

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 380**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 21/47 (2006.01)

G01N 33/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2015 PCT/US2015/061684**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16081770**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2015 E 15802326 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3221465**

54 Título: **Cuantificación de resto glucano en glucoproteínas recombinantes**

30 Prioridad:

19.11.2014 US 201462082014 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2019

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

CHEMMALIL, LETHA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 727 380 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

Cuantificación de resto glucano en glucoproteínas recombinantes

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/082.014 presentada el 19 de noviembre de 2014.

10 RESUMEN

La invención se refiere a un método para la determinación del resto glucano en una glucoproteína recombinante usando la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación.

15 INTRODUCCIÓN

La glucosilación puede influir en las propiedades biológicas y fisicoquímicas de las proteínas recombinantes que están destinadas para su uso como fármacos biofarmacéuticos (Byrne, Donohoe y O'Kennedy, 2007). Por ejemplo, el resto ácido siálico de una proteína desempeña un papel importante en la semivida del suero. A medida que se expone la galactosa terminal, las glucoproteínas asialoladas se endocitan mediante los receptores hepáticos de asialo galctosa a través de la endocitosis mediada por receptores (Hildenbrandt y Aronson, 1979).

Por consiguiente, el estado de los grupos sialo terminales en tales fármacos biofarmacéuticos puede requerir el control como un atributo de calidad importante. Los métodos habitualmente empleados incluyen la derivatización de ácido siálico. En este método, el ácido siálico se libera a través de la hidrólisis ácida (por ejemplo, ácido acético 8 M) y se marca con un fluoróforo o un cromóforo, tal como con 1,2-diamino-4,5-metilendioxibenceno (DMB en inglés). El marcado va seguido de un análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC en inglés).

Un enfoque alternativo usa un método en el que se somete el ácido siálico liberado de manera enzimática (sialidasa-A) a una separación cromatográfica de intercambio de aniones de pH alto (HPAEC en inglés) y a una posterior detección amperométrica con pulsos (PAD en inglés). El sistema de HPAEC-PAD está disponible en el mercado a través de Dionex.

Ambos métodos tienen inconvenientes. La primera técnica de derivatización tiene una variabilidad inherentemente alta y el segundo método de HPAEC-PAD soporta una alta variabilidad debido a la obstrucción de electrodos durante el análisis (Ganesa, Granda y Mattaliano, 2003). Además, los materiales necesarios para el método de HPAEC-PAD resultan caros y costosos de mantener. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un método más eficaz y reproducible para el ensayo de restos ácido siálico en glucoproteínas recombinantes. El documento WO2010/071824 proporciona métodos para el enriquecimiento, la identificación y/o la cuantificación de glucanos no habitualmente modificados (por ejemplo, glucanos fosforilados, gluconados sulfatados y/o glucanos multiacetilados). Estos métodos proporcionan una preparación de glucanos a partir de la que se han liberado ácidos siálicos; el sometimiento de la preparación de glucanos con tratamiento con sialidasa a una técnica de separación que separa los glucanos basándose en la relación de carga respecto a masa; y la cuantificación de los productos cargados usando al menos un patrón de cuantificación. El documento WO2013/130604 se refiere a un método para la medición de manera específica de la sialilación de una biomolécula de interés sin la interferencia de otras biomoléculas presentes en la muestra. Ganesa C y col. (2003) indican la influencia de los niveles de sialilación en la cuantificación de oligosacáridos y analizan la variabilidad de respuesta usando la cromatografía de intercambio de aniones de pH alto y la detección amperométrica con pulsos. También está disponible la cromatografía de interacción hidrófila con detectores a base de aerosol (ELSD, CAD, NQAD en inglés) para compuestos polares que carecen de un cromóforo de UV en una formulación intravenosa (JOSE M. CINTRON Y COL., 2013).

Sumario de la invención

La invención desvelada en el presente documento proporciona un método mejorado y fiable para la determinación del resto glucano en una glucoproteína recombinante. La invención es particularmente adecuada para la determinación del resto ácido siálico en una glucoproteína recombinante. La invención se basa, en parte, en el desarrollo de técnicas para la determinación de los restos ácido siálico en glucoproteínas recombinantes usando la tecnología de recuento de partículas por condensación en agua (WCPC en inglés). La tecnología de WCPC permite que el analito se amplíe usando vapor de agua para proporcionar la mayor sensibilidad. Tal como se muestra más adelante, la invención permite la determinación del tipo y la cuantificación de restos ácido siálico en glucoproteínas recombinantes. La glucoproteína recombinante que se va a analizar puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, una proteína de fusión, una hormona, una citocina o un derivado, una variante, una muteína, un fragmento, un multímero o un conjugado de cualquiera de las entidades moleculares anteriores.

En un aspecto, la invención proporciona un método para la determinación de un resto glucano en una glucoproteína recombinante, comprendiendo el método la digestión de la glucoproteína recombinante con una enzima,

preferentemente una exoglucosidasa, para liberar glucano y la cuantificación del glucano usando la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación. Opcionalmente, el ácido de glucano liberado se separa de la glucoproteína recombinante antes de la etapa de cuantificación. Los restos glucano incluyen, pero sin limitación, el análisis de composición del ácido siálico, la galactosa terminal, los glucanos unidos a N, los glucanos unidos a O y los monosacáridos. En un aspecto, la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación usa un detector de nanocuantificación de analitos (NQAD en inglés).

En un aspecto preferido, la invención proporciona un método para la determinación de un resto ácido siálico en una glucoproteína recombinante, comprendiendo el método la digestión de la glucoproteína recombinante con una sialidasa para liberar ácido siálico y la cuantificación del ácido siálico usando la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación. Opcionalmente, el ácido siálico liberado se separa de la glucoproteína recombinante antes de la etapa de cuantificación. En un aspecto, la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación usa un detector de nanocuantificación de analitos (NQAD).

Breve descripción de las figuras

Figura 1: separación de NANA y NGNA en una columna de amida de PolyGLYCOPLEX (trietyl amina/acetoniitrilo en condición de gradiente isocrático).

Figura 2A: cromatograma de NANA/NGNA en una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm usando ácido fórmico al 20 %. Figura 2B: cromatograma de NANA/NGNA (inyección separada y combinada) en una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm usando ácido fórmico al 20 %.

Figura 3A: cromatograma representativo de un patrón de ácido siálico (NANA).

Figura 3B: cromatograma representativo de ácido siálico (NANA) liberado de sialidasa A a partir de glucoproteína-A.

Figura 4: cromatograma de NANA-NGNA usando una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm con una composición de gradiente inicial de B al 15 %.

Figura 5: cromatograma de NANA/NGNA usando una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm usando una composición de gradiente inicial de B al 20 %.

Figura 6: cromatograma de NANA/NGNA usando una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm con una composición de gradiente inicial de B al 25 %.

Figura 7: separación de NANA y NGNA en una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 5 cm (acetoniitrilo al 100 % y ácido fórmico al 10 % como fases móviles A y B) con un gradiente inicial de B al 20 %.

Figura 8: gráfica de regresión lineal de los patrones de calibración de ácido siálico (NANA).

Figura 9: intervalo dinámico lineal del ácido siálico en el método de HPLC/NQAD.

Descripción detallada

Tal como se muestra en el presente documento en un aspecto de la invención, el análisis libre de derivatización de las glucoproteínas usando un método de HPLC/NQAD con una columna de amida de PolyGLYCOPLEX™ se correlacionó bien con un método de HPLC con una derivatización de columna previa usando 1,2-diamino-4,5-metilendioxicbenzo (DMB), así como la cromatografía de intercambio de aniones de pH alto a base de Dionex (o cromatografía de iones) con una detección amperométrica con pulsos (HPAEC-PAD). Sin embargo, con la eliminación de la etapa de derivatización, el método de HPLC/NQAD es más eficaz que el método de HPLC/DMB. Además, el método de HPLC/NQAD es más reproducible que el método de HPAEC-PAD, ya que el método de HPAEC-PAD soporta una alta variabilidad debido a la obstrucción de electrodos durante el análisis. En su conjunto, el método de HPLC/NQAD desvelado en el presente documento como un aspecto de la invención ofrece un intervalo dinámico lineal amplio, así como una excelente precisión, exactitud, repetibilidad, fiabilidad y facilidad de uso, con una comparabilidad aceptable con los métodos habitualmente usados de HPAEC-PAD y HPLC/DMB.

Por lo tanto, los métodos de la invención incluyen la digestión de la glucoproteína recombinante con una sialidasa para generar ácido siálico y, después, la cuantificación de la cantidad y/o el tipo de resto ácido siálico usando la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación.

Sin embargo, los métodos de la invención también se pueden usar para analizar otros restos glucano, además del ácido siálico, incluyendo, pero sin limitación, el análisis de composición de los N-glucanos, la galactosa terminal, los O-glucanos y los monosacáridos. Los ejemplos de otros restos glucano específicos que se pueden detectar, cuantificar o analizar usando los métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, la glucosa (Glu), la galactosa (Gal), la N-acetil-glucosamina (GlcNAc), la manosa, la N-acetilgalactosamina (GalNAc), la fucosa (Fuc), la N-acetil-manosamina (ManNAc), la fructosa y la sacarosa, así como combinaciones más complejas de uno o más tipos de tales restos, tales como estructuras mono-antenarias, bi-antenarias, tri-antenarias, tetra-antenarias y de orden superior. Cualquier cantidad de modificaciones postraduccionales de las glucoproteínas se puede determinar y cuantificar de manera similar usando los métodos de la invención descritos en el presente documento con particularidad para los restos ácido siálico.

Detección de dispersión de luz por nucleación de condensación

La detección de dispersión de luz por nucleación de condensación es un tipo de técnica de detección a base de aerosol. Una muestra que se va a someter a ensayo, en primer lugar, se nebuliza en gotas y, después, la fase móvil se evapora de las gotas, dejando partículas suspendidas en el aire de productos químicos con una volatilidad inferior a la fase móvil. Este aerosol seco se desplaza, después, a otra cámara donde el vapor de agua se condensa sobre las partículas, que se hinchan. Las partículas hinchadas se pueden detectar de manera individual usando un sensor óptico a base de láser. (Gille y Crowshaw, 2008, *Chromatography Today*, Vol. 1(3), pág. 26). Un sistema disponible en el mercado para la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación es el detector de nanocuantificación de analitos (NQAD™) a través de Dionex.

A diferencia de otros detectores a base de aerosol, la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación, tal como la NQAD, no soporta la interferencia por el ruido o el desplazamiento del sensor que puede interferir en la resolución y la sensibilidad de los analitos. Aunque los detectores de índice de refracción y otros detectores a base de aerosol se enfrentan a una inestabilidad de período inicial y una falta de respuesta lineal durante los ciclos de gradiente, el sistema de NQAD ha demostrado tener un período inicial estable, un intervalo dinámico lineal más amplio y ha mostrado ser adecuado para la cuantificación de analitos en niveles bajos de nanogramos (Hutchinson, Li, Farrell, Groeber, Szucs, Dicoski y Haddad, 2011). El detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) y el NQAD son, ambos, baratos, fáciles de funcionar y compatibles con todos los tipos de sistemas de HPLC. Sin embargo, en la cuantificación, el NQAD es más adecuado que el ELSD, ya que este tiene un intervalo dinámico lineal más amplio y mayor sensibilidad.

De acuerdo con Hutchinson y col. (2011), los límites de detección de analitos cromofóricos de UV con una diversidad de propiedades fisicoquímicas se evaluaron usando diversos detectores con diferentes composiciones de fase móvil en condiciones de gradiente en las que se ha demostrado que NQAD es el detector más sensible. Hutchinson y col. (2011) observaron que el límite inferior de detección (LLOD en inglés) del NQAD fue de 10 ng/ml, seguido del CAD (detector de aerosol cargado) de Corona con un LLOD de 76 ng/ml y el detector de UV (en 200 nm) con un LLOD de 178 ng/ml a un volumen de inyección de 25 µl de analitos que consisten en diversas características fisicoquímicas. Basándose en el estudio realizado por Olsovská, Kamenik y Cjthaml (2009), los compuestos antibióticos investigados (con una baja absorción de UV), los macrólidos (oleandomicina, eritromicina, troleandomicina, claritromicina y roxitromicina) habían presentado una sensibilidad tres veces mayor con la detección de NQAD, en comparación con la detección de UV. Con el aumento de la sensibilidad de NQAD en los niveles de LOD (límite de detección) y LOQ (límite de cuantificación), junto con la capacidad del NQAD para detectar compuestos antibióticos no cromofóricos, se había permitido la identificación de compuestos antibióticos novedosos (Olsovská, Kamenik y Cajthaml, 2009).

A diferencia de los detectores de índice de refracción, el detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) convencional ofrece capacidades de gradiente y una sensibilidad adecuada. Sin embargo, un inconveniente del ELSD es que la respuesta del detector es exponencial, en lugar de lineal (Kimball, Arjo y Johnston, 2004). La transformación de datos se debe aplicar a la respuesta de datos de ELSD para generar una función lineal. Con la transformación de datos, los detectores de dispersión de luz por evaporación, tales como el ELSD 800 y ELSD 3300 de Alltech, han demostrado una excelente linealidad, además de la aceptable exactitud, precisión (repetibilidad y precisiones entre ensayos), especificidad, robustez y estabilidad (Cintron y Riskey, 2013). Sin embargo, se ha demostrado que el detector NQAD es 50 y 10 veces más sensible que ELSD 800 y ELSD 3300 con límites de detecciones (LOD) de 50 g/ml, 10 g/ml y 1 g/ml para el ELSD 800, el ELSD 3300 y el NQAD, respectivamente.

Tal como se muestra más adelante, los métodos de la invención se pueden usar para identificar y cuantificar los restos ácido siálico en una glucoproteína recombinante. Por ejemplo, la cantidad y/o la relación del ácido N-acetilneuramínico y el ácido N-glucolilneuramínico liberados se resolvieron y cuantificaron fácilmente usando los métodos de la invención. Otros restos glucano (por ejemplo, el análisis de composición de los glucanos unidos a N, la galactosa terminal, los glucanos unidos a O y los monosacáridos) se pueden determinar y cuantificar de manera similar.

Liberación del resto ácido glucano de la glucoproteína recombinante

Se puede usar cualquier método adecuado para dirigir y liberar el resto glucano de la glucoproteína. Los métodos incluirán la selección de las enzimas adecuadas que escinden el resto glucano que se desea determinar y cuantificar. Tales enzimas, conocidas como glucosidasas, se conocen ampliamente y están disponibles en el mercado. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: las sialidasas; la PNGasa F, que escinde todos los oligosacáridos complejos, híbridos o con alto contenido de manosa unidos a la asparagina (excepto aquellos que contienen un núcleo de α(1-3)-fucosa); las endoglucosidasas F1, F2 y F3; la endoglucosidasa H; la O-glucosidasa para la liberación de glucanos unidos a O; y la galactosidasa para la liberación de galactosa terminal.

En uno de los métodos de la invención, la glucoproteína recombinante se digiere con una sialidasa para liberar ácido siálico. El ácido siálico liberado se puede detectar después usando la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación. Se puede usar cualquier cantidad de sialidasas disponibles en el mercado. La invención se ilustra más adelante usando Sialidase-A™ (Prozyme), que libera ácido N-acetilneuramínico unido a α(2-3), α(2-6), α(2-8) y α(2-9) de carbohidratos complejos. Sin embargo, también se pueden usar otras sialidasas, dependiendo de la aplicación y el resto ácido siálico particular que se va a detectar en la glucoproteína recombinante.

Separación del glucano liberado de la glucoproteína recombinante

Opcionalmente, después de liberarse el resto glucano de la glucoproteína recombinante, se puede usar una etapa de separación para la mejora de la capacidad de detección del método de la invención. El resto glucano liberado se puede separar mediante cualquier cantidad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación, electroforesis capilar, filtración y/o cromatografía sobre la base del tamaño, la carga, la hidrofobicidad o una combinación de los mismos. La cromatografía puede ser en un lote o en una columna.

En un aspecto ampliamente usado en los laboratorios de cuantificación, la etapa de separación se realiza usando la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC en inglés). Las columnas de HPLC están disponibles en una amplia diversidad de formatos, tamaños y medios de cromatografía. En una realización de la invención que emplea la HPLC que se ilustra más adelante, se puede usar una etapa de cromatografía de interacción hidrófila (HILIC en inglés) para separar el resto ácido siálico liberado de la glucoproteína recombinante. Sin embargo, se debe entender que se pueden desarrollar otras etapas de separación, dependiendo del resto glucano o los restos que se van a analizar y la glucoproteína. Las condiciones de carga y elución pueden hacer uso de diversos tampones y gradientes, dependiendo de la aplicación seleccionada, y son conocidos por parte de aquellos expertos en la materia.

Glucoproteína recombinante para su uso en los métodos de la invención

Para los fines de la invención, una glucoproteína recombinante se define como cualquier proteína que se produce mediante una célula hospedadora que se ha diseñado para producir la proteína mediante técnicas de biología molecular, tales como la tecnología de ADN recombinante (ADNr), por lo que la proteína se ha glucosilado después de la traducción. El estado del resto glucano en una glucoproteína recombinante puede ser un atributo de calidad crítica, en especial, para las glucoproteínas recombinantes destinadas para aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, la administración a un mamífero). Por consiguiente, los métodos de la invención tienen una utilidad particular en la fabricación de proteínas terapéuticas que son glucoproteínas recombinantes. Solo unos pocos ejemplos de tales proteínas, que se describen con más detalle más adelante, son los anticuerpos, las proteínas de fusión, las hormonas y las citocinas, así como los derivados, las variantes, las muteínas, los fragmentos, los multímeros y los conjugados de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de las glucoproteínas recombinantes que se pueden analizar mediante los métodos de la presente invención incluyen las proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas a o sustancialmente similares a la totalidad o parte de una de las siguientes proteínas: factor de necrosis tumoral (TNF en inglés), ligando flt3 (documento WO 94/28391), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, IL-2, angiopoyetina-2 (Maisonpierre y col. (1997), *Science* 277(5322): 55-60), ligando para el receptor activador de NF-kappa B (RANKL, documento WO 01/36637), ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, documento WO 97/01633), linfopoyetina derivada del estroma tímico, factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF en inglés, patente australiana n.º 588819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre (patente estadounidense n.º 6.204.363), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos, RANTES, hormona de crecimiento de la proteína 2 similar a fibrinógeno humano (FGL2; n.º de acceso de NCBI NM_00682; Rugg y Pytela (1995), *Gene* 160:257-62), insulina, insulinotropina, factores de crecimiento similares a insulina, hormona paratiroidea, interferones, incluyendo α -interferones, γ -interferones e interferones de consenso (patentes estadounidenses n.º 4.695.623 y 4.897.471), factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas similares a sinaptotagmina (SLP 1-5), neurotrofina-3, glucagón, interleucinas, factores estimuladores de colonias, linfoxina- β , factor inhibidor de la leucemia y oncostatina-M. Las descripciones de las glucoproteínas recombinantes que se pueden analizar de acuerdo con los métodos de la invención se pueden hallar en, por ejemplo, *Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research*, todos los volúmenes (Aggarwal y Gutterman, Eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); *Growth Factors: A Practical Approach* (McKay y Leigh, Eds., Oxford University Press Inc., Nueva York, 1993); y *The Cytokine Handbook*, Vol. 1 y 2 (Thompson y Lotze Eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

De manera adicional, los métodos de la invención son útiles para analizar los glucanos liberados de las glucoproteínas recombinantes que comprenden la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos de un receptor para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, un antagonista para tal receptor o cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente y/o las proteínas sustancialmente similares a tales receptores o antagonistas. Estos receptores y antagonistas incluyen: ambas formas del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR en inglés, denominadas p55 y p75, patente estadounidense n.º 5.395.760 y patente estadounidense n.º 5.610.279), receptores de interleucina-1 (IL-1) (tipos I y II; patente EP n.º 0460846, patente estadounidense n.º 4.968.607 y patente estadounidense n.º 5.767.064), antagonistas del receptor de IL-1 (patente estadounidense n.º 6.337.072), antagonistas o inhibidores de IL-1 (patentes estadounidenses n.º 5.981.713, 6.096.728 y 5.075.222), receptores de IL-2, receptores de IL-4 (patente EP n.º 0 367 566 y patente estadounidense n.º 5.856.296), receptores de IL-15, receptores de IL-17, receptores de IL-18, receptores de Fc, receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos, receptores para el factor inhibidor de la oncostatina-M y la leucemia, receptor activador de NF-kappa B (RANK, documento WO 01/36637 y patente estadounidense n.º 6.271.349), osteoprotegerina (patente estadounidense n.º 6.015.938), receptores para TRAIL

(incluyendo receptores de TRAIL 1, 2, 3 y 4) y receptores que comprenden dominios de muerte, tales como Fas o receptor inductor de la apoptosis (AIR en inglés).

Otras glucoproteínas recombinantes que se pueden analizar usando la invención incluyen las proteínas que comprenden la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos de los antígenos de diferenciación (denominadas proteínas CD) o sus ligandos o proteínas sustancialmente similares a cualquiera de estos. Tales antígenos se desvelan en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani y col., Eds., Kobe, Japón, 1996). Las proteínas CD similares se desvelan en entornos de fabricación posteriores. Los ejemplos de tales antígenos incluyen CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 y ligandos de los mismos (ligando CD27, ligando CD30, etc.).

Los métodos de la invención se adaptan en particular para el análisis de los restos ácido siálico en glucoproteínas recombinantes que son proteínas de fusión. Las proteínas de fusión pueden comprender la totalidad o una parte de cualquiera de las proteínas anteriores fusionadas con otra proteína o dominio de proteína. Las proteínas de fusión particularmente útiles son las proteínas de fusión de Fc. Una cantidad de tales proteínas de fusión está disponible en el mercado o está en desarrollo. Los ejemplos de las proteínas de fusión que se pueden analizar usando los métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, etanercept, aflibercept, rilonacept, belatacept, abatacept y alefacept.

Las glucoproteínas recombinantes enzimáticamente activas o sus ligandos también se pueden analizar usando la invención. Los ejemplos incluyen las proteínas que comprenden la totalidad o parte de una de las siguientes proteínas o sus ligandos o una proteína sustancialmente similar a una de estas: elementos de la familia de los dominios de la disintegrina y la metaloproteínasa, incluyendo enzima convertidora de TNF-alfa, diversas cinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno tisular, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, antagonista de IL-2, alfa-1 antitripsina, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente y otras numerosas enzimas y sus ligandos.

Las proteínas recombinantes que son anticuerpos también se pueden analizar usando los métodos de la invención. El término "anticuerpo" se refiere a las inmunoglobulinas de cualquier isotipo o subclase o a una región de enlace a antígeno de las mismas que compite con el anticuerpo intacto por el enlace específico, a menos que se especifique de otra manera, incluyendo los fragmentos humanos, humanizados, quiméricos, multispecíficos, monoclonales, policlonales y de oligómeros o enlace a antígeno de las mismas. También se incluyen las proteínas que tienen un fragmento o una región de enlace a antígeno, tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpos, Fd, dAb, maxicuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias, fragmentos de regiones determinantes de complementariedad (CDR en inglés), scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir un enlace a antígeno específico a un polipéptido diana. El término "anticuerpo" es inclusivo de, pero sin limitación, aquellos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula hospedadora transfectada para expresar el anticuerpo.

Los ejemplos de los anticuerpos incluyen, pero sin limitación, aquellos que reconocen una cualquiera o una combinación de proteínas, incluyendo, pero sin limitación, las proteínas mencionadas anteriormente y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD32, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, subunidad p35 de IL-12, IL-13, IL-21, IL-23, subunidad p19 de IL-23, subunidad p40 compartida con IL-12/IL-23, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-13, receptor de IL-17, subunidades del receptor de IL-18, FGL2, PDGF- β y análogos de los mismos (véanse las patentes estadounidenses n.º 5.272.064 y 5.149.792), B7RP-1, B7RP-2, VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, c-fms, receptor de EGF (véase la patente estadounidense n.º 6.235.883), receptor de CGRP, receptor de VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9 en inglés), FGF21, ligando de osteoprotegerina, interferón gamma, EGFRvIII, simulador de linfocitos B (BlyS, también conocido como BAFF, THANK, TALL-1 y zTNF4; véase Do y Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1): 19-25), receptor de BAFF, BCMA, April, ST2, complemento de C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto de gen que se expresa junto con el cáncer de pulmón), HER-2, HER-3, glucoproteína asociada a tumor TAG-72, antígeno SK-1, epítomos asociados a tumor que están presentes en niveles elevados en los sueros de pacientes con cáncer de colon y/o de páncreas, epítomos o proteínas asociados a cáncer expresados en células de cáncer de mama, colon, células escamosas, próstata, páncreas, pulmón y/o riñón y/o en células de melanoma, glioma o neuroblastoma, núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, integrina VLA-4, integrinas B2, TSLP, IFN γ , receptores de TRAIL 1, 2, 3 y 4, RANK, ligando de RANK, TNF- α , molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), molécula-3 de adhesión intracelular (ICAM-3), angiopoyetina 1 (Ang1), angiopoyetina 2 (Ang2), leucointegrina adhesina, glucoproteína de plaqueta gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor de tejido VIIa), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado al linfocito T citotóxico), muerte celular programada 1 (PD-1), ligando de muerte celular programada 1 (PDL-1), ligando de muerte celular programada 2 (PDL-2), gen-3 de activación de linfocitos (LAG-3), dominio de inmunoglobulina de linfocitos T y dominio de mucina 3 (TIM3), receptor de Fc- γ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, esclerostina, L-selectina, virus sincitial respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. Los

ejemplos específicos de los anticuerpos conocidos que se pueden analizar usando los métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, adalimumab, alirocumab, bevacizumab, infliximab, abciximab, alemtuzumab, bapineuzumab, basiliximab, belimumab, briakinumab, brodalumab, canakinumab, certolizumab pegol, cetuximab, conatumumab, denosumab, dupilumab, eculizumab, gemtuzumab, guselkumab, ozogamicina, golimumab, 5 ibritumomab, ixekizumab, ipilimumab, tiuxetan, labetuzumab, lebrizumab, mapatumumab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, muromonab-CD3, nivolumab, natalizumab, nimotuzumab, ofatumumab, omalizumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pemtumomab, pertuzumab, pembrolizumab, ranibizumab, rituximab, romosozumab, rovelizumab, rilotumumab, tildrakizumab, tocilizumab, tositumomab, tralokinumab, trastuzumab, tremelimumab, ustekinumab, vedolizumab, zalutumumab y zanolimumab.

Los ejemplos de las citocinas que son glucoproteínas de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, subunidad p35 de IL-12, IL-13, IL-17 (incluyendo, pero sin limitación, monómeros, homodímeros y heterodímeros de IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D y IL-17E (también conocidos como IL-25)), IL-21, IL-23, subunidad p19 de IL-23 y subunidad p40 compartida con IL-12/IL-23.

Habiéndose descrito la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no de limitación.

Ejemplos

20 ABREVIATURAS

ACN:	Acetonitrilo
AEX:	Cromatografía de intercambio de aniones
CAD:	Detector de aerosol cargado
25 CEX:	Cromatografía de intercambio de cationes
CNLS:	Detección de dispersión de luz por nucleación de condensación
DMB:	1,2-diamino-4,5-metilendioxibenceno
ELSD:	Detector de dispersión de luz por evaporación
HIC:	Cromatografía de interacción hidrófoba
30 HILIC:	Cromatografía de interacción hidrófila
HPAEC-PAD:	Cromatografía de intercambio de aniones y detección amperométrica con pulsos
LLOD:	Límite inferior de detección
LOD:	Límite de detección
LOQ:	Límite de cuantificación
35 NANA:	Ácido N-acetilneuramínico
Neu5Ac:	Ácido N-acetilneuramínico
NGNA:	Ácido N-glucolilneuramínico
NQAD:	Detector de nanocuantificación de analitos
PAD:	Detector amperométrico con pulsos
40 RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa
TFA:	Ácido trifluoroacético
WCPC:	Recuento de partículas por condensación a base de agua
LCMS:	Cromatografía líquida-espectrometría de masas

45 Métodos y materiales

Se adquirieron columnas de amida de PolyGLYCOPLEX (50 x 4,0 mm con 5 μ) y (100 x 2,1 mm, 5 μ) a través de PolyLC. Se adquirieron una columna XBridge C18 (4,6 x 250 mm con 5 μ) y una columna analítica YMC-Pack ODS-AQ (2,0 x 150 mm con 3 μ) a través de Waters. Se adquirieron una columna Kinetex C18 (4,6 x 100 mm con 2,6 μ) y una columna de azúcar de modo mixto (cromatografía de iones/exclusión por tamaño) (8,0 x 300 mm con 6 μ) a través de Phenomenex y Shodex, respectivamente. Las columnas de intercambio de aniones y cationes (4,6 x 150 mm con 3 μ) se adquirieron a través de Sepax Technologies. Se adquirieron 1-heptanosulfonato de sodio, hidrógeno sulfato de trimetil tetradecil amonio, ácido L-glutámico, ácido L-aspártico, NANA y NGNA a través de Sigma Aldrich. Se adquirió sialidasa-A a través de Prozyme. Se adquirieron recipientes de muestreador automático de HPLC, insertos de vidrio y tapas de recipiente a través de Agilent. Se usaron dos glucoproteínas internas (Glucoproteínas A y B) que contenían ácido siálico (NANA) unido a N y O como proteínas modelo para el estudio.

EJEMPLO 1

60 1. Exploración inicial de las columnas de HPLC con diversas sustancias químicas

La selección de una columna adecuada es una parte importante del desarrollo de cualquier método de HPLC. Por lo tanto, se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de las múltiples sustancias químicas de la columna. Con el fin de retener y cuantificar el ácido siálico, se evaluaron diversas columnas de RP-HPLC, incluyendo la columna X-bridge 65 C18, la columna YMC-Pack ODS-AQ C18 y la columna Kinetex C18 en condiciones de fases móviles ácidas (TFA al 0,1 % y TFA/ACN al 0,1 % como fases móviles A y B, respectivamente) y neutras (tampón de fosfato 50 mM, pH 7,0

y ACN como las fases móviles inicial y de elución, respectivamente). También se llevó a cabo una evaluación a un pH intermedio usando fosfato de trietilamina 10 mM a pH 4,4 como fase móvil inicial y acetonitrilo como fase móvil de elución. En todos los casos, se mantuvo inicialmente un gradiente isocrático al 5 % de B durante 5 minutos antes de la aplicación de un gradiente lineal con un incremento del 4 % por minuto hasta que se alcanzó el 95 % de B. Se aplicó un caudal de 1 ml/min en todos los casos.

Puesto que el análisis de RP-HPLC en presencia de reactivos de pares iónicos adecuados puede aumentar la retención de los analitos cargados (Sharma, Glick y Vouros, 2012), como el ácido siálico, también se exploró la cromatografía de pares iónicos mediante la adición de ya sea un reactivo de pares iónicos catiónico positivamente cargado o un agente de pares iónicos aniónico negativamente cargado a la fase móvil a una concentración final de 5 mM. Se usó una solución de 1-heptanosulfonato de sodio como reactivo de pares iónicos catiónico (Calhoun y King, 2007) e hidrógeno sulfato de trimetil tetradecil amonio como reactivo de pares iónicos aniónico (Remsburg, 2007). Los análisis cromatográficos de pares iónicos se llevaron a cabo en una columna X-bridge C18 usando TFA al 0,1 % con un reactivo de pares iónicos 5 mM como fase móvil A y TFA al 0,1 % con un reactivo de pares iónicos 5 mM/ACN como fase móvil B de elución. En todos los casos, se aplicó un gradiente lineal del 5 % de B al 95 % de B en el transcurso de 20 minutos. Tal como describen Isakau, Robert y Shingel (2009), se evaluó una columna de azúcar de modo mixto de cromatografía de iones/exclusión por tamaño (SEC/IEX en inglés) a través de Shodex en modo isocrático a un caudal de 1 ml/min usando metanol al 50 % como fase móvil. Tal cromatografía SEC/IEX se ha reconocido como una técnica eficaz para la determinación simultánea de aniones y cationes después de una inyección de muestra individual en la columna de separación (Mori, Taoda, Itabashi, Ikedo y Tanaka, 2006). El patrón de ácido siálico (NANA) a una concentración de 1 mg/ml se diluyó en serie hasta 0,0156 mg/ml y a partir de ahí se inyectaron 100 μ l de cada patrón.

Como el detector NQAD no es compatible con un alto contenido de sal, las columnas AEX y CEX se evaluaron usando un gradiente de pH en lugar de un gradiente de sal. Se realizó la cromatografía de intercambio de iones en el gradiente de pH usando las columnas de cationes y aniones de Sepax. Con el pKa conocido (2,6) de ácido siálico (NANA), se aplicó un gradiente de pH lineal a partir de un pH 2,2 que terminó en un pH 3,6 usando glicina/HCl 10 mM para la cromatografía de intercambio de aniones y un gradiente lineal de pH 3,6 a pH 2,2 usando glicina/HCl 10 mM para la cromatografía de intercambio de cationes. Se llevaron a cabo todos los análisis en los sistemas Agilent 1100 o 1200 equipados con un NQAD de QUANT Technologies.

RESULTADOS: los resultados de evaluación de diversas técnicas de separación sugirieron que la cuantificación del ácido siálico no derivatizado no era factible con técnicas cromatográficas, tales como RP-HPLC, cromatografía de pares iónicos, cromatografía de iones/exclusión por tamaño de modo mixto y cromatografía de intercambio de iones (en el modo de gradiente de pH). Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de las columnas de RP-HPLC han sugerido que el ácido siálico altamente polar no podría retenerse en condiciones de pH ácido, neutro o intermedio. El fenómeno observado no fue inesperado, ya que los grupos polares altamente enriquecidos en el ácido siálico (carbonilo, oxilo, carboxílico, amina y múltiples hidroxilos) inhiben su enlace a las columnas de RP-HPLC. Aunque las columnas de RP-HPLC facilitan la retención del ácido siálico marcado fluorescente altamente hidrófobo (Zauner, Deelder y Wuhler, 2011), el ácido siálico no derivatizado altamente polar es difícil de retener en una columna de RP-HPLC. El intento que se realizó para aumentar la hidrofobicidad del ácido siálico con la ayuda de reactivos de pares iónicos no tuvo éxito. El análisis de RP-HPLC del ácido siálico en presencia de reactivos de pares iónicos de cationes y aniones no ayudó a mejorar la retención del ácido siálico no derivatizado a la columna de RP-HPLC. Aunque los enfoques intentados deben trabajarse sobre bases teóricas, el resultado negativo podría haber resultado del hecho de que la cantidad recomendada por el proveedor del reactivo de pares iónicos 5 mM puede no haber sido suficiente para un enlace adecuado. Basándose en la literatura publicada, la cantidad de los reactivos de pares iónicos debe ser significativamente mayor en las moléculas altamente polares como el ácido siálico. Por ejemplo, se usó una solución acuosa 60 mM de reactivo de pares iónicos de triisopropanolamina para la determinación de los ácidos siálicos en fluidos biológicos usando la cromatografía de pares iónicos en fase inversa (Siskos y Spyridk, 1999). Se puede explorar el aumento de la cantidad de reactivos de pares iónicos.

Los resultados de evaluación de la columna de azúcar de modo mixto de cromatografía de iones/exclusión por tamaño (dimensión de 8 x 300 mm) indicaron que la sensibilidad del método no fue suficiente para la aplicación prevista. El patrón de ácido siálico con concentraciones \leq 1 mg/ml no presentó ningún pico en 100 μ l de inyección en esta columna. Como el umbral de detección del método está por debajo del intervalo deseado (de 0,015 a 1,0 mg/ml), no se realizó una optimización adicional de este método. La misma columna con una dimensión menor podría ayudar a mejorar la sensibilidad del método. Sin embargo, las columnas con dimensiones menores aún no están disponibles. No se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de cualquiera de los análisis mencionados anteriormente, ya que ninguno de estos presentó ningún pico distinto de los picos de inyección.

Las fases estacionarias que contienen estructuras poliméricas de derivados de poli-succinimida con grupos funcionales, tales como PolyGLYCOPLEX, aspartamida de polisulfetoilo y aspartamida de polihidroxietilo, son más adecuadas, ya que estas se usan ampliamente para separar diversos compuestos altamente polares (Ikegami, Tomomatsu, Takubo, Horie y Tanaka, 2008).

EJEMPLO 2

2. Evaluación de la columna de amida de PolyGLYCOPLEX para la separación de NANA-NGNA

Esta evaluación fue para evaluar el uso de una columna de amida de PolyGLYCOPLEX para la separación y la cuantificación de NANA y NGNA en proteínas que contienen ambas formas de ácidos siálicos. Aunque los métodos de RP-HPLC son adecuados para la retención del ácido siálico marcado fluorescente altamente hidrófobo (Zauner, Deelder y Wuhrer, 2011), el ácido siálico no derivatizado altamente polar es difícil de retener en una columna de RP-HPLC. Por lo tanto, se exploró la cromatografía HILIC. Las fases estacionarias que contienen estructuras poliméricas de derivados de poli-succinimida con grupos funcionales, tales como PolyGLYCOPLEX, aspartamida de polisulfoetilo y aspartamida de polihidroxietilo, se han usado para separar diversos compuestos altamente polares (Ikegami, Tomomatsu, Takubo, Horie y Tanaka, 2008). La columna de amida de PolyGLYCOPLEX (100 x 2,1 mm, 3 µ) a través de PolyLC se evaluó en condiciones isocráticas usando la fase móvil que contenía acetonitrilo con fosfato de trietilamina 10 mM (80:20 en v/v) a un pH 4,4. Los patrones de NANA y NGNA a 1 mg/ml se diluyeron a 1:10 con agua, en primer lugar, y, después, los dos patrones se mezclaron a una relación de 1:1 antes de que se realizaran inyecciones de 10 µl. Después de la inyección de la mezcla de NANA-NGNA, también se inyectaron, por separado, 5 µl de cada uno de los patrones de NANA-NGNA. Se llevaron a cabo análisis en el sistema Agilent 1100 usando el ajuste de NQAD mostrado a continuación.

Parámetros de NQAD

Ajuste de calibre para la presión de gas	206,843 kPa (30 PSI)
Temperatura de evaporador	35 °C
Temperatura de nebulizador	25
Filtro de ajuste	1X
Diferencia	0 %
Flujo de efluente	1,5 ml/min
Linealización	Activa
Temperatura óptica	60 °C
Temperatura de crecimiento	60 °C
Temperatura de acondicionador	20 °C

RESULTADOS: tal como se representa en la Figura 1, el análisis llevado a cabo en la columna de amida de PolyGLYCOPLEX usando acetonitrilo con fosfato de trietilamina 10 mM a pH 4,4 en condiciones isocráticas proporcionó una excelente separación entre NANA y NGNA. Las asignaciones de pico se realizaron mediante la inyección de NANA y NGNA por separado. Sin embargo, el grado de arrastre fue tan grave (datos no mostrados) que si se inyecta NGNA después de NANA, no se podría obtener un cromatograma de NGNA limpio sin tener un nivel de traza de NANA y viceversa. El problema del arrastre junto con la variabilidad de ciclo a ciclo inherente a los métodos isocráticos llevó a no tener en cuenta este método. Aunque se puede desarrollar y adoptar un protocolo de limpieza de columna para resolver el problema del arrastre, este puede influir en la exactitud de los resultados de cuantificación.

EJEMPLO 3

3. Optimización del método de PolyGLYCOPLEX para la separación de NANA-NGNA

Los resultados de evaluación de las columnas de amida de PolyGLYCOPLEX de 5 y 10 cm en condiciones de fases móviles diferentes se muestran en los apartados 3.1 a 3.4. Los resultados de evaluación de las temperaturas de evaporador se muestran en el apartado 3.5.

3.1 Optimización de la cromatografía

En este ejemplo, se evaluó y optimizó la columna de amida de PolyGLYCOPLEX en condiciones de fases móviles diferentes y diversos ajustes de la temperatura de evaporador de NQAD. Puesto que la columna de amida de PolyGLYCOPLEX superó a otras sustancias químicas de columna en términos de retención del ácido siálico no derivatizado, se seleccionó la columna de amida de PolyGLYCOPLEX para una optimización adicional a fin de lograr la mejor separación posible entre NANA y NGNA sin tener el problema del arrastre. Aunque este apartado (apartado 3.1) detalla la optimización cromatográfica del método, el apartado 3.2 describe las condiciones usadas para la optimización de la temperatura de evaporador de NQAD. Las diferentes condiciones cromatográficas evaluadas son las desglosadas a continuación.

- Columna de PolyGLYCOPLEX de 10 cm con ACN al 100 % y ácido fórmico al 10 % como fases móviles
- Columna de PolyGLYCOPLEX de 10 cm con ACN al 100 % y TFA al 0,1 % como fases móviles
- Columna de PolyGLYCOPLEX de 5 cm con ACN al 100 % y ácido fórmico al 10 % como fases móviles

- Columna de PolyGLYCOPLEX de 10 cm con ACN y ácido fórmico al 20 % como fases móviles

Se evaluó una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm o de 5 cm usando ACN como fase móvil inicial. Se usaron las fases móviles de elución del ácido fórmico o el TFA al 0,1 % desglosadas anteriormente. El patrón de NANA a 1 mg/ml se diluyó a 1:10 con agua y se realizaron inyecciones a 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µl. Además de eso, se inyectaron patrones de NANA y NGNA (la misma preparación de muestra que en el apartado 2) para evaluar la capacidad del método para separar NANA y NGNA. Se llevaron a cabo análisis en el sistema Agilent 1200. Los parámetros de NQAD son los mismos que en el apartado 2. Se llevaron a cabo múltiples experimentos mediante el cambio de la composición del gradiente inicial, variando del 0 % de B al 35 % de B. En todos los casos, el % inicial de B se mantuvo constante durante 1 minuto antes de la aplicación del gradiente lineal de 15 minutos hasta que se logró el 95 % de B. La temperatura de columna se mantuvo en ambiente y el caudal se mantuvo a 0,5 ml/min.

RESULTADOS: de las diversas composiciones de gradiente inicial que se evaluaron, una composición de gradiente inicial del 20 % parece ser ligeramente mejor en términos de separación entre NANA y NGNA. Un cromatograma representativo de la separación de NANA-NGNA que usa la columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm (usando acetonitrilo al 100 % y ácido fórmico al 10 % como fases móviles A y B) en las composiciones de gradiente inicial del 15, 20 y 25 % se muestra en las Figuras 4, 5 y 6, respectivamente.

A diferencia del problema de arrastre encontrado anteriormente en el ciclo isocrático (apartado 1), no se observó tal arrastre en ninguna de las condiciones de gradiente evaluadas. La evaluación de la columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm que usa acetonitrilo al 100 % y ácido trifluoroacético al 0,1 % como fases móviles A y B proporcionó una simetría de ruido y picos de período inicial que fue menos que deseable. Los resultados de evaluación de la columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 5 cm que usa acetonitrilo al 100 % y ácido fórmico al 10 % como fases móviles A y B proporcionaron una separación entre NANA y NGNA (Figura 7) que no fue tan buena como la separación lograda en la columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm en las mismas condiciones de análisis (Figura 5). La evaluación de la columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm que usa acetonitrilo al 100 % y ácido fórmico al 20 % como fases móviles A y B indicó que el ácido fórmico al 20 % como fase móvil B es mejor que el ácido fórmico al 10 % en términos de lograr picos más agudos y una separación ligeramente mejor entre NANA y NGNA (Figura 2A frente a Figura 5). La Figura 2B representa un cromatograma de NANA y NGNA inyectados por separado, así como una mezcla. Se sometió a ensayo la superposición de cromatograma del patrón de NANA en concentraciones múltiples y no se encontró ningún problema de arrastre.

3.2 Optimización de la temperatura de evaporador de NQAD

La temperatura de evaporador (el parámetro más crítico del NQAD) se optimizó para maximizar la evaporación del disolvente del eluyente, al tiempo que se mantuvo la volatilidad mínima del ácido siálico para lograr una relación de señal respecto a ruido óptima. Otros ajustes de temperatura (temperatura de nebulizador, temperatura óptica, temperatura de crecimiento y temperatura de acondicionador) son constantes y no se pueden variar. El ajuste de la temperatura de evaporador se varió de 35 a 60 °C (35, 40, 45, 50, 55 y 60 °C) para determinar la temperatura de evaporador óptima a la que se puede lograr la mejor relación de señal respecto a ruido. La evaluación se llevó a cabo usando la columna de amida de PolyGLYCOPLEX (50 x 4 mm, 5 µ) con ACN al 100 % y ácido fórmico al 20 % como fases móviles A y B, respectivamente. Todos los parámetros de NQAD, excepto la temperatura de evaporador, fueron los mismos que en el Ejemplo 2. La composición de fase móvil inicial del 20 % de B se mantuvo durante 1 minuto antes de aplicarse el gradiente. Se aplicó un incremento lineal del 8,3 % de B/min, de tal manera que se alcanzó el 95 % de B a los 10 minutos. La temperatura de columna se mantuvo en ambiente y el caudal de columna se mantuvo a 1,0 ml/min.

RESULTADOS: la intensidad de señal, así como el ruido de período inicial, fue directamente proporcional al grado de la temperatura de evaporador. Se logró una relación de señal respecto a ruido óptima a una temperatura de evaporador de 40 °C.

EJEMPLO 4

4. Columna de amida de PolyGLYCOPLEX corta para la cuantificación de NANA

A fin de cuantificar el NANA en las muestras en las que está ausente el NGNA, se evaluó una columna de amida de PolyGLYCOPLEX corta (50 x 4,6 mm, 3 µm). Con el fin de aumentar la vida de columna, se usó un menor porcentaje de ácido fórmico como fase móvil de elución en lugar de ácido fórmico al 20 %. Como un porcentaje menor de ácido fórmico no es lo suficientemente fuerte como para eluir el ácido siálico altamente polar de la columna de amida de PolyGLYCOPLEX, se llevó a cabo una evaluación en un enfoque de gradiente novedoso. En este enfoque, el gradiente de la fase móvil se cambió de la fase móvil inicial a la fase móvil de elución tan pronto como se realizó la inyección, de tal manera que el ácido siálico enlazado se eluye en un entorno isocrático de la fase móvil de elución. La evaluación se llevó a cabo para determinar las composiciones y el caudal de las fases móviles óptimas, así como el mejor gradiente. El NANA liberado de PNGasaF se sometió a un análisis de HPLC/NQAD antes y después de la filtración para determinar la necesidad de filtración. Los parámetros de evaluación detallados se describen en los apartados 4.1 a 4.4.

Los resultados de evaluación de la columna de amida de PolyGLYCOPLEX corta (50 x 4,6 mm, 3 µm) con un menor porcentaje de ácido fórmico como fase móvil de elución son adecuados para la cuantificación de NANA, siempre que el cambio de la condición de fase móvil inicial a la condición de fase móvil de elución se produzca poco después de realizarse la inyección. En esta condición de gradiente, se logran un período inicial estable y una simetría de picos adecuada a medida que se produce la elución del ácido siálico (NANA) durante el entorno isocrático de la fase móvil de elución. Los resultados de análisis de las diferentes fases móviles de elución, las diferentes condiciones de gradiente y los diferentes caudales mostrados en los apartados 4.1 a 4.3 indicaron que se logran los mejores resultados con ácido fórmico al 1 % a un caudal de 1,5 ml/min con el uso del gradiente 2. Los resultados mostrados en el apartado 4.3 sugirieron que no se requiere la filtración de muestra posterior a la PNGasaF. Los cromatogramas representativos del patrón de ácido siálico (NANA) y el ácido siálico (NANA) liberado de PNGasaF de las glucoproteínas usando las condiciones optimizadas se muestran en las Figuras 3A y 3B, respectivamente. Una gráfica de regresión lineal representativa de los patrones de NANA se muestra en la Figura 8.

4.1 Evaluación de ácido fórmico al 0,5 % frente a ácido fórmico al 1,0 %

Aunque se usó acetonitrilo al 100 % como fase móvil inicial, se usó ácido fórmico al 0,5 % o al 1,0 % como fase móvil de elución para este conjunto de experimentos. Todos los parámetros de NQAD, excepto la temperatura de evaporador, fueron los mismos que en el apartado 2. Se aplicó la temperatura de evaporador optimizada de 40 °C. El cambio de gradiente de fase móvil A (ACN al 100 %) a fase móvil B (ácido fórmico al 1,0 %) llevó que se produjera 1 minuto después de la inyección. Después del cambio de gradiente, se mantuvo la condición isocrática al 1,0 % de ácido fórmico durante 10 minutos. La temperatura de columna se mantuvo en ambiente y el caudal se mantuvo a 1,0 ml/min.

RESULTADOS: los cromatogramas superpuestos y apilados de dos fases móviles de elución (ácido fórmico al 0,5 % y al 1 % como fases móviles de elución) demostraron que el cromatograma generado con ácido fórmico al 1 % ha presentado una mejor simetría de picos que con ácido fórmico al 0,5 %, por tanto, se seleccionó el ácido fórmico al 1 % sobre el del 0,5 %.

4.2 Evaluación de los gradientes 1 y 2

Todos los parámetros, excepto el gradiente de HPLC, fueron los mismos que en el apartado 4.1. Se usaron ACN al 100 % y ácido fórmico al 1,0 % como fases móviles A y B, respectivamente. Aunque el cambio de gradiente de ACN al 100 % a ácido fórmico al 1,0 % llevó a que se produjera en 1,0 minuto para el gradiente 2, la duración para el cambio de gradiente se redujo de 1,0 minuto a 0,1 minutos para el gradiente 1.

RESULTADOS: los cromatogramas obtenidos del gradiente 1 (cambio rápido del gradiente de la fase móvil inicial a la fase móvil de elución en 0,1 minutos) y del gradiente 2 (cambio del gradiente de la fase móvil inicial a la fase móvil de elución en 1,0 minuto) no fueron muy diferentes entre sí. Sin embargo, se seleccionó el gradiente 2 con un tiempo de retención más largo porque la separación entre el ácido siálico y los patrones de idoneidad del sistema (eluido de ácido L-glutámico y ácido L-aspártico) es mejor con el gradiente 2.

4.3 Evaluación de diferentes caudales

Se aplicó el gradiente 2 de HPLC descrito en el apartado 4.2 a múltiples caudales (1,0, 1,2 y 1,5 ml/min) usando acetonitrilo al 100 % y ácido fórmico al 1,0 % como fases móviles A y B, respectivamente. Todos los parámetros de NQAD fueron los mismos que en el apartado 4.1.

RESULTADOS: los análisis llevados a cabo en diferentes caudales mostraron que la mejor simetría de picos se logra a un caudal de 1,5 ml/min.

4.4 Evaluación de la digestión de muestra filtrada frente a no filtrada

Las muestras digeridas con sialidasa se inyectaron con y sin filtración de Centricon. La intención de la filtración de Centricon fue separar el ácido siálico (NANA) de la proteína interferente y otros componentes de matriz. Se llevó a cabo un análisis en una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 5 cm usando los ajustes de NQAD y gradiente de HPLC optimizados mostrados a continuación. Se usaron acetonitrilo al 100 % y ácido fórmico al 1,0 % como fases móviles A y B, respectivamente.

Gradiente de HPLC

Tiempo	% de B
0	0
1,0	100

10	100
Temperatura de columna: ambiente Caudal: 1,5 ml/min Detección: NQAD	

Ajustes de NQAD

Ajuste de calibre para la presión de gas	206,843 kPa (30 PSI)
Temperatura de evaporador	35 °C
Temperatura de nebulizador	25
Filtro de ajuste	1X
Diferencia	0 %
Flujo de efluente	1,5 ml/min

Los patrones de NANA en el intervalo de 1 a 32 nmol/20 µl de inyección se prepararon a partir de un patrón de NANA liofilizado a través de Sigma. Se sometió a ensayo un patrón de idoneidad del sistema, ya que este es una parte fundamental de muchos procedimientos analíticos para garantizar la validez de rendimiento del sistema integrado que consiste en los equipos, la electrónica, las funciones analíticas y las muestras que se van a analizar. La inyección de 20 µl de la mezcla de idoneidad del sistema, que consistía en 1,0 mg/ml de ácido L-glutámico y ácido L-aspartico, cada uno, se incluyó en cada ciclo analítico.

RESULTADOS: los perfiles cromatográficos, así como las respuestas de pico del NANA, fueron comparables entre las muestras filtradas y no filtradas. Con el fin de lograr una mayor eficacia durante el análisis, se puede excluir la alternativa de filtración que consume tiempo, ya que es evidente que la cuantificación de NANA no se ve interferida por la proteína residual y otros componentes de matriz.

EJEMPLO 5

5. Evaluación de comparabilidad del método de HPLC/NQAD frente a otros métodos ortogonales

El método de HPLC corta con el gradiente 2 descrito en el apartado 4.2 a un caudal de 1,5 ml/min se comparó frente a los métodos de HPAEC-PAD y HPLC/DMB para determinar qué tan bien se correlacionan los resultados obtenidos a partir del método de HPLC/NQAD.

5.1 Preparación de muestra para los análisis de HPLC/NQAD, HPAEC-PAD y HPLC/DMB:

En el estudio comparativo, se usaron las técnicas específicas de método para la liberación de NANA de la glucoproteína. Las condiciones de digestión enzimática usadas para el HPLC/NQAD y HPAEC-PAD se describen en los apartados 5.1.1 y 5.1.2, respectivamente. La hidrólisis ácida y la posterior derivatización de DMB realizadas en el método de HPLC/DMB se describen en el apartado 5.1.3. Las etapas de cálculo para la determinación de los picomoles de NANA por inyección se muestran de la siguiente manera.

$$\text{Pmol de NANA/injec.} = \frac{\text{X,XX } \mu\text{g}}{\mu\text{l de NANA}} \cdot \frac{1 \mu\text{mol}}{309,27 \mu\text{g}} \cdot \frac{10^6 \text{pmol}}{1 \mu\text{mol}} \cdot 20 \mu\text{l (vol. inyectado)}$$

Donde X,XX µg es la cantidad de NANA inyectado y 309,27 µg es el peso molecular de NANA

Donde X,XX µg es la cantidad de NANA inyectado y 309,27 µg es el peso molecular de NANA

Las ecuaciones usadas para la determinación de los picomoles de proteína por inyección, así como los picomoles de NANA/picomoles de proteína, son tal como se muestran en los apartados 5.1.1 a 5.1.3.

5.1.1 Digestión de sialidasa-A de las muestras para el método de HPLC/NQAD:

En la digestión enzimática, se mezclaron 10 µl de una muestra de 5,0 mg/ml (50 µg) con 12 µl de sialidasa-A (Prozyme) y 4 µl de tampón de reacción 5X y 4 µl de agua Milli-Q. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 37 °C ± 3 °C durante 4 horas ± 15 minutos, lo que se estableció como la condición de digestión óptima a lo largo del transcurso de

tiempo de reacción. Al final de la incubación, se añadieron 30 µl de agua para llevar el volumen total a 60 µl. Se usó la siguiente ecuación para el cálculo de los picomoles de proteína por inyección para el método de HPLC/NQAD:

$$5,0 \text{ mg/ml} * 10 \text{ } \mu\text{l} * (1 \text{ } \mu\text{mol/PM en } \mu\text{g}) * (10^6 \text{ picomol/} \mu\text{mol}) * (1/60 \text{ } \mu\text{l}) * 20 \text{ } \mu\text{l}$$

Donde 5,0 mg/ml es la concentración de la muestra, PM es el peso molecular de la proteína, 60 µl es el volumen final de la muestra y 20 µl es el volumen de inyección.

Los picomoles de NANA/picomoles de proteína se determinan mediante la división de los picomoles de NANA/inyec. calculados basándose en la ecuación presentada en el apartado 5.1 dividido por los X1 picomoles/inyec. calculados a partir del apartado 5.1.1.

5.1.2 Digestión de sialidasa-A de las muestras para el método de HPAEC-PAD:

Con el fin de liberar el ácido siálico de las muestras de glucoproteína, se mezclaron 10 µl de una muestra de 1,0 mg/ml con 2 µl de sialidasa-A (Prozyme) y 4 µl de tampón de reacción 5X y 4 µl de agua Milli-Q. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 37 °C ± 2 °C durante 4 horas ± 15 minutos, lo que se estableció como la condición de digestión óptima a lo largo del transcurso de tiempo de reacción. Al final de la incubación, se añadieron 780 µl de agua para llevar el volumen total a 800 µl. Se usó la siguiente ecuación para el cálculo de los picomoles de proteína por inyección para el método de HPAEC-PAD:

$$1,0 \text{ mg/ml} * 10 \text{ } \mu\text{l} * (1 \text{ } \mu\text{mol/PM en } \mu\text{g}) * (10^6 \text{ picomol/} \mu\text{mol}) * (1/800 \text{ } \mu\text{l}) * 20 \text{ } \mu\text{l}$$

Donde 1,0 mg/ml es la concentración de la muestra, PM es el peso molecular de la proteína, 800 µl es el volumen final de la muestra y 20 µl es el volumen de inyección.

Los picomoles de NANA/picomoles de proteína se determinan mediante la división de los picomoles de NANA/inyec. calculados basándose en la ecuación presentada en el apartado 5.1 dividido por los X2 picomoles/inyec. calculados a partir del apartado 5.1.2.

5.1.3 Hidrólisis ácida y derivatización de DMB para el método de HPLC/DMB:

El ácido N-acetilneuramínico (NANA) de las muestras de glucoproteínas se liberó mediante una hidrólisis con ácido acético 8 M seguida de una derivación de columna previa con reactivo fluorescente 1,2-diamino-4,5-metilendioxi-benceno (DMB). El ácido N-acetilneuramínico forma un derivado de quinoxalino altamente fluoróforo cuando se somete a tratamiento con DMB (Lin, Inoue e Inoue, 2000). Se usó la siguiente ecuación para el cálculo de los picomoles de proteína para el método de HPLC/DMB.

$$1,0 \text{ mg/ml} * 10 \text{ } \mu\text{l} * (1 \text{ } \mu\text{mol/PM en } \mu\text{g}) * (10^6 \text{ pmol/} \mu\text{mol}) * (1/60 \text{ } \mu\text{l}) * 20 \text{ } \mu\text{l}$$

Donde 1,0 mg/ml es la concentración de la muestra, PM es el peso molecular de la proteína, 60 µl es el volumen final de la muestra y 20 µl es el volumen de inyección.

Los picomoles de NANA/picomoles de proteína se determinan mediante la división de los picomoles de NANA/inyec. calculados basándose en la ecuación presentada en el apartado 5.1 dividido por los X3 picomoles/inyec. calculados a partir del apartado 5.1.3.

5.2 Análisis de muestra y evaluación de comparabilidad

Las glucoproteínas A y B se sometieron a ensayos paralelos en los métodos de HPLC/NQAD y HPLC/DMB, así como en el método de HPAEC-PAD. En el método de HPLC/NQAD, se analizó el NANA liberado de sialidasa-A usando los parámetros cromatográficos y los ajustes de NQAD descritos en el apartado 4.4. En el método de HPLC/DMB, se llevó a cabo un análisis en el sistema Waters Alliance equipado con un detector de fluorescencia. Se usó una columna ultrasphere ODS (Beckman) para la separación. La fase móvil para la separación isocrática de NANA y NGNA consistió en agua al 78 %/metanol al 21 %/acetonitrilo al 0,3 %. El eluido de columna se controló usando un detector fluorescente a 374 nm y 448 nm de longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. En el método de HPAEC-PAD, se analizó el NANA liberado de sialidasa-A usando hidróxido de sodio 0,1 M e hidróxido de sodio 0,1 M con acetato de sodio 1 M como fases móviles A y B, respectivamente. Se aplicó un gradiente lineal del 5 % de B al 18 % de B durante 35 minutos. El eluido se controló usando un detector amperométrico con pulsos (PAD). La concentración de NANA obtenida a partir del método de HPLC/NQAD se comparó frente a los resultados obtenidos a partir de los métodos de HPLC/DMB y HPAEC-PAD para determinar la comparabilidad del método de HPLC/NQAD con los dos métodos ortogonales.

RESULTADOS: los resultados de comparabilidad del HPLC/NQAD frente al HPAEC-PAD y el HPLC/DMB se muestran a continuación en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Aunque los métodos ortogonales (HPAEC-PAD y HPLC/DMB) se usan para la cuantificación del ácido siálico de la glucoproteína-A, el método de HPAEC-PAD es el único método

disponible para la glucoproteína-B. Por lo tanto, el método de HPLC/NQAD solo se comparó frente al HPAEC-PAD para la glucoproteína-B. Los resultados del HPLC/NQAD fueron comparables a los métodos ortogonales para las muestras sometidas a ensayo.

5

Tabla 1: Comparación de HPLC/NQAD frente a HPAEC-PAD

ID de Muestra	Contenido de NANA en mol/mol de HPLC/NQAD	Contenido de NANA en mol/mol de HPAEC-PAD	% de RSD entre HPLC/NQAD y HPAEC-PAD
Lote n.º A1 de glucoproteína A	13,67	12,96	4
Lote n.º A2 de glucoproteína A	13,59	12,48	6
Lote n.º A3 de glucoproteína A	13,28	12,82	2
Lote n.º A4 de glucoproteína A	13,26	12,52	4
Lote n.º A5 de glucoproteína A	13,25	12,86	2
Lote n.º A6 de glucoproteína A	12,50	11,48	6
Lote n.º A7 de glucoproteína A	13,48	12,46	5
Lote n.º A8 de glucoproteína A	13,64	12,54	6
Lote n.º A9 de glucoproteína A	12,71	11,82	5
Lote n.º B1 de glucoproteína B	21,1	22,3	4
Lote n.º B2 de glucoproteína B	25,5	23,3	6
Lote n.º B3 de glucoproteína B	22,5	22,4	0,3

Tabla 2: Comparación de HPLC/NQAD frente a HPLC/DMB

ID de Muestra	Contenido de NANA en mol/mol de HPLC/NQAD	Contenido de NANA en mol/mol de HPLC/DMB	% de RSD entre HPLC/NQAD y HPLC/DMB
Lote n.º A1 de glucoproteína A	16,54	15,26	6
Lote n.º A2 de glucoproteína A	16,79	16,33	2
Lote n.º A3 de glucoproteína A	13,22	13,47	1
Lote n.º A4 de glucoproteína A	13,77	13,96	1
Lote n.º A5 de glucoproteína A	13,34	13,86	3

EJEMPLO 6

10

6. Calificación del ensayo de cuantificación de NANA con la columna de amida de PolyGLYCOPLEX

15

El método de columna corta (con la columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 5 cm) descrito en el apartado 4.4 se sometió a la calificación de método formal. El método de HPLC/NQAD corta (con una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 5 cm) cumplió con todos los criterios de calificación en cuanto a la exactitud, la linealidad y la precisión de ensayo (repetibilidad y precisión intermedia). El LOD y LOQ del método se determinaron como 0,32 y 0,86 nmol/inyec., respectivamente. Los resultados detallados se muestran en los apartados 6.1 a 6.4.

20

6.1 Evaluación de exactitud del método de HPLC/NQAD

25

Con el fin de evaluar la exactitud, se realizó un estudio de adición en el que se añadieron cantidades conocidas de NANA a diversas concentraciones en la glucoproteína-A. Las muestras añadidas y no añadidas se sometieron después a un análisis de HPLC/NQAD después de la digestión con sialidasa. Las concentraciones de NANA obtenidas para las muestras no añadidas se restaron de las muestras añadidas, que, después, se compararon frente a la cantidad conocida de NANA añadido para determinar las recuperaciones reales. A fin de verificar, además, la exactitud, se realizó un análisis de espectrometría de masas en un eluido de HPLC/NQAD de glucoproteína-A enzimáticamente digerida.

RESULTADOS: tal como se ilustra en la Tabla 3, los resultados de los experimentos de adición y recuperación han demostrado que las recuperaciones de NANA añadido en la glucoproteína-A a diversos niveles se encuentran dentro del intervalo del 90-110 %. Las trazas de TIC y los espectros de masas correspondientes indicaron que el pico de NANA obtenido a partir del método de HPLC/NQAD era puro y que ningún otro componente interferente se coeluyó con el NANA.

5

Tabla 3: Resultados de adición y recuperación

Muestra	NANA añadido (nmol/inyec.)	NANA recuperado (nmol/inyec.)	% de recuperación
Glucoproteína-A (2 µl)	5,9	5,8	98,9
Glucoproteína-A (4 µl)	10,8	10,8	100,3
Glucoproteína-A (6 µl)	14,9	14,4	96,3
Glucoproteína-A (8 µl)	18,5	19,8	107,3
Glucoproteína-A (10 µl)	21,6	21,5	99,8

10 6.2 Evaluación del intervalo dinámico lineal

El intervalo dinámico lineal del ensayo se determinó mediante la realización de los conjuntos de patrones de NANA a diversas concentraciones.

15 Tal como se ilustra en la Tabla 4, el intervalo dinámico lineal del ensayo se ha determinado que se encuentra en el intervalo de 1-32 nmol/inyec. con un coeficiente de determinación (R^2) = > 0,99. La gráfica de regresión lineal correspondiente se muestra en la Figura 9.

Tabla 4: Resultados de la evaluación del intervalo dinámico lineal

Concentración de patrón (nmol/inyec.)	Concentración de patrón (ng/inyec.)	Respuesta de NQAD [área de pico (mV*s)]	R^2
1,01	312,5	9,4	0,9998
2,02	625	20,5	
4,04	1.250	47,7	
8,08	2.500	101,2	
16,17	5.000	219,7	
32,33	10.000	446,7	

20

6.3 Evaluación de la precisión de método

La precisión de método, el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de múltiples muestras del mismo tipo de muestra en las condiciones prescritas, se evaluó a dos niveles, la *repetibilidad* y la *precisión intermedia*.

25

6.3.1 Repetibilidad

La repetibilidad o la precisión entre ensayos se expresa en las mismas condiciones de funcionamiento durante un intervalo de tiempo corto. A fin de demostrar la repetibilidad del método, se analizó el ácido siálico liberado (NANA) de la glucoproteína-A en 6 inyecciones de réplica. La desviación típica relativa calculada a partir de múltiples inyecciones se comparó con la diana de rendimiento prevista determinada a partir de la ecuación de Horwitz (Horwitz, 1982) presentada a continuación.

35

$$\% \text{ de RSD} < 2^{(2,5-0,5\log C)} \text{ RSD}$$

Donde C es la concentración del analito en la muestra en mg/ml.

40

RESULTADOS: el % de RSD de 0,96 determinado a partir de la evaluación de repetibilidad se encontraba dentro de la diana de rendimiento del % de RSD de ≤ 4 establecida en base a la ecuación de Horwitz, que se cumplió totalmente. La precisión de un procedimiento analítico que normalmente se expresa como desviación típica o % de RSD de una serie de mediciones se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de repetibilidad de la glucoproteína-A

Repetibilidad de glucoproteína-A	
Glucoproteína-A	NANA (mol/mol)
Réplica 1	13,389
Réplica 2	13,441
Réplica 3	13,678
Réplica 4	13,424
Réplica 5	13,420
Réplica 6	13,629
Promedio	13,497
Desviación típica	0,13
% de RSD	< 0,96

6.3.2 Precisión intermedia

La precisión intermedia se expresa como variaciones dentro de los laboratorios, tales como diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. Con el fin de evaluar la precisión intermedia, se llevó a cabo un análisis por parte de dos analistas en diferentes días. Las precisiones intermedias observadas se compararon con la diana de rendimiento prevista determinada a partir de la ecuación de Horwitz.

RESULTADOS: la precisión intermedia se estableció mediante el análisis de la glucoproteína-A en dos días diferentes y por parte de dos analistas. El % de RSD de 0,95 se encuentra dentro de la diana de rendimiento del % de RSD \leq 6 establecida mediante la ecuación de Horwitz. La precisión de un procedimiento analítico que se expresa como la varianza, la desviación típica o el coeficiente de variación de una serie de mediciones se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultados de la precisión intermedia

Precisión intermedia de glucoproteína en día 1 (Analistas 1 y 2)			
Glucoproteína-A	NANA (mol/mol) Analista 1 (Día 1)	NANA (mol/mol) Analista 2 (Día 1)	NANA (mol/mol) Analista 1 (Día 2)
Réplica 1	13,692	13,475	13,478
Réplica 2	13,625	13,733	13,440
Réplica 3	13,661	13,351	13,544
Media	13,56		
DT	0,13		
% de RSD	0,95		

6.4 Evaluación del LOD/LOQ

Aunque el LOD describe la concentración de analito más baja que probablemente se distinguirá de manera fiable del ruido, el LOQ es la concentración más pequeña que se puede medir de manera fiable mediante el método analítico. Un enfoque tradicional y típico para estimar el LOD y el LOQ consiste en la medición de réplicas (normalmente $n=20$) de un calibrador cero o una muestra para ensayo en blanco y la conversión de la respuesta en nmol/inyección usando la ecuación de regresión lineal derivada de la curva típica. En cuanto a la determinación del LOD y el LOQ, se analizaron 30 réplicas de muestras para ensayo en blanco de matriz (agua) y 10 réplicas de los patrones de ácido siálico más bajos (1 nanomol/inyección). La curva típica construida a partir de patrones de ácido siálico analizados simultáneamente facilita la conversión de las respuestas en nmol/inyección.

El LOD y el LOQ se determinaron a partir de los datos generados a partir de 30 ciclos de réplicas de muestra para ensayo en blanco y 10 ciclos de réplicas de los patrones de ácido siálico más bajos (1,0 nmol/inyec.). Los datos en bruto se convirtieron en nmol/inyec. usando la ecuación de regresión lineal. Aunque la media $+3,3$ de DT se usó para determinar el LOD, la media $+10$ de DT se usó para determinar el LOQ. Tal como se muestra en la Tabla 7, el LOD y el LOQ del método, determinados a partir de 30 inyecciones de muestras para ensayo en blanco, fueron de 0,32 y 0,86 nmol/inyec., respectivamente. El valor observado promedio de 0,99 nmol/inyec. determinado a partir de 10 inyecciones de los patrones de ácido siálico más bajos se encuentra bien dentro del valor esperado de 1,0 nmol/inyec., lo que verifica la exactitud de los patrones más bajos. El % de RSD entre los múltiples valores de los patrones más bajos es del 9 %, lo que verifica la precisión de los patrones más bajos.

Tabla 7: Determinación del LOD/LOQ basada en la verificación de 30 inyecciones de muestras para ensayo en blanco basada en 10 inyecciones de los patrones de ácido siálico más bajos (1 nanomol/inyec.)

N.º de inyección de muestra para ensayo en blanco	Valor de Cal (nmol/inyec.)	N.º de inyección de los patrones de NANA más bajos	NANA (nmol/inyec.)
1	0,41	1	0,88
2	0,20	2	0,96
3	0,07	3	0,85
4	0,11	4	1,06
5	0,08	5	0,95
6	0,03	6	0,93
7	0,03	7	1,12
8	0,04	8	1,10
9	0,03	9	1,05
10	0,08	10	0,99
11	0,03		
12	0,04		
13	0,02		
14	0,04		
15	0,04		
16	0,04		
17	0,04		
18	0,02		
19	0,02		
20	0,02		
21	0,02		
22	0,05		
23	0,02		
24	0,01		
25	0,01		
26	0,02		
27	0,02		
28	0,02		
29	0,06		
30	0,26		
Prom.	0,06		0,99
Desv. típica	0,08		0,09
% de RSD			9 %
LOD	0,32		
LOQ	0,86		

DISCUSIÓN

- 5 Basándose en los datos resumidos en la Tabla 1, no se continuó, además, con el método de RP-HPLC para cuantificar el ácido siálico no derivatizado. A pesar del uso común del RP-HPLC para la cuantificación del ácido siálico derivatizado de DMB (1,2-diamino-4,5-metilendioxi-benceno), el ácido siálico no derivatizado altamente polar no se pudo retener en el RP-HPLC sin alguna forma de derivatización previa. La Tabla 1 resume también la aplicación
- 10 positiva y negativa de otros modos de sustancias químicas de columna (cromatografía de pares iónicos, cromatografía de exclusión de iones, cromatografía de intercambio de cationes y aniones y cromatografía de interacción hidrófoba) para la cuantificación del ácido siálico no derivatizado.
- 15 La evaluación limitada llevada a cabo para aumentar la hidrofobicidad para mejorar el enlace del ácido siálico no derivatizado a la columna de RP-HPLC a través de la utilización de reactivos de pares iónicos no tuvo éxito. Ya que la cromatografía de pares iónicos se evaluó únicamente con un alcance limitado, los futuros investigadores pueden explorar esta área mediante el uso de diversos reactivos de pares iónicos de aniones y cationes diferentes a diversas concentraciones para mejorar el enlace.
- 20 Ya que el detector NQAD no es compatible con un alto contenido de sal, no se realizaron la AEX ni la CEX con gradientes de sal. Por la misma razón, también se excluyó de la evaluación la cromatografía de interacción hidrófoba.
- 25 Tanto la cromatografía de intercambio de aniones como de cationes con un gradiente de pH se evaluaron sin ningún resultado exitoso. La evaluación de la columna de cromatografía de exclusión de iones de modo mixto no es prometedora debido a la sensibilidad deficiente asociada a una dimensión de columna más grande.

Tal como se muestra en las Figuras 2 y 3, las columnas de HILIC de PolyGLYCOPLEX y X-bridge son adecuadas para la retención del ácido siálico no derivatizado. Como la columna de amida de PolyGLYCOPLEX presentó un período inicial relativamente mejor que la columna X-bridge, se seleccionó la columna de amida de PolyGLYCOPLEX para la optimización adicional. Con el uso de la columna de amida de PolyGLYCOPLEX, se logró una simetría de picos aceptable en dos condiciones de elución: (1) una columna de 10 cm con acetonitrilo como fase móvil A y ácido fórmico al 20 % como fase móvil B y (2) una columna de 5 cm con acetonitrilo como fase móvil A y ácido fórmico al 1 % como fase móvil B. Aunque la primera opción es más adecuada para las situaciones en las que los analitos tienen tanto NANA como NGNA presente en los mismos (Figura 4), la segunda opción es ideal si las glucoproteínas contienen únicamente NANA (Figura 6).

La respuesta de pico comparable presentada por las muestras filtradas y no filtradas de Centricon (digestión de glucoproteína sometida a tratamiento con sialidasa) sugiere que la interferencia de matriz de la glucoproteína u otros componentes de matriz no es un problema. Por lo tanto, la filtración de Centricon aplicada para retirar la proteína y los componentes de matriz no es una etapa necesaria.

Tal como se resume en las Tablas 2 y 3, los resultados de cuantificación del ácido siálico obtenidos a partir de HPLC/NQAD están en buena concordancia con los métodos ortogonales. La recuperación del 95-105 % (Tabla 4) obtenida a partir del experimento de adición y recuperación (glucoproteína-A añadida con NANA a diversos niveles), así como los resultados comparables del método de HPLC/NQAD con los métodos ortogonales (Tablas 2 y 3), soportan, además, la exactitud del método.

El intervalo lineal del método de HPLC/NQAD es de 1-32 nmol/inyec. con un coeficiente de determinación (R) = > 0,99 (Tabla 5). El % de RSD del 0,96 % y el 0,95 % (Tablas 6 y 7) determinado a partir de la repetibilidad (precisión entre ensayos) y la precisión intermedia se encontraban bien dentro de la diana de rendimiento del ≤ 4 % y ≤ 6 % de RSD, respectivamente, establecida a partir de la ecuación de Horwitz.

No hay un ahorro de tiempo significativo en los tiempos de análisis cromatográfico, ya que los tiempos de análisis son comparables en HPLC/NQAD, HPAEC/PAD y HPLC/DMB con los tiempos de ciclo respectivos de 30 minutos, 31 minutos y 35 minutos. Sin embargo, el método de HPLC/NQAD proporciona un beneficio de coste sobre el método de HPLC/DMB, ya que se elimina la etapa de derivatización costosa y lenta.

Desde la perspectiva de la programación, resulta beneficioso la retirada de la derivatización. Por ejemplo, se espera que el proceso de secado de la muestra en Speed Vac se complete en aproximadamente 2 horas. Sin embargo, a menudo este puede variar de vez en cuando y añadir más incertidumbre a la línea de tiempo del ensayo. Aunque el tiempo de preparación y el tiempo de análisis de la muestra son comparables entre HPLC/NQAD y HPAEC/PAD, HPLC/NQAD supera a HPAEC/PAD en términos de fiabilidad y facilidad de uso.

CONCLUSIÓN

Como el resto ácido siálico de las proteínas terapéuticas influye en las propiedades biológicas y fisicoquímicas, además de desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la semivida del suero, la cuantificación del ácido siálico en las glucoproteínas es una etapa analítica requerida en la caracterización de las proteínas bioterapéuticas. El método de HPLC/NQAD libre de derivatización descrito en el presente documento es una técnica eficaz y fiable para la cuantificación exacta del ácido siálico no derivatizado en las proteínas terapéuticas recombinantes. El ácido siálico liberado de manera enzimática de proteínas terapéuticas separadas mediante la columna de HILIC de PolyGLYCOPLEX se puede detectar y cuantificar usando un detector de nanocuantificación de analitos (NQAD). Aunque la medición exacta del contenido de ácido siálico es crítica en muchas proteínas terapéuticas, las técnicas actualmente empleadas, tales como HPAEC/PAD y HPLC/DMB, se enfrentan a diversos problemas. Mientras que el método de HPLC/DMB requiere una derivatización tediosa, el método de HPAEC/PAD soporta problemas, tales como la obstrucción de electrodos y altos costes de mantenimiento. Además de eliminar la variabilidad asociada a la derivatización, el método de HPLC/NQAD ha demostrado un intervalo dinámico lineal, así como una excelente precisión, repetibilidad, fiabilidad, exactitud y facilidad de uso con una comparabilidad aceptable con los métodos habitualmente usados de HPAE-PAD y HPLC/DMB.

Referencias

1. Byrne, B., Donohoe, G. y O'Kennedy, R. (2007). Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of bio-pharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today* 12(7/8): 319-326.
2. Hildenbrandt, G. y Aronson, N. (1979). Uptake of asialo-glycophorin by the perfused rat liver and isolated hepatocytes. *Biochemica Et Biophysica Acta* 587(3): 373-80.
3. Ganesa, C., Granda, B. W. y Mattaliano, R. J. (2003). Sialylation levels influence oligosaccharide quantitation: Analyzing response variability using high-pH anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection. *BioPharm International* 16(6): 44-48.

4. Hutchinson JP; Li J; Farrell W; Groeber E; Szucs R; Dicoski G y Haddad PR. (2011). Comparison of the response of four aerosol detectors used with ultra high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1281(12): 1446-55.
- 5 5. Olsovská J; Kamenik Z; Cajthaml T. (2009). Hyphenated ultra high-performance liquid chromatography-Nano Quantity Analyte Detector technique for determination of compounds with low UV absorption. *Journal of Chromatography* 1261(30): 5774-8.
- 10 6. Kimball, B., Arjo, W., Johnston, J. (2004). Single point calibration with non-linear detector: Carbohydrate analysis of conifer needles by hydrophobic interaction chromatography-evaporative light scattering detector. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 27(12): 1835-1848.
- 15 7. Cintron, J. y Risley, D. (2013). Hydrophilic interaction chromatography with aerosol-based detectors for polar compounds lacking UV chromophore in an intravenous formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 78-79:14-18.
- 20 8. Sharma, V.K., Glick, J., Vouros, P. (2012). Reversed-phase ion-pair liquid chromatography electro spray ionization tandem mass spectrometry for separation, sequencing and mapping of sites of base modification of isomeric oligonucleotide adducts using monolithic column. *Journal of Chromatography A* 1245 (6): 65-74.
- 25 9. Calhoun, A.R., King, A.D. (2007). The solubility of ethane in aqueous solutions of sodium 1-pentanesulfonate, sodium 1-hexanesulfonate, sodium 1-heptanesulfonate, and sodium 1-octanesulfonate at 25 °C. *Journal of Colloid and Interface Science* 309 (2): 505-510.
- 30 10. Remsburg, J. W. (2007). Multiply charged cationic pairing agents for trace analysis of anionic species by electro spray ionization mass spectrometry. (N.º de orden 1447279, The University of Texas at Arlington). ProQuest Dissertations and Theses 77.
- 35 11. Isakau, H., Robert, M. y Shingel, K. (2009). A novel derivatization-free method of formaldehyde and propylene glycol determination in hydro gels by liquid chromatography with refractometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49(3): 594-600.
- 40 12. Mori, M., Taoda, H., Itabashi, H., Ikedo, M. y Tanaka, K. (2006). Use of combined ion-exclusion and cation exchange chromatography to study photooxidation of ionic nitrogen compounds on a titanium dioxide photo catalyst. *ACTA CHROMATOGRAPHICA* 1 (16): 28-37.
- 45 13. Horwitz, W. 1982. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical Chemistry* 54:67-76.
- 50 14. Zauner, G., Deelder, M. y Wuhrer, M. (2011). A recent advance in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics. *Electrophoresis*. 32(24): 3456-3466.
- 55 15. Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., Tanaka, N. (2008). Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatography* 1184(1-2): 474-503.
16. Duy, S., Besteiro, S., Berry, L., Perigaud, C., Bressolle, F., Vial, H.J., Lefebvre-Tournier, I. (2012). A quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry method for metabolomic analysis of *Plasmodium falciparum* lipid related metabolites. *Analytica Chimica Acta* 739(20): 47-56.
17. Lin, S.L., Inoue, S. e Inoue, Y. (2000). Acid-base properties of the reaction product of sialic acid with fluoregenic reagent, 1-2-diamino-4,5-methylethylene dioxybenzene (DMB) *Carbohydrate Research* 329(2): 447-451.
18. Horwitz, W. (1982). Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical Chemistry* 54 (1): 67-76.
19. Siskos, PA. y Spyridk, MH. (1999). Determination of sialic acids in biological fluids using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl* 724(2): 205-12.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la determinación de un resto ácido siálico en una glucoproteína recombinante, comprendiendo el método la digestión de la glucoproteína recombinante con una sialidasa para liberar ácido siálico y la cuantificación del ácido siálico usando la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, la separación del ácido siálico liberado de la glucoproteína recombinante antes de la etapa de cuantificación.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, en donde la etapa de separación implica una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), tal como una cromatografía de interacción hidrófila (HILIC).
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación usa un detector de nanocuantificación de analitos (NQAD).
- 15 5. Un método para la determinación del resto glucano en una glucoproteína recombinante, comprendiendo el método la digestión de la glucoproteína recombinante con una glucosidasa para liberar glucano y la cuantificación del glucano usando la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, que comprende, además, la separación del glucano liberado de la glucoproteína recombinante antes de la etapa de cuantificación.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la etapa de separación implica una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), tal como una cromatografía de interacción hidrófila (HILIC).
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la detección de dispersión de luz por nucleación de condensación usa un detector de nanocuantificación de analitos (NQAD).
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la glucoproteína recombinante es un anticuerpo, una proteína de fusión, una hormona o una citocina.
- 30 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde el resto glucano es uno o más de un resto ácido siálico, unido a N.
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en donde se determina la cantidad de resto glucano.
12. Un método de la reivindicación 2, en donde la glucoproteína recombinante es una glucoproteína de fusión de Fc recombinante.
- 40 13. Un método de la reivindicación 2, en donde la glucoproteína recombinante es etanercept.
14. El método de las reivindicaciones 1 a 4 o 13, en donde el ácido siálico es ácido N-acetilneuramínico y/o ácido N-glucolilneurámico.
- 45 15. El método de la reivindicación 14, en donde se determina la cantidad de ácido N-acetilneuramínico y/o ácido N-glucolilneurámico o en donde se determina la relación de ácido N-acetilneuramínico respecto a ácido N-glucolilneurámico.

FIG. 1

Separación de NANA y NGNA en una columna de amida de PolyGLYCOPLEX (trietil amina/acetoneitrilo en condición de gradiente isocrática)

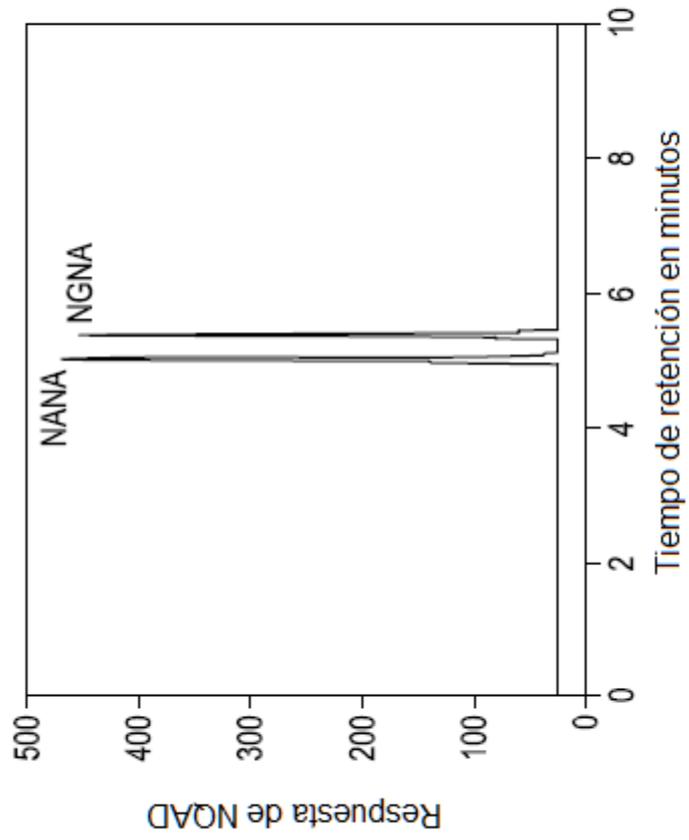


FIG. 2A

Cromatograma de NANA/NGNA en una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm usando ácido fórmico al 20 %

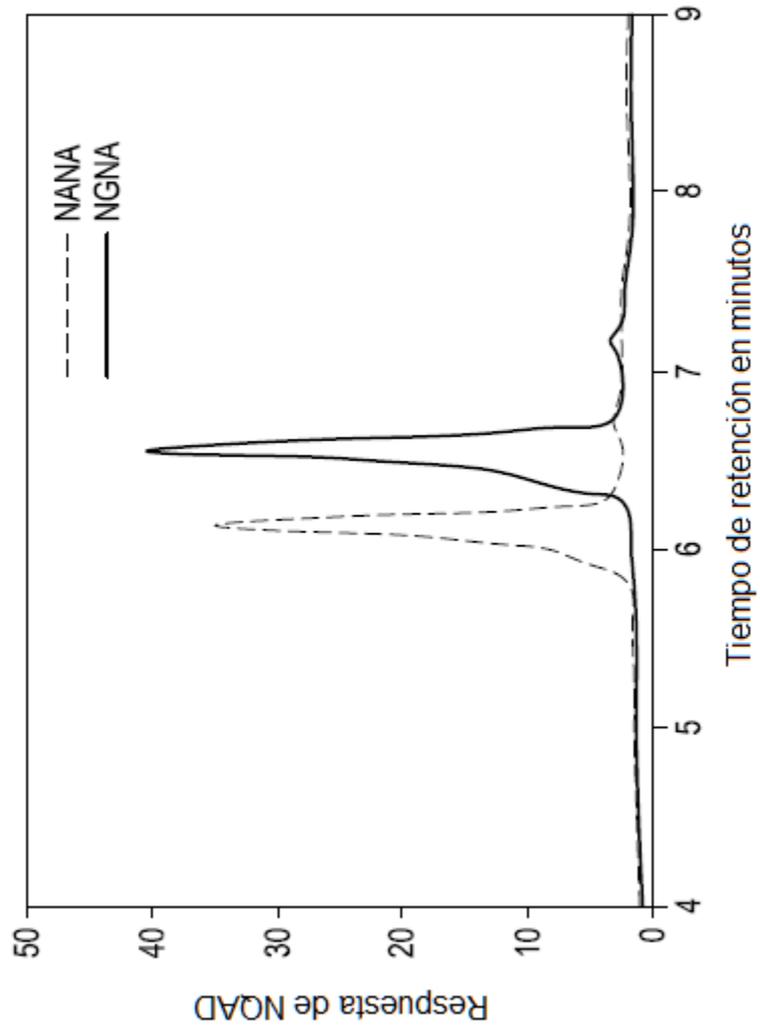


FIG. 2B

Cromatograma de NANA/NGNA (inyección separada y combinada) en una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm usando ácido fórmico al 20 %

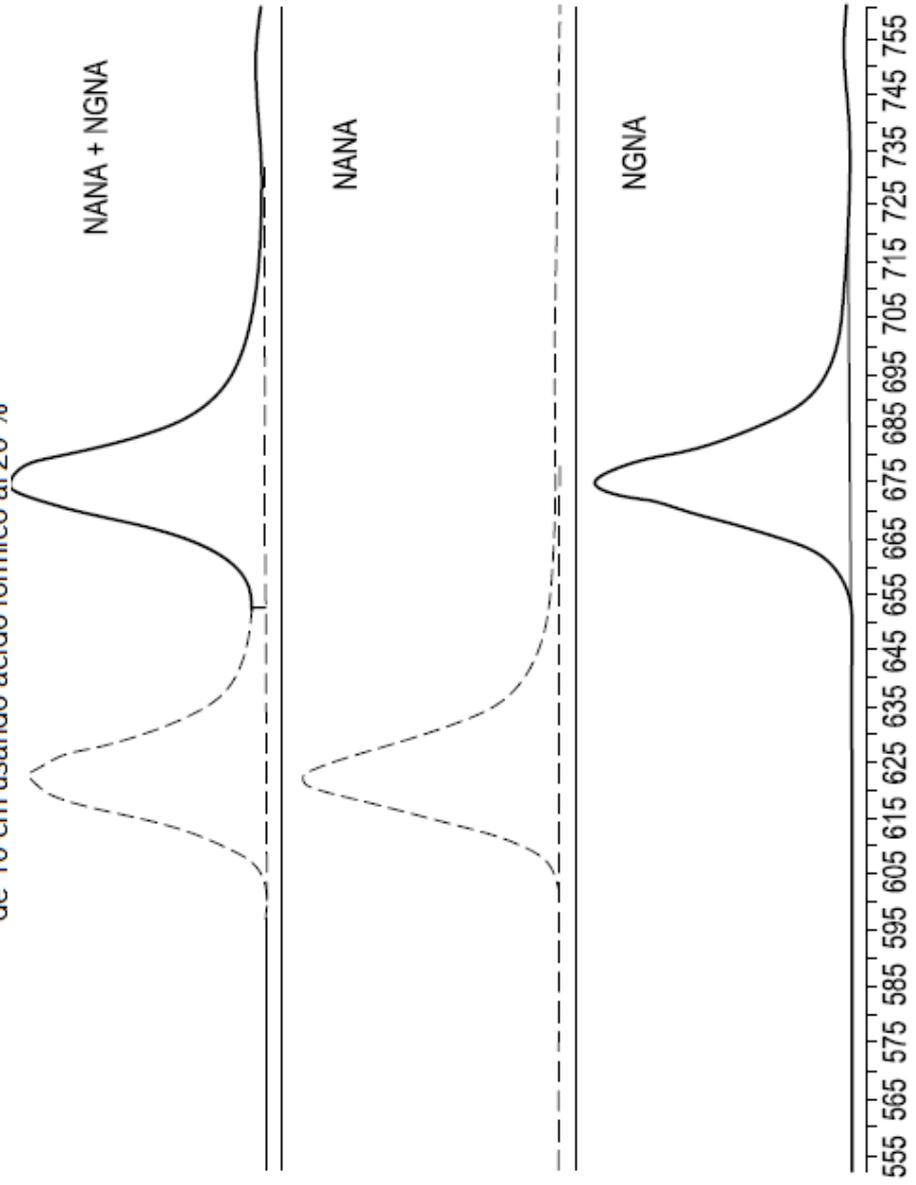


FIG. 3A

Cromatograma representativo del patrón de ácido siálico (NANA)

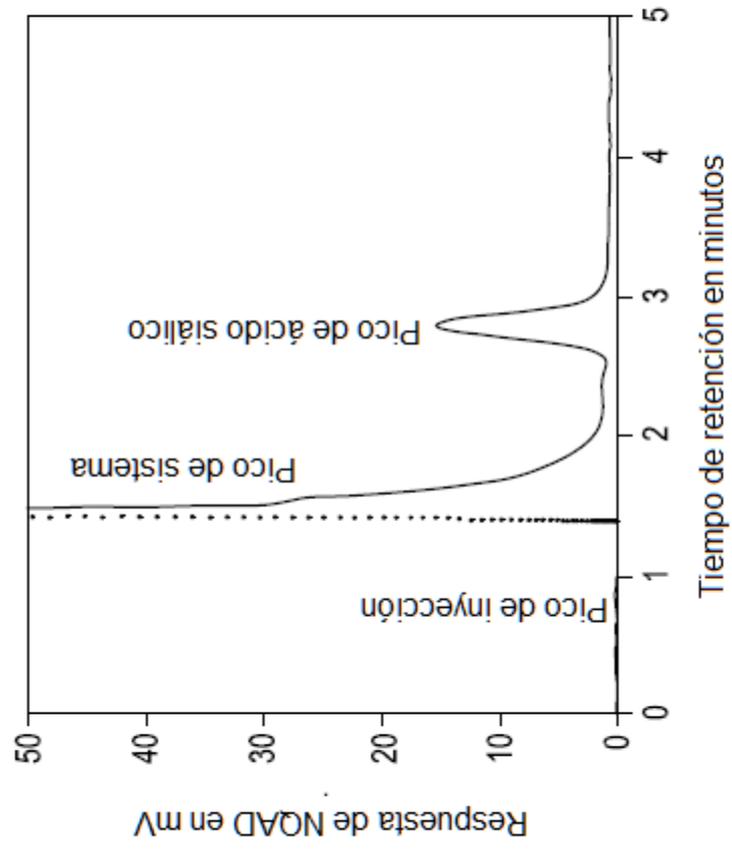


FIG. 3B

Cromatograma representativo del ácido siálico NANA liberado de sialidasa A de la glucoproteína-A

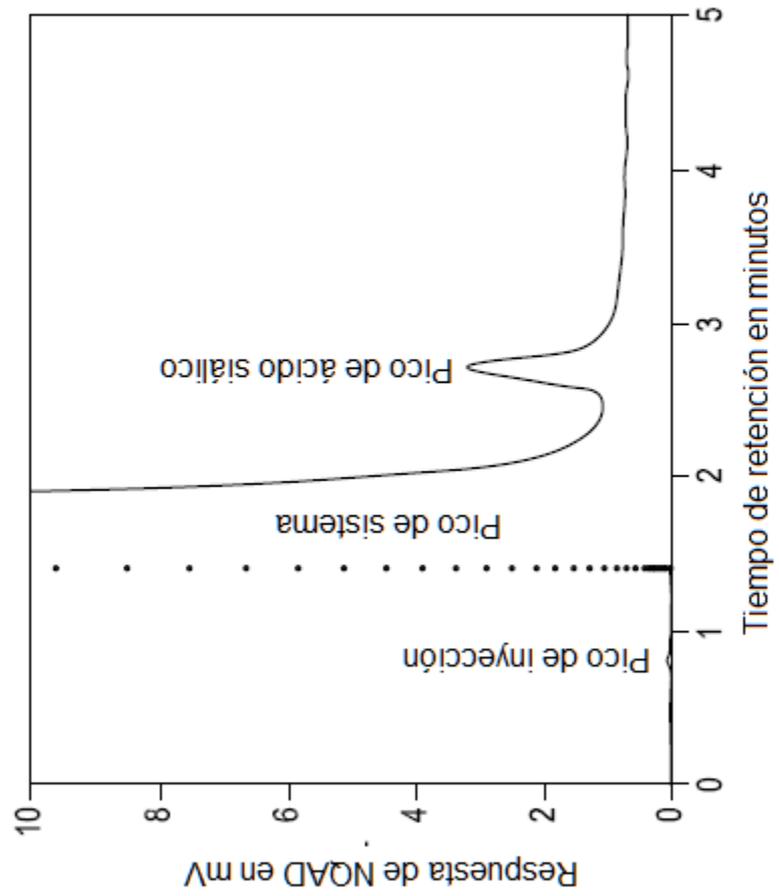


FIG. 4

Cromatograma de NANA-NGNA que usa una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm con una composición de gradiente inicial del 15 % de B

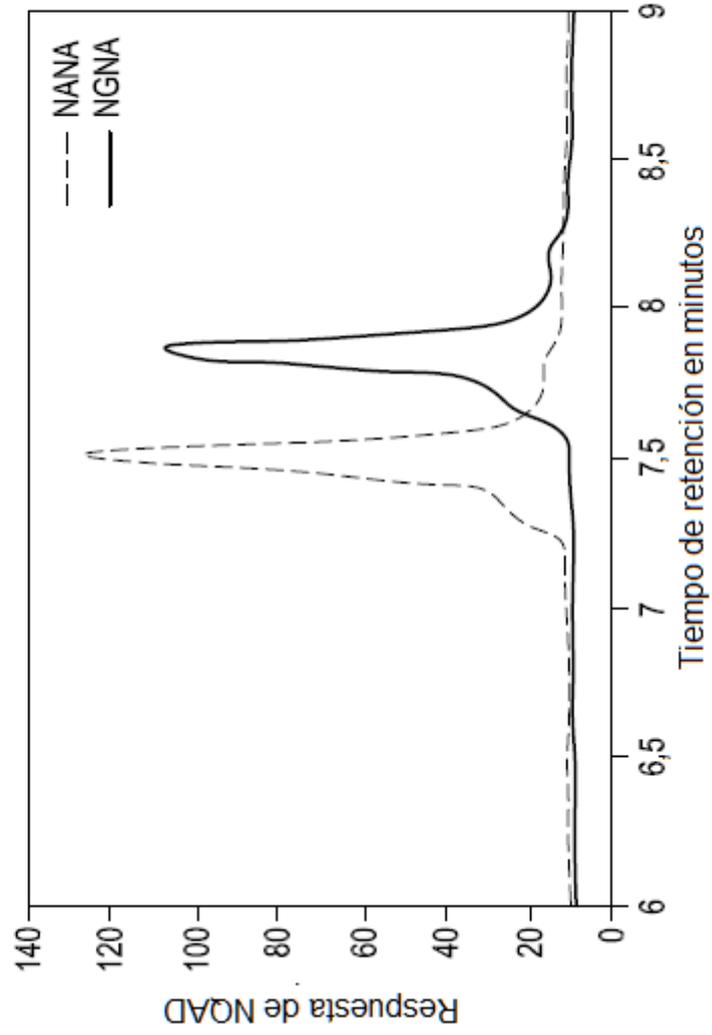


FIG. 5

Cromatograma de NANA-NGNA que usa una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 10 cm con una composición de gradiente inicial del 20 % de B

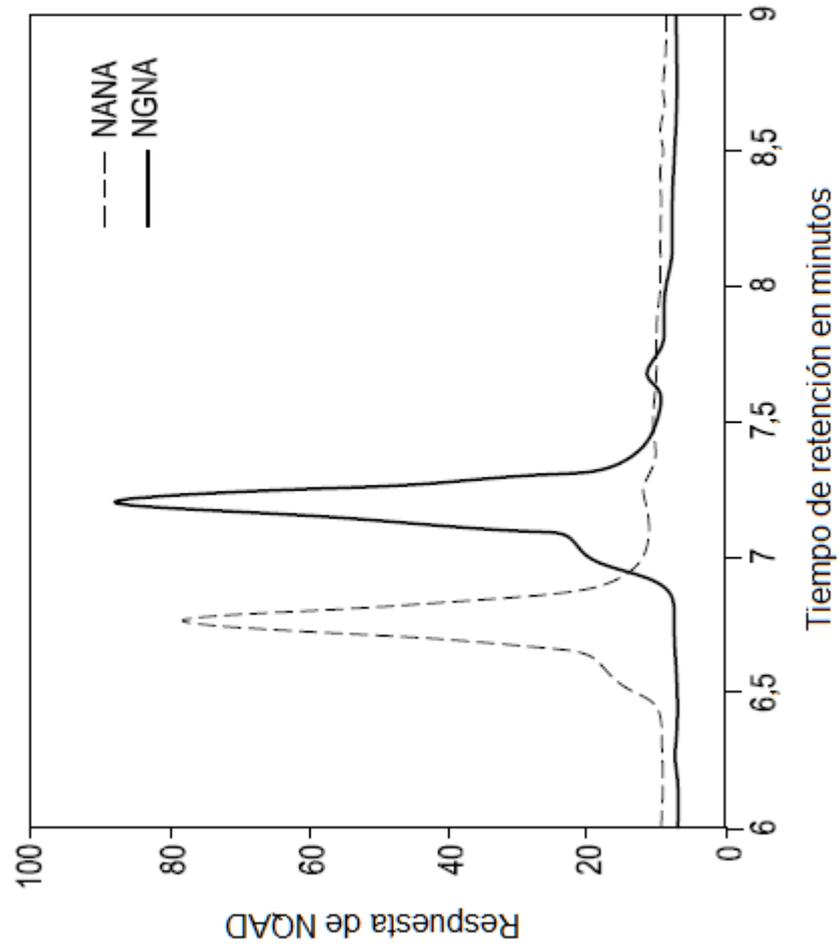


FIG. 6

Cromatograma de NANA/NGNA que usa una columna de amida de PolyGLYCOPEX de 10 cm con una composición de gradiente inicial del 25 % de B

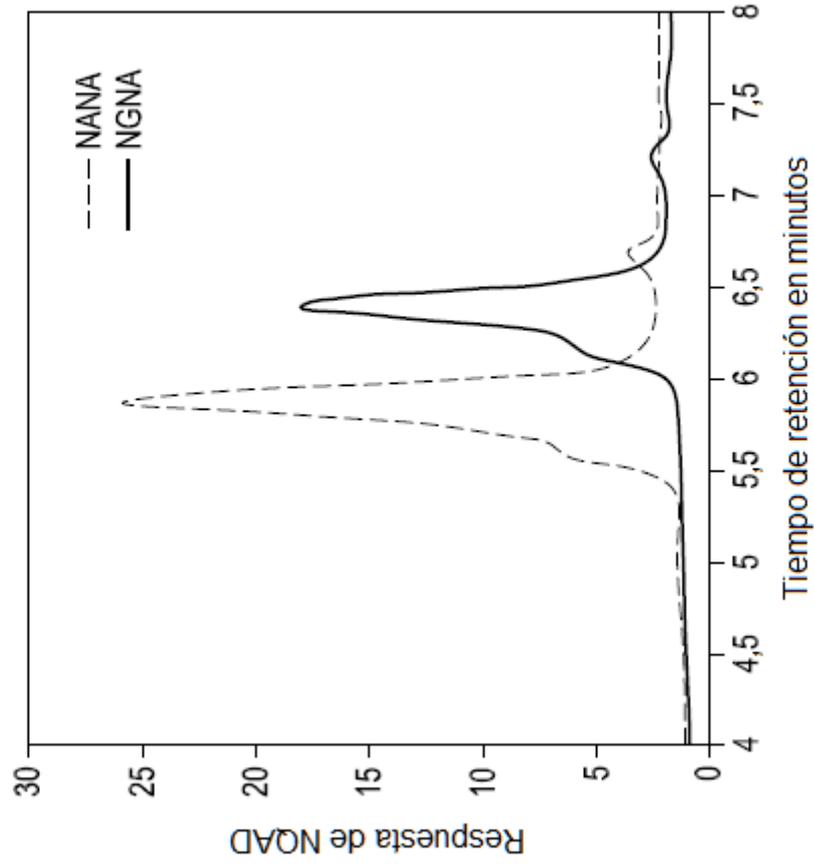


FIG. 7

Separación de NANA y NGNA en una columna de amida de PolyGLYCOPLEX de 5 cm (acetonitrilo al 10 % y ácido fórmico al 10 % como fases móviles A y B) con un gradiente inicial al 20 % de B

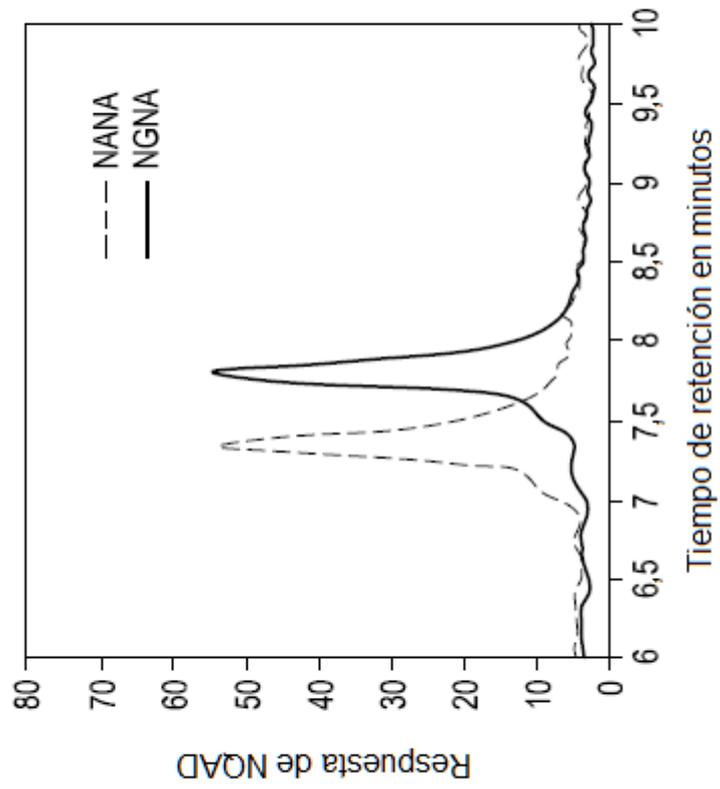


FIG. 8

Gráfica de regresión lineal de los patrones de calibración de ácido siálico (NANA)

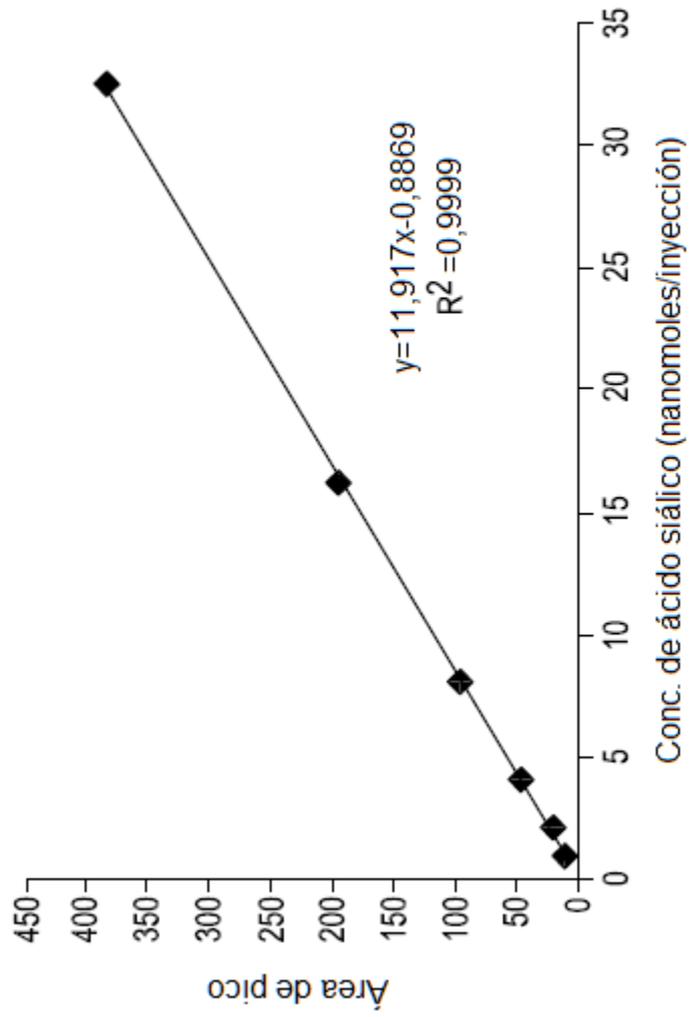


FIG. 9

Intervalo dinámico lineal del ácido siálico en el método de HPLC/NQAD

