(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 984 813**

(51) Int. Cl.:

G01N 30/88 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2021 PCT/EP2021/060797**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2021 WO21219530**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2021 E 21720515 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024 EP 4143564**

(54) Título: **Método para la identificación y la cuantificación de polisacáridos en composiciones de glicoconjugados complejas**

(30) Prioridad:

28.04.2020 EP 20171823
28.01.2021 EP 21154080

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2024

(73) Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1125 Trenton-Harbourton Road
Titusville, NJ 08560, US

(72) Inventor/es:

FLÜTSCH, ANDREAS y
AL-KAABI, ALI

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la identificación y la cuantificación de polisacáridos en composiciones de glicoconjugados complejas

La presente invención se refiere a métodos analíticos para identificar y cuantificar composiciones de glicoconjugados complejas, particularmente al análisis de un componente polisacarídico de una glicoproteína en una muestra. La invención se refiere además al uso de sistemas de cromatografía de líquidos - espectrometría de masas ("sistemas de CL-EM") en dichos métodos analíticos, particularmente al uso de sistemas de CL-EM para el control en proceso durante la fabricación de glicoconjugados, para el control de la liberación de los glicoconjugados producidos, para el control de la estabilidad de los glicoconjugados almacenados y para la optimización de procesos de la fabricación de glicoconjugados.

Existe una presión cada vez mayor por parte de las autoridades reguladoras sobre los fabricantes biofarmacéuticos para que demuestren programas satisfactorios de comprensión, medición y control de la glicosilación en fármacos a base de glicoproteínas. Sin embargo, el análisis de composiciones de glicoconjugados complejas, es decir, la identificación y la cuantificación absoluta de las mismas, es una tarea desafiante. Dicho análisis normalmente comprende una serie de ensayos y requiere, para un análisis completo en condiciones de GMP, 1 semana o incluso más.

Para fármacos a base de glicoproteínas, los ensayos químicos de última generación se realizan en sistemas de cromatografía de líquidos de alta resolución (sistemas HPLC) equipados con diferentes detectores: Para la determinación de polisacáridos (PS) totales y libres, se usa un detector amperométrico pulsado que requiere una preparación laboriosa de la muestra hidrolizando las cadenas de azúcar y detectando los monosacáridos liberados después de la separación por cromatografía de iones. Como afirma ThermoFisher Scientific, un fabricante de dichos sistemas de HPLC, "Los hidratos de carbono son difíciles de analizar usando cromatografía y métodos de detección habituales", pero su "detección electroquímica se ha optimizado para el análisis de hidratos de carbono" (1). En conclusión, la detección y cuantificación amperométrica se puede considerar el criterio de referencia en la cuantificación de hidratos de carbono. Sin embargo, una de las principales desventajas de la técnica (los monosacáridos necesarios) hace que la preparación de la muestra de fármacos a base de glicoproteínas sea laboriosa y los ensayos de liberación requieran mucho tiempo y dinero.

Adicionalmente, todos los fármacos a base de glicoproteínas se someten a pruebas analíticas de liberación adicionales (por ejemplo, glicanos libres en las fármacos, modificaciones con glicanos) además del arsenal de liberación general para determinar la pureza y la identidad solicitados por las autoridades reguladoras. Estos múltiples criterios de liberación diferentes dan como resultado tiempos de liberación prolongados para los fármacos a base de glicoproteínas.

Mazsaroff *et al.* (2) describen el análisis de estructuras de hidratos de carbono de glicoproteínas usando sistemas de CL-EM y fragmentación en la fuente. El documento describe un método analítico para la cuantificación relativa determinando la relación de dos picos. Como afirman explícitamente los autores, es "importante comprender que la relación del área del pico del ion del fragmento en condiciones óptimas para la relación señal-ruido podría no reflejar la relación absoluta de los iones del fragmento presentes en la molécula de glicoproteína investigada, pero las condiciones óptimas producen la mejor medida para la cuantificación relativa de la relación de iones de fragmentos en la comparación de los diferentes lotes de un producto biofarmacéutico con su patrón". En conclusión, el documento no describe ninguna cuantificación absoluta de las estructuras de los hidratos de carbono; ni sugiere el uso de una curva de calibración de material de referencia.

Ivancic *et al.* (3) describen el análisis por CL-EM de glicoproteína ácida a1 humana multiglicosilada compleja como modelo para desarrollar métodos de identificación y cuantificación para el análisis de glicopéptidos intactos. El documento describe un método analítico en el que se usa la fragmentación en la fuente para fragmentar los hidratos de carbono, que se usan como marcadores para identificar glicopéptidos. En última instancia, la técnica tiene como objetivo cuantificar el "grado de glicosilación" de un péptido en la proteína AAG. Esto significa la comparación de las intensidades máximas de los péptidos identificados como glicosilados con las intensidades máximas de los péptidos no glicosilados. De nuevo, el documento no describe ninguna cuantificación absoluta de las estructuras de los hidratos de carbono; ni sugiere el uso de una curva de calibración de material de referencia.

Carell *et al.* (documento US 2020/041470) (4) desvela un reactivo de derivatización para polisacáridos como componente de glicoproteínas. El uso de este reactivo de derivatización e isotopólogos de los mismos en combinación con una curva de calibración que se genera a partir de un material de referencia permite la cuantificación absoluta de dichos polisacáridos mediante sistemas de CL-EM que son capaces de fragmentar iones seleccionados mediante disociación inducida por colisión (CID, por sus siglas en inglés). Como la derivatización del analito es un requisito previo para la cuantificación, el documento no describe ningún método de CL-EM en donde la glicoproteína esté en su estado nativo. Dicha derivatización del componente polisacarídico requiere la adición de una etapa de preparación de muestra en comparación con un método que analiza una glicoproteína en su estado nativo y, por lo tanto, hace que dichos métodos sean inevitablemente más engorrosos. Además, el método requiere el uso de un sofisticado sistema de CL-EM en el que los iones específicos resultantes de la fragmentación en la fuente se pueden seleccionar y

fragmentar adicionalmente mediante CID. Un equipo tan sofisticado no sólo es más caro en sí, sino que además la validación de un método de análisis correspondiente requiere más tiempo que los métodos sin dichos requisitos. Por lo tanto, se considera beneficioso el uso de un sistema de CL-EM relativamente simple y un protocolo que requiera un mínimo de etapas de manipulación, particularmente en el contexto de un ensayo de liberación de fármaco.

Echeverría *et al.* (5) describen un método de EM para cuantificar glicanos que forman parte de un anticuerpo monoclonal. La cuantificación absoluta de los polisacáridos se consigue después de la escisión del anticuerpo mediante incubación con la enzima PNGasa F. Para la cuantificación, se añade a la muestra una mezcla de glicanos marcados isotópicamente como patrón interno y el análisis se realiza mediante EM de desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (MALDI-TOF). De nuevo, el presente documento no describe ningún método de análisis para glicoproteínas en donde la glicoproteína esté en su estado nativo. Además, el método no usa cromatografía de líquidos para separar las glicoproteínas dentro de la muestra antes del análisis de EM, sino que simplemente sugiere la posibilidad de aplicar la mezcla informada de patrones de glicano marcados isotópicamente a métodos basados en CL-EM. Como se ha analizado anteriormente, la adición de una etapa de preparación de la muestra, por ejemplo, la liberación mediada por PNGasa F del componente PS de la proteína portadora, hace que el método de análisis sea más engorroso y, por lo tanto, reduce el rendimiento en comparación con un método que no implica una etapa de este tipo. Además, la digestión con PNGasa F no es aplicable a todas las estructuras de polisacáridos, limitando de este modo el método de la técnica anterior a glicoproteínas que están dentro de la especificidad de sustrato de la PNGasa F.

De forma similar, Jeong *et al.* (6) describen un método de EM MALDI-TOF para la cuantificación absoluta de glicanos después de su liberación mediada por PNGasa F de una glicoproteína, seguido de la permetilación de los glicanos. Por lo tanto, el presente documento tampoco describe un método de cuantificación para glicoproteínas en donde la glicoproteína esté en su estado nativo. El método descrito tampoco incluye la separación de las glicoproteínas basada en CL antes del análisis por EM. Como se ha esbozado anteriormente, la adición de una etapa de preparación de la muestra hace que el método de análisis sea más engorroso y reduce el rendimiento. En este caso particular, la preparación de la muestra no sólo implica la digestión con PNGasa F (lo que supone una limitación inherente al método), sino que también incluye una etapa de permetilación, por lo tanto complicando adicionalmente la preparación de la muestra.

En consecuencia, existe la necesidad de métodos analíticos mejorados para glicoconjugados, particularmente fármacos a base de glicoproteínas.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención mitigar al menos algunos de estos inconvenientes del estado de la técnica.

En particular, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos analíticos que eviten la preparación de la muestra, aumentando de este modo el rendimiento analítico y también disminuyendo los costes de liberación, para fármacos a base de glicoproteínas.

Además, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos analíticos que combinen múltiples criterios de liberación diferentes en un ensayo, reduciendo de este modo adicionalmente el tiempo de liberación del lote de fármacos a base de glicoproteínas.

En particular, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos analíticos que proporcionen simultáneamente información sobre la identidad y la cantidad absoluta de fármacos a base de glicoproteínas.

Uno o más de los objetivos anteriores se consiguen mediante un método analítico como se define en la invención de acuerdo con la reivindicación 1 y de acuerdo con el uso de sistemas de CL-EM como se define en la reivindicación 12.

La presente invención se describirá con más detalle a continuación. Se entiende que las diversas realizaciones, preferencias e intervalos proporcionados/desvelados en la presente memoria descriptiva se pueden combinar a voluntad. Además, dependiendo de la realización específica, las definiciones, realizaciones o intervalos seleccionados pueden no ser aplicables.

A menos que se especifique otra cosa, se aplicará las siguientes **definiciones** en la presente memoria descriptiva:

Como se usa en el presente documento, el término "un", "uno", "una", "el/la" y términos similares utilizados en el contexto de la presente divulgación (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) se deben interpretar como que cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "que incluye", "que contiene" y "que comprende" se usan en el presente documento en su forma abierto, no limitante. Se entiende que las diversas realizaciones, preferencias e intervalos se pueden combinar a voluntad.

A lo largo de la presente memoria descriptiva se usa una serie de abreviaturas, incluyendo:

ABC	Área bajo la curva
CID	disociación inducida por colisión, una técnica de EM
EPA	Exotoxina A detoxificada de *P. aeruginosa*
ETD	disociación por transferencia de electrones, una técnica de EM
HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento,
IC-PAD	Detección amperométrica pulsada por cromatografía de iones
FIS	Fragmentación en la fuente
CL	cromatografía de líquidos
LPS	lipopolisacárido
EM	espectrometría de masas
PS	Polisacárido
RP	Fase inversa
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
TIC	Corriente total de iones, una técnica de EM

Las abreviaturas anteriores y otras abreviaturas mencionadas en la memoria descriptiva, son comunes en el campo.

El término **"glicoconjugado"** se conoce en el campo y describe particularmente entidades químicas unidas covalentemente a uno o más polisacáridos. Dicho glicoconjugado se puede obtener mediante conjugación biológica en una célula viva ("bioconjugado" o "conjugado biológico") o se puede obtener mediante conjugación química de un polisacárido (glicoconjugado "químico" o "sintético"). Las entidades químicas adecuadas incluyen proteínas/péptidos y lípidos, siendo los glicoconjugados correspondientes **glicoproteínas,** (que incluyen proteoglicanos, peptidoglicanos y glicopéptidos) y **glicolípidos.**

El término glicoproteína incluye "glicoproteínas tradicionales" y "vacunas glicoconjugadas". En las glicoproteínas tradicionales, el énfasis está en la parte proteica, tal como, por ejemplo, para los anticuerpos o la eritropoyetina, donde el principio "activo" reside más en la parte proteica y los glicanos desempeñan una función, por ejemplo, en la semivida o definen otras propiedades. Estas glicoproteínas tradicionales encuentran un uso generalizado en aplicaciones farmacéuticas. En las vacunas glicoconjugadas, el énfasis está en la parte de glicano, para el que se desea una respuesta inmunitaria porque los glicanos son los antígenos relevantes y la parte proteica simplemente sirve como portador para conducir a una respuesta inmunitaria de memoria de linfocitos T deseada.

El término glicoproteína incluye además "proteoglicanos" y "peptidoglicanos" y "glicopéptidos". El término "proteoglicanos" se refiere a proteínas que están fuertemente glicosiladas. La unidad básica de proteoglicano consiste en una proteína central con una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) unidas covalentemente. El punto de unión es un resto serina (Ser) al que se une el glicosaminoglicano a través de un puente de tetrasacárido. El término "peptidoglicano" se refiere a un polímero que consiste en sacáridos y aminoácidos que forman una capa similar a una malla fuera de la membrana plasmática de la mayoría de las bacterias, formando la pared celular. El término "glicopéptido" se refiere a una glicoproteína que comprende hasta 50 aminoácidos en la parte proteica. Estando disponible dicho glicopéptido, por ejemplo, a través de la digestión de una glicoproteína más grande (por ejemplo, a través de digestión con tripsina), fermentación bacteriana o síntesis química.

El término **"glicolípidos"** se conoce en el campo y describe particularmente entidades en las que uno o más sacáridos están unidos mediante un enlace glicosídico (covalente) a un lípido. Por consiguiente, el rasgo característico de un glicolípido es la presencia de un sacárido (particularmente un polisacárido como se analiza en el presente documento) unido a un resto lipídico.

El término **"polisacárido"** se conoce en el campo y describe particularmente hidratos de carbono poliméricos compuestos por unidades monosacarídicas unidas entre sí mediante uniones glicosídicas, ya sea lineales o ramificadas. Dichos polisacáridos se caracterizan por sus unidades de repetición, cada unidad de repetición descrita con su respectiva composición de monosacáridos. Dichas unidades de repetición incluyen uno o más monosacáridos que también se pueden modificar químicamente (por ejemplo, amidarse, sulfonarse, acetilarse, fosforilarse, etc.). Los monosacáridos que normalmente se encuentran en dichas unidades de repetición son monosacáridos cíclicos o lineales que contienen de tres a siete átomos de carbono. En el caso específico de las vacunas glicoconjugadas, el polisacárido conjugado proviene de una especie patógena (por ejemplo, *Escherichia coli*) con dicha unidad de repetición definida por la genética del patógeno específico. Por lo tanto, la unidad de repetición puede ser un marcador/identificador específico del patógeno.

En consecuencia, la expresión "componente polisacarídico" indica una o más cadenas de glicano de un glicoconjugado. Los glicanos pueden ser monómeros o polímeros de restos de azúcar, pero normalmente contienen al menos tres azúcares y pueden ser lineales o ramificados. Un glicano puede incluir residuos de azúcar naturales (por ejemplo, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico, galactosa, manosa, fucosa, arabinosa, ribosa, xilosa, etc.) y/o azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, 2'-desoxirribosa, fosfomanosa, 6'-sulfo N-acetilglucosamina, etc). El término "glicano" incluye homopolímeros y heteropolímeros de restos de azúcar. El término

"glicano" también abarca un componente de glicano de un glicoconjugado (por ejemplo, de una glicoproteína, glicopéptido, glicolípido). El término también abarca glicanos libres, incluyendo glicanos que han sido escindidos o liberados de otro modo de un glicoconjugado.

La expresión "polisacárido O-acetilado", como se usa en el presente documento, se refiere a polisacáridos en los que uno o más monosacáridos de la unidad de repetición se modifican químicamente mediante acetilación. Dichos monosacáridos tienen uno o más de sus grupos hidroxilo presentes acetilados. Para unidades de repetición derivadas de patógenos utilizadas en vacunas glicoconjugadas, la O-acetilación de determinados monosacáridos puede ser esencial para inducir una respuesta inmunitaria para dicho patógeno. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de componentes polisacarídicos derivados de patógenos.

Las expresiones **"glicano"** / "cadena de glicano" son sinónimos de "polisacárido" como se define a continuación. De forma correspondiente, en el contexto de la presente invención, "glicano" y el prefijo "glico-", también se refieren a la porción de hidratos de carbono de un glicoconjugado, tal como una glicoproteína o un glicolípido.

El término **"serotipo"**, como se usa en el presente documento, se refiere a glicoconjugados que tienen diferentes cadenas de polisacáridos que derivan de diferentes serotipos bacterianos. A continuación en la Tabla 1 se identifican ejemplos de glicanos de una serie de serotipos de *E. coli*.

La expresión "estado nativo" se conoce en el campo y se refiere a una biomolécula, tal como un glicoconjugado, en su estado intacto y funcional. Cuando se hace referencia al estado nativo dentro de la invención, estado nativo significa que el glicoconjugado que se ha de analizar no se derivatiza ni se modifica de otro modo durante la preparación de la muestra, por ejemplo, con una enzima tal como PNGasa F, ni se somete a una reacción química. Por lo tanto, el análisis de un glicoconjugado en su estado nativo difiere de cualquier método que implique la derivatización del glicoconjugado o que implique una etapa de preparación de la muestra para liberar los glicanos de la molécula portadora, por ejemplo, una proteína portadora, antes de someter la muestra al etapa de CL-EM del análisis. Sin embargo, cuando se hace referencia al estado nativo dentro de la invención, la expresión estado nativo no se refiere a la conformación del glicoconjugado, es decir, su plegamiento tridimensional tal como su estructura secundaria, estructura terciaria o estructura cuaternaria. Por lo tanto, se entiende que "análisis de una glicoproteína en su estado nativo" es sinónimo de "análisis de una glicoproteína, en donde la glicoproteína no se somete a (i) digestión enzimática con una enzima que elimina el componente polisacarídico de la proteína portadora ni a (ii) una reacción química, por ejemplo, derivatización, en cada caso antes de introducir la glicoproteína en el sistema de CL-EM".

La presente invención se entenderá mejor haciendo referencia a la **figuras.**

Figura 1: Espectros de CL-EM combinados a lo largo del pico cromatográfico principal (función de EM TIC, eje x m/z; eje y intensidad rel. [%]) de la glicoproteína analizada EcO6A (un componente de vacuna glicoconjugada, que comprende polisacárido de *E. coli* serotipo O6A unido covalentemente a la proteína portadora EPA; la estructura para la unidad de repetición de PS se proporciona en la Tabla 1) y se proporciona una mezcla de diferentes glicoproteínas EcO75, EcO2, EcO1A, EcO4, EcO25B y EcO6A (polisacáridos de *E. coli* serotipos 075, O2, O1A, O4, O25B y O6A, cada uno de ellos independientemente unido covalentemente a proteínas portadoras EPA; en la Tabla 1 se proporcionan estructuras para las unidades de repetición de estos polisacáridos).

El panel A muestra la fragmentación en la fuente de *E. coli* serotipo EcO6A y la liberación de fragmento específico de unidad de repetición (pico con masa 893,3262 g/mol).

Como se observa en el Panel B, la liberación de unidades de repetición de glicano, así como su asignación selectiva, también es posible en muestras de glicoproteínas complejas, como es visible para una mezcla hexavalente con 6 serotipos diferentes, masas representadas cerca de los picos.

Figura 2: Se muestra una curva de calibración de ejemplo. La fragmentación en la fuente ocurre linealmente basándose en la cantidad de serotipo inyectado, representada en este caso en una prueba de concepto usando la glicoproteína EcO6A. Una cantidad diferente de proteína inyectada (de 0,2 µg hasta 1,2 pg) conduce a una respuesta de señal diferente para la unidad de repetición de EcO6A (fragmento con una masa molecular de 893,32 g/mol; Eje y respuesta / [u.a.]; Eje x microgramos de EcO6A]

Figura 3: Espectros de CL-EM combinados a lo largo del pico cromatográfico principal (función de EM TIC, eje x m/z; eje y intensidad rel. [%]) de la glicoproteína EcO25B y EcO16 (con/sin acetilación). Las estructuras de las unidades de repetición con O-acetilo para los respectivos serotipos de *E. coli* O25B y 016 se proporcionan en la Tabla 1.

El panel A muestra la fragmentación en la fuente de la glicoproteína EcO25B con dos picos distintos: Unidades de repetición con (862 g/mol) y sin O-Acetilo (820 g/mol).

El panel B muestra el mismo efecto para la glicoproteína EcO16 con dos picos distintos con masas de 716 g/mol y 674 g/mol para unidades de repetición con y sin O-acetilo.

En términos más generales, en un **primer aspecto,** la invención se refiere a un método para analizar un componente polisacarídico (un glicano) de un glicoconjugado en una muestra. Es importante señalar que dicho análisis se refiere tanto a la identificación de dicho componente polisacarídico como a la cuantificación absoluta de dicho componente polisacarídico. El método inventivo comprende las etapas de (a) establecer una curva de calibración de dicho componente polisacarídico por medio de un sistema de CL-EM; (b) medir la muestra en el mismo sistema de CL-EM; (c) comparar los resultados de (a) y (b) para analizar de este modo dicho componente polisacarídico en dicha muestra. En una realización ventajosa, el glicoconjugado es una glicoproteína.

En una realización preferida, el glicoconjugado, preferentemente una glicoproteína, se encuentra en su estado nativo. Por lo tanto, como no se requiere liberación enzimática, por ejemplo, liberación mediada por PNGasa F, del componente de PS de la proteína portadora, el método también es aplicable al análisis de glicoconjugados que no son susceptibles a dicha escisión enzimática, por ejemplo, glicoconjugados que comprenden motivos de azúcar que no están dentro de la especificidad de sustrato de la PNGasa F, tales como motivos de azúcar que comprenden N-acetilglicosamina (GlcNAc) unida a una alfa 1,3-fucosa. Como se explica con más detalle a continuación, el método inventivo proporciona información sobre al menos dos y preferentemente más, más preferentemente todos, de entre

(i) la identidad de los polisacáridos en,
(ii) la cantidad absoluta de polisacárido unido a otra entidad química del glicoconjugado, tal como proteína, en,
(iii) la cantidad de polisacárido libre en,
(iv) la cantidad e identidad de modificaciones tales como acetilación en polisacárido unido y libre, y
(v) la pureza de, muestras que contienen glicoconjugados, particularmente composiciones farmacéuticas a base de glicoproteína. Este aspecto de la invención, particularmente las etapas del proceso y los términos utilizados, se explicarán con más detalle a continuación:

Glicoconjugado: El término se ha analizado anteriormente. El método inventivo es ampliamente aplicable y se puede usar para analizar glicoproteínas (incluyendo proteoglicanos, peptidoglicanos y glicopéptidos) y glicolípidos.

Glicoproteína: El término se ha analizado anteriormente. Específicamente se refiere a un producto de conjugación, en donde un polisacárido (es decir, un glicano) está acoplado covalentemente a una proteína portadora. El conjugado puede ser un bioconjugado, que es un producto de conjugación preparado en una célula hospedadora, en donde la maquinaria de la célula hospedadora produce el glicano y la proteína, y une el glicano a la proteína portadora, por ejemplo, a través de uniones N de asparagina o arginina. El conjugado también se puede preparar mediante unión química de la proteína y la cadena de glicano, por ejemplo, mediante alquilación de tiol. El método inventivo es aplicable a todos los tipos de conjugación. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que no es relevante cómo se une el azúcar, siempre y cuando esté fragmentado en la fuente mediante la EM. Si se produce o no fragmentación en la interfaz proteína-glicano, esto no es relevante, ya que el material de referencia mostrará la misma fragmentación.

Los glicoconjugados particularmente útiles incluyen proteínas portadoras a las que están unidos uno o más polisacáridos. Estos glicoconjugados se utilizan, por ejemplo, como componentes activos de determinadas vacunas, que tienen como objetivo inducir respuestas inmunitarias funcionales contra los polisacáridos de los glicoconjugados. En realizaciones de la invención, dicha glicoproteína comprende una proteína portadora y uno o más polisacáridos unidos covalentemente a dicha proteína portadora, preferentemente de 1 a 4 polisacáridos unidos covalentemente a dicha proteína portadora.

En realizaciones de la invención, la glicoproteína es un producto de conjugación que contiene un antígeno O de *E. coli* unido covalentemente a una proteína portadora. El término antígeno O se conoce en el campo y se usa en su contexto normal, y no se debe confundir con O-unido. La expresión antígeno O generalmente se refiere a un polímero de glicano repetitivo contenido dentro de un LPS de una bacteria, tal como *E. coli*. El antígeno O de *E. coli* es un polímero de oligosacáridos de repetición inmunogénicos (normalmente de 1 a 40 unidades de repetición) y normalmente se usa para el serotipado y la producción de vacunas glicoconjugadas.

Proteína portadora: En realizaciones de la invención, la proteína portadora se selecciona del grupo que consiste en exotoxina A detoxificada de *P. aeruginosa* (EPA), flagelina de *E. coli* (FliC), CRM197, proteína de unión a maltosa (MBP), toxoide diftérico, toxoide tetánico, hemolisina A detoxificada de *S. aureus*, factor de agregación A, factor de agrupación B, enterotoxina termolábil de *E. coli*, variantes detoxificadas de la enterotoxina termolábil de *E. coli*, subunidad B de la toxina colérica (CTB), toxina colérica, variantes detoxificadas de la toxina colérica, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de la proteína Sat de *E. coli*, neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, hemocianina de lapa californiana (KLH), PcrV de *P. aeruginosa*, proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (OMPC) y proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipificable. En una realización particular, la proteína portadora es una exotoxina A detoxificada de *Pseudomonas aeruginosa* (EPA). En dichas realizaciones, la EPA comprende preferentemente de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10, preferentemente de 2 a 4, sitios de glicosilación.

En una realización particular, la EPA comprende cuatro sitios de glicosilación. Véase, por ejemplo, el documento WO 2017/035181 para obtener una descripción de ejemplos de bioconjugación de polisacáridos de antígeno *O* de *E. coli* a la proteína portadora EPA.

Polisacárido: El término se ha analizado anteriormente. Los polisacáridos adecuados comprenden de 1 a 100, tal como 1-50, 1-40, 1-30, 1-20 y 1-10, 3-50, 3-40, por ejemplo, al menos 5, tal como 5-40, por ejemplo, 7-30, por ejemplo, de 7 a 25, por ejemplo, de 10 a 20, por ejemplo, 5 - 20, unidades de repetición n. Dichas unidades de repetición contienen (es decir, comprenden o consisten en) (i) monosacáridos no modificados y/o (ii) monosacáridos modificados. La expresión "monosacáridos modificados" se refiere en particular a monosacáridos químicamente modificados y en realizaciones no limitantes incluyen N-acetilación, O-acetilación, amidación y/o aminación de monosacáridos. Dichos monosacáridos modificados pueden comprender una o más modificaciones, particularmente una, dos o tres de las modificaciones anteriores, en el mismo monosacárido.

En realizaciones de la invención, las unidades de repetición adecuadas comprenden monosacáridos seleccionados del grupo que consiste en manosa, ramnosa, glucosa, fucosa, galactosa, manosa modificada, ramnosa modificada, glucosa modificada, fucosa modificada y galactosa modificada. Se muestran estructuras no limitantes y de ejemplo de polisacáridos de antígeno *O* de *E. coli* a continuación en la Tabla 1. Se muestra una única unidad de repetición para cada polisacárido de antígeno *O* de *E. coli*. En esta tabla, n es independientemente un número entero de 1 a 100, tal como 1-50, 1-40, 1-30, 1-20 y 1-10, 3-50, 3-40, por ejemplo, al menos 5, tal como 5-40, por ejemplo, 7-30, por ejemplo, de 7 a 25, por ejemplo, de 10 a 20, por ejemplo, 5 - 20, pero en algunos casos puede ser 1-2.

Tabla 1: Estructuras de polisacáridos de antígeno O de *E. coli*

Polisacárido de antígeno O de *E. coli* Estructura de la unidad de repetición
Polisacárido de antígeno O4 (O4) α-D-Glc*p* 1 ↓ 3 $[\rightarrow 2)$-α-L-Rha*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→$]_n$
Polisacárido de antígeno O1A (O1A) $[\rightarrow 3)$-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*NAc-(1→$]_n$ 2 ↑ 1 β-D-Man*p*NAc
Polisacárido de antígeno O2 (O2) $[\rightarrow 3)$-α-L-Rha*p*-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*NAc-(1→$]_n$ 2 ↑ 1 α-D-Fuc*p*3NAc
Polisacárido de antígeno O6A (O6) $[\rightarrow 4)$-α-D-Gal*p*NAc-(1→3)-β-D-Man*p*-(1→4)-β-D-Man*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→$]_n$ 2 ↑ 1 β-D-Glc*p*
Polisacárido de antígeno O8 (O8) **α-D-Man*p*3Me-(1→[3)-β-D-Man*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→$]_n$**
Polisacárido de antígeno 015 (015) **$[\rightarrow$2)-β-D-Gal*p*-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→$]_n$**
Polisacárido de antígeno 016 (016) $[\rightarrow 2)$-β-D-Gal*f*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→$]_n$ 2 ↑ Ac

(continuación)

Polisacárido de antígeno O de *E. coli* Estructura de la unidad de repetición
Polisacárido de antígeno O18A (O18A) $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}p\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{NAc-}(1\rightarrow]_n$ 3 ↑ 1 β-D-Glc*p*NAc
Polisacárido de antígeno O25B (O25B) β-D-Glc*p* 1 ↓ 6 $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc-}(1\rightarrow]_n$ 3 2 ↑ ↑ 1 Ac α-L-Rha*p*
Polisacárido de antígeno O75 (O75) β-D-Man*p* 1 ↓ 4 $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}p\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc-}(1\rightarrow]_n$

Muestra: El término muestra se conoce en el campo. Incluye cualquier material que, opcionalmente después de su dilución, se puede suministrar a un sistema analítico. Dichas muestras incluyen particularmente (i) lotes de producción de glicoconjugado (incluyendo lotes en proceso y lotes de producción liberados/almacenados); (ii) composiciones que comprenden múltiples glicoconjugados, tales como composiciones farmacéuticas que comprenden una vacuna multivalente.

Las muestras adecuadas comprenden, además del glicoconjugado, (i) una matriz acuosa; (ii) opcionalmente proteína portadora libre de polisacáridos (o péptido libre en el caso de glicopéptidos; o lípidos libres en el caso de los glicolípidos), (iii) opcionalmente polisacáridos no unidos a una proteína portadora (o péptido o lípido, en este caso: "PS libre"), (iv) proteínas opcionalmente no relacionadas (o péptidos o lípidos). La matriz acuosa (i) puede contener uno o más tampones (por ejemplo, tampón de fosfato), sales inorgánicas (por ejemplo, NaCl), alcoholes de azúcar (por ejemplo, D-sorbitol), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Polisorbato 80). Las proteínas no relacionadas (iv) pueden incluir hasta un 10 %, hasta un 50 % o incluso hasta un 90 % de impurezas relacionadas con el proceso (por ejemplo, proteínas de la célula hospedadora). Se considera particularmente beneficioso que el método inventivo sea tolerante a una amplia diversidad de componentes adicionales en la muestra. Por lo tanto, es adecuado analizar una muestra sin una preparación laboriosa y que contenga materiales que de otro modo interferirían con los protocolos analíticos convencionales.

En una realización, la muestra comprende **un único glicoconjugado.**

En una realización adicional, la muestra comprende **una multitud de glicoconjugados,** tal como 2 - 20, por ejemplo, 4 - 10 glicoconjugados. De nuevo, los glicoconjugados se refieren preferentemente a glicoproteínas. Por lo tanto, el método inventivo también permite el análisis de muestras complejas que comprenden una multitud de glicoconjugados, por ejemplo, que tienen glicanos de múltiples serotipos. Por lo tanto, incluso muestras complejas para la liberación de un medicamento, tales como una vacuna conjugada multivalente, se pueden analizar mediante el método inventivo. Es evidente que el método inventivo avanza en la producción de medicamentos que comprenden una multitud de serotipos y mejora la calidad y seguridad de dichos medicamentos complejos.

Es evidente que el método inventivo también es adecuado para verificar la ausencia de glicoconjugados, por ejemplo, muestras en blanco y, por lo tanto, en determinadas realizaciones una muestra no comprende glicoconjugado.

En una realización, la muestra comprende una proteína portadora o péptido portador. En otra realización, la muestra comprende **más de una proteína portadora o péptido portador.** Por lo tanto, el método inventivo es adecuado para analizar muestras que comprenden múltiples glicoproteínas/glicopéptidos diferentes, no sólo que comprende

diferentes patrones de glicosilación de la misma proteína/péptido portador, sino que también difieren en la proteína/péptido portador. El término proteína/péptido portador se refiere así a una única proteína/péptido portador como se ha descrito anteriormente y también a una multitud de proteínas/péptidos portadores, tal como 2-10, por ejemplo, en una muestra hay presentes de 2 a 5 proteínas/péptidos portadores diferentes.

Método analítico: El método de acuerdo con la invención permite la identificación y cuantificación absoluta del **contenido total de componentes polisacarídicos** en una muestra. Además, el método de la invención es capaz de diferenciar entre la cantidad de polisacáridos unidos y libres en la muestra. En consecuencia, en una realización, la invención proporciona un método para identificar y cuantificar el **contenido de polisacáridos unidos y libres** en una composición que comprende al menos un glicoconjugado. Además, el método de la invención es capaz de confirmar la **ausencia de un componente polisacarídico** (PS unido y/o libre) en una muestra.

Como se ha analizado anteriormente, el método de la invención comprende 3 etapas: (a) calibrar; (b) medir; (c) identificar y cuantificar el componente polisacarídico de un glicoconjugado, en donde preferentemente el glicoconjugado está en su estado nativo. Estas etapas se explicarán con más detalle a continuación y se ilustran con más detalle en los ejemplos en las figuras proporcionadas:

Etapa (a), establecer una curva de calibración del componente polisacarídico mediante un sistema de CL-EM: Para preparar una curva de calibración, se someten alícuotas de un material de referencia a un sistema de CL-EM. El material de referencia es una muestra con identidad conocida y cantidad absoluta conocida de dicho uno o más componentes polisacarídicos. Dicho material de referencia se puede obtener sometiendo una muestra que comprende el componente polisacarídico a un protocolo analítico convencional.

En una realización de la invención, la etapa (a) incluye la preparación de un material de referencia y la calibración de un sistema de CL-EM con dicho material de referencia. La preparación de un material de referencia se puede lograr de acuerdo con las etapas a1-a3 y opcionalmente a4-a5 como se esboza a continuación. La calibración de un material de referencia se puede lograr de acuerdo con la etapa a6 como se esboza a continuación.

Etapa (a1): Esta etapa comprende la determinación de la identidad de dicha glicoproteína en el material de referencia. Los métodos analíticos adecuados son conocidos en sí e incluyen, por ejemplo, electroforesis por transferencia Western o EM.

Etapa (a2): La siguiente etapa comprende la determinación del contenido total de polisacáridos (PS) de dicha glicoproteína en el material de referencia. Los métodos analíticos adecuados son conocidos en sí e incluyen, por ejemplo, IC-PAD después de la hidrólisis.

Etapa (a3): La siguiente etapa comprende la determinación del contenido de PS libres en el material de referencia. Los métodos analíticos adecuados son conocidos en sí e incluyen, por ejemplo, IC-PAD después de la hidrolización y separación de PS unidos y no unidos.

Etapa (a4): La siguiente etapa opcional comprende la determinación del grado de modificación (en realizaciones específicas la modificación es O-Acetilación) de dicha glicoproteína. Los métodos analíticos adecuados son conocidos en sí e incluyen, por ejemplo, cromatografía de iones IC-CD después de la eliminación de grupos modificadores (por ejemplo, liberación de grupos O-acetilo mediante hidrólisis).

Etapa (a5): La siguiente etapa opcional comprende la determinación de la pureza de dicha glicoproteína en el material de referencia. Los métodos analíticos adecuados son conocidos en sí e incluyen, por ejemplo, RP-HPLC y/o SEC.

Siguiendo las etapas (a1...a3) y opcionalmente (a4...a5) se obtiene un material de referencia que comprende el componente polisacarídico de una glicoproteína. Se preparan alícuotas del mismo para la siguiente etapa (a6). Dichas alícuotas del material de referencia contienen un componente polisacarídico en una concentración conocida, es decir, en una cantidad absoluta conocida.

Etapa (a6): Esta etapa incluye la medición de alícuotas del material de referencia mediante un sistema de CL-EM. Los datos obtenidos (incluyendo el tiempo de retención, la identificación de picos, la determinación de ABC) permiten establecer una curva de calibración. En esta etapa, el material de referencia se separa a través de CL en primer lugar, el eluato se somete a fragmentación en la fuente (ISF) dentro del detector de EM adaptando el voltaje de ionización (voltaje de cono). Se entiende que la etapa a6 se realiza después de obtener alícuotas del material de referencia. Dicha curva de calibración es específica del sistema de CL-EM y de los parámetros utilizados.

Como se ha esbozado anteriormente, la glicoproteína está preferentemente en su estado nativo. Sin embargo, en realizaciones alternativas, es posible digerir la glicoproteína con una peptidasa, por ejemplo, con tripsina, antes de someter la muestra al etapa de CL-EM del análisis. Dicha digestión con una peptidasa, por ejemplo, tripsina, sólo conduce a la escisión de uniones peptídicas pero no da como resultado la escisión de un enlace azúcar-péptido. En el caso de muestras que contienen glicoproteínas, dicha digestión conduce a la generación de glicopéptidos que se someten a la etapa de CL-EM del análisis. En ese caso, el material de referencia se digiere antes de realizar la etapa

(a6) y la muestra se digiere antes de realizar la etapa (b1). Los glicopéptidos resultantes todavía se pueden considerar en su estado nativo, es decir, no sometidos a (i) digestión enzimática con una enzima que elimina el componente polisacarídico de la proteína portadora ni a (ii) una reacción química, por ejemplo, derivatización, en cada caso antes de introducir la muestra en el sistema de CL-EM. El expero conoce la digestión de glicoproteínas con una peptidasa, por ejemplo, el tratamiento con tripsina.

En realizaciones preferidas de la invención, la muestra no se digiere con una enzima, tal como una peptidasa.

Etapa (b), medir la muestra en el mismo sistema de CL-EM: La medición de una muestra en un sistema de CL-EM se conoce en sí, incluye (b1) proporcionar una muestra al sistema de CL-EM y (b2) medir la muestra en el sistema de CL-EM.

Es evidente para el experto que la calibración de la etapa (a) se puede usar para medir una única muestra en la etapa (b) o para medir una multitud de muestras en la etapa (b). Por lo tanto, las etapas (b1) y (2) se pueden realizar repetidamente para medir una multitud de muestras. Por ejemplo, 2 muestras del mismo serotipo, se miden con la misma curva de calibración proporcionando la primera muestra (b1) y midiendo la primera muestra (b2), seguido de proporcionar la segunda muestra (b1') y midiendo la segunda muestra (b2'). Por lo tanto, medir una muestra incluye medir una única muestra y medir una multitud de muestras.

Etapa (b1): Se pueden proporcionar muestras al sistema de CL-EM de cualquier manera conocida. Normalmente, se elige la inyección desde un vial que comprende la muestra en el sistema por medio de un muestreador automático. La muestra se podrá obtener directamente de un lote de fabricación. La muestra se puede diluir para que coincida con un intervalo de concentraciones de la curva de calibración. En el caso de muestras que contienen glicoproteínas, la muestra está preferentemente en su estado nativo.

En realizaciones alternativas, dicha muestra puede ser digerida con una peptidasa, tal como tripsina, para someter los glicopéptidos a análisis. Como se ha analizado anteriormente, los glicopéptidos resultantes todavía se pueden considerar en su estado nativo, es decir, no sometidos a (i) digestión enzimática con una enzima que elimina el componente polisacarídico de la proteína portadora ni a (ii) una reacción química, por ejemplo, derivatización, en cada caso antes de introducir la muestra en el sistema de CL-EM. Por lo tanto, en métodos de acuerdo con la invención, los enlaces azúcar-péptido no se escinden antes de someter la muestra al etapa de CL-EM del análisis.

En esa realización alternativa, el material de referencia también se digiere antes de realizar la etapa (a6).

En realizaciones preferidas de los métodos de la invención, la muestra no se digiere con una peptidasa, ni con ninguna enzima. Los métodos sin digestión enzimática tienen la ventaja de simplificar mucho el análisis.

Etapa (b2): De acuerdo con el método de la invención, la muestra se mide con los mismos parámetros que en la etapa (a6) anterior. Preferentemente, la muestra se mide en el mismo sistema de CL-EM que se usó para preparar la curva de calibración. Preferentemente, la muestra se mide dentro de las 8 horas posteriores a que se estableciera la curva de calibración. Todas estas medidas mejoran la calidad de los datos; son conocidos por el experto y tienen en cuenta la sensibilidad de los sistemas de CL-EM frente a factores externos.

En una primera realización, la medición de la muestra incluye

- la determinación de la **identidad** de la muestra y
- la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína

Esto permite determinar la cantidad absoluta de la cadena de glicano.

En una segunda realización, la medición de la muestra incluye

- la determinación de la **identidad** de la muestra y
- la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína y
- la determinación del **contenido de PS acetilados** de la glicoproteína.

Esto permite determinar adicionalmente el grado de acetilación en la muestra.

En una tercera realización, la medición de la muestra incluye

- la determinación de la **identidad** de la muestra y
- la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína y
- determinación de la **pureza de la muestra.**

En una cuarta realización, la medición de la muestra incluye

• la determinación de la **identidad** de la muestra y
• la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína y
• la determinación del contenido de **PS acetilados** de la glicoproteína y
• determinación de la **pureza** de la muestra.

En una quinta realización, la medición de la muestra incluye

• la determinación de la **identidad** de la muestra y
• la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína y
• la determinación del contenido de **PS libre**.

Esto permite determinar adicionalmente la cantidad (relativa o absoluta) de glicano no conjugado.

En una sexta realización, la medición de la muestra incluye

• la determinación de la **identidad** de la muestra y
• la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína y
• la determinación del **contenido de PS acetilados** de la glicoproteína y
• la determinación del **contenido de PS libre.**

Esto permite determinar adicionalmente la cantidad (relativa o absoluta) de glicano no conjugado considerando también el grado de PS acetilados unidos.

En una séptima realización, la medición de la muestra incluye

• la determinación de la **identidad** de la muestra y
• la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína y
• la determinación del contenido de **PS acetilados** de la glicoproteína y
• la determinación del contenido de PS libres y
• la determinación del contenido de **PS acetilados libres**.

Esto permite determinar adicionalmente la cantidad de PS acetilados libre.

En una octava realización, la medición de la muestra incluye

• la determinación de la **identidad** de la muestra y
• la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína y
• la determinación del **contenido de PS libres** de la muestra y
• la determinación de la **pureza** de la muestra.

En una novena realización, la medición de la muestra incluye

• la determinación de la **identidad** de la muestra y
• la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína y
• la determinación del **contenido de PS acetilados** de la glicoproteína y
• la determinación del **contenido de PS libres** de la muestra, y
• la determinación de la **pureza** de la muestra.

En una décima realización, la medición de la muestra incluye

• la determinación de la **identidad** de la muestra y
• la determinación del **contenido de PD** de la glicoproteína y
• la determinación del **contenido de PS acetilados** de la glicoproteína y
• la determinación del **contenido de PS libres** de la muestra y
• la determinación del contenido de **PS acetilados libres** de la muestra y
• la determinación de la **pureza** de la muestra.

Por lo tanto, en realizaciones de la invención, se consigue la determinación **simultánea** de la identidad de la muestra y uno o más de los siguientes: el contenido de PS, el contenido de PS acetilados, el contenido de PS libres, el contenido de PS acetilados libres y la pureza de la muestra. Cabe de destacar que, la determinación simultánea de la identidad de la muestra y los siguientes parámetros por lo general no es posible en el caso de métodos que implican una etapa de preparación de la muestra para liberar los glicanos de la molécula portadora, por ejemplo, una proteína portadora, o que implican la derivatización de la glicoproteína (se introduce impureza adicional): el contenido de PS libres, el contenido de PS acetilados libres y la pureza de la muestra.

En otras realizaciones, el método para el análisis de un componente polisacarídico de una glicoproteína en una

muestra con respecto a los aspectos esbozados en la primera a la décima realización comprende las etapas de: (a) establecer una curva de calibración de dicho componente polisacarídico por medio de un sistema de CL-EM, en donde esta etapa (a) incluye la preparación de un material de referencia (etapas a1-a3 y opcionalmente a4-a5) y calibrar un sistema de CL-EM con dicho material de referencia (etapa a6) y en donde la curva de calibración se establece mediante la separación de los alícuotas de dicho material de referencia a través de CL, y someter el eluato de la CL a fragmentación en la fuente dentro del detector de EM ajustando el voltaje de ionización; (b) medir la muestra en el mismo sistema de CL-EM usando los mismos parámetros que en la etapa a (a6) con el mismo sistema de CL-EM; (c) comparar los resultados de (a) y (b) para analizar de este modo dicho componente polisacarídico en dicha muestra.

Cabe de destacar que, no se requiere fragmentación adicional, por ejemplo, usando CID o ETD. Por lo tanto, en una realización, la invención como se describe en el presente documento proporciona un método, donde no se requiere fragmentación adicional del ion que se obtiene después de la fragmentación en la fuente.

En una realización, la invención proporciona un método como se describe en el presente documento, dónde no se añade **ningún patrón interno** a la muestra. Con el fin de proporcionar resultados fiables, se consideró suficiente generar una curva de calibración separada. Se considera beneficioso que no sea necesario usar un patrón interno ya que su omisión reduce las etapas de manipulación y, por lo tanto, simplifica el método.

La **pureza** de una muestra se puede determinar de manera conocida, por ejemplo, a través del detector de índice de refracción, a través del detector UV, de la parte de CL del sistema de CL-EM. Como alternativa, o además, la pureza se puede determinar mediante la EM. Esto se puede hacer observando la corriente iónica total.

Etapa (c), comparar los resultados de (a) y (b) para analizar de este modo el componente polisacarídico en la muestra: Hasta ahora, los sistemas de CL-EM no se usaron para la cuantificación absoluta de un componente polisacarídico en un glicoconjugado frente a una curva de calibración. En consecuencia, la etapa (c) incluye (c1) la identificación de picos característicos para cada PS en la muestra y (c2) comparar el área bajo la curva (ABC) para dicho pico con la curva de calibración. Es evidente para el experto que en realizaciones en las que la medición de una muestra en la etapa (b) se repitió para una multitud de muestras (por ejemplo, del mismo serotipo o que incluyen la misma glicoproteína) como se describió anteriormente, la etapa (c) se puede repetir análogamente para cada muestra, usando la misma curva de calibración.

En un **segundo aspecto,** la invención se refiere al uso de un sistema de cromatografía de líquidos - espectrometría de masas ("sistema de CL-EM") para analizar un componente polisacarídico de un glicoconjugado en una muestra. En una realización preferida, dicha glicoproteína está en su estado nativo. Las definiciones anteriores, tales como "muestra", "glicoconjugado", "polisacárido", "proteína portadora" y "estado nativo" son aplicables análogamente a este segundo aspecto de la invención. Particularmente, el término "glicoconjugado" incluye el significado de "glicoproteína" y más específicamente de una "proteína portadora a la que están unidos uno o más polisacáridos". Este aspecto de la invención se explicará con mayor detalle a continuación:

Análisis: De nuevo, es importante señalar que dicho análisis incluye tanto, la **identificación** de dicho componente polisacarídico, **como** la **cuantificación absoluta** de dicho componente polisacarídico. La **identificación** de un componente de PS incluye la confirmación de presencia y la confirmación de ausencias de dicho componente de PS. Por lo tanto, si se espera que un componente de PS específico esté presente en la muestra, por ejemplo, ya que la muestra proviene de un lote de producción, la identificación de dicho componente de PS es la confirmación de su presencia. Análogamente, se puede esperar que un componente específico de PS esté ausente en una muestra, lo que también se puede confirmar. La **cuantificación absoluta** de dicho componente de PS incluye la determinación de la concentración medida, por ejemplo, en µg [componente de PS]/ml [Muestra].

En las realizaciones, la invención también se refiere al uso de un sistema de CL-EM para el **control en proceso** en la producción de glicoconjugados, particularmente para el control en proceso en la producción de vacunas glicoconjugadas.

En las realizaciones, la invención también se refiere al uso de un sistema de CL-EM para el **control de la liberación** de los glicoconjugados producidos, particularmente para el control de la liberación en la producción de vacunas glicoconjugadas. Por lo tanto, el sistema de CL-EM se puede usar como **ensayo de liberación** para un fármaco o un medicamento; comprendiendo dicho fármaco o medicamento uno o más glicoconjugados, particularmente una o más vacunas glicoconjugadas.

En las realizaciones, la invención también se refiere al uso de un sistema de CL-EM para el **control de la estabilidad** de los glicoconjugados almacenados, particularmente para el control de la estabilidad de vacunas glicoconjugadas almacenadas. Por lo tanto, el sistema de CL-EM se puede usar como **ensayo de vida útil** de un fármaco o de un medicamento; comprendiendo dicho fármaco o medicamento uno o más glicoconjugados, particularmente una o más vacunas glicoconjugadas.

En las realizaciones, la invención también se refiere al uso de un sistema de CL-EM para la **optimización** de **procesos** en el desarrollo de la fabricación de glicoconjugados, particularmente la fabricación de vacunas glicoconjugadas. Usar

un sistema de CL-EM como se describe en el presente documento simplifica significativamente la identificación de parámetros críticos y, por lo tanto, permite un desarrollo más rápido y acorta los plazos durante el aumento de escala.

Sistema de CL-EM: Los sistemas de HPLC conectados a un detector espectrométrico de masas se denominan habitualmente sistemas de CL-EM. Estos detectores son capaces de determinar la masa molecular de un analito específico presente en una muestra. Su precisión y exactitud de masa con frecuencia se denominan el criterio de referencia para determinar las masas moleculares de las moléculas.

Un efecto secundario conocido del análisis de glicoconjugados, tales como glicoproteínas, en un sistema de CL-EM, es la fragmentación del glicano al inyectar la muestra en el detector. Este efecto se denomina "fragmentación en fuente" (ISF, por sus siglas en inglés) y está relacionado con el voltaje aplicado durante la inyección (el denominado "voltaje de cono"). La ISF no es ideal para un detector de EM de buen rendimiento, ya que puede generar fragmentos de iones desconocidos o no identificables en muestras complejas.

Por lo tanto, los proveedores realizan pruebas de ISF baja durante la calificación del rendimiento del sistema (<2 %).

En el campo de la EM, la ISF es comúnmente conocida y no es deseable para las pruebas de ocupación de glicanos, ya que puede eliminar totalmente la modificación por glicanos de la parte restante del conjugado (por ejemplo, la cadena peptídica de un glicopéptido). Por otra parte, la fragmentación de azúcar se realiza para identificar y caracterizar adicionalmente la composición de monosacáridos mediante iones indicadores. Sin embargo, esta fragmentación por lo general requiere una energía mucho mayor y, por lo tanto, diferentes técnicas de EM (CID, ETD).

Los inventores han descubierto sorprendentemente que los glicoconjugados sometidos a análisis por CL-EM muestran el efecto de ISF, que separa la unidad de repetición de glicano, claramente visible como un pico distinto de la masa correspondiente (Figura 1A). Después de ajustar el voltaje de cono, el efecto no sólo es visible cuando se inyecta un único glicoconjugado sino también en mezclas más complejas, como una composición que comprende múltiples glicoconjugados (Figura 1B). Como este efecto ocurre para todos los polisacáridos de diferentes serotipos y cada polisacárido específico de serotipo tiene una masa distintiva, se puede usar para identificar el serotipo específico (a través de su polisacárido) en la muestra que se ha de analizar.

En una realización, sl sistema de CL-EM es un sistema de CL-EM con fragmentación en la fuente del eluato obtenido de la cromatografía de líquidos. Dichos sistemas están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Waters Corporation, Sciex, ThermoFisher Scientific.

En una realización, el sistema de CL-EM comprende además una válvula de desvío delante del detector de EM. Dicha válvula permite desviar sólo una fracción del eluato hacia el detector de EM. De nuevo, dichos sistemas están disponibles en el mercado.

En las realizaciones, la glicoproteína es como se ha definido anteriormente, comprende particularmente una proteína portadora y uno o más polisacáridos unidos covalentemente a dicha proteína. En determinadas realizaciones, la muestra comprende más de una proteína portadora, llevando, cada una, uno o más polisacáridos unidos covalentemente.

En las realizaciones, la proteína portadora es como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, se selecciona del grupo que consiste en exotoxina A detoxificada de *P. aeruginosa* (EPA), flagelina de *E. coli* (FliC), CRM197, proteína de unión a maltosa (MBP), toxoide diftérico, toxoide tetánico, hemolisina A detoxificada de *S. aureus*, factor de agregación A, factor de agrupación B, enterotoxina termolábil de *E. coli*, variantes detoxificadas de la enterotoxina termolábil de *E. coli*, subunidad B de la toxina colérica (CTB), toxina colérica, variantes detoxificadas de la toxina colérica, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de la proteína Sat de *E. coli*, neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, hemocianina de lapa californiana (KLH), PcrV de *P. aeruginosa*, proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (OMPC) y proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipificable. En una realización particular, la proteína portadora es una exotoxina A detoxificada de *Pseudomonas aeruginosa* (EPA).

En las realizaciones, los polisacáridos son como se han definido anteriormente. Por ejemplo, los polisacáridos comprenden 1 - 100, tales como 5 - 20 unidades de repetición. En la Tabla 1 se muestran estructuras de ejemplo, anteriormente.

En las realizaciones, la muestra comprende además una matriz acuosa; opcionalmente proteína portadora (o lípido o péptido) libre de polisacáridos; opcionalmente polisacáridos no unidos a una proteína portadora (o lípido o péptido); y opcionalmente proteínas no relacionadas.

La lista de **referencias** proporciona información adicional en el contexto de la presente invención.

(1) thermofisher.com/ch/en/home/industrial/chromatogr aphy/chromatography-learning-center/ion-chromatography-information/ion-chromatography-analysis-analyte/analyzing-carbohydrates-hpae-pad-ion-chromatography.html

(2) Mazsaroff *et al.*, *Anal. Chem.*, 1997
(3) Ivancic *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 2010
(4) US 2020/041470
(5) Echeverria *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2015
(6) Jeong *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2012

Para ilustrar adicionalmente la invención, se proporcionan los siguientes **ejemplos**. Estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención.

I. Preparación del material de referencia

Una muestra de glicoproteína en cantidades mayores se obtiene directamente de un lote de fabricación y se divide en alícuotas y se almacena adecuadamente (por ejemplo, -80 °C). Los diferentes etapas de caracterización se realizan sobre alícuotas descongeladas de dicha muestra de glicoproteína.

1) Determinar la identidad correcta del material de referencia. Se sigue un protocolo de transferencia Western convencional usando un anticuerpo específico que se ha seleccionado y probado para determinar su especificidad para la cadena polisacarídica de la glicoproteína de interés. Opcionalmente, la identidad correcta de la proteína portadora se determina usando un anticuerpo específico para la proteína portadora.

2) Determinar el contenido de polisacárido total dentro del material de referencia. Se realiza una hidrólisis ácida total en monosacáridos con posterior análisis mediante cromatografía de iones y detección amperométrica pulsada (IC-PAD), de acuerdo con las siguientes instrucciones.

Tomar una alícuota del material de referencia e hidrolizar durante 2 h a 120 °C usando ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final de 1,8 M. Las condiciones óptimas de hidrólisis (temperatura, concentración de TFA y tiempo) pueden variar dependiendo de la concentración inicial de los polisacáridos. Las condiciones óptimas deben demostrar que se liberan cuantitativamente todos los monosacáridos de la cadena polisacarídica sin degradación adicional de la molécula de monosacárido objetivo para la cuantificación absoluta.

Después de la hidrólisis, enfriar la muestra a temperatura ambiente y después secarla usando un SpeedVac, normalmente a 30 °C durante la noche. Resuspender totalmente la muestra seca en H2O (grado MilliQ) y transferir la muestra a un vial de HPLC. Preparar un conjunto de patrones de calibración usando un monosacárido disponible en el mercado (por ejemplo, manosa). Si el monosacárido objetivo para la cuantificación sufre modificaciones durante la etapa de hidrólisis mencionada anteriormente (por ejemplo, la N-acetilglucosamina se convierte en glucosamina), usar el monosacárido adecuado o, como alternativa, realizar también el procedimiento de hidrólisis mencionado anteriormente en el conjunto de patrones de calibración.

Preparar un sistema de cromatografía de iones (por ejemplo, Dionex ICS-5000) equipado con un detector amperométrico pulsado (PAD) que tiene instalado un electrodo de oro desechable sobre politetrafluoroetileno (PTFE). Usar una columna analítica Dionex CarboPac PA1 (4x 250 mm) y, opcionalmente, una columna protectora Dionex CarboPac PA1 (4x 50 mm).

Equilibrar el sistema con Eluyente A, NaOH 16 mM para la elución de la muestra, y Eluyente B, NaOH 500 mM para la limpieza de la columna. Inyectar secuencialmente la muestra y el conjunto de patrones de calibración usando el siguiente método de instrumento/perfil de gradiente:

- 0 a 24 min, 100 % de Eluyente A, caudal de 1 ml/min (elución)
- 25 a 32 min, 100 % de Eluyente B, caudal de 1 ml/min (lavado)
- 33 a 60 min, 100 % de Eluyente A, caudal de 1 ml/min (reequilibrar)

Dependiendo del monosacárido objetivo, es posible que sea necesario optimizar estos gradientes.

Usar el área bajo la curva del conjunto de calibración medido para obtener una curva de calibración y después cuantificar la muestra desconocida. Opcionalmente, la cantidad de monosacárido objetivo después se usa para volver a calcular la cantidad absoluta de unidades de repetición/polisacáridos en ug/ml en la muestra de glicoproteína.

3) Determinar el contenido de polisacáridos libres dentro del material de referencia. Los polisacáridos unidos a una proteína portadora se eliminan mediante un cartucho C4, seguido de una hidrólisis ácida total en monosacáridos con análisis posterior mediante cromatografía de iones y detección amperométrica pulsada. Dependiendo del tamaño de la glicoproteína, se puede elegir una longitud de polímero de carbono diferente del material del cartucho (por ejemplo, cartucho C8) para retener totalmente la proteína portadora.

Debido a que la etapa de preparación de la muestra es laboriosa, se recomienda usar un monosacárido adicional que no esté presente en el material de referencia como patrón interno (por ejemplo, galactosa) para compensar la posible pérdida de muestra durante la preparación.

Tomar dos alícuotas del material de referencia y añadir la misma cantidad de patrón interno. Equilibrar un cartucho C4 (por ejemplo, Chromafix C4-SPE de Macherey-Nagel) de acuerdo con el manual del fabricante; por ejemplo, 5 volúmenes de columna de metanol al 100 %, después, 5 volúmenes de columna de acetonitrilo al 100 %, después 5 volúmenes de columna de acetonitrilo al 5 % v/v.

Durante la siguiente etapa, recoger el flujo que contiene el polisacárido libre: Aplicar una de las dos alícuotas sobre el cartucho y posteriormente aplicar 2 volúmenes de columna de acetonitrilo al 5 %. Medir el volumen del flujo recogido y añadir una cantidad igual de acetonitrilo al 5 % a la otra alícuota, que no se ha aplicado al cartucho C4. Secar ambas muestras preparadas usando un SpeedVac, normalmente a 30 °C durante la noche.

Resuspender totalmente ambas muestras secas en H2O (grado MilliQ) y después seguir el procedimiento mencionado anteriormente para la hidrólisis ácida total en monosacáridos: Añadir ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final de 1,8 M a ambas muestras e hidrolizar durante 2 h a 120 °C. (Las condiciones óptimas de hidrólisis pueden variar y se deben optimizar). Después de la hidrólisis, ambas muestras se enfrían a temperatura ambiente y después se secan usando un SpeedVac, normalmente a 30 °C durante la noche. Resuspender totalmente ambas muestras secas en H2O (grado MilliQ) y transferirlas a viales de HPLC.

Preparar un sistema de cromatografía de iones (por ejemplo, Dionex ICS-5000) equipado con un detector amperométrico pulsado (PAD) que tiene instalado un electrodo de oro desechable sobre politetrafluoroetileno (PTFE). Usar una columna analítica Dionex CarboPac PA1 (4x 250 mm) y, opcionalmente, una columna protectora Dionex CarboPac PA1 (4x 50 mm).

Equilibrar el sistema con Eluyente A, NaOH 16 mM para la elución de la muestra, y Eluyente B, NaOH 500 mM para la limpieza de la columna. Inyectar secuencialmente ambas muestras preparadas usando el siguiente método de instrumento/perfil de gradiente:

- 0 a 24 min, 100 % de Eluyente A, caudal de 1 ml/min (elución)
- 25 a 32 min, 100 % de Eluyente B, caudal de 1 ml/min (lavado)
- 33 a 60 min, 100 % de Eluyente A, caudal de 1 ml/min (reequilibrar)

Dependiendo del monosacárido objetivo, es posible que sea necesario optimizar estos gradientes.

Usar el área bajo la curva del monosacárido objetivo (por ejemplo, manosa) y el patrón interno aplicado (por ejemplo, galactosa) para normalizar las áreas medidas. El contenido de polisacáridos libres de la muestra analizada se determina comparando relativamente las áreas normalizadas de las dos alícuotas medidas: La alícuota tratada con cartucho C4 representa el porcentaje de polisacáridos libres dentro de la muestra en comparación con la alícuota no tratada con cartucho C4, que representa el 100 % de los polisacáridos disponibles. Usar el valor obtenido de polisacáridos libres para calcular a partir del contenido total de polisacáridos determinado anteriormente la cantidad de "polisacáridos unidos".

4) Determinar el grado de modificación de la cadena polisacarídica en el material de referencia. Esta etapa opcional describe la determinación de restos de azúcar O-acetilado que usa una hidrólisis alcalina suave seguida de un análisis posterior mediante cromatografía de iones y detección de conductividad.

Tomar una alícuota del material de referencia y realizar una etapa de desalinización para eliminar las moléculas de acetato libres en la muestra (por ejemplo, columna Zeba Spin, columna PD-10) siguiendo el manual del fabricante. Añadir un patrón interno a la muestra desalada (por ejemplo, propionato, 20 pg/ml) e hidrolizar durante 2 h a 37 °C usando NaOH a una concentración final de 10 mM. Las condiciones óptimas de hidrólisis (concentración de NaOH, temperatura y tiempo) pueden variar dependiendo de la concentración inicial de los polisacáridos. Las condiciones óptimas deben demostrar que se liberan cuantitativamente todos los grupos O-acetato de la cadena polisacarídica sin degradación adicional del acetato en la muestra.

Después de la hidrólisis, la muestra se enfría a temperatura ambiente y después se filtra para eliminar la proteína residual que podría interferir durante el análisis por HPLC (por ejemplo, filtro centrífugo, PES 3 kDa). Seguir el manual del fabricante para preparar los filtros y recoger el filtrado que contiene las moléculas de acetato liberadas.

Preparar un conjunto de patrones de calibración usando un patrón de acetato disponible en el mercado para cromatografía de iones. Los conjuntos de patrones de calibración deben contener la misma cantidad de patrón interno que se aplicó anteriormente (por ejemplo, propionato, 20 pg/ml).

Preparar un sistema de cromatografía de iones (por ejemplo, Dionex ICS-5000) equipado con un detector de conductividad y un supresor instalado. Usar una columna analítica Dionex IonPac AS11-HC (4x 250 mm) y, opcionalmente, una columna protectora Dionex IonPac AS11-HC (4x 50 mm). Equilibrar el sistema con Eluyente A, NaOH 1 mM para la elución de la muestra, y Eluyente B, NaOH 100 mM para la limpieza de la columna. Inyectar secuencialmente la muestra y el conjunto de patrones de calibración usando el siguiente método de instrumento/perfil de gradiente:

- 0 a 15 min, 100 % de Eluyente A, caudal de 1,5 ml/min, Supresor 4 mA, (elución)
- 16 a 21 min, 100 % de Eluyente B, caudal de 1,5 ml/min, Supresor 372 mA, (lavado)
- 22 a 25 min, 100 % de Eluyente A, caudal de 1,5 ml/min, Supresor 4 mA (reequilibrar)

Dependiendo del sistema de cromatografía de iones, la configuración del supresor puede variar.

Usar el patrón interno para normalizar el área bajo la curva para ambos, el conjunto de calibración medido y la muestra desconocida. Después usar la curva de calibración obtenida para cuantificar la concentración de acetato en la muestra desconocida. El grado de monosacárido O-acetilado se puede calcular determinando la relación de acetato por contenido de polisacárido determinado (como se ha descrito anteriormente).

5) Opcionalmente, determinar la pureza relativa del material de referencia. Esto se consigue mediante cromatografía de exclusión por tamaño y/o cromatografía de fase inversa. Seleccionar una columna adecuada para la glicoproteína objetivo (por ejemplo, Supelco TSKgel G3000SWXL para exclusión por tamaño, Cosmosil 5C4-AR-300 para fase inversa) y realizar la etapa de cromatografía de acuerdo con el manual del fabricante. Por ejemplo, la absorbancia medida a 215 nm se puede usar para determinar la pureza relativa de la glicoproteína en comparación con otros compuestos que absorben a 215 nm. Seguir el manual del software de HPLC para determinar la pureza relativa (en %) de la glicoproteína.

II. Análisis en el sistema de CL-EM

Una muestra de glicoproteína que se ha de analizar se obtiene directamente de un lote de fabricación. Para identificar y cuantificar el contenido de polisacáridos de dicha muestra, usar un material de referencia preparado de antemano como se ha descrito anteriormente que refleje la misma especie de glicoproteína, por ejemplo, albergando la misma estructura de glicano en la misma proteína portadora. La muestra que se ha de analizar también puede contener múltiples glicoproteínas diferentes, si el material de referencia utilizado en el protocolo que se menciona a continuación es idéntico en términos de composición y estructura de glicano.

Si no se menciona otra cosa, usar productos químicos de grado EM para preparar los eluyentes.

Nota: No es necesario derivatizar la glicoproteína que se ha de analizar (por ejemplo, a través de marcaje isotópico). Además, no se necesitan tratamientos enzimáticos, por lo tanto, no se requiere una preparación prolongada de la muestra antes del análisis. Se puede considerar que la glicoproteína que se ha de analizar está en su estado nativo como se ha descrito anteriormente. Además, no se añade ningún patrón interno para la cuantificación a la muestra, sino que basta con generar una curva de calibración separada.

1) Opcionalmente, realizar un intercambio de tampón de la muestra y el material patrón de referencia de calibración. Es posible que desee realizar esta etapa para evitar que determinados componentes de la matriz entren al detector de EM. Sin embargo, es probable que el intercambio de tampón también elimine fragmentos de polisacáridos libres, impidiendo de este modo una determinación correcta del contenido de polisacáridos libres dentro de dicha muestra. En su lugar, se recomienda usar una válvula de desvío entre el sistema de CL y EM que se pueda programar para desviar componentes no deseados hacia los desechos después de la elución de la cromatografía de líquidos.

Si se realiza, usar filtros centrífugos con un corte de peso molecular adecuado para intercambiar el tampón al menos 3 veces por eluyente A (H2O grado MilliQ, ácido fórmico al 0,1 % v/v). La cantidad de muestra (por ejemplo, 30 pg) depende de la glicoproteína de interés y debe optimizarse.

2) Preparar viales de HPLC con la muestra que se ha de analizar y el material de referencia. Las concentraciones óptimas dependen del sistema de CL-EM utilizado. Para crear una curva de calibración, los diferentes puntos de calibración del material de referencia se pueden adaptar inyectando el mismo volumen de diferentes concentraciones preparadas o inyectando diferentes volúmenes de la misma concentración. Esto depende de la linealidad del inyector del sistema de CL, así como de la muestra que se ha de analizar (por ejemplo, posibles interferencias por adsorción en el vial a lo largo del tiempo, etc.) y se debe optimizar para la muestra específica.

3) Preparar el sistema de CL-EM. Un HDMS ACQUITY-Synapt G2 de Waters, como sistema de ejemplo, se prepara calibrando el detector de EM de acuerdo con el manual del fabricante con NaI. Usar una columna de fase inversa adecuada para el sistema (por ejemplo, ACQUITY BEH300 C4, 1,7 um 2,1 x 150 mm, Waters) capaz de eluir la proteína. Dependiendo del tamaño de la glicoproteína que se ha de analizar, se puede elegir una longitud de polímero de carbono diferente del material de fase inversa (por ejemplo, C8 o C18) para retener y eluir la muestra adecuadamente. Equilibrar el sistema con eluyente A (H2O grado MilliQ, ácido fórmico al 0,1 % v/v) y Eluyente B (Acetonitrilo, ácido fórmico al 0,1 % v/v).

4) Inyectar secuencialmente la muestra y los puntos de calibración del material de referencia. Son adecuados los siguientes métodos de instrumento/perfil de gradiente:

- Inicial, 95 % de Eluyente A, 5 % de Eluyente B, caudal de 0,4 ml/min
- 1 min, 95 % de Eluyente A, 5 % de Eluyente B, caudal de 0,4 ml/min
- 9 min, 60 % de Eluyente A, 40 % de Eluyente B, caudal de 0,4 ml/min
- 11 min, 5 % de Eluyente A, 95 % de Eluyente B, caudal de 0,4 ml/min
- 12 min, 5 % de Eluyente A, 95 % de Eluyente B, caudal de 0,4 ml/min
- 12,5 min, 95 % de Eluyente A, 5 % de Eluyente B, caudal de 0,4 ml/min
- 15 min, 95 % de Eluyente A, 5 % de Eluyente B, caudal de 0,4 ml/min

Dependiendo de la glicoproteína objetivo y del sistema/columna utilizados, estos gradientes, así como las cantidades de inyección, se pueden adaptar.

5) Analizar las proteínas eluidas con los detectores adjuntos: Opcionalmente, adquirir la señal de absorbancia UV en la longitud de onda deseada. Si se desea una señal de absorbancia UV, es posible que sea necesario inyectar una mayor cantidad de muestra y optimizar la concentración de inyección. Opcionalmente, usar una válvula de división/desvío entre el sistema de CL y el de EM para evitar la sobresaturación del detector de EM. Usar el detector de EM del sistema (por ejemplo, espectrómetro cuadrupolo TOF Synapt G2 HDMS, Waters) con ionización por electropulverización en modo de resolución positiva. Obtener datos en las condiciones optimizadas de los instrumentos. Se usaron los siguientes parámetros en un espectrómetro TOF Synapt G2 HDMS:

- Tiempo de barrido de 1 segundo
- Voltaje capilar de 3 kV
- Voltaje del cono de muestreo de 37 V
- Temperatura de la fuente 120 °C
- Temperatura de desolvatación 450 °C
- Flujo de gas del cono de 20 L/H
- Flujo del gas de desolvatación 550 L/H.
- Función de EM 500-2000 Da con trampa de 4 eV y sin energía de colisión de transferencia.
- Opcionalmente: Obtener la función MSMS 100-1000 Da en la masa objetivo con trampa de 4 eV y energía de colisión de transferencia en rampa de 18-25 eV.
- Bloquear la obtención de pulverización de Leucina Encefalina a intervalos de 30 segundos.

El parámetro crítico es el voltaje de cono de muestreo, dando como resultado la fragmentación en la fuente de la cadena de glicano. Dependiendo de la glicoproteína que se ha de analizar, es posible que sea necesario optimizar este voltaje de cono.

6) Procesar los datos adquiridos. El procesamiento de datos se realiza usando los paquetes de software proporcionados por el fabricante (por ejemplo, MassLynx, Waters). En primer lugar, combinar espectros a través del pico cromatográfico principal (función de EM TIC) que representa la glicoproteína eluida. Si los parámetros de obtención de CL-EM se optimizasen adecuadamente, la fragmentación en la fuente da como resultado un pico de masa altamente específico que se origina en la cadena o cadenas de polisacárido de la glicoproteína analizada. (véase la fig. 1A). Los resultados de una muestra que contiene seis glicoconjugados de EPA diferentes se pueden procesar de forma análoga a la mencionada anteriormente (véase la fig. 1B). Dependiendo de la estructura de los glicanos y de los parámetros optimizados, se puede observar una masa relacionada con la unidad de repetición del polisacárido. El pico de masa específico se puede usar para confirmar la identidad de la glicoproteína analizada. En segundo lugar, para la siguiente etapa usar los cromatogramas extraídos del pico de masa específico identificado: El área bajo la curva en el pico cromatográfico principal (que representa la glicoproteína eluida) corresponde a la cantidad de polisacárido unido inyectado del material de referencia. Con una curva de calibración (cantidad de polisacárido frente a área bajo la curva; véase la fig. 2) se puede determinar la cantidad absoluta del contenido de polisacárido en la muestra desconocida (en el pico cromatográfico principal).

Opcionalmente, los cromatogramas extraídos del pico de masa específico identificado se pueden usar además para determinar la cantidad relativa de polisacárido libre: Comparar la suma del área bajo la curva de todos, excepto el pico cromatográfico principal, con el área bajo la curva del pico cromatográfico principal (que representa la glicoproteína eluida). La determinación de polisacáridos libres dentro de la muestra se puede optimizar adicionalmente extrayendo cromatogramas para diferentes fragmentos de la cadena polisacarídica (por ejemplo, fragmentos monosacarídicos o disacarídicos, sacáridos modificados, iones de oxonio específicos de polisacáridos, etc.).

Opcionalmente, determinar el grado de modificación del polisacárido con los espectros combinados a través del pico principal cromatográfico (que representa la glicoproteína eluida): En el ejemplo de cadenas de polisacáridos O-acetilados, el pico de masa específico identificado puede tener un pico vecino con una diferencia de masa de 42 Da que representa una forma desacetilada del glicano (véase la fig. 3). Comparando el área bajo la curva de estos dos picos, se puede determinar el grado de modificación.

Opcionalmente, el cromatograma de UV obtenido y/o el cromatograma de TIC se pueden usar para determinar la

pureza relativa de la muestra analizada: Comparar la suma del área bajo la curva de todos, excepto el pico cromatográfico principal, con el área bajo la curva del pico cromatográfico principal (que representa la glicoproteína eluida).

III. Conclusión

Cabe señalar que en el caso de la vacuna glicoconjugada multivalente (una vacuna decavalente de *E. coli* (ExPEC), por ejemplo, que está en desarrollo actualmente, que comprende 10 polisacáridos de antígeno O de *E. coli*, cada uno de ellos independientemente acoplado covalentemente a la proteína portadora EPA, es decir, que contiene 10 fármacos), la liberación de cada uno de los fármacos individuales antes de la presente invención normalmente requería varios ensayos diferentes, incluyendo un ensayo de contenido de PS (similar a la etapa I.2 anterior), así como posteriormente (es decir, dependiendo del resultado del ensayo de contenido de PS) ensayos de contenido de PS libres (similares a la etapa I.3 anterior) y para algunos serotipos un ensayo para determinar la O-acetilación (similar a la etapa I.4 anterior). Esta dependencia secuencial de otros dos ensayos conduce a un bajo rendimiento durante la liberación del control de calidad ("QC"). Además, normalmente también se deben realizar ensayos de identidad y pureza (similares a las etapas I.1 y I.5 anteriores, respectivamente) para la liberación de cada fármaco.

Una de las ventajas de los métodos de la invención es que ahora estos 5 ensayos diferentes se pueden combinar en un solo procedimiento analítico (sección II anterior) donde la única preparación de la muestra es una etapa de dilución, lo que puede reducir el tiempo requerido para el análisis químico de pruebas de control de calidad de aproximadamente dos semanas a aproximadamente dos días, dando como resultado una reducción del tiempo, los materiales y los operadores necesarios para obtener la misma información relevante. Por lo tanto, el método da como resultado un tiempo de liberación de lotes significativamente más corto a un coste menor.

Por otra parte, el ensayo se puede realizar en fármacos individuales, pero también incluso después de que los fármacos individuales se hayan mezclado en un medicamento más complejo, por ejemplo, sobre la composición final de la vacuna glicoconjugada multivalente.

Por otra parte, la alta especificidad de un detector espectrométrico permite la cuantificación en muestras intermedias del proceso donde la pureza de la muestra es generalmente mucho menor. Esto reducirá los costes y el tiempo durante la optimización del proceso y, por lo tanto, reducirá los costes globales de desarrollo de las vacunas basadas en glicoproteínas fabricadas comercialmente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar un componente polisacarídico de una glicoproteína en una muestra,

en donde dicha glicoproteína comprende una proteína portadora y uno o más polisacáridos unidos covalentemente a dicha proteína portadora, y
por lo que
el análisis incluye:

- la identificación de dicho componente polisacarídico, y
- la cuantificación absoluta de dicho componente polisacarídico;

el método comprende las etapas de:

(a) establecer una curva de calibración de dicho componente polisacarídico por medio de un sistema de CL-EM;
(b) medir la muestra en el mismo sistema de CL-EM;
(c) comparar los resultados de (a) y (b) para analizar de este modo dicho componente polisacarídico en dicha muestra; y

en donde las etapas a y b incluyen inyectar glicoproteínas (o glicopéptidos obtenidos a partir de las mismas) en el sistema de CL-EM y someterlas a fragmentación en la fuente en el espectrómetro de masas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha glicoproteína no se somete a (i) digestión enzimática con una enzima que elimina el componente polisacarídico de la proteína portadora ni a (ii) una reacción química, en cada caso antes de introducir la glicoproteína en dicho sistema de CL-EM.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 - 2, donde dicha proteína portadora se selecciona del grupo que consiste en exotoxina A detoxificada de *P. aeruginosa* (EPA), flagelina de *E. coli* (FliC), CRM197, proteína de unión a maltosa (MBP), toxoide diftérico, toxoide tetánico, hemolisina A detoxificada de *S. aureus*, factor de agregación A, factor de agrupación B, enterotoxina termolábil de *E. coli*, variantes detoxificadas de la enterotoxina termolábil de *E. coli*, subunidad B de la toxina colérica (CTB), toxina colérica, variantes detoxificadas de la toxina colérica, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de la proteína Sat de *E. coli*, neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, hemocianina de lapa californiana (KLH), PcrV de *P. aeruginosa*, proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (OMPC) y proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipificable;
preferentemente una exotoxina A detoxificada de *Pseudomonas aeruginosa.*

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, donde dicho uno o más polisacáridos comprenden 1-100, preferentemente 5 - 20, unidades de repetición,
comprendiendo dichas unidades de repetición monosacáridos no modificados y/o monosacáridos modificados.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, donde dicha muestra comprende además:

- una matriz acuosa, incluyendo dicha matriz opcionalmente uno o más de tampones, sales inorgánicas, alcoholes de azúcar y tensioactivos no iónicos;
- opcionalmente proteína portadora libre de polisacáridos;
- opcionalmente polisacáridos no unidos a una proteína portadora ("PS libres");
- opcionalmente proteínas no relacionadas.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, donde dicha muestra comprende una multitud de glicoproteínas diferentes, preferentemente 2 - 20, tal como 4 - 10 glicoproteínas, diferenciándose dichas glicoproteínas en los componentes polisacarídicos y/o en las proteínas portadoras.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, donde dicha etapa (a) incluye la preparación de un material de referencia (etapas a1-a3 y opcionalmente a4-a5) y calibrar un sistema de CL-EM con dicho material de referencia (etapa a6):

(a1) la determinación de la identidad de dicha glicoproteína;
(a2) la determinación del contenido total de polisacáridos (PS) de dicha glicoproteína en dicho material de referencia;
(a3) la determinación del contenido de PS libres en dicho material de referencia;
(a4) opcionalmente la determinación del grado de modificación, particularmente O-acetilación, de dicha glicoproteína en dicho material de referencia;
(a5) opcionalmente la determinación de la pureza de dicha glicoproteína en dicho material de referencia;
para obtener de este modo un material de referencia que comprende el componente polisacarídico de una

glicoproteína; seguido de
(a6) medir alícuotas de dicho material de referencia por medio de un sistema de CL-EM,

para establecer de este modo dicha curva de calibración.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde

- en la etapa (a1), la identidad de dicha glicoproteína se determina mediante electroforesis por transferencia Western o mediante EM; y/o
- en la etapa (a2), el contenido total de PS se determina mediante IC-PAD después de la hidrólisis; y/o
- en la etapa (a3), el contenido de PS libres se determina mediante IC-PAD después de la hidrolización y separación de PS unidos y no unidos; y/o
- en la etapa (a4), el grado de modificación, particularmente O-acetilación, se determina mediante cromatografía de iones IC-CD después de la liberación de grupos modificadores, particularmente la liberación de grupos O-acetilo mediante hidrólisis; y/o
- en la etapa (a5), la pureza de la glicoproteína se determina mediante RP-HPLC y/o SEC; y/o
- en la etapa (a6), la curva de calibración se establece separando las alícuotas a través de CL y sometiendo el eluato de la CL a fragmentación en la fuente dentro del detector de EM ajustando el voltaje de ionización.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, donde dicha etapa (b) incluye:

(b1) proporcionar una muestra; y
(b2) medir la muestra usando los mismos parámetros que en (a6) con el mismo sistema de CL-EM.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicha medición (b2) incluye la determinación de la identidad de la muestra y uno de los siguientes:

- la determinación del contenido de PS de la glicoproteína; O
- la determinación del contenido de PS y del contenido de PS acetilados de la glicoproteína; O
- la determinación del contenido de PS de la glicoproteína y la determinación de la pureza de la muestra; O
- la determinación del contenido de PS y del contenido de PS acetilados de la glicoproteína y la determinación de la pureza de la muestra; O
- la determinación del contenido de PS de la glicoproteína y la determinación del contenido de PS libres; O
- la determinación del contenido de PS y del contenido de PS acetilados de la glicoproteína y la determinación del contenido de PS libres; O
- la determinación del contenido de PS y del contenido de PS acetilados de la glicoproteína y la determinación del contenido de PS libres y del contenido de PS acetilados libres;
- la determinación del contenido de PS de la glicoproteína y la determinación del contenido de PS libres y de la pureza de la muestra; O
- la determinación del contenido de PS y del contenido de PS acetilados de la glicoproteína y la determinación del contenido de PS libres y de la pureza de la muestra; O
- la determinación del contenido de PS y del contenido de PS acetilados de la glicoproteína y la determinación del contenido de PS libres y del contenido de PS acetilados libres y de la pureza de la muestra.

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, donde dicha etapa (c) incluye:

(c1) identificar picos característicos para cada PS en la muestra; y
(c2) comparar el ABC para dicho pico con la curva de calibración.

12. Uso de sistema de cromatografía de líquidos - espectrometría de masas ("sistema de CL-EM") con fragmentación en la fuente del eluato obtenido de la cromatografía de líquidos para analizar un componente polisacarídico de una glicoproteína en una muestra, en donde dicha glicoproteína comprende una proteína portadora y uno o más polisacáridos unidos covalentemente a dicha proteína portadora, y
por lo que dicho análisis incluye:

- inyectar glicoproteínas (o glicopéptidos obtenidos a partir de las mismas) en el sistema de CL-EM y someterlas a fragmentación en la fuente en el espectrómetro de masas,
- establecer una curva de calibración de dicho componente polisacarídico por medio del sistema de CL-EM,
- la identificación de dicho componente polisacarídico, y
- la cuantificación absoluta de dicho componente polisacarídico.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la glicoproteína no se somete a (i) digestión enzimática con una enzima que elimina el componente polisacarídico de la proteína portadora ni a (ii) una reacción química, en cada caso antes de introducir la glicoproteína en dicho sistema de CL-EM.

14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 - 13, donde el sistema de CL-EM comprende además

una válvula de desvío delante del detector de EM.

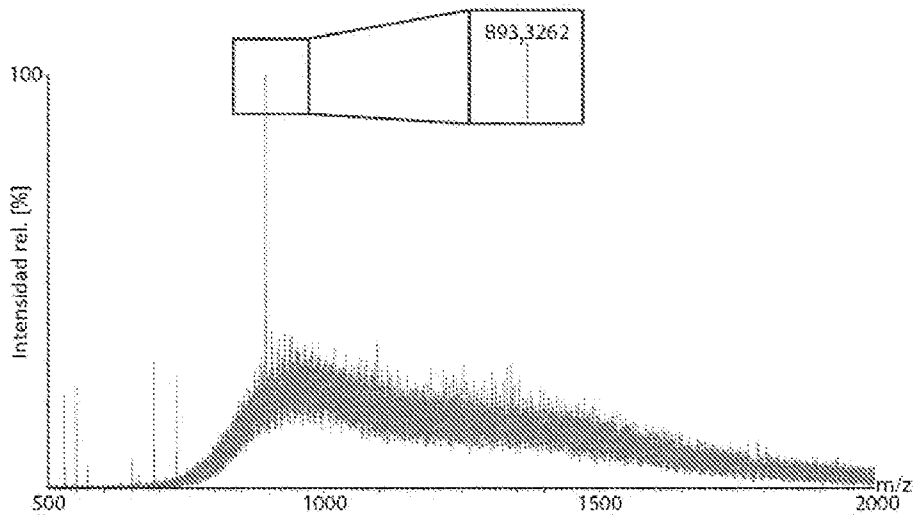
15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 - 14, donde dicha proteína portadora se selecciona del grupo que consiste en exotoxina A detoxificada de *P. aeruginosa* (EPA), flagelina de *E. coli* (FliC), CRM197, proteína de unión a maltosa (MBP), toxoide diftérico, toxoide tetánico, hemolisina A detoxificada de *S. aureus*, factor de agregación A, factor de agrupación B, enterotoxina termolábil de *E. coli*, variantes detoxificadas de la enterotoxina termolábil de *E. coli*, subunidad B de la toxina colérica (CTB), toxina colérica, variantes detoxificadas de la toxina colérica, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de la proteína Sat de *E. coli*, neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, hemocianina de lapa californiana (KLH), PcrV de *P. aeruginosa*, proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (OMPC) y proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipificable; preferentemente exotoxina A detoxificada de *Pseudomonas aeruginosa* y/o
dichos polisacáridos comprenden 1 - 100, preferentemente 5 - 20 unidades de repetición, comprendiendo dichas unidades de repetición monosacáridos no modificados y/o monosacáridos modificados.

16. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 - 15, donde dicha muestra comprende además

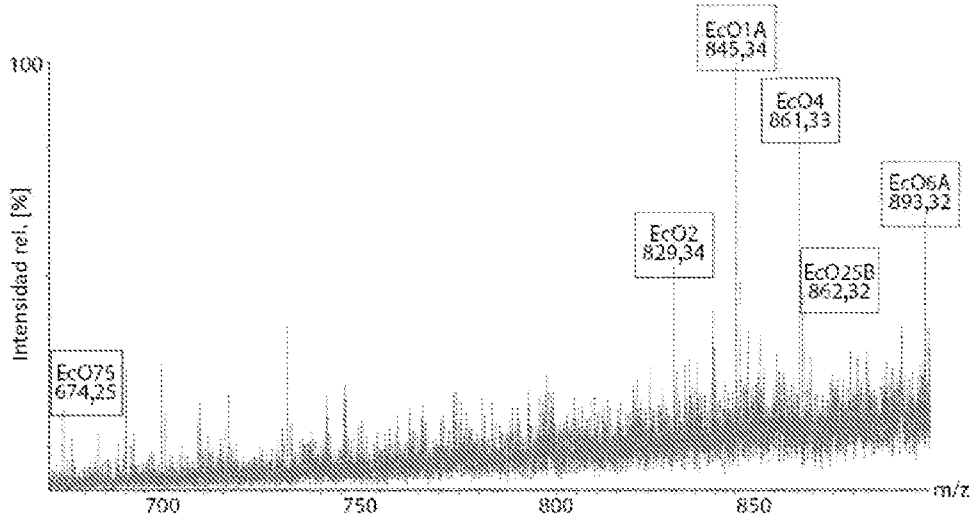
- una matriz acuosa, incluyendo dicha matriz opcionalmente uno o más de tampones, sales inorgánicas, alcoholes de azúcar y tensioactivos no iónicos;
- opcionalmente proteína portadora libre de polisacáridos;
- opcionalmente polisacáridos no unidos a una proteína portadora; y
- opcionalmente proteínas no relacionadas.

17. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 - 16,

- para el control en proceso en la producción de glicoconjugados;
- para el control de la liberación de los glicoconjugados producidos;
- para el control de la estabilidad de los glicoconjugados almacenados; y/o
- para la optimización de procesos en la producción de glicoconjugados.


893,3262
100
Intensidad rel. [%]
500
1000
1500
2000
m/z

A


EcO1A
845,34
EcO4
861,33
EcO6A
893,32
EcO2
829,34
EcO25B
862,32
EcO75
674,25
100
Intensidad rel. [%]
700
750
800
850
m/z

B

Fig. 1

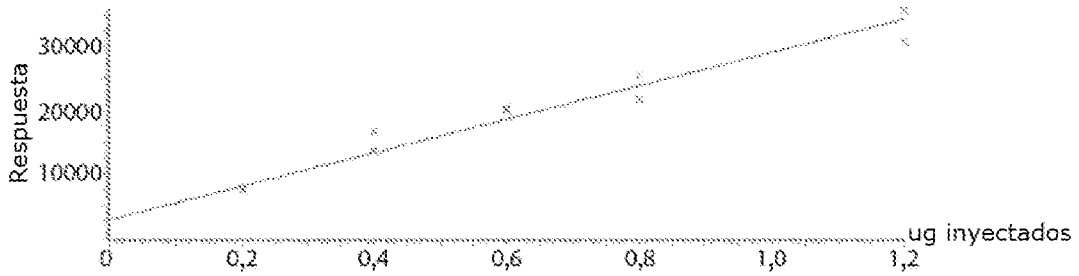

30000
20000
10000
Respuesta
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
ug inyectados

Fig. 2

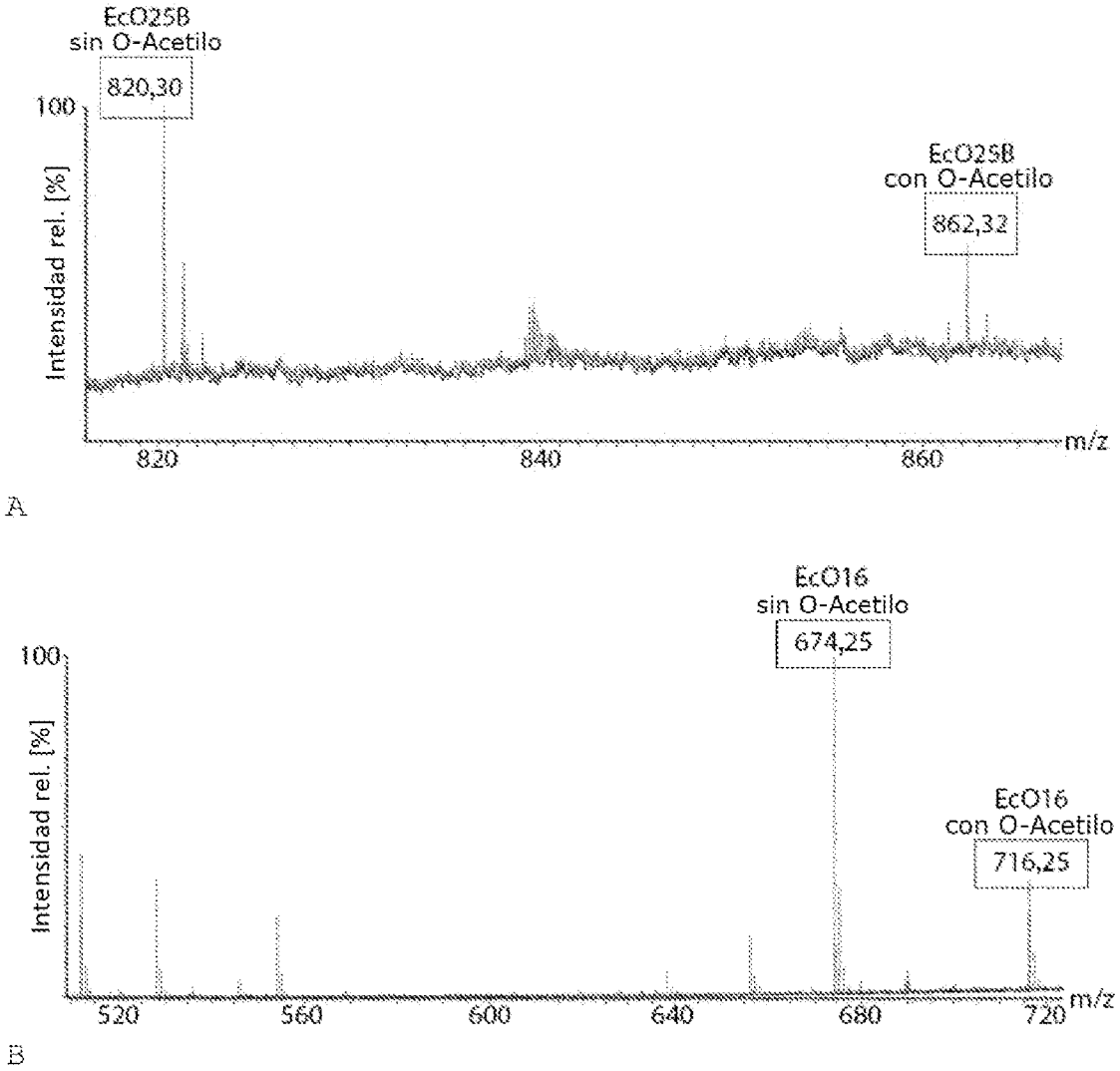

EcO25B
sin O-Acetilo
820,30
100
Intensidad rel. [%]
EcO25B
con O-Acetilo
862,32
820
840
860
m/z
A
EcO16
sin O-Acetilo
674,25
100
Intensidad rel. [%]
EcO16
con O-Acetilo
716,25
520
560
600
640
680
720
m/z
B

Fig. 3