

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 461**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2019** **PCT/US2019/041541**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2020** **WO20014572**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2019** **E 19749884 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2024** **EP 3821256**

54 Título: **Detección y cuantificación de péptidos glicosilados**

30 Prioridad:

13.07.2018 US 201862697547 P

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

09.10.2024

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

ROSENBERG, AVRAHAM Z. y

SHEN, BIAO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 981 461 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

Detección y cuantificación de péptidos glicosilados

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está relacionada con productos biofarmacéuticos, y se refiere a la detección y cuantificación de la glicosilación postraducciona

10 ANTECEDENTES

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAbs) son moléculas heterogéneas producidas en células de mamíferos con muchas variantes de producto, incluyendo las variantes resultantes de modificaciones postraduccionales (PTM). La glicosilación ligada a N es una PTM importante en los anticuerpos terapéuticos. Las agencias reguladoras exigen la caracterización de las estructuras de los glicanos ligados a N y la cuantificación de las glicoformas individuales para definir la calidad del producto farmacéutico, demostrar la consistencia entre lotes y garantizar el control del proceso de fabricación. Tradicionalmente, los glicanos ligados al N dentro de los anticuerpos se cuantifican liberando enzimáticamente los glicanos del anticuerpo seguido del marcado con reactivos fluorescentes. Alternativamente, la glicosilación puede caracterizarse a nivel peptídico analizando los glicopéptidos generados a partir del dígido tróptico de un anticuerpo. Sin embargo, los glicopéptidos que poseen glicoformas heterogéneas a menudo no se separan bien mediante cromatografía líquida en fase inversa (RPLC), que se usa tradicionalmente para el mapeo de péptidos. Además, la fragmentación en la fuente inducida por la espectrometría de masas (MS) en línea de la cadena de azúcares en los glicopéptidos puede producir artefactos de glicoformas truncadas, que comprometen la cuantificación precisa de la abundancia relativa de las diferentes glicoformas usando MS.

Kondo et al. (J. Sep. Sci. 2010, 33, 891-902) divulga un método de enriquecimiento de glicopéptidos por digestión doble y no específica de glicoproteínas, aplicando la muestra que comprende glicopéptidos a una columna hidrófoba, y luego aplicando el flujo a una columna hidrófila. Palmisano et al. (Nature Protocols, 2010, 5, 12, 1974-1982) divulga un método para el enriquecimiento selectivo de glicopéptidos que contienen ácido siálico usando cromatografía de dióxido de titanio. Larsen et al. (Molecular & Cellular Proteomics, 2005, 4, 107-119) divulga un método de caracterización de glicoproteínas separadas en gel usando digestión proteolítica no específica de dos pasos combinada con una columna de fase inversa hidrófoba y una columna de polvo de grafito. Alagesan et al. (Anal Bioanal Chem, 2017, 409:529-538) proporciona una revisión del impacto de diferentes fases móviles sobre el enriquecimiento de glicopéptidos por HILIC zwitteriónico.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la presente invención proporciona un método para separar glicopéptidos, en el que el método comprende: poner en contacto una muestra que comprende glicopéptidos con un sustrato de enriquecimiento hidrófilo en condiciones que permitan que los glicopéptidos se unan al sustrato de enriquecimiento hidrófilo; lavar el sustrato de enriquecimiento hidrófilo para eliminar contaminantes que no son glicopéptidos del sustrato de enriquecimiento hidrófilo; eluir los glicopéptidos del sustrato de enriquecimiento hidrófilo con una solución de formiato de amonio y acetonitrilo (ACN) en agua, creando de este modo una muestra de glicopéptidos enriquecida; aplicar la muestra de glicopéptidos enriquecida a una columna de separación; y eluir los glicopéptidos de la columna de separación, separando de este modo los glicopéptidos de la muestra.

En algunas realizaciones, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo comprende un sustrato de cromatografía de extracción en fase sólida (SPE).

En algunas realizaciones, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo comprende un material sorbente aminopropílico a base de sílice.

En algunas realizaciones, la solución de formiato de amonio y ACN en agua comprende aproximadamente 100-400 mM de formiato de amonio y aproximadamente de un 2,5% a aproximadamente un 10% de ACN en agua.

En algunas realizaciones, la solución de formiato de amonio y ACN comprende 200 mM de formiato de amonio y un 5% de ACN en agua.

En algunas realizaciones, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se lava con una solución de lavado de ácido fórmico y ACN que comprende de un 0,5% a aproximadamente un 5% de ácido fórmico en volumen y de aproximadamente un 85% a aproximadamente un 95% de ACN en volumen con el resto de agua para eliminar los contaminantes que no son glicopéptidos.

En algunas realizaciones, la solución de lavado de ácido fórmico y ACN comprende un 1% de ácido fórmico,

un 9% de H₂O, un 90% de ACN en volumen.

En algunas realizaciones, la columna de separación comprende una columna de interacción hidrófila (HILIC).

5 En algunas realizaciones, eluir el glicopéptido de la columna de separación comprende además separar los glicopéptidos en una o más fracciones.

En algunas realizaciones, separar los glicopéptidos en una o más fracciones comprende aplicar un gradiente de fase móvil a la columna de separación.

10 En algunas realizaciones, el gradiente de la fase móvil es 10 mM de formiato de amonio, pH 4,5 a un 90% de ACN con 10 mM de formiato de amonio, pH 4,5.

15 En algunas realizaciones, el gradiente de la fase móvil es 0,05% de TFA en H₂O o 0,045% de TFA en ACN.

En algunas realizaciones, el método incluye además identificar los glicopéptidos presentes en una o más de las fracciones.

20 En algunas realizaciones, el método incluye además identificar un glicano asociado con los glicopéptidos presentes en una o más de las fracciones.

En algunas realizaciones, el glicano comprende un N-glicano.

25 En algunas realizaciones, los glicopéptidos se obtienen a partir de un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es de isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, o de isotipo mixto.

En algunas realizaciones, el método incluye además digerir el anticuerpo monoclonal con una proteasa.

30 En algunas realizaciones, la proteasa comprende tripsina.

En algunas realizaciones, el método incluye además realizar análisis de espectrometría de masas de los glicopéptidos eluidos.

35 En algunas realizaciones, el método incluye además realizar perfiles de glicosilación a nivel de glicopéptido de los glicopéptidos eluidos.

En algunas realizaciones, el método incluye además prelavado el sustrato de enriquecimiento hidrófilo con una solución de acetonitrilo (ACN) en agua.

40 En algunas realizaciones, el método incluye además diluir una muestra que comprende glicopéptidos en una solución de ACN en agua antes del contacto con el sustrato de enriquecimiento hidrófilo.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de flujo de trabajo que ilustra los métodos estándar actuales de cuantificación de glicopéptidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

La Figura 2 muestra una tabla que muestra los resultados del método de cuantificación de glicopéptidos mostrado en el flujo de trabajo de la Figura 1, comparado con la cuantificación de glicanos liberados; es decir, uno basado en la detección de glicopéptidos y el otro basado en la detección de glicanos liberados.

50 La Figura 3 muestra un espectro de masas que demuestra que las discrepancias entre las cuantificaciones de glicoformas mediante los métodos de glicopéptido y de glicano liberado (ver la Figura 2) se deben probablemente a la fragmentación en la fuente de la estructura principal de azúcares por MS en el análisis de glicopéptidos, que provoca un aumento de los artefactos de glicano truncados (es decir, G0F-GlcNAc y G1F-GlcNAc) y una disminución del glicano principal (es decir, G0F y G1F). El método del glicano liberado cuantifica las glicoformas por la fluorescencia del marcador unido al glicano liberado, no por la señal MS.

La Figura 4 muestra un diagrama de flujo de trabajo para los métodos de cuantificación de glicopéptidos divulgados en la presente.

La Figura 5 muestra un conjunto de cromatogramas HILIC-UV de péptidos mAb1 que muestran los resultados de una separación de péptidos mAb1 obtenidos de la digestión triptica por dos métodos diferentes.

La Figura 6 muestra un primer plano de la porción de glicopéptido de la traza mostrada en la Figura 5 que demuestra que el método N°2 tenía mejor separación, picos más nítidos y mayor relación S/N.

La Figura 7 muestra un conjunto de cromatogramas HILIC-TIC de glicopéptidos de mAb1 haciendo zoom sobre los glicopéptidos. Como se muestra, el método N°2 tenía una mayor relación S/N de la señal de MS.

65 Las Figuras 8A y 8B muestran espectros MS1 de glicopéptidos mAb1 (iones M²⁺).

La Figura 9 muestra un conjunto de trazas y una tabla que muestran una comparación de la cuantificación de glicoformas mediante la separación de glicopéptidos en una columna HILIC con el análisis de glicanos liberados.

La Figura 10 muestra un conjunto de trazas y una tabla que demuestran que el secado de los digeridos peptídicos podía ayudar a concentrar los glicopéptidos, pero no afectaba a la señal UV ni al % de PA relativo de los glicanos.

La Figura 11 muestra un conjunto de trazas que ilustran los cambios realizados para simplificar las preparaciones de fases móviles y mejorar la integración de los picos usando un 0,05% y un 0,045% de TFA en agua y ACN, respectivamente (fase móvil de mapeo de péptidos RP-LC).

Las Figuras 12A, 12B, 12C y 12D muestran un conjunto de resultados de espectros de masas que demuestran que el cambio de fase móvil no tuvo ningún impacto sobre la señal de MS de los glicopéptidos (iones M^{2+}).

La Figura 13 muestra un conjunto de trazas que demuestran la estabilidad en solución de los glicopéptidos mAb1 diluidos al 80% de ACN.

La Figura 14 muestra un conjunto de trazas que demuestran que los digeridos tripticos con glicopéptidos mal cortados complican la cuantificación de los glicopéptidos por UV.

La Figura 15 muestra un conjunto de trazas y una tabla que demuestran que con los datos de MS en línea puede usarse EIC para encontrar el porcentaje de glicopéptidos mal cortados en cada pico para ayudar a la cuantificación de la glicoforma.

La Figura 16 muestra un conjunto de trazas y una tabla que demuestran que la redigestión de mAb2 con tripsina eliminó los glicopéptidos mal cortados para ayudar a la cuantificación de la glicoforma.

La Figura 17 muestra un conjunto de trazas que demuestran que el formiato de amonio mejoró significativamente la elución de glicopéptidos a partir de SPE HILIC.

La Figura 18 muestra un conjunto de trazas y una tabla que demuestran que el secado o la limpieza/secado de SPE no tuvieron ningún efecto sobre la cuantificación del glicopéptido mAb1.

La Figura 19 muestra un conjunto de trazas y una tabla que demuestran cuantificaciones similares de la glicoforma mAb3 mediante análisis de glicopéptidos y glicanos liberados.

Las Figuras 20A y 20B muestran un conjunto de trazas y una tabla que demuestran cuantificaciones similares de glicoformas usando digeridos tripticos de mAb3 reducidas y no reducidas mediante análisis de glicopéptidos y glicanos liberados.

La Figura 21 muestra un conjunto de trazas que ilustran una comparación de la separación de los glicopéptidos IgG1 e IgG4, con y sin fucosilación.

La Figura 22 muestra un diagrama esquemático de flujo de trabajo que ilustra métodos de cuantificación de glicopéptidos que incluyen los métodos divulgados en la presente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene únicamente el propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. Cualesquiera realizaciones o características de las realizaciones pueden combinarse entre sí, y tales combinaciones se incluyen expresamente dentro del alcance de la presente invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Como se usa en la presente, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico enumerado particular, significa que el valor puede variar del valor enumerado en no más del 1%. Por ejemplo, como se usa en la presente, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Aunque en la puesta práctica o las pruebas de la presente invención puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

Abreviaturas usadas en la presente

PTMs: Modificaciones postraduccionales

RP-LC-MS/MS: Cromatografía líquida de fase inversa y espectrometría de masas en tándem

mAb: Anticuerpo monoclonal

IgG: Inmunoglobulina G

LC: Cadena Ligera

HC: Cadena pesada

MS: Espectrometría de masas

SPE: Extracción en fase sólida

HILIC: Cromatografía líquida de interacción hidrófila

UV: Ultravioleta

TFA: ácido trifluoroacético

ACN: Acetonitrilo

Definiciones

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro (es decir, "moléculas de anticuerpo completas"), así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM) o fragmentos de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada ("HCVR" o "V_H") y una región constante de cadena pesada (compuesta por los dominios C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}). En varias realizaciones, la cadena pesada puede ser un isotipo IgG. En algunos casos, la cadena pesada se selecciona entre IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, la cadena pesada es de isotipo IgG1 o IgG4, incluyendo opcionalmente una región bisagra quimérica de isotipo IgG1/IgG2 o IgG4/IgG2. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera ("LCVR" o "V_L") y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo terminal amino a extremo terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El término "anticuerpo" incluye referenciar tanto a inmunoglobulinas glicosiladas como no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase. El término "anticuerpo" incluye moléculas de anticuerpo preparadas, expresadas, creadas o aisladas por medios recombinantes, como anticuerpos aislados de una célula huésped transfectada para que exprese el anticuerpo. Para una revisión de la estructura de los anticuerpos, consultar Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) Dev. Comp. Immunol. 55-77 (2003); y M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1) Surv. Immunol. Res. 27-42 (1983).

El término anticuerpo también abarca el "anticuerpo biespecífico", que incluye una inmunoglobulina heterotetramérica que puede unirse a más de un epítipo diferente. Una mitad del anticuerpo biespecífico, que incluye una única cadena pesada y una única cadena ligera y seis CDR, se une a un antígeno o epítipo, y la otra mitad del anticuerpo se une a un antígeno o epítipo diferente. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico puede unirse al mismo antígeno, pero a epítopos diferentes o a epítopos no solapados. En algunos casos, ambas mitades del anticuerpo biespecífico tienen cadenas ligeras idénticas pero conservan la especificidad dual. Los anticuerpos biespecíficos se describen de manera general en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2010/0331527 (30 de diciembre de 2010).

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "fragmento de anticuerpo"), se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), que consiste en un dominio VH, (vi) una CDR aislada, y (vii) un scFv, que consiste en los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, unidos por un conector sintético para formar una única cadena de proteínas en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes. En el término "anticuerpo" también se engloban otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, como los diacuerpos, (consultar, por ejemplo, Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448; y Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

Además, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden obtenerse usando técnicas estándar de ADN recombinante comúnmente conocidas en la técnica (consultar Sambrook et al., 1989).

Se pretende que el término "anticuerpo humano" incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los mAbs humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR y en particular en la CDR3. Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, incluya mAbs en los que secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, ratón), se han injertado en secuencias FR humanas. El término incluye anticuerpos producidos recombinantemente en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. No se pretende que el término incluya anticuerpos aislados de o generados en un sujeto humano.

Como se usa en la presente el término "glicopéptido/glicoproteína" es un péptido/proteína modificado, durante o después de su síntesis, con carbohidratos o glicano unidos covalentemente. En ciertas realizaciones, un glicopéptido se obtiene a partir de un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, a partir de un digerido de proteasa de un anticuerpo monoclonal.

Como se usa en la presente el término "glicano" es un compuesto que comprende una o más unidades de azúcar, entre las que comúnmente se incluyen glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa (Fuc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc) (Frank Kjeldsen,

et al. Anal Chem. 2003, 75, 2355-2361). La fracción de glicano en una glicoproteína, como un anticuerpo monoclonal, es un carácter importante para identificar su función o localización celular. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico se modifica con una fracción de glicano específica.

5 Se pretende que el término "cromatografía de interacción hidrófila" o HILIC incluya un proceso que emplea una fase estacionaria hidrófila y una fase móvil orgánica hidrófoba en la que los compuestos hidrófilos se retienen durante más tiempo que los compuestos hidrófobos. En ciertas realizaciones, el proceso utiliza una fase móvil de solvente miscible en agua.

10 El término "muestra", como se usa en la presente, se refiere a una mezcla de moléculas que comprende por lo menos una molécula de analito, por ejemplo, un glicopéptido, como el obtenido a partir de un anticuerpo monoclonal, que se somete a manipulación de acuerdo con los métodos de la invención, incluyendo, por ejemplo, separación, análisis, extracción, concentración o realización de perfiles.

15 Los términos "análisis" o "analizando", como se usan en la presente, se usan indistintamente y se refieren a cualquiera de los varios métodos de separación, detección, aislamiento, purificación, solubilización, detección y/o caracterización de moléculas de interés (por ejemplo, glicoproteína). Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida, electroforesis, espectrometría de masas, por ejemplo, SPE HILIC, MALDI-MS o ESI, cromatografía líquida, por ejemplo, de alto rendimiento, por ejemplo, de fase inversa, fase normal o exclusión por tamaño, cromatografía líquida de pares iónicos, extracción líquido-líquido, por ejemplo, extracción con fluido acelerado, extracción con fluido supercrítico, extracción asistida por microondas, extracción con membrana, extracción Soxhlet, precipitación, clarificación, detección electroquímica, tinción, análisis elemental, degradación de Edmund, resonancia magnética nuclear, análisis por infrarrojos, análisis por inyección en flujo, electrocromatografía capilar, detección ultravioleta, y combinaciones de los mismos.

25 El término "realización de perfiles", como se usa en la presente, se refiere a cualquiera de los varios métodos de análisis que se usan en combinación para proporcionar el contenido, la composición o la proporción característica de los glicopéptidos en una muestra.

30 Un "sustrato de enriquecimiento hidrófilo", como se usa en la presente, es un material cromatográfico que se une preferentemente a materiales hidrófilos en condiciones que permiten la unión, por ejemplo, pH, fuerza iónica, etc. En algunas realizaciones, un sustrato de enriquecimiento hidrófilo se usa para SPE.

35 El término "superficie cromatográfica", como se usa en la presente, incluye una superficie que está expuesta a una muestra o a analitos. Una superficie cromatográfica puede estar químicamente modificada, funcionalizada o activada o tener una microestructura, por ejemplo, un poro. En ciertas realizaciones, la superficie cromatográfica puede ser hidrófoba, hidrófila (polar) o iónica. En otras realizaciones, la superficie cromatográfica es totalmente porosa, superficialmente porosa o no porosa.

40 El término "núcleo cromatográfico", como se usa en la presente, incluye un material cromatográfico, que incluye pero no se limita a un material orgánico como la sílice, en forma de una partícula, monolito u otra estructura adecuada que forma una parte interna de los materiales de la invención. En ciertos aspectos, la superficie del núcleo cromatográfico representa la superficie cromatográfica, o representa un material encapsulado por una superficie cromatográfica, como se define en la presente. El material de superficie cromatográfico puede estar dispuesto sobre o unido o apareado al núcleo cromatográfico de tal manera que sea discernible una transición discreta o distinta, o puede estar unido al núcleo cromatográfico de tal manera que se mezcle con la superficie del núcleo cromatográfico, dando como resultado una gradación de materiales y sin una superficie interna discreta del núcleo. En ciertos aspectos, el material de superficie cromatográfico puede ser el mismo o diferente del material del núcleo cromatográfico y puede presentar propiedades físicas o fisicoquímicas diferentes de las del núcleo cromatográfico, incluyendo, pero no limitadas a, el volumen de poros, el área superficial, el diámetro medio de los poros, el contenido de carbono o la estabilidad hidrolítica del pH.

55 El término "hidrófilo", como se usa en la presente, describe que tiene afinidad, atracción, adsorción o absorción por el agua.

El término "hidrófobo", como se usa en la presente, describe la falta de afinidad, repulsión o incapacidad para adsorber o absorber agua.

60 La "extracción en fase sólida" o "SPE" es una técnica cromatográfica que se usa a menudo junto con el análisis químico cuantitativo, por ejemplo, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o la cromatografía de gases (GC). El objetivo de la SPE es aislar los analitos diana de una matriz de muestra compleja que contiene contaminantes no deseados. Los analitos diana aislados se recuperan en una solución que sea compatible con el análisis cuantitativo. Esta solución final que contiene el compuesto diana puede usarse directamente para el análisis o evaporarse y reconstituirse en otra solución de menor volumen con el propósito de concentrar aún más el compuesto diana, haciéndolo más susceptible de detección y medición.

"Cromatografía", como se usa en la presente, se refiere al proceso de separación de una mezcla, por ejemplo una mezcla que contiene glicopéptidos. Implica hacer pasar una mezcla a través de una fase estacionaria, que separa las moléculas de interés de otras moléculas de la mezcla y permite aislar una o más moléculas de interés. Los ejemplos de métodos de separación cromatográfica incluyen la cromatografía de acción capilar, como la cromatografía en papel, la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía en columna, la cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), la cromatografía líquida en fase nanoinvertida, la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en gel, como la cromatografía de filtración en gel, la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de afinidad, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) y la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), entre otras.

"Poner en contacto", como se usa en la presente, incluye juntar por lo menos dos sustancias en solución o fase sólida, por ejemplo poner en contacto una fase estacionaria de un material cromatográfico con una muestra.

Descripción general

Los anticuerpos monoclonales (MAbs) han surgido como productos biofarmacéuticos eficaces contra el cáncer y otras enfermedades crónicas debido a la especificidad de estos fármacos hacia antígenos diana, por ejemplo, activando el sistema inmunitario para eliminar células tumorales, bloqueando la transducción de señales de las células tumorales para que proliferen, transportando fármacos a las células tumorales o como dianas de radiación. La glicosilación de las inmunoglobulinas influye tanto en sus propiedades fisicoquímicas como en sus funciones efectoras mediadas por células, como la unión y activación del complemento. Estas funciones biológicas pueden depender no sólo de la presencia o ausencia de oligosacáridos ligados a N, sino también de la estructura específica de los oligosacáridos. Además, la N-glicosilación de los anticuerpos se caracteriza de manera rutinaria en la fabricación de productos biofarmacéuticos. En particular, el perfil de glicanos de un anticuerpo monoclonal se define a veces como un atributo crítico de calidad, ya que puede ser una medida de la eficacia, la inmunogenicidad y las condiciones de fabricación. Por lo tanto, es importante que los enfoques de análisis de glicanos muestran alta sensibilidad para facilitar una caracterización detallada. En la fabricación de anticuerpos monoclonales terapéuticos, la N-glicosilación específica del sitio y la evaluación de la ocupación del sitio de N-glicano son importantes. Por lo tanto, hay una necesidad de métodos de alta eficiencia/alta resolución para separar glicopéptidos obtenidos de anticuerpos monoclonales. La invención divulgada satisface esa necesidad.

En la presente se divulga un nuevo método de análisis y cuantificación de glicopéptidos en el que se combina una extracción en fase sólida (SPE) con una columna de cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) para separar los péptidos tripticos glicosilados y los no glicosilados. En varias realizaciones, estas técnicas de separación se combinan con la detección ultravioleta (UV) y la detección por espectrometría de masas (MS) en línea para dilucidar las estructuras de los glicanos. En algunos métodos, la caracterización de los glicanos se basa en la liberación de los glicanos de las cadenas peptídicas y luego analizarlos por separado de los péptidos (consultar, por ejemplo, las Figuras 1-3). Debido a que los glicanos no son adecuados para la detección UV, los glicanos liberados a menudo se marcan con una etiqueta de fluoróforo, por ejemplo, antranilamida, ácido antranílico o 2-aminopiridina, para la detección de fluorescencia o una molécula, por ejemplo, procainamida, con basicidad significativa como para permitir la detección por MS. Sin embargo, este enfoque del análisis de glicanos sólo proporciona una evaluación global de la glicosilación. En particular, la información específica del sitio sobre los glicanos se pierde debido a que este flujo de trabajo depende de un procedimiento de liberación. Por el contrario, en el método divulgado, los glicopéptidos aislados se separan basándose en diferencias en la estructura de la glicoforma dentro de la misma separación cromatográfica. Además, la separación de glicopéptidos con diferentes isómeros de glicanos, que se logró usando la columna HILIC, no se observó usando métodos de RP-LC estándar (consultar, por ejemplo, las Figuras 1-3). Mediante la optimización de las condiciones de preparación de muestras para HILIC, incluyendo dilución, secado al vacío y/o extracción en fase sólida (SPE), se desarrolló un flujo de trabajo que permite el análisis de glicopéptidos a partir de diferentes tipos de preparaciones de muestras de mapeo peptídico (consultar, por ejemplo, la Figura 22). Como se divulga en la presente, los inventores han demostrado que el método y el flujo de trabajo son adecuados para la identificación y cuantificación de los niveles relativos de glicoformas individuales en un anticuerpo a nivel de péptido usando detección UV acoplada con detección MS en línea (ver, por ejemplo, las Figuras 4 y 22).

Los métodos divulgados en la presente incluyen la purificación y/o separación y/o análisis de glicopéptidos, por ejemplo, glicopéptidos obtenidos de un anticuerpo monoclonal, como un anticuerpo que ha sido digerido con una o más proteasas. Los métodos divulgados proporcionan resultados mejorados de separación y análisis y la capacidad de estudiar glicanos mientras todavía están enlazados covalentemente a sus fragmentos de anticuerpo. Este análisis a nivel de péptido de las glicoformas también proporciona el beneficio en la caracterización biofarmacéutica de que puede utilizarse una única muestra para el mapeo de péptidos en fase inversa, por ejemplo, una digestión con tripsina, y el mapeo de glicopéptidos basado en HILIC. Además, la preservación del enlace entre el glicano y el péptido/proteína facilita la detección UV y MS basada en el componente proteínico del glicopéptido, por ejemplo, eliminando la necesidad de marcar glicanos liberados.

Los métodos de la invención incluyen poner en contacto una muestra que incluye glicopéptidos con un sustrato de enriquecimiento hidrófilo en condiciones que permitan que los glicopéptidos se unan al sustrato de

enriquecimiento hidrófilo. Una vez cargada la muestra en el sustrato de enriquecimiento hidrófilo, puede pasarse una serie de soluciones de lavado y elución adaptadas sobre el sustrato de enriquecimiento hidrófilo para separar los contaminantes de los glicopéptidos y, a continuación, recoger los glicopéptidos para su análisis adicional. En los métodos de la invención, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se lava para eliminar los contaminantes que no son glicopéptidos de la muestra. Por tanto, en un grado significativo los glicopéptidos se enriquecen en el sustrato de enriquecimiento hidrófilo, como en la superficie cromatográfica del sustrato de enriquecimiento hidrófilo. En ciertas realizaciones, un sustrato de enriquecimiento hidrófilo comprende un material sorbente aminopropílico a base de sílice. En ciertas realizaciones, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo está configurado para la extracción en fase sólida (SPE).

Los dispositivos diseñados para SPE incluyen típicamente un sorbente cromatográfico (por ejemplo, un sustrato de enriquecimiento hidrófilo, como un sorbente aminopropílico a base de sílice) que permite al usuario retener preferentemente los componentes objetivo, en este caso los glicopéptidos. Los dispositivos de SPE incluyen típicamente un depósito de contención de muestras, un medio para contener el sorbente y un conducto de fluidos, o boquilla, para dirigir los fluidos que salen del dispositivo a recipientes de recogida adecuados. El dispositivo de SPE puede tener un formato de un solo pocillo, que es conveniente y rentable para preparar un número pequeño de muestras, o un formato de varios pocillos, que es adecuado para preparar un gran número de muestras en paralelo. Los formatos de múltiples pocillos se usan comúnmente con sistemas robotizados de dispensación de fluidos. Los formatos de múltiples pocillos típicos incluyen los formatos de placa estándar de 48, 96 y 384 pocillos. Habitualmente, los fluidos se fuerzan a través del dispositivo de SPE y hacia los recipientes de recogida, ya sea haciendo vacío a través del dispositivo con un colector de vacío especialmente diseñado, o usando la fuerza centrífuga o gravitatoria. La fuerza centrífuga se genera colocando el dispositivo de SPE, junto con una bandeja de recogida adecuada, en una centrífuga diseñada específicamente para el propósito pretendido. Es ventajoso que un dispositivo de SPE tenga una gran capacidad para retener compuestos diana de una amplia variedad de polaridades cromatográficas, que sea capaz de mantener la retención del compuesto diana a medida que los contaminantes de la muestra se lavan hasta desecharse, y que proporcione la capacidad de eluir los compuestos diana en un volumen de elución tan pequeño como sea posible, maximizando de este modo el grado de concentración del compuesto diana obtenido durante la SPE.

De acuerdo con los métodos divulgados puede usarse una variedad de dispositivos de extracción en fase sólida. En una realización, el dispositivo SPE se selecciona del grupo que consiste en microplacas de elución, columnas cromatográficas, placas de capa fina, dispositivos de limpieza de muestras, cartuchos de inyección, placas de microtitulación y dispositivos preparatorios cromatográficos.

Los materiales sorbentes aminopropílicos a base de sílice, incluyendo los materiales de SPE, son conocidos en la técnica y pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo de Waters Corporation, como en forma de una placa de HILIC SPE GlycoWorks (consultar, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.723.236, 7.052.611 y 7.192.525). En algunas realizaciones, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se prepara para la adición de la muestra mediante lavado, por ejemplo, un paso de prelavado. En algunas realizaciones, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se lava antes del contacto con la muestra de glicopéptido. En algunas realizaciones, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se lava con agua (H₂O) y/o una solución de ACN (por ejemplo, ACN en agua), como una solución de ACN de aproximadamente un 60% a aproximadamente un 95% en volumen, por ejemplo, una solución de ACN de aproximadamente un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% en volumen, con el resto de agua.

En los métodos de la invención, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se pone en contacto con una muestra que contiene glicopéptido para su enriquecimiento. Con respecto a la solución de muestra, incluirá los glicopéptidos disueltos en un solvente en el que sean solubles los glicopéptidos, y en el que los glicopéptidos se unirán al sustrato de enriquecimiento hidrófilo. Preferiblemente, la unión es fuerte, dando como resultado la unión de una parte sustancial de los glicopéptidos. En algunos casos, se unirán sustancialmente todos los glicopéptidos. En varias realizaciones, el solvente es una solución acuosa, que típicamente contiene un tampón, sal y/o surfactantes para solubilizar y estabilizar los glicopéptidos. En algunas realizaciones, la muestra de glicopéptidos es una solución de aproximadamente un 60% de ACN a un 90% de ACN y de un 10% a aproximadamente un 40% de agua con de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 0,5% de TFA por volumen, como aproximadamente 80:20 ACN:Agua (v/v) con un 0,2% de TFA. Puede usarse un pH bajo para mantener la solubilidad del péptido en el solvente altamente orgánico, por ejemplo una solución con un pH por debajo de aproximadamente 6,5, como por debajo de aproximadamente 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 o 3,0.

Luego, se lava el sustrato de enriquecimiento hidrófilo para eliminar contaminantes, como péptidos no glicosilados que no se unen significativamente al sustrato de enriquecimiento hidrófilo. Tales contaminantes pueden desecharse. En algunas realizaciones, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se lava con una solución de ácido y acetonitrilo (ACN) en agua (H₂O), como una solución de ácido fórmico y/o ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo (ACN) en agua (H₂O). En ciertas realizaciones, la solución de ácido fórmico y ACN en agua incluye de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 5% de ácido fórmico en volumen y de aproximadamente un 85% a aproximadamente un 95% de ACN en volumen con el resto de agua, por ejemplo aproximadamente un 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% o 5,0% de ácido fórmico en volumen y aproximadamente un 80%, 85%,

90% o 95% de ACN en volumen. En ciertas realizaciones, la solución de TFA y ACN en agua incluye de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 5% de TFA en volumen y de aproximadamente un 85% a aproximadamente un 95% de ACN en volumen con el resto de agua, por ejemplo aproximadamente un 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, o 5,0% de TFA en volumen y aproximadamente un 80%, 85%, 90%, o 95% de ACN en volumen. En cierto ejemplo, la solución de lavado es una solución de ácido fórmico al 1%, H₂O al 9% y ACN al 90% en volumen. En cierto ejemplo, la solución de lavado es una solución de TFA al 1%, H₂O al 9% y ACN al 90% en volumen.

Una vez que se hayan eliminado los contaminantes, el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se pone en contacto con una solución de elución para eluir los glicopéptidos del sustrato de enriquecimiento hidrófilo. El sorbente aminopropílico a base de sílice posee una superficie débilmente básica y potencial para el intercambio aniónico. Sin embargo, la recuperación relativa y total de glicopéptidos a partir de un sorbente aminopropílico a base de sílice podría ser particularmente sensible a las condiciones de elución. Una recuperación sesgada, o especiación, puede ser problemática para un procedimiento de preparación de muestras. Además de no proporcionar una representación precisa de las especies presentes en la muestra, puede ser indicativa de un método que no es robusto y de que los perfiles de abundancia relativa obtenidos pueden no estar determinados de manera reproducible, en particular con respecto a las especies pobremente recuperadas. Por ejemplo, para la recuperación de glicanos derivatizados, en oposición a los glicopéptidos objeto de esta divulgación, se recomienda que se use acetato de amonio en ACN como solución de elución. Sin embargo, en el caso de los glicopéptidos, el acetato de amonio en ACN no da un buen resultado. Por tanto, los glicopéptidos se eluyen del sorbente aminopropílico a base de sílice con una solución de formiato de amonio y ACN en agua. En algunas realizaciones, la solución de formiato de amonio y ACN en agua incluye aproximadamente 100-400 mM de formiato de amonio y de aproximadamente un 2,5 a aproximadamente un 10% de ACN, como por ejemplo, aproximadamente 100 mM de formiato de amonio, aproximadamente 150 mM de formiato de amonio, aproximadamente 200 mM de formiato de amonio, aproximadamente 250 mM de formiato de amonio, aproximadamente 300 mM de formiato de amonio, aproximadamente 350 mM de formiato de amonio, o aproximadamente 400 mM de formiato de amonio y aproximadamente un 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5%, o 10,0%, de ACN. En un ejemplo específico, la solución de formiato de amonio y ACN en agua incluye aproximadamente 200 mM de formiato de amonio y aproximadamente un 5% de ACN.

Una vez se han eluido los glicopéptidos del sustrato de enriquecimiento hidrófilo, la muestra de glicopéptidos enriquecida resultante se somete a separación adicional como se indica en los métodos reivindicados y puede someterse a análisis adicional, por ejemplo cromatografía y/o análisis de espectrometría de masas. En los métodos de la invención, la muestra de glicopéptidos enriquecida se aplica a una columna de separación y posteriormente se eluye de la columna de separación, por ejemplo usando un gradiente de fase móvil para resolver las especies individuales de glicopéptidos.

En algunas realizaciones, se realizan gradientes de solvente, eluciones escalonadas y/o elución multidimensional para eluir y/o separar los glicopéptidos de la columna de separación. El uso de gradientes es bien conocido en la técnica de la cromatografía. El principio básico implica adsorber un analito en la columna de separación y luego eluir con un gradiente de solvente de desorción. El gradiente se refiere al cambio de por lo menos una característica del solvente, por ejemplo, el cambio en el pH, la fuerza iónica, la polaridad o la concentración de algún agente que influya en la fuerza de la interacción de unión.

Los gradientes usados pueden ser graduales o pueden añadirse al mismo ritmo. En una realización, se emplean dos o más bolos de solvente de desorción que varían en una o más dimensiones. Por ejemplo, los dos o más bolos pueden variar en pH, fuerza iónica, hidrofobicidad o similares. Puede seleccionarse una solución de lavado, si se usa, de tal manera que elimine los contaminantes no deseados con una pérdida o daño mínimo para los glicopéptidos unidos. Las propiedades de la solución de lavado pueden ser intermedias entre las de las soluciones de muestra y de desorción. Los solventes, por ejemplo en un gradiente de elución, se eligen para que sean compatibles con los glicopéptidos y el método de detección final. Generalmente, los solventes usados son solventes convencionales conocidos. En varias realizaciones, los solventes entre los que puede seleccionarse un solvente adecuado incluyen hidróxido de amonio, trietilamina, fosfato diamónico, cloruro de metileno, acetonitrilo (con o sin pequeñas cantidades de modificadores básicos o ácidos), metanol (que contiene una mayor cantidad de modificador, por ejemplo, ácido acético o trietilamina, o mezclas de agua con metanol o acetonitrilo), acetato de etilo, cloroformo, hexano, isopropanol, acetona, tampón alcalino, tampón de alta fuerza iónica, tampón ácido, ácidos fuertes, bases fuertes, mezclas orgánicas con ácidos/bases, metanol ácido o básico, tetrahidrofurano y agua.

Puede usarse cromatografía líquida, incluyendo HPLC, para analizar estructuras, como los glicopéptidos. Para estudiar estas estructuras pueden usarse varias formas de cromatografía líquida, como la cromatografía de intercambio aniónico, la HPLC de fase inversa, la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento y la cromatografía de fase normal (NP), incluyendo la NP-HPLC (consultar, por ejemplo, Alpert et al., J. Chromatogr. A 676:191-202 (1994)). La cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) es una variante de la NP-HPLC que puede realizarse con fases móviles parcialmente acuosas, lo que permite la separación en fase normal de péptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y muchas proteínas. El orden de elución de la

HILIC es de menos polar a más polar, al contrario que en la HPLC de fase inversa. La HPLC puede realizarse, por ejemplo, en un sistema HPLC de Waters (por ejemplo, el sistema Waters 2695 Alliance HPLC), Agilent, Perkin Elmer, Gilson, etc.

La NP-HPLC, preferiblemente la HILIC, es una forma particularmente útil de HPLC que puede usarse en los métodos descritos en la presente. La NP-HPLC separa los analitos basándose en interacciones polares entre los analitos y la fase estacionaria (por ejemplo, el sustrato). El analito polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria polar. La fuerza de adsorción aumenta con el incremento de la polaridad del analito, y la interacción entre el analito polar y la fase estacionaria polar (en relación con la fase móvil) aumenta el tiempo de elución. El uso de solventes más polares en la fase móvil disminuirá el tiempo de retención de los analitos, mientras que los solventes más hidrófobos tienden a aumentar los tiempos de retención.

Con la NP-HPLC pueden usarse varios tipos de sustratos, por ejemplo, para cromatografía en columna, incluyendo sustratos de sílice, amino, amida, celulosa, ciclodextrina y poliestireno. Ejemplos de sustratos útiles, por ejemplo, que pueden usarse en cromatografía en columna, incluyen: poliSulfoetil Aspartamida (por ejemplo, de PolyLC), un sustrato de sulfobetaína, por ejemplo, ZIC®-HILIC (por ejemplo, de SeQuant), POROS® HS (por ejemplo, de Applied Biosystems), POROS® S (por ejemplo, de Applied Biosystems), PoliHidroetil Aspartamida (por ejemplo, de PolyLC), Zorbax 300 SCX (por ejemplo, de Agilent), PolyGLYCOPLEX® (por ejemplo, de PolyLC), Amida-80 (por ejemplo, de Tosohas), TSK GEL® Amida-80 (por ejemplo, de Tosohas), Polihidroxietilo A (por ejemplo, de PolyLC), Glico-Sep-N (por ejemplo, de Oxford GlycoSciences) y Atlantis HILIC (por ejemplo, de Waters). Las columnas que pueden usarse en los métodos divulgados incluyen columnas que utilizan uno o más de los siguientes grupos funcionales: grupos carbamilo, grupos sulfopropilo, grupos sulfoetilo (por ejemplo, poli (2-sulfoetilo aspartamida)), grupos hidroxietilo (por ejemplo, poli (2-hidroxietilo aspartamida)) y grupos de ácido sulfónico aromático.

La fase móvil usada puede incluir tampones con y sin agentes de emparejamiento iónico, por ejemplo, acetonitrilo y agua. Los agentes de emparejamiento iónico incluyen formiato, acetato, TFA y sales. Pueden usarse gradientes de los tampones, por ejemplo, si se usan dos tampones, la concentración o porcentaje del primer tampón puede disminuir mientras que la concentración o porcentaje del segundo tampón aumenta durante el transcurso de la cromatografía. Por ejemplo, el porcentaje del primer tampón puede disminuir de aproximadamente un 100%, aproximadamente un 99%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 75%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 65%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 45% o de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 0%, aproximadamente un 1%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 25%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 35% o aproximadamente un 40% en el transcurso de la cromatografía. Como otro ejemplo, el porcentaje del segundo tampón puede aumentar de aproximadamente un 0%, aproximadamente un 1%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 25%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 35% o aproximadamente un 40% a aproximadamente un 100%, aproximadamente un 99%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 75%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 65%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 45% o aproximadamente un 40% en el transcurso de la misma serie. Opcionalmente, la concentración o el porcentaje del primer y el segundo tampón pueden volver a sus valores iniciales al final de la serie cromatográfica. A modo de ejemplo, el porcentaje del primer tampón puede cambiar en cinco pasos del 85% al 63% al 59% al 10% al 85%; mientras que el porcentaje del segundo tampón en los mismos pasos cambia del 15% al 37% al 41% al 90% al 15%. Los porcentajes pueden cambiar gradualmente como un gradiente lineal o de manera no lineal (por ejemplo, escalonada). Por ejemplo, el gradiente puede ser multifásico, por ejemplo, bifásico, trifásico, etc. En realizaciones preferidas, los métodos descritos en la presente usan un gradiente de tampón de acetonitrilo decreciente que corresponde a una polaridad creciente de la fase móvil sin el uso de agentes de emparejamiento iónico.

La temperatura de la columna puede mantenerse a una temperatura constante durante toda la serie de cromatografía, por ejemplo, usando un calentador de columna comercial. En algunas realizaciones, la columna se mantiene a una temperatura entre aproximadamente 18° C y aproximadamente 70° C, por ejemplo, entre aproximadamente 30° C y aproximadamente 60° C, entre aproximadamente 40° C y aproximadamente 50° C, por ejemplo, a aproximadamente 20° C, aproximadamente 25° C, aproximadamente 30° C, aproximadamente 35° C, aproximadamente 40° C, aproximadamente 45° C, aproximadamente 50° C, aproximadamente 55° C, aproximadamente 60° C, aproximadamente 65° C o aproximadamente 70° C. Una temperatura preferida es de aproximadamente 45° C.

El caudal de la fase móvil puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 100 ml/min. Para las propuestas analíticas, los caudales varían típicamente de 0 a 10 ml/min; para la HPLC preparativa, pueden usarse caudales superiores a 100 ml/min. Por ejemplo, el caudal puede ser de aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5 o aproximadamente 5 ml/min. La sustitución por una columna que tenga el mismo empaquetamiento, la misma longitud, pero un diámetro más pequeño requiere una reducción del caudal para

conservar el mismo tiempo de retención y resolución de los picos que los observados en una columna de diámetro más ancho. Preferiblemente, se usa un caudal equivalente a aproximadamente 1 ml/min en una columna de 4,6x100 mm y 5 µm.

5 El tiempo de ejecución puede ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 240 minutos, por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 minutos, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos, de aproximadamente 40 a aproximadamente 90 minutos, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 minutos, de aproximadamente 60 a aproximadamente 120 minutos, de aproximadamente 50 a aproximadamente 80 minutos.

10 La NP-HPLC puede ajustarse para ser realizada a nanoescala, por ejemplo, usando columnas con un diámetro interior de aproximadamente 75 µm (consultar, por ejemplo, Wuhrer et al., Anal. Chem. 76:833-838 (2004); Wuhrer et al., Internat. J. Mass. Spec. 232:51-57 (2004)).

15 En ciertas realizaciones, la columna de separación es una columna de separación de interacción hidrófila (HILIC) y los glicopéptidos se eluyen posteriormente de la columna de separación HILIC, por ejemplo usando un gradiente de fase móvil para resolver las especies individuales de glicopéptidos, purificando y/o separando de este modo los glicopéptidos de la muestra. En ciertos ejemplos, los glicopéptidos eluidos de la HILIC se separan en una o más fracciones. Tales fracciones pueden usarse para análisis posteriores, como el análisis MS. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen identificar los glicopéptidos y/o glicanos presentes en una o más de las fracciones.

20 En ciertas realizaciones, el glicano es un N-glicano. En ciertas realizaciones, el gradiente de la fase móvil es de 10 mM de formiato de amonio, pH 4,5 a 90% de ACN con 10 mM de formiato de amonio, pH 4,5. En ciertas realizaciones, el gradiente de fase móvil es del 0,1% de TFA en H₂O para que sea del 0,1% de TFA en ACN.

25 El glicopéptido se obtiene de una proteína glicosilada, como un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal glicosilado puede prepararse por reducción, digestión enzimática, desnaturalización, fragmentación, escisión química y una combinación de las mismas. Los métodos divulgados en la presente son aplicables a cualquier isotipo de anticuerpo, como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, o de isotipo mixto.

30 La reducción es para reducir los enlaces disulfuro en dos tioles en una proteína tridimensional, como un anticuerpo monoclonal. La reducción puede realizarse mediante desnaturalización por calor, añadiendo un tensioactivo o añadiendo un agente desnaturalizante, por ejemplo, HCl de guanidina (6M), en presencia de un agente reductor, por ejemplo, TCEP-HCl. La degradación enzimática es una digestión de la proteína con una proteasa, por ejemplo, tripsina o proteasa L de *Achromobacter* (Lys-C). Además, la glicoproteína puede desnaturalizarse mediante calor o productos químicos, o una combinación de los mismos. La fragmentación implica escindir porciones de proteínas de una proteína de una única de múltiples subunidades de proteína, como un anticuerpo monoclonal, con métodos físicos, biológicos o químicos. Por ejemplo, para la fragmentación de subunidades de anticuerpos se usa comúnmente una enzima degradadora de inmunoglobulinas de *S. pyogenes* (IdeS).

40 En varias realizaciones, un anticuerpo en una muestra puede tratarse y prepararse por reducción, degradación enzimática, desnaturalización o fragmentación antes de entrar en contacto con el sustrato de enriquecimiento hidrófilo. Los métodos proporcionan un método cromatográfico novedoso para caracterizar la glicosilación de proteínas, por ejemplo, agentes terapéuticos de anticuerpos monoclonales (mAb), mediante análisis HILIC-UV-MS a nivel de fragmentos y péptidos. En ciertas realizaciones, las muestras en cualquier paso intermedio pueden estar concentradas, desaladas o similares.

45 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la detección del glicopéptido, por ejemplo usando la señal UV de la porción peptídica del glicopéptido. Esto puede hacerse para fracciones de una muestra y permite la selección de fracciones específicas para análisis posteriores, por ejemplo, análisis de espectrometría de masas (MS). Por tanto, en realizaciones adicionales, el paso de detección comprende la espectroscopia de masas o la cromatografía líquida-espectroscopia de masas (LC-MS). En la aplicación de la espectrometría de masas para el análisis de biomoléculas, las moléculas se transfieren de las fases líquida o sólida a la fase gaseosa y a la fase de vacío. Como muchas biomoléculas son a la vez grandes y frágiles (las proteínas son un ejemplo claro), dos de los métodos más eficaces para su transferencia a la fase de vacío son la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) o la ionización por electropulverización (ESI). Los expertos en la técnica conocen los aspectos del uso de estos métodos y los requisitos de preparación de la muestra. En general, la ESI es más sensible, mientras que la MALDI es más rápida. Significativamente, algunos péptidos se ionizan mejor en el modo MALDI que en el ESI, y viceversa (Genome Technology, junio 220, pág. 52). Los métodos y dispositivos del canal de extracción de la presente invención son particularmente adecuados para preparar muestras para el análisis por MS, especialmente muestras de biomoléculas como los glicopéptidos. Una ventaja importante de la invención es que permite la preparación de una muestra enriquecida que puede analizarse directamente, sin necesidad de pasos de proceso intermedios, por ejemplo, concentración o desalación.

60 La ESI se realiza mezclando la muestra con ácido volátil y solvente orgánico e infundiéndola a través de una aguja conductora cargada con alto voltaje. Las gotitas cargadas que son pulverizadas (o expulsadas) desde el extremo de la aguja se dirigen hacia el espectrómetro de masas, y se secan mediante calor y vacío a medida que van entrando.

Después de que se hayan secado las gotas, las moléculas cargadas restantes se dirigen mediante lentes electromagnéticas hacia el detector de masas y se analizan en masa. En una realización, la muestra eluida se deposita directamente desde el capilar en una boquilla de electropulverización, por ejemplo, el capilar funciona como cargador de la muestra. En otra realización, el propio capilar funciona como dispositivo de extracción y como boquilla de electropulverización.

Para la MALDI, las moléculas de analito (por ejemplo, proteínas) se depositan sobre objetivos metálicos y se cocrystalizan con una matriz orgánica. Las muestras se secan y se insertan en el espectrómetro de masas, y típicamente se analizan mediante detección por tiempo de vuelo (TOF). En una realización, la muestra eluida se deposita directamente desde el capilar sobre el objetivo metálico, por ejemplo, el propio capilar funciona como cargador de la muestra. En una realización, el analito extraído se deposita sobre una diana de MALDI, se añade una matriz de ionización MALDI y la muestra se ioniza y analiza, por ejemplo, mediante detección TOF.

En algunas realizaciones, se usan otros modos de ionización, por ejemplo, ESI-MS, espectrometría de masas de ionización por turbopulverización, espectrometría de masas de ionización por nanopulverización, espectrometría de masas de ionización por termopulverización, espectrometría de masas de ionización por pulverización sónica, SELDI-MS y MALDI-MS. En general, una ventaja de estos métodos es que permiten purificar la muestra "justo a tiempo" e introducirla directamente en el medio de ionización. Es importante señalar que los varios modos de ionización y detección introducen sus propias limitaciones en la naturaleza de la solución de desorción usada, y es importante que la solución de desorción sea compatible con ambos. Por ejemplo, la matriz de la muestra en muchas aplicaciones debe tener una baja fuerza iónica, o residir dentro de un intervalo de pH particular, etc. En ESI, la sal en la muestra puede prevenir la detección disminuyendo la ionización u obstruyendo la boquilla. Este problema se aborda presentando el analito con poca sal y/o mediante el uso de una sal volátil. En el caso de MALDI, el analito debe estar en un solvente compatible con la formación de manchas en la diana y con la matriz de ionización empleada.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo elaborar y usar los métodos de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio, la temperatura es en grados centígrados, la temperatura ambiente es de aproximadamente 25° C, y la presión es la atmosférica o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1: Comparación de métodos anteriores basados en RPLC-UV-MS de glicopéptidos y glicano liberado.

La Figura 1 es un diagrama esquemático de flujo de trabajo que ilustra los métodos actuales de cuantificación de glicopéptidos. El anticuerpo terapéutico se digirió con tripsina después de ser desnaturalizado, reducido y alquilado. La cuantificación relativa se realizó mediante intensidad del pico (altura) de los picos de masa del glicopéptido. El método del glicano liberado cuantifica las glicoformas por la fluorescencia del marcador unido al glicano liberado, no por la señal de MS. La Figura 2 es una tabla que muestra una comparación de la cuantificación relativa de cada glicoforma cuantificada por glicanos liberados (marcados con un reactivo fluorescente, RapiFluor-MS de Waters) y glicopéptidos. Las principales diferencias en las cuantificaciones entre métodos se muestran en las filas 3, 5, 7 y 8. La Figura 3 es un espectro de masas que demuestra que las discrepancias entre las cuantificaciones de glicoformas por métodos de glicopéptidos y de glicanos liberados se deben probablemente a la fragmentación en la fuente de la estructura principal del azúcar por MS en el análisis de glicopéptidos, lo que provoca un aumento de los artefactos de glicanos truncados (es decir, G0F-GlcNAc y G1F-GlcNAc) y una disminución del glicano principal (es decir, G0F y G1F). Este resultado demuestra que se necesitan métodos nuevos y mejorados para el análisis de glicanos a nivel de péptidos.

Ejemplo 2: Nuevos métodos de análisis de glicopéptidos usando HILIC-UV-MS.

Los péptidos de los anticuerpos terapéuticos se prepararon mediante métodos de mapeo peptídico reducido o no reducido realizados de manera rutinaria. A continuación, los digeridos se diluyeron al 80% de ACN final (v/v) antes del análisis HILIC-UV-MS.

Sistema LC: Sistema ACQUITY I-Class UPLC® de Waters con detector PDA (UV)

Sistema MS: Waters XEVO G2-S QToF o Thermo Scientific Q Exactive Plus

Columna: Columna Waters ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide HILIC

La Figura 5 es un conjunto de cromatogramas HILIC-UV de péptidos mAb1 que muestran los resultados de una separación de péptidos mAb1 obtenidos de la digestión triptica mediante dos métodos diferentes. El método N°1 usa formiato de amonio mientras que el método N°2 usa TFA. Los niveles relativos de las diferentes glicoformas se cuantificaron mediante UV usando el detector PDA con detección MS en línea. La Figura 6 es un primer plano de la

porción de glicopéptido de la traza mostrada en la Figura 5 que demuestra que el método N°2 tenía mejor separación, picos más nítidos y mayor relación S/N. La Figura 7 es un conjunto de cromatogramas HILIC-TIC de glicopéptidos mAb1 con zoom en la porción de glicopéptido. Como se muestra, el método N°2 tuvo una mayor relación S/N de la señal MS. Las Figuras 8A y 8B son espectros MS1 de glicopéptidos mAb1 (iones M^{2+}). La fragmentación de los glicanos en la fuente de MS no fue un factor en la cuantificación de las glicoformas por UV. La Figura 9 es un conjunto de trazas y una tabla que muestran una comparación de la separación de glicopéptidos en una columna HILIC con el análisis de glicanos liberados. Para mAb1 se observaron cuantificaciones de glicoconformación similares mediante análisis de glicopéptidos y de glicanos liberados. Es importante destacar que no se observaron diferencias importantes en las cuantificaciones de glicoformas entre los dos métodos, lo que demuestra que la separación en columna HILIC era viable para el análisis de glicopéptidos. Además, los niveles totales de fucosilación y galactosilación fueron coherentes entre los dos análisis. Los artefactos de glicanos truncados no afectan a la cuantificación de glicopéptidos mediante HILIC-UV. Esto sugiere que los artefactos observados por el análisis RPLC previo se debieron a la fragmentación en origen de los glicanos inducida por MS.

Los digeridos diluidos pueden concentrarse con secado: Si un digerido tiene una concentración de $<0,5$ mg/ml, la muestra puede concentrarse mediante secado al vacío y volviendo a suspender los péptidos secos en 80:20 de ACN:Agua (v/v) con un 0,2% de TFA a 0,5 mg/ml o más. Para mantener la solubilidad del péptido en el solvente altamente orgánico se requiere un pH bajo. La Figura 10 es un conjunto de trazas y una tabla que demuestran que los péptidos secados ayudaron a concentrar los péptidos y es coherente usando diferentes cantidades de muestra (por ejemplo, 5-20 μ g, arriba a la izquierda), pero no afectó a la señal UV (abajo a la izquierda) ni al % de PA relativo (tabla de la derecha) de los glicanos. La Figura 11 es un conjunto de trazas que muestran los cambios realizados para simplificar las preparaciones de fase móvil y mejorar la integración de los picos. La fase móvil cambió del 0,1% de TFA en agua/ACN a los mismos tampones de fase móvil usados para el mapeo de péptidos (0,05% y 0,045% de TFA en agua y ACN, respectivamente). Las Figuras 12A, 12B, 12C y 12D son un conjunto de resultados de espectros de masas que muestran que el cambio de fase móvil no tuvo impacto sobre la señal de MS de los glicopéptidos (iones M^{2+}). La Figura 13 es un conjunto de trazas que demuestran la estabilidad en solución de los glicopéptidos mAb1 diluidos en ACN al 80%.

Identificación de glicopéptidos mal cortados: La Figura 14 es un conjunto de trazas que muestran que los digeridos con glicopéptidos mal cortados complican la cuantificación de los glicopéptidos por UV. La Figura 15 es un conjunto de trazas y una tabla que demuestra que con los datos de MS en línea puede usarse cromatografía iónica de extracción (EIC) para encontrar el porcentaje de glicopéptidos mal cortados en cada pico. Se usó la EIC de la detección MS en línea para calcular la proporción de péptidos erróneos con respecto a los glicopéptidos tripticos regulares en cada pico de coelución y para filtrar la señal UV debida a los cortes erróneos para la cuantificación de la glicoforma. Alternativamente, el digerido puede volver a digerirse con tripsina para convertir los cortes erróneos en glicopéptidos tripticos regulares.

Para la redigestión, se usó el siguiente protocolo: Aumentar el pH del digerido a ~ 8.0 con base de Tris 3 M; Añadir relación 1:5 E:S (p/p) de tripsina, incubar a 50° C durante 1 hora; y Añadir un 0,2% de TFA (final) y diluir al 80% de ACN (final) para análisis HILIC. La Figura 16 es un conjunto de trazas y una tabla que demuestran que la redigestión de mAb2 con tripsina eliminó la interferencia de glicopéptidos mal cortados para la cuantificación de glicoformas.

Los digeridos contaminados con reactivos pueden limpiarse con extracción en fase sólida y concentrarse con secado: Si un digerido tiene una concentración de $<0,5$ mg/ml, puede concentrarse secándolo al vacío y volviendo a suspender los péptidos secos en 80:20 ACN:Agua (v/v) con un 0,2% de TFA hasta 0,5 mg/ml o más. Para mantener la solubilidad del péptido en el solvente altamente orgánico se requiere un pH bajo.

El digerido puede limpiarse de sales, reactivos o detergentes mediante extracción en fase sólida (SPE) y luego secarse al vacío.

Placa de μ Elución Waters GlycoWorks HILIC (N° de pieza 186002780): Lavar con agua, luego 80:15 ACN:Agua (v/v); Añadir digerido peptídico (diluido al 80% de ACN, v/v); Lavar dos veces con 1:9:90 de Ácido Fórmico/Agua:ACN (v/v); Eluir con 200 mM Formiato de amonio, 5% de ACN; Secar al vacío los glicopéptidos eluidos; y Volver a suspender en 80:20 de ACN:Agua (v/v) con un 0,2% de TFA a 0,5 mg/ml.

La Figura 17 es un conjunto de trazas que demuestran que el formiato de amonio mejora significativamente la elución de glicopéptidos a partir de SPE HILIC.

La Figura 18 es un conjunto de trazas y una tabla que demuestran que el secado o la limpieza/secado de la SPE no afectan a la cuantificación del glicopéptido mAb1.

La Figura 19 es un conjunto de trazas y una tabla que demuestran cuantificaciones similares de la glicoforma mAb3 mediante análisis de glicopéptidos y glicanos liberados.

Las Figuras 20A y 20B son un conjunto de trazas y una tabla que demuestran cuantificaciones similares de

glicoformas usando digeridos trípticos de mAb3 reducidos y no reducidos mediante análisis de glicopéptidos y glicanos liberados.

5 La Figura 21 es un conjunto de trazas que muestra una comparación de la separación de los glicopéptidos IgG1 e IgG4, con y sin fucosilación.

10 El alcance de la presente invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en la presente. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras acompañantes. Se pretende que tales modificaciones formen parte de la invención en la medida que entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de separación de glicopéptidos, que comprende:

- 5 poner en contacto una muestra que contiene glicopéptidos con un sustrato de enriquecimiento hidrófilo en condiciones que permitan que los glicopéptidos se unan al sustrato de enriquecimiento hidrófilo;
 lavar el sustrato de enriquecimiento hidrófilo para eliminar los contaminantes que no son glicopéptidos del sustrato de enriquecimiento hidrófilo;
 10 eluir los glicopéptidos del sustrato de enriquecimiento hidrófilo con una solución de formiato de amonio y acetonitrilo (ACN) en agua para crear una muestra de glicopéptidos enriquecida;
 aplicar la muestra de glicopéptidos enriquecida a una columna de separación; y
 eluir los glicopéptidos de la columna de separación, separando de este modo los glicopéptidos de la muestra.

15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato de enriquecimiento hidrófilo comprende un sustrato de cromatografía de extracción en fase sólida (SPE).

3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde el sustrato de enriquecimiento hidrófilo comprende un material sorbente aminopropílico a base de sílice.

20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la solución de formiato de amonio y ACN en agua comprende aproximadamente 100-400 mM de formiato de amonio y de aproximadamente un 2,5% a aproximadamente un 10% de ACN en agua, o en donde la solución de formiato de amonio y ACN comprende aproximadamente 200 mM de formiato de amonio y aproximadamente un 5% de ACN en agua.

25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se lava con una solución de lavado de ácido fórmico y ACN que comprende de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 5% de ácido fórmico en volumen y de aproximadamente un 85% a aproximadamente un 95% de ACN en volumen, con el resto de agua para eliminar los contaminantes que no son glicopéptidos,
 30 o en donde el sustrato de enriquecimiento hidrófilo se lava con una solución de lavado de ácido fórmico y ACN que comprende aproximadamente un 1% de ácido fórmico, aproximadamente un 9% de H₂O y aproximadamente un 90% de ACN en volumen.

35 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la columna de separación comprende una columna de interacción hidrófila (HILIC).

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde eluir de los glicopéptidos de la columna de separación comprende además separar los glicopéptidos en una o más fracciones.

40 8. El método de la reivindicación 7, en donde separar los glicopéptidos en una o más fracciones comprende aplicar un gradiente de fase móvil a la columna de separación.

45 9. El método de la reivindicación 8, en donde el gradiente de fase móvil comprende aproximadamente 10 mM de formiato de amonio, pH 4,5 a aproximadamente un 90% de ACN con 10 mM de formiato de amonio, pH 4,5, o en donde el gradiente de fase móvil comprende aproximadamente un 0,05% de TFA en H₂O o aproximadamente un 0,045% de TFA en ACN.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además identificar los glicopéptidos presentes en una o más de las fracciones.

50 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende además identificar un glicano asociado con los glicopéptidos presentes en una o más de las fracciones.

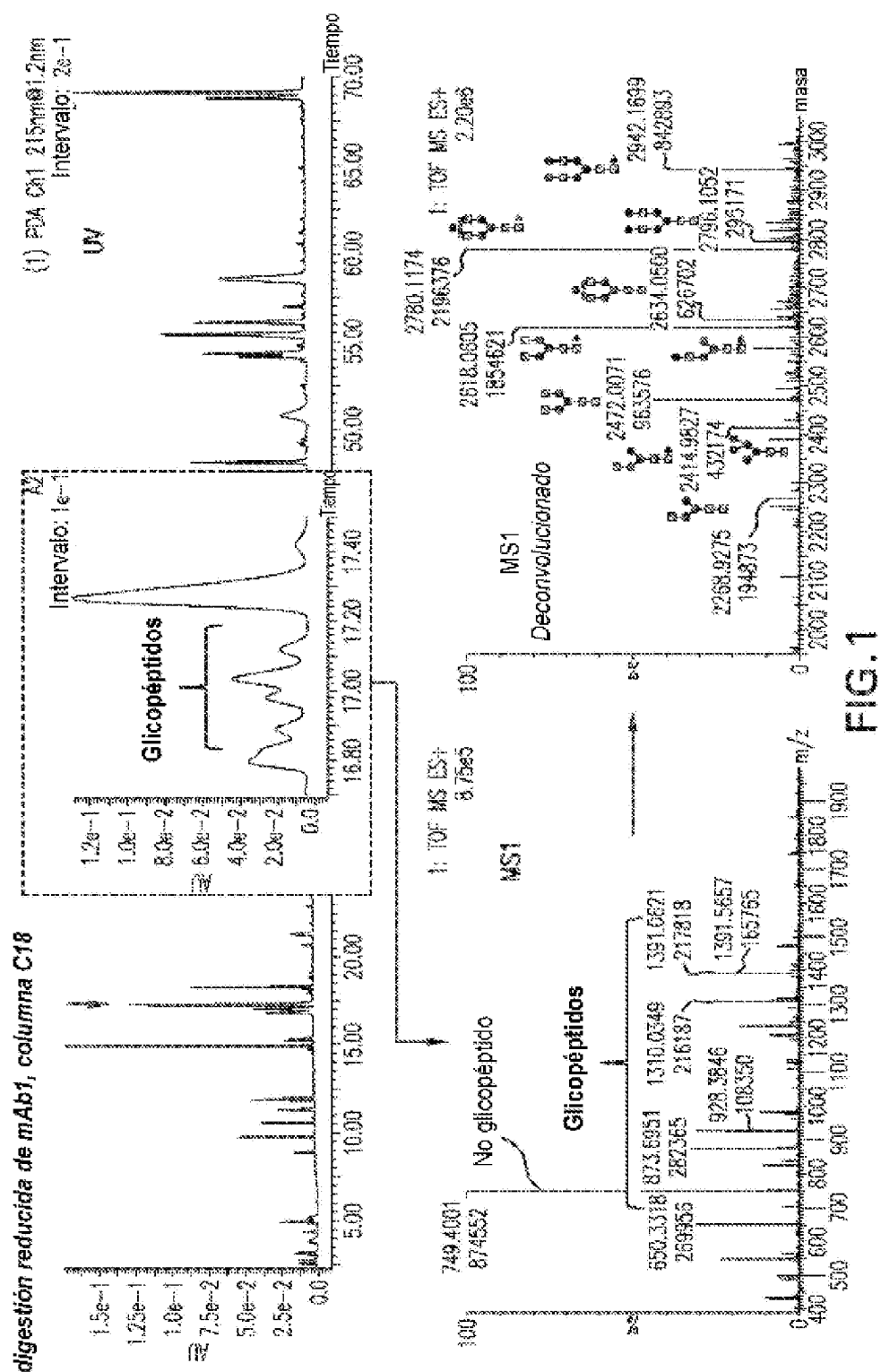
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde los glicopéptidos se obtienen a partir de un anticuerpo monoclonal.

55 13. El método de la reivindicación 12, que comprende además digerir el anticuerpo monoclonal con una proteasa, o que comprende digerir el anticuerpo monoclonal con una proteasa en donde la proteasa comprende tripsina.

60 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además realizar análisis de espectrometría de masas de los glicopéptidos eluidos.

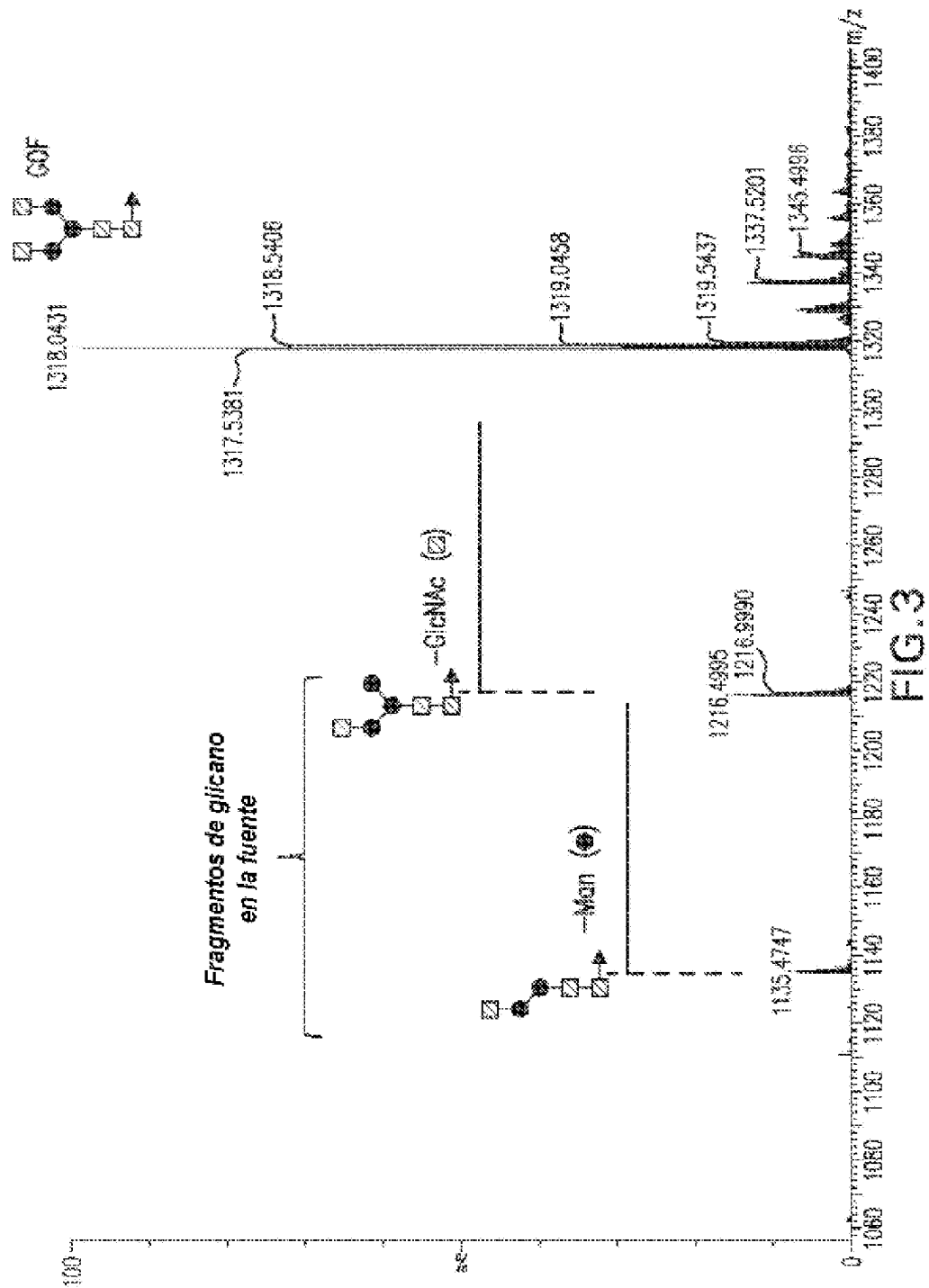
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además realizar perfiles de glicosilación a nivel de glicopéptido de los glicopéptidos eluidos.

65



Glicano	% Total de glicoformas	
	Glicopéptido	Glicano liberado
	0.51	0.10
	0.44	ND
	2.50	0.26
	2.46	1.60
	5.43	0.30
	12.25	13.09
	3.75	ND
	23.57	34.12
	7.66	2.41 (1-6)
		3.30 (1-3)
	28.12	14.01 (1-6)
		16.16 (1-3)
	2.67	1.14
	10.65	11.21

FIG.2



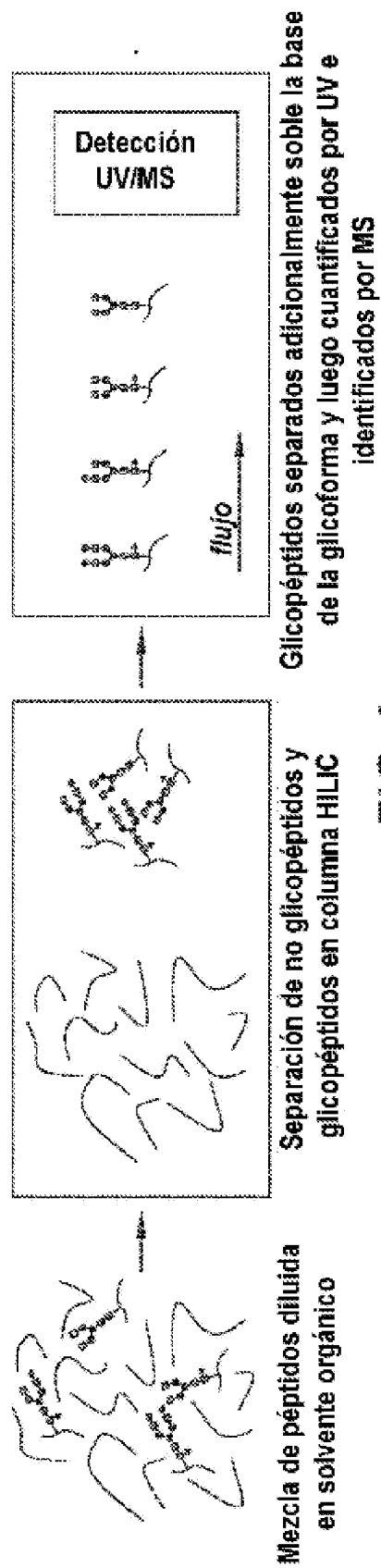


FIG.4

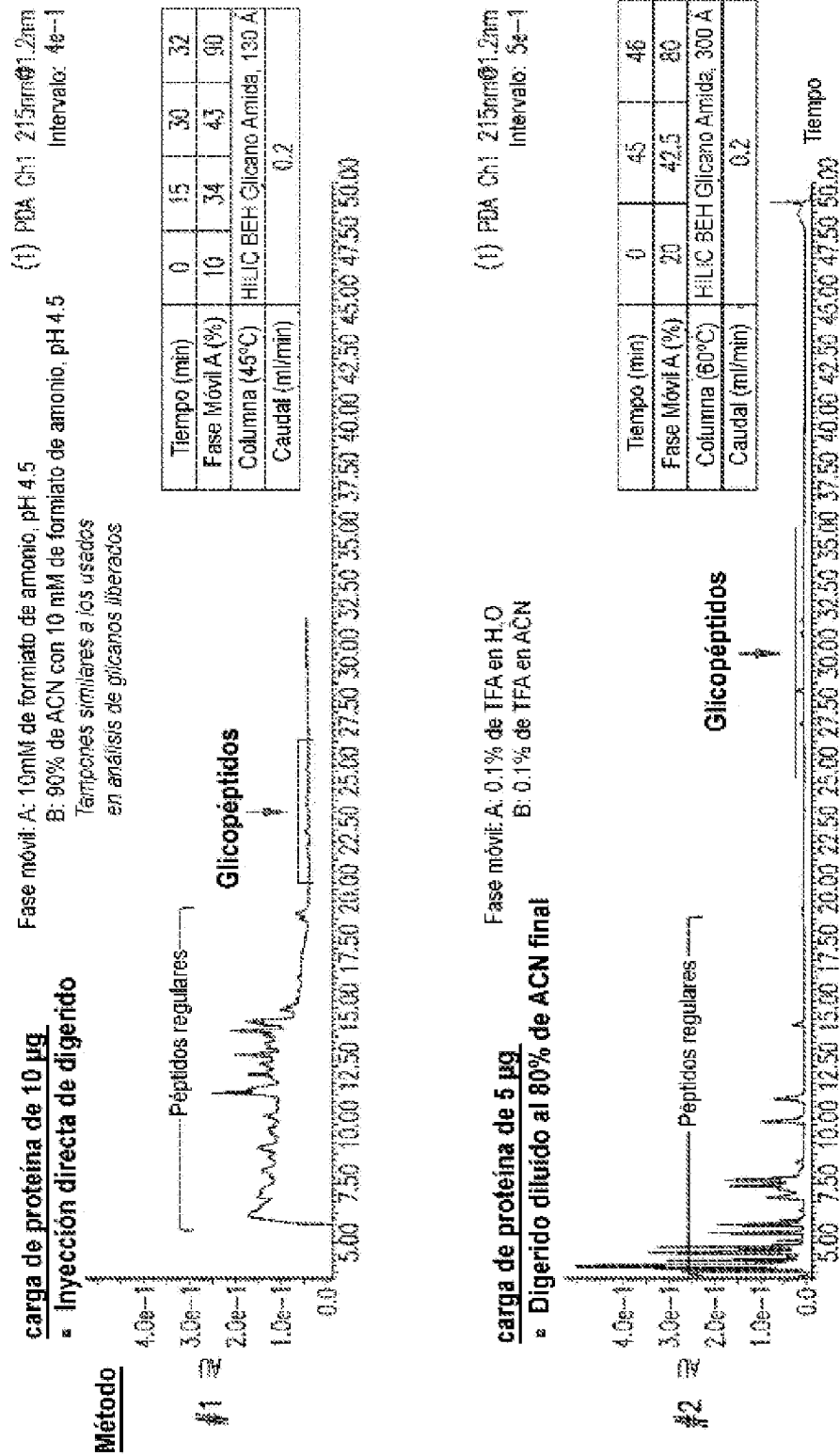


FIG.5

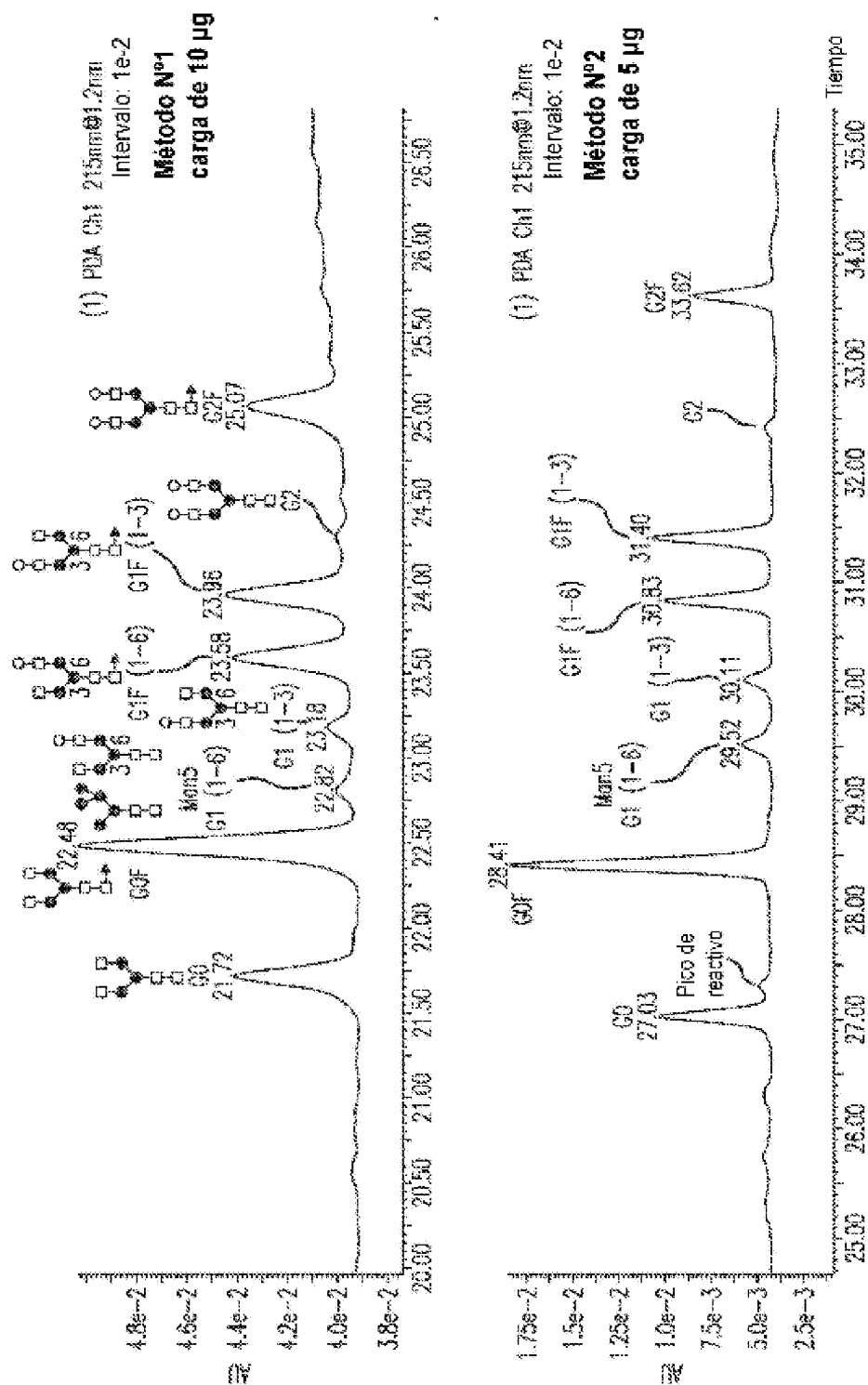


FIG.6

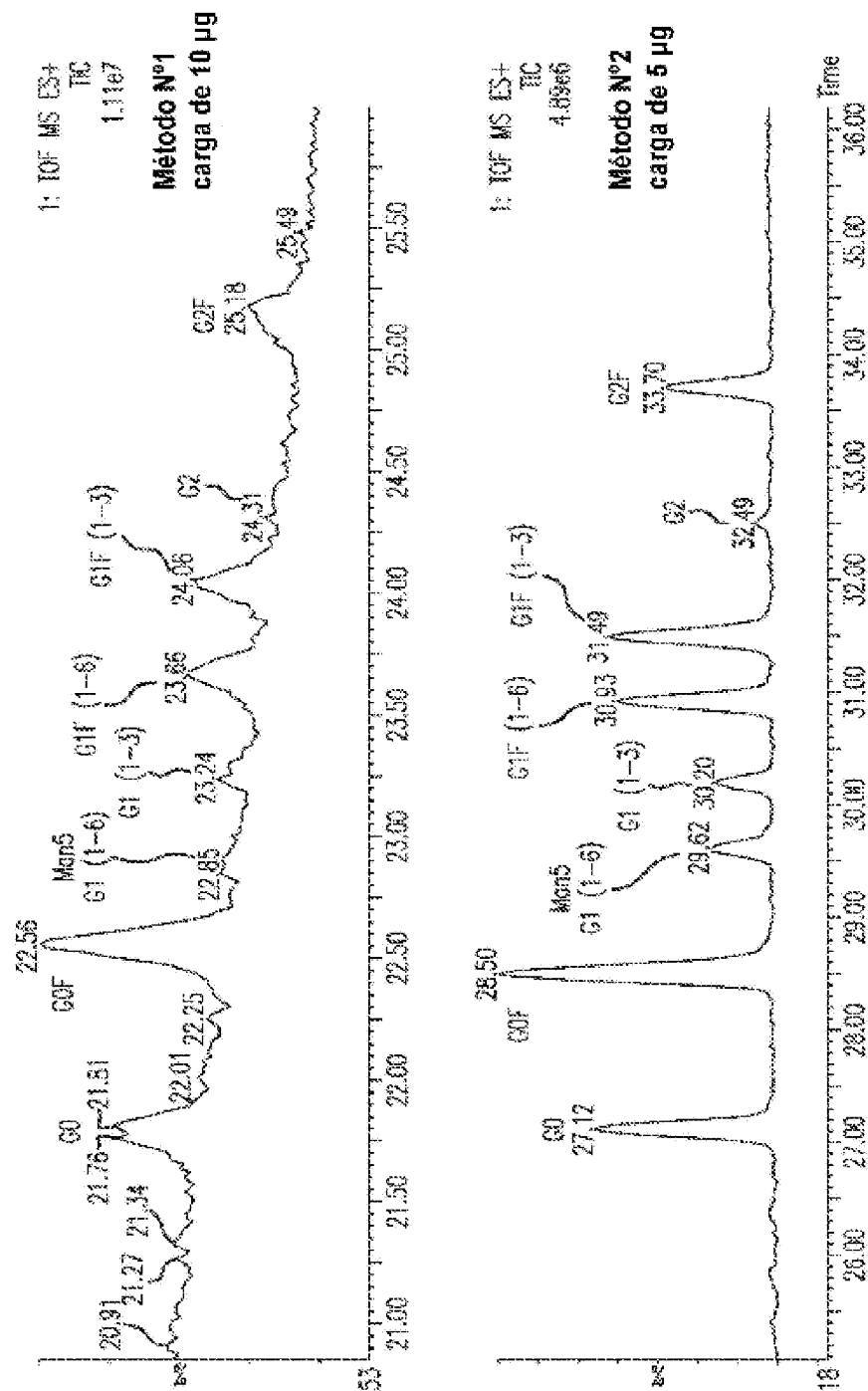
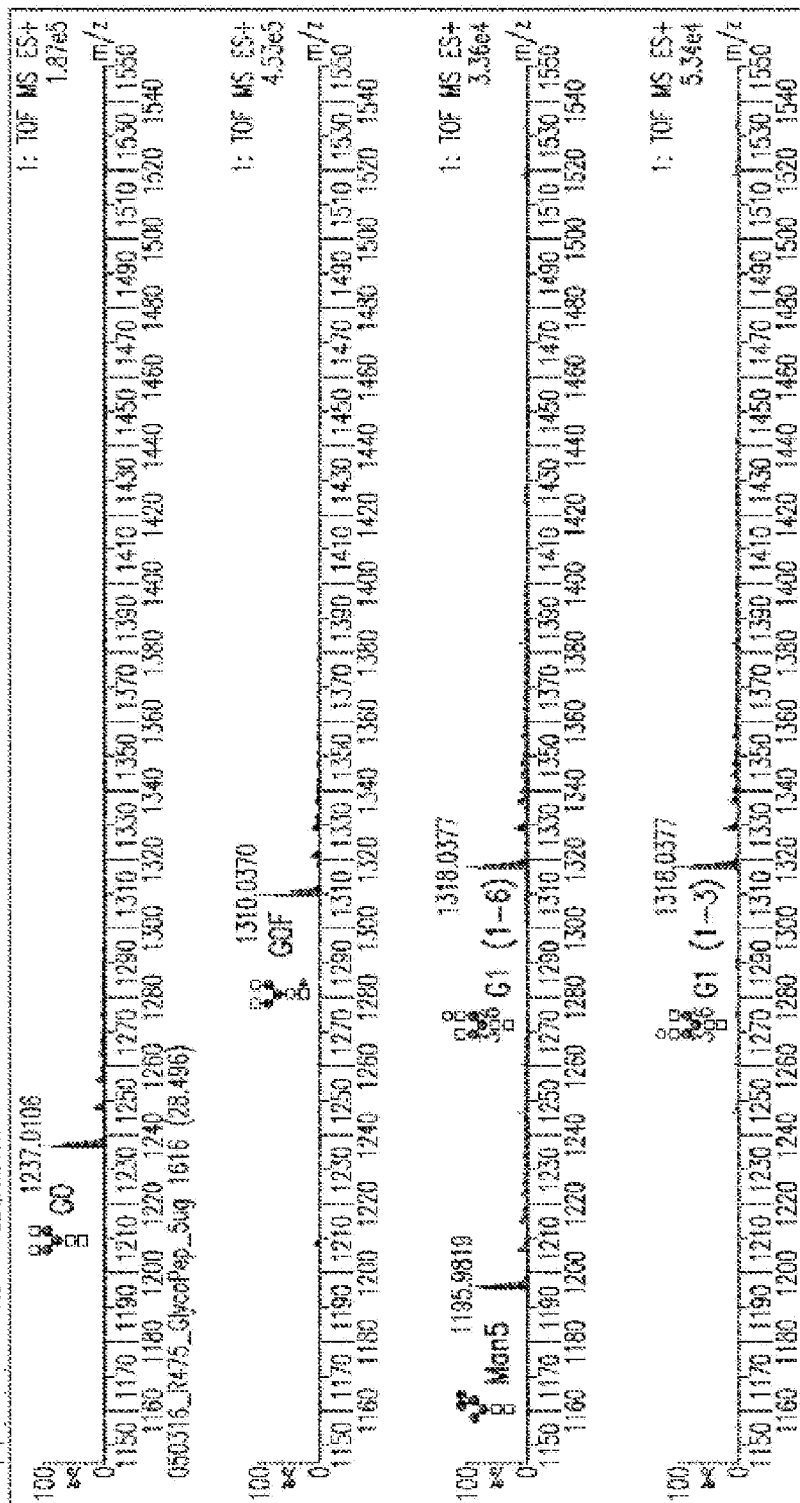


FIG.7

MS1 de glicopéptidos de mAb1 (iones M²⁺)

Método N°2

Glicopéptido de mAb1: HC 292EEQFNSTNR300

**FIG.8A**

MS1 de glicopéptidos de mAb1 (iones M^{2+})

Método N°2

Glicopéptido de mAb1: HC 292EQFNSTYR-300

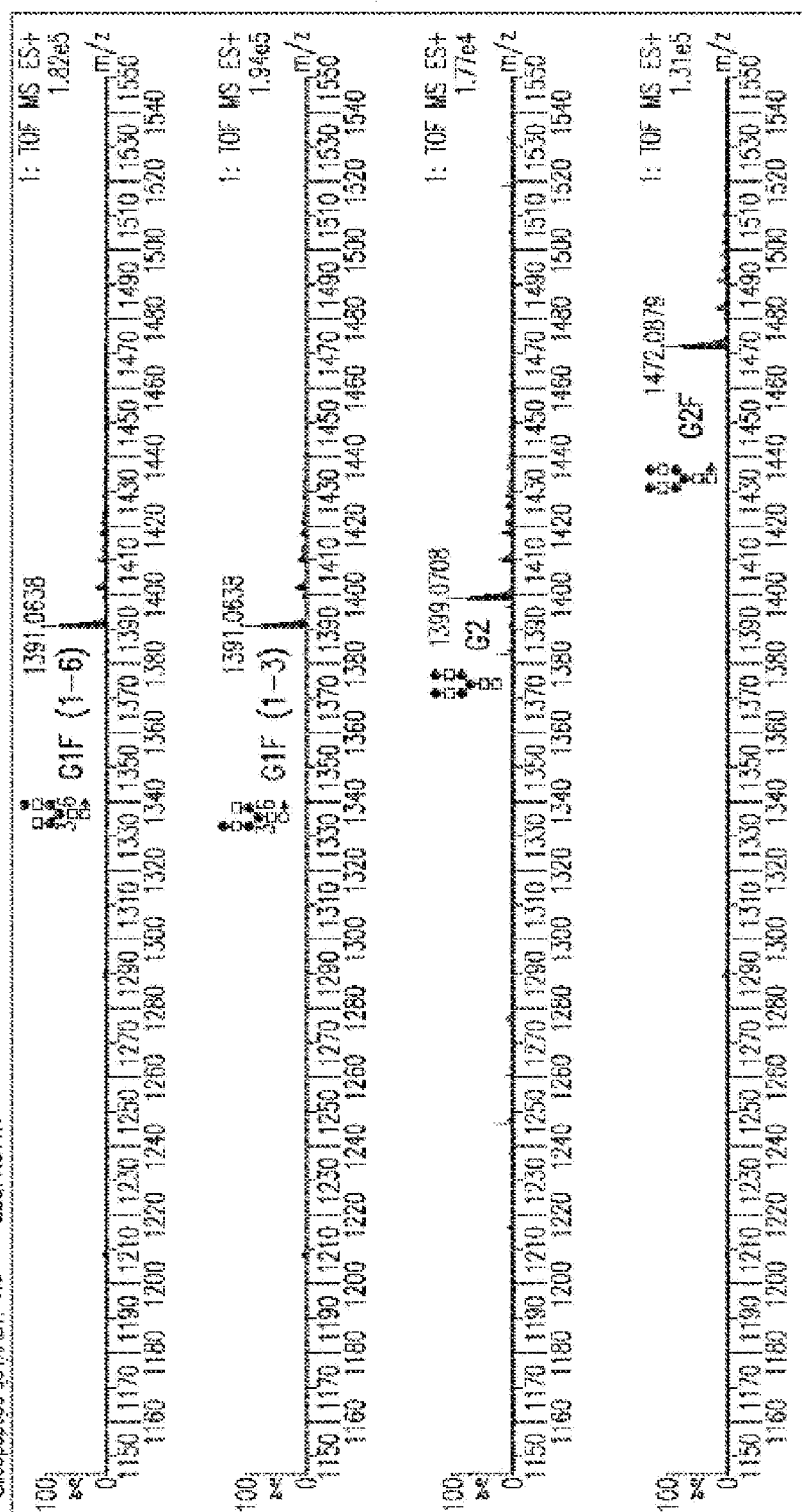


FIG.8B

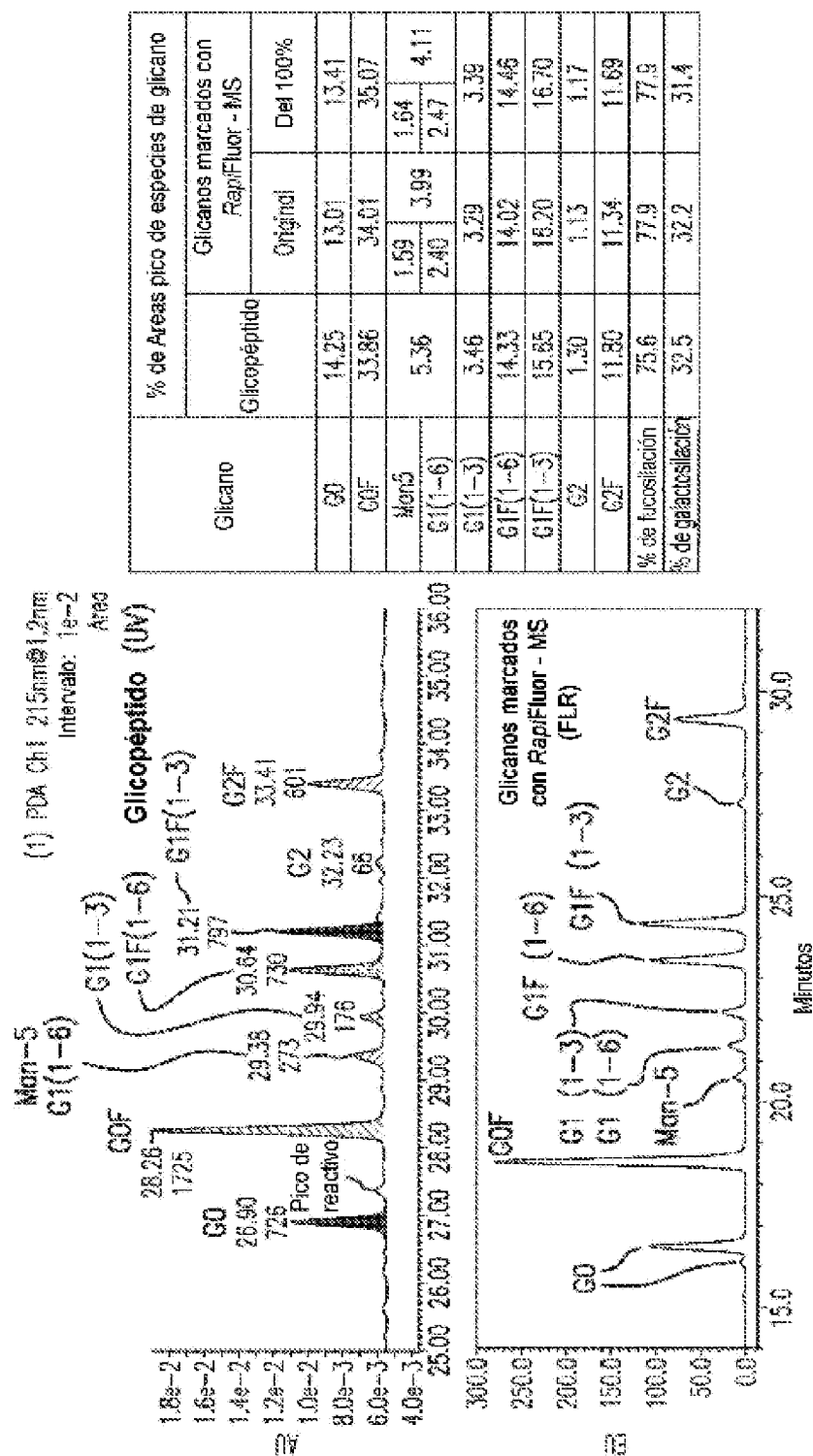


FIG.9

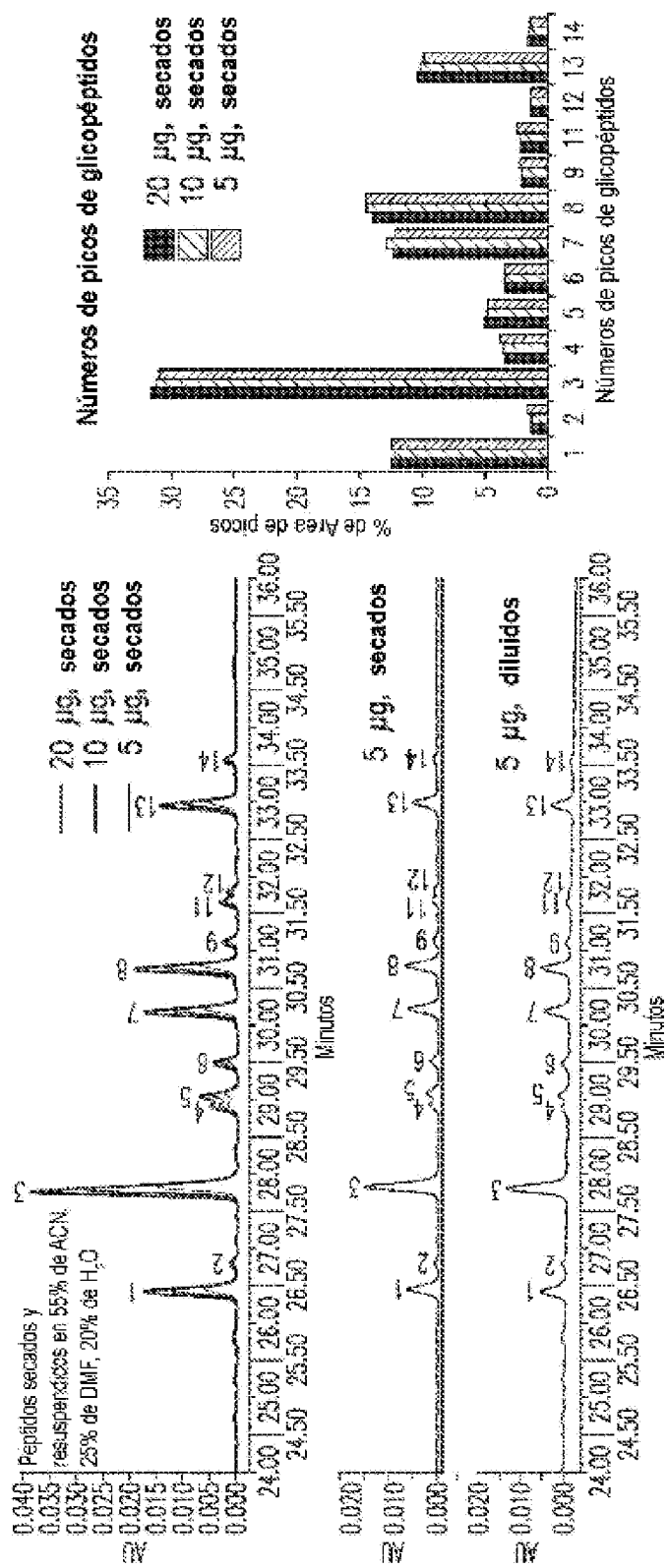
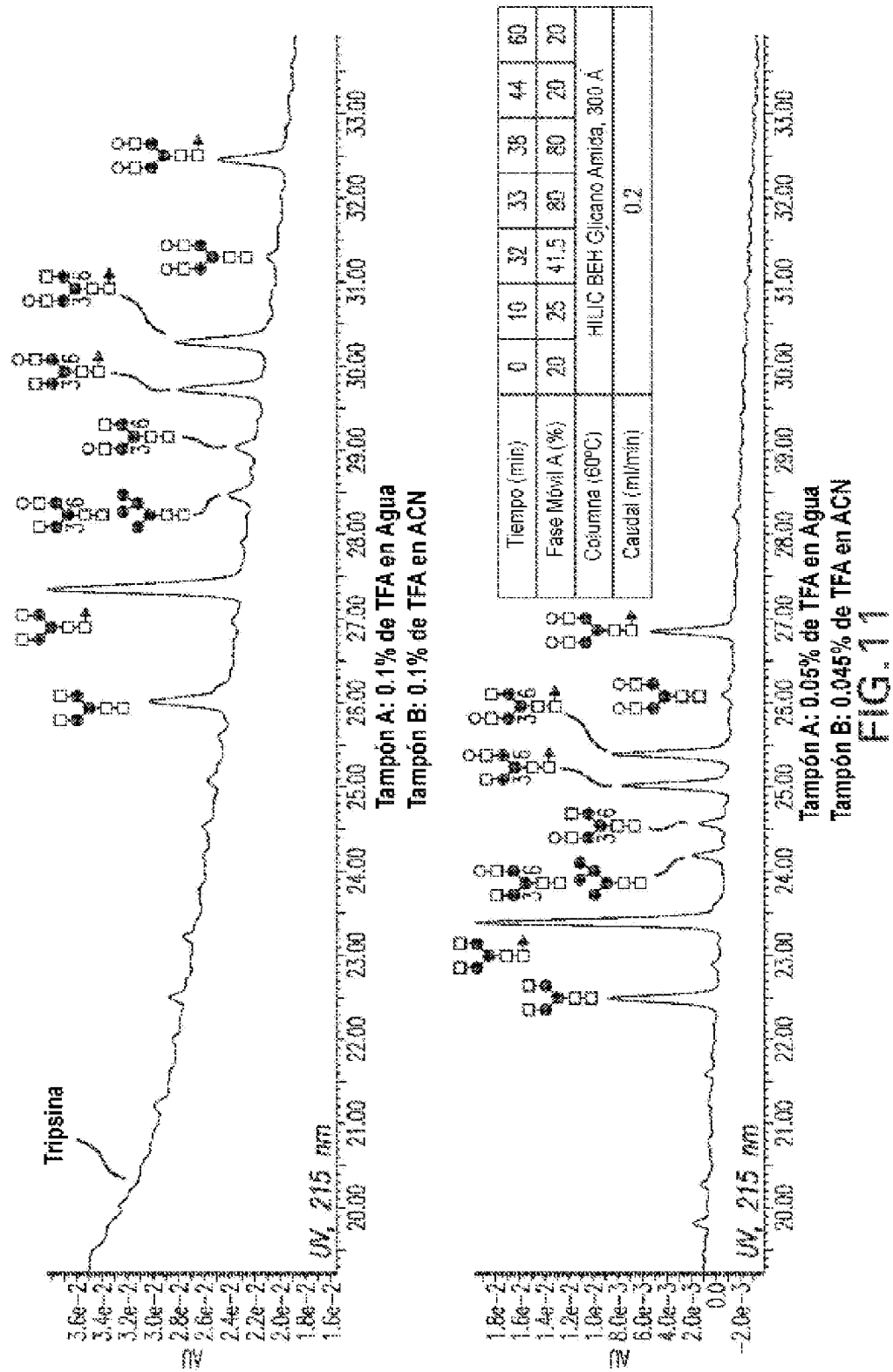


FIG.10



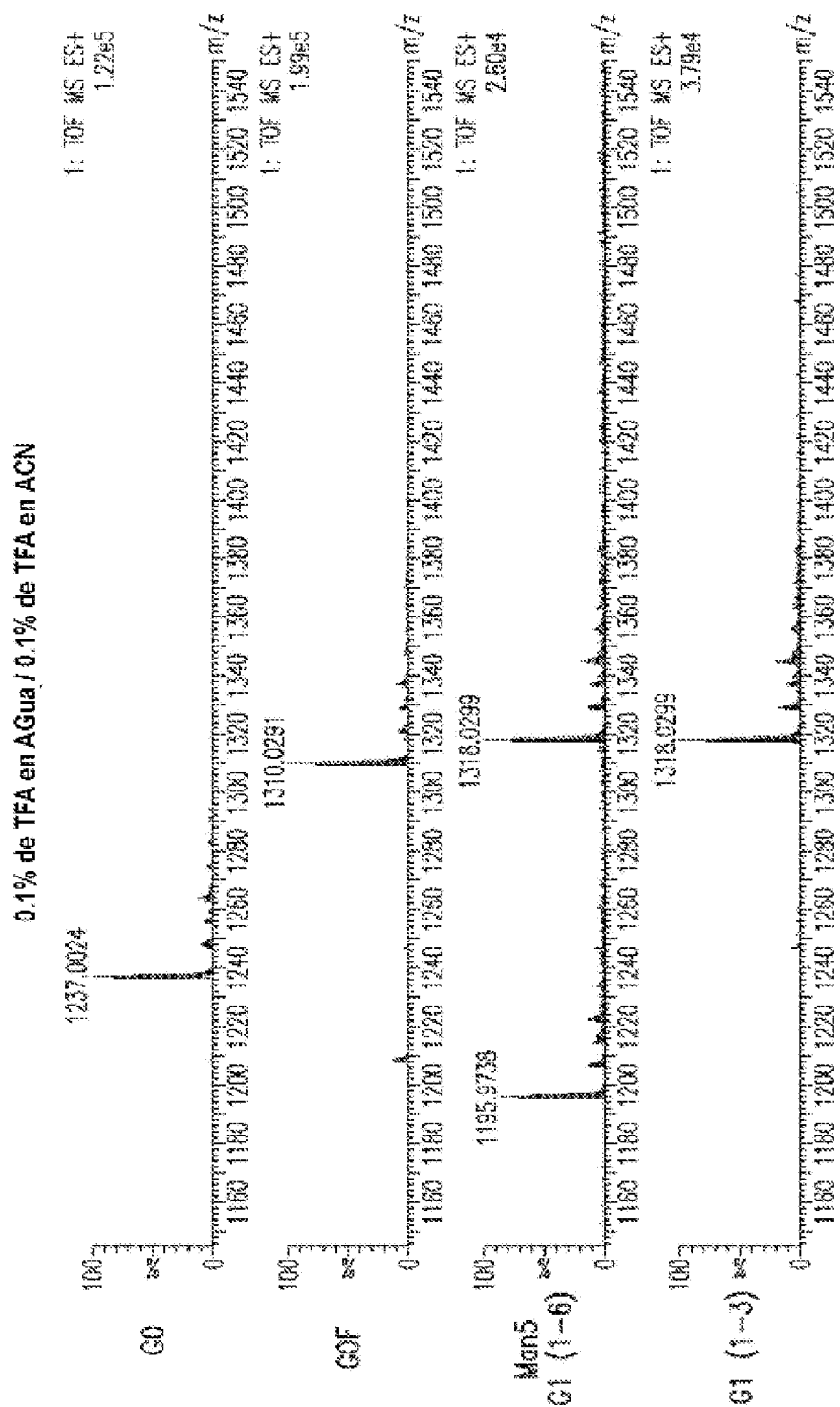


FIG.12A

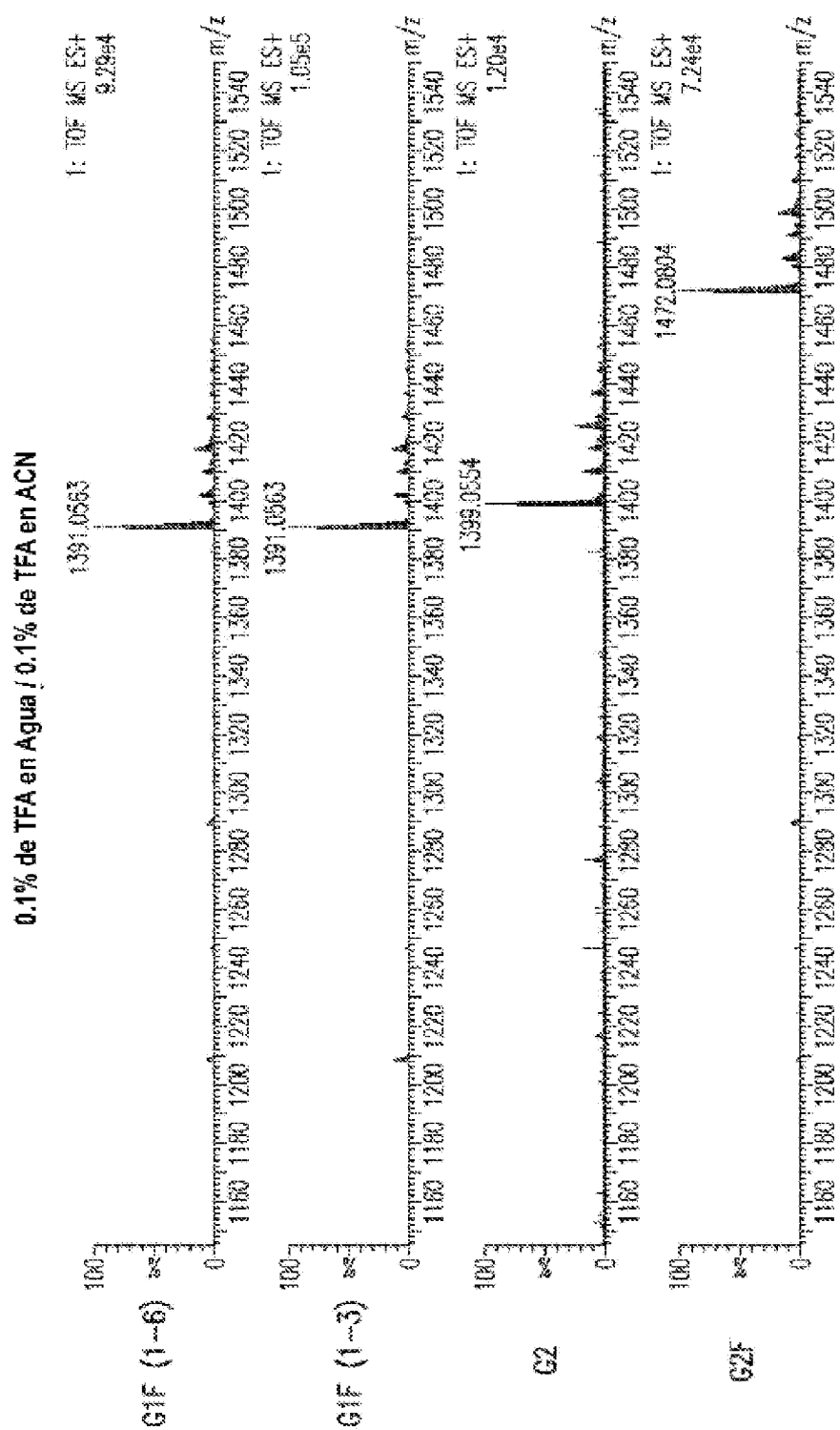


FIG.12B

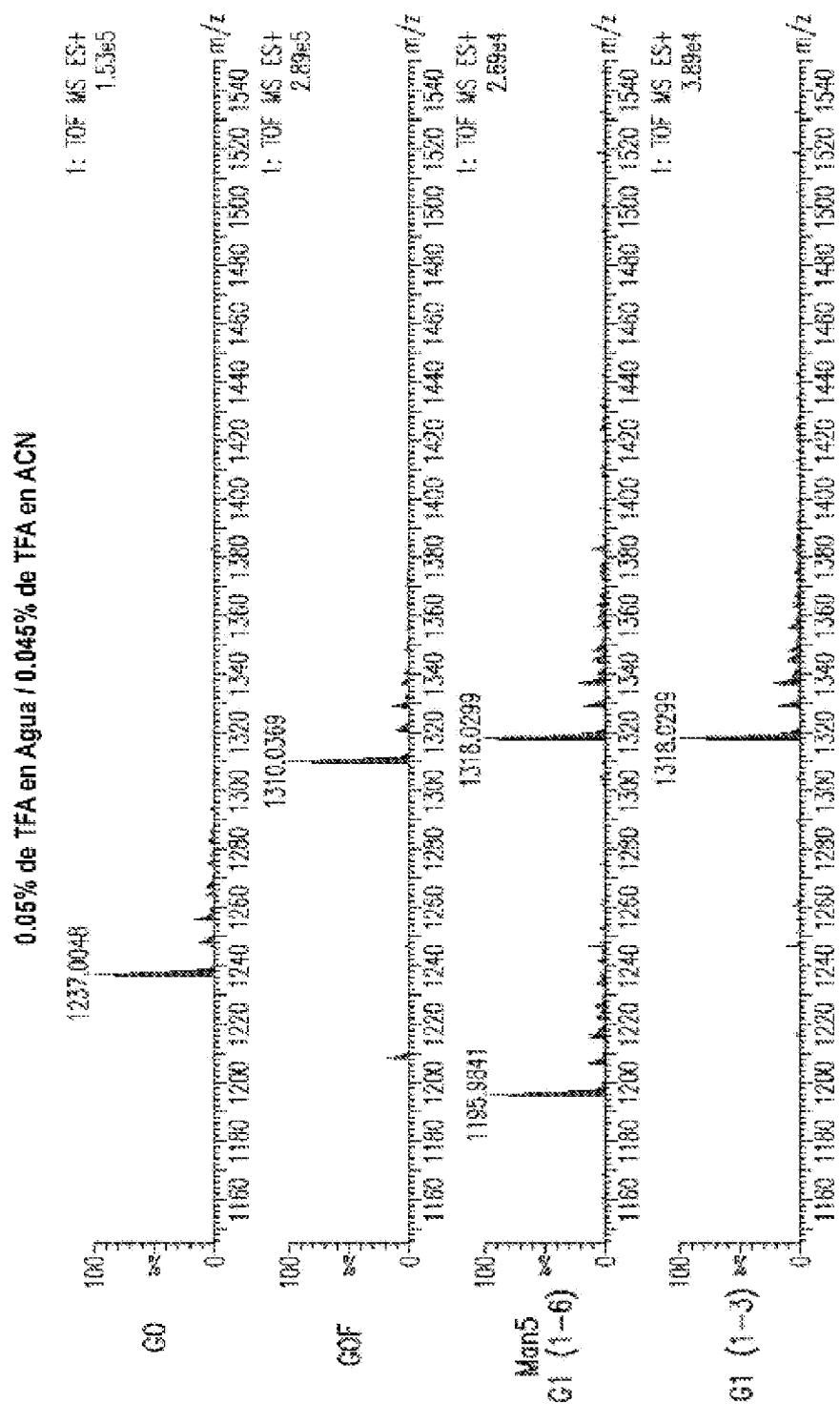


FIG.12C

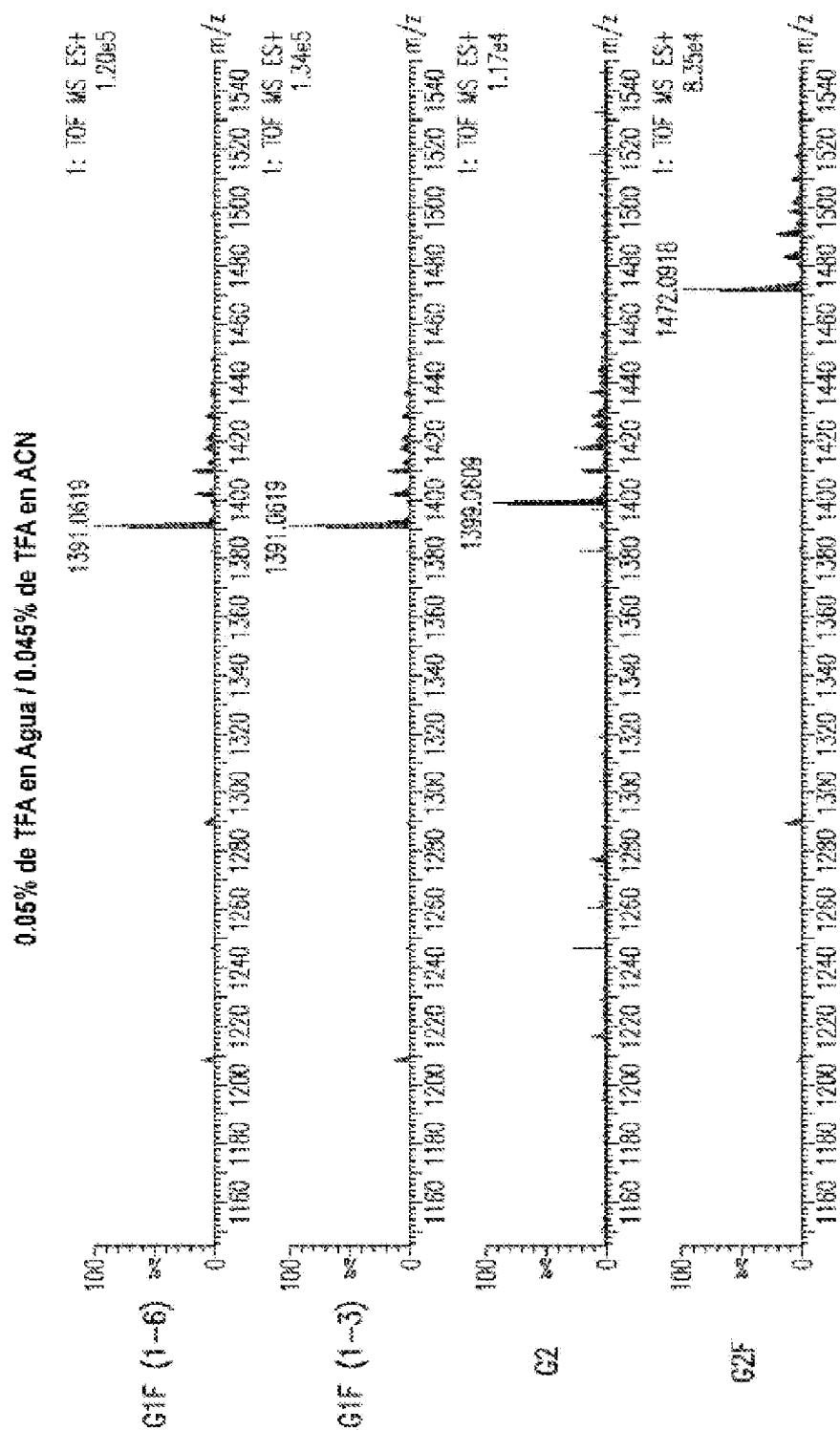
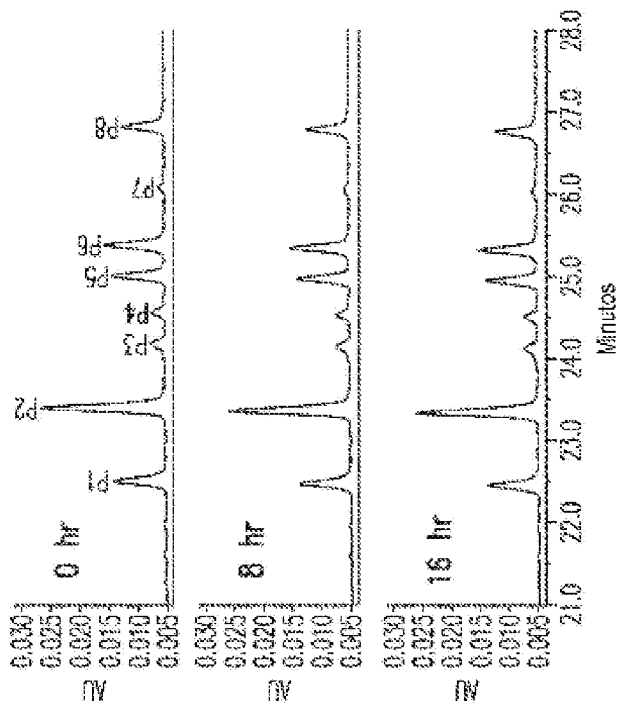


FIG. 12D



Tiempo	% de Área de Pico (PA)							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
0 hr	14.56	33.74	4.49	3.30	13.96	16.43	1.71	11.81
8 hr	14.24	34.20	4.59	3.31	13.81	16.29	1.46	12.10
16 hr	14.56	34.55	4.74	3.25	13.56	15.86	1.54	11.94
% de Diferencia								
8 vs 0 hr	2.2%	1.4%	2.2%	0.3%	1.1%	0.9%	14.6%	2.5%
16 vs 0 hr	0.0%	2.4%	5.6%	1.5%	2.9%	3.5%	9.9%	1.1%

% de Diferencia de % de PA para glicanos principales son $\leq 3.5\%$

FIG.13

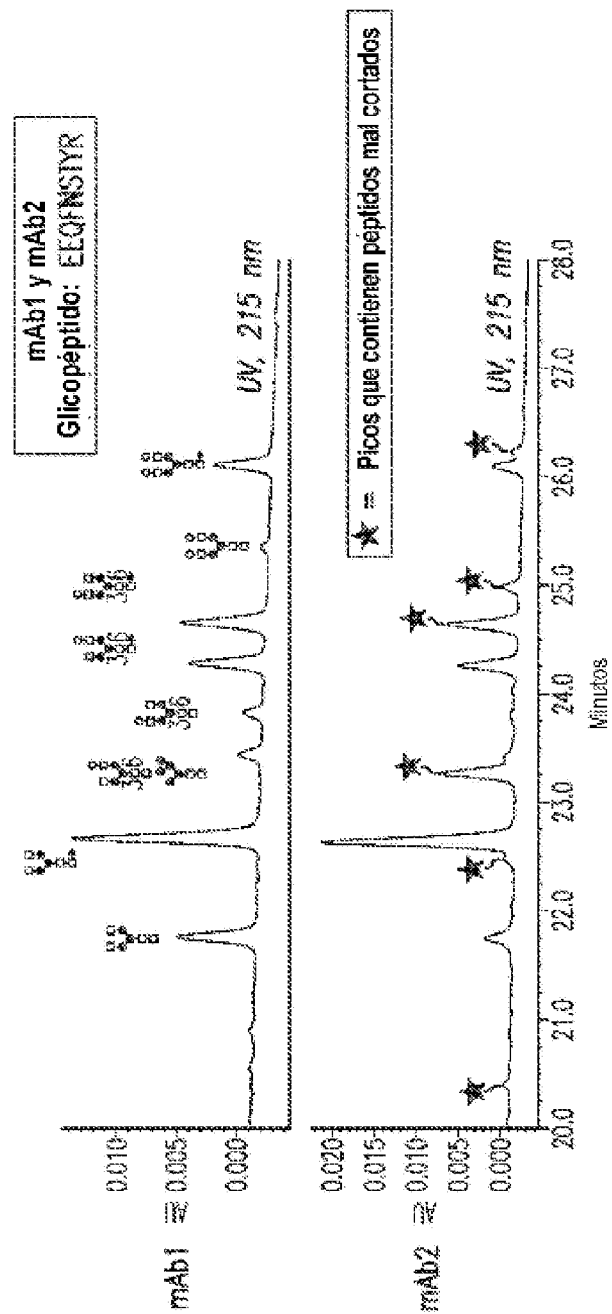


FIG.14

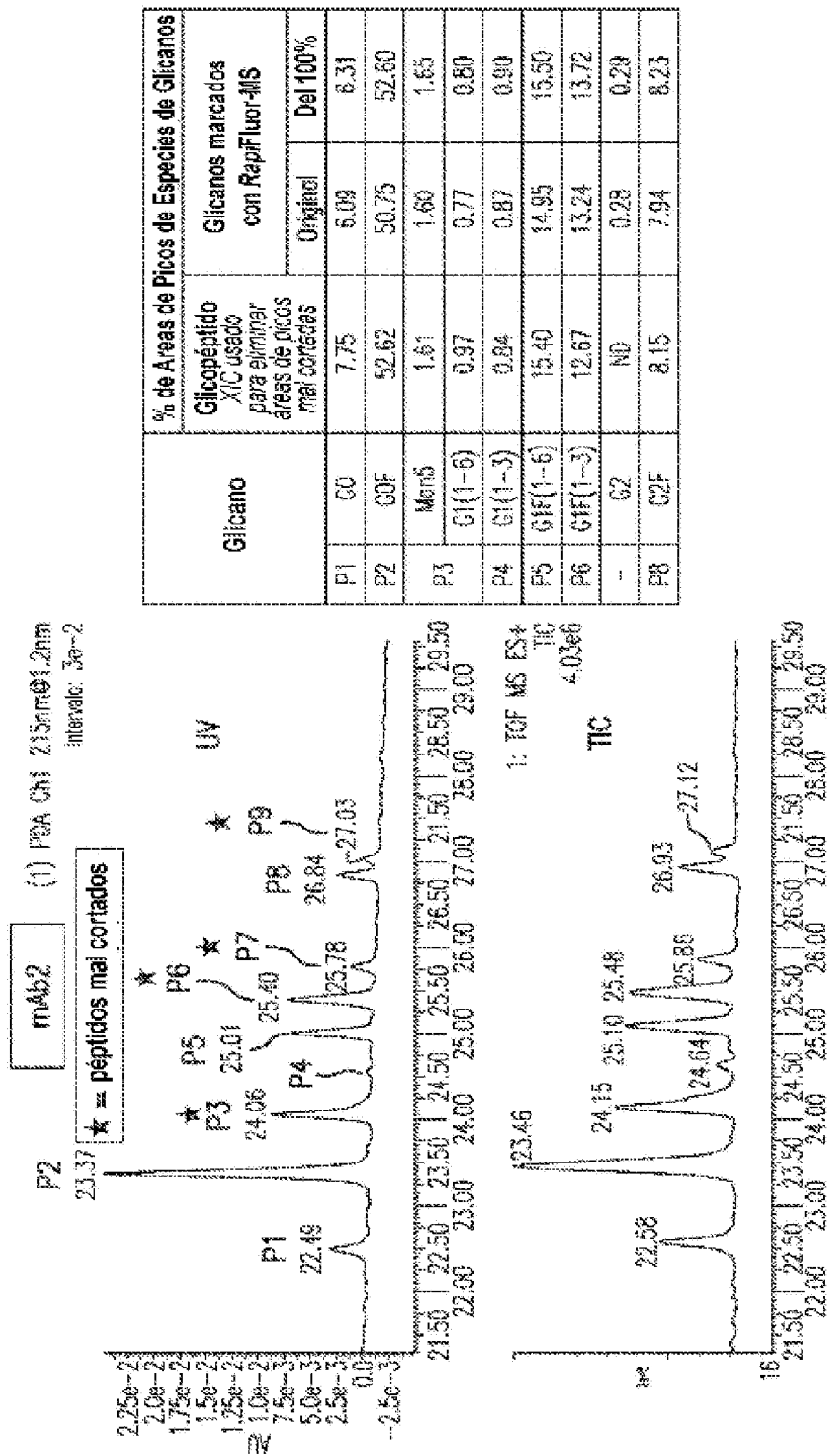


FIG.15

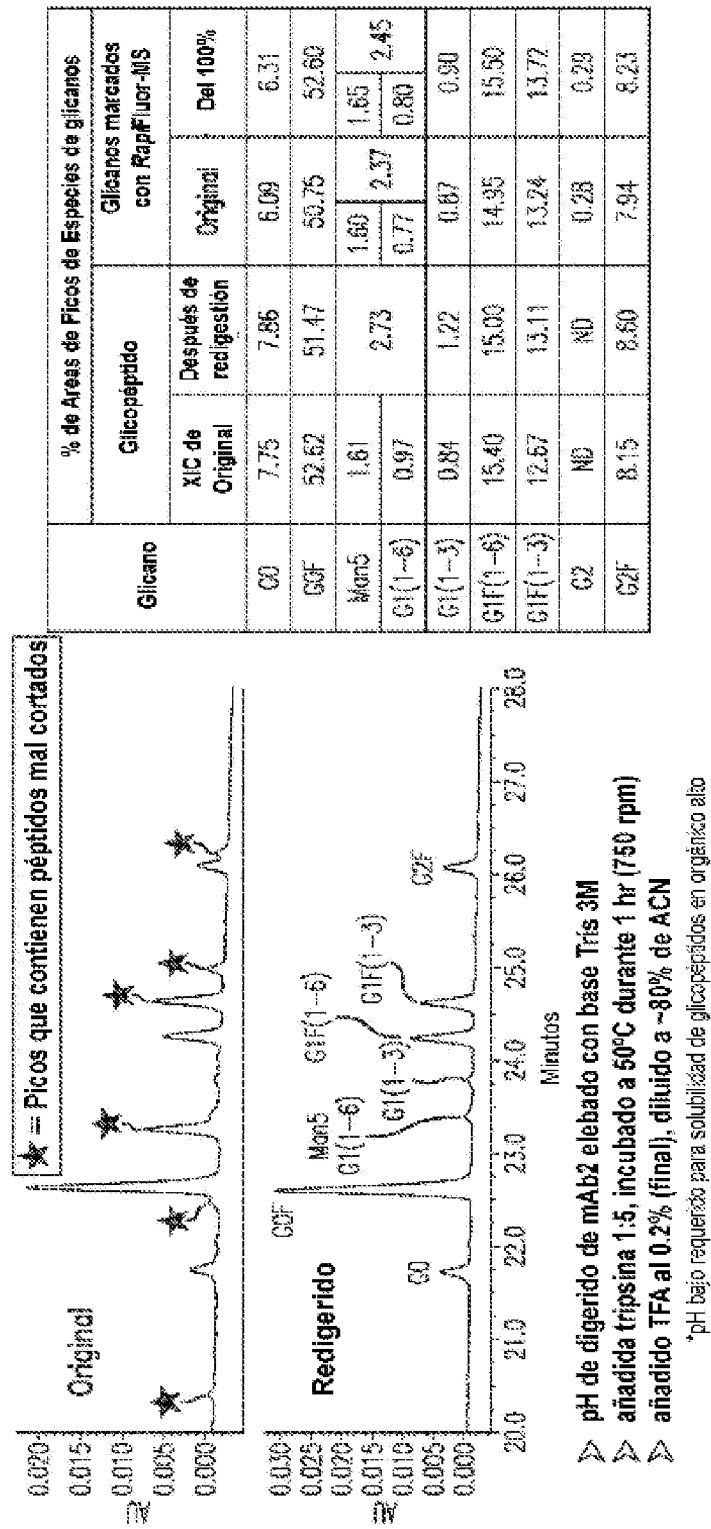


FIG. 16

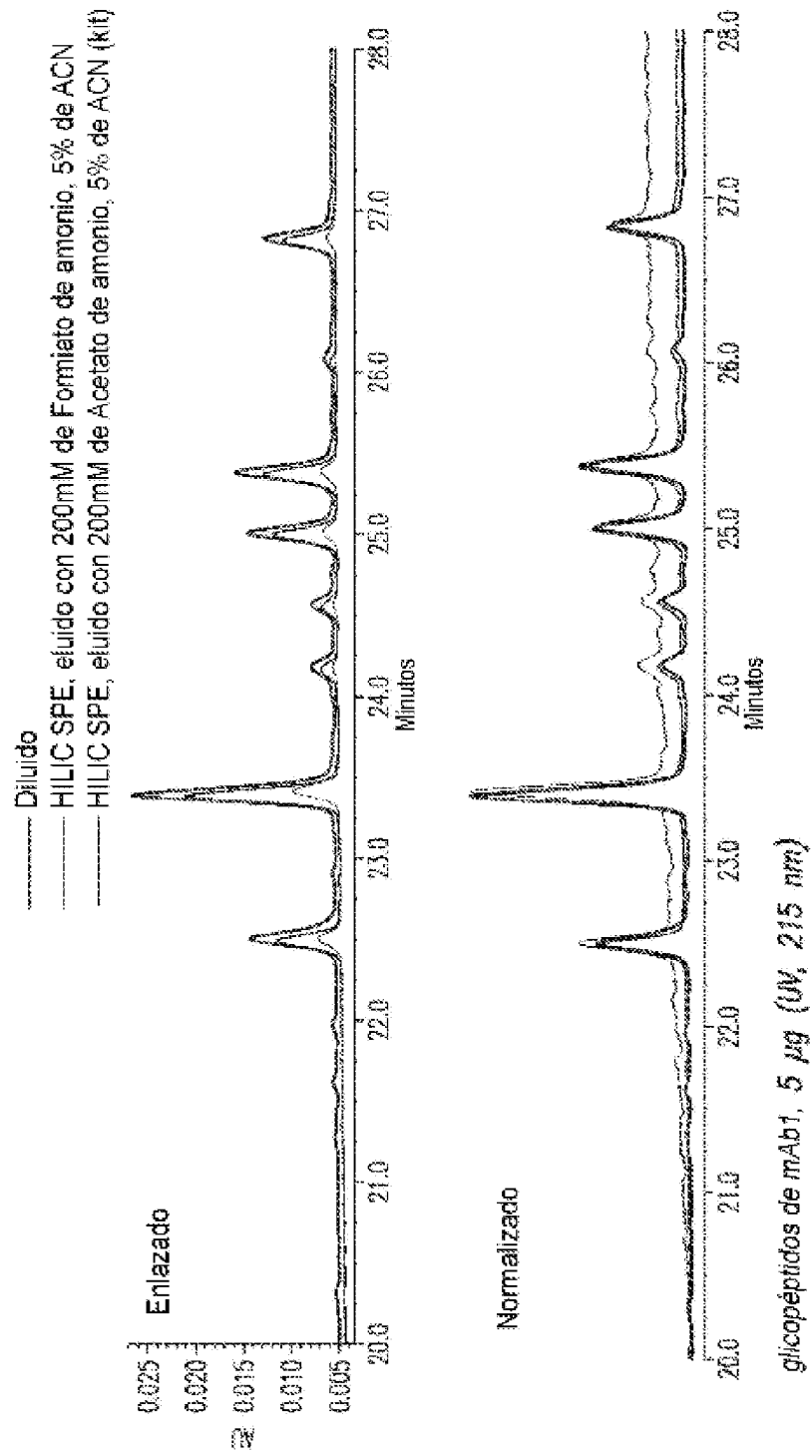


FIG.17

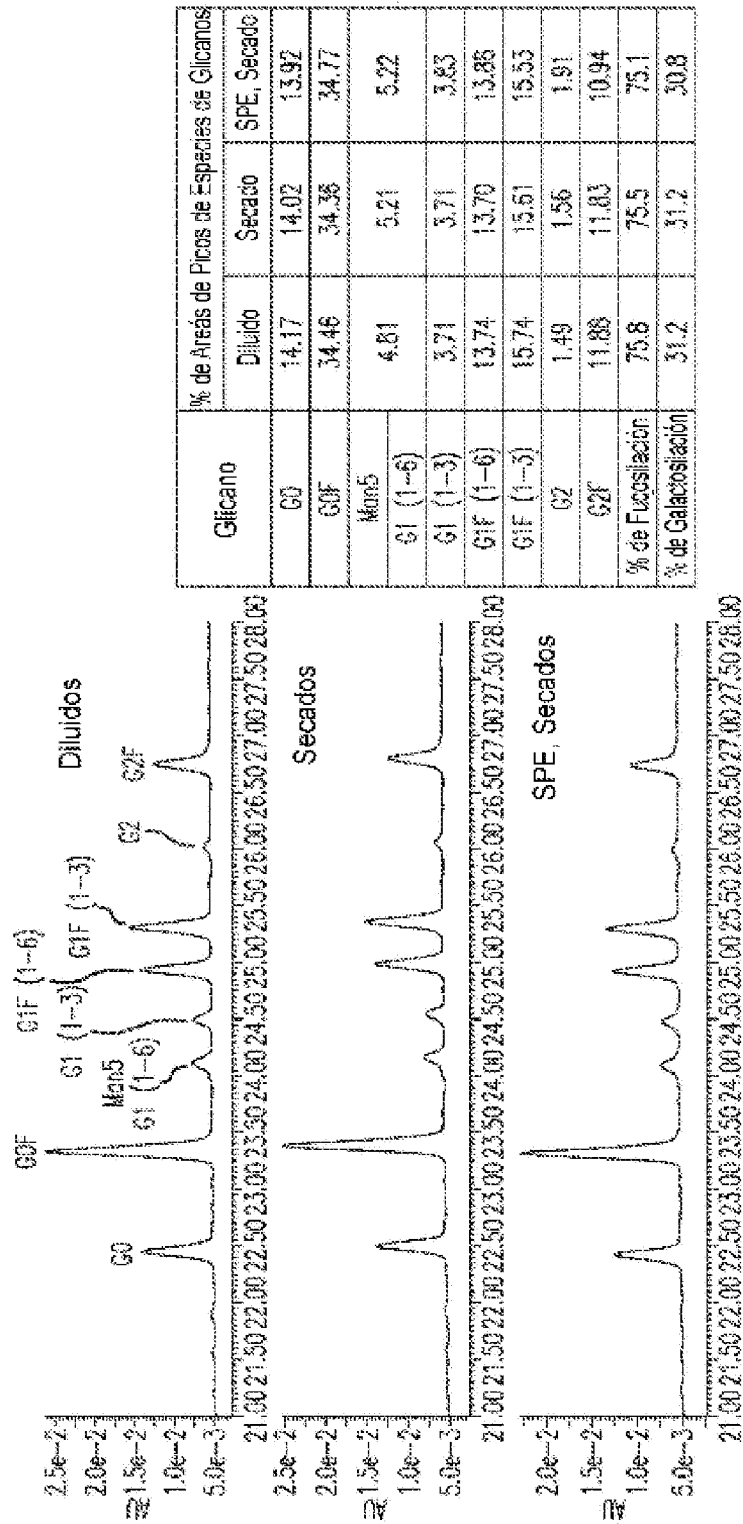


FIG.18

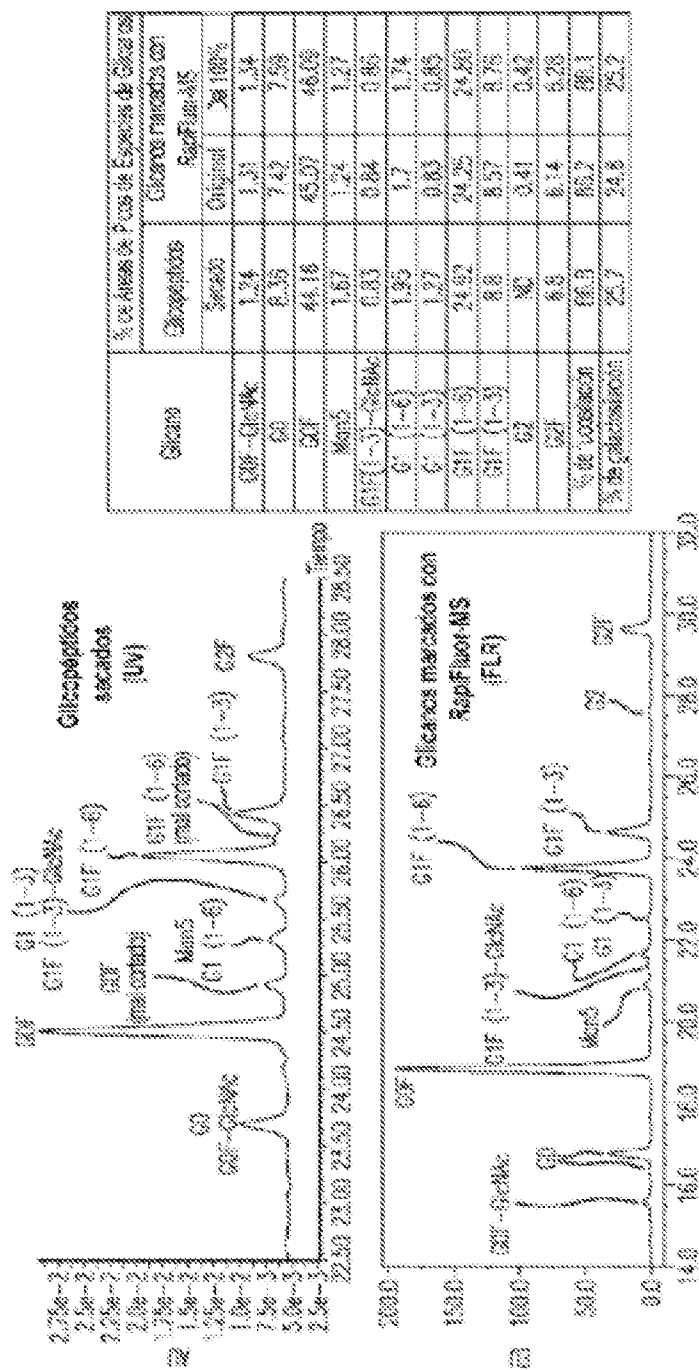
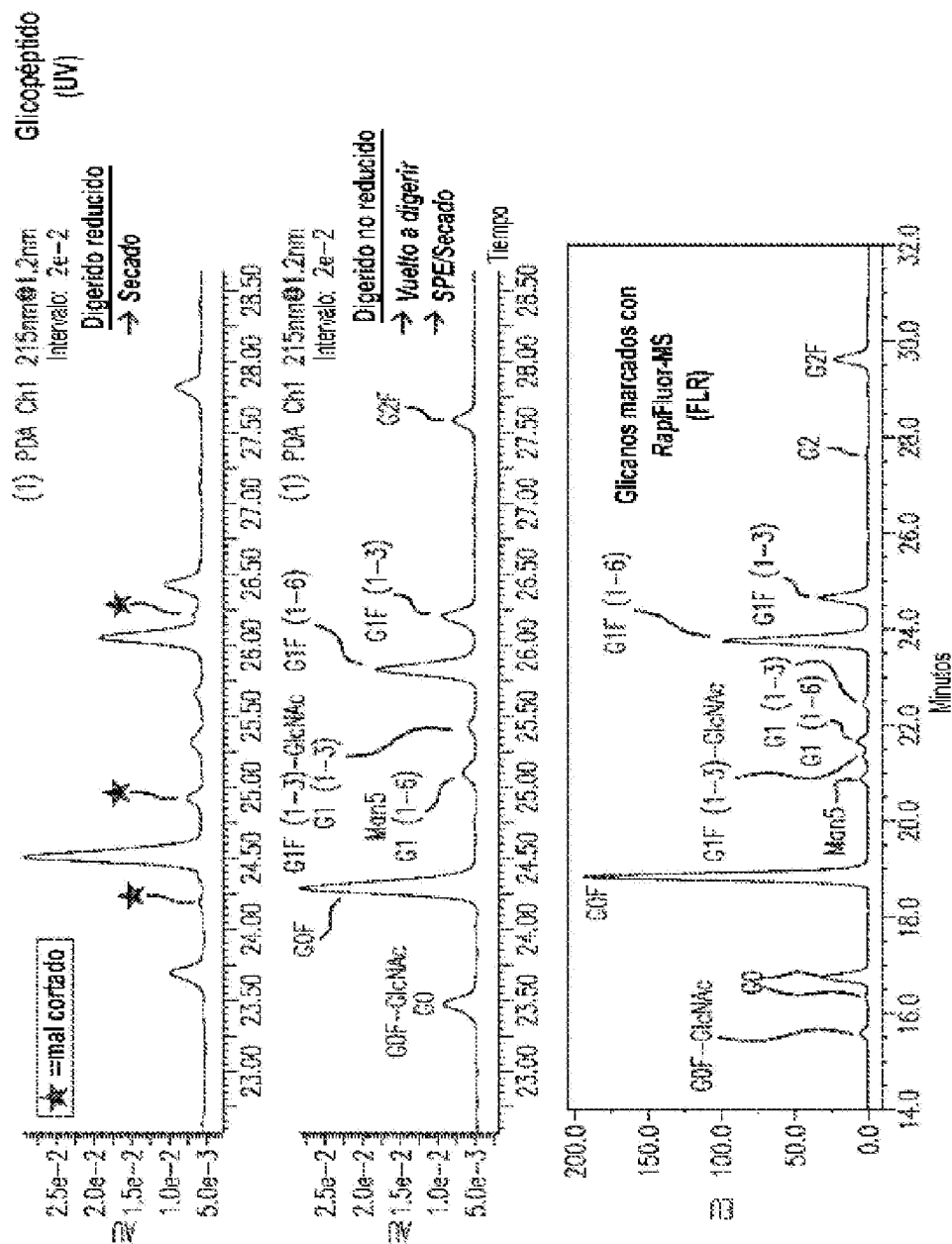


FIG.19



Glicano	% de Areas de Picos de Especies de Glicanos			
	Glicopéptidos		Glicanos Marcados con RapiFluor-MS	
	<u>Reducido</u> Secado	<u>No Reducido</u> <i>Vuelto a digerir SPE/Secado</i>	Original	Del 100%
G0F-GlcNAc	1.24	0.98	1.31	1.34
G0	8.36	8.25	7.42	7.59
G0F	44.16	46.33	45.07	46.09
Man5	1.67	1.73	1.24	1.27
G1F (1-3)-GlcNAc	0.83	0.93	0.84	0.86
G1 (1-6)	1.95	2.33	1.7	1.74
G1 (1-3)	1.27	0.98	0.83	0.85
G1F (1-6)	24.92	24.96	24.25	24.80
G1F (1-3)	8.8	8.44	8.57	8.76
G2	ND	ND	0.41	0.42
G2F	6.8	5.09	6.14	6.28
% de fucosilación	86.8	86.7	86.2	88.1
% de galactosilación	25.7	23.9	24.6	25.2

FIG.20B

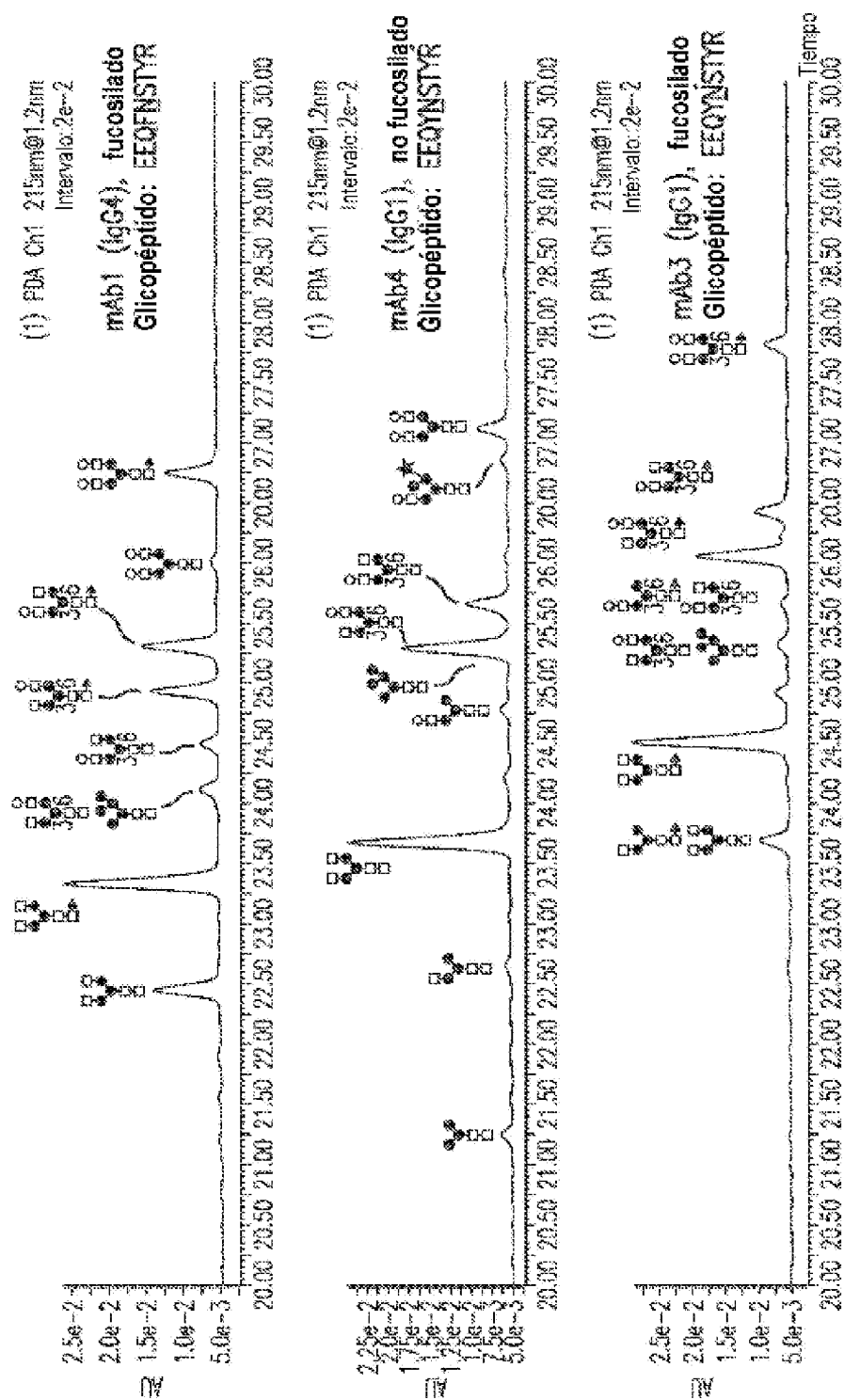


FIG.21

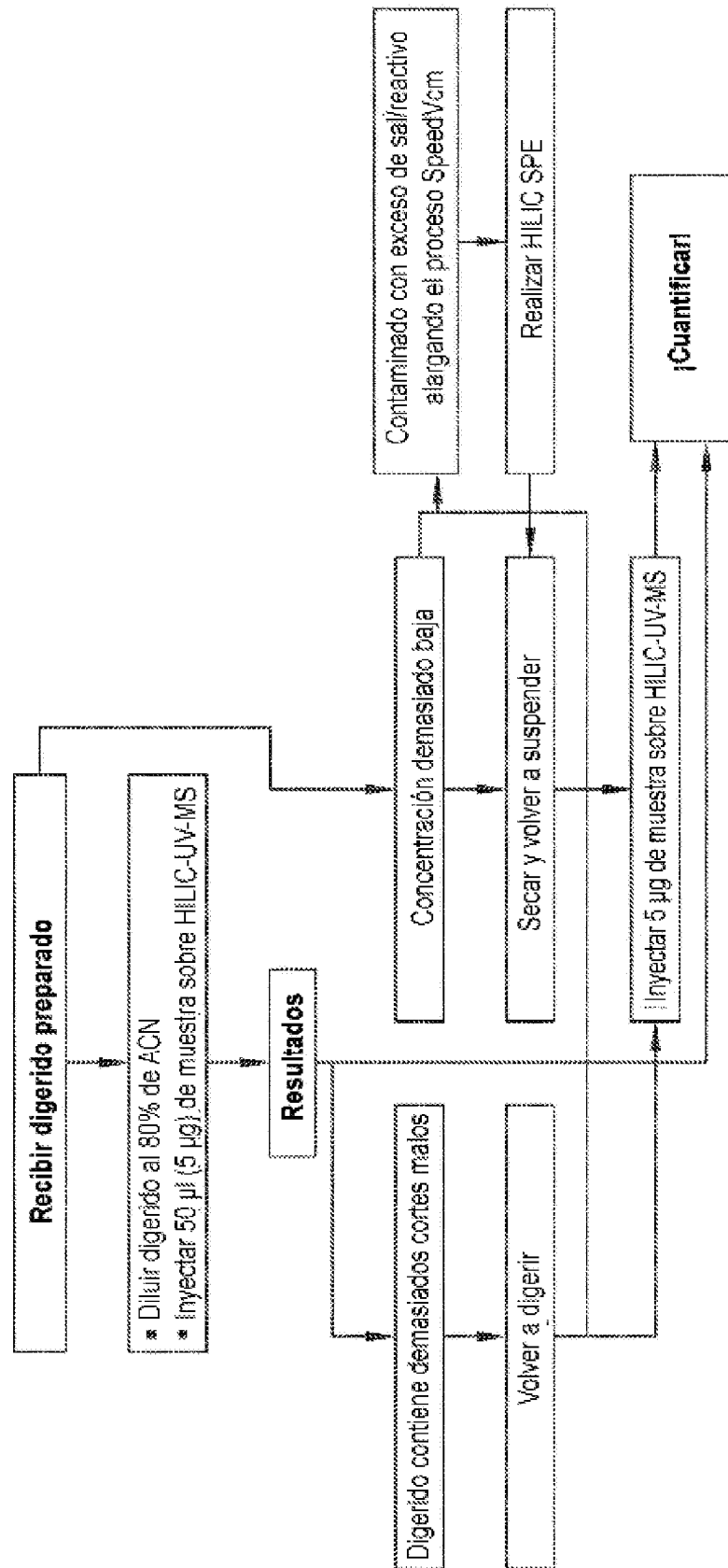


FIG.22