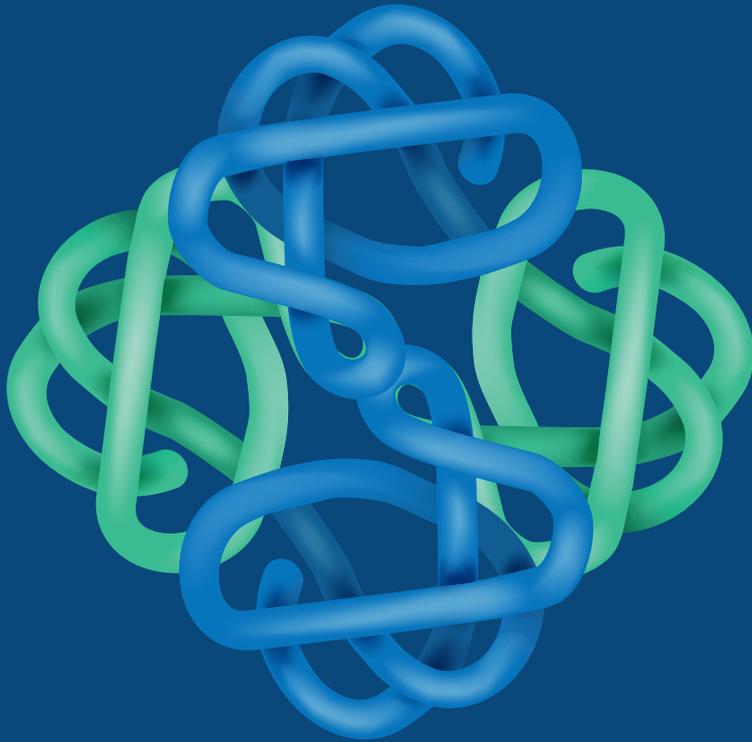


ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS



SERIE
LA GLICOBIOLOGÍA: AVANCES EN
TEMAS DE SALUD PRIORITARIOS

ROBERTA SALINAS-MARÍN, BLANCA EDA DOMINGUEZ,
RICARDO CASTRO E IVÁN MARTÍNEZ-DUNCKER

UAEM

ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS

Serie

La glicobiología: avances en
temas de salud prioritarios

ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS

Serie

La glicobiología: avances en
temas de salud prioritarios

Roberta Salinas-Marín
Blanca Eda Dominguez
Ricardo Castro
Iván Martínez-Duncker



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

México, 2020

Esta obra se publicó con el apoyo del CONACyT, Red temática Glicociencia en Salud-CONACyT.

Salinas-Marín, Roberta, autor

Análisis de glicoproteínas / Roberta Salinas-Marín, Blanca Eda Domínguez, Ricardo Castro, Iván Martínez-Duncker. - - Primera edición.- - México : Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2021.

63 páginas : ilustraciones.- - (La glicobiología: avances en temas de salud prioritarios)
ISBN 978-607-8784-31-8 digital

1. Glicoconjugados

2. Glicoproteínas

3. Biología molecular

LCC QP702.G577

DC 572.567

Esta publicación fue dictaminada por pares académicos bajo la modalidad doble ciego.

Primera edición, septiembre de 2021

D.R. © 2021, *Análisis de Glicoproteínas*. Roberta Salinas-Marín, Blanca Eda Domínguez, Ricardo Castro e Iván Martínez-Duncker

Serie La glicobiología. Avances en temas de salud prioritarios

D.R. © 2021, Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, CP 62209. Cuernavaca, Morelos.
publicaciones@uaem.mx
libros.uaem.mx
ISBN: 978-607-8784-31-8



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons
Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Imagen de portada: designua - stock.abobe.com

Diseño de portada y formación: Jorge Andere

Corrección de estilo: Roberto Abad

CONTENIDO

Sobre los autores	7
Lista de abreviaturas.....	9
Resumen	11
Introducción	13
Importancia de la glicosilación en bioterapéuticos	19
Métodologías de análisis de glicoproteínas.....	23
Análisis de glicoproteínas intactas	25
Análisis de glicopéptidos	27
Hidrólisis de glicanos	31
Hidrólisis de <i>N</i> -glicanos	31
Hidrólisis de <i>O</i> -glicanos	33
Análisis de glicanos con marcaje fluorescente	34
Análisis de glicanos sin derivatizar.....	38
Herramientas informáticas para el análisis de glicanos.....	40
Conclusiones	41
Referencias	43

SOBRE LOS AUTORES

¹ Roberta Salinas-Marín
² Blanca Eda Dominguez
³ Ricardo Castro
¹ Iván Martínez-Duncker

¹ Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

² Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

³ Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AA: Ácido 2-aminobenzoico
2-AB: 2-Aminobenzamida
ABS: Enzima sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*
ACQ: 6-Aminoquinolil-*N*-hidroxi-succinimidil carbamato
ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AMF: α -Fucosidasa de almendra
APTS: 8-Aminopirina-1,3,6-trisulfonato
Arg: Arginina
Asn: Asparagina
Asp: Ácido aspártico
BHK: Células de bebé de hámster
BKF: α -Fucosidasa
 β -ME: β -Mercaptoetanol
BTG: β -Galactosidasa bovina
CAP: Amniocitos humanos primarios
CDC: Citotoxicidad dependiente de complemento
CE: Electroforesis capilar
CE-LIF: Electroforesis por capilaridad con fluorescencia inducida por láser
CHO: Células de ovario de hámster chino
CID: Disociación por colisión inducida
ConA: Lectina concanavalina
DTT: Ditioeritrol
ECD: Disociación por captura de electrones
EMA: Agencia Europea de Medicamentos
ESI: Ionización por electrospray
ESI-TOF: Sistema de ionización por electrospray-tiempo de vuelo
ETD: Disociación por transferencia electrónica
FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos
Fuc: Fucosa
Gal: Galactosa
GalNAc: *N*-Acetilgalactosamina
Glc: Glucosa
GlcNAc: *N*-Acetilglucosamina
Glu: Ácido glutámico
GUH: β -*N*-acetilglucosaminidasa
HEK293: Células embrionarias de riñón humano
HILIC: Cromatografía líquida de interacción hidrofílica con sefarosa o celulosa
HKB-11: Células de riñón/células B
HPAEC: Cromatografía de alta resolución de intercambio de aniones
HPLC-UPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución o ultra resolución
HT-1080: Células de fibrosarcoma
HuH-7: Células de carcinoma de hígado
ICR-FT: Resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier
IM: Movilidad de iones

IM-MS: Espectrometría de masas en combinación con movilidad de iones

IEF: Isoelectroenfoque

IgG: Inmunoglobulina

JAC: Lectina jacalina

LC: Cromatografía de líquidos

LCA: Lectina de *Lens culinaris*

Lys: Lisina

MALDI: Ionización por desorción con láser asistida por una matriz

Man: Manosa

MEA: Mercaptoetilamina

MS: Espectrometría de masas

NANI: Sialidasa de *Streptococcus pneumoniae*

Neu: Ácido N-acetil-Neuramínico o ácido siálico

NeuGc: Ácido N-glicolil-neuramínico

NS0: Células de mieloma murino

PAD: Detección amperométrica por pulsos

PERC.6: Células de retina

PGC: Carbón grafitico poroso

PNA: Lectina de cacahuete

PNGasa F: N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum*

RFMS: RapiFluor-MS

RPLC: Cromatografía en fase reversa

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño

Ser: Serina

Sp2/0: Células de mieloma murino

SPG: β -Galactosidasa de *S. pneumoniae*

TFA: Ácido trifluoroacético

Thr: Treonina

TCEP: Fosfina tris(2-car-boxietil)

TOF: Analizador de tiempo de vuelo

UVPD: Método de fotodisociación ultravioleta

WGA: Lectina de germen de trigo

RESUMEN

La glicosilación es la modificación postraduccional de mayor prevalencia y complejidad estructural que ocurre naturalmente en proteínas terapéuticas, modulando significativamente su rendimiento, bioactividad, solubilidad, estabilidad proteolítica, inmunogenicidad y su vida media en plasma. La caracterización del patrón de glicosilación es importante como parte de los estudios de aseguramiento de la calidad de una glicoproteína terapéutica, antes y después de su ingreso al mercado. La caracterización estructural efectiva de los glicanos requiere del uso de diversas metodologías analíticas. En este capítulo se abordan los métodos de análisis como cromatografía de líquidos de alta resolución o ultra resolución (HPLC-UPLC), electroforesis capilar (CE), espectrometría de masas (MS) e isoelectroenfoque (IEF) empleados solos o en combinación en el análisis de glicoproteínas, haciendo consideraciones respecto a su complementariedad y uso diferencial.

INTRODUCCIÓN

El nacimiento de la tecnología de ADN recombinante marca el inicio en la transformación de la industria farmacéutica basada en el uso de biomoléculas. Las proteínas terapéuticas como anticuerpos monoclonales, péptidos y proteínas recombinantes representan el grupo más grande de productos en desarrollo por la industria biofarmacéutica (Durocher y Butler 2009; Planinc *et al.* 2016; Kaplon y Reichert 2019). La producción de esta nueva clase de moléculas farmacéuticas o biofarmacéuticos es necesaria para el tratamiento de cáncer, anemia, artritis, diabetes, entre otras enfermedades (Higgins 2010; Duivelshof *et al.* 2019). En los últimos años, la producción de biomoléculas terapéuticas ha cobrado importancia en el ramo farmacéutico, resultado de sus propiedades terapéuticas, eficacia y especificidad que contrastan con respecto a moléculas pequeñas. La mayor parte de estas biomoléculas no genera reacciones alérgicas porque estructuralmente es muy parecida a proteínas endógenas como citosinas, factores de crecimiento, hormonas, inmunoglobulinas y anticuerpos, además de suplementar la actividad de moléculas endógenas esenciales como enzimas y factores de coagulación (Hossler *et al.* 2009). En la producción de proteínas recombinantes, el ADN es fundamental porque contiene la información necesaria para que una célula produzca una proteína con una secuencia de aminoácidos similar a la proteína nativa o silvestre, sin embargo, no proporciona directamente las indicaciones necesarias para que una proteína sea glicosilada, de tal forma que las secuencias de ADN no garantizan que una molécula tenga un patrón de glicosilación similar a las proteínas producidas por nuestro organismo (Higgins 2010; Dominguez-Vega *et al.* 2018).

La glicosilación es la modificación postraducciona de proteínas más común que permite la producción de secuencias de carbohidratos o glicanos unidos covalentemente a proteínas o lípidos (Spiro 2002; Schwarz y Aebi 2011). De

manera general, los glicanos son divididos en dos grupos principales, los *N* y *O*-glicanos, cuyas cadenas de oligosacáridos se unen al átomo de nitrógeno del grupo amino de residuos de asparagina en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (X= cualquier aminoácido, excepto prolina) o a un átomo de oxígeno de serina/treonina, respectivamente (figura 1A). Los *N*-glicanos se encuentran unidos a residuos de asparagina vía el núcleo (Man)₃(GlcNAc)₂ (donde Man representa manosa y GlcNAc a *N*-acetilglucosamina). Los *N*-glicanos se dividen en tres clases principales: altos en manosa, complejos e híbridos. Los *N*-glicanos altos en manosa pueden tener entre 5-9 residuos de manosa, los híbridos presentan residuos de manosas en la antena α1-6 y una o dos antenas con diferente grado de extensión en α1-3 y los complejos tienen entre dos o cuatro antenas con diferente grado de extensión, generalmente terminados en ácido siálico (figura 1B).

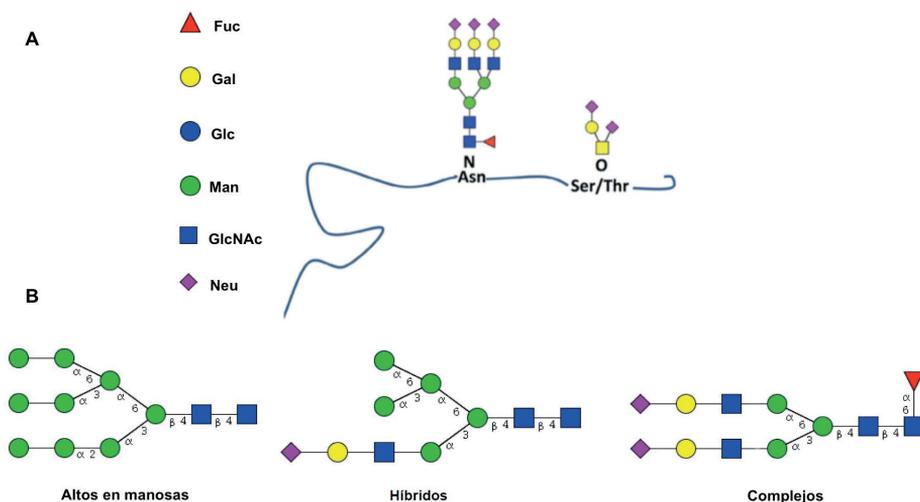


Figura 1. A) Esquema de glicoproteína con ejemplos de estructuras de *N*- y *O*- glicanos. B) Estructuras de los principales tipos de *N*-glicanos encontrados en proteínas humanas. Fuc, Fucosa; Gal, Galactosa; Glu, Glucosa; Man, Manosa; GlcNAc, *N*-Acetilglucosamina; Neu, ácido *N*-acetil-Neuramínico o ácido siálico.

Fuente: elaboración propia.

La biosíntesis de *O*-glicanos inicia y termina en el Golgi con la adición de carbohidratos a los residuos de serina o treonina. En mamíferos, el monosacárido GalNAc es comúnmente encontrado al inicio de las estructuras de *O*-glicanos, sin embargo pueden existir núcleos “cores” de *O*-manosa que han sido identificados normalmente en glicoproteínas del cerebro (Endo 1999). Los *O*-glicanos pueden variar en tamaño, desde un simple core de GalNAc (Antígeno Tn) hasta estructuras ramificadas complejas de 1-20 residuos de carbohidratos con ocho diferentes núcleos, siendo los núcleos 1, 2, 3 y 4 los que se encuentran ampliamente distribuidos en glicoproteínas de mamífero (figura 2) (Dell y Morris 2001).

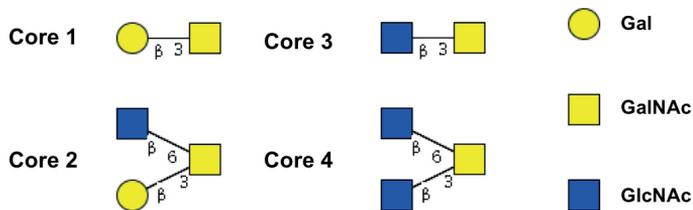


Figura 2. Tipos de núcleos de *O*-glicanos distribuidos en glicoproteínas de mamíferos. Gal, Galactosa; GalNAc, *N*-acetilgalactosamina; GlcNAc, *N*-Acetilglucosamina.

Fuente: elaboración propia.

La glicosilación es dependiente de la actividad de enzimas llamadas glicosiltransferasas, responsables de transferir los monosacáridos y sintetizar oligosacáridos durante la traducción o co-traducción de las proteínas. Aunque la glicosilación es dependiente de glicosiltransferasas codificadas por diversos genes que actúan de forma secuencial, gracias a una organización compartimental, las células producen proteínas con un patrón de glicosilación que exhibe cierto grado de variabilidad, es decir, una glicoproteína puede presentarse en diferentes glicofomas (misma proteína con diferente patrón de oligosacáridos) (Spiro 2002); (Sola y Griebenow 2010; Arigoni-Affolter *et al.* 2019). Adicionalmente, la glicosilación puede ser estructuralmente heterogénea con respecto al sitio de unión del glicano (macroheterogeneidad) y con respecto a

la estructura del glicano (microheterogeneidad) (Weerapana y Imperiali 2006; Mann y Jensen 2003; Walsh *et al.* 2005).

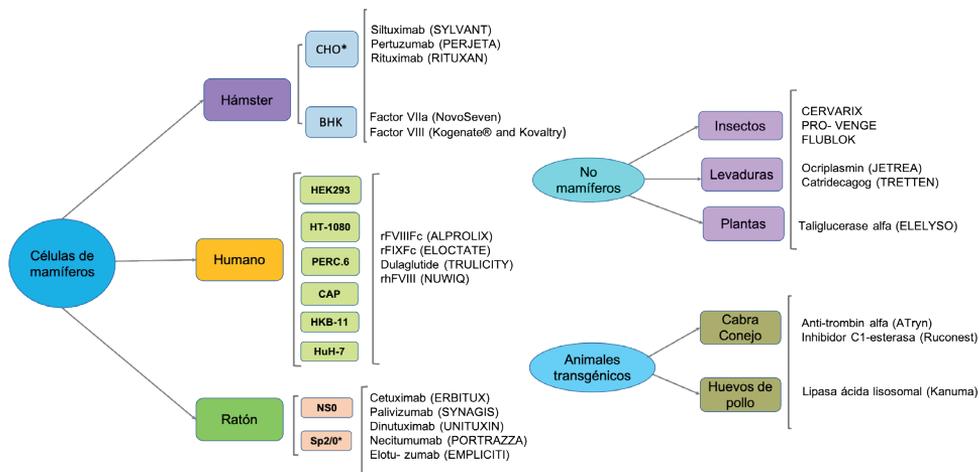


Figura 3. Sistema de expresión de proteínas recombinantes. CHO (células de ovario de hámster chino), BHK (células de bebe de hámster), HEK293 (células embrionarias de riñón humano), HT-1080 (células de fibrosarcoma), CAP (amniocitos humanos primarios), HuH-7 (células de carcinoma de hígado), PERC.6 (células de retina), HKB-11 (células de riñón/células B) y NS0 y Sp2/0 (células de mieloma murino). *Otros bioterapéuticos producidos en estas células se describen en la tabla 1.

Fuente: elaboración propia.

La producción de glicoproteínas mediante ingeniería genética hace uso del cultivo de bacterias, plantas, células de insecto, levaduras y células de mamífero (incluidas las humanas), sin embargo, la mayoría son producidas en sistemas de cultivo de células de mamífero como células de ovario de hámster chino (CHO), células de bebé de hámster (BHK) y células de mieloma de ratón (SP2/0 Y NS0) (figura 3, tabla 1) (Planinc *et al.* 2016; Estes y Melville 2014; Walsh 2018; Lalonde y Durocher 2017). Estas líneas celulares de mamífero son ampliamente utilizadas en la expresión de proteínas terapéuticas (figura 3)

porque son capaces de producir proteínas complejas y de gran peso molecular, adicionalmente permiten asegurar una reducción en la inmunogenicidad del biofarmacéutico, incrementan su estabilidad, eficacia *in vivo* y pueden producir modificaciones postraduccionales como la glicosilación de manera similar a las producidas en los humanos (Durocher y Butler 2009).

La glicosilación de proteínas puede afectar la actividad biológica de los biofarmacéuticos de manera directa o indirecta debido a la variabilidad en la glicosilación en los procesos celulares y, por ende, en la producción de una biomolécula. Por consiguiente, el patrón de glicosilación puede ser importante como parte de los estudios de caracterización al asegurar la uniformidad del proceso y la calidad de un bioterapéutico antes y después de su ingreso al mercado. Para obtener una glicoproteína con un patrón de glicosilación consistente es necesario un proceso de producción eficiente y una caracterización efectiva mediante el uso de diversas técnicas analíticas. En este capítulo abordaremos los principales métodos empleados en el análisis de carbohidratos o glicanos presentes en glicoproteínas terapéuticas.

IMPORTANCIA DE LA GLICOSILACIÓN EN BIOTERAPÉUTICOS

La glicosilación es la modificación postraduccional con mayor prevalencia y complejidad estructural que ocurre naturalmente en proteínas terapéuticas porque modula significativamente el rendimiento, bioactividad, solubilidad, estabilidad proteolítica, inmunogenicidad y su vida media en plasma (Durocher y Butler 2009; Reusch y Tejada 2015).

El patrón de glicosilación de una proteína terapéutica es un parámetro crítico para la solubilidad del biofármaco, estabilidad, farmacocinética y farmacodinamia (Jefferis 2009; Costa *et al.* 2014; Yang y Bartlett 2019). La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por su acrónimo en inglés, Food and Drug Administration) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA por su acrónimo en inglés, European Medicines Agency) han establecido guías específicas de caracterización fisicoquímica para demostrar la consistencia de un producto bioterapéutico glicosilado, considerando la heterogeneidad de las glicoformas, el contenido de carbohidratos, estructura de los carbohidratos, el sitio de glicosilación, entre otros. En ciertas biomoléculas, la glicosilación es considerada un atributo de calidad para la liberación del mismo.

La glicosilación de la región Fc de anticuerpos monoclonales utilizados en el tratamiento de cáncer pueden modular la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) que permiten la eliminación o muerte de células tumorales (Liu 2015; Cymer *et al.* 2018). Recientemente, se ha reportado que la actividad ADCC se incrementa en ausencia de residuos de fucosa presentes en el core de GlcNAc de los N-glicanos, en comparación con una disminución de esta actividad en anticuerpos que contienen el núcleo fucosilado (figura 4). De tal forma que, mediante ingeniería genética, se han desarrollado líneas de CHO deficientes en la enzima α -1-6-fucosiltransferasa (FUT8) o bien se ha inhibido la fucosilación para la producción de anticuerpos afucosilados, incrementando su efecto contra células tumorales (Mori *et al.* 2007; Subedi y Barb 2016).

Por otro lado, el grado de sialilación en la región Fc de las IgGs incrementa la actividad antiinflamatoria, lo que permitiría el diseño de biomoléculas para el tratamiento de enfermedades como artritis reumatoide (Schwab y Nimmerjahn 2014). Como se mencionó anteriormente, las líneas celulares comúnmente utilizadas para la producción de anticuerpos y glicoproteínas son CHO (producción del 70% de proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales) y células de mieloma de ratón (NS0 y Sp2/0) porque son capaces de generar patrones de glicosilación similares al humano (Planinc *et al.* 2016; Estes y Melville 2014; Liu 2015). Sin embargo, los patrones de carbohidratos encontrados en IgGs de humano son de tipo complejo biantenarico con un núcleo de fucosa (Fuc), residuos de galactosa (Gal), de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectada y ácido *N*-acetilneuramínico (Neu), mientras que las IgGs producidas en CHO presentan mayor grado de fucosilación y un bajo nivel de residuos de galactosa y ácido siálico. Adicionalmente, las líneas celulares de ratón y de otros mamíferos producen residuos de carbohidratos (Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc (α Gal) y *N*-glicolil-neuramínico (NeuGc)) que no están presentes en el ser humano porque carece de las enzimas que participan en su biosíntesis. Sin embargo, en el caso del Neu5Gc, a pesar de que el ser humano no puede producirlo o ha perdido la capacidad enzimática de hacerlo, las células humanas pueden incorporarlo a partir de la dieta y generar glicoconjugados con Neu5Gc. Está comprobado que la presencia de este tipo de ácido siálico induce la producción de anticuerpos contra el mismo. La presencia del residuo y los anticuerpos anti-Neu5GC han sido relacionados como responsables de inflamación crónica (Baker *et al.* 2001; Beck *et al.* 2008; Yehuda y Padler-Karavani 2020). Recientemente, también se ha reportado que la presencia anticuerpos anti-Neu5Gc en suero humano puede formar complejos con bioterapéuticos con presencia de Neu5Gc y reducir la vida media de los biofarmacéuticos y por consiguiente su eficacia (Ghaderi *et al.* 2010; Yehuda y Padler-Karavani 2020). También los glicanos altos en manosa identificadas en anticuerpos o glicoproteínas expresadas en células CHO pueden llegar a generar un impacto negativo

en la vida media de los bioterapéuticos al incrementar su unión al receptor de manosa (Reusch y Tejada 2015; Goetze *et al.* 2011).

En resumen, no solamente se debe considerar el efecto de las modificaciones en la ADCC y CDC debido a cambios en los patrones de glicosilación del sitio Fc durante la producción de anticuerpos monoclonales como justificación de la importancia crucial de la glicosilación en los bioterapéuticos, sino también por su importancia en aspectos como estabilidad *in vivo* e *in vitro* de las proteínas (Reusch y Tejada 2015; Liu *et al.* 2009; Liu 2015).

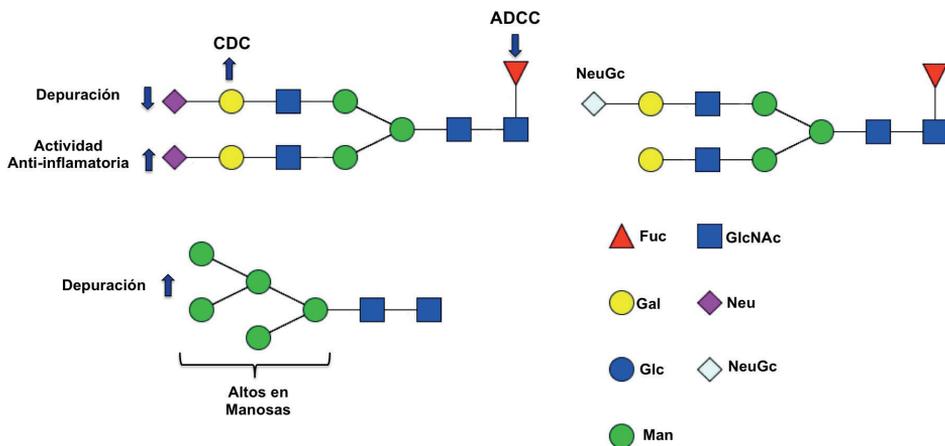


Figura 4. Estructura-función de N-glicanos en bioterapéuticos. La galactosilación incrementa la CDC, los residuos de ácido siálico disminuyen la depuración del bioterapéutico e incrementan la actividad antiinflamatoria, mientras que el core de fucosilación disminuye la ADCC. Los residuos altos en manosa incrementan la depuración y la presencia del ácido N-glicolil-neuramínico genera inmunoreactividad. CDC= Citotoxicidad dependiente de complemento. ADCC= Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Fuc= Fucosa, Gal=Galactosa, Glc= Glucosa, Man= Manosa, GlcNAc= N-Acetilglucosamina, Neu=ácido N-acetil-neuramínico o siálico, NeuGc=ácido N-glicolilneuramínico.

Fuente: elaboración propia. Modificada de Figura 1. *N-Glycan Analysis of Biotherapeutic Proteins*: <https://www.biopharminternational.com/view/n-glycan-analysis-biotherapeutic-proteins>

Tabla 1. Bioterapéuticos con la mayor cantidad de ventas en el 2020 de acuerdo con FIERCE Farma Special Report.

Posición en ventas	Bioterapéutico	Clase	Indicaciones	Línea celular	Compañía	Ventas en 2017 (billones de dolares)	Tipo de Glicosilación
1	Humira® (adalimumab)	Anticuerpo monoclonal	Artritis reumatoide	CHO	AbbVie	20.39	N-glicosilación
2	Keytruda® (pembrolizumab)	Anticuerpo monoclonal	Cáncer, Linfoma	CHO	Merck y Co.	14.38	N-glicosilación
6	Eylea® (aflibercept)	Proteína recombinante	Retinopatía	CHO	Bayer y Regeneron Pharmaceuticals	8.36	N-glicosilación
7	Stelara® (ustekinumab)	Anticuerpo monoclonal	Psoriasis, enfermedad de Crohn's	SP2/0	Johnson & Johnson	7.94	N-glicosilación
8	Opdivo® (nivolumab)	Anticuerpo monoclonal	Cáncer de pulmón, melanoma	CHO	Bristol Myers Squibb	7.92	N-glicosilación
11	Enbrel® (etanercept)	Proteínas recombinantes	Artritis reumatoide	CHO	Amgen y Pfizer	6.37	N-glicosilación y O-glicosilación
14	Avastin®	Anticuerpo monoclonal	Cáncer de colon	CHO	Roche (Genentech)	5.32	N-glicosilación

Fuente: elaboración propia.

MÉTODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS

La comprensión de la relación entre la estructura de los glicanos y la función biológica del biofármaco permite tomar decisiones respecto a la información requerida en cada etapa de desarrollo.

El mapeo de glicanos se lleva a cabo aplicando numerosos enfoques y metodologías que dependerán de la diversidad y complejidad de las estructuras de los glicanos, así como de la tecnología y los sistemas de detección disponibles en cada laboratorio. El análisis de glicanos involucra métodos complementarios que permitan la elucidación de atributos específicos de glicosilación como el sitio de glicosilación, estructura y abundancia de estos (Beck *et al.* 2013; Dotz *et al.* 2015; Dominguez-Vega *et al.* 2018; Lu *et al.* 2018). Los métodos analíticos incluyen cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), electroforesis capilar (CE), espectrometría de masas (MS) e isoelectroenfoque (IEF). Estos métodos se complementan dependiendo de si la muestra a analizar es una glicoproteína intacta, glicopéptidos, glicanos liberados o monosacáridos libres (figura 5).

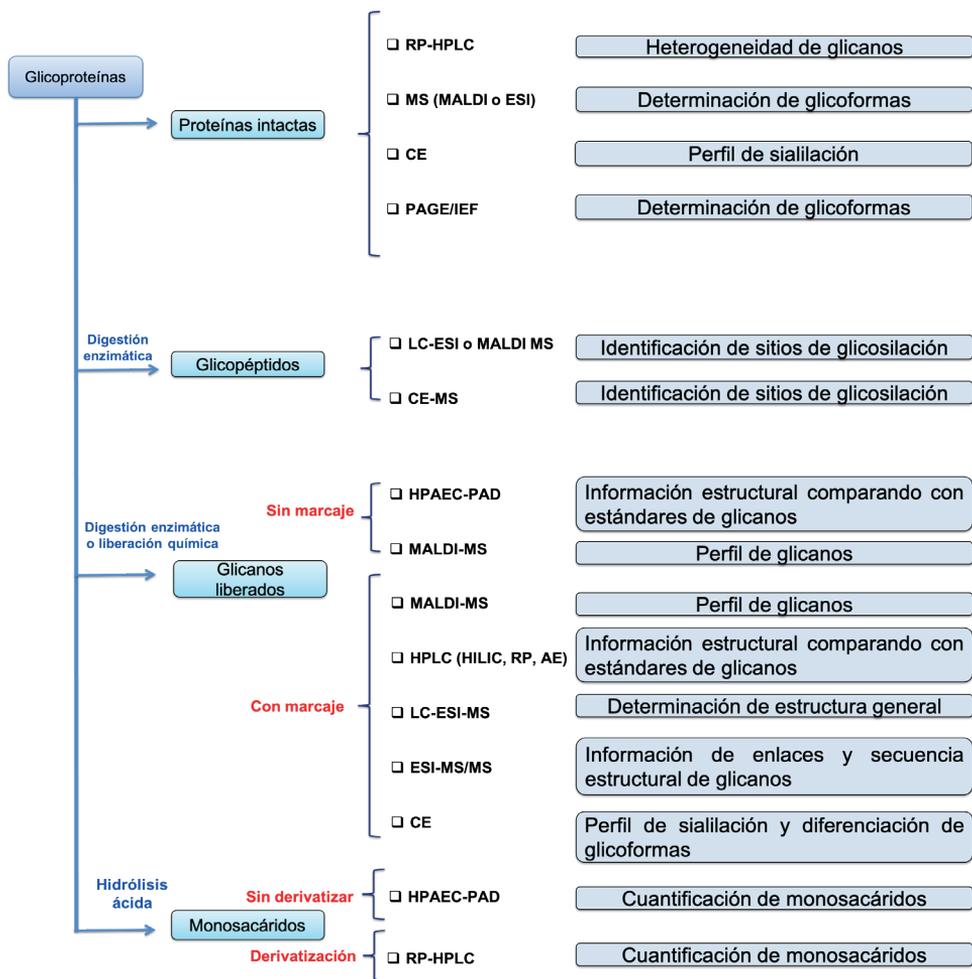


Figura 5. Esquema general de métodos analíticos en el análisis de glicanos. El enfoque de análisis de glicoproteínas está dividido en cuatro grupos principales: glicoproteínas intactas, glicopéptidos, glicanos liberados o hidrolizados o monosacáridos. Estos métodos son utilizados en combinación para determinar los perfiles de glicanos, estructuras y heterogeneidad, sitios de glicosilación y contenido específico de glicanos.

Fuente: elaboración propia.

ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS INTACTAS

Existe una gran variedad de métodos analíticos para el análisis y caracterización de glicanos a nivel de proteína intacta como cromatografía, electroforesis, masas (MS) y algunas técnicas espectroscópicas. Sin embargo, debido a la resolución, las MS se han convertido en una herramienta crucial para la caracterización de glicoproteínas terapéuticas. El análisis de glicoproteínas intactas o análisis denominados *top* utilizando espectrometría, es generalmente realizado mediante fuentes de ionización como ionización por electrospray (ESI) o por desorción con láser asistida por una matriz (MALDI), y se requieren analizadores de masa de alta resolución como ToF, Orbitrap, y de resonancia ciclotrónica de iones (ICR-FT) para resolver pequeñas diferencias de masas (Zhang *et al.* 2016; Lu *et al.* 2018; Rojas-Macias *et al.* 2019; Dominguez-Vega *et al.* 2018). Sin embargo, el uso de ICR-FT es reducido debido a los altos costos de mantenimiento del superconductor. Las muestras de glicoproteínas intactas representan el nivel más alto de análisis y generalmente deben ser sometidas a un paso de separación por cromatografía de líquidos (LC) o electroforesis por capilar (CE) previo a su análisis por ESI o MALDI, aunque también pueden ser analizadas fuera de línea (sin conexión a métodos de separación como LC) (Breuker *et al.* 2008; Lu *et al.* 2018; Carillo *et al.* 2020). El análisis directo de una biomolécula, por ejemplo un anticuerpo monoclonal intacto, es posible, sin embargo, este proceso es precedido frecuentemente de un paso de eliminación de sales para obtener mayor calidad en el espectro al disminuir los aductos de sales y mejorar la eficiencia de ionización.

El análisis de una inmunoglobulina (IgG) utilizando una fuente de ionización como ESI puede generar iones cuasimolares o picos base con un estado de carga elevado o carga múltiple ($z= 20-60$), resultando en valores de m/z en el rango de 2000-5000 daltones que pueden ser detectados por diversos analizadores. Por el contrario, con MALDI una IgG lleva un máximo de cuatro cargas lo que genera una disminución de la resolución y precisión en la

determinación de la masa (Breuker *et al.* 2008; Beck *et al.* 2013). Cuando se analizan moléculas grandes con MALDI, se necesita un analizador con amplio rango de m/z que puede obtenerse al acoplar esta técnica a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) (Beck *et al.* 2013; Dominguez-Vega *et al.* 2018). Entonces, MALDI-TOF-MS es frecuentemente utilizado como primer paso en el análisis de glicanos porque permite determinar la diversidad de glicanos presente en pequeñas cantidades de muestra. Los glicanos neutros se detectan mejor en modo ion positivo, usualmente $[M+Na]^+$. Una limitante del análisis es la pérdida de información de los residuos de ácido siálico bajo las condiciones de ionización de MALDI, lo cual condiciona el derivatizar los glicanos para estabilizar los enlaces α -glicosídicos (Quaranta *et al.* 2020). Los glicanos sialilados son inestables en el proceso de ionización y son analizados en modo negativo, o bien las muestras son desialiladas o derivatizadas antes del análisis mediante permetilación. La permetilación de una muestra de glicanos permite metilar los grupos OH, NH y grupos carboxilos en los residuos de ácido siálico, incrementando la sensibilidad y permitiendo analizar glicanos neutros y sialilados al mismo tiempo (Wada *et al.* 2007; Reiding *et al.* 2014; Gaunitz *et al.* 2017).

Por otro lado, el patrón de glicanos y su heterogeneidad pueden ser analizados de forma directa a partir de glicoproteínas intactas utilizando cromatografía en fase reversa (RPLC), acoplado a un sistema de ionización por electroespray-tiempo de vuelo (ESI-TOF), o bien, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (Zhang *et al.* 2009; Fekete *et al.* 2016). La técnica de RPLC ofrece una mejor separación cromatográfica de las variantes proteicas (Zhang *et al.* 2009) y se pueden detectar masas de anticuerpos (mAb) con 10 ppm de exactitud ($150,000 \pm 1.5\text{Da}$), incrementando la temperatura de columna ($60-80^\circ\text{C}$). La técnica de SEC-MS, aunque con menor resolución que la RPLC, puede ser una opción en condiciones de temperatura ambiente, siempre y cuando se modifique la fase móvil para eliminar las sales que pueden interferir con el análisis de masas (Xu *et al.* 2014; Liu *et al.* 2009). Para perfiles glicoproteicos

más complejos como el análisis de eritropoyetina que contiene tres sitios de N y uno de O-glicosilación (Harazono *et al.* 2013), se recomienda utilizar LC-ESI-MS, mientras que para perfiles más heterogéneos como el análisis de alfa-Darbeopetina con cinco sitios de N-glicosilación, es mejor utilizar ESI-TOF-MS, o bien, masas de alta resolución Orbitrap Exactive™ Plus (Rosati *et al.* 2012). Este sistema permite el análisis de perfiles de glicanos complejos a nivel de proteína intacta. Esta tecnología genera pocas cargas en una proteína cuando se ioniza en un buffer de acetato de amonio que permite a la proteína retener su estructura nativa (Rosati *et al.* 2012; Rosati *et al.* 2013). Otra manera de incrementar la sensibilidad en el análisis de MS de glicoproteínas es utilizando agentes reductores como ditioeritrol (DTT), fosfina tris(2-car-boxietil) (TCEP), β -mercaptoetanol (β -ME) y mercaptoetilamina (MEA) (Jung *et al.* 2014). El uso de proteasas como papaína, pepsina, IdeZ e IdeS es también una alternativa para obtener fragmentos más pequeños que permitan favorecer el análisis de MS (Crivianu-Gaita *et al.* 2015; Brezski y Jordan 2010).

ANÁLISIS DE GLICOPÉPTIDOS

El análisis de glicopéptidos ofrece información sobre los sitios de glicosilación, el grado de ocupación y las estructuras químicas de los oligosacáridos. El procedimiento de análisis inicia con la digestión de la glicoproteína de interés a glicopéptidos mediante el uso de proteasas específicas como tripsina, Lys-C o Glu-C, o bien, la combinación de éstas (tabla 2) (Kolarich *et al.* 2012; Mechref 2012). Posteriormente, la muestra digerida se analiza mediante técnicas de separación cromatográficas como HPLC o UPLC y CE (Lu *et al.* 2018; Ruhaak *et al.* 2018). Los glicopéptidos separados se pueden caracterizar individualmente, mediante análisis directo por masas o por deglicosilación y posterior identificación de los glicanos. La determinación de los sitios de glicosilación proteica a nivel de glicopéptidos es frecuentemente realizada utilizando ESI-MS o MALDI-MS, porque son métodos de ionización suaves

que permiten preservar la integridad de la estructura de los glicopéptidos (Gong *et al.* 2009; Ruhaak *et al.* 2018; Gaunitz *et al.* 2017).

Tabla 2. Proteasas utilizadas comúnmente en la digestión de proteínas y glicoproteínas.

Enzima	Sitio de hidrólisis	pH óptimo
Tripsina	Arg, Lys	8.0-9.0
Endoproteinasa, Lys-C	Lys	8.0
Endoproteinasa, Glu-C (buffer de fosfatos)	Glu	6.5-7.5
Endoproteinasa, Glu-C (buffer de carbonatos)	Glu, Asp	8.0-9.0
Pepsina	Inespecífica	2.0-3.0
Endoproteinasa (AspN)	Asp	8.0

Fuente: elaboración propia.

El análisis de la microheterogeneidad de glicanos es esencial para entender la contribución sito-específico de las estructuras de glicanos en la seguridad y eficacia de los productos biofarmacéuticos. La identificación directa de mezclas de glicopéptidos y péptidos mediante MS está limitada por el efecto del enmascaramiento (supresión de iones) de los péptidos sobre las señales de los glicopéptidos (Ongay *et al.* 2012; Ruhaak *et al.* 2018). Este efecto se puede evitar al separar los péptidos de los glicopéptidos antes del análisis, utilizando lectinas acopladas a matrices de agarosa o sefarosa en columnas que pueden utilizarse a baja y alta presión (HPLC o UPLC) (Zhang *et al.* 2011; Ueda *et al.* 2010; Shetty *et al.* 2010; Drake *et al.* 2011; Johansen *et al.* 2009; Chen *et al.* 2020; Gaunitz *et al.* 2017). El uso de lectinas para enriquecer fracciones de glicopéptidos permite eliminar los péptidos no glicosilados, utilizando mono o disacáridos que compiten por la unión a la lectina acoplada a una resina (Zhang *et al.* 2011; Shetty *et al.* 2010; Koles *et al.* 2007; Lewandrowski *et al.* 2006; Ruiz-May *et al.* 2014; Ruhaak *et al.* 2018). La mayoría de las lectinas empleadas son para enriquecer *N*-glicopéptidos mediante cromatografía de afinidad (Hirabayashi 2004; Wuhrer *et al.* 2007; Ruhaak *et al.* 2018).

La lectina Concanavalina (ConA) se ha utilizado para enriquecer glicoproteínas en muestras de suero y orina (Bunkenborg *et al.* 2004; Ruhaak *et al.* 2018). La ConA se une preferentemente a glicanos oligomanosídicos, híbridos y bi-antenarios, pero por el contrario, los glicanos tipo tri-antenarios y tetra-antenarios no son retenidos y los residuos de fucosa unidos a GlcNAc pueden disminuir la especificidad de la lectina (Cummings y Kornfeld 1982). Por otro lado, esta lectina no reconoce O-glicopéptidos o glicoproteínas. Por esta razón, se ha recurrido al uso combinado de las lectinas ConA y la lectina de germen de trigo (WGA) (Bunkenborg *et al.* 2004). La lectina WGA reconoce residuos de GlcNAc, quitobiosa y glicanos sialilados distribuidos en N- y O-glicanos (Bakry *et al.* 1991; Alley *et al.* 2013). El uso combinado de estas lectinas permite entonces el reconocimiento de glicanos con y sin residuos de ácido siálico (Bunkenborg *et al.* 2004; Schwarz *et al.* 1993).

El uso de lectinas para estudiar la O-glicosilación es poco específico (Darula y Medzihradzsky 2009; Madera *et al.* 2005). Algunos reportes han demostrado que la lectina Jacalina (JAC) permite satisfactoriamente el enriquecimiento de O-glicopéptidos de tipo mucina o de core 1 (GalNAc-Ser/Thr) (Darula y Medzihradzsky 2009; Durham y Regnier 2006; Tachibana *et al.* 2006). La lectina JAC se ha utilizado con la lectina ConA y WGA con el objetivo de enriquecer O-glicopéptidos (Saulsbury 1997). Otras lectinas utilizadas en el enriquecimiento de glicopéptidos son las obtenidas de *Lens culinaris* (LCA) y de cacahuate (PNA). La primera con especificidad similar a ConA aunque tiene preferencia por glicanos con residuos de fucosa, mientras que PNA tiene especificidad similar a la lectina JAC pero no reconoce residuos de ácidos siálico unidos a galactosa (Saulsbury 1997). En la tabla 3, se muestran las condiciones de uso de las lectinas y el carbohidrato que debe utilizarse para obtener fracciones de glicopéptidos enriquecidas dependiendo de la afinidad de las lectinas por diferentes residuos de carbohidratos.

El enriquecimiento de glicopéptidos es necesario porque se evita la supresión competitiva entre péptidos y glicopéptidos frecuentemente resultado de la competencia de las digestiones enzimáticas de glicoproteínas. Otros métodos

de enriquecimiento de glicopéptidos desarrollados son SEC (Alvarez-Manilla *et al.* 2006; Ruhaak *et al.* 2018) y la cromatografía líquida de interacción hidrofílica con sefarosa o celulosa (HILIC) (Hagglund *et al.* 2004; Dominguez-Vega *et al.* 2018). La técnica cromatográfica de separación HILIC también puede ser acoplada a nano-ESI o UPLC-MS (Hagglund *et al.* 2004; Takegawa *et al.* 2006; Wuhrer *et al.* 2005; Gaunitz *et al.* 2017; Alley *et al.* 2013) para el análisis de glicopéptidos. Una vez separados los glicopéptidos se analizan por ESI o MS-MALDI, siendo LC-ESI-MS el método más eficiente y ampliamente utilizado (Ongay *et al.* 2012). Cuando la abundancia de los glicopéptidos es baja, no es recomendable utilizar un sistema de fase reversa acoplado a masas o RPLC-MS debido a la supresión iónica generada por la coelución de glicopéptidos de mayor abundancia. La metodología de HILIC es una de las mejores opciones para separar glicopéptidos aunque tiene la desventaja de no distinguir entre glicopéptidos isómeros (Desaire 2013). Para diferenciar glicopéptidos isómeros se debe utilizar un sistema nano-LC-MS utilizando capilares empacados con carbón grafito poroso (PGC) que permitan resolver glicopéptidos cortos producidos por digestión, por ejemplo con la enzima Pronasa E (Hua *et al.* 2012).

Tabla 3. Lectinas y condiciones de uso en cromatografía por afinidad.

¹ Lectina unida a resina de columna.

² Buffer de unión para preparar las muestras y remover proteínas inespecíficas.

Lectina ¹	Buffer de unión ² (pH 7.4)	Carbohidrato contenido en el buffer de elución ³ (pH 7.4)
Con A	20 mM Tris, 0.15 NaCl, 1 mM Ca ⁺² , 1 mM Mn ⁺²	0.5 M Metil- α -D-manopiranosido
WGA	20 mM Tris, 0.15 NaCl	0.5 M N-acetil-glucosamina
JAC	20 mM Tris, 0.15 NaCl	0.8 M Galactosa
PNA	20 mM Tris, 0.15 NaCl, 1 mM Ca ⁺² , 1 mM Mg ⁺²	0.5 M Lactosa
LCA	20 mM Tris, 0.15 NaCl, 1 mM Ca ⁺² , 1 mM Mn ⁺²	0.5 M Metil- α -D-manopiranosido

³ Buffer de elución 20 mM Tris, 0.15 NaCl.

Fuente: elaboración propia.

La espectrometría de masas en tandem es más específica si se requiere establecer el perfil de un glicopéptido, sin embargo, tiene la desventaja de que puede generar degradación de glicopéptidos sialilados si éstos no son derivatizados previamente (Reusch y Tejada 2015). El análisis de glicopéptidos por LC-MS/MS permite determinar el sitio o sitios de glicosilación y la composición de glicanos presentes en el glicopéptido. No obstante, es necesario emplear un sistema alternante de masas entre la disociación por colisión inducida (CID) y las técnicas de disociación por captura de electrones (ECD) y disociación por transferencia electrónica (ETD) en instrumentos Orbitrap (Alley *et al.* 2013; Gaunitz *et al.* 2017; Chen *et al.* 2020). La técnica de CID permite romper residuos de glicanos unidos a glicopéptidos generando información acerca de la composición y secuencia de carbohidratos, dejando intacta la parte peptídica, mientras que con ECD y ETD se rompen de manera predominante los enlaces peptídicos y se utilizan para identificar el sitio de glicosilación en la glicoproteína y la secuencia peptídica (Scott *et al.* 2011; Segu y Mechref 2010; Fekete *et al.* 2016; Hagan *et al.* 2014). De tal forma que los péptidos enriquecidos pueden ser fragmentados mediante CID-ETD y así es posible analizar los residuos de glicanos mediante CID y la secuencia de glicopéptidos y el sitio de unión de los glicanos con ECD y ETD.

El método fotodisociación ultravioleta (UVPD) es una vía emergente de gran potencial para analizar tanto glicopéptidos como glicanos hidrolizados. El pulso de fotones UV generados por láser son utilizados para excitar iones en un rango de 3.5-7.9 eV. El nivel de fragmentación de iones es mayor y *N*- y *O*- glicopéptidos se han detectado a 157 nm, mientras que grupos lábiles presentes en oligosacáridos como los residuos de ácido siálico se han analizado a 193 nm determinando su localización es estructuras ramificadas (Ruhaak *et al.* 2018).

HIDRÓLISIS DE GLICANOS

Otro método de análisis consiste en obtener los glicanos mediante hidrólisis enzimática o química. La metodología utilizada para hidrolizar o liberar

glicanos depende de la glicoproteína que se analiza. El agente de hidrólisis se selecciona de acuerdo con el tipo de eliminación (*N*- u *O*-glicanos) y el nivel requerido (monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos) (Merry y Astrautsova 2003).

HIDRÓLISIS DE *N*-GLICANOS

Un método químico utilizado para hidrolizar *N*-glicanos y *N*-glicoproteínas es la hidrazinólisis. Este proceso ha sido reemplazado por métodos enzimáticos. Los *N*-glicanos pueden ser liberados enzimáticamente de las glicoproteínas mediante el uso de una amidasa comercial conocida como *N*-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum* (PNGasa F) (Koles *et al.* 2007). La enzima PNGasa F hidroliza glicanos unidos entre el core de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y el residuo de asparagina de todos los *N*-glicanos, con excepción de los que contienen el residuo de $\alpha(1,3)$ -fucosa unido al core de GlcNAc encontrado en glicoproteínas de plantas e insectos (Tretter *et al.* 1991). La PNGasa F hidroliza glicanos altos en manosa, híbridos y complejos (Yang y Bartlett 2019) en condiciones de pH 7.5. Otra enzima es la PNGasa A aislada de almendras; es una amidasa utilizada para hidrolizar glicanos $\alpha(1,3)$ -fucosilados (Royle *et al.* 2006b) que funciona a pH 4.0, mientras que la enzima endo D hidroliza los dos residuos de GlcNAc dentro del core quitobiosa. Para hidrolizar todas las clases de *N*-glicanos, se utiliza la enzima endo H que es selectiva para estructuras oligomanosa y de tipo híbrido. Existen otras endoglicosidasas como F1, F2 y F3, siendo F1 muy similar en mecanismo de hidrólisis a endo H, mientras que F2 prefiere cadenas biantenarias y F3 hidroliza cores de tipo bi- y tri-antennarios fucosilados (Freeze y Kranz 2010) (figura 6). La eficiencia de la digestión por lo general depende de la accesibilidad de los glicanos en la proteína y por ello la proteína debe desnaturalizarse para permitir la exposición del sitio de glicosilación, a menos que se desee distinguir entre glicanos de superficie y del interior de la proteína (Merry y Astrautsova 2003).

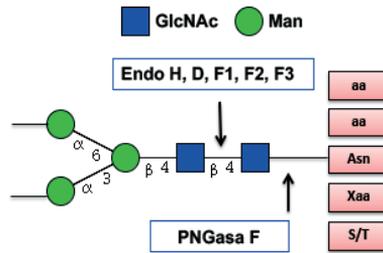


Figura 6. Enzimas utilizadas para hidrolizar *N*-glicanos. PNGasa F hidroliza *N*-glicanos entre el residuo del aminoácido asparagina (Asn) convirtiéndola a Asp, y las endoglicosidasas H, D y F hidrolizan los *N*-glicanos entre los dos residuos de GlcNAc en la región del core dejando el residuo de GlcNAc unido a la proteína. Aa =aminoácidos, Xaa (cualquier aa, excepto Pro) y S/T (Ser/Thr).

Fuente: elaboración propia.

HIDRÓLISIS DE O-GLICANOS

La hidrólisis de los *O*-glicanos unidos a los residuos de Ser y Thr sigue siendo un reto debido a la limitada especificidad de las enzimas *O*-glicosidasas reportadas. La enzima conocida como *O*-glicosidasa (endo- α -N-acetilgalactosaminidasa o Eng) extraída de *Diplococcus pneumoniae* (Bhavanandan *et al.* 1976; Brooks y Savage 1997; Kobata y Takasaki 1978), es capaz de liberar residuos del core-1 de los *O*-glicanos (Gal1, 3GalNAc-Ser/Thr) de disacáridos y presenta poca tolerancia a oligosacáridos de mayor longitud. En la actualidad, la *O*-glicosidasa comercial endo-GalNAc obtenida de *Enterococcus faecalis*, hidroliza el core 1 y 3 de estructuras de *O*-glicanos (Hagan *et al.* 2014). Aún cuando se dispone de esta enzima, los métodos químicos siguen siendo la mejor alternativa de hidrólisis de los *O*-glicanos presentes en las glicoproteínas. La β -eliminación en condiciones alcalinas (Fukuda 2001) y la hidrazinólisis (Patel y Parekh 1994) son los dos métodos químicos más utilizados en la liberación de *O*-glicanos. La hidrazinólisis o liberación química utilizando hidrazina anhidra se ha utilizado ampliamente generando glicanos reductores con alto rendimiento (Merry *et al.* 2002; Patel y Parekh 1994), sin embargo, su uso se ha limitado por la baja

disponibilidad del reactivo debido a su peligrosidad (Goso *et al.* 2017). Otro inconveniente del uso de la hidrazinólisis es que en esta reacción se eliminan los grupos acetatos presentes en los *N*-glicanos, generando pérdida de información de estos grupos, por ejemplo en los residuos de ácido siálico (Bendiak y Cumming 1985; Patel *et al.* 1993). Esta reacción no es específica y se liberan aproximadamente entre el 10-20 % de los *N*-glicanos durante el proceso (Patel y Parekh 1994).

La β -eliminación alcalina es el método más reconocido en la hidrólisis de *O*-glicanos, sin embargo, puede presentarse degradación de los mismos debido a las condiciones de pH elevado requeridas durante la reacción (Fukuda 2001). Existe una adaptación de la β -eliminación en condiciones no reductoras utilizando un medio débilmente alcalino con amonio, que es compatible con la detección por espectrometría de masas y que evita que los glicanos hidrolizados se degraden por formación de glicosil-aminas (Huang *et al.* 2001; Royle *et al.* 2002). La β -eliminación en condiciones reductoras utilizando NaOH para hidrolizar el enlace glicosídico entre los glicanos y el péptido, debe incluir el uso de borohidruro de sodio (NaBH_4) para reducir los glicanos libres a alditoles con la finalidad de prevenir la aminación reductiva. Sin embargo, el método tiene la limitante que la sensibilidad del análisis disminuye porque no se pueden derivatizar los glicanos con fluorocromos (Carlson 1966; Hagan *et al.* 2014). En general, los *O*-glicanos pueden ser hidrolizados utilizando hidrazina o NaBH_4 mediante una reacción de β -eliminación con una posterior reducción de los glicanos liberados para evitar la formación de productos de degradación (Wada *et al.* 2010; Goetz *et al.* 2009), pero deben considerarse las desventajas de cada método de hidrólisis dependiendo de los residuos de carbohidrato a analizar.

El perfil de los glicanos hidrolizados puede ser analizado por MALDI-TOF-MS realizando previamente permetilación para mejorar la eficiencia de ionización y para estabilizar los glicanos sialilados durante el análisis simultáneo de glicanos neutros y sialilados en modo ionización positiva (Zhang *et al.* 2009;

Sanchez-De Melo *et al.* 2015; Marino *et al.* 2010; Gaunitz *et al.* 2017; Ruhaak *et al.* 2018). La esterificación de ácidos siálicos, además de permitir estabilizarlos, da la posibilidad de distinguir por MALDI-MS el tipo de enlace de estos residuos (α 2-3 y α 2-6) (Reiding *et al.* 2014).

ANÁLISIS DE GLICANOS CON MARCAJE FLUORESCENTE

El análisis de los glicanos hidrólizados es un reto debido a la falta de grupos cromóforos en su estructura natural y a la heterogeneidad causada por los tipos de anómeros, posiciones y configuraciones de enlace. Por esta razón, los glicanos obtenidos por hidrólisis química o enzimática son comúnmente marcados con fluorocromos para hacer más sensible su detección mediante aminación reductiva (Ruhaak *et al.* 2010; Zaia 2008; Gaunitz *et al.* 2017; Ruhaak *et al.* 2018), para mejorar la eficiencia de ionización y facilitar su análisis por HPLC/UPLC, MS y CE (Zaia 2008; Marino *et al.* 2010; Lu *et al.* 2018). La derivatización química es el método más común que se emplea para marcar glicanos en su extremo reductor mediante aminación reductiva (Ruhaak *et al.* 2010). Se puede acoplar un marcador fluorescente a cada mono y oligosacárido, facilitando así la determinación de cantidades nanomolares. Los dos fluoróforos más utilizados para el marcaje de glicanos son 2-aminobenzamida (2-AB) y ácido 2-aminobenzoico (2-AA) (Ruhaak *et al.* 2010). El fluoróforo 2-AB carece de carga negativa y es utilizado como estándar en análisis por HPLC, pero su eficiencia de ionización en ESI es baja. Por otro lado, el fluoróforo 2-AA tiene carga negativa y puede utilizarse en CE y MALDI (Ruhaak *et al.* 2010; Mo *et al.* 1998; Ruhaak *et al.* 2018). La Procainamida [4-amino-N-(2-dietilaminoetil) benzamida] también puede utilizarse para marcar a los N-glicanos incrementando su eficiencia de ionización en ESI en comparación con 2-AB detectando N-glicanos de baja abundancia (Kozak *et al.* 2015; Chen *et al.* 2020). Recientemente, se reportaron dos nuevos fluoróforos para marcar N-glicanos: RapiFluor-MS (RFMS) (Lauber *et al.* 2015) y el 6-aminoquinolil-N-hidroxi-succinimidil carbamato

(ACQ) (Stockmann *et al.* 2015) que permite la derivatización de glicosilaminas. Previo al uso de MS para analizar los glicanos marcados se debe remover el exceso de fluorocromos y sales. Los métodos que pueden considerarse son HILIC, RPLC, intercambio aniónico (HPAEC), PGC y filtración en gel (Ruhaak *et al.* 2010; Ruhaak *et al.* 2018; Dominguez-Vega *et al.* 2018). El UPLC y UHPLC, como nueva tecnología cromatográfica en la purificación de moléculas, ha permitido disminuir el tiempo requerido para los análisis y ha mejorado la resolución con el incremento de la presión como resultado del uso de columnas con menor tamaño de partícula (menor a 2µm) en comparación con el HPLC (Guillarme *et al.* 2010; Novakova *et al.* 2006; D'Atri *et al.* 2019). El método de HILIC es mejor que otros métodos de HPLC para separar glicanos. Los glicanos marcados con 2-AB son eluidos y comparados con una escalera de dextrans (homopolímero de glucosa) utilizado como estándar y permite realizar una estimación del número de unidades de glucosa presentes de manera rápida y altamente reproducible (figura 7) (Marino *et al.* 2010; Lauber *et al.* 2015; Pabst y Altmann 2011; Ahn *et al.* 2010; Pucic *et al.* 2011; D'Atri *et al.* 2019; Dominguez-Vega *et al.* 2018). Con esta información y bases de datos como Glycibase, que contienen los valores de tiempos de retención normalizados (GU) obtenidos mediante un amplio análisis de especies de glicanos por HILIC-HPLC/UPLC, RPLC y por electroforesis por capilaridad con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF), es posible calcular la abundancia de cada monosacárido presente y proponer una estructura del glicano (Royle *et al.* 2006a; Campbell *et al.* 2015; Lu *et al.* 2018). A este análisis se pueden acoplar digestiones con exo-glicosidas que permitan remover monosacáridos terminales, y de esta forma, asignar de manera específica los residuos de carbohidratos y el tipo de enlace (figura 7) (Campbell *et al.* 2015; Duffy y Rudd 2015). Una mejora de este método es el uso de un robot de bajo costo como nueva plataforma de análisis del perfil de N-glicanos. Stockmann *et al.*, 2013, determinaron el perfil de N-glicanos de una IgG durante varias etapas como la purificación del anticuerpo a partir del cultivo celular, hidrólisis de los glicanos, marcaje con fluoróforos, y finalmente

se analizaron las muestras por UPLC en placas de 96 o 384 pozos con una excelente reproducibilidad (Stockmann *et al.* 2013).

El acoplamiento del UPLC a detectores de masas es una metodología primordial en el análisis de glicanos. Existen ya en el mercado tecnologías LC-MS de análisis de glicanos como la plataforma biofarmacéutica UniFi®, que incorpora datos de separación de glicanos por HILIC-UPLC, detección fluorescente y confirmación por masas de alta resolución. La metodología HILIC-UPLC-MS puede volverse más poderosa mediante el uso de reactivos como RFMS que incrementa 160 veces más la sensibilidad de los glicanos en el análisis por MS comparado con el tradicional fluorocromo 2-AB (Lauber *et al.* 2015).

Los glicanos hidrolizados también pueden ser analizados por electroforesis por capilar, acoplando un detector de fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) con alta sensibilidad y resolución, utilizando el fluorocromo APTS (8-amino-pirina-1,3,6-trisulfonato) para marcar oligosacáridos (Guttman 1996; Guttman *et al.* 1996; Lu *et al.* 2018), aunque también existen reportes utilizando el fluoróforo 2-AA (Kamoda *et al.* 2006). La separación de glicanos marcados por CE está basada en la relación volumen hidrodinámico: carga. La separación de biomoléculas se basa en el transporte de analitos a través de un campo eléctrico hacia el ánodo o cátodo, mientras que el tamaño de la molécula determina la velocidad del transporte. A pesar de que la mayoría de los carbohidratos no tiene carga con esta metodología es posible separarla y diferenciar estructuras de glicanos isoméricas (Guttman 1996; Guttman *et al.* 1996; Kamoda *et al.* 2006; Ma y Nashabeh 1999; Lu *et al.* 2018; Yang y Bartlett 2019). Una ventaja de la CE es la velocidad del análisis y la cantidad de muestra requerida (<1 µL). Sin embargo, la desventaja es el limitado número de estándares de glicanos en el mercado que podrían permitir asignar los picos en CE. La CE-LIF puede ser utilizada en conjunto con UPLC como un método en 2D (Mittermayr *et al.* 2011) y acoplarse a masas, pero aún no se ha explorado y sigue siendo un reto en el campo de la glicómica.

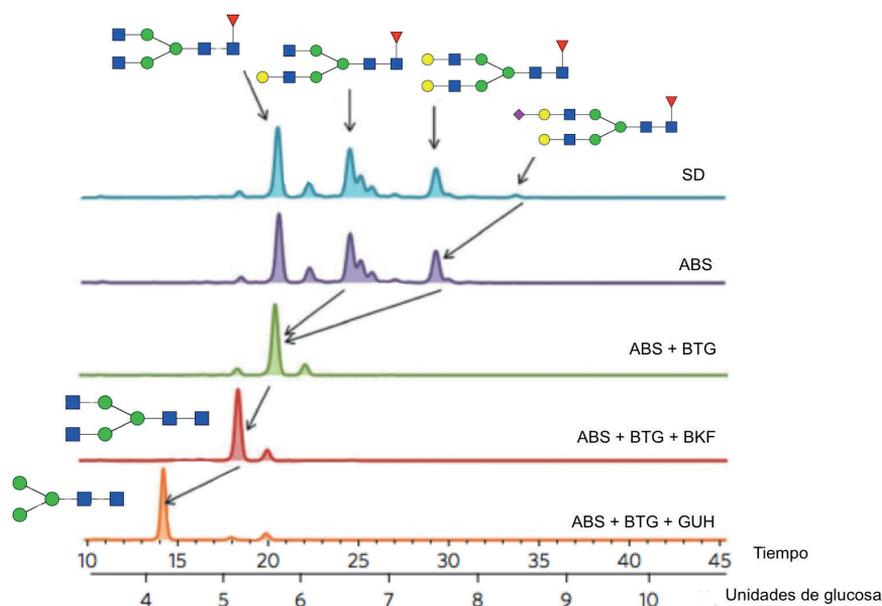


Figura 7. Representación de un perfil de HILIC con N-glicanos marcados con 2-AB sin digerir (SD) y utilizando exo-glicosidasas. ABS: Enzima sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (EC 3.2.1.18) hidroliza ácido N-acetilneuraminico (NeuAc) ligado $\alpha(2-6/3/8)$ y N-ácido glicolilneuraminico (Neu5Gc), BTG: β -Galactosidasa bovina (EC 3.2.1.23) hidroliza residuos no reductores de galactosa con enlaces $\beta(1-3/4)$. BKF: α -Fucosidasa (EC 3.2.1.51) hidroliza residuos de fucosa no reductores en enlaces $\alpha(1-2/6)$ de manera más eficiente que residuos $\alpha(1-3/4)$, GUH: β -N-acetilglucosaminidasa digiere residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) ligadas a manosa en posición $\beta(1-4)$ pero no hidroliza a GlcNAc $\beta(1-4)$ bisectada a manosa. Otras enzimas como NAN1: Sialidasa de *Streptococcus pneumoniae* (EC 3.2.1.18) hidroliza residuos de Neu y Neu5Gc en posiciones $\alpha(2-3)$. SPG: β -Galactosidasa de *S. pneumoniae* (EC 3.2.1.23) hidroliza residuos de galactosa unidos $\beta(1-4)$. AMF: α -fucosidasa de almendra (EC 3.2.1.51) digiere residuos de fucosa unidos $\alpha(1-3/4)$, excepto el core de fucosa $\alpha(1-6)$.

Fuente: elaboración propia. Modificada de Figura 4 del artículo <https://www.nature.com/articles/nchembio.437.pdf>

ANÁLISIS DE GLICANOS SIN DERIVATIZAR

Los glicanos hidrolizados proveen información referente al contenido específico de residuos terminales como ácidos siálicos, galactosas, manosas,

GlcNAc, o bien, O-monosacáridos (Tangvoranuntakul *et al.* 2003; Orvisky *et al.* 2003; Keck *et al.* 2008). Los residuos de NeuAc se obtienen por hidrólisis ácida o enzimática utilizando una enzima llamada neuroaminidasa (*Clostridium perfringens*) (Rohrer *et al.* 1998) y pueden ser cuantificados con alta sensibilidad y resueltos sin derivatizar mediante cromatografía de intercambio aniónico HPAEC a pH elevado con detección amperométrica por pulsos (PAD) (Rohrer *et al.* 1998; Yao *et al.* 1989), utilizando estándares comerciales de ácido siálico como el ácido 3-deoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosónico (Lingg *et al.* 2012). Esta metodología permite separar algunos isómeros y detectar directamente glicanos nativos sin marcar con un fluoróforo. No obstante, acoplar MS a este método de separación cromatográfica es complicado debido a que en este sistema se utilizan fases móviles con pH elevado y alta concentración de sales que interfieren con la ionización de los glicanos (Higgins 2010). Además, la cuantificación absoluta del glicano sólo es posible si se conocen los factores de respuesta PAD individuales para las diversas estructuras de carbohidratos. El análisis de otros monosacáridos, excluyendo a los residuos de NeuAc, se realiza mediante hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético (TFA). Posteriormente, los residuos de NeuAc y los carbohidratos hidrolizados se separan por HPLC (Higgins 2010; Yang y Bartlett 2019). Este método presenta el inconveniente de hidrólisis incompletas y los carbohidratos son inestables debido a las condiciones ácidas utilizadas (Marino *et al.* 2010; Higgins 2010). La cromatografía en grafito poroso (PGC) también puede ser utilizada para separar glicanos y ofrece selectividad ortogonal adicional en comparación con otras columnas (Pabst y Altmann 2011; Grey *et al.* 2009; Ruhaak *et al.* 2018). Con este tipo de fase, sí es posible aplicar un método de PGC-MS por ionización con electrospray y realizar análisis directo de glicanos.

La MS es una herramienta esencial para la glicociencia desde el surgimiento de los métodos de ionización suave como MALDI y ESI-MS. Estos métodos modernos permiten el análisis de mezclas de glicanos tanto en la forma nativa como derivatizada, sin embargo, en muestras de mamíferos es preferible la

permetilación de los glicanos hidrolizados para neutralizar los monosacáridos ácidos o glicanos sialilados (Mechref y Novotny 2002; Wada *et al.* 2007). La permetilación elimina la carga de los glicanos y los convierte en hidrofóbicos disminuyendo la supresión iónica permitiendo su análisis cualitativo por MALDI-TOF. Con este método, la ionización resulta en iones simples generando espectros más sencillos; caso contrario sucede con la ESI que crea múltiples picos cargados haciendo más difícil el análisis del espectro (Zaia 2010), lo que puede resolverse purificando los glicanos por cromatografía de líquidos para simplificar el espectro o bien utilizarse como único método de análisis (Ritchie *et al.* 2010). El problema de la identificación de glicanos por masas es que los glicanos isómeros no pueden ser resueltos utilizando sólo masas, sino que deben utilizarse metodologías complementarias como MS tándem en las que los iones son fragmentados en múltiples pasos para discernir entre estructuras isoméricas (Triguero *et al.* 2010). Las fases estacionarias PGC son ampliamente utilizadas en la purificación y separación de glicanos sin derivatizar, lo cual permite caracterizar isómeros estructurales gracias a la interacción del analito con la superficie del grafito. En este método, los glicanos altos en manosa eluyen rápido en comparación a especies sialiladas o fucosiladas que presentan mayor retención, así los isómeros β 1,4 unidos a residuos de galactosa se pueden separar de los β 1,3Gal porque eluyen más rápido. En cuanto a los isómeros α 2,6 unidos a residuos de NeuAc, pueden separarse de los α 2,3 NeuAc porque eluyen antes que estos últimos (Yang y Bartlett 2019).

La movilidad de iones (IM) es una técnica analítica que se ha utilizado en aeropuertos para detectar agentes químicos y explosivos, pero que también está tomando relevancia porque permite separar y analizar biomoléculas ionizadas en fase gaseosa (helio o nitrógeno). La combinación de IM con la espectrometría de masas (IM-MS) se vuelve una herramienta poderosa porque no sólo permite detectar moléculas en fase gaseosa en base a su relación m/z , sino que pueden separarse iones de acuerdo a su masa, carga, tamaño y forma, permitiendo analizar isómeros. El primer paso consiste en separar los iones

dependiendo de las colisiones con el gas de arrastre y, posteriormente, los iones se introducen en un analizador de masa para determinar su relación m/z en microsegundos (Mucha *et al.* 2019; Hofmann y Pagel 2017). La IM-MS se ha utilizado en la caracterización de *N*- y *O*- glicanos sin derivatizar específicamente en la diferenciación de isómeros porque se pueden separar de acuerdo a su tiempo de movilidad. Esta herramienta sigue mejorándose en la caracterización de carbohidratos, sin embargo, siguen existiendo complicaciones sobre todo por la existencia de conformeros que sobrelapan a los isómeros estructurales durante el análisis (Ruhaak *et al.* 2018).

HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS PARA EL ANÁLISIS DE GLICANOS

El desarrollo de técnicas analíticas poderosas como CE, HPLC y MS ha generado la acumulación de una gran cantidad de datos referentes a estructuras de glicanos (Zaia 2008; Domann *et al.* 2007; Ruhaak *et al.* 2018; Dominguez-Vega *et al.* 2018). Con la finalidad de facilitar el análisis de estos datos, se han creado diversos softwares y bases de datos como Glycobase, una colección de datos analíticos de *N*- y *O*- glicanos obtenidos por CE y cromatografía de líquidos (Campbell *et al.* 2015; Hayes *et al.* 2011). La base de datos UniCarb-KB de diversos glicanos analizados por LC-MS/MS (Hayes *et al.* 2011; Gaunitz *et al.* 2017) permite analizar las m/z obtenidas de diversas elucidaciones estructurales de glicanos. GlycoMod es una herramienta web que permite encontrar posibles glicanos analizados por masas y está basada en una librería *in silico* de datos de masas de glicanos sin derivatizar, o bien, monosacáridos metilados o acetilados (Cooper *et al.* 2001), y aunque carece de filtros biológicos, contiene estructuras inverosímiles que son confirmadas con datos de la base GlycosidIQ (Joshi *et al.* 2004), que actualmente se encuentra integrada a UniCarb-KB. Por otra parte, GlycoFragment y GlycoSearchMS son herramientas que permiten interpretar espectros de MS/MS (Lohmann y von der Lieth 2003, 2004), comparando experimentos de masas con una librería teórica extraída de SweetDB que contiene

datos de *N*- y *O*- glicanos. Una herramienta similar a estas es GlycoPepDB que realiza búsquedas comparativas de glicanos de bases de datos contra los reportados en la literatura (Go *et al.* 2007). Existen otras herramientas como éstas que analizan datos de masas de iones cargados, de *N*- y *O*- glicofomas y de glicanos unidos a proteínas en múltiples sitios de glicosilación. Sin embargo, las bases de datos de glicanos son limitadas porque no existen colecciones completas debido a que existen estructuras de glicanos no reportadas aún, y porque no se conocen las secuencias de proteínas cuando se realizan búsquedas en la base de datos para la identificación de glicoproteínas o glicopéptidos.

CONCLUSIONES

El análisis estructural de glicanos en glicoproteínas terapéuticas y en otro tipo de muestras sigue siendo un reto analítico. Es necesario siempre considerar la respuesta que se requiere para seleccionar una estrategia o bloque de análisis adecuado. En cada uno de estos bloques de análisis existen limitaciones, como la pérdida de los sitios de glicosilación durante el análisis de glicanos hidrolizados, que requieren del análisis de glicopéptidos o glicoproteínas intactas. Sin embargo, en el análisis de glicopéptidos se puede perder sensibilidad si no se realiza un enriquecimiento de las muestras para eliminar los péptidos no glicosilados. Por otro lado, en la identificación de sitios de glicosilación es necesario recurrir a nuevas tecnologías de fragmentación, como CID con técnicas como ECD y ETD para obtener información de los glicanos y péptidos al mismo tiempo. En cuanto al análisis de glicanos hidrolizados, el uso de CE permite analizar *N*-glicanos con carga o residuos neutros previamente derivatizados; esta metodología podría adaptarse a métodos más robustos.

Por el momento, la tecnología HILIC es la vía de oro, por ser la más simple y capaz de separar diferentes oligosacáridos en base a sus propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas. La incorporación del sistema de UPLC al análisis de *N*-glicanos mediante HILIC ha mejorado la resolución y reducido los tiempos

de análisis. Adicionalmente, el marcaje con fluorocromos es sencillo y robusto y permite la predicción de los valores GU que, con las bases de datos, es una herramienta potencial en la elucidación de *N*- y *O*-glicanos. El análisis estructural de *N*-glicanos por este método, puede enriquecerse y confirmarse utilizando exoglicosidasas, sin embargo, para el caso de *O*-glicanos existe la limitante de la baja disponibilidad de enzimas en el mercado.

En espectrometría de masas se siguen desarrollando aplicaciones cada día y puede decirse que, de manera global, su uso en el análisis de glicanos es limitado y a un nivel muy especializado. La determinación de la secuencia de glicanos puede obtenerse por experimentos de MALDI, sin embargo, aunque este método es eficiente y rápido, la asignación de la estructura exacta del oligosacárido requiere del uso de técnicas ortogonales como una combinación HPLC-MS. Finalmente, los requerimientos que no puedan ser cubiertos con los diferentes métodos analíticos, pueden suplirse con análisis en 3D utilizando resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía de rayos X. Desafortunadamente, el uso de estas herramientas exige un alto nivel de especialización para interpretar los datos y la cantidad de muestra requerida muchas veces no es compatible con la baja abundancia de las glicoproteínas.

El análisis estructural de los carbohidratos seguirá siendo un reto para la glicociencia debido a la variabilidad en la secuencia de los glicanos y su distribución en el espacio. Hasta el momento no existe un método único que permita la elucidación estructural de los glicanos, y, dependiendo del objetivo, se seguirá haciendo uso del mejor método o de una combinación de ellos.

REFERENCIAS

- Ahn J, Bones J, Yu YQ, Rudd PM, Gilar M (2010) Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 microm sorbent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878 (3-4):403-408. doi:10.1016/j.jchromb.2009.12.013
- Alley WR, Jr., Mann BF, Novotny MV (2013) High-sensitivity analytical approaches for the structural characterization of glycoproteins. *Chem Rev* 113 (4):2668-2732. doi:10.1021/cr3003714
- Alvarez-Manilla G, Atwood J, 3rd, Guo Y, Warren NL, Orlando R, Pierce M (2006) Tools for glycoproteomic analysis: size exclusion chromatography facilitates identification of tryptic glycopeptides with *N*-linked glycosylation sites. *J Proteome Res* 5 (3):701-708. doi:10.1021/pr050275j
- Arigoni-Affolter I, Scibona E, Lin CW, Bruhlmann D, Souquet J, Broly H, Aebi M (2019) Mechanistic reconstruction of glycoprotein secretion through monitoring of intracellular *N*-glycan processing. *Sci Adv* 5 (11):eaax8930. doi:10.1126/sciadv.aax8930
- Baker KN, Rendall MH, Hills AE, Hoare M, Freedman RB, James DC (2001) Metabolic control of recombinant protein *N*-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 73 (3):188-202
- Bakry N, Kamata Y, Simpson LL (1991) Lectins from *Triticum vulgare* and *Limax flavus* are universal antagonists of botulinum neurotoxin and tetanus toxin. *J Pharmacol Exp Ther* 258 (3):830-836
- Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S (2013) Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 85 (2):715-736. doi:10.1021/ac3032355
- Beck A, Wagner-Rousset E, Bussat MC, Lokteff M, Klinguer-Hamour C, Haeuw JF, Goetsch L, Wurch T, Van Dorsselaer A, Corvaia N (2008) Trends in

- glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Curr Pharm Biotechnol* 9 (6):482-501
- Bendiak B, Cumming DA (1985) Hydrazinolysis-*N*-reacetylation of glycopeptides and glycoproteins. Model studies using 2-acetamido-1-*N*-(*L*-aspart-4-oyl)-2-deoxy-beta-D-glucopyranosylamine. *Carbohydr Res* 144 (1):1-12
- Bhavanandan VP, Umemoto J, Davidson EA (1976) Characterization of an endo-alpha-*N*-acetyl galactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae*. *Biochem Biophys Res Commun* 70 (3):738-745
- Breuker K, Jin M, Han X, Jiang H, McLafferty FW (2008) Top-down identification and characterization of biomolecules by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 19 (8):1045-1053. doi:10.1016/j.jasms.2008.05.013
- Brezski RJ, Jordan RE (2010) Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? *MAbs* 2 (3):212-220
- Brooks MM, Savage AV (1997) The substrate specificity of the enzyme endo-alpha-*N*-acetyl-D-galactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae*. *Glycoconj J* 14 (2):183-190
- Bunkenborg J, Pilch BJ, Podtelejnikov AV, Wisniewski JR (2004) Screening for *N*-glycosylated proteins by liquid chromatography mass spectrometry. *Proteomics* 4 (2):454-465. doi:10.1002/pmic.200300556
- Campbell MP, Royle L, Rudd PM (2015) GlycoBase and autoGU: resources for interpreting HPLC-glycan data. *Methods Mol Biol* 1273:17-28. doi:10.1007/978-1-4939-2343-4_2
- Carillo S, Perez-Robles R, Jakes C, Ribeiro da Silva M, Millan Martin S, Farrell A, Navas N, Bones J (2020) Comparing different domains of analysis for the characterisation of *N*-glycans on monoclonal antibodies. *J Pharm Anal* 10 (1):23-34. doi:10.1016/j.jpha.2019.11.008
- Carlson DM (1966) Oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucin. *J Biol Chem* 241 (12):2984-2986
- Chen SY, Dong M, Yang G, Zhou Y, Clark DJ, Lih TM, Schnaubelt M, Liu Z, Zhang H (2020) Glycans, Glycosite, and Intact Glycopeptide Analysis of *N*-Linked

- Glycoproteins Using Liquid Handling Systems. *Anal Chem* 92 (2):1680-1686. doi:10.1021/acs.analchem.9b03761
- Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH (2001) GlycoMod--a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics* 1 (2):340-349. doi:10.1002/1615-9861(200102)1:2<340::AID-PROT340>3.0.CO;2-B
- Costa AR, Rodrigues ME, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J (2014) Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit Rev Biotechnol* 34 (4):281-299. doi:10.3109/07388551.2013.793649
- Crivianu-Gaita V, Romaschin A, Thompson M (2015) High efficiency reduction capability for the formation of Fab antibody fragments from F(ab)₂ units. *Biochem Biophys Rep* 2:23-28. doi:10.1016/j.bbrep.2015.04.004
- Cummings RD, Kornfeld S (1982) Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-Agarose affinity chromatography. A rapid, sensitive, and specific technique. *J Biol Chem* 257 (19):11235-11240
- Cymer F, Beck H, Rohde A, Reusch D (2018) Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation - Structure, function and therapeutic potential. *Biologicals* 52:1-11. doi:10.1016/j.biologicals.2017.11.001
- D'Atri V, Fekete S, Clarke A, Veuthey JL, Guilleme D (2019) Recent Advances in Chromatography for Pharmaceutical Analysis. *Anal Chem* 91 (1):210-239. doi:10.1021/acs.analchem.8b05026
- Darula Z, Medzihradsky KF (2009) Affinity enrichment and characterization of mucin core-1 type glycopeptides from bovine serum. *Mol Cell Proteomics* 8 (11):2515-2526. doi:10.1074/mcp.M900211-MCP200
- Dell A, Morris HR (2001) Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science* 291 (5512):2351-2356
- Desaire H (2013) Glycopeptide analysis, recent developments and applications. *Mol Cell Proteomics* 12 (4):893-901. doi:10.1074/mcp.R112.026567
- Domann PJ, Pardos-Pardos AC, Fernandes DL, Spencer DI, Radcliffe CM, Royle

- L, Dwek RA, Rudd PM (2007) Separation-based glycoprofiling approaches using fluorescent labels. *Proteomics* 7 Suppl 1:70-76. doi:10.1002/pmic.200700640
- Dominguez-Vega E, Tengattini S, Peintner C, van Angeren J, Temporini C, Haselberg R, Massolini G, Somsen GW (2018) High-resolution glycoform profiling of intact therapeutic proteins by hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 184:375-381. doi:10.1016/j.talanta.2018.03.015
- Dotz V, Haselberg R, Shubhakar A, Kozak RP, Falck D, Rombouts Y, Reusch D, Somsen GW, Fernandes DL, Wührer M (2015) Mass spectrometry for glycosylation analysis of biopharmaceuticals. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 73:1-9. doi:10.1016/j.trac.2015.04.024
- Drake PM, Schilling B, Niles RK, Braten M, Johansen E, Liu H, Lerch M, Sorensen DJ, Li B, Allen S, Hall SC, Witkowska HE, Regnier FE, Gibson BW, Fisher SJ (2011) A lectin affinity workflow targeting glycosite-specific, cancer-related carbohydrate structures in trypsin-digested human plasma. *Anal Biochem* 408 (1):71-85. doi:10.1016/j.ab.2010.08.010
- Duffy FJ, Rudd PM (2015) GlycoProfileAssigner: automated structural assignment with error estimation for glycan LC data. *Bioinformatics* 31 (13):2220-2221. doi:10.1093/bioinformatics/btv129
- Duivelshof BL, Jiskoot W, Beck A, Veuthey JL, Guillarme D, D'Atri V (2019) Glycosylation of biosimilars: Recent advances in analytical characterization and clinical implications. *Anal Chim Acta* 1089:1-18. doi:10.1016/j.aca.2019.08.044
- Durham M, Regnier FE (2006) Targeted glycoproteomics: serial lectin affinity chromatography in the selection of O-glycosylation sites on proteins from the human blood proteome. *J Chromatogr A* 1132 (1-2):165-173. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.070
- Durocher Y, Butler M (2009) Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 20 (6):700-707. doi:10.1016/j.

- copbio.2009.10.008
- Ecker DM, Jones SD, Levine HL (2015) The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* 7 (1):9-14. doi:10.4161/19420862.2015.989042
- Endo T (1999) *O*-mannosyl glycans in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1473 (1):237-246
- Estes S, Melville M (2014) Mammalian cell line developments in speed and efficiency. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 139:11-33. doi:10.1007/10_2013_260
- Fekete S, Guillarme D, Sandra P, Sandra K (2016) Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal Chem* 88 (1):480-507. doi:10.1021/acs.analchem.5b04561
- Freeze HH, Kranz C (2010) Endoglycosidase and glycoamidase release of *N*-linked glycans. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 12:Unit12* 14. doi:10.1002/0471140864.ps1204s62
- Fukuda M (2001) Beta-elimination for release of *O*-GalNAc-linked oligosaccharides from glycoproteins and glycopeptides. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 17:Unit17* 15B. doi:10.1002/0471142727.mb1715bs31
- Gaunitz S, Nagy G, Pohl NL, Novotny MV (2017) Recent Advances in the Analysis of Complex Glycoproteins. *Anal Chem* 89 (1):389-413. doi:10.1021/acs.analchem.6b04343
- Ghaderi D, Taylor RE, Padler-Karavani V, Diaz S, Varki A (2010) Implications of the presence of *N*-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nat Biotechnol* 28 (8):863-867. doi:10.1038/nbt.1651
- Go EP, Rebecchi KR, Dalpathado DS, Bandu ML, Zhang Y, Desaire H (2007) GlycoPep DB: a tool for glycopeptide analysis using a “Smart Search”. *Anal Chem* 79 (4):1708-1713. doi:10.1021/ac061548c
- Goetz JA, Novotny MV, Mechref Y (2009) Enzymatic/chemical release of *O*-glycans allowing MS analysis at high sensitivity. *Anal Chem* 81 (23):9546-9552. doi:10.1021/ac901363h
- Goetze AM, Liu YD, Zhang Z, Shah B, Lee E, Bondarenko PV, Flynn GC (2011)

- High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology* 21 (7):949-959. doi:10.1093/glycob/cwr027
- Gong B, Cukan M, Fisher R, Li H, Stadheim TA, Gerngross T (2009) Characterization of *N*-linked glycosylation on recombinant glycoproteins produced in *Pichia pastoris* using ESI-MS and MALDI-TOF. *Methods Mol Biol* 534:213-223. doi:10.1007/978-1-59745-022-5_16
- Goso Y, Sugaya T, Ishihara K, Kurihara M (2017) Comparison of Methods to Release Mucin-Type *O*-Glycans for Glycomic Analysis. *Anal Chem* 89 (17):8870-8876. doi:10.1021/acs.analchem.7b01346
- Grey C, Edebrink P, Krook M, Jacobsson SP (2009) Development of a high performance anion exchange chromatography analysis for mapping of oligosaccharides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (20-21):1827-1832. doi:10.1016/j.jchromb.2009.05.003
- Guillarme D, Ruta J, Rudaz S, Veuthey JL (2010) New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Anal Bioanal Chem* 397 (3):1069-1082. doi:10.1007/s00216-009-3305-8
- Guttman A (1996) High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis. *Nature* 380 (6573):461-462. doi:10.1038/380461a0
- Guttman A, Chen FT, Evangelista RA (1996) Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis* 17 (2):412-417. doi:10.1002/elps.1150170221
- Hagan AK, Wang M, Liu L (2014) Current approaches to glycoprotein analysis. *Protein Pept Lett* 21 (10):986-999. doi:10.2174/0929866521666140626095752
- Hagglund P, Bunkenborg J, Elortza F, Jensen ON, Roepstorff P (2004) A new strategy for identification of *N*-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *J Proteome Res* 3 (3):556-566
- Harazono A, Hashii N, Kuribayashi R, Nakazawa S, Kawasaki N (2013) Mass

- spectrometric glycoform profiling of the innovator and biosimilar erythropoietin and darbepoetin by LC/ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal* 83:65-74. doi:10.1016/j.jpba.2013.04.031
- Hayes CA, Karlsson NG, Struwe WB, Lisacek F, Rudd PM, Packer NH, Campbell MP (2011) UniCarb-DB: a database resource for glycomic discovery. *Bioinformatics* 27 (9):1343-1344. doi:10.1093/bioinformatics/btr137
- Higgins E (2010) Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic. *Glycoconj J* 27 (2):211-225. doi:10.1007/s10719-009-9261-x
- Hirabayashi J (2004) Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj J* 21 (1-2):35-40. doi:10.1023/B:GLYC.0000043745.18988.a1
- Hofmann J, Pagel K (2017) Glycan Analysis by Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* 56 (29):8342-8349. doi:10.1002/anie.201701309
- Hossler P, Khattak SF, Li ZJ (2009) Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 19 (9):936-949. doi:10.1093/glycob/cwp079
- Hua S, Nwosu CC, Strum JS, Seipert RR, An HJ, Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB (2012) Site-specific protein glycosylation analysis with glycan isomer differentiation. *Anal Bioanal Chem* 403 (5):1291-1302. doi:10.1007/s00216-011-5109-x
- Huang Y, Mechref Y, Novotny MV (2001) Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Anal Chem* 73 (24):6063-6069
- Jefferis R (2009) Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci* 30 (7):356-362. doi:10.1016/j.tips.2009.04.007
- Johansen E, Schilling B, Lerch M, Niles RK, Liu H, Li B, Allen S, Hall SC, Witkowska HE, Regnier FE, Gibson BW, Fisher SJ, Drake PM (2009) A lectin HPLC method to enrich selectively-glycosylated peptides from complex biological samples. *J Vis Exp* (32). doi:10.3791/1398

- Joshi HJ, Harrison MJ, Schulz BL, Cooper CA, Packer NH, Karlsson NG (2004) Development of a mass fingerprinting tool for automated interpretation of oligosaccharide fragmentation data. *Proteomics* 4 (6):1650-1664. doi:10.1002/pmic.200300784
- Jung SK, Lee KH, Jeon JW, Lee JW, Kwon BO, Kim YJ, Bae JS, Kim DI, Lee SY, Chang SJ (2014) Physicochemical characterization of Remsima. *MABs* 6 (5):1163-1177. doi:10.4161/mabs.32221
- Kamoda S, Ishikawa R, Kakehi K (2006) Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for detailed studies on *N*-linked oligosaccharide profile of therapeutic recombinant monoclonal antibodies. *J Chromatogr A* 1133 (1-2):332-339. doi:10.1016/j.chroma.2006.08.028
- Kaplon H, Reichert JM (2019) Antibodies to watch in 2019. *MABs* 11 (2):219-238. doi:10.1080/19420862.2018.1556465
- Keck R, Nayak N, Lerner L, Raju S, Ma S, Schreitmueller T, Chamow S, Moorhouse K, Kotts C, Jones A (2008) Characterization of a complex glycoprotein whose variable metabolic clearance in humans is dependent on terminal *N*-acetylglucosamine content. *Biologicals* 36 (1):49-60. doi:10.1016/j.biologicals.2007.05.004
- Kobata A, Takasaki S (1978) endo-beta-Galactosidase and endo-alpha-*N*-acetylglactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae*. *Methods Enzymol* 50:560-584
- Kolarich D, Jensen PH, Altmann F, Packer NH (2012) Determination of site-specific glycan heterogeneity on glycoproteins. *Nat Protoc* 7 (7):1285-1298. doi:10.1038/nprot.2012.062
- Koles K, Lim JM, Aoki K, Porterfield M, Tiemeyer M, Wells L, Panin V (2007) Identification of *N*-glycosylated proteins from the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Glycobiology* 17 (12):1388-1403. doi:10.1093/glycob/cwm097
- Kozak RP, Tortosa CB, Fernandes DL, Spencer DI (2015) Comparison of pro-cainamide and 2-aminobenzamide labeling for profiling and identification

- of glycans by liquid chromatography with fluorescence detection coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal Biochem* 486:38-40. doi:10.1016/j.ab.2015.06.006
- Lalonde ME, Durocher Y (2017) Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol* 251:128-140. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.04.028
- Lauber MA, Yu YQ, Brousmiche DW, Hua Z, Koza SM, Magnelli P, Guthrie E, Taron CH, Fountain KJ (2015) Rapid Preparation of Released *N*-Glycans for HILIC Analysis Using a Labeling Reagent that Facilitates Sensitive Fluorescence and ESI-MS Detection. *Anal Chem* 87 (10):5401-5409. doi:10.1021/acs.analchem.5b00758
- Lewandrowski U, Moebius J, Walter U, Sickmann A (2006) Elucidation of *N*-glycosylation sites on human platelet proteins: a glycoproteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 5 (2):226-233. doi:10.1074/mcp.M500324-MCP200
- Lingg N, Zhang P, Song Z, Bardor M (2012) The sweet tooth of biopharmaceuticals: importance of recombinant protein glycosylation analysis. *Biotechnol J* 7 (12):1462-1472. doi:10.1002/biot.201200078
- Liu HC, Gaza-Bulsecu G, Chumsae C (2009) Analysis of Reduced Monoclonal Antibodies Using Size Exclusion Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20 (12):2258-2264. doi:10.1016/j.jasms.2009.08.015
- Liu L (2015) Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci* 104 (6):1866-1884. doi:10.1002/jps.24444
- Lohmann KK, von der Lieth CW (2003) GLYCO-FRAGMENT: A web tool to support the interpretation of mass spectra of complex carbohydrates. *Proteomics* 3 (10):2028-2035. doi:10.1002/pmic.200300505
- Lohmann KK, von der Lieth CW (2004) GlycoFragment and GlycoSearchMS: web tools to support the interpretation of mass spectra of complex carbohydrates. *Nucleic Acids Res* 32 (Web Server issue):W261-266. doi:10.1093/

- nar/gkh392
- Lu G, Criehtfield CL, Gattu S, Veltri LM, Holland LA (2018) Capillary Electrophoresis Separations of Glycans. *Chem Rev* 118 (17):7867-7885. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00669
- Ma S, Nashabeh W (1999) Carbohydrate analysis of a chimeric recombinant monoclonal antibody by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem* 71 (22):5185-5192
- Madera M, Mechref Y, Novotny MV (2005) Combining lectin microcolumns with high-resolution separation techniques for enrichment of glycoproteins and glycopeptides. *Anal Chem* 77 (13):4081-4090. doi:10.1021/ac050222l
- Mann M, Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21 (3):255-261. doi:10.1038/nbt0303-255
- Marino K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM (2010) A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol* 6 (10):713-723. doi:10.1038/nchembio.437
- Mechref Y (2012) Use of CID/ETD mass spectrometry to analyze glycopeptides. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 12:Unit 12 11 11-11*. doi:10.1002/0471140864.ps1211s68
- Mechref Y, Novotny MV (2002) Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity. *Chem Rev* 102 (2):321-369
- Merry AH, Neville DC, Royle L, Matthews B, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM (2002) Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis. *Anal Biochem* 304 (1):91-99. doi:10.1006/abio.2002.5620
- Merry T, Astrautsova S (2003) Chemical and enzymatic release of glycans from glycoproteins. *Methods Mol Biol* 213:27-40. doi:10.1385/1-59259-294-5:27
- Mittermayr S, Bones J, Doherty M, Guttman A, Rudd PM (2011) Multiplexed analytical glycomics: rapid and confident IgG N-glycan structural elucidation. *J Proteome Res* 10 (8):3820-3829. doi:10.1021/pr200371s
- Mo W, Takao T, Sakamoto H, Shimonishi Y (1998) Structural analysis of

- oligosaccharides derivatized with 4-aminobenzoic acid 2-(diethylamino) ethyl ester by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 70 (21):4520-4526
- Mori K, Iida S, Yamane-Ohnuki N, Kanda Y, Kuni-Kamochi R, Nakano R, Imai-Nishiya H, Okazaki A, Shinkawa T, Natsume A, Niwa R, Shitara K, Satoh M (2007) Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies. *Cytotechnology* 55 (2-3):109-114. doi:10.1007/s10616-007-9103-2
- Mucha E, Stuckmann A, Marianski M, Struwe WB, Meijer G, Pagel K (2019) In-depth structural analysis of glycans in the gas phase. *Chem Sci* 10 (5):1272-1284. doi:10.1039/c8sc05426f
- Novakova L, Matysova L, Solich P (2006) Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 68 (3):908-918. doi:10.1016/j.talanta.2005.06.035
- Ongay S, Boichenko A, Govorukhina N, Bischoff R (2012) Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *J Sep Sci* 35 (18):2341-2372. doi:10.1002/jssc.201200434
- Orvisky E, Stubblefield B, Long RT, Martin BM, Sidransky E, Krasnewich D (2003) Phosphomannomutase activity in congenital disorders of glycosylation type Ia determined by direct analysis of the interconversion of mannose-1-phosphate to mannose-6-phosphate by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal Biochem* 317 (1):12-18
- Pabst M, Altmann F (2011) Glycan analysis by modern instrumental methods. *Proteomics* 11 (4):631-643. doi:10.1002/pmic.201000517
- Patel T, Bruce J, Merry A, Bigge C, Wormald M, Jaques A, Parekh R (1993) Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both *N*- and *O*-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Biochemistry* 32 (2):679-693
- Patel TP, Parekh RB (1994) Release of oligosaccharides from glycoproteins by hydrazinolysis. *Methods Enzymol* 230:57-66

- Planinc A, Bones J, Dejaegher B, Van Antwerpen P, Delporte C (2016) Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives. *Anal Chim Acta* 921:13-27. doi:10.1016/j.aca.2016.03.049
- Pucic M, Knezevic A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O, Gornik O, Supraha-Goreta S, Wormald MR, Redzic I, Campbell H, Wright A, Hastie ND, Wilson JF, Rudan I, Wuhrer M, Rudd PM, Josic D, Lauc G (2011) High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics* 10 (10):M111 010090. doi:10.1074/mcp.M111.010090
- Quaranta A, Spasova M, Passarini E, Karlsson I, Ndreu L, Thorsen G, Ilag LL (2020) *N*-Glycosylation profiling of intact target proteins by high-resolution mass spectrometry (MS) and glycan analysis using ion mobility-MS/MS. *Analyst* 145 (5):1737-1748. doi:10.1039/c9an02081k
- Reiding KR, Blank D, Kuijper DM, Deelder AM, Wuhrer M (2014) High-throughput profiling of protein *N*-glycosylation by MALDI-TOF-MS employing linkage-specific sialic acid esterification. *Anal Chem* 86 (12):5784-5793. doi:10.1021/ac500335t
- Reusch D, Tejada ML (2015) Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* 25 (12):1325-1334. doi:10.1093/glycob/cwv065
- Ritchie G, Harvey DJ, Stroehrer U, Feldmann F, Feldmann H, Wahl-Jensen V, Royle L, Dwek RA, Rudd PM (2010) Identification of *N*-glycans from Ebola virus glycoproteins by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight and negative ion electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24 (5):571-585. doi:10.1002/rcm.4410
- Rohrer JS, Thayer J, Weitzhandler M, Avdalovic N (1998) Analysis of the *N*-acetylneuraminic acid and *N*-glycolylneuraminic acid contents of glycoproteins by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Glycobiology* 8 (1):35-43
- Rojas-Macias MA, Mariethoz J, Andersson P, Jin C, Venkatakrishnan V, Aoki NP, Shinmachi D, Ashwood C, Madunic K, Zhang T, Miller RL, Horlacher

- O, Struwe WB, Watanabe Y, Okuda S, Levander F, Kolarich D, Rudd PM, Wuhrer M, Kettner C, Packer NH, Aoki-Kinoshita KF, Lisacek F, Karlsson NG (2019) Towards a standardized bioinformatics infrastructure for *N*- and *O*-glycomics. *Nat Commun* 10 (1):3275. doi:10.1038/s41467-019-11131-x
- Rosati S, Rose RJ, Thompson NJ, van Duijn E, Damoc E, Denisov E, Makarov A, Heck AJ (2012) Exploring an orbitrap analyzer for the characterization of intact antibodies by native mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* 51 (52):12992-12996. doi:10.1002/anie.201206745
- Rosati S, van den Bremer ET, Schuurman J, Parren PW, Kamerling JP, Heck AJ (2013) In-depth qualitative and quantitative analysis of composite glycosylation profiles and other micro-heterogeneity on intact monoclonal antibodies by high-resolution native mass spectrometry using a modified Orbitrap. *MAbs* 5 (6):917-924. doi:10.4161/mabs.26282
- Royle L, Dwek RA, Rudd PM (2006a) Determining the structure of oligosaccharides *N*- and *O*-linked to glycoproteins. *Curr Protoc Protein Sci Chapter* 12:Unit 12 16. doi:10.1002/0471140864.ps1206s43
- Royle L, Mattu TS, Hart E, Langridge JI, Merry AH, Murphy N, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM (2002) An analytical and structural database provides a strategy for sequencing *O*-glycans from microgram quantities of glycoproteins. *Anal Biochem* 304 (1):70-90. doi:10.1006/abio.2002.5619
- Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM (2006b) Detailed structural analysis of *N*-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol Biol* 347:125-143. doi:10.1385/1-59745-167-3:125
- Ruhaak LR, Xu G, Li Q, Goonatilleke E, Lebrilla CB (2018) Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses. *Chem Rev* 118 (17):7886-7930. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00732
- Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M (2010) Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem* 397 (8):3457-3481. doi:10.1007/s00216-010-3532-z

- Ruiz-May E, Catala C, Rose JK (2014) *N*-glycoprotein enrichment by lectin affinity chromatography. *Methods Mol Biol* 1072:633-643. doi:10.1007/978-1-62703-631-3_43
- Sanchez-De Melo I, Grassi P, Ochoa F, Bolivar J, Garcia-Cozar FJ, Duran-Ruiz MC (2015) *N*-glycosylation profile analysis of Trastuzumab biosimilar candidates by Normal Phase Liquid Chromatography and MALDI-TOF MS approaches. *J Proteomics* 127 (Pt B):225-233. doi:10.1016/j.jprot.2015.04.012
- Saulsbury FT (1997) Alterations in the *O*-linked glycosylation of IgA1 in children with Henoch-Schonlein purpura. *J Rheumatol* 24 (11):2246-2249
- Schwab I, Nimmerjahn F (2014) Role of sialylation in the anti-inflammatory activity of intravenous immunoglobulin - F(ab')(2) versus Fc sialylation. *Clin Exp Immunol* 178 Suppl 1:97-99. doi:10.1111/cei.12527
- Schwarz F, Aebi M (2011) Mechanisms and principles of *N*-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 21 (5):576-582. doi:10.1016/j.sbi.2011.08.005
- Schwarz FP, Puri KD, Bhat RG, Surolia A (1993) Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin, and lentil (*Lens culinaris*) lectin. *J Biol Chem* 268 (11):7668-7677
- Scott NE, Parker BL, Connolly AM, Paulech J, Edwards AV, Crossett B, Falconer L, Kolarich D, Djordjevic SP, Hojrup P, Packer NH, Larsen MR, Cordwell SJ (2011) Simultaneous glycan-peptide characterization using hydrophilic interaction chromatography and parallel fragmentation by CID, higher energy collisional dissociation, and electron transfer dissociation MS applied to the *N*-linked glycoproteome of *Campylobacter jejuni*. *Mol Cell Proteomics* 10 (2):M000031-MCP000201. doi:10.1074/mcp.M000031-MCP201
- Segu ZM, Mechref Y (2010) Characterizing protein glycosylation sites through higher-energy C-trap dissociation. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24 (9):1217-1225. doi:10.1002/rcm.4485
- Shetty V, Nickens Z, Shah P, Sinnathamby G, Semmes OJ, Philip R (2010) Investigation of sialylation aberration in *N*-linked glycopeptides by

- lectin and tandem labeling (LTL) quantitative proteomics. *Anal Chem* 82 (22):9201-9210. doi:10.1021/ac101486d
- Sola RJ, Griebenow K (2010) Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs* 24 (1):9-21. doi:10.2165/11530550-000000000-00000
- Spiro RG (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12 (4):43R-56R. doi:10.1093/glycob/12.4.43r
- Stockmann H, Adamczyk B, Hayes J, Rudd PM (2013) Automated, high-throughput IgG-antibody glycoprofiling platform. *Anal Chem* 85 (18):8841-8849. doi:10.1021/ac402068r
- Stockmann H, Duke RM, Millan Martin S, Rudd PM (2015) Ultrahigh throughput, ultrafiltration-based *n*-glycomics platform for ultraperformance liquid chromatography (ULTRA(3)). *Anal Chem* 87 (16):8316-8322. doi:10.1021/acs.analchem.5b01463
- Subedi GP, Barb AW (2016) The immunoglobulin G1 *N*-glycan composition affects binding to each low affinity Fc gamma receptor. *MAbs* 8 (8):1512-1524. doi:10.1080/19420862.2016.1218586
- Tachibana K, Nakamura S, Wang H, Iwasaki H, Tachibana K, Maebara K, Cheng L, Hirabayashi J, Narimatsu H (2006) Elucidation of binding specificity of Jacalin toward *O*-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. *Glycobiology* 16 (1):46-53. doi:10.1093/glycob/cwj038
- Takegawa Y, Deguchi K, Keira T, Ito H, Nakagawa H, Nishimura S (2006) Separation of isomeric 2-aminopyridine derivatized *N*-glycans and *N*-glycopeptides of human serum immunoglobulin G by using a zwitterionic type of hydrophilic-interaction chromatography. *J Chromatogr A* 1113 (1-2):177-181. doi:10.1016/j.chroma.2006.02.010
- Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E (2003) Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman

- dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (21):12045-12050. doi:10.1073/pnas.2131556100
- Tretter V, Altmann F, Marz L (1991) Peptide-N4-(*N*-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1--3 to the asparagine-linked *N*-acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem* 199 (3):647-652
- Triguero A, Cabrera G, Royle L, Harvey DJ, Rudd PM, Dwek RA, Bardor M, Lerouge P, Cremata JA (2010) Chemical and enzymatic *N*-glycan release comparison for *N*-glycan profiling of monoclonal antibodies expressed in plants. *Anal Biochem* 400 (2):173-183. doi:10.1016/j.ab.2010.01.027
- Ueda K, Takami S, Saichi N, Daigo Y, Ishikawa N, Kohno N, Katsumata M, Yamane A, Ota M, Sato TA, Nakamura Y, Nakagawa H (2010) Development of serum glycoproteomic profiling technique; simultaneous identification of glycosylation sites and site-specific quantification of glycan structure changes. *Mol Cell Proteomics* 9 (9):1819-1828. doi:10.1074/mcp.2010/000893
- Wada Y, Azadi P, Costello CE, Dell A, Dwek RA, Geyer H, Geyer R, Kakehi K, Karlsson NG, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kim S, Kondo A, Lattova E, Mechref Y, Miyoshi E, Nakamura K, Narimatsu H, Novotny MV, Packer NH, Perreault H, Peter-Katalinic J, Pohlentz G, Reinhold VN, Rudd PM, Suzuki A, Taniguchi N (2007) Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans--HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology* 17 (4):411-422. doi:10.1093/glycob/cwl086
- Wada Y, Dell A, Haslam SM, Tissot B, Canis K, Azadi P, Backstrom M, Costello CE, Hansson GC, Hiki Y, Ishihara M, Ito H, Kakehi K, Karlsson N, Hayes CE, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kobayashi K, Kolarich D, Kondo A, Lebrilla C, Nakano M, Narimatsu H, Novak J, Novotny MV, Ohno E, Packer NH, Palaima E, Renfrow MB, Tajiri M, Thomsson KA, Yagi H, Yu SY, Taniguchi N (2010) Comparison of methods for profiling *O*-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome

- Initiative multi-institutional study of IgA1. *Mol Cell Proteomics* 9 (4):719-727. doi:10.1074/mcp.M900450-MCP200
- Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ, Jr. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 44 (45):7342-7372. doi:10.1002/anie.200501023
- Walsh G (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* 36 (12):1136-1145. doi:10.1038/nbt.4305
- Weerapana E, Imperiali B (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* 16 (6):91R-101R. doi:10.1093/glycob/cwj099
- Wuhrer M, Catalina MI, Deelder AM, Hokke CH (2007) Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 849 (1-2):115-128. doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.041
- Wuhrer M, Deelder AM, Hokke CH (2005) Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 825 (2):124-133. doi:10.1016/j.jchromb.2005.01.030
- Xu CF, Zang L, Weiskopf A (2014) Size-exclusion chromatography-mass spectrometry with m-nitrobenzyl alcohol as post-column additive for direct characterization of size variants of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 960:230-238. doi:10.1016/j.jchromb.2014.04.023
- Yang X, Bartlett MG (2019) Glycan analysis for protein therapeutics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1120:29-40. doi:10.1016/j.jchromb.2019.04.031
- Yao K, Ubuka T, Masuoka N, Kinuta M, Ikeda T (1989) Direct determination of bound sialic acids in sialoglycoproteins by acidic ninhydrin reaction. *Anal Biochem* 179 (2):332-335
- Yehuda S, Padler-Karavani V (2020) Glycosylated Biotherapeutics: Immunological Effects of *N*-Glycolylneuraminic Acid. *Front Immunol*

- 11:21. doi:10.3389/fimmu.2020.00021
- Zaia J (2008) Mass spectrometry and the emerging field of glycomics. *Chem Biol* 15 (9):881-892. doi:10.1016/j.chembiol.2008.07.016
- Zaia J (2010) Mass spectrometry and glycomics. *OMICS* 14 (4):401-418. doi:10.1089/omi.2009.0146
- Zhang P, Woen S, Wang T, Liao B, Zhao S, Chen C, Yang Y, Song Z, Wormald MR, Yu C, Rudd PM (2016) Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov Today* 21 (5):740-765. doi:10.1016/j.drudis.2016.01.006
- Zhang W, Wang H, Zhang L, Yao J, Yang P (2011) Large-scale assignment of *N*-glycosylation sites using complementary enzymatic deglycosylation. *Talanta* 85 (1):499-505. doi:10.1016/j.talanta.2011.04.019
- Zhang ZQ, Pan H, Chen XY (2009) Mass Spectrometry for Structural Characterization of Therapeutic Antibodies. *Mass Spectrometry Reviews* 28 (1):147-176. doi:10.1002/mas.20190

La primera edición de *Análisis de glicoproteínas*, perteneciente a la serie *La glicobiología: avances en temas de salud prioritarios*, fue creada en Cuernavaca, Morelos, en septiembre de 2021

