q) generan distintos productos de digestión. Este ejemplo demuestra un modo en que comparar los productos de digestión generados mediante digestiones simultáneas y secuenciales puede proporcionar información sobre la estructura y/o composición del glicano.

El ejemplo anterior se ilustra adicionalmente en la Figura 7, que muestra cómo las estructuras de polilactosamina se pueden dilucidar mediante digestión secuencial con respecto a simultánea. En la Figura 7, la muestra contiene una población de glicanos. Después de la digestión simultánea de la población de glicanos con sialidasa, galactosidasa y hexosaminidasa, la mayoría de los glicanos se escindió hasta las estructuras nucleares Man3Gn2 como se indica mediante cromatografía líquida (LC; Figura 7A) y espectrometría de masas (MS; Figura 7B). Unos pocos picos exclusivos con tiempos de retención más extensos corresponden a las estructuras de tipo manosa elevada. Sin embargo, tras la digestión secuencial con sialidasa, galactosidasa y hexosaminidasa, permanecen picos adicionales, además de los picos que se asocian con las estructuras de tipo manosa elevada. Estos picos adicionales corresponden a glicanos con lactosa acoplada al núcleo Man3Gn2 que permanecen, como se indica mediante los datos de MS. La presencia de estos picos (en la secuencial pero no en la simultánea) corresponde a las estructuras tipo polilactosamina en la muestra original.

Ejemplo 4: Identificación de ligaduras de ácido siálico en un *N*-glicano utilizando digestión con exoglicosidasa simultánea y secuencial

Los protocolos de digestión con exoglicosidasa secuencial con respecto a simultánea se pueden utilizar para obtener información sobre la estructura y/o composición de *N*-glicanos en una preparación de glicano. Por ejemplo, se puede determinar la presencia y/o tipo de ligaduras de ácido siálico al comparar los productos de digestión generados mediante una digestión secuencial y una simultánea, como se señala en la Tabla 5 para la estructura de *N*-glicano

hipotética:



5

La Tabla 5 presenta un grupo de sialidasas, cada una tiene una especificidad de ligadura de sustrato diferente. El presente ejemplo demuestra cómo se pueden distinguir las ligaduras de ácido siálico  $\alpha$ -2,3 ácido terminales de las ligaduras  $\alpha$ -2,6.

Tabla 5. Determinación de ligaduras de ácido siálico en *N*-glicanos

Enzima	Rx11	Rx12 S	Rx12 Q	Rx13 S	Rx13 Q	Rx14 S o Q	Rx15 S	Rx15 Q	Rx16 S o Q
$\alpha$ -2/3,6,8,9-sialidasa	---	X	X	---	---	X	---	---	---
$\alpha$ -2/3-sialidasa	---	---	---	X	X	---	---	---	X
$\beta$ -1/3,4,6-galactosidasa	---	X	X	X	X	X	X	X	X
$\beta$ -1,4-hexosaminidasa	---	X	X	X	X	---	X	X	-
Productos de digestión									

10

Como se muestra en la Tabla 5, Rx12 (S) y Rx12 (Q) representan cada uno la digestión del mismo *N*-glicano con conjuntos idénticos de enzimas ( $\alpha$ -2/3,6,8,9-sialidasa,  $\beta$ -1/3,4,6-galactosidasa y  $\beta$ -1,4-hexosaminidasa). Sin embargo, las digestiones simultáneas (S) y secuenciales (Q) generan distintos productos de digestión. Como se ilustra, la comparación entre la digestión secuencial y la simultánea dilucida las estructuras de polilactosamina y que el ácido siálico ligado a 2,6 está presente sobre la extensión de polilactosamina, mientras que el ácido siálico ligado a 2,3 está en el brazo con solo una lactosamina. Este ejemplo demuestra un modo en que comparar los productos de digestión generados mediante digestiones simultáneas y secuenciales puede proporcionar información sobre la estructura y/o composición del glicano.

15

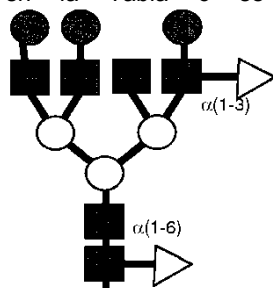
20

Además, como se ilustra en la Tabla 5, el tratamiento Rx15 (Q) escinde todas las antenas no sialiladas en una población de glicanos hasta el glicano trimanosilo nuclear. Los productos de escisión comprenden especies mono, bi, tri y tetra-antennarias de las cuales se puede obtener el perfil cromatográficamente. Dichos perfiles proporcionan una lectura de la composición antenaria de la mezcla de glicano original. En particular, dichos perfiles proporcionan una lectura de la composición antenaria de las ramificaciones sialiladas. Con una pluralidad de muestras, después de llevar a cabo dicho tratamiento con glicosidasa, cada glicano individual tendrá muchas ramificaciones como sialiladas y las mismas se pueden separar mediante cromatografía. Esto se ilustra adicionalmente en la Figura 4, que representa una población de *N*-glicanos de ejemplo que se somete a las condiciones de digestión de Rx05 (Q), según se muestran en la Tabla 5. Para la población de *N*-glicanos que se muestra en la Figura 4, este ejemplo

muestra cómo el tratamiento secuencial puede proporcionar una población de productos de digestión. Los productos de digestión se pueden analizar y se pueden determinar sus estructuras y/o composiciones.

Ejemplo 5: Identificación de ligaduras de fucosilo en un *N*-glicano utilizando digestión con exoglicosidasa simultánea y secuencial

5 Los protocolos de digestión con exoglicosidasa simultánea se pueden utilizar para obtener información sobre la estructura y/o composición de *N*-glicanos en una preparación de glicano. Por ejemplo, la digestión con diversas combinaciones de exoglicosidasas se puede utilizar la distinguir la fucosilación  $\alpha$ -1/3,4 en brazo (antenaria) de la fucosilación  $\alpha$ -1,6 nuclear de un *N*-glicano desialiado previamente. Los efectos de cada tratamiento que se muestran en la Tabla 6 se ilustran en el caso de la siguiente estructura de glicano de ejemplo:



10

Tabla 6. Determinación de ligaduras de fucosilo

Enzima	Rx01	Rx02	Rx03	Rx04	Rx05	Rx06	Rx07
$\beta$ -1/3,4,6-galactosidasa	---	X	X	---	X	X	X
$\alpha$ -1/3,4,6-fucosidasa	---	X	---	---	---	X	---
$\alpha$ -1/3,4-fucosidasa	---	---	X	---	---	---	X
$\beta$ -1,4-hexosaminidasa	---	X	X	X	X	---	---
Productos de digestión							

15

Como se muestra en la Tabla 6, la digestión con exoglicosidasa con diferentes combinaciones de enzimas genera diversos productos de digestión. En el ejemplo presentado en la presente, un análisis basado solo en la masa indica la presencia de dos residuos fucosa. Sin embargo, mediante el uso de la estrategia anterior, se puede determinar la *ubicación* de los dos residuos fucosa (es decir, una fucosa está en el núcleo y una fucosa está en la ramificación con respecto a los dos residuos de fucosa que aparecen en las ramificaciones). Este ejemplo demuestra un modo en que comparar los productos de digestión generados mediante digestión simultánea puede proporcionar información sobre la estructura y/o composición del glicano.

20

Ejemplo 6: Identificación rápida de glicanos que contienen polilactosamina

25

Los glicanos ligados por *N* se liberaron de una glicoproteína modelo utilizando Péptido: *N*-Glicosidasa F (PNGasa-F), que proporcionó una muestra de glicano. PNGasa-F es una amidasa que escinde entre los residuos GlcNAc más interno y asparagina de oligosacáridos con manosa elevada, híbridos y complejos de glicoproteínas ligadas por *N* (Maley et al., 1989, Anal. Biochem., 180:195). PNGasa F puede hidrolizar casi todos los tipos de cadenas de *N*-glicano de glicopéptidos y/o glicoproteínas. La muestra de glicano resultante se purificó utilizando cartuchos de extracción de fase sólida de carbón grafitizado. La mezcla de glicano, a continuación, se etiquetó fluorescentemente con 2-benzamida. La muestra de glicano se dividió en dos partes iguales y cada parte se hizo reaccionar con un conjunto de exoglicosidasas (es decir, sialidasa, galactosidasa y *N*-acetilhexosaminidasa) de forma simultánea y secuencial, respectivamente. Los productos de reacción se analizaron posteriormente mediante HPLC fluorescente

de fase normal utilizando una columna de amida o MALDI-MS. Los resultados del análisis se presentan en la Figura 8 (cromatogramas) y la Figura 9 (MALDI-MS).

#### Equivalentes y alcance

5 Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar utilizando no más que los experimentos de rutina, muchos equivalentes de realizaciones específicas según la descripción incluida en la presente. No se pretende que el alcance de la presente invención se limite a la Descripción que antecede, sino que se establece en las reivindicaciones adjuntas.

10 En las reivindicaciones, los artículos como «un/una» y «el/la» pueden significar uno o más de uno, a menos que se indique lo contrario o sea evidente otra cosa a partir del contexto. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a «una nanopartícula» incluye una pluralidad de dicha nanopartícula y la referencia a «la célula» incluye la referencia a una o más células conocidas por los expertos en la técnica, etc. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen «o» entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o son relevantes de otra forma para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o que sea evidente otra cosa a partir del contexto. La descripción incluye realizaciones donde exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en, o de otro modo es relevante para un producto o proceso dado. La descripción incluye realizaciones donde más de un miembro o todo el grupo de miembros está presente en, se emplea en, o de otro modo es relevante para un producto o proceso dado. Además, se entenderá que la descripción abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones donde una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introduce en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que es dependiente de otra reivindicación se puede modificar para incluir una o más limitaciones que se encuentran en cualquier otra reivindicación que es dependiente de la misma reivindicación base. Además, cuando las reivindicaciones mencionan una composición, se entenderá que los métodos para utilizar la composición para cualquiera de los fines descritos en la presente se incluyen y los métodos para producir la composición según cualquiera de los métodos para producir descritos en la presente u otros métodos conocidos en la técnica se incluyen, a menos que se indique de otra forma o a menos que sea evidente para un experto en la técnica que podría surgir una contradicción o inconsistencia.

25 En los casos en que los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo Markush, se entenderá que también se describe cada subgrupo de los elementos y cualquier elemento(s) se puede retirar del grupo. Se entenderá que, en general, en los casos en que se hace referencia a la descripción o aspectos según la descripción como que comprende/n elementos, características específicas, etc., determinadas realizaciones según la descripción o aspectos según la descripción consisten, o consisten esencialmente en, estos elementos, características, etc. Por razones de simplicidad, dichas realizaciones no se han establecido específicamente *in haec verba* en la presente. Se señala que se pretende que la expresión «que comprende» sea abierta y permita la inclusión de elementos o etapas adicionales.

30 Cuando se proporcionan intervalos se incluyen los extremos. Además, se entenderá que a menos que se indique de otra forma o que sea evidente otra cosa a partir del contexto y entendimiento de un experto en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor o subintervalo específico dentro de los intervalos establecidos en diferentes realizaciones según la descripción, hasta un décimo de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

35 Además, se entenderá que cualquier realización específica de la presente descripción que entra dentro de la técnica anterior puede excluirse explícitamente de una o más de las reivindicaciones. Dado que se considera que dichas realizaciones son conocidas por un experto en la técnica, se pueden excluir incluso si la exclusión no se establece explícitamente en la presente. Cualquier realización específica de las composiciones según la descripción (p. ej., cualquier exoglicosidasa, cualquier ligadura glicosídica, cualquier condición de reacción, cualquier método de purificación, cualquier método de análisis de producto, etc.) se puede excluir de una o más reivindicaciones, por cualquier motivo, esté o no relacionado con la existencia de técnica anterior.

40 Las publicaciones descritas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan solamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Ningún contenido de la presente debe interpretarse como admisión de que los inventores no tienen derecho a preceder a dicha divulgación en virtud de descripción previa.

50

## REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar una preparación de glicano, el método comprende las etapas de:  
proporcionar una preparación de glicano;  
5 someter una primera muestra de la preparación de glicano a un primer procedimiento con exoglicosidasa, donde el primer procedimiento con exoglicosidasa comprende el tratamiento secuencial de la primera muestra con un conjunto de al menos dos exoglicosidasas, donde dichas exoglicosidasas se administran de forma secuencial a la primera muestra;  
someter una segunda muestra de la preparación de glicano a un segundo procedimiento con exoglicosidasa, donde el segundo procedimiento con exoglicosidasa difiere del primer procedimiento con exoglicosidasa y comprende el  
10 tratamiento simultáneo de la segunda muestra con el mismo conjunto de exoglicosidasas;  
caracterizar los productos de escisión del primer y segundo procedimientos con exoglicosidasa; y  
comparar la caracterización de los productos de escisión del primer procedimiento con exoglicosidasa con la caracterización de los productos de escisión del segundo procedimiento con exoglicosidasa.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de comparación comprende comparar la caracterización de los  
15 productos de escisión del primer o segundo procedimiento con exoglicosidasa con los productos de escisión de una muestra de referencia.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende:  
(a) tratar la primera y segunda muestras con una exoglicosidasa seleccionada del grupo que consiste en una sialidasa, una galactosidasa, una hexosaminidasa, una fucosidasa, una manosidasa y sus combinaciones; o  
20 (b) tratar la primera y segunda muestras con al menos dos exoglicosidasas seleccionadas del grupo que consiste en una sialidasa, una galactosidasa, una hexosaminidasa, una fucosidasa, una manosidasa y sus combinaciones.
4. El método de la reivindicación 1, en el que al menos un producto de escisión comprende un glicano sulfatado, un glicano fosforilado, un ácido siálico ligado a una *N*-acetilglucosamina, un glicano acetilado, una fucosilación antenaria, una extensión de lactosamina o un núcleo pentasacárido que comprende tres residuos manosa y 2 *N*-  
25 acetilglucosamina.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de proporcionar una preparación de glicano comprende:  
a) proporcionar una pluralidad de glicoproteínas, cada glicoproteína comprende al menos un *N*-glicano, cuyo *N*-glicano está ligado a una glicoproteína de la pluralidad;  
b) extraer al menos un *N*-glicano de al menos una glicoproteína;  
30 c) opcionalmente, aislar los *N*-glicanos extraídos.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de caracterización comprende someter los productos de escisión a un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en métodos cromatográficos, cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC), cromatografía de capa delgada (TLC), cromatografía en columna de amida, espectrometría de masas (MS), MS en tándem, LC-MS, LC-MS/MS, ionización mediante desorción por láser asistida por matriz y espectrometría de masas (MALDI-MS), espectrometría de masas con transformada de Fourier (FTMS), separación de movilidad iónica con espectrometría de masa (IMS-MS), disociación por transferencia de electrones (ETD-MS), métodos electroforéticos, electroforesis capilar (CE), CE-MS, electroforesis en gel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con posterior transferencia Western utilizando anticuerpos que reconocen estructuras de glicano específicas, resonancia magnética nuclear (RMN) RMN unidimensional (1D-RMN), RMN bidimensional (2D-RMN), espectroscopía de correlación de giro de ángulo magnético RMN (COSY-RMN), espectroscopía correlacionada total RMN (TOCSY-RMN), coherencia cuántica heteronuclear RMN (HSQC-RMN), coherencia cuántica múltiple heteronuclear (HMQC-RMN), espectroscopía de efecto nuclear Overhauser en el sistema rotatorio RMN (ROESY-RMN), espectroscopía de Efecto nuclear Overhauser (NOESY-RMN) y sus combinaciones.  
35  
40  
45
7. El método de la reivindicación 1, en el que la preparación de glicano es una preparación de *N*-glicano y el método comprende además evaluar la presencia de modificaciones en la preparación de *N*-glicano seleccionadas del grupo que consiste en fosforilación, sulfatación, acetilación, extensiones de lactosamina y fucosilación antenaria.
8. Un método para caracterizar una pluralidad de *N*-glicanos ligados a una proteína que comprende:



- a) proporcionar una pluralidad de glicoproteínas, cada glicoproteína comprende al menos un *N*-glicano, cuyo *N*-glicano está ligado a una glicoproteína de la pluralidad; donde el patrón de glicosilación de al menos un miembro de la pluralidad difiere del patrón de glicosilación de al menos un miembro distinto de la pluralidad;
- b) extraer al menos dos *N*-glicanos de al menos una glicoproteína;
- 5 c) opcionalmente, aislar los *N*-glicanos extraídos;
- d) escindir al menos un enlace glicosídico terminal del extremo no reductor de un primer *N*-glicano extraído al someter dicho primer *N*-glicano extraído a tratamiento secuencial con un conjunto de al menos dos enzimas exoglicosidasas para generar una pluralidad de productos de escisión, donde dichas enzimas exoglicosidasas se administran de forma secuencial a dicho primer *N*-glicano extraído;
- 10 e) escindir al menos un enlace glicosídico terminal del extremo no reductor de un segundo *N*-glicano extraído al someter dicho segundo *N*-glicano extraído a tratamiento simultáneo con el mismo conjunto de enzimas exoglicosidasas para generar una pluralidad de productos de escisión;
- f) caracterizar los productos de escisión obtenidos del primer *N*-glicano extraído con los productos de escisión obtenidos del segundo *N*-glicano extraído; y
- 15 g) opcionalmente, comparar la caracterización de los productos de escisión con una muestra de referencia.
9. Un método comparar lotes de una glicoproteína, el método comprende las etapas de:
- proporcionar una primera preparación de glicano a partir de un primer lote de la glicoproteína;
- proporcionar una segunda preparación de glicano a partir de un segundo lote de la glicoproteína;
- 20 someter la primera preparación de glicano a un primer procedimiento con exoglicosidasa, para escindir específicamente monosacáridos de los extremos no reductores de los glicanos ligados por *N* en la primera preparación de glicano, donde el primer procedimiento con exoglicosidasa comprende el tratamiento secuencial de la primera preparación de glicano con un conjunto de al menos dos exoglicosidasas, donde dichas exoglicosidasas se administran de forma secuencial a la primera preparación de glicano;
- 25 someter la segunda preparación de glicano a un segundo procedimiento con exoglicosidasa, para escindir específicamente monosacáridos de los extremos no reductores de los glicanos ligados por *N* en la segunda preparación de glicano, donde el segundo procedimiento con exoglicosidasa difiere del primer procedimiento con exoglicosidasa y comprende el tratamiento simultáneo de la segunda preparación de glicano con el mismo conjunto de exoglicosidasas; y
- 30 comparar los productos de escisión obtenidos de la primera preparación de glicano con los productos de escisión obtenidos de la segunda preparación de glicano con el fin de evaluar la consistencia de los dos lotes.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la primera y segunda preparaciones se tratan con al menos una exoglicosidasa seleccionada del grupo que consiste en una sialidasa, una galactosidasa, una hexosaminidasa, una fucosidasa, una manosidasa y sus combinaciones.
- 35 11. El método de la reivindicación 9, en el que al menos un producto de escisión comprende una Glicofoma seleccionada del grupo que consiste en
- un núcleo pentasacárido que comprende tres residuos manosa y 2 *N*-acetilglucosamina;
- una fucosilación antenaria;
- una extensión de lactosamina;
- un glicano sulfatado;
- 40 un glicano fosforilado;
- un ácido siálico ligado a una *N*-acetilglucosamina; y
- un glicano acetilado.
12. El método de la reivindicación 9, en el que el método comprende:
- a) extraer al menos un *N*-glicano de al menos una glicoproteína del primer o segundo lote; y

b) opcionalmente, aislar dicho al menos un *N*-glicano extraído.

13. Un método para monitorizar la producción de una glicoproteína, el método comprende las etapas de:

durante la producción de una glicoproteína, extraer al menos una primera y segunda muestras que contienen glicano del sistema de producción;

- 5 someter la primera muestra que contiene glicano a un primer procedimiento con exoglicosidasa, para escindir específicamente monosacáridos de los extremos no reductores de los glicanos ligados por *N* en la primera muestra que contiene glicano, donde el primer procedimiento con exoglicosidasa comprende el tratamiento secuencial de la primera muestra que contiene glicano con un conjunto de al menos dos exoglicosidasas, donde dichas exoglicosidasas se administran de forma secuencial a la primera muestra que contiene glicano;
  - 10 someter la segunda muestra que contiene glicano a un segundo procedimiento con exoglicosidasa, para escindir específicamente monosacáridos de los extremos no reductores de los glicanos ligados por *N* en la segunda muestra que contiene glicano, donde el segundo procedimiento con exoglicosidasa difiere del primer procedimiento con exoglicosidasa y comprende el tratamiento simultáneo de la segunda muestra que contiene glicano con el mismo conjunto de exoglicosidasas; y
  - 15 comparar los productos de escisión obtenidos de la primera muestra que contiene glicano con los de la segunda muestra que contiene glicanos con el fin de determinar las diferencias y, por lo tanto, monitorizar el progreso de la producción de la glicoproteína.
14. El método de la reivindicación 13, en el que se extrae al menos una muestra que contiene glicano cuando el procedimiento con exoglicosidasa está alrededor de 10 % completo.
- 20 15. El método de la reivindicación 13, en el que se extrae al menos una muestra que contiene glicano antes de que el procedimiento con exoglicosidasa esté 100 % completo.
16. El método de la reivindicación 13, en el que se extrae al menos una muestra que contiene glicano antes de que se escinda el 100 % de los glicanos.

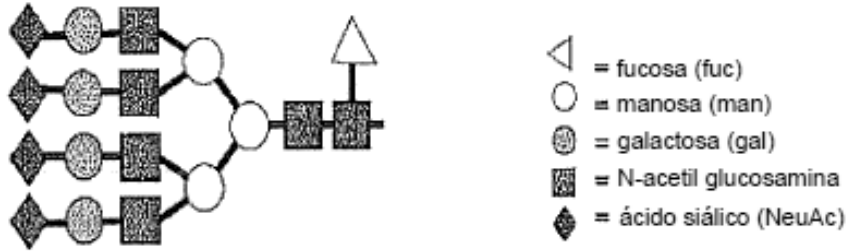
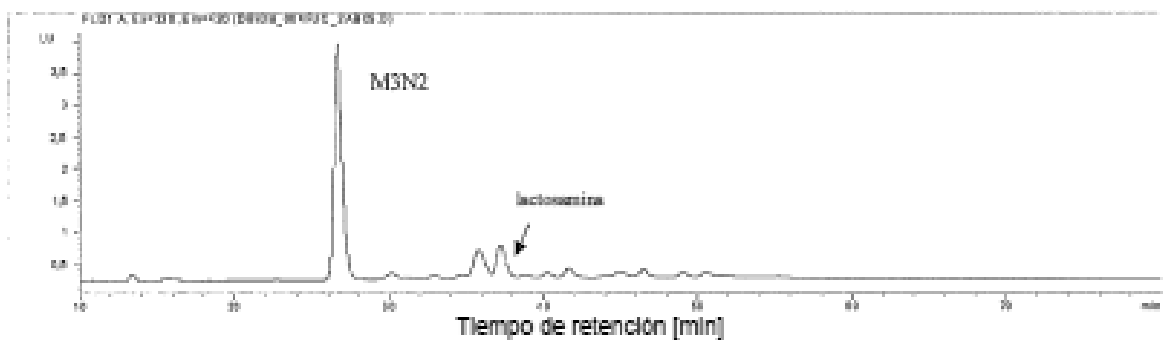


Figura 1

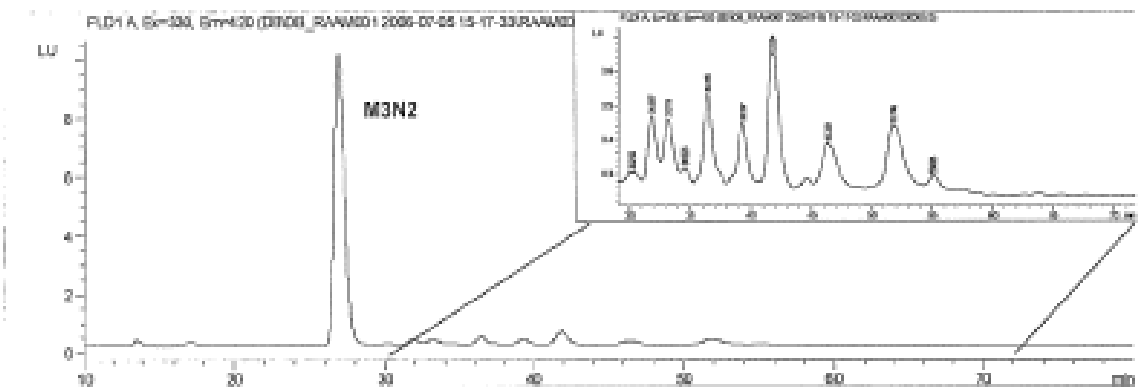
**A.**



**B.**



**Figura 2**



**Figura 3**

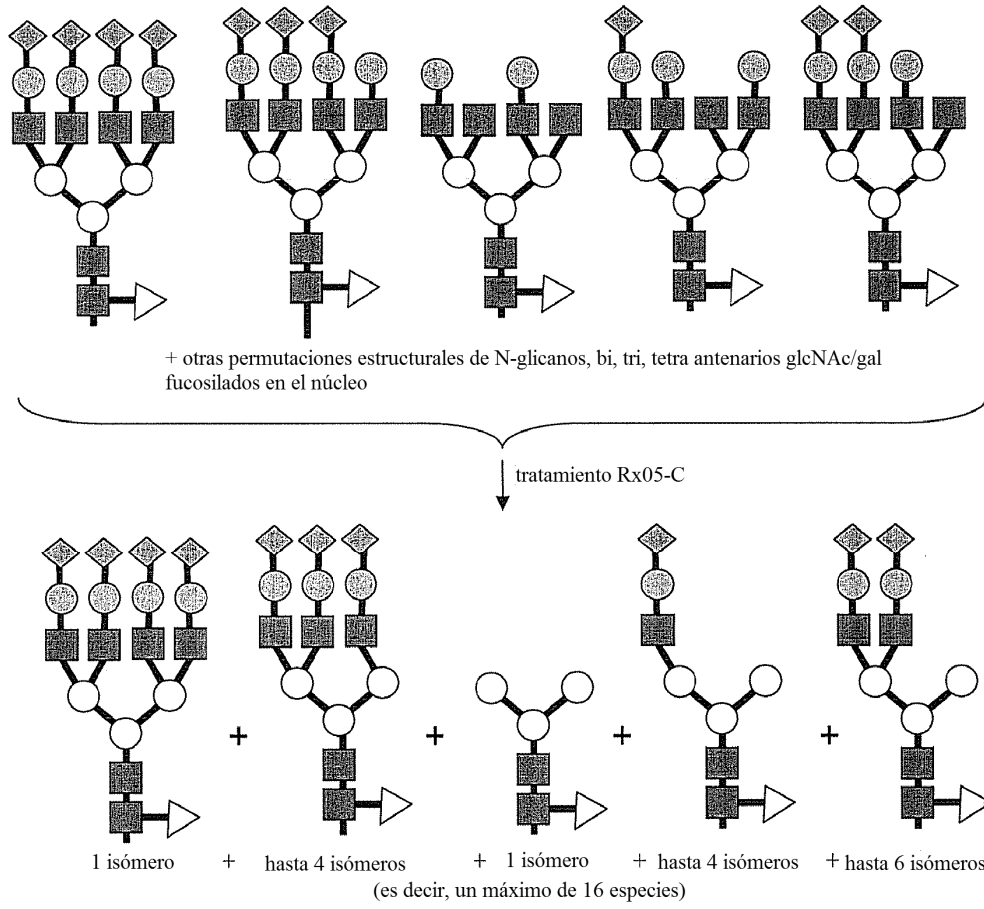


Figura 4

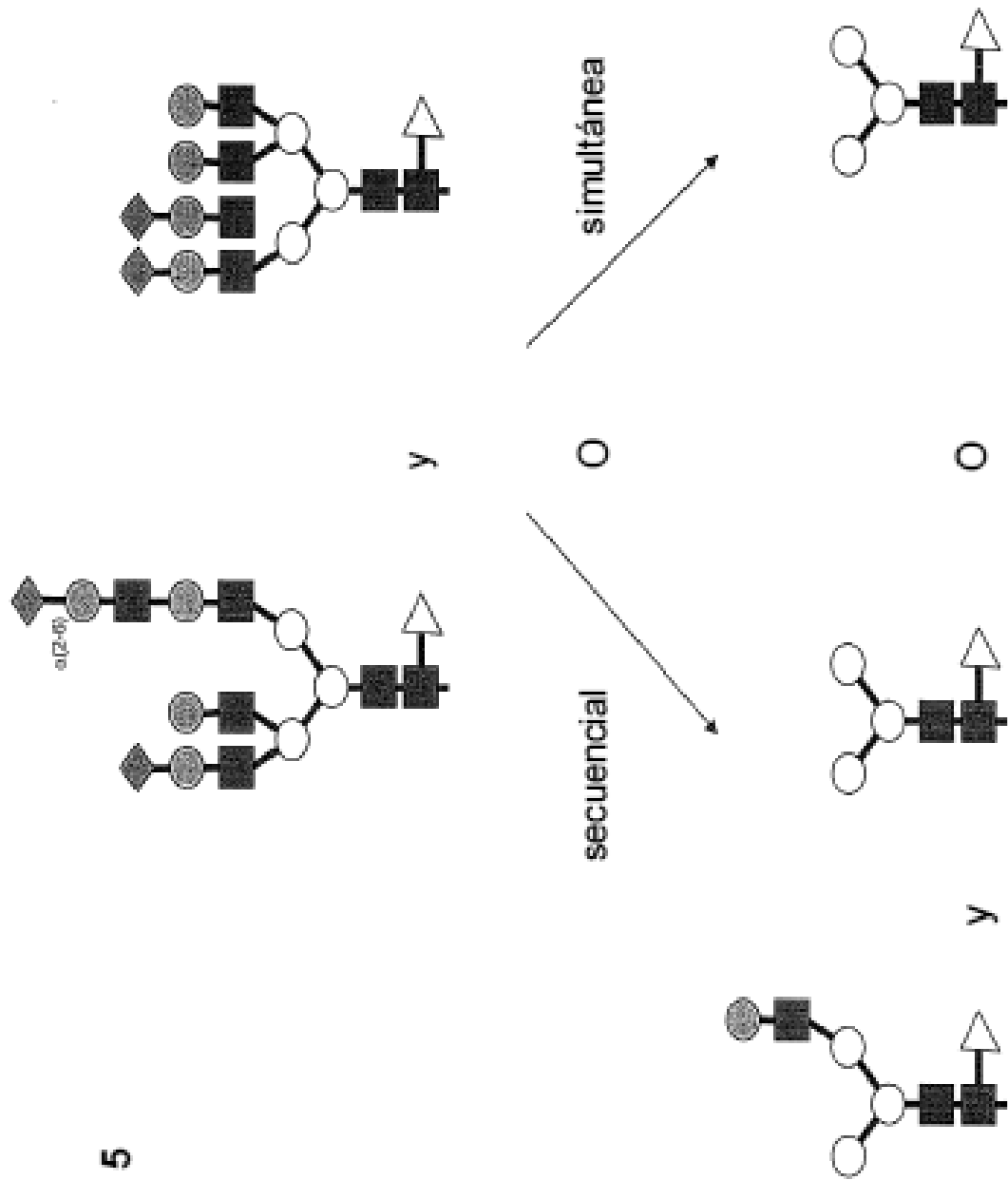


Figura 5

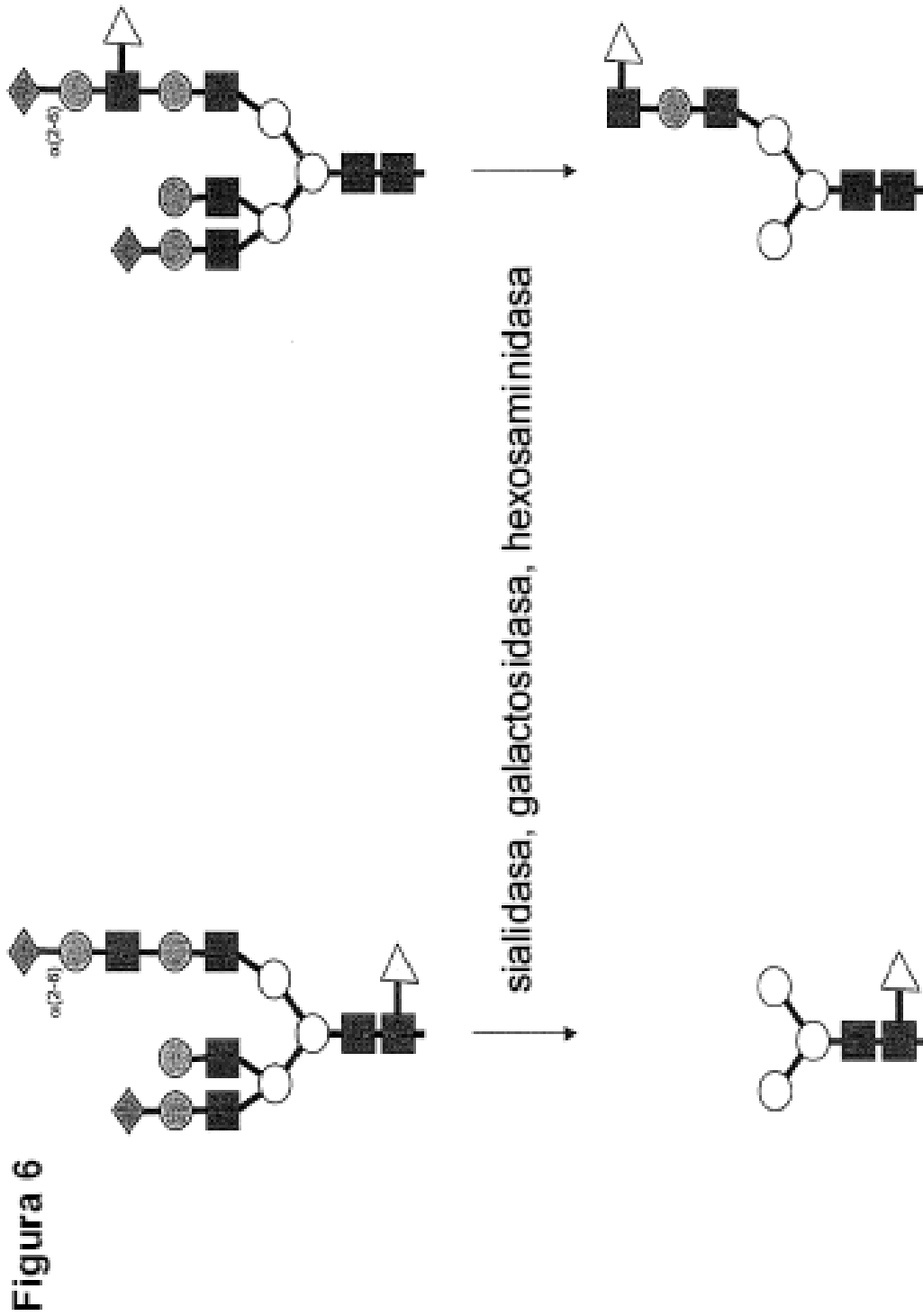
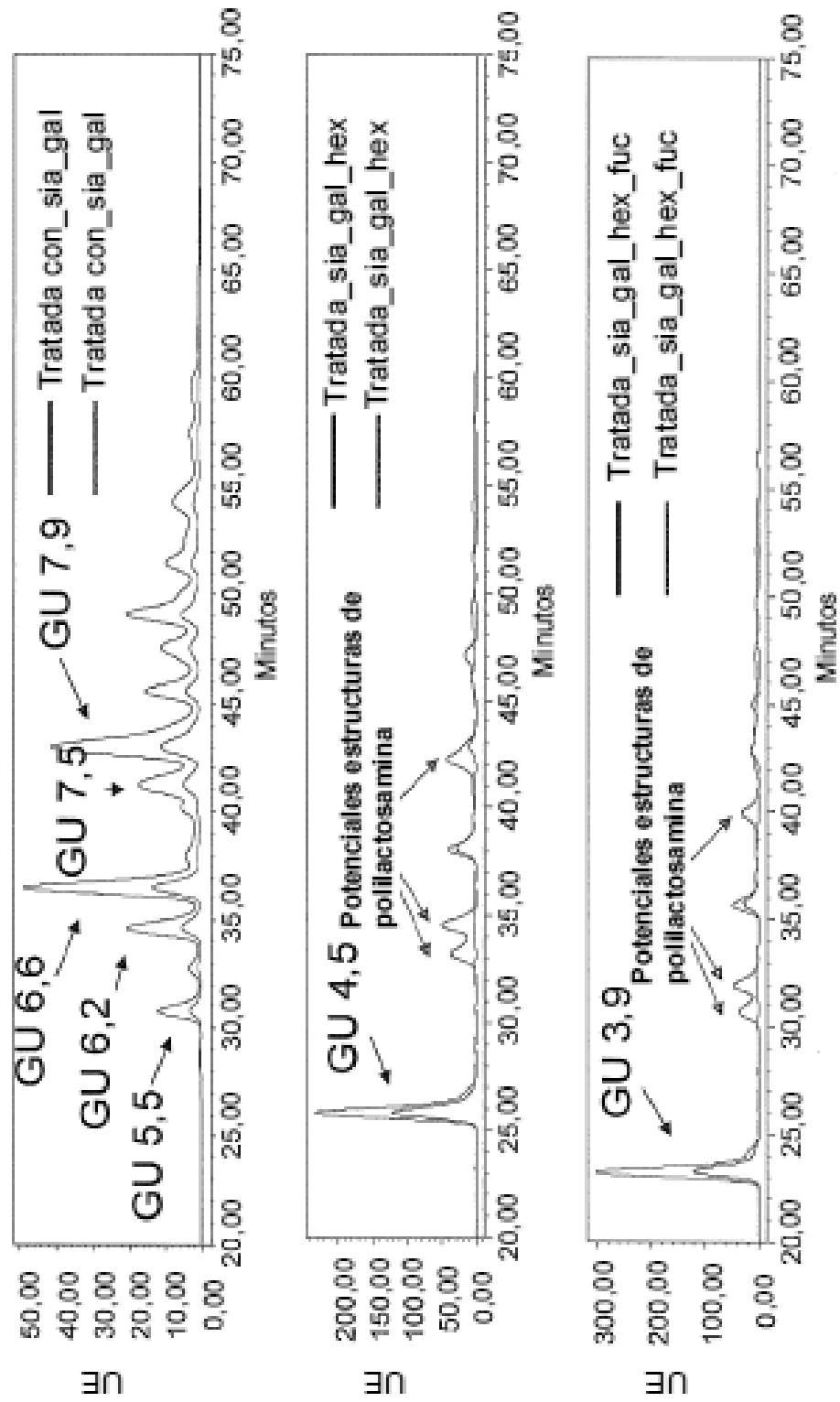


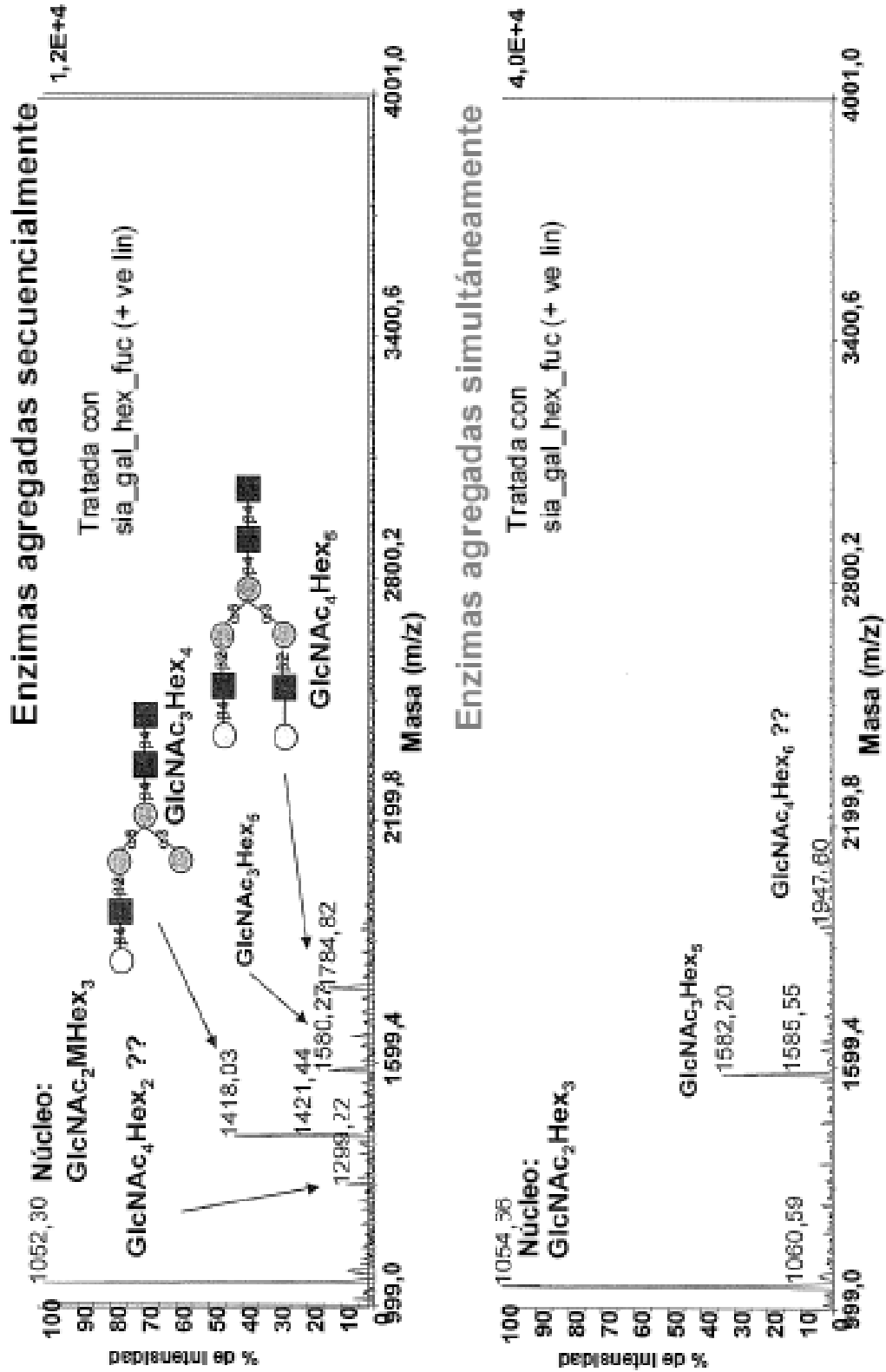
Figura 7A



———Enzimas agregadas secuencialmente ——— Tratada con\_sia\_gal  
 ——Enzimas agregadas simultáneamente —— Tratada\_sia\_gal\_hex



Figura 7B



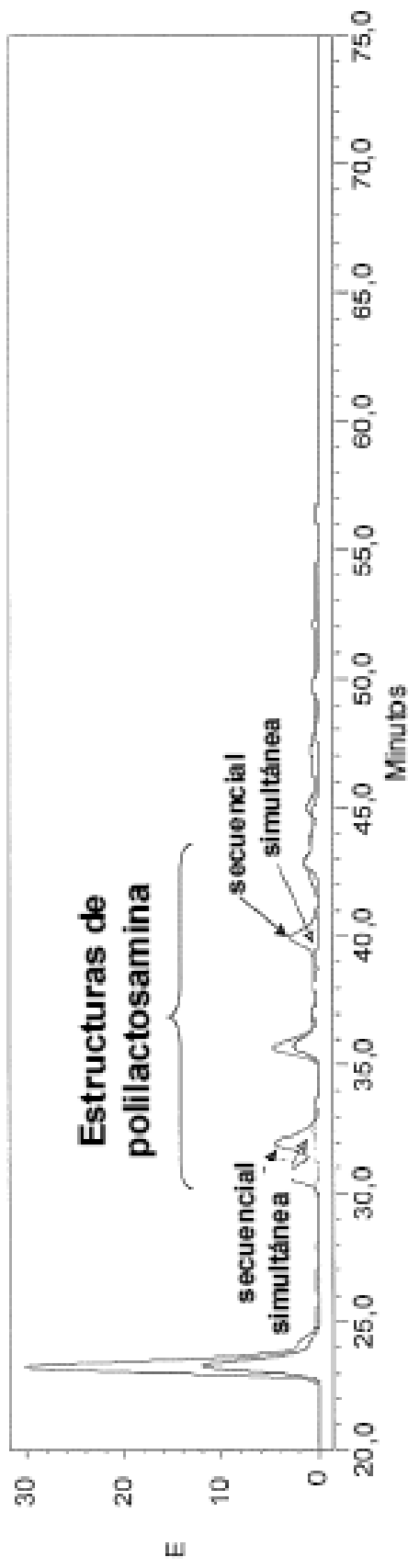


Figura 8.

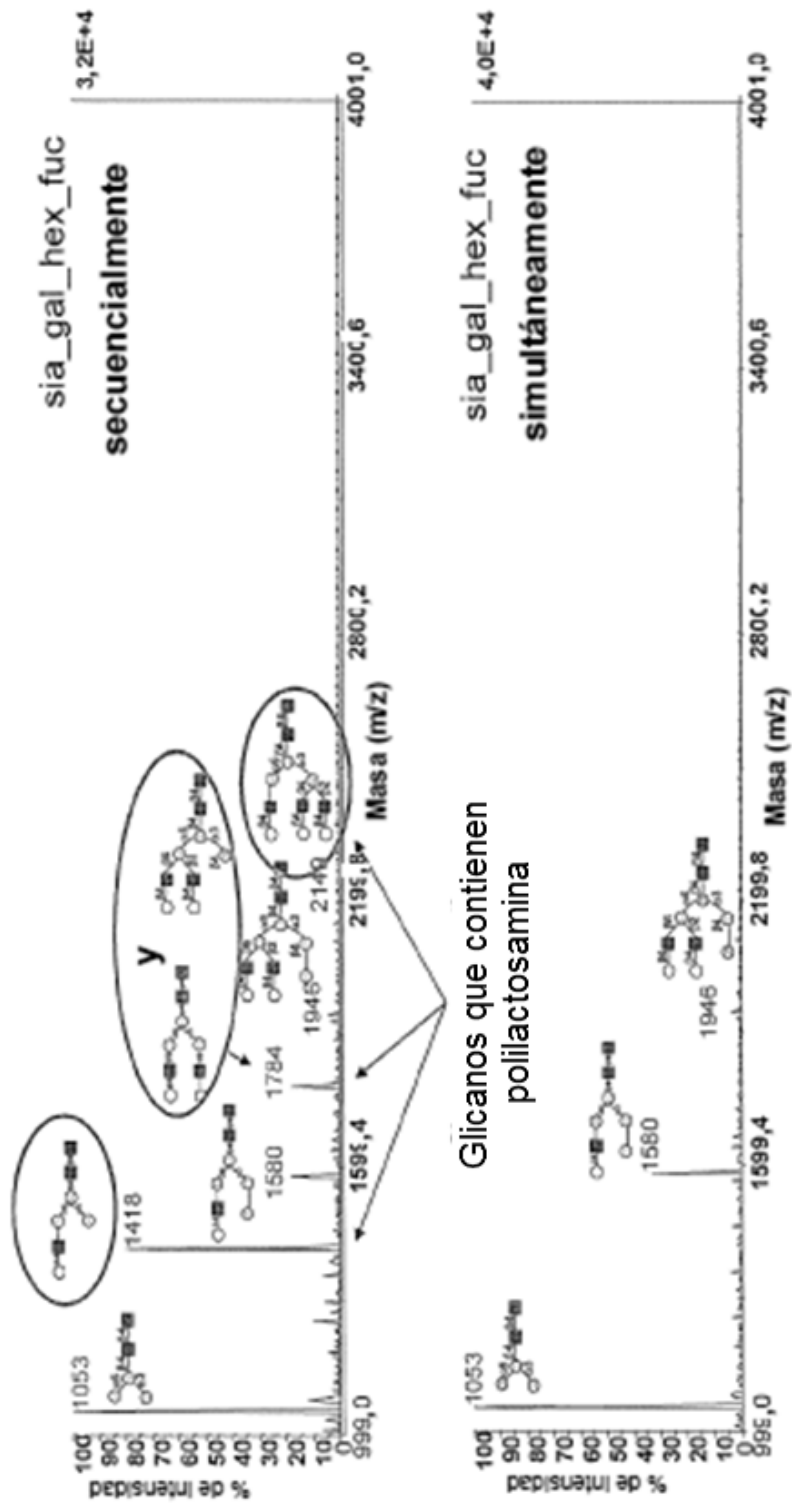


Figura 9.