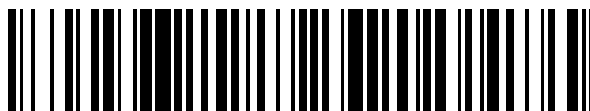


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 302**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2014 PCT/EP2014/075189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2014 E 14802043 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3071601**

54 Título: **Análisis de glicanos mediante la derivatización de residuos de ácido siálico**

30 Prioridad:

21.11.2013 GB 201320571

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

10.02.2020

73 Titular/es:

ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (100.0%)

Albinusdreef 2

2333 ZA Leiden, NL

72 Inventor/es:

BLANK, DENNIS;

WUHRER, MANFRED y

REIDING, KARLI ROBERT

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 741 302 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

Análisis de glicanos mediante la derivatización de residuos de ácido siálico

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a métodos de derivatización de ácidos siálicos que pueden estar presentes en fracciones de glicanos. Esto puede resultar útil para determinar los perfiles de glicosilación de, por ejemplo, glicoproteínas y glicolípidos, y para el uso de dichos métodos en análisis clínicos, así como en el desarrollo y el control biológico.

Antecedentes de la invención

[0002] La glicosilación es una modificación postraduccional común que provoca efectos significativos en las características de las proteínas, como la solubilidad, el plegamiento y la actividad de unión a receptores [1-3]. Un número cada vez mayor de enfermedades han mostrado asociación con cambios en la glicosilación, incluyendo diversos tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes y congénitas [4-8]. Debido a esto, la obtención de perfiles de glicanos de proteínas individuales o muestras más complejas como plasma pueden actuar como un importante biomarcador clínico [9]. Además, se sabe que los glicanos afectan a la actividad, la estabilidad y la inmunogenicidad de los biofármacos, por lo que precisan una monitorización y un control minuciosos.

[0003] Una característica importante de la glicosilación es la presencia de ácidos siálicos (como ácido N-acetilneuramínico y ácido N-glicolilneuramínico) [12]. Estos monosacáridos han mostrado muchas funciones en la comunicación celular, interactúan con tipos concretos de lectinas, y han sido relacionados con el cáncer y la formación de metástasis. En el caso de la glicosilación humana, los ácidos siálicos se pueden unir a una galactosa terminal mediante enlace glicosídico α 2,6 o bien α 2,3, mostrando, en consecuencia, distintas funcionalidades. Los ácidos N-acetilneuramínicos unidos a α 2,3, por ejemplo, son necesarios específicamente para la formación de estructuras sialil Lewis X, que han demostrado ser indicativas de metástasis de diversos tipos de cáncer [16-19], mientras que los ácidos siálicos unidos a α 2,6 desempeñan funciones en la inhibición de la galectina, promoviendo de este modo la supervivencia celular. A causa de la necesidad cada vez mayor de análisis, el desarrollo de métodos de glicómica de alto rendimiento (HTP) resulta de gran interés.

[0004] Una técnica que resulta adecuada para los estudios de glicómica es la espectrometría de masas (MS) mediante desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) de tiempo de vuelo (TOF), ya que puede proporcionar información rápidamente sobre la composición, la secuencia y la ramificación de estructuras de glicanos [23]. Sin embargo, los ácidos siálicos se unen a los glicanos mediante un enlace relativamente débil, lo que provoca a menudo la pérdida del residuo mediante deterioro metastásico y en el origen durante las respectivas fases de ionización y aceleración en el espectrómetro de masas. Además, las especies de glicanos sialiladas tienden a mostrar una alta variabilidad en cuanto a la aducción salina, derivando en múltiples señales para una única composición de glicanos. Asimismo, un grupo carboxilo como el presente en un ácido siálico facilita considerablemente la ionización negativa mediante MALDI, generando una desviación en la intensidad de la señal al comparar oligosacáridos ácidos y neutros, lo cual impide la cuantificación relativa de las mezclas de muestras [24].

[0005] Un modo de mejorar la medición de glicanos sialilados mediante MALDI-TOF-MS es la derivatización [25, 26]. En concreto, las modificaciones químicas del grupo carboxilo del ácido siálico puede prevenir en gran medida el deterioro metastásico, y el producto de reacción resultante se puede analizar mediante MALDI-TOF-MS en modo positivo junto con los tipos no sialilados [24, 25, 27]. Resulta interesante que las condiciones de reacción desarrolladas permiten la derivatización de ácidos siálicos de manera dependiente al enlace, derivatizando de manera diferencial ácidos siálicos con enlace α 2,3 (propensos a la formación de lactonas) y ácidos siálicos con enlace α 2,6 (sometidos a otra modificación química, como la esterificación y la amidación). Los métodos descritos en la literatura implican la metil-esterificación o (metil)amidación, pero estas requieren normalmente muestras de glicanos muy altamente purificadas, condiciones adversas o largos tiempos de reacción, y no muestran una completa especificidad de unión [28-30]. Al ser estos procesos informativos para el análisis de oligosacáridos sialilados, su idoneidad para el análisis HTP de muestras complejas es limitada.

[0006] Uno de los objetos de la presente invención es impedir y/o mitigar al menos uno de los inconvenientes anteriormente mencionados.

Sumario de la invención

[0007] La presente invención se basa en estudios llevados a cabo por los presentes inventores con el fin de desarrollar métodos de derivatización de ácido siálico adecuados para su uso con la medición MALDI-TOF-MS de glicanos sialilados.

[0008] En un primer aspecto, se proporciona un método para derivatizar los residuos siálicos presentes en fracciones de glicanos, comprendiendo el método:

la reacción, con pH 1,9 - 7,6, de una muestra biológica o preparación de glicano en una solución alcohólica, comprendiendo un reactivo al menos una carbodiimida(s) y al menos un triazol o etilo 2-ciano-2-

(hidroximino)acetato (Oxyrna pure), con el fin de derivatizar cualquier residuo de ácido siálico que pueda encontrarse en las fracciones de glicanos presentes en la muestra biológica.

5 **[0009]** Los inventores han observado que la derivatización se realiza mediante alquil-esterificación y formación de lactonas de los residuos de ácido siálico, observándose una amidación escasa o nula. Normamente, se puede observar menos de un 1 % de amidación, como menos de un 0,5 %, o un 0,1 % de amidación. Los inventores han observado que la acetilación de ácidos siálicos se puede evitar en condiciones de derivatización seleccionadas. Por otro lado, la derivatización puede tener lugar tanto en ácido N-acetilneuramínico como en ácido N-glicolilneuramínico, así como en ácidos siálicos unidos a residuos de N-acetilhexosamina, como la N-acetilglucosamina.

10 **[0010]** La presente invención puede permitir el análisis de los residuos de ácido siálico derivatizados presentes en las fracciones de glicanos mediante técnicas de espectrometría de masas, como técnicas de desorción/ionización láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) conocidas en la materia, como se describirá más adelante en el presente documento. No obstante, la reacción de derivatización puede permitir que se lleven a cabo otros tipos de análisis. Por ejemplo, la reacción de derivatización puede permitir la modificación de glicoconjugados y/u otras moléculas glicosiladas para modificar sus propiedades físico-químicas, incluyendo el cambio de las posiciones de migración en la electroforesis capilar en gel, o la liberación en ensayos de unión de cromatografía.

15 **[0011]** Dicha al menos una carbodiimida puede ser N,N'-diciohexilcarbodiimida (DDC), o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), por ejemplo, en su forma de hidrocloreuro. Dicha al menos una carbodiimida se puede proporcionar en solución con una concentración de entre 0,01 y 1 M, tal como 0,1-0,8 M, normalmente, 0,25-0,75 M.

20 **[0012]** Entre los triazoles adecuados se incluye el hidroxibenzotriazol (HOBt), normalmente en una forma hidratada, como el monohidrato que se puede proporcionar también en solución con una concentración de entre 0,1-1 M, como 0,2-0,8 M, normalmente, 0,25-0,75 M.

25 **[0013]** El reactivo puede comprender una única combinación de carbodiimida y triazol/Oxyrna pure, o se pueden proporcionar mezclas que comprendan una o más carbodiimida(s) junto con uno o más triazol(es)/Oxyrna pure.

[0014] Las combinaciones especialmente preferidas de componentes reactivos son DCC con HOBt, DCC con Oxyrna pure, EDC con HOBt y EDC con Oxyrna pure. Una combinación especialmente preferida es EDC y HOBt.

30 **[0015]** Normalmente, los componentes reactivos se proporcionan como una única composición de reactivo. Los componentes reactivos se pueden proporcionar en una solución alcohólica, como metanol, etanol, (iso)propanol o butanol. La solución del reactivo en alcohol puede ser de 0,01 - 1 M, como 0,05 - 0,8 M, 0,2 - 0,7 M, como 0,4 - 0,6 M, especialmente 0,5 M. De manera alternativa, los reactivos se pueden proporcionar inicialmente en una forma liofilizada que esté reconstituida con la muestra y el alcohol apropiado.

35 **[0016]** Normalmente, el contenido de alcohol para la reacción de derivatización del ácido siálico será de entre 50 % y 99 %, como de 70 % a 96 %, especialmente 95 % v/v.

[0017] Los inventores han observado que la elección del alcohol puede afectar al grado y al tipo de derivatización que se produzca. En algunas formas de realización, el alcohol preferido es metanol o etanol y, en una forma de realización especialmente preferida, el alcohol es etanol.

40 **[0018]** Preferiblemente, la reacción puede llevarse a cabo en condiciones ácidas o neutras (por ejemplo, de pH 1,9 a pH 7,6). Esto se puede conseguir añadiendo un ácido. Como el ácido trifluoroacético (TFA), por ejemplo, TFA al 0,1 % - 0,4 %. Los inventores han observado que las condiciones ácidas pueden reducir o minimizar los productos secundarios no deseados.

45 **[0019]** De hecho, los presentes inventores han observado que el uso de condiciones ácidas puede servir para minimizar los productos secundarios observados utilizando el ya conocido agente de derivatización cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMT-MM), sobre todo cuando se utilicen muestras no puras.

[0020] La presente invención da a conocer también un método de derivatización residuos de ácido siálico presentes en fracciones de glicanos, comprendiendo el método:

50 la reacción de una muestra biológica o preparación de glicano con DMT-MM en condiciones ácidas; con el fin de derivatizar cualquier residuo de ácido siálico que pueda encontrarse en las fracciones de glicanos presentes en la muestra biológica.

[0021] Preferiblemente, las condiciones ácidas se proporcionan mediante la adición de TFA en la reacción, como TFA al 0,1 % - 0,4 %, normalmente TFA al 0,2 %.

55 **[0022]** La presente invención se puede llevar a cabo en muestras purificadas o no puras. Por ejemplo, los presentes inventores han sido capaces de derivatizar glicanos sialilados a partir de muestras de plasma y fibrinógeno que han sido digeridas enzimáticamente para poner a disposición de la reacción cualquier glicano. Una enzima adecuada para su uso en la liberación de oligosacáridos ligados al N es una endoglicosidasa, como

PNGase F. Ventajosamente, los presentes inventores han sido capaces de llevar a cabo las reacciones de derivatización de la presente invención sin la necesidad de purificación tras la reacción enzimática anteriormente descrita, al contrario que en las técnicas descritas en el estado de la técnica que afirman que la purificación de glicanos de una muestra biológica, como plasma, es necesaria antes de llevar a cabo la derivatización. Sin pretender limitarse a la teoría, parece que la solución alcohólica en la que se proporciona(n) el/los reactivo(s) puede ser capaz de precipitar proteínas y sustancias similares, lo cual puede interferir de otro modo en la reacción de derivatización.

[0023] Así, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método de derivatización mediante residuos de ácido siálico presentes en fracciones de glicanos, comprendiendo el método:

el tratamiento de una muestra biológica o preparación de glicano, normalmente tratamiento enzimático, para liberar fracciones de glicanos presentes en la muestra; y la reacción directa de la muestra biológica tratada con una solución alcohólica que comprenda un reactivo que comprenda al menos una carbodiimida(s) y al menos un triazol o etilo 2-ciano-2-(hidroximino)acetato (Oxyma pure); con el fin de derivatizar cualquier residuo de ácido siálico que pueda encontrarse en las fracciones de glicanos presentes en la muestra biológica.

[0024] Se entiende que el término «directo/a(s)», según se ha utilizado anteriormente, se refiere a que la muestra no se somete a una etapa de purificación antes de que se lleve a cabo la reacción de derivatización. No hace referencia a un período de tiempo y, por lo tanto, no implica que la etapa de derivatización se deba llevar a cabo de manera inmediata. Puede existir un período de espera entre la etapa de tratamiento y la etapa de derivatización.

[0025] Opcionalmente, la solución reactiva puede ser ácida, según se ha descrito anteriormente.

[0026] Se da a conocer además una solución alcohólica que comprende al menos una carbodiimida(s) y al menos un triazol o etilo 2-ciano-2-(hidroximino)acetato (Oxyma pure) para su uso en la derivatización de residuos de ácido siálico presentes en fracciones de glicanos.

[0027] Se da a conocer también el uso de la solución alcohólica anterior para derivatizar residuos de ácido siálico presentes en fracciones de glicanos.

[0028] Los alcoholes y concentraciones preferidos, así como los componentes de la solución y sus concentraciones, se han definido anteriormente en el presente documento.

[0029] Ventajosamente, las presentes reacciones de derivatización de la presente invención se llevan a cabo en una única etapa y, por lo tanto, se puede considerar como una reacción «en un solo recipiente». La reacción de derivatización (en un solo recipiente) se puede llevar a cabo con cualquier temperatura de reacción adecuada durante cualquier duración adecuada. Los tiempos de reacción habituales son de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 horas, como de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 2 horas (por ejemplo, de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 1 hora).

[0030] Las temperaturas de reacción habituales son de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 100 °C, como de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C).

[0031] La invención se puede realizar en cualquier preparación de glicano que contenga, por ejemplo, glicoproteínas, glicolípidos, glicoconjugados u otras moléculas glicosiladas. Normalmente, los glicanos se pueden liberar a partir de moléculas que contengan glicanos contenidas en una muestra biológica de interés, o pueden permanecer adheridos a la fracción o porción de estas, tales como, por ejemplo, un péptido o fracción lipídica. En cualquier caso, dichas preparaciones se denominan preparación de glicano. Entre los ejemplos de glicoproteínas se incluyen las hormonas, como la eritropoyetina.

[0032] El término «preparación de glicano», según se utiliza en el presente documento, hace referencia a un conjunto de glicanos obtenidos conforme a un método de producción concreto. En algunas formas de realización, la preparación de glicano hace referencia a un conjunto de glicanos obtenidos a partir de una preparación de glicoproteínas.

[0033] El término «muestra biológica», según se utiliza en el presente documento, hace referencia a cualquier muestra sólida o fluida obtenida, excretada o secretada a partir de cualquier célula u organismo vivo, incluyendo, entre otros, cultivo tisular, biorreactores, tejido humano o animal, plantas, frutas, verduras, microorganismos unicelulares (como bacterias o levaduras) y organismos pluricelulares. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un fluido biológico obtenido a partir de, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido seminal, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (por ejemplo, fluido obtenido a partir de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o fluido obtenido de una articulación (p. ej., una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad como una artritis reumatoide, osteoartritis, gota o artritis séptica). Una muestra biológica también puede ser, por ejemplo, una muestra obtenida a partir de cualquier órgano o tejido (incluyendo una muestra de biopsia o autopsia), puede comprender células (bien células primarias, bien células cultivadas), medio condicionado por cualquier célula, tejido u órgano, cultivo tisular. La muestra biológica se puede utilizar de manera directa, o puede haber sido

sometida a una o más etapas de purificación o reacción con el objetivo de aislar y/o aumentar la presencia de glicoproteínas, glicolípidos, glicoconjugados, etc., concretos.

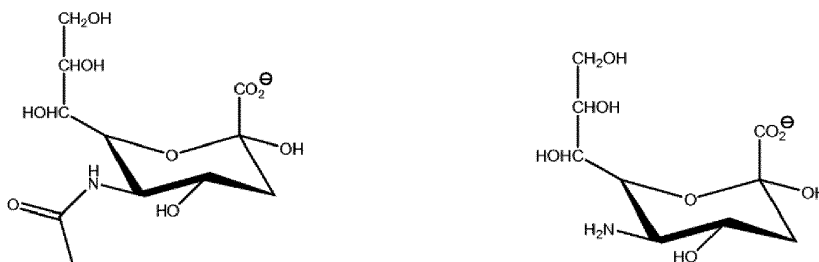
[0034] La glicoproteína puede ser una glicoproteína de superficie celular. Según se utiliza en el presente documento, el término «glicoproteína de superficie celular» hace referencia a una glicoproteína, donde al menos una porción de esta se encuentra en la superficie exterior de una célula. En algunas formas de realización, una glicoproteína de superficie celular es una proteína que está ubicada en la superficie celular, de manera que al menos una de las estructuras de glicano esté presente en la superficie exterior de la célula. En muchas formas de realización de la descripción, un glicano de superficie celular está unido de manera covalente a un polipéptido como parte de una glicoproteína de superficie celular. Un glicano de superficie celular también puede estar unido a un lípido de membrana celular, y se denomina glicolípido.

[0035] El término «glicolípido», según se utiliza en el presente documento, hace referencia a un lípido que contiene una o varias fracciones de azúcar unidas de manera covalente (esto es, glicanos).

[0036] La(s) fracción(es) de azúcar puede(n) estar presente(s) en forma de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos. La(s) fracción(es) de azúcar puede(n) comprender una única cadena no ramificada de residuos de azúcar, o puede(n) constar de una o varias cadena(s) ramificada(s). En algunas formas de realización de la descripción, las fracciones de azúcar pueden incluir grupos sulfato y/o fosfato. En algunas formas de realización, las glicoproteínas contienen fracciones de azúcar ligadas al O; en algunas formas de realización, las glicoproteínas contienen fracciones de azúcar ligadas al N, como pueden comprender los expertos en la materia, la estructura peptídica comprende normalmente una cadena lineal de residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, la estructura peptídica abarca la membrana celular, de manera que comprende una porción transmembranal y una porción extracelular. En algunas formas de realización, una estructura peptídica de una glicoproteína que abarca la membrana celular comprende una porción intracelular, una porción transmembranal y una porción extracelular. En algunas formas de realización, los métodos de la presente descripción comprenden la escisión de una glicoproteína de superficie celular con una proteasa para liberar la porción extracelular de la glicoproteína, o una porción de la misma, donde dicha exposición no rompe de manera sustancial la membrana celular. La(s) fracción(es) de azúcar puede(n) estar presente(s) en forma de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos. La(s) fracción(es) de azúcar puede(n) comprender una única cadena no ramificada de residuos de azúcar, o puede(n) comprender una o varias cadena(s) ramificada(s). En algunas formas de realización de la descripción, las fracciones de azúcar pueden incluir grupos sulfato y/o fosfato. De manera alternativa, o adicionalmente, las fracciones de azúcar pueden incluir acetil, glicolil, propil u otras modificaciones alquílicas. En algunas formas de realización, las glicoproteínas contienen fracciones de azúcar ligadas al O; en algunas formas de realización, las glicoproteínas contienen fracciones de azúcar ligadas al N. En algunas formas de realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden una etapa de análisis de cualquiera o la totalidad de las glicoproteínas de superficie celular, fragmentos liberados (p. ej., glicopéptidos) de glicoproteínas de superficie celular, glicanos de superficie celular unidos a glicoproteínas de superficie celular, estructuras peptídicas de glicoproteínas de superficie celular, fragmentos de dichas glicoproteínas, glicanos y/o estructuras peptídicas, y combinaciones de estos.

[0037] El término «glicoconjugado», según se utiliza en el presente documento, abarca todas las moléculas en las que al menos una fracción de azúcar está ligada de manera covalente a al menos otra fracción. El término abarca específicamente todas las biomoléculas con fracciones de azúcar ligadas de manera covalente, incluyendo, por ejemplo, glicoproteínas ligadas al N, glicoproteínas ligadas al O, glicolípidos, proteoglicanos, etc.

[0038] La presente invención está relacionada con la estabilización de ácido siálico con enlace específico de glicanos y con su análisis. El término «ácido siálico», según se utiliza en el presente documento, es un término genérico para los derivados con N u O sustituido de ácido neuramínico, un monosacárido de nueve carbonos. El grupo amino de ácido neuramínico presenta normalmente un grupo acetilo o glicolilo en un ácido siálico. Los sustituyentes hidroxilos presentes en el ácido siálico se pueden modificar mediante acetilación, metilación, sulfatación y fosforilación. El ácido siálico predominante es el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). Los ácidos siálicos aportan una carga negativa a los glicanos, ya que el grupo carboxilo tiende a disociar un protón con pH fisiológico. A continuación, se muestran ejemplos de ácidos siálicos desprotonados:



50 ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac; izquierda) y ácido neuramínico (Neu; derecha)

[0039] Se pueden utilizar métodos de la presente invención para analizar glicanos en una gran variedad de estados, incluyendo, por ejemplo, glicanos libres, glicoconjugados (por ejemplo, glicopéptidos, glicolípidos, proteoglicanos, etc.), o células o componentes celulares, etc.

5 **[0040]** Asimismo, puede resultar deseable marcar las fracciones de glicanos presentes en la muestra biológica o preparación de glicano utilizando técnicas conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, el extremo reductor de una fracción de azúcar se puede marcar fácilmente, por ejemplo, con un isótopo de marcado radiactivo o no radiactivo, o con una marca fluorescente o luminiscente. Por ejemplo, dichos agentes de marcado se pueden utilizar para marcar el glicano mediante la reacción del grupo con función amina del agente de marcado con el extremo reductor del N-glicano (-CHO) mediante aminación reductora. Un experto en la materia
10 podrá apreciar que se puede emplear una amplia variedad de condiciones de reacción para potenciar esta reacción de aminación reductora, y por lo tanto, se contempla una gran variedad de condiciones de reacción; véase, por lo general, March 's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, M. B. Smith y J. March, 5.^a edición, John Wiley & Sons, 2001, y Comprehensive Organic Transformations, R.C. Larock, 2.^a edición, John Wiley & Sons, 1999. Entre las condiciones adecuadas de aminación reductora se incluye la aportación de un agente reductor, como NaCNBH₃, 2-picolina borano o NaBH(OAc)₃, y el mantenimiento de un pH ácido a ligeramente ácido de la mezcla de reacción. Se espera que dicho marcado, en caso de que sea necesario, tendrá lugar antes de la derivatización del ácido siálico, aunque también podría tener lugar tras la reacción de derivatización.

20 **[0041]** Los glicanos sialilados derivatizados y opcionalmente marcados se pueden purificar convenientemente tras la derivatización y/o el marcado. Se puede utilizar cualquier técnica de purificación adecuada. En una forma de realización de la invención, los glicanos sialilados derivatizados y opcionalmente marcados se pueden purificar mediante cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), extracción en fase sólida de carbono grafitizado poroso (PGC-SPE), resinas de intercambio catiónico, extracción líquido-líquido o una mezcla de los anteriores.

25 **[0042]** En una forma de realización preferida, el al menos un glicano derivatizado y opcionalmente marcado puede estar purificado mediante HILIC. Esto se puede llevar a cabo utilizando algodón hidrófilo u otro tipo de algodón. En resumen, el al menos un glicano sialilado derivatizado y opcionalmente marcado se aplica en una fase estacionaria que comprende algodón; la fase estacionaria se lava con un primer disolvente; y el al menos un glicano sialilado derivatizado y opcionalmente marcado se eluye de la fase estacionaria con un segundo disolvente. Normalmente, la muestra que comprende dicho al menos un glicano sialilado derivatizado y
30 opcionalmente marcado se mezcla con un disolvente orgánico; donde el disolvente orgánico comprende acetonitrilo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol o tetrahidrofurano.

35 **[0043]** Preferiblemente, el disolvente orgánico es acetonitrilo a entre el 25 % y el 80 % v/v en alcohol; más preferiblemente, donde el disolvente orgánico es acetonitrilo a entre el 40 % y el 60 % v/v en alcohol; más preferiblemente, donde el disolvente orgánico es acetonitrilo al 50 % v/v en alcohol. Preferiblemente, la muestra comprende una mezcla 1:1 con el disolvente orgánico.

40 **[0044]** El primer disolvente para el lavado es una mezcla de disolvente que comprende agua, un disolvente orgánico y un ácido. Más preferiblemente, el disolvente orgánico es acetonitrilo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol o tetrahidrofurano, y el ácido es ácido trifluoroacético (TFA), ácido fórmico, ácido acético, ácido pentafluoropropiónico o ácido heptafluorobutírico. De manera conveniente, la primera mezcla de disolvente descrita anteriormente comprende entre un 70 % y un 95 % v/v de disolvente orgánico y entre un 0,1 % y un 3 % v/v de ácido en agua. Preferiblemente, la mezcla de disolvente comprende entre un 80 % y un 90 % v/v de disolvente orgánico y entre un 0,5 % y un 2 % v/v de ácido en agua. Preferiblemente, la mezcla de disolvente
45 comprende un 85 % v/v de disolvente orgánico, normalmente acetonitrilo, y un 1% v/v de ácido, normalmente TFA, en agua.

[0045] Preferiblemente, el segundo disolvente comprende un disolvente polar. Más preferiblemente, el disolvente polar es agua, dimetilsulfóxido o dimetilformamida. Opcionalmente, el segundo disolvente comprende un disolvente más polar que el primer disolvente.

50 **[0046]** Sin pretender limitarse a la teoría, se espera que el lavado elimine sales, péptidos no glicosilados, lípidos, detergentes, exceso de marcas de extremo reductor, agentes reductores, reactivos activadores de ácido siálico, desnaturalizantes, proteínas desnaturalizadas, etc., de la fase estacionaria.

[0047] Preferiblemente, la fase estacionaria se mantiene en un recipiente de extremo abierto. El recipiente puede estar abierto en un extremo o en ambos extremos. Preferiblemente, el recipiente está abierto en ambos extremos.

55 **[0048]** Opcionalmente, el recipiente de extremo abierto es una pipeta, una pipeta multicanal o una punta de pipeta. De manera alternativa, el recipiente puede ser el pocillo de una placa multipocillo, tal como una placa de 96 o 384 pocillos.

[0049] De manera conveniente, la etapa de purificación se puede emplear para extraer dicho uno o varios glicano(s) derivatizado(s) y opcionalmente marcado(s) con el fin de purificarlos lo suficiente para su posterior análisis, por ejemplo, MALDI-TOF-MS.

5 **[0050]** Los residuos siálicos derivatizados resultan ser estables y las soluciones de reacción, antes o después de la purificación posterior, se pueden almacenar durante un período de tiempo (por ejemplo, de 1 día a unas cuantas semanas) a desde 4 °C a 10 °C con anterioridad a cualquier análisis posterior que se lleve a cabo. Las muestras de reacción opcionalmente purificadas también se pueden secar, realizándose un análisis posterior en las muestras reconstituidas.

10 **[0051]** El análisis posterior mediante técnicas de espectrometría de masas, especialmente el análisis MALDI-TOF, es un aspecto especialmente característico de la presente invención. Así, de acuerdo con la presente invención, en una forma de realización preferida, los métodos anteriormente descritos de la presente invención comprenden, además, la detección de los glicanos sialilados derivatizados y opcionalmente marcados mediante análisis de espectrometría de masas, especialmente análisis MALDI-TOF, cromatografía líquida, cromatografía en gas, electroforesis capilar, cromatografía de intercambio aniónico o una mezcla de los anteriores.

15 **[0052]** Los presentes inventores han observado que se puede facilitar el análisis mediante la adición de Na⁺, por ejemplo, en forma de NaOH, antes de someter a la muestra derivatizada al análisis MALDI-TOF. Normalmente, se puede añadir 0,1-10 mM, por ejemplo, 0,5-5 mM, especialmente 1 mM de transportador Na⁺, como NaOH, en un material de matriz (concentración de matriz de 0,1-20 mg/ml, por ejemplo, 1-10 mg/ml, normalmente 5 mg/ml) en el que se ha añadido la muestra derivatizada.

20 **[0053]** Los inventores han observado también que las impurezas, las variaciones en la aducción de sal, y las variaciones en la cristalización de la matriz que pueden interferir en el análisis MALDI-TOF se pueden eliminar llevando a cabo una etapa de recristalización en la muestra derivatizada antes de que la muestra se analice mediante MALDI-TOF. Por ejemplo, se puede dejar secar una muestra de la muestra derivatizada purificada que se vaya a analizar, y se puede añadir un reactivo de recristalización, como etanol que contenga hasta un 5 % de agua, en la muestra seca con el objetivo de permitir la recristalización y posterior purificación de la muestra que se vaya a analizar. Por ejemplo, el cristal inicial se puede formar mezclando la muestra con una solución de matriz y dejando secar la mezcla. La solución de matriz es por ejemplo ácido 2,5-dihidroxi benzoico (2,5-DHB) en acetonitrilo al 50 % (ACN), una mezcla de sustancias de matriz como 9:1 2,5-DHB y ácido 2-metoxi-5-hidroxi benzoico, u otras matrices (microcristalinas) como 6-aza-2-tiotimina (ATT), 3-aminoquinilina (3AQ), 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP), ácido 2-(4-hidroxifenilazo)benzoico (HABA) o un ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA).

25
30

[0054] A raíz de lo anterior, se podrá apreciar que la presente invención se puede llevar a cabo de manera manual, semiautomática o totalmente automática.

35 **[0055]** Los métodos de la presente exposición se pueden utilizar para acelerar de manera significativa una o varias etapas de desarrollo del proceso para la producción de una glicoproteína de interés terapéutico o relevante desde el punto de vista comercial. Algunos ejemplos no limitativos de dichas etapas de desarrollo del proceso que se pueden mejorar utilizando métodos de la presente exposición incluyen la selección celular, la selección de clones, la optimización de medios, las condiciones de cultivo, las condiciones del proceso y/o el proceso de purificación. Los expertos en la materia serán conocedores de otras etapas de desarrollo del proceso que se pueden mejorar.

40

[0056] Los productos de glicoproteínas terapéuticos representativos cuya producción y/o calidad puede ser monitorizada de acuerdo con la presente descripción incluyen, por ejemplo, cualquiera de entre una variedad de agentes hematológicos (incluyendo, por ejemplo, inmunoglobulinas, eritropoyetinas, factores de coagulación sanguínea, etc.), interferones, factores estimulantes de colonias, anticuerpos, enzimas y hormonas.

45 **[0057]** Los métodos se pueden utilizar también para monitorizar el alcance y/o el tipo de glicosilación que tenga lugar en un cultivo celular concreto, permitiendo así el ajuste o posiblemente la finalización del cultivo para, por ejemplo, lograr un patrón de glicosilación concreto deseado o para evitar el desarrollo de un patrón de glicosilación concreto no deseado. Los métodos se pueden emplear también para evaluar las características de glicosilación de las células, por ejemplo, incluso antes de que las células o líneas celulares hayan sido modificadas para producir la glicoproteína, o para producir la glicoproteína a un nivel relevante desde el punto de vista comercial.

50

[0058] En algunas formas de realización de la descripción, se conoce un patrón deseado de glicosilación para una glicoproteína diana concreta, y la tecnología descrita en el presente documento permite la monitorización de muestras de cultivos para evaluar el progreso de la producción a lo largo de una ruta conocida por producir el patrón de glicosilación deseado. Por ejemplo, cuando la glicoproteína diana sea una glicoproteína terapéutica, que haya sido sometida, por ejemplo, a una revisión reguladora en uno o varios países, será a menudo deseable monitorizar los cultivos para evaluar la probabilidad de que generen un producto con un patrón de glicosilación casi tan idéntico al patrón de glicosilación establecido del producto farmacéutico como sea posible, producido o no exactamente por la misma ruta. Según se utiliza en el presente documento, «casi tan idéntico» hace referencia a un patrón de glicosilación que presenta al menos un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de correlación con el

60

patrón de glicosilación establecido del producto farmacéutico. En dichas formas de realización, las muestras del cultivo de producción se toman normalmente en varios momentos y se comparan con un estándar establecido o con un cultivo control con el objetivo de evaluar la glicosilación relativa.

5 **[0059]** Para mejorar la accesibilidad de la enzima al sitio de glicosilación, la mayoría de proteínas necesitan una etapa de desnaturalización proteica. Normalmente, esto se logra utilizando detergentes y agentes reductores de disulfuros, aunque los métodos de desnaturalización de una glicoproteína para su uso de acuerdo con la presente invención no se limitan al uso de dichos agentes. Por ejemplo, la exposición a altas temperaturas puede ser suficiente para desnaturalizar una glicoproteína, de manera que una enzima adecuada para la escisión de estructuras de glicanos sea capaz de acceder al sitio de escisión. En algunas formas de realización, se emplea una combinación de detergentes, agentes reductores de disulfuros, altas temperaturas y/u otros agentes de condiciones de reacción para desnaturalizar una glicoproteína. Cabe destacar que también es posible extraer glicanos en una solución diluida de hidróxido de amonio. Por consiguiente, el uso de PNGase F para escindir glicanos a partir de glicoproteínas presenta la ventaja de que el hidróxido de amonio diluido puede facilitar, además, la solubilidad y parte del plegamiento de los sustratos proteínicos. Por otro lado, los glicanos ligados al N se pueden escindir a partir de una glicoproteína empleando métodos químicos. Por ejemplo, se puede liberar un glicano ligado al N mediante un tratamiento con hidrazina para proporcionar una hidrazida del N-glicano (esto es, hidrazinólisis).

Descripción detallada

20 **[0060]** A continuación, se describirá más detalladamente la presente invención con referencia a las figuras que se representan.

La figura 1 muestra un espectro de MALDI-TOF-MS en modo de reflectrón positivo (RP) tras la metil-esterificación de N-glicoma de plasma liberado de PNGase F. Las muestras se sometieron a reacción utilizando varias combinaciones de activador/reactivo y condiciones ácidas en metanol. Se muestra el N-glicano disialilado más abundante presente en dicho espectro. La masa de 2273,804 Da corresponde a un producto de reacción completamente metil-esterificado $[M+Na]^+$, mientras que las masas de 2281,770 Da y 2289,736 Da corresponden a especies que carecen de uno o dos grupos metilo con la formación de sal de sodio resultante ($[M-H+2Na]^+$ y $[M-2H+3Na]^+$). Los productos de reacción en 2258,804 Da indican amidación de carbonilo, mientras que 2241.777 Da indican un producto de reacción lactonizado. Se seleccionó EDC + HOBt como la más prometedora en función de la integridad de la modificación y la falta de reacciones secundarias, sin necesidad de ácido. Se utilizan símbolos a lo largo del documento para indicar los residuos monosacáridos ducosa (triángulo), galactosa (círculo claro), manosa (círculo oscuro), N-acetilglucosamina (cuadrado) y ácido N-acetilneuramínico (rombo), mientras que los picos metastásicos se señalan con un asterisco. En el caso de enlaces conocidos de ácido siálico, α 2,3 se indica con un ángulo recto izquierdo y α 2,6 con un ángulo recto. No se evaluaron enlaces de otros residuos, y las composiciones, así como los esquemas estructurales, se muestran basándose en la literatura [35, 37, 38].

La figura 2 muestra espectros de MALDI-TOF-MS RP tras la etil-esterificación de N-glicoma de plasma con EDC + HOBt utilizando metanol, etanol, isopropanol y n-butanol como disolventes y donador alquilo. Se muestran composiciones trisialiladas con diversos tipos de enlaces de ácido siálico. Las especies de glicanos muestran lactonización y esterificación mediante metanol (32,026 Da), etanol (46,042 Da), propanol (60,058 Da) y butanol (32,026 Da). Todos los alcoholes han demostrado ser un donador de grupo alquilo para la derivatización de ácido siálico específico del enlace, mientras que el metanol y el etanol muestran la eficacia de reacción menos optimizada. Las proporciones relativas de las señales lactonizadas y alquil-esterificadas, sin embargo, difieren por alcohol.

La figura 3 muestra un triple análisis de estándares oligosacáridos con enlace específico de ácido siálico (sialilactosa con ácido siálico ligado a α 2,3 o α 2,6) tras la alquilación de EDC + HOBt en metanol o bien etanol a diversas temperaturas. En el gráfico se muestran las intensidades relativas medias de los productos de reacción lactonizados y esterificados, con las barras de error indicando la desviación típica. Los ácidos siálicos ligados a 2,6 parecen formar preferiblemente un éster tanto con metanol como con etanol a todas las temperaturas. Sin embargo, la reacción de ácidos siálicos ligados a 2,3 muestra un efecto dependiente de la temperatura, como máximo 93,6 % (SD \pm 0,9 %) del producto lactonizado deseado formado a 4 °C. El uso de etanol como donador alquilo, por otra parte, muestra de media un 97,7 % (SD \pm 0,9 %) de lactonización en todas las temperaturas, y, por consiguiente, resulta más adecuado para separar los ácidos siálicos ligados a α 2,3 y α 2,6.

La figura 4 muestra espectros de MALDI-TOF-MS RP de 3'-sialilactosa y 6'-sialilactosa cuando se ha alquil-esterificado durante 1 h a 37 °C con EDC + HOBt en metanol o etanol. El producto de reacción lactonizado es visible a 638,190 Da $[M+Na]^+$, siendo las masas esterificadas de 670,217 y 684,232 Da, respectivamente, en el caso del metanol y el etanol. En ningún caso se pudo observar la masa de 678,183 Da, que indicaría una subalquilación. La reacción en etanol muestra la especificidad más elevada al enlace de ácido siálico, apareciendo únicamente cantidades mínimas de productos de reacción no deseados.

La figura 5 muestra N-glicanos de fibrinógeno liberados según lo estudiado mediante A) MALDI-TOF-MS RP tras 1 h a 37 °C con EDC + HOBt en etil-esterificación, y B) marcado 2-AA y HILIC UHPLC con detección fluorescente. C) el triple análisis y la cuantificación relativa de las estructuras monosialiladas y disialiladas muestra unas intensidades de señal relativas muy comparables entre los análisis MALDI-TOF-MS y UHPLC. Las abreviaturas utilizadas en el presente documento son: hexosa (H), N-acetilhexosamina (N), fucosa (F) y ácido N-acetilneuramínico con enlace no especificado (S), enlace α 2,3 indicado por lactonización (L) o enlace α 2,6 indicado por esterificación (E). Los números representados indican el número de residuos. Las barras de error muestran la desviación típica.

La figura 6 muestra un espectro de MALDI-TOF-MS RP tras aplicar el protocolo de etil-esterificación EDC+HOBt a 37 °C durante 1 h para el análisis de N-glicomas de plasma. A) Vista general del espectro completo que muestra las intensidades relativas de 1000 Da a 5000 Da. B) Espectro de rango intermedio de 3200 Da a 3800 Da. C) Espectro de rango alto de 3800 a 5000 Da que muestra las masas derivables de glicanos de hasta 4727,640 Da. A pesar de que la precisión de las masas posibilita la mayoría de asignaciones de composición, las estructuras representadas se basan en la literatura y pueden no reflejar la muestra real.

La figura 7 muestra un ensayo de reproducibilidad de 1 h a 37 °C con EDC + HOBt y etil-esterificación. Se liberaron de manera independiente 24 muestras originadas en una reserva de plasma típica mediante PNGase F, se etil-esterificaron, se purificaron mediante HILIC SPE, se cristalizaron con matriz, se recrystalizaron con etanol y se analizaron mediante MALDI-TOF-MS RP. El experimento se realizó tres veces en días separados, indicado como experimento 1-3. El gráfico muestra las intensidades relativas medias observadas (normalizadas a la suma de intensidades), con las barras de error para la desviación típica. A) Perfil relativo de los 20 N-glicanos más abundantes en el plasma humano según lo observado tras la etil-esterificación. B) Perfil relativo del rango de N-glicanos observables tras la etil-esterificación.

La figura 8 muestra espectros de MALDI-TOF-MS RP tras aplicar el protocolo de etil-esterificación EDC+HOBt a 37 °C durante 1 h en A) el estándar glicano ADF marcado con 2-AB (N-glicanos biantenarios fucosilados) y B) estándar glicano A3 marcado con 2-AB (N-glicanos triantenarios con ácidos siálicos unidos tanto a α 2,3 como a α 2,6).

La figura 9 muestra espectros de MALDI-TOF-MS RP de glicopéptidos trípticos de IgG A) sin derivatización, B) tras 1 h de incubación a 37 °C con EDC+HOBt en etanol, y C) tras 1 h de incubación a 4 °C con EDC+HOBt en metanol. Las señales IgG2/3 (secuencia peptídica = EEQFNSTFR) se muestran entre paréntesis, las señales IgG1 (secuencia peptídica = EEQYNSTYR) sin paréntesis, mientras que las señales IgG4 (secuencia peptídica = EEQFNSTYR) no se han indicado debido a su baja intensidad relativa. Los glicopéptidos sialilados muestran únicamente una pequeña señal cuando se analizan de manera nativa, con los picos metastásicos (representados con un signo de suma) indicando la inestabilidad y pérdida de ácidos siálicos. Estos picos metastásicos ya no se observan ni en las condiciones de etanol ni en las de metanol, y las especies sialiladas se pueden observar junto con las variantes no sialiladas. Las señales para las condiciones de esterificación B y C se originan a partir de una lactonización y dos esterificaciones en el péptido (+ 38,05 Da para la etil-esterificación, y +10,02 Da para la metil-esterificación), con una esterificación adicional por ácido siálico ligado a α 2,6 (+28,03 y +14,02 Da, respectivamente). Se puede observar un producto secundario tanto para las condiciones de etil-esterificación como para las de metil-esterificación, donde una esterificación haya sido sustituida por una lactonización (-46,04 Da y -32,03 Da, respectivamente, indicados mediante un asterisco), que es menor para la condición de metil-esterificación.

La figura 10 muestra espectros de MALDI-TOF-MS RP de A) N-glicosilación de fetuina bovina tras la etil-esterificación, y B) la fragmentación de las especies de glicanos a m/z 3213,147 [M+Na]⁺, lo que reveló la presencia de un ácido N-acetilneuramínico etil-esterificado en una de las N-acetilglucosaminas antenarias.

La figura 11 muestra un espectro de MALDI-TOF-MS RP de la N-glicosilación plasmática de la cepa C57BL6 de ratón tras la etil-esterificación. Junto a los residuos de ácido N-acetilneuramínico etil-esterificados y lactonizados, las señales observadas indican la presencia y derivatización de ácidos N-glicolilneuramínicos ligados a α 2,3 y a α 2,6. Mientras que los ácidos N-glicolilneuramínicos no modificados presentan un incremento de masa de 307,09 Da (no detectado), las variantes lactonizadas y etil-esterificadas presentan incrementos de masa de 289,08 Da y 335,12 Da, respectivamente. Además, se pudo observar la presencia de glicanos O-acetilados (m/z 2375,85 y m/z 2521,90). El asterisco indica una señal que no es de glicano.

La figura 12 muestra perfiles de MALDI-TOF/TOF-MS/MS RP de dos señales de glicanos de la cepa plasmática CD57BL6 de ratón tras la etil-esterificación. A) Muestra la fragmentación de una estructura biantenaria que contiene tanto un ácido N-glicolilneuramínico etil-esterificado (ligado a α 2,6) como un ácido N-glicolilneuramínico lactonizado (ligado a α 2,3). B) Muestra la fragmentación de una estructura biantenaria con dos ácidos N-glicolilneuramínicos etil-esterificados, uno de los cuales está O-acetilado.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Muestras

5 **[0061]** El plasma recogido de veinte donantes humanos (plasma normal de control congelado Visucon-F, citrado y tamponado con 0,02 M de HEPES) se obtuvo a través de Affinity Biologicals (Ancaster, Canadá). La sal de sodio de la 3'-sialilactosa (Neu5Ac(α 2,3)Gal(β 1,4)Glc) y la sal de sodio de la 6'-sialilactosa (Neu5Ac(α 2,6)Gal(β 1,4)Glc), ambas con purezas superiores al 98 %, se adquirieron a través de Carbosynth (Compton, R. U.). Tanto la 3'-sialilactosa como la 6'-sialilactosa se disolvieron a una concentración de 100 mg/ml en agua Milli-Q. El fibrinógeno de plasma humano se adquirió a través de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), y se incubó durante 4,5 h a 37 °C en 1x PBS, dando como resultado una solución de fibrinógeno de 24,12 mg/ml.

10 Sustancias químicas, reactivos y enzimas

15 **[0062]** El agua Milli-Q (MQ) utilizada en el presente estudio se generó a partir de un sistema Millipore Q-Gard 2 mantenido a ≤ 18 M Ω . El metanol, etanol, 2-propanol, 1-butanol, ácido trifluoroacético (TFA), ácido acético glacial, dodecilsulfato de sodio (SDS), disodio hidrógeno fosfato dihidrato (Na₂HPO₄·2H₂O), potasio dihidrógeno fosfato (KH₂PO₄) y cloruro de sodio (NaCl) se adquirieron a través de Merck (Darmstadt, Alemania). La N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), hidroxibenzotriazol (HOBt) hydrato, ácido 2-aminobenzoico (2-AA), 2-picolina borano (2-PB), dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sodio al 50 % (NaOH), ácido fórmico al 98 % (FA), hidróxido de amonio al 25 % en agua (NH₄OH) y Nonidet P-40 (NP-40) se obtuvieron a través de Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania), mientras que la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) hidrocloreuro y el etil-2-ciano-2(hidroxiimino)acetato (nombre comercial, Oxyma Pure) se obtuvo a través de Fluorochem (Hadfield, R. U.). Entre los componentes adicionales utilizados para este estudio se incluye el péptido-N-glicosidasa F recombinante (PNGase F) de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE. UU.), ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB) de Bruker Daltonik (Bremen, Alemania) y acetonitrilo HPLC SupraGradient (ACN) de Biosolve (Valkenswaard, Países Bajos).

25 Liberación de N-glicanos

30 **[0063]** Los N-glicanos se liberaron de las muestras humanas de plasma y fibrinógeno según se ha descrito anteriormente. Se desnaturalizaron 10 μ l de muestra añadiendo 20 μ l de SDS al 2 % e incubandola durante 10 minutos a 60 °C. La etapa de liberación se llevó a cabo posteriormente añadiendo 20 μ l de mezcla de liberación que contenía NP-40 al 2 % y 0,5 mU de PNGase F en 2,5x PBS (1x PBS preparado como MQ con 5,7 g/l de Na₂HPO₄·2H₂O, 0,5 g/l de KH₂PO₄ y 8,5 g/l de NaCl), e incubando durante la noche a 37 °C.

Comparación activador/reactivo

35 **[0064]** Se probó la idoneidad de varios reactivos y sus combinaciones con metil-esterificación de ácido siálico de muestras de N-glicomas de plasma liberados de PNGase-F no purificados. Se disolvió DMT-MM (para fines comparativos), HOBt, Oxyma Pure, DCC y EDC a 0,5 M en metanol, con y sin TFA al 0,2 %. Se añadió 1 μ l de N-glicoma de plasma liberado (aproximadamente 14 μ g de proteína plasmática y la glicosilación de esta) a 20 μ l de cada reactivo. Además, se añadió 1 μ l de N-glicoma de plasma liberado a 20 μ l de metanol, que contenía las combinaciones de reactivos DCC con HOBt, DCC con Oxyma Pure, EDC con HOBt o EDC con Oxyma Pure, estando cada componente en una concentración de 0,25 M, y cada condición con y sin TFA al 0,2 %. Todas las muestras se incubaron durante 1 h a 60 °C.

40 **[0065]** Se observó que las mezclas de reacción no eran directamente compatibles con MALDI-TOF-MS, ya que una mancha de 1 μ l en una placa objetivo de Bruker Anchorchip no se secó completamente, con y sin matriz, y la medición de muestras preparadas de este modo no dio como resultado señales de analito perceptibles. Las muestras tampoco respondieron a la coevaporación con orgánicos volátiles (ACN, etanol, acetona) ni a la aplicación de presión de vacío. Debido a esto, se consideró necesaria una limpieza de la muestra para el enriquecimiento y purificación de los glicanos de la mezcla de reacción, y se eligió HILIC SPE utilizando algodón como fase estacionaria, según se ha descrito anteriormente [32].

50 **[0066]** Los glicanos mostraron una retención insuficiente en la fase estacionaria con algodón al extraerlos directamente de la mezcla de reacción, produciendo una señal de espectrometría de masas muy débil tras el análisis. Por lo tanto, se añadieron 20 μ l de ACN y las muestras se incubaron durante 15 min a -20 °C antes de proceder con el enriquecimiento del glicano y su análisis mediante MALDI-TOF-MS.

Comparación de alcohol

55 **[0067]** La combinación de 0,25 M de EDC y 0,25 M de HOBt se seleccionó como la combinación de reactivos más prometedora para la esterificación de ácidos siálicos, y los alcoholes adicionales se analizaron junto con metanol para su uso como disolvente combinado y donador alquilo. Se disolvieron 0,25 M de EDC y 0,25 M de HOBt en metanol, etanol, 2-propanol y 1-butanol, respectivamente. Se añadió 1 μ l de N-glicoma plasmático liberado de PNGase F a 20 μ l de cada condición, y las muestras se incubaron durante 1 h a 60 °C. Tras esto, se añadieron 20 μ l de ACN y las muestras se incubaron a -20 °C antes del enriquecimiento de glicanos y el análisis mediante MALDI-TOF-MS.

Especificidad de unión en α 2,3-sialilactosa y α 2,6-sialilactosa

[0068] La especificidad de unión de las condiciones de metanol y etanol de 0,25 M de EDC y 0,25 M de HOBt se analizó utilizando estándares de oligosacáridos con una posición de enlace de ácido siálico conocida. Se añadió 1 μ l 100 mg/ml (100 μ g) de α 2,3-sialilactosa o α 2,6-sialilactosa a 20 μ l de metanol o etanol que contenía 0,25 M de EDC y 0,25 M de HOBt. Las muestras se incubaron durante 1 h a 60 °C, 50 °C, 37 °C, 21 °C o 4°C. A continuación, se añadieron 20 μ l de ACN y las muestras se incubaron durante 15 min a -20 °C antes de proceder con el enriquecimiento de glicanos y el análisis mediante MALDI-TOF-MS.

Marcado de glicanos de fibrinógeno

[0069] Se modificaron las alícuotas de N-glicanos liberados de PNGase F de fibrinógeno mediante etil-esterificación o marcado fluorescente del extremo reductor con 2-AA para permitir la comparación entre MALDI-TOF-MS y la cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) y la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) con detección fluorescente. Para la etil-esterificación, las condiciones óptimas se establecieron en experimentos anteriores. Se añadió 1 μ l de mezcla de liberación de fibrinógeno (24,12 μ g de proteína) a 20 μ l de 0,25 M EDC 0,25 M HOBt en etanol, y reaccionó durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 20 μ l de ACN, y la mezcla se almacenó a -20 °C durante 15 min antes del enriquecimiento de glicanos y el análisis MALDI-TOF-MS.

[0070] En el caso de la HILIC-UHPLC, los N-glicanos liberados se marcaron con 2-AA, según lo descrito anteriormente. En resumen, se mezclaron 20 μ l de fibrinógeno liberado de PNGase F con 10 μ l de ácido acético glacial al 15 % de 2-AA (48 mg/ml) en DMSO, y 10 μ l de 2-PB (107 mg/ml) en DMSO. La mezcla se incubó durante 2 h a 65 °C y se diluyó a ACN al 75 % antes del análisis HILIC-UHPLC.

Pruebas de repetibilidad

[0071] Se determinó la repetibilidad de las condiciones establecidas de etil-esterificación mediante múltiples análisis de la misma muestra en varios días, realizando todas las tapas en una placa PCR de 96 pocillos (PP, Platte, Greiner Bio-One), y se selló para las etapas de incubación con cinta adhesiva (Nutacon, Leimuiden, Países Bajos). Cada día, se tomaron 24 muestras plasmáticas independientes del mismo plasma extraído, y se desglucosilaron con PNGase F según se ha descrito anteriormente. Se etil-esterificó 1 μ l de cada muestra liberada mediante su adición a una nueva placa PCR que contenía 20 μ l de 0,25 M HOBt y 0,25 M EDC en etanol, y se incubó durante 1 h a 37 °C. Después de esto, se añadieron 20 μ l de ACN y la placa se almacenó a -20 °C durante 30 min. Las muestras se purificaron mediante HILIC SPE con algodón y se midieron mediante MALDI-TOF-MS. El proceso completo se repitió dos veces en días consecutivos con reactivos recién preparados para establecer una variabilidad diaria.

Enriquecimiento de glicanos HILIC SPE

[0072] El enriquecimiento de glicanos se llevó a cabo mediante HILIC SPE con algodón conforme a lo descrito anteriormente [32], con unas cuantas modificaciones. Se dejó que las muestras extraídas a -20 °C volvieran a estar a temperatura ambiente antes de proceder. Se incorporaron 200 μ g de algodón (HEMA, Países Bajos) en puntas de pipeta de 20 μ l (Rainin Instrument, Oakland, EE. UU.), y después se acondicionaron pipeteando tres veces un volumen de 20 μ l de MQ, y se equilibraron tres veces con 20 μ l de ACN al 85 %. A continuación, la muestra se cargó pipeteando 20 veces en la mezcla de reacción. Para pipetear la muestra, se tuvo especial cuidado en no incluir el precipitado, ya que la obstrucción de la punta haría más difícil el proceso. La realización del pipeteo en un ángulo demostró ser un modo fácil de impedir que el precipitado se viera afectado, y dio excelentes resultados. Las puntas se lavaron tres veces con 20 μ l de ACN al 85 % y TFA al 1 %, y tres veces con 20 μ l de ACN al 85 %. La elución posterior se realizó en 10 μ l de MQ. En el caso de un formato de placa de 96 pocillos, se utilizó una pipeta de 12 canales para todas las etapas.

Medición HILIC-UHPLC

[0073] La separación y el análisis de N-glicanos marcados 2-AA se llevó a cabo utilizando HILIC-UHPLC con detección fluorescente. Para ello, se utilizó un Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Breda, Países Bajos) con una columna de glicano de 1,7 μ m 2,1x100 mm Acquity UPLC BEH (Waters). La temperatura del horno de columnas se ajustó a 60 °C y el caudal a 0,6 ml/min. Se utilizaron dos soluciones para la generación del gradiente, ACN como solución A y 100 mM de formiato de amonio (preparado como FA tamponado a pH 4,4 mediante NH₄OH) como solución B. Las muestras se transfirieron utilizando un 75 % de solución A (correspondiendo siempre el porcentaje restante a la solución B), y antes de la separación, la columna se enjuagó con un 85 % de A durante 10 min. El gradiente de flujo comenzó en 75 % de A y se redujo progresivamente hasta 57 % de A en 45 min. A continuación, se enjuagó de nuevo la columna con un 40 % de A durante 10 minutos y, posteriormente, 10 minutos de 85 % de A. Los cromatogramas registrados de detección de fluorescencia se analizaron empleando Chromeleon versión 7.1.2.1713 (Dionex).

MALDI-TOF-MS

[0074] Para el análisis MALDI-TOF-MS, 1 μ l de muestra de glicano purificada mediante HILIC SPE con algodón se colocó en una MTP objetivo AnchorChip 800/384 TF MALDI (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania), se mezcló

en la placa con 1 μ l de 2,5-DHB (5 mg/ml) en ACN al 50 %, y se dejó secar. De este modo, los espectros de MALDI-TOF-MS RP mostraron una proporción cercana a 1:1 de los tipos $[M+Na]^+$ and $[M+K]^+$, complicando así el análisis. La adición de 1 mM de NaOH a la solución matriz corrigió este prolema, mostrando casi exclusivamente especies $[M+Na]^+$.

5 **[0075]** Los cristales de matriz se homogeneizaron añadiendo 0,2 μ l de etanol, lo que provocó una rápida recristalización, mejorando de este modo la reproducibilidad entre tomas y reduciendo la variabilidad de la aducción salina. Debido a que la cristalización de la mancha se determinó en última instancia mediante la etapa de recristalización, las muestras manchadas se podían dejar secar inicialmente al aire o secar rápidamente con un flujo de nitrógeno sin diferencias apreciables en cuanto a los espectros.

10 **[0076]** El análisis se realizó mediante UltraFlex extreme MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania) en modo reflectrón de iones positivo (RP), utilizando Flexcontrol 3.4 versión operativa 119. Antes de medir las muestras, los espectros se calibraron en las masas conocidas de un estándar de calibración de péptidos (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania). Todas las muestras se ionizaron mediante un láser smartbeam-II, y se aceleraron con 25 kV tras 140 ns de extracción retrasada. Se utilizó una ventana de masas de m/z 100 a 1500 para el
15 análisis de α 2,3-sialilactosa y α 2,6-sialilactosa, y para las muestras de N-glicano de fibrinógeno y plasma, una ventana de m/z 1000 a 5000 con una supresión de hasta m/z 900. Para cada espectro, se acumularon 20000 disparos láser con una frecuencia láser de 2000 Hz, utilizando una ruta completa aleatoria de muestra con 200 disparos por marca rasterizada. Se utilizó una alta intensidad láser para la obtención de perfiles de la muestra para la ionización de mayores especies de glicanos, asegurándose de que las especies monoisotópicas estaban
20 todavía claramente identificadas para todas las masas detectables.

[0077] La espectrometría de masas tándem se llevó a cabo en los picos más abundantes en N-glicoma de plasma humano, utilizando el modo LIFT positivo con disociación inducida por láser.

Análisis de los datos de MALDI-TOF-MS

25 **[0078]** Mediante el uso de flexAnalysis v3.3 versión operativa 65 (Bruker Daltonik), los espectros de MALDI-TOF-MS adquiridos se recalibraron de manera interna utilizando diversas masas de calibración. Las abreviaturas empleadas para la notación de glicanos son: hexosa (H), N-acetilhexosamina (N), fucosa (F) y ácido N-acetilneuramínico con enlace no especificado (S), y los números anexos indican el número de residuos. Las masas se calcularon como $[M+Na]^+$ para las composiciones de glicano H3N4F1, H4N4F1, H5N4F1, H5N4S1, H5N4F1S1, H5N4S2, H6N5S3, H6N5F1S3 y H7N6S4, utilizando distintas masas de ácido siálico en función de la derivatización realizada. Para las muestras de fibrinógeno, se utilizaron únicamente las masas de H5N4S1 y H5N4S2 para la calibración, y para la sialilactosa se calcularon los valores de H2S1 para variantes de ácido
30 siálico alquiladas y lactonizadas. Se seleccionaron las masas en los espectros utilizando un algoritmo centroide mediante el uso de una ventana de masas de 0,5 Da, seguido por una calibración cuadrática. Los espectros recalibrados se exportaron como formato de texto y se analizaron posteriormente utilizando *software* personalizado. En resumen, el análisis se llevó a cabo como una extracción de datos dirigida utilizando una lista determinada de composiciones de glicano. Para cada composición, se calculó la distribución de isótopos, así como las masas adjuntas. Para cada isótopo dentro del 95 % del grupo de isótopos acumulativos, se sumaron los valores de espectro en una ventana de masas de 1 Da. A continuación, se sumó el ruido para una región de 1 Da con 1 Da menos que el grupo de isótopos, y se le restó a cada uno de los isótopos (dando como resultado
40 únicamente el valor de señal). Las proporciones de isótopos observadas se compararon con las calculadas para evitar errores provocados por la superposición, y posteriormente se sumaron los valores de isótopos para dar un valor de composición de glicanos. Se estableció la distribución relativa de estos valores de glicanos para cada espectro mediante la división de cada valor entre la suma de todos los valores. Se calcularon las medias y las desviaciones típicas de los repetidos experimentos.

45 Aislamiento de IgG

[0079] Se purificó IgG a partir de plasma de control sano mediante el empleo de perlas de Protein G Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Las perlas se lavaron tres veces con 1x PBS y se colocaron en una placa de filtro de baja unión MultiScreen de 350 μ l (Millipore, Ámsterdam, Países Bajos) (15 μ l de perlas por pocillo), junto con 150 μ l de 1x PBS. Se añadieron dos μ l de plasma a las perlas en cada pocillo y se incubaron durante 1 h en
50 una plataforma de agitación (600 RPM). Las perlas con IgG incorporadas se lavaron tres veces con 200 μ l de 1x PBS y tres veces con 200 μ l de MQ utilizando un colector de vacío. Para la elución, se añadieron 100 μ l de 100 mM ácido fórmico (Sigma-Aldrich) en MQ a las perlas y se recogió el eluyente. Posteriormente, el eluyente se secó y se aclaró en 20 μ l de 50 mM de bicarbonato de amonio (ABC) (Sigma-Aldrich). Las IgG aisladas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

55 Digestión de IgG mediante tripsina

[0080] La digestión de las IgG aisladas se llevó a cabo mediante tripsina tratada con TPCK (Roche Diagnostics). En cada pocillo (que contenía aproximadamente 20 μ g de IgG en 20 μ l de 50 mM de ABC), se añadieron 2 μ g de tripsina (1:10, enzima:proteína) y la placa se agitó durante 10 min a 600 RPM. Tras confirmar que el pH se situaba entre 6 y 10, la mezcla de digestión se incubó durante la noche a 37 °C.

Fetuina bovina

[0081] Se disolvió fetuina bovina a una concentración de 10,9 mg/ml en 25 mM de ABC, de los que 10 µl se sometieron a liberación de PNGase F. Se llevó a cabo etil-esterificación, HILIC-SPE con algodón y análisis MALDI-TOF-MS según se ha descrito anteriormente (figura 10A). Se realizó MS/MS para mostrar la etil-esterificación y la discriminación de ácidos siálicos ligados a residuos de *N*-acetilglucosamina (figura 10B).

N-glicoma de plasma de ratón

[0082] El plasma agrupado tamponado con NaEDTA de la cepa de ratón C57BL6 se adquirió a través de Innovative Research (IMS-C57BL6-N, Novi, Michigan, EE. UU.). Se liberaron veinte µl de este plasma mediante PNGase F, 1 µl de los cuales se etil-esterificaron, se enriquecieron con glicanos para la HILIC-SPE con algodón y se analizaron. Se realizó un MS/MS para mostrar la derivatización de los ácidos *N*-glicolilneuramínicos ligados a α2,3 y a α2,6 en lactonas y ésteres de etilo (figura 12A), así como la conservación de la *O*-acetilación del ácido siálico mediante la reacción de etil-esterificación (figura 12B).

RESULTADOS

[0083] Se desarrolló un sólido método MALDI-TOF-MS de alto rendimiento para obtener perfiles de *N*-glicanos de plasma humano mediante la derivatización específica al enlace de residuos de ácido siálico. Las condiciones de reacción se optimizaron para conseguir la etilación de los residuos de ácido siálico ligado a 2,6, mientras que el ácido siálico ligado a 2,3 se sometió a formación de lactonas. Empezando por 10 µl de plasma humano, se lograron perfiles de glicanos permitiendo la diferenciación de 114 especies de glicanos (figura 6). El desarrollo y la validación del método se describen en las siguientes secciones.

Comparación de distintos activadores/reactivos

[0084] Se compararon varios reactivos de acoplamiento junto con combinaciones de los mismos para determinar la metil-esterificación específica al enlace de residuos de ácido siálico en mezclas de *N*-glicano impuras. El plasma agrupado (10 µl) disponible en el mercado se sometió a un tratamiento con PNGase F para obtener una muestra compleja con *N*-glicanos libres. El *N*-glicoma de plasma contiene un gran número de composiciones de *N*-glicano, incluyendo especies neutras y altamente sialiladas con diversos enlaces [34, 35], y, por consiguiente, se trata de una muestra informativa para estudiar los efectos globales de métodos de modificación de un ácido siálico. Todas las reacciones se llevaron a cabo directamente en la mezcla no purificada de liberación de PNGase F, empleando metanol como donador de metilo y como disolvente. Las muestras reaccionaron durante 1 h a 60 °C en reactivos de acoplamiento/activación DMT-MM con metanol (con fines comparativos), DCC, EDC, HOBt u Oxyma Pure, cada uno con y sin TFA al 0,2 %. Por otro lado, se probaron las combinaciones de reactivos DCC + HOBt, DCC + Oxyma Pure, EDC + HOBt y EDC + Oxyma Pure, cada una con y sin TFA al 0,2 %. Durante la etapa de incubación de 1 h, se formó precipitado blanco en el fondo de las muestras, provocando la separación entre los componentes solubles en metanol en la mezcla (incluyendo los glicanos y los reactivos de acoplamiento), y las proteínas que contenían fracciones insolubles en metanol.

[0085] Se consideró necesaria una limpieza de la muestra para el enriquecimiento y purificación de los glicanos procedentes de la mezcla de reacción, y se eligió HILIC SPE utilizando algodón como fase estacionaria, según se ha descrito anteriormente [32]. Una concentración de entre el 25 % y el 75 % de ACN dio como resultado una excelente retención sin desviación apreciable para los glicanos de masa grande y pequeña, y se escogió el valor intermedio de 50 % de ACN. La mezcla 1:1 de la solución alcohólica procedente de la reacción y el ACN mostró una formación adicional de precipitado, por lo que las muestras se incubaron durante 15 min a -20 °C para acelerar este proceso. Para realizar el HILIC SPE, se introdujeron 200 µg de algodón en puntas, se lavaron con 3x 20 µl de MQ y 3x 20 µl de ACN al 85 %, se cargaron con muestras mediante pipeteo 20x en la mezcla de reacción, se lavaron con 3x 20 µl de ACN al 85 % y TFA al 1 %, 3x 20 µl de ACN al 85 %, y se eluyeron con 10 µl de MQ. Fue necesario un pipeteo cuidadoso para impedir la obstrucción de las puntas.

[0086] A continuación, se colocó 1 µl de las muestras purificadas en una placa MALDI AnchorChip y se cocrystalizaron con 1 µl de 2,5-DHB (5 mg/ml) como matriz. Para evitar la formación de aductos de potasio, se añadió 1 mM de NaOH a la solución matriz, produciendo casi exclusivamente especies [M+Na]⁺. La recristalización se llevó a cabo con 0,2 µl de etanol para reducir la variabilidad entre tomas, y para reducir además la variedad de aducción salina.

[0087] La efectividad de las diversas condiciones de reacción se determinó teniendo en cuenta las masas de los *N*-glicanos sialilados, especialmente H5N4S2, la composición de glicano más destacada en *N*-glicoma de plasma (figura 1). El cambio de masa inducido por la metil-esterificación deseada es de +14,016 Da por ácido siálico, dando como resultado una masa de 2273,804 Da [M+Na]⁺ para el *N*-glicano H5N4S2 de plasma completamente esterificado más destacado. Únicamente se observaron ácidos siálicos no modificados en el modo RP cuando estaban asociados a un sodio adicional (+21,982 Da por ácido siálico), haciendo que las señales en 2281,770 y 2289,736 fueran indicadoras de reacciones incompletas. Además, se pudo observar la lactonización de uno de los ácidos siálicos, derivando en una pérdida de masa de 18,011 Da, dando como resultado una señal a *m/z* 2241,777 [M+Na]⁺.

[0088] Los reactivos DCC, EDC, HOBt y Oxyma Pure solos demostraron ser incapaces de modificar los ácidos siálicos, independientemente del ácido que se utilizara durante la reacción. DMT-MM mostró metil-esterificación de residuos de ácido siálico, pero también generó un pico destacado en m/z 2240,792 (-33,012 Da con respecto a la masa modificada prevista, superponiéndose con el producto de lactonización), así como amidación de grupos carboxilo (-0,984 Da). Estos productos secundarios se evitaron en gran medida mediante la adición de TFA al 0,2 % en la reacción, aunque unas condiciones muy ácidas pueden derivar en la desialilación parcial y en la pérdida de otros sustituyentes volubles. Cada una de las combinaciones de reactivos DCC + HOBt, DCC + Oxyma Pure and EDC + Oxyma pure mostró una considerable metil-esterificación de los residuos de ácido siálico, pero la presencia de aductos de sodio indicó también que la conversión había sido incompleta. Este hecho se corrigió en gran medida, aunque no completamente, con condiciones ácidas. EDC + HOBt pareció ser la combinación de reactivos más prometedora, mostrando una completa conversión independientemente del ácido utilizado, y, por lo tanto, fue seleccionada para la posterior experimentación.

Prueba de distintos alcoholes

[0089] EDC + HOBt se seleccionó como la mezcla de reactivos más prometedora para la esterificación de ácido siálico, y se probaron diversos alcoholes posteriormente como una combinación de agente de precipitación y donador alquilo. Empleando 20 µl de metanol, etanol, 2-propanol y 1-butanol, 1 µl de solución de N-glicomas de plasma reaccionó durante 1 h a 60 °C. El 2-propanol y el 1-butanol disolvieron únicamente de manera parcial EDC + HOBt a temperatura ambiente, por lo que se utilizó una suspensión muy homogeneizada. La purificación, la colocación y la medición MALDI-TOF-MS RP se llevaron a cabo conforme a lo descrito anteriormente.

[0090] El análisis de las composiciones de glicanos sialilados mostró que todos los alcoholes eran donadores de grupo alquilo para la esterificación de ácido siálico (figura 2). Se estudiaron como ejemplo las composiciones de glicanos trisialilados H6N5S3 y H6N5F1S3. Las masas previstas tras la derivatización con metanol, etanol, 2-propano y 1-butanol eran 2944,047, 2986,094, 3028,141 y 3070,188 Da para la composición H6N5S3, y 3090,105, 3132,152, 3174,199 y 3216,246 Da para H6N5F1S3, respectivamente, todas visibles en los espectros registrados. Además, se encontraron productos de lactonización en todos los espectros, con diferencias de masa de 32,026, 46,042, 60,058 y 74,073 Da, pero las proporciones relativas de las señales lactonizadas y alquil-esterificadas diferían en lo que respecta al alcohol. El isopropanol mostró una gran variedad de productos de reacción además de las especies previstas, y tanto el isopropanol como el 1-butanol produjeron señales relativamente bajas para los glicanos sialilados. Se seleccionaron el metanol y el etanol como los disolventes y donadores de alcohol más prometedores para la modificación de ácido siálico específico al enlace, y se utilizaron para el posterior desarrollo del método.

Obtención de especificidad de unión

[0091] Se estudió la especificidad al enlace de EDC + HOBt junto con metanol y etanol utilizando estándares oligosacáridos con un tipo conocido de enlace de ácido siálico, a saber, 3'-sialilactosa (Neu5Ac(α2,3)Gal(β1,4)Glc) y 6'-sialilactosa (Neu5Ac(α2,6)Gal(β1,4)Glc), ambos con purezas superiores al 98 %. Para estudiar además el efecto de la temperatura en la especificidad al enlace, las muestras no solo reaccionaron durante 1 h a 60 °C, sino también a 50 °C, 37 °C, 21 °C y 4 °C. La purificación, la colocación y las mediciones MALDI-TOF-MS RP se realizaron conforme a lo descrito anteriormente.

[0092] La cuantificación relativa se llevó a cabo entre los productos de reacción lactonizados (638,190 Da en todas las condiciones) y los productos metil-esterificados y etil-esterificados (670,217 y 684,232 Da respectivamente) (figura 3). No se halló producto de reacción no modificado (678,183 Da), lo cual indica que todos los ácidos bien se esterificaron bien se lactonizaron. Los ácidos siálicos ligados a α2,6 demostraron ser muy susceptibles a la alquilación, ya que tanto el metanol como el etanol generaron una esterificación casi completa (figura 4). No obstante, la lactonización de ácidos siálicos ligados a α2,3 en metanol mostró una conversión dependiente de la temperatura, formándose una menor cantidad de reacción secundaria (esterificación de metanol) a temperaturas más bajas. Utilizando metanol, la lactonización correcta oscilaba entre únicamente un 53,9 % (SD ± 1,5 %) a 60 °C y un 93,6 % (SD ± 0,6 %) a 4 °C. No obstante, un entorno de etanol mostró una preferencia mucho mayor por la lactonización de ácido siálico ligado a 2,3, mostrando de media únicamente un 2,3 % (SD ± 0,9 %) de reacción secundaria (esterificación de etanol) en todas las temperaturas. Debido a la diferencia casi completa entre los productos de reacción de 3'-sialilactosa y 6'-sialilactosa, el etanol se seleccionó como el mejor disolvente y donador para la modificación de ácido siálico específico del enlace mediante EDC + HOBt. Las condiciones de reacción se ajustaron a 1 h a 37 °C para la experimentación posterior, con el fin de permitir una condición de temperatura controlada de la que se pudiera disponer fácilmente en la mayoría de laboratorios.

[0093] También fue posible derivatizar y analizar especies que contenían ácido N-glicolilneuramínico.

Estabilidad del ácido siálico

[0094] Las proporciones de glicanos H5N4S1 y H5N4S2 liberados de fibrinógeno se determinaron mediante MALDI-TOF-MS tras la etil-esterificación, y se compararon con HILIC-UHPLC tras el marcado 2-AA. El triple análisis y la cuantificación relativa de los glicanos monosialilados y disialilados mostraron unas señales muy comparables, con una media de 65,3 % y 34,7 % (SD ± 1,5 %) para MALDI-TOF-MS y 66,4 % y 33,6 % (SD ±

0,2 %) para las mediciones de UHPLC (figura 5). La desviación típica del método MALDI fue considerablemente mayor que en el método UHPLC, pero aun así presentaba un coeficiente de variación (CV) de 4,3 % para el pico más pequeño, y 2,3 % para el más grande. Las proporciones observadas son la proporción de los glicanos más destacados monosialilados y disialilados biantenarios según lo determinado mediante espectrometría de masas y UHPLC de manera muy similar y en consonancia con la literatura (respectivamente, 61,94 % y 38,06 % de la distribución de N-glicanos sialilados de fibrinógeno) [36].

Reproducibilidad

[0095] La reproducibilidad del perfilado de N-glicomas de plasma humano empleando etil-esterificación de EDC + HOBt durante 1 h a 37 °C se demostró mediante múltiples ensayos de repetición en tres días distintos. El plasma agrupado se dividió en 24 muestras separadas, se liberaron los glicanos con PNGase F, se etil-esterificaron, se purificaron mediante HILIC SPE con algodón y se analizaron mediante MALDI-TOF-MS RP. Las señales de los glicanos se integraron, se normalizaron a la suma de intensidad y se calcularon las señales relativas y las desviaciones típicas. Este protocolo se llevó a cabo durante dos días adicionales para tener en cuenta la variación diaria.

[0096] Los perfiles de plasma estudiados utilizando el protocolo de etil-esterificación mostraron glicanos [M+Na]⁺ con una masa que oscilaba entre 1257,423 Da (H5N2) y 4727,640 Da (H10N9F1, con cuatro ácidos siálicos lactonizados (abreviados como L) indicando el enlace α2,3) (figura 6). En total, se pudieron detectar 217 grupos de isótopos distintos en los espectros, 114 de los cuales se podían atribuir a composiciones de glicano dentro de una desviación de masa por debajo de 0,05 Da (desviación de masa media de 0,012 Da), teniendo en cuenta aproximadamente el 90 % del espectro total. Las señales que se encontraron con más frecuencia que se podían asignar a una masa de glicano nativa mostraron una masa que era 101,051 Da menor que los picos de glicano destacados asociados, lo cual indicaba una posible fragmentación entre anillos de 0,2 A en la N-acetilglucosamina del extremo reductor.

[0097] El análisis de repetibilidad para los 20 glicanos más abundantes (responsables del 94 % de la distribución acumulativa de glicanos de un espectro) en 24 muestras independientes procedentes del mismo grupo de plasma reveló una alta reproducibilidad en un grupo, así como entre tres grupos preparados y medidos en distintos días. Los valores medios de intensidad relativa para el pico más alto (H5N4 con dos ácidos siálicos esterificados (abreviados como E) indicando enlace α2,6 eran de aproximadamente 54,7 % (SD ± 2,3 %) en todas las mediciones, con la CV media en torno al 3,8 % (figura 7A). El análisis de todas las masas de glicanos muestra una reproducibilidad razonable incluso para los valores inferiores al 0,1 % de la distribución acumulativa (figura 7B).

Derivatización de N-glicanos marcados con extremo reductor

[0098] Para analizar las condiciones de etil-esterificación para la derivatización de glicanos con extremo reductor marcado, se adquirieron los estándares de glicanos A2F y A3 marcados con 2-aminobenzamida (2-AB) a través de Ludger Ltd. (Abingdon, Reino Unido, números de producto CAB-A2F-01 y CAB-A3-01), y se disolvieron a 5 µM en MQ. Se añadió un µl de estos estándares disueltos a 20 µl de reactivo de etilación, y se sometió a 1 h de incubación a 37 °C. Tras la adición de 20 µl de ACN, los glicanos se recubrieron mediante HILIC-SPE con algodón, y se estudiaron mediante MALDI-TOF-MS (figura 8).

[0099] Las asignaciones de espectrometría de masas de las composiciones de glicanos y enlaces de ácido siálico se realizan conforme a las asignaciones realizadas por el proveedor (perfilado HILIC HPLC, digestión de exoglicosidasa). No se observaron señales que pudieran indicar reacciones secundarias debido al marcador 2-AB en el extremo reductor del glicano ni productos de reacción incompletos.

Digestión de Ig y comparación de alcoholes para la derivatización de glicopéptidos

[0100] En función de la metodología de glicanos liberados, se seleccionaron 0,25 M de EDC y 0,25 M de HOBt como los activadores de ácido carboxílico más prometedores. Se utilizó tanto metanol como etanol como donador alquilo y disolvente para la reacción de esterificación. Para ambas condiciones, se incubó 1 µl de digestión de Ig en crudo con 20 µl de reactivo, y la incubación se llevó a cabo durante 1 h a 37 °C (etil-esterificación) o durante 1 h a 4 °C (metil-esterificación), condiciones que previamente se había observado que proporcionaban la especificidad al enlace más elevada en productos de reacción. A continuación, se añadieron 20 µl de ACN (50 %, v/v), los glicopéptidos modificados se enriquecieron a partir de las mezclas de reacción mediante HILIC con algodón, y se realizó el análisis mediante MALDI-TOF-MS (figura 9).

[0101] La presente invención proporciona diversas ventajas con respecto a otras técnicas del estado de la técnica para la derivatización y el análisis de glicanos sialilados. Por ejemplo, los reactivos que se han desarrollado muestran una alta tolerancia a las impurezas de la muestra, lo que permite la derivatización de ácido siálico de muestras no enriquecidas. También existe una alta especificidad de la reacción en relación con la esterificación de ácido siálico, con una resistencia significativa a la amidación, sobrealquilación y subalquilación, así como a otras reacciones secundarias. Las condiciones de reacción suaves empleadas impiden la pérdida de ácidos siálicos y otros grupos volubles. Por ejemplo, la acetilación de ácidos siálicos se puede conservar tras la derivatización. Por lo tanto, la presente invención se puede aplicar en la medición del

estado de acetilación de las glicoproteínas. Esto puede resultar útil para el análisis de hormonas que se puedan comercializar y/o ser ingeridas por sujetos y podría resultar útil, por ejemplo, para la caracterización de fármacos y/o el control del dopaje; por ejemplo, analizando la eritropoyetina.

[0102] Además, la velocidad y facilidad de uso del reactivo (simplemente añadir el reactivo y esperar 15-60 min), su estabilidad (12 semanas a -20 °C), su baja toxicidad, su muy elevada especificidad al enlace entre ácidos siálicos ligados a α 2,3 y a α 2,6 y su compatibilidad con la limpieza de muestras HILIC son ventajas adicionales.

[0103] Por último, los inventores han sido capaces de observar masas muy altas en el perfilado MALDI-TOF-MS de N-glicoma de plasma liberado de PNGase F (hasta 4800 D) y una buena reproducibilidad en el modo perfilado.

10 LISTA DE REFERENCIAS

[0104]

1. Wormald, M.R. y R.A. Dwek, Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure*, 1999. 7(7): p. R155-60.
2. Crocker, P.R., J.C. Paulson, y A. Varki, Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 2007. 7(4): p. 255-66.
3. Muramatsu, T., Essential roles of carbohydrate signals in development, immune response and tissue functions, as revealed by gene targeting. *Journal of biochemistry*, 2000. 127(2): p. 171-6.
4. Adamczyk, B., T. Tharmalingam, y P.M. Rudd, Glycans as cancer biomarkers. *Biochimica et biophysica acta*, 2012. 1820(9): p. 1347-53.
5. van Kooyk, Y. y G.A. Rabinovich, Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*, 2008. 9(6): p. 593-601.
6. Guillard, M., et al., Plasma N-glycan profiling by mass spectrometry for congenital disorders of glycosylation type II. *Clinical chemistry*, 2011. 57(4): p. 593-602.
7. Parekh, R.B., et al., Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 1985. 316(6027): p. 452-7.
8. Dennis, J.W., M. Granovsky, y C.E. Warren, Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochimica et biophysica acta*, 1999. 1473(1): p. 21-34.
9. An, H.J., et al., Glycomics and disease markers. *Current opinion in chemical biology*, 2009. 13(5-6): p. 601-7.
10. Kawasaki, N., et al., The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 2009. 32(5): p. 796-800.
11. Salles, G., et al., Phase 1 study results of the type II glycoengineered humanized anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab (GA101) in B-cell lymphoma patients. *Blood*, 2012. 119(22): p. 5126-32.
12. Coggle, J.E. y J.P. Williams, Experimental studies of radiation carcinogenesis in the skin: a review. *International journal of radiation biology*, 1990. 57(4): p. 797-808.
13. Dall'Olio, F. y M. Chiricolo, Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate journal*, 2001. 18(11-12): p. 841-50.
14. Schauer, R., Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current opinion in structural biology*, 2009. 19(5): p. 507-14.
15. Sperandio, M., C.A. Gleissner, y K. Ley, Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunological reviews*, 2009. 230(1): p. 97-113.
16. Isozaki, H., T. Ohyama, y H. Mabuchi, Expression of cell adhesion molecule CD44 and sialyl Lewis A in gastric carcinoma and colorectal carcinoma in association with hepatic metastasis. *International journal of oncology*, 1998. 13(5): p. 935-42.
17. Nakayama, T., et al., Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer*, 1995. 75(8): p. 2051-6.
18. Jeschke, U., et al., Expression of sialyl lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis. *Anticancer research*, 2005. 25(3A): p. 1615-22.
19. Jorgensen, T., et al., Up-regulation of the oligosaccharide sialyl LewisX: a new prognostic parameter in metastatic prostate cancer. *Cancer research*, 1995. 55(9): p. 1817-9.

20. Schultz, M.J., A.F. Swindall, y S.L. Bellis, Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer metastasis reviews*, 2012. 31(3-4): p. 501-18.
21. Zhuo, Y. y S.L. Bellis, Emerging role of alpha2,6-sialic acid as a negative regulator of galectin binding and function. *The Journal of biological chemistry*, 2011. 286(8): p. 5935-41.
- 5 22. Hsu, D.K., R.Y. Yang, y F.T. Liu, Galectins in apoptosis. *Methods in enzymology*, 2006. 417: p. 256-73.
23. Harvey, D.J., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass spectrometry reviews*, 1999. 18(6): p. 349-450.
24. Powell, A.K. y D.J. Harvey, Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, 1996. 10(9): p. 1027-32.
- 10 25. Harvey, D.J., Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2011. 879(17-18): p. 1196-225.
26. Ruhaak, L.R., et al., Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010. 397(8): p. 3457-81.
- 15 27. Miura, Y., et al., Rapid and simple solid-phase esterification of sialic acid residues for quantitative glycomics by mass spectrometry. *Chemistry*, 2007. 13(17): p. 4797-804.
28. Wheeler, S.F., P. Domann, y D.J. Harvey, Derivatization of sialic acids for stabilization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and concomitant differentiation of alpha(2 --> 3)- and alpha(2 --> 6)-isomers. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 2009. 23(2): p. 303-12.
- 20 29. Alley, W.R., Jr. y M.V. Novotny, Glycomic analysis of sialic acid linkages in glycans derived from blood serum glycoproteins. *Journal of proteome research*, 2010. 9(6): p. 3062-72.
30. Liu, X., et al., Methylamidation for sialoglycomics by MALDI-MS: a facile derivatization strategy for both alpha2,3- and alpha2,6-linked sialic acids. *Analytical chemistry*, 2010. 82(19): p. 8300-6.
- 25 31. Ruhaak, L.R., et al., Hydrophilic interaction chromatography-based high-throughput sample preparation method for N-glycan analysis from total human plasma glycoproteins. *Analytical chemistry*, 2008. 80(15): p. 6119-26.
32. Selman, M.H., et al., Cotton HILIC SPE microtips for microscale purification and enrichment of glycans and glycopeptides. *Analytical chemistry*, 2011. 83(7): p. 2492-9.
- 30 33. Ruhaak, L.R., et al., 2-picoline-borane: a non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination. *Proteomics*, 2010. 10(12): p. 2330-6.
34. Knezevic, A., et al., High throughput plasma N-glycome profiling using multiplexed labelling and UPLC with fluorescence detection. *The Analyst*, 2011. 136(22): p. 4670-3.
- 35 35. Stumpo, K.A. y V.N. Reinhold, The N-glycome of human plasma. *Journal of proteome research*, 2010. 9(9): p. 4823-30.
36. Adamczyk, B., et al., Characterization of fibrinogen glycosylation and its importance for serum/plasma N-glycome analysis. *Journal of proteome research*, 2013. 12(1): p. 444-54.
37. Kornfeld, R. y S. Kornfeld, Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*, 1985. 54: p. 631-64.
- 40 38. Nairn, A.V., et al., Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *The Journal of biological chemistry*, 2008. 283(25): p. 17298-313.

REIVINDICACIONES

- 1.** Método de derivatización mediante esterificación alquílica de enlace específico y formación de lactonas de residuos de ácido siálico presentes en fracciones de glicanos, comprendiendo el método:
- 5 la reacción, con pH 1,9 - 7,6, de una muestra biológica o preparación de glicano en una solución alcohólica, comprendiendo un reactivo al menos una carbodiimida(s) y al menos un triazol o etilo 2-ciano-2-(hidroximino)acetato (Oxyma pure), con el fin de derivatizar cualquier residuo de ácido siálico que pueda encontrarse en las fracciones de glicanos presentes en la muestra biológica.
- 2.** Método según la reivindicación 1, donde dicha al menos una carbodiimida es N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DDC), o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), por ejemplo, en su forma de hidrocloreuro.
- 10 **3.** Método según las reivindicaciones 1 o 2, donde dicho triazol es hidroxibenzotriazol (HOBt) en una forma hidratada.
- 4.** Método según la reivindicación 3, donde HOBt es monohidrato.
- 5.** Método según cualquier reivindicación anterior, donde el reactivo es una mezcla, como DCC con HOBt, DCC con oxyma pure, EDC con HOBt y EDC con oxyma pure.
- 15 **6.** Método según cualquier reivindicación anterior, donde la solución alcohólica es metanol, etanol, (iso)propanol o butanol.
- 7.** Método según cualquier reivindicación anterior donde, cuando el método se lleva a cabo en condiciones ácidas, dichas condiciones ácidas se proporcionan, por ejemplo, mediante la adición de ácido trifluoroacético (TFA), como TFA al 0,1 % - 0,4 %.
- 20 **8.** Método según cualquier reivindicación anterior, donde el método se lleva a cabo en muestras puras o impuras, opcionalmente donde la muestra impura es una muestra biológica, como una muestra de plasma, inmunoglobulina o fibrinógeno que haya sido sometida a una digestión enzimática.
- 9.** Método según cualquier reivindicación anterior, donde la fracción de glicano, antes o después de la derivatización, se marca, por ejemplo, con un isótopo de marcado radiactivo o no radiactivo, o un marcador fluorescente o luminiscente.
- 25 **10.** Método según cualquier reivindicación anterior, donde los glicanos sialilados derivatizados y opcionalmente marcados se purifican tras la derivatización y/o el marcado, por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), p. ej., algodón hidrófilo, extracción en fase sólida de carbono grafitizado poroso (PGC-SPE), resinas de intercambio catiónico, extracción líquido-líquido o una mezcla de los anteriores.
- 30 **11.** Método según cualquier reivindicación anterior, comprendiendo, además, el análisis de los residuos de ácido siálico derivatizados presentes en las fracciones de glicanos, por ejemplo, mediante una separación adecuada y la detección de ácidos siálicos unidos de manera diferencial, por ejemplo, mediante una técnica de espectrometría de masas, opcionalmente donde la técnica de espectrometría de masas es un análisis MALDI-TOF, y opcionalmente se añade Na⁺, por ejemplo, en forma de NaOH, a la muestra derivatizada antes de
- 35 someter a la muestra derivatizada al análisis MALDI-TOF.
- 12.** Método según la reivindicación 11, donde la muestra derivatizada se somete a una etapa de recristalización antes de que la muestra sea analizada mediante MALDI-TOF.
- 13.** Método según cualquier reivindicación anterior para su uso en la detección y/o la determinación de acetilación y/o sialilación de ácido siálico.
- 40 **14.** Método según cualquier reivindicación anterior para la derivatización de ácidos siálicos unidos a cualquier monosacárido.
- 15.** Método según cualquier reivindicación anterior para la derivatización de ácidos siálicos unidos a cualquier otra fracción que contenga ácido siálico (por ejemplo, mediante enlace α 2,8 a ácido N-acetilneuramínico o ácido N-glicolilneuramínico), una hexosa (por ejemplo, mediante enlace α 2,3 o enlace α 2,6 a galactosa) o N-acetilhexosamina (por ejemplo, mediante enlace α 2,6 a N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina).
- 45

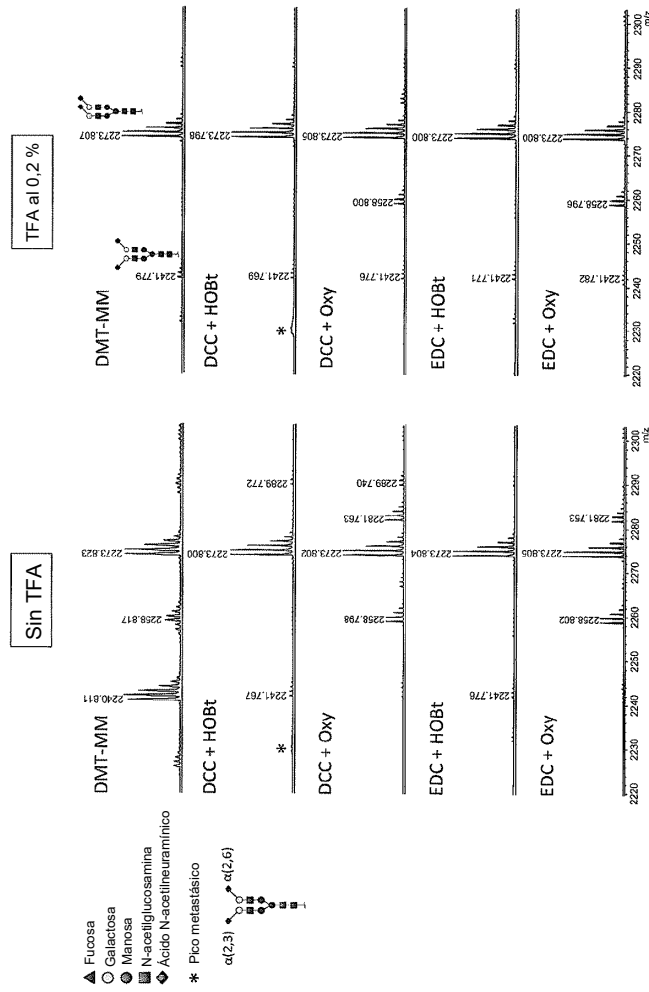


Figura 1

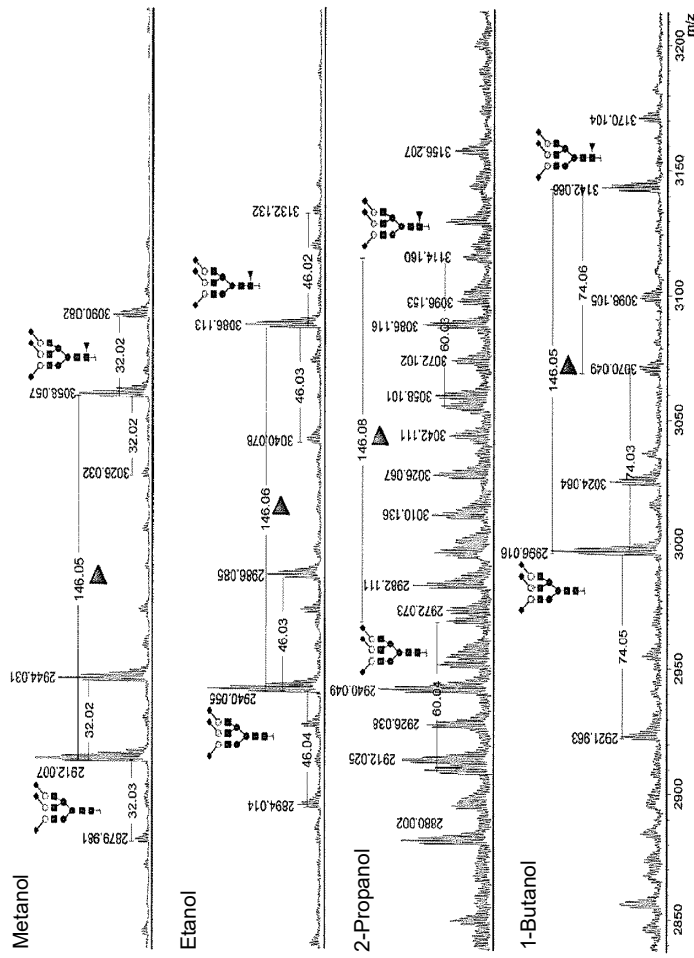


Figura 2

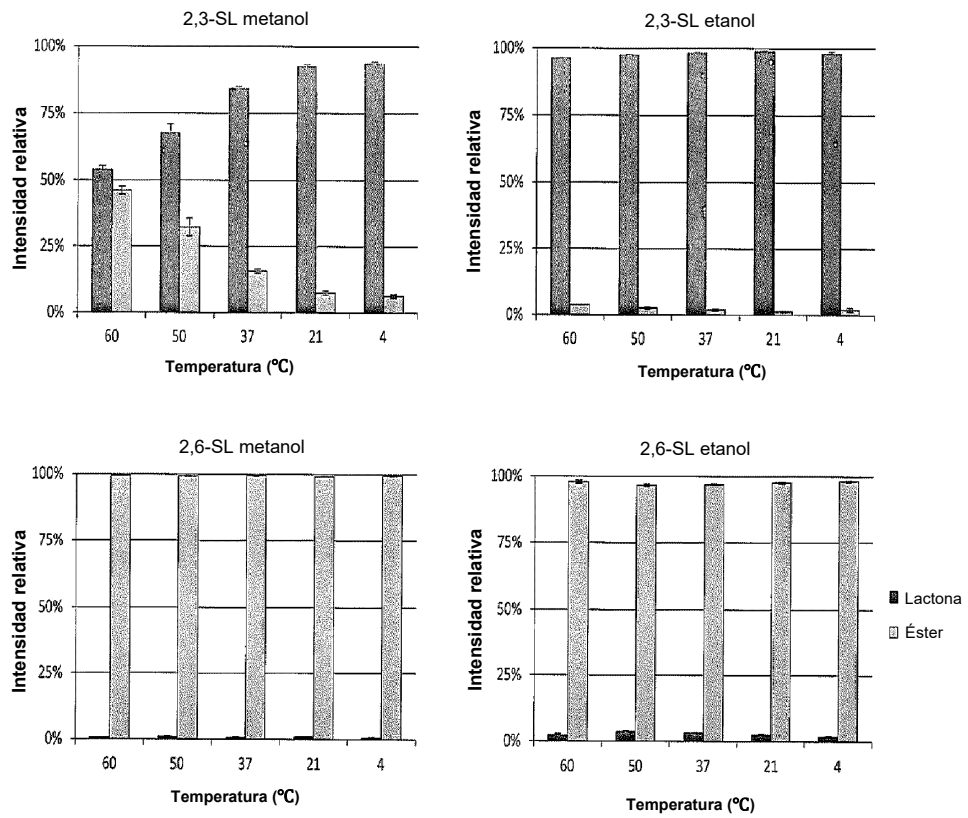


Figura 3

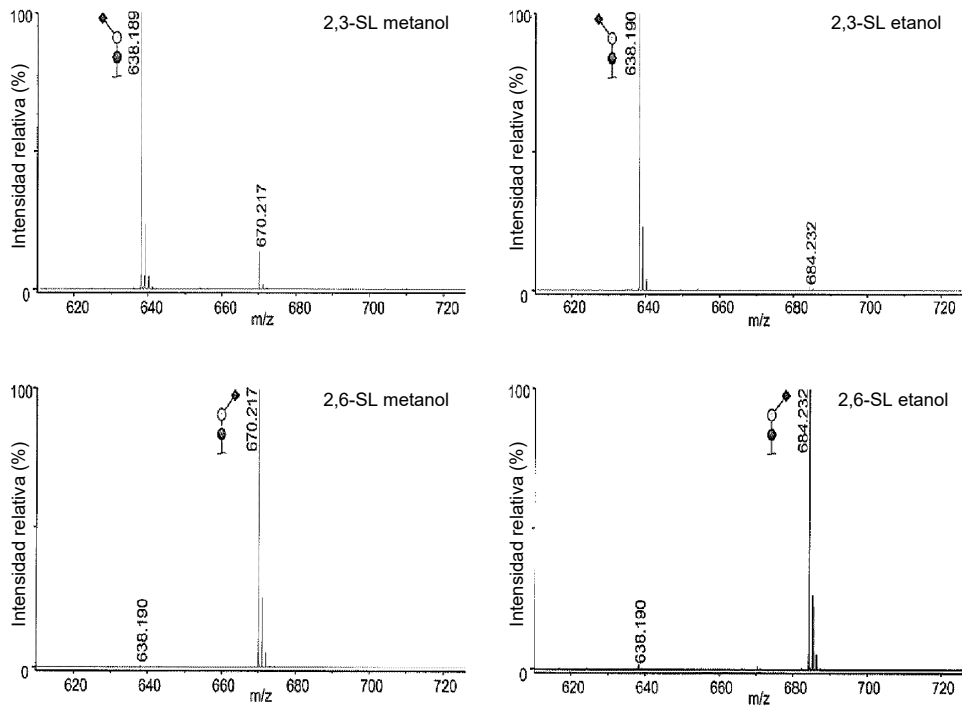


Figura 4

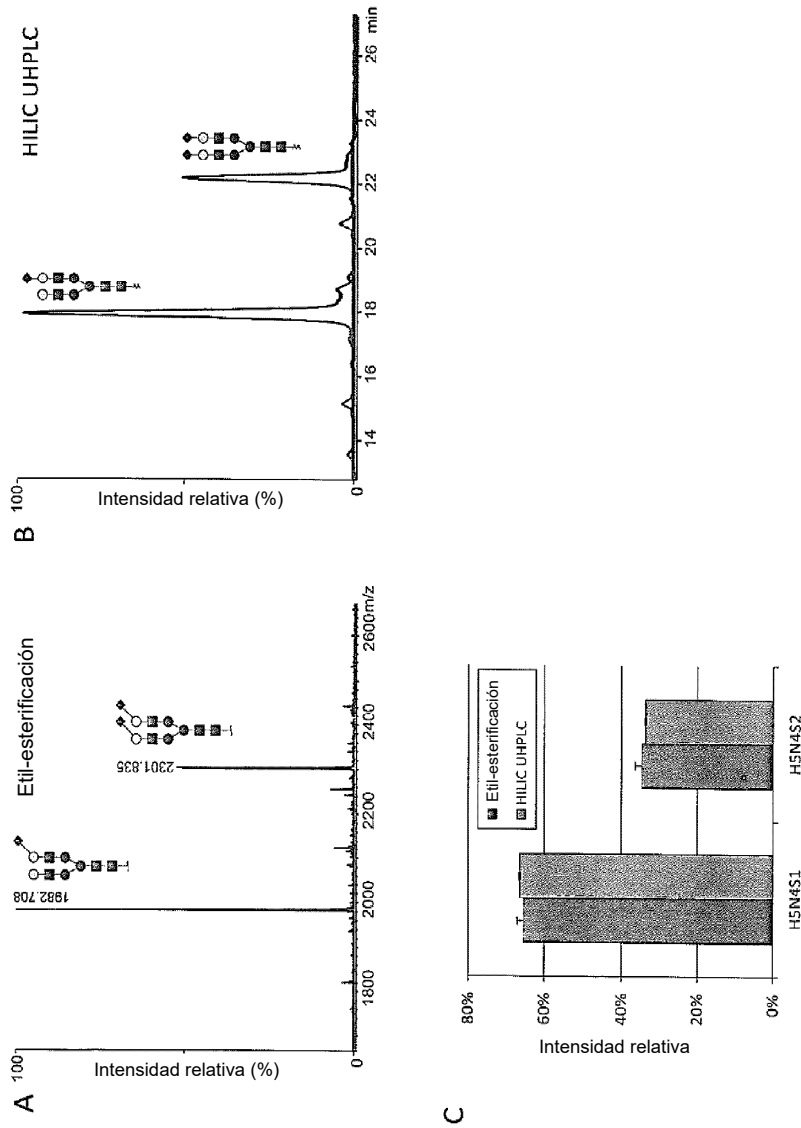


Figura 5

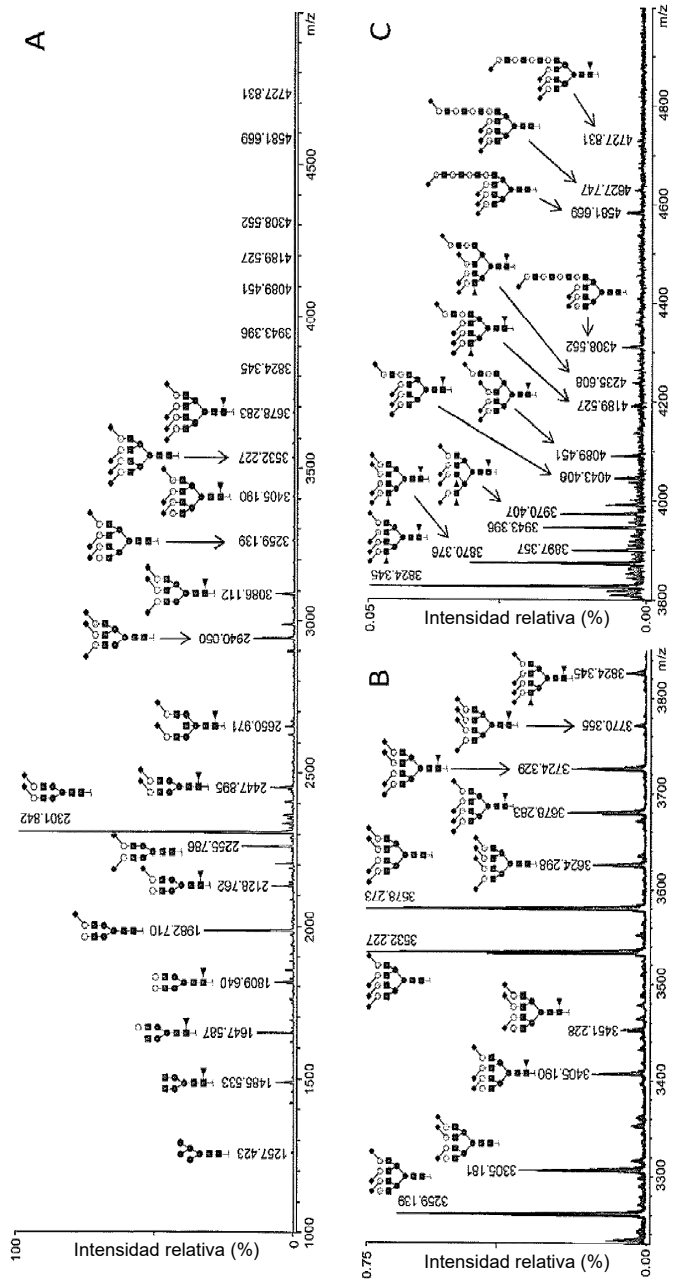


Figura 6

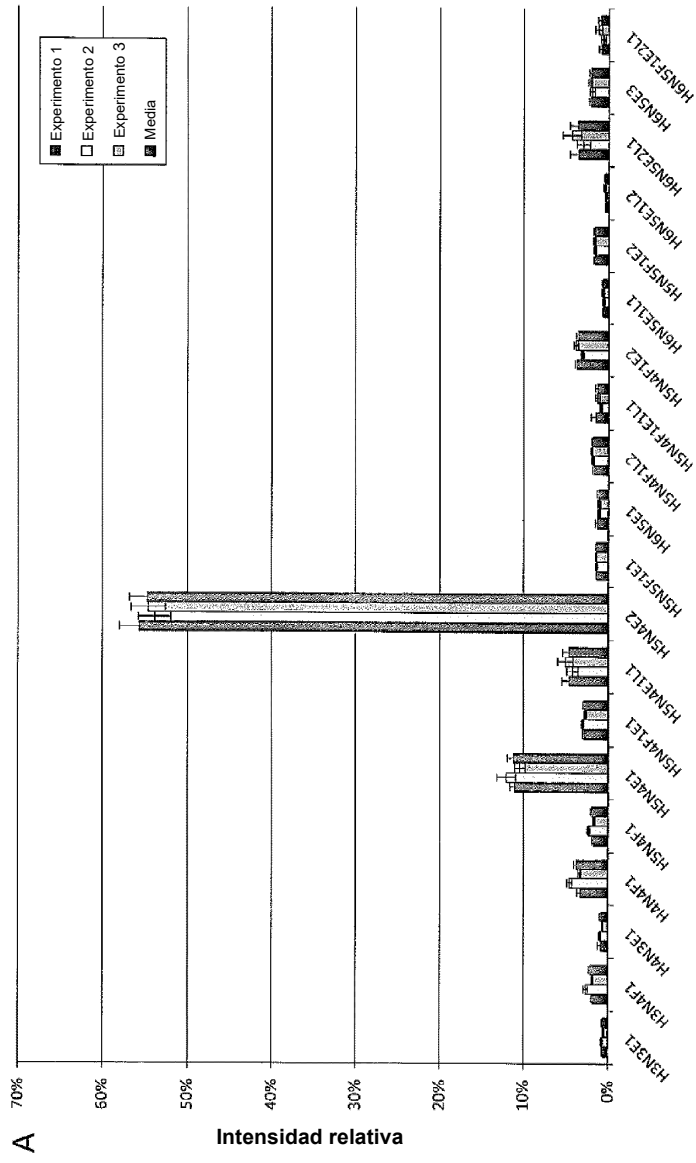


Figura 7A

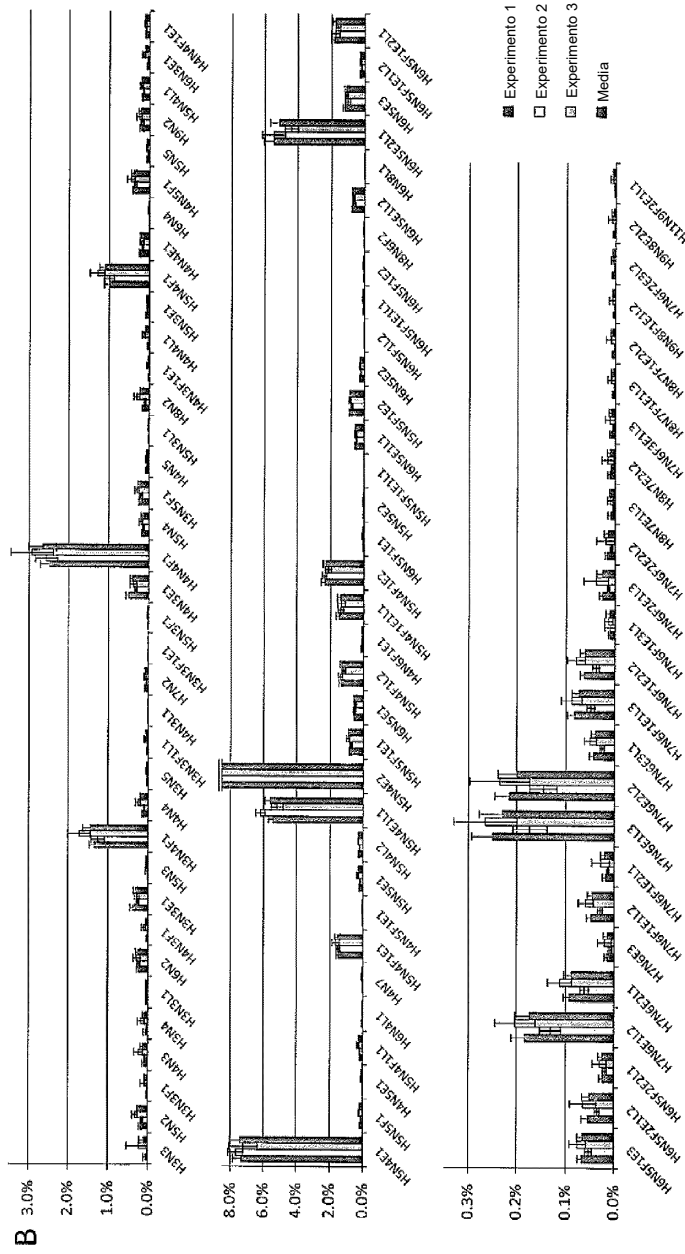


Figura 7B

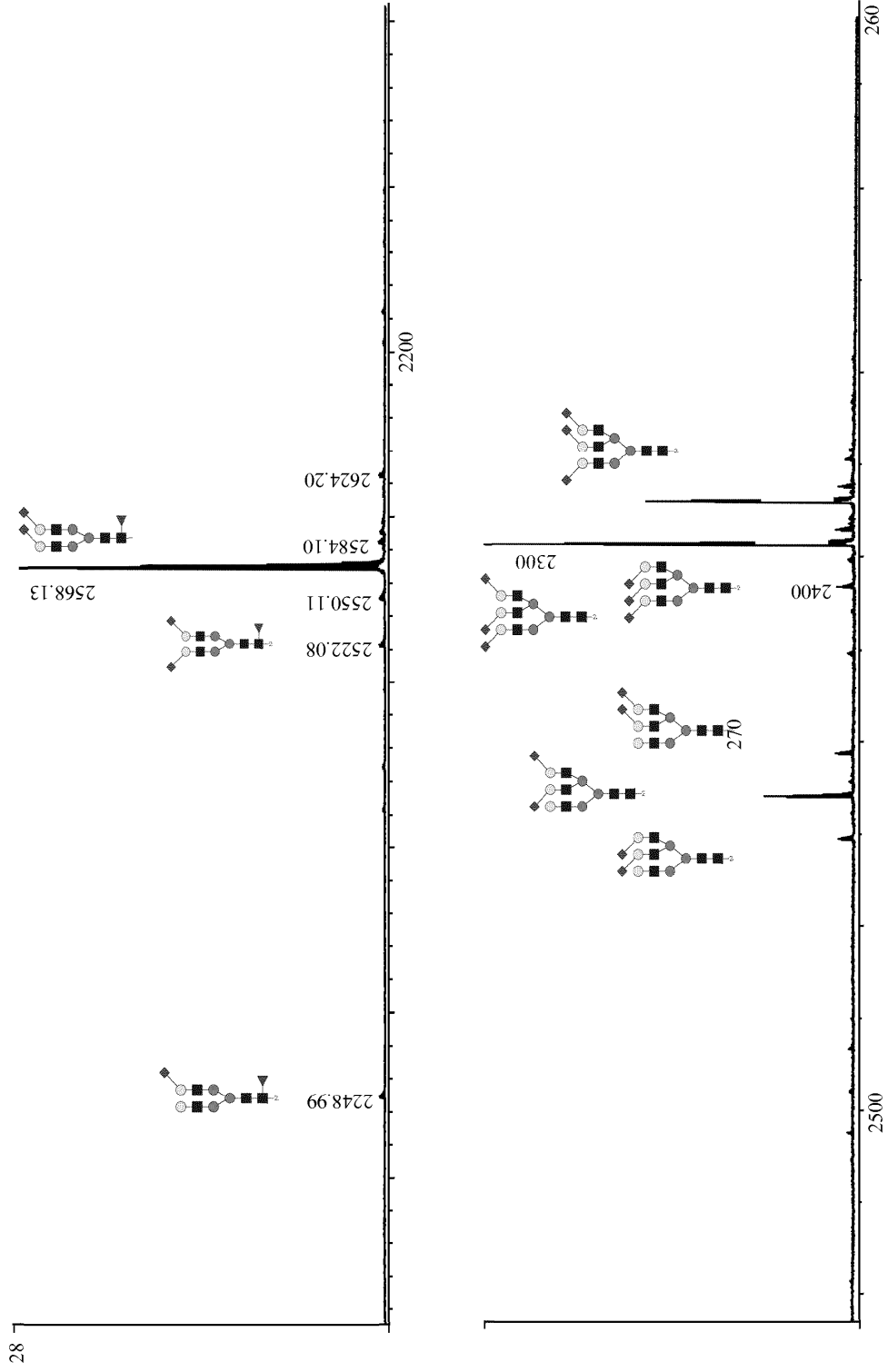


Figura 8

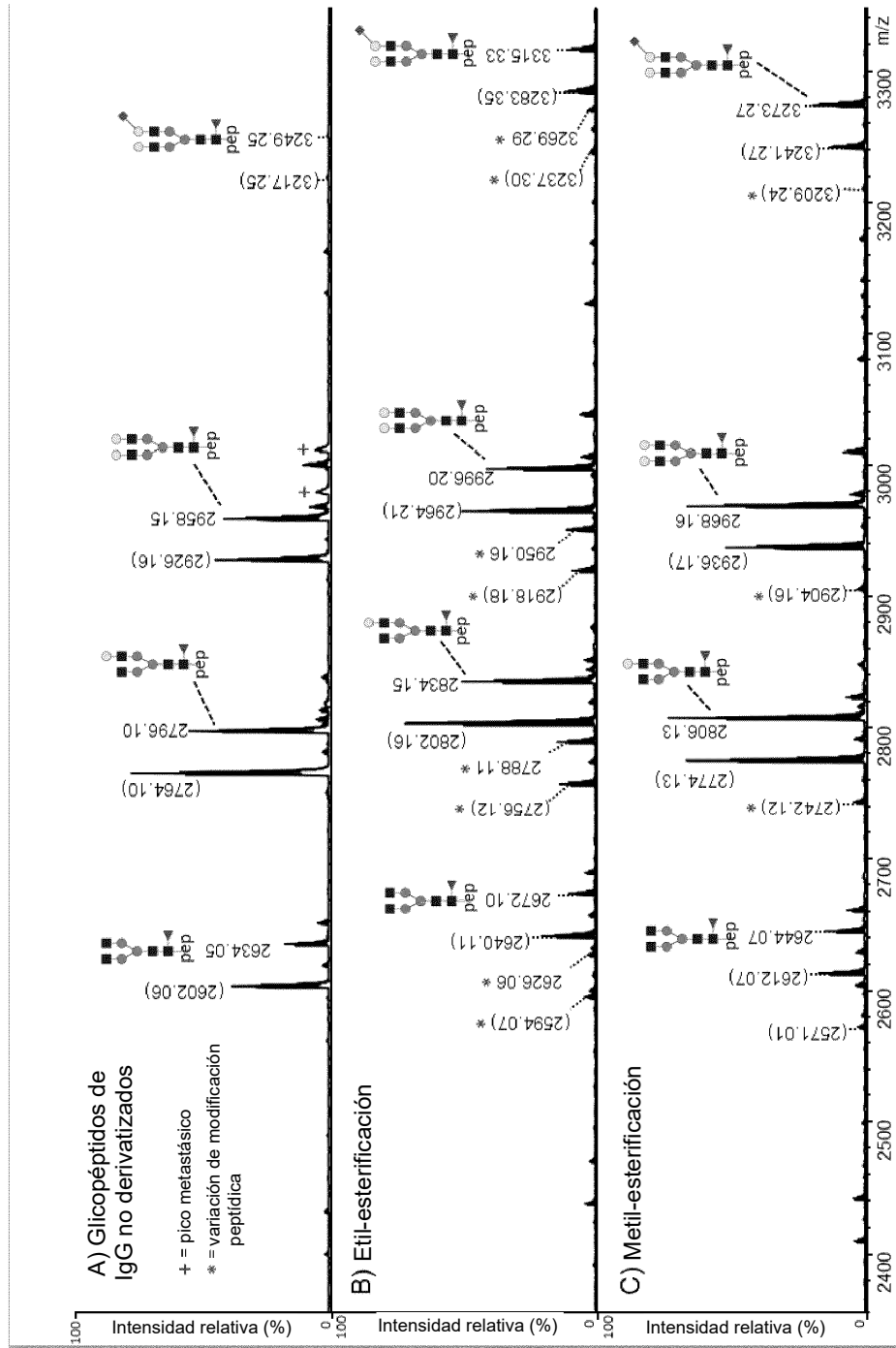


Figura 9

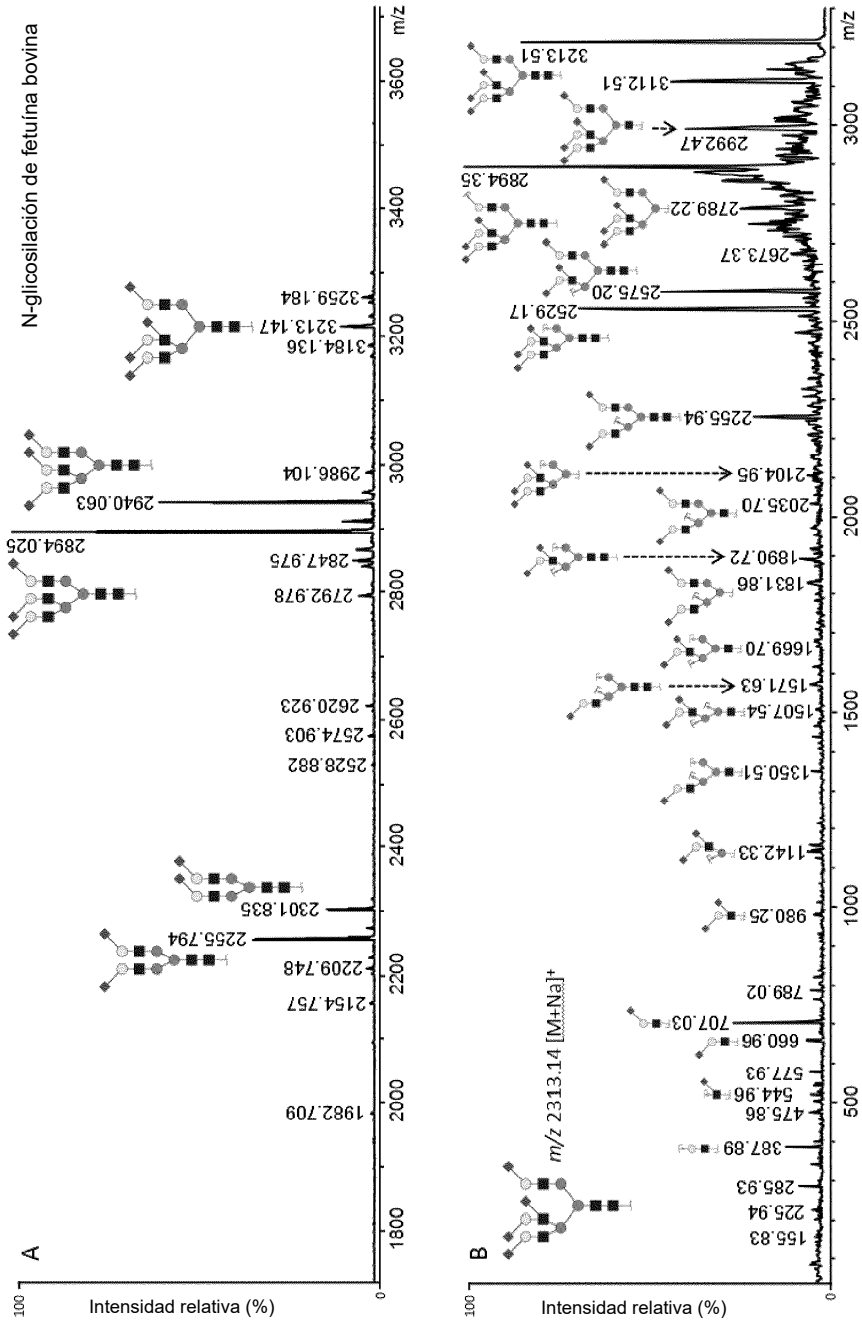


Figura 10

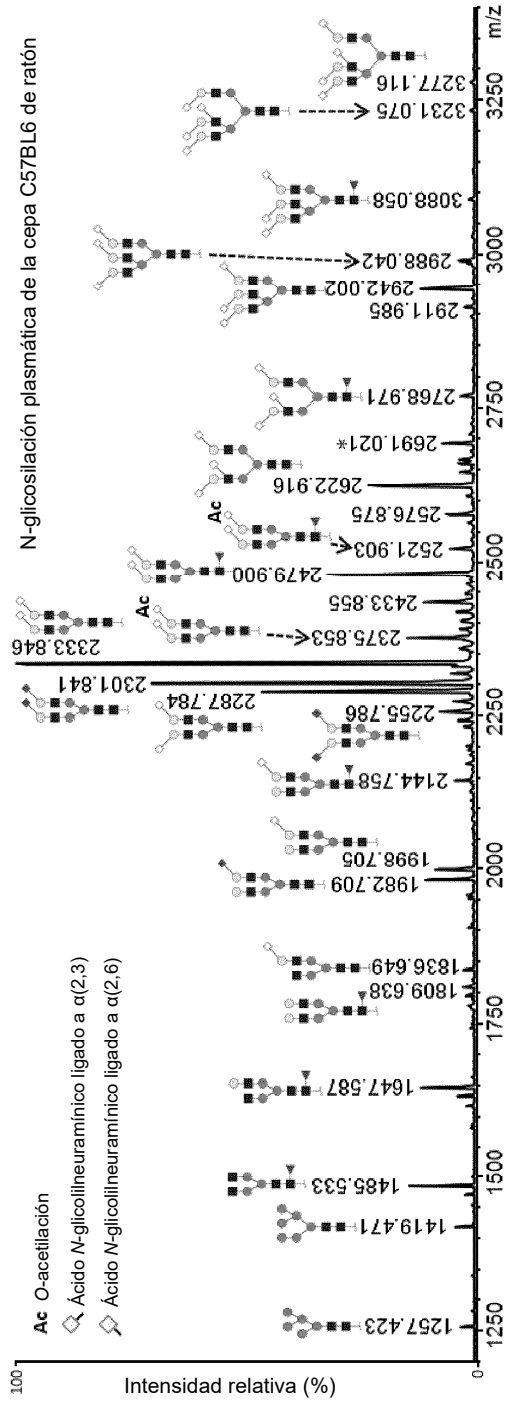


Figura 11

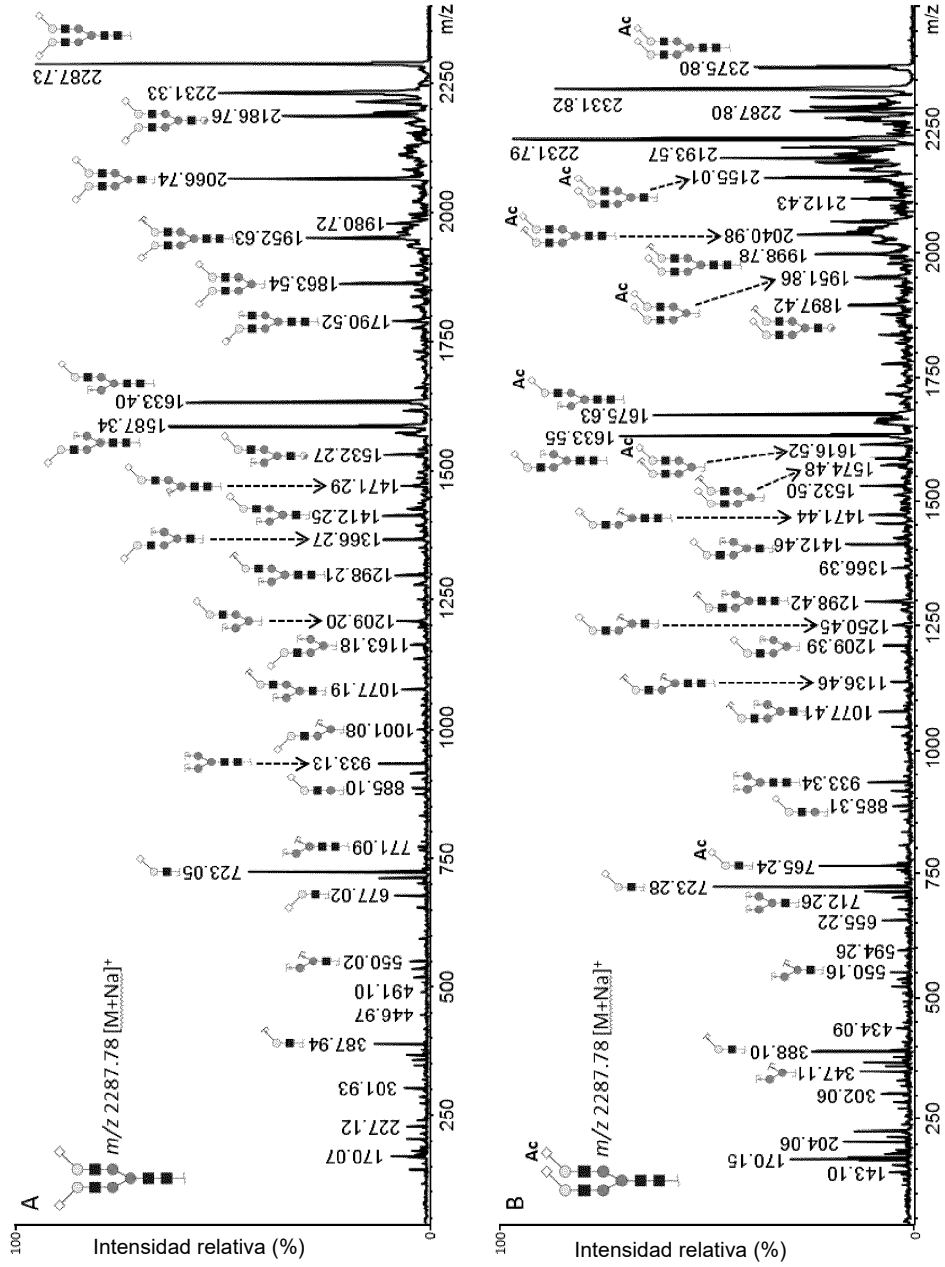


Figura 12