

"2021, Año de la Independencia"

**COMENTARIOS**

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de noviembre y hasta el 31 de diciembre de 2021, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.

Correo electrónico: [consultas@farmacopea.org.mx](mailto:consultas@farmacopea.org.mx).

**DATOS DEL PROMOVENTE**

**Nombre:** \_\_\_\_\_  
**Institución o empresa:** \_\_\_\_\_  
**Teléfono:** \_\_\_\_\_

**Cargo:** \_\_\_\_\_  
**Dirección:** \_\_\_\_\_  
**Correo electrónico:** \_\_\_\_\_

**MONOGRAFÍA NUEVA**

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>MGA 0474. ANÁLISIS DE GLICANOS Y GLICOPROTEÍNAS</b></p>		
<p>Los glicanos, también llamados mono y polisacáridos, son carbohidratos poliméricos producidos por microorganismos vivos. Existen diversos fármacos base proteicos que contienen en su estructura carbohidratos (glicosilación), denominados glicoproteínas que han sido desarrollados como resultado de los avances en la biotecnología; además, muchas proteínas de origen biológico poseen estructuras de glicanos.</p>		
<p>La glicosilación, es una modificación postraducciona que puede desempeñar un papel importante en la determinación de la función farmacocinética, farmacodinámica, estabilidad e inmunogenicidad. Existen 4 tipos de principales de glicosilación en proteínas, sin embargo, los dos tipos más importantes son la N-glicosilación y la O-</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>glicosilación. A diferencia de la transcripción y la traducción, la glicosilación es un proceso que no se realiza a partir de un molde; por lo tanto, se pueden presentar variaciones en el patrón de glicosilación de una proteína ocasionadas por diversas fuentes o diferentes procesos de fabricación. Se conoce que las diferencias en el perfil de glicosilación pueden afectar la actividad biológica de las proteínas con una aplicación terapéutica. Por lo anterior, el perfil de glicosilación es un atributo crítico que debe ser caracterizado y asegurado en su estabilidad y calidad en cualquier glicoproteína de uso terapéutico y profiláctico.</p>		
<p>La primera parte de este MGA proporciona una breve introducción a la glicobiología y describe la complejidad de las estructuras de los glicanos. Posteriormente se proporcionan diagramas de flujo y una serie de estrategias analíticas generales que se pueden utilizar para caracterizar los glicanos mediante el análisis directo de las glicoproteínas ó de glicanos liberados no derivatizados o derivatizados usando diversos métodos de separación cromatográfica y electroforética analizados por diferentes métodos de detección.</p>		
<p>Este MGA proporciona los enfoques utilizados para el análisis de glicoproteínas y glicanos así como, los requisitos para la aplicación de los métodos y la validación de los mismos. El análisis de glicanos implica la aplicación de diversos procedimientos, así como el desarrollo de mapas de estructuras de glicanos específicos para cada glicoproteína. Los</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>procedimientos específicos se indican en las monografías pertinentes.</p>		
<p><b>GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS</b> La mayoría de las proteínas en las células eucarióticas se glicosilan o se modifican postraduccionalmente antes de ser dirigidas hacia los lisosomas y convertirse en parte de la membrana o secretarse. La glicosilación presenta variaciones significativas en cada célula, tejido y especie, debido a la expresión diferencial de cientos de glicosiltransferasas y glicosidasas localizadas por todo el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, así como la por la presencia diferencial de los azúcares utilizados para producir los precursores de la estructura glicosídica. En las proteínas se llevan a cabo cuatro tipos principales de glicosilación enzimática:</p>		
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. La N-glicosilación, que implica la transferencia inicial de oligosacáridos al nitrógeno en el grupo amida terminal de la asparagina.</li> <li>2. La O-glicosilación, que en general implica la transferencia inicial de monosacáridos a los grupos hidroxilo de serina y treonina</li> <li>3. El anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que es un glicolípido unido al C-terminal de una proteína</li> <li>4. La C-glicosilación, que implica la formación de un enlace carbono-carbono entre el carbono C2 del anillo indol de triptófano y</li> </ol>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>el carbono C1 de un residuo de <math>\alpha</math>-manopiranosilo.</p>		
<p>Cualquier proteína puede contener múltiples glicosilaciones N, O ó C, pero no más de un anclaje GPI. La adición no enzimática de sacáridos, llamada glicación, puede presentarse cuando las proteínas se mezclan con azúcares reductores mediante una serie de reacciones complejas. De todas estas, los dos tipos de glicosilación proteica de importancia farmacéutica son la N- y la O-glicosilación. Este capítulo describe los métodos analíticos para las glicosilaciones ligadas a N y O, que son las que se encuentran con más frecuencia en los medicamentos glicoproteicos.</p>		
<p><b>A. N-Glicosilación</b></p>		
<p>La biosíntesis de N-glicanos en glicoproteínas se puede describir como un proceso en etapas:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Iniciación y elongación de la cadena de glicanos unida por lípidos.</li> <li>2. Transferencia de oligosacáridos a la proteína o cadena de polipéptidos naciente.</li> <li>3. Procesamiento de la cadena de N-glicanos mediante la eliminación de residuos específicos de glucosa y manosa.</li> <li>4. Modificación de la cadena de N-glicanos mediante la adición de residuos a los extremos no reductores de la cadena de glicanos.</li> </ol>		
<p>Hay consenso en que la secuencia de aminoácidos para la N-glicosilación es Asn-Xaa-Thr/Ser (donde</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Xaa es cualquier aminoácido diferente de prolina). En general, solo aproximadamente dos tercios de todas las secuencias potenciales, denominadas secuones, se glicosilan y en la actualidad, no existe un método para predecir qué secuón será glicosilado. La N-glicosilación generalmente está relacionada con el tráfico y secreción de proteínas. Los N-glicanos pueden categorizarse como ricos en manosa, híbridos o complejos, dependiendo del grado de procesamiento (<i>Figura 1</i>).</p>		
<p>Los N-glicanos existen como monoantenarios o como glicanos híbridos y complejos con dos o más ramificaciones, frecuentemente denominadas antenas; por lo tanto, a tales glicanos se les clasifica como biantenarios, triantenarios, tetraantenarios y pentaantenarios, estos últimos poco comunes. Las estructuras ricas en manosa carecen de residuos de galactosa o de N-acetilglucosamina (GlcNAc), en las ramificaciones que funcionan como antenas en el extremo más distante de la cadena. En las estructuras híbridas, las antenas presentan residuos de GlcNAc y residuos de manosa terminal, mientras que, en las estructuras complejas, los residuos de <math>\alpha</math>1,6- y <math>\alpha</math>1,3-manosa se sustituyen con grupos de GlcNAc. En los glicanos complejos, las antenas con frecuencia portan residuos de ácido siálico terminal (ácido neuramínico), residuo que se ha demostrado tiene un gran efecto sobre la farmacocinética y la farmacodinámica de muchas glicoproteínas terapéuticas.</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>B. O-Glicosilación</b></p>		
<p>Las cadenas de O-glicanos se construyen secuencialmente mediante un residuo de GalNAc inicial unido a serina, treonina o tirosina, así como a otros aminoácidos menos comunes como la hidroxiprolina e hidroxilisina. Se conocen múltiples estructuras centrales de glicanos, la secuencia y el enlace isomérico de monosacáridos presentan una mayor variedad que los de los de N-glicanos y se han identificado por lo menos ocho distintos (Figura 2). Aunque no hay consenso en una secuencia de aminoácidos determinada para la O-glicosilación esta se favorece por lo general, con la presencia de prolina ubicada un residuo antes o tres residuos después del sitio de glicosilación, ó por la ausencia de residuos de aminoácidos cargados próximos a serina o treonina. La unidad de disacárido N-acetil-lactosamina, Gal<math>\beta</math>1,4GlcNAc, es la extensión más común de la cadena. También son frecuentes las modificaciones adicionales, incluyendo protección de la galactosa terminal con ácido siálico y fucosilación a lo largo de la cadena.</p>		
<p>La O-glicosilación puede ocurrir en grupos, por ejemplo, el tipo mucina, que por lo general forma parte de la superficie celular o de glicoproteínas secretadas. Otra O-glicosilación, como por ejemplo O-GlcNAc, se presenta en muchas proteínas nucleocitoplásmicas; por otra parte, la glicosilación con enlaces O-Man se presenta en algunas</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>glicoproteínas musculares y neuronales. Cabe mencionar que las levaduras llevan a cabo preponderantemente este tipo de glicosilación. Los tipos de glicosilación con enlaces O-Fuc- y O-Glc se presentan en un gran número de proteínas epidérmicas parecidas al factor de crecimiento que se asocian con la vía de señalización Notch.</p>		
<p><b>Heterogeneidad de los Glicanos</b> El tipo de glicosilación (con enlaces N- u O-), la ocupación del sitio y el sitio de glicosilación no son los únicos aspectos que pueden provocar la variación de glicoproteína a glicoproteína, sino que también las estructuras reales de los oligosacáridos (ramificaciones y uniones) pueden variar, incluso en el mismo sitio. Esta heterogeneidad puede resultar de variaciones en el grado de ocupación (total, parcial ó desocupado), en el tipo de glicosilación (ligada en N o en O), y en las estructuras de oligosacáridos (extensiones, ramificaciones y/o enlaces).</p>		
<p>La variación estructural sucede debido a que la glicosilación no se realiza a partir de un molde. El patrón de glicosilación en un sitio dado depende de muchos factores, incluyendo la disponibilidad de glicosiltransferasas y exoglicosidasas específicas de la célula. La heterogeneidad conduce a diversas propiedades físicas y bioquímicas, y por consiguiente, también a la diversidad funcional. La glicosilación de proteínas también está influenciada por la estructura de la proteína, el proceso de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>producción, el sistema de expresión huésped-vector y las condiciones de cultivo celular.</p>		
<p><b>Sistemas de Expresión de Células Huésped y Glicosilación</b></p>		
<p><b>a) bacterias</b> Aunque se ha demostrado que la O- y la N-glicosilación ocurren en una variedad de procariotes, la <i>Escherichia coli</i>, es la bacteria elegida para la producción de muchos productos terapéuticos y no produce proteínas glicosiladas.</p>		
<p><b>b) levaduras</b> Las levaduras producen proteínas N-glicosiladas y O-glicosiladas. Sin embargo, la hipermanosilación en las levaduras puede producir cadenas de N-glicanos con más de 100 residuos de manosa y la sialilación no ocurre a menos que el organismo sea genéticamente modificado. Existen cepas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> que contienen genes heterólogos de varias enzimas de glicosilación, lo cual ha permitido la N-glicosilación en esta levadura de manera similar a la que se produce en humanos. Por otra parte, la O-glicosilación en las levaduras también varía significativamente de la que se presenta en células de mamíferos; la O-glicosilación de la serina o treonina se</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>produce mediante la unión de moléculas de manosa y a menudo consiste en cadenas lineales de hasta seis residuos.</p>		
<p><b>c) Células de insectos</b> Las cadenas de N-glicanos de células de insectos por lo general son del tipo rico en manosa, trimanosa o paucimanosa y complejo truncado. Las células de insectos también producen glicoproteínas con el residuo Fuca<math>\alpha</math>1,3 unido al residuo de GlcNAc proximal en el núcleo de quitobiosa. Este residuo del núcleo de fucosa es un potente inmunógeno y alérgeno. La O-glicosilación en células de insectos no ha sido bien estudiada y aunque se han encontrado residuos de GalNAc–Ser(Thr) con enlaces O-glicosídicos, son muy pocos los que se procesan más allá de la secuencia Gal<math>\beta</math>1,3GalNAc– Ser(Thr). No se han encontrado residuos de ácido siálico en proteínas producidas en células de insectos, aunque la modificación recombinante de la célula de insecto así como variaciones en el medio de cultivo ha logrado demostrar que es posible la producción de productos con ácidos siálico terminal.</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>d) Células vegetales y vegetales</b></p> <p>Los N-glicanos de vegetales contienen principalmente oligosacáridos del tipo oligomanosa, pero también están presentes los tipos híbridos y complejos truncados de estructuras, con o sin Xilβ1,2 acopladas al residuo de manosa con enlace β del núcleo trimanosílico y Fuca1,3 acoplado al residuo de GlcNAc proximal del núcleo de quitobiosa. Los residuos Fuc y Xil son inmunogénicos y se ha demostrado que forman parte de los glico-epitopes de varios alérgenos vegetales. La O-glicosilación en vegetales no ha sido bien estudiada pero se sabe que consiste predominantemente en la adición de cadenas de arabinogalactanos acopladas a residuos de hidroxiprolina, treonina y serina que se localizan en la pared celular del vegetal o en la superficie externa de la membrana plasmática celular. Estos glicanos son inmunogénicos.</p>		
<p><b>e) Células animales</b></p> <p>La mayoría de las proteínas glicosiladas terapéuticas se producen en líneas continuas de células de animales. Se han empleado las células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>riñón de hámster bebe (BHK, por sus siglas en inglés), de riñón embrionario humano (HEK, por sus siglas en inglés) y de mieloma de ratón (SP2/0 o NS0), entre otras células. Estas células animales por lo general producen proteínas con glicosilación similar a la que se observa en humanos. Aunque existen varias diferencias entre la glicosilación en células de roedores y humanos, tales como la presencia de ácido <i>N</i>-glicolilneuramínico que no se encuentra en humanos, las células CHO se han convertido en la herramienta más utilizada por la industria biotecnológica.</p>		
<p><b>ANÁLISIS DE GLICANOS PARA FÁRMACOS BIOLÓGICOS GLICOSILADOS</b> La glicosilación de proteínas puede afectar la actividad biológica, ya sea directa o indirectamente, y la variabilidad en la glicosilación no solo surge de la diversidad celular, sino también del proceso de fabricación. Por consiguiente, el patrón de glicosilación puede ser importante como parte de los estudios de caracterización al asegurar la uniformidad del proceso, y puede ser importante también al asegurar la calidad uniforme de un medicamento biológico después de su ingreso al mercado. Para llevar a cabo el análisis se requieren materiales de referencia adecuadamente caracterizados para respaldar el análisis biológico y fisicoquímico de los lotes de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>producción para asegurar la uniformidad entre lotes. El análisis de la glicosilación puede ser adecuado para los siguientes procesos:</p>		
<p>1. Caracterización de la estructura y estabilidad de productos novedosos y su estabilidad en las etapas de procesamiento y almacenamiento; 2. Pruebas de liberación de lote y pruebas de control durante el proceso; y</p>		
<p>3. Evaluación de la comparabilidad entre productos (p. ej., cuando se han realizado uno o más cambios en el proceso). La comprensión de la relación entre la estructura de glicanos y la función biológica permite tomar decisiones con respecto a la información requerida en cada etapa de desarrollo. Para fármacos biológicos/biotecnológicos, los criterios de caracterización y las especificaciones para la liberación de lotes por lo general se establecen en los lineamientos. El mapeo de glicanos se lleva a cabo aplicando numerosos enfoques y metodologías. Esta variedad es una consecuencia de la diversidad y complejidad de las estructuras de los glicanos, así como de la tecnología y los sistemas de detección disponibles.</p>		
<p>Debido a la diversidad y complejidad de las estructuras de los glicanos y al aumento en la disponibilidad y las mejoras en varios sistemas de detección y tecnologías, los métodos analíticos cubren una amplia gama. Los diferentes métodos que respaldan a los procedimientos paso a paso</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>varían con las glicoproteínas, la disponibilidad de equipo, la experiencia de cada científico y los grupos de científicos, y la información requerida. Los dos tipos de glicosilación de proteínas más estudiados que afectan a la bioactividad son la N- y la O-glicosilación. Los análisis de glicanos pueden emplearse en diversas aplicaciones; las más importantes son: caracterización general del producto, validación del proceso, evaluación de la comparabilidad, pruebas de estabilidad, control de uniformidad del proceso de fabricación y pruebas de liberación.</p>		
<p>La selección de las técnicas analíticas y sus aplicaciones en el desarrollo del producto y la fabricación de rutina dependen de muchos factores, como por ejemplo la complejidad de la glicoproteína, el conocimiento de las relaciones entre glicosilación y seguridad y eficacia, y el diseño general de la estrategia para controlar el proceso de fabricación. Por ejemplo, incluso cuando la importancia biológica de la glicosilación es incierta, el control de la glicosilación se puede considerar como una medida de uniformidad de fabricación. El diagrama de flujo de la Figura 3A es de gran apoyo en la selección de las aplicaciones del análisis de glicanos, mientras que la Figura 3B ofrece una perspectiva general de las técnicas analíticas disponibles y del equipo empleado.</p>		
<p><b>SELECCIÓN DE ANÁLISIS DE GLICANOS PARA CARACTERIZACIÓN Y ESPECIFICACIÓN DE FÁRMACOS BIOLÓGICOS GLICOSILADOS</b></p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Análisis de Glicoproteínas Intactas</b> La forma más directa de análisis de glicoproteínas y glicanos es el estudio de las moléculas intactas. Este método permite obtener información sobre el perfil de glicosilación de las glicoproteínas. Sin embargo, este procedimiento ofrece información limitada cuando se analiza una molécula con múltiples sitios de glicosilación. Uno de los factores de glicosilación más importantes que define la actividad biológica y determina la vida media de las glicoproteínas en circulación es el grado de sialilación. Esto hace que la electroforesis basada en carga iónica y la cromatografía de intercambio iónico sean las técnicas de primera elección. Se han usado casi todos los tipos de electroforesis en gel para estudiar la glicosilación de proteínas, incluyendo la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (MGA 0311, <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i>) y el isoelectroenfoco (IEF) (MGA 0311, <i>Isoelectroenfoco</i>). De manera similar, se ha demostrado que la electroforesis capilar (CE) (MGA 0312, <i>Electroforesis capilar</i>) también es adecuada.</p>		
<p>La cromatografía de intercambio aniónico fuerte se ha usado con el mismo propósito, pero la resolución es a menudo inferior a la del IEF y la CE. La espectrometría de masas directa (MS) es otra opción para el análisis de la modificación postraduccional. A medida que se mejora la resolución de la MS, se hace posible, por medio de este método, la caracterización directa de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>glicoproteínas cada vez más complejas. La técnica debe elegirse de acuerdo con su idoneidad para proporcionar una correlación confiable entre el grado de sialilación y la bioactividad del producto.</p>		
<p><b>Análisis de Glicopéptidos</b> El análisis de glicopéptidos ofrece información sobre los sitios de glicosilación, el grado de ocupación y las estructuras de los oligosacáridos. Los sitios de glicosilación se pueden ver afectados por las condiciones de cultivo celular. Por lo tanto, si un sitio de glicosilación conocido es crítico, los fabricantes deben monitorear las estructuras sitio-específicas de los glicanos. El método típico consiste en generar primero glicopéptidos mediante la digestión con proteasa y luego separarlos, por ejemplo, por HPLC en fase reversa (RP-HPLC) (MGA 0536, Mapeo peptídico). Posteriormente, los glicopéptidos separados se pueden caracterizar individualmente, p. ej., mediante análisis directo usando MS, o por desglicosilación y posterior identificación de los glicanos, según se describe más adelante en la sección Perfil de Oligosacáridos Escindidos.</p>		
<p>La identificación directa mediante MS de la mezcla de glicopéptidos y péptidos sin glicosilar, está limitada por el efecto del enmascaramiento (supresión de iones) de los péptidos sobre las señales de los glicopéptidos. Se puede evitar este efecto separando los péptidos de los glicopéptidos antes del análisis por MS, por ejemplo, combinando el análisis MS fuera de línea</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>(ionización por desorción con láser asistida por matrices [MALDI, por sus siglas en inglés]) o por acoplamiento en línea (ionización por electrospray [ESI, por sus siglas en inglés]). El análisis por MS de glicopéptidos es importante en la caracterización de O-glicanos debido a que estos glicanos no siempre se liberan cuantitativamente y además, debido a su menor tamaño, se adaptan mejor a la caracterización por MS como glicopéptidos. También puede ser apropiado usar CE de alta resolución para la separación, en especial para el análisis de sialilación.</p>		
<p>La identificación de los diferentes sitios de glicosilación de una glicoproteína se hace posible comparando mapas de péptidos obtenidos por digestión proteolítica de la glicoproteína intacta con los obtenidos cuando la glicoproteína se desglicosila previamente o después de la digestión proteolítica. La masa del péptido proporciona información sobre los sitios de glicosilación y calculando la diferencia de masa entre el glicopéptido intacto y el glicopéptido desglicosilado, es posible obtener información sobre los glicanos unidos con respecto a la composición y heterogeneidad. Se puede realizar una etapa de separación después o antes de la desglicosilación.</p>		
<p><b>Perfil de Oligosacáridos liberados</b> La generación de un perfil de glicanos totales liberados de glicoproteínas es el método más común para caracterizar glicoproteínas. Este método ofrece información sobre las diversas</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>poblaciones de glicanos presentes en las proteínas, perfil bi- tri- y tetra-antenario. El grado de sialilación también se puede analizar en este proceso. Dependiendo del método seleccionado, pueden ser necesario derivatizar o marcar previamente a los glicanos para permitir su detección. El análisis de glicanos liberados generalmente implica la liberación y purificación de los glicanos de la mezcla de reacción, seguido del marcado/derivatización de los glicanos, cuando sea necesario; y finalmente una separación y detección del glicano.</p>		
<p>Se encuentran disponibles muchos protocolos y la mayoría de los pasos en el análisis están bien establecidos. La posible desventaja con tal flexibilidad es la falta de acuerdo con respecto a la elección del método bajo ciertas circunstancias; debido a la variedad de técnicas analíticas, no siempre es posible comparar los resultados obtenidos usando diferentes plataformas. Hasta ahora, la mayoría del trabajo se ha enfocado en la <i>N</i>-glicosilación, debido a los siguientes factores:</p>		
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Por lo general, los <i>N</i>-glicanos son clínicamente más relevantes que los <i>O</i>-glicanos en los productos biológicos;</li> <li>2. La liberación de <i>N</i>-glicanos, ya sea por medios químicos (hidrazina) o por enzimas (endoglicosidasas y <i>N</i>-glicosidasa peptídica F [PNGasa F]), es más sencilla</li> </ol>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>que la liberación de glicanos con enlace O-</p>		
<p><b>DESGLICOSILACIÓN</b> El método usado para la liberación de glicanos depende de la glicoproteína en análisis. El agente de escisión se selecciona de acuerdo con el tipo de escisión y el nivel de información requeridos. Se puede usar escisión enzimática o química. La <i>Tabla 1</i> proporciona una lista de algunos agentes de escisión enzimática y su especificidad. La eficiencia de la digestión por lo general depende de la accesibilidad de los glicanos en la proteína y, por consiguiente, la proteína debe desnaturalizarse para maximizar la exposición del sitio de glicosilación, a menos que los analistas deseen distinguir entre glicanos en la superficie y en el interior de la proteína. También pueden usarse agentes de escisión química, por ejemplo, hidrazina o borohidruro alcalino para <math>\beta</math>-eliminación de glicanos con enlace O-.</p>		
<p><b>Liberación Química o Enzimática de N-Glicanos</b>—La PNGasa F (<i>Flavobacterium meningosepticum</i>) es la enzima de preferencia para la liberación de N-glicanos para la mayoría de las glicoproteínas, excepto para algunas glicoproteínas de células vegetales y de insectos que pueden contener un residuo Fuca1,3 unido al núcleo de quitobiosilo. Las cadenas de N-glicanos que tienen esta estructura pueden ser separadas del glicopéptido únicamente por la enzima de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>almendra, PNGasa A. La liberación química por hidrazina anhidra es mucho menos común, principalmente debido a la disponibilidad limitada del reactivo, el cual se considera como un químico peligroso. Asimismo, la hidrazinólisis produce <i>N</i>-glicanos des-<i>N</i>-acetilados.</p>		
<p><b>Liberación Química o Enzimática de O-Glicanos.</b> En la actualidad, solamente una enzima, la <i>O</i>-glicanasa de <i>Diplococcus pneumoniae</i>, está disponible para la liberación de <i>O</i>-glicanos y esta enzima tiene un uso limitado debido a su alta especificidad de sustrato: únicamente separa residuos de Gal<math>\beta</math>1,3GalNAc<math>\alpha</math>1-Ser/Thr. Además, no se dispone de un procedimiento químico ideal; no obstante, los <i>O</i>-glicanos unidos a Ser y Thr se pueden liberar generalmente mediante la reacción por <math>\beta</math>-eliminación reductora catalizada con álcali (reacción con borohidruro alcalino), en la que los glicanos liberados se reducen tan pronto como se escinden a fin de evitar la formación de productos de degradación debido al "peeling".</p>		
<p>Sin embargo, esta reacción no es específica y se sabe que, por lo general, durante la reacción también se liberan aproximadamente 10%–20% de <i>N</i>-glicanos. Los glicanos liberados carecen de un grupo reductor usado para el acoplamiento de marcadores fluorescentes mediante aminación reductiva. Afortunadamente, gracias a los avances en la sensibilidad de la MS, es posible la identificación directa de glicanos reducidos. Se pueden obtener <i>O</i>-glicanos reductores de una</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>calidad relativamente buena mediante <math>\beta</math>-eliminación catalizada con álcali usando aminas primarias tales como la etilamina y la hidrazina. No obstante, ambos reactivos tienen el potencial de producir productos de degradación debido al "peeling". Además, la liberación de O-glicanos con etilamina no es cuantitativa. Aunque la hidrazina puede ser mejor que la etilamina, requiere del estricto control de las condiciones de reacción y manipulación, además de que no cuenta con una fuente comercial.</p>		
<p><b>Separación de glicanos liberados sin marcado fluorescente.</b> Los N-glicanos también se pueden resolver mediante cromatografía de intercambio aniónico HPAEC de pH alto con detección amperométrica por pulsos (PAD, por sus siglas en inglés; ver MGA 0241, Cromatografía), la cual presenta alta sensibilidad, puede separar algunos isómeros y alcanzar una capacidad para detectar directamente glicanos nativos sin marcar. No obstante, la LC/MS para este método de separación es complicada debido a que este sistema HPAEC usa fases móviles con pH elevado y alta concentración de sales que interfieren con la ionización de los glicanos. Además, la cuantificación absoluta del glicano solo es posible si se conocen los factores de respuesta PAD individuales para las diversas estructuras de los glicanos, p. ej., si se encuentra disponible una biblioteca de referencia de oligosacárido apropiada. La cromatografía en grafito poroso</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>(PGC, por sus siglas en inglés) también puede usarse para separar glicanos y ofrece selectividad ortogonal adicional en comparación con otras columnas. Es posible aplicar un método de PGC-MS por ionización con electrospray y para el análisis directo de glicanos.</p> <p><b>MARCADO DE GLICANOS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DE DETECCIÓN Y/O PARA MODIFICAR SUS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS</b></p> <p>La derivatización química es el método más común que se emplea para marcar glicanos en su extremo reductor mediante aminación reductiva. Se puede acoplar un marcador fluorescente a cada mono y oligosacárido, facilitando así la determinación de cantidades molares. La <i>Tabla 2</i> presenta los ejemplos más comunes de marcadores fluorescentes y sus usos más comunes.</p>		
<p><b>PERFIL DE N-GLICANOS</b></p> <p>El análisis o la determinación del perfil de los glicanos liberados se puede realizar mediante procedimientos cromatográficos, electroforéticos o de MS y, en general, mediante una combinación de los mismos. Los métodos se pueden elegir y agrupar de acuerdo con la naturaleza de los glicanos y el nivel de información requerida. El análisis de glicanos ofrece información sobre las diversas poblaciones de glicanos presentes en la proteína (ricos en manosa, híbridos, complejos).</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Perfil de Glicanos mediante HPLC y/o Electroforesis y MS. La generación de perfiles de glicanos marcados con etiquetas fluorescentes mediante HPLC se ha convertido en el método más común. Se puede acoplar una etiqueta a cada mono y oligosacárido individual mediante aminación reductiva en su extremo reductor, facilitando la determinación de cantidades molares. Con un marcador apropiado, se puede generar un perfil de glicanos con alta sensibilidad usando HPLC en fase reversa, en fase normal y de intercambio aniónico (MGA 0241, Cromatografía). Rutinariamente, los analistas usan una combinación de estos métodos a fin de incrementar la resolución de la separación y para diferenciar mejor las estructuras de los glicanos. La exactitud de la identificación de los glicanos se puede validar mediante estándares de glicanos y/o acoplando el sistema HPLC con MS. Por consiguiente, la HPLC de intercambio aniónico, en fase normal y en fase reversa-ESI-MS-MS forman combinaciones poderosas; así mismo y de ser posible, el análisis en línea puede ofrecer perfiles cuantitativos relativos e información sobre la estructura de los glicanos en una sola corrida. La identificación de los picos a través del tiempo de retención es aceptable siempre que sus identidades hayan sido previamente validadas por métodos complementarios y que sea posible garantizar la homogeneidad de los picos.</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>El grado de sialilación de las cadenas de los glicanos puede ser un factor crucial para la eficacia clínica, debido a que la sialilación a menudo define la vida media de la molécula <i>in vivo</i>. La HPLC de intercambio aniónico es el método más simple para su determinación y las estructuras de los glicanos separados basándose en su carga pueden ser identificadas posteriormente por MS. Cuando la interfase de ionización está diseñada únicamente para flujos de bajo contenido salino, es necesaria la desalinización de cada fracción antes de la MS.</p>		
<p>Cuando se utilizan sistemas de separación de alta resolución tales como la CE, se pueden identificar las estructuras de los glicanos usando estándares bien caracterizados para comparación, sin necesidad de usar la MS. El desarrollo de un sistema CE- MS en línea ha incrementado aún más el poder del análisis de glicanos usando este método. Identificación Estructural por Secuenciación Microenzimática y Espectrometría de Masas. Cuando se requiere información detallada sobre la estructura, el análisis generalmente se lleva a cabo usando secuenciación microenzimática. Este procedimiento depende en gran medida de la especificidad y calidad de las enzimas usadas. En los últimos tiempos, la MS en tándem se ha usado con mayor regularidad para confirmar, determinar y secuenciar estructuras de glicanos conocidas y nuevas; este método es factible especialmente cuando los glicanos se liberan de glicoproteínas</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>bien conocidas y de fuentes de producción también bien conocidas.</p>		
<p><b>Análisis de Monosacáridos</b> Diversos ensayos cuantitativos de monosacáridos se llevan a cabo para una variedad de propósitos. En el campo de las glicoproteínas, estos proporcionan información sobre las cantidades relativas de sacáridos en una glicoproteína y sobre el grado de sialilación de una glicoproteína. Así mismo, a través de la medición de la composición de monosacáridos, se obtiene información sobre la estructura de las cadenas de glicanos presentes. Los ensayos usados más simples son las pruebas colorimétricas para demostrar que el producto sea glicosilado y para cuantificar la cantidad total de sacárido presente en el producto. Dichas pruebas tienen una pobre especificidad entre diferentes tipos de residuos de azúcares. Los ensayos de la composición de monosacáridos son por lo general más simples de realizar que el perfil de oligosacáridos, aunque proveen menos información.</p>		
<p>El ensayo de mayor uso es la cuantificación de contenido de ácido siálico, debido a que la pérdida de sialilación y exposición de residuos Gal terminales pueden llevar a una eliminación más rápida de la glicoproteína de la circulación. Estos ensayos se pueden dividir en dos tipos: (1) aquellos que proporcionan información composicional sobre la muestra intacta sin degradación previa; y (2) otros, principalmente</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>cromatográficos, que requieren la hidrólisis de las cadenas de sacáridos antes del análisis y que generan información cuantitativa sobre diversas especies de monosacáridos de manera simultánea. En general, los primeros son colorimétricos y los últimos son cromatográficos. La etapa de hidrólisis es una fuente importante de variabilidad del ensayo y puede requerir de optimización cuidadosa para muestras específicas.</p>		
<p>La presencia de ciertos monosacáridos señala la presencia de estructuras de glicanos específicas. Por ejemplo, la GalNAc generalmente indica la presencia de cadenas de O-glicanos, mientras que la fucosa denota la presencia de tipos específicos de cadenas. Como consecuencia de la diversidad limitada de residuos de monosacáridos presentes en los glicanos de las glicoproteínas, se requiere la cuantificación exacta de los residuos Man, Gal o GlcNAc a fin de distinguir entre grandes cantidades de glicanos estructuralmente diversos. El monosacárido ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc, por sus siglas en inglés) no se produce en humanos y por lo general se considera un componente indeseable y potencialmente inmunogénico de los productos biofarmacéuticos.</p>		
<p><b>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</b> Las muestras de glicoproteínas para el análisis de monosacáridos deben estar libres de sales, excipientes y demás materiales portadores (a menudo se usan azúcares de bajo peso molecular como excipientes para productos</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>biofarmacéuticos). Lo anterior se puede lograr a través de una variedad de métodos, incluyendo los siguientes:</p>		
<p>1. Diálisis contra agua o contra un amortiguador volátil, usando una membrana adecuada y liofilización; 2. HPLC en una columna para permeación en gel apropiada, eluida con agua o con un amortiguador volátil, monitoreada por absorbancia UV o índice de refracción y seguida por la liofilización de la muestra; o 3. Captura de la muestra en un cartucho RP-SPE (extracción en fase sólida de fase reversa) como por ejemplo un sistema para SPE (extracción en fase sólida) C18 o C8, seguido por lavado para eliminar las sales y excipientes y elución de la muestra requerida.</p>		
<p><b>CUANTIFICACIÓN</b> El método común para la cuantificación de azúcares neutros en las glicoproteínas depende del color generado al calentar glicanos o glicoproteínas en presencia de fenol acuoso en ácido sulfúrico concentrado. En muchos casos, el calor requerido para esta reacción se genera agregando ácido sulfúrico concentrado a la mezcla de glicoproteínas-fenol en agua. El mezclado rápido y eficaz de las soluciones es crítico para obtener resultados uniformes. Los resultados cuantitativos se obtienen mediante el análisis simultáneo de estándares para generar una curva estándar de absorbancia en función de la cantidad</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
de sacáridos y/ o en función de una muestra de referencia del producto en análisis.		
<p><b>PROCEDIMIENTOS DE HIDRÓLISIS PARA CADENAS DE POLISACÁRIDOS Y GLICANOS DE GLICOPROTEÍNAS</b></p> <p>Los métodos cromatográficos para la identificación y cuantificación de componentes de monosacáridos requieren la hidrólisis de la muestra antes del análisis. Es necesaria la preparación adecuada de la muestra debido a que los excipientes o las impurezas relacionadas con el proceso pueden ser sacáridos, y las sales residuales pueden interferir con la hidrólisis o con la separación cromatográfica subsiguiente o con la marcación con fluoróforo. Los residuos de ácido siálico pueden ser liberados mediante hidrólisis ácida moderada o por tratamiento enzimático, lo cual deja otros residuos de azúcares unidos a la cadena peptídica.</p>		
<p>La cuantificación de la cantidad de sacárido presente se basa en la adición de un estándar interno antes o después de la hidrólisis. El estándar más comúnmente usado para el análisis de ácido siálico mediante HPAEC es el ácido 3-desoxi-D-glicero-D-galacto2-nonulosónico (KDN), mientras que la 2-desoxiglucosa se usa ampliamente para azúcares neutros. Ambos azúcares son acidolábiles y se deben agregar después de la etapa de hidrólisis. La cuantificación exacta depende de la hidrólisis estequiométrica y</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
de que no se degraden los productos monosacáridos durante la hidrólisis.		
<p><b>DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS SIÁLICOS TOTALES</b></p> <p>Los ácidos siálicos se presentan en polisacáridos y glicoproteínas bacterianas generalmente como derivados N-acetilo y N-glicolilo del ácido neuramínico (Neu5Ac y Neu5Gc). Los ácidos siálicos pueden determinarse junto con otros monosacáridos a través de un proceso que incluye hidrólisis ácida para liberar monosacáridos constitutivos, seguida de HPLC usando una mezcla estándar apropiada. Otra alternativa para determinar el contenido total de ácido siálico son los procedimientos colorimétricos sin necesidad de hidrólisis. El método comúnmente referido como método Warren se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico con el producto de oxidación con peryodato del ácido neuramínico liberado <i>in situ</i> a partir de la glicoproteína. También el color se puede generar, mediante la reacción de resorcinol con ácido neuramínico. Para alcanzar una cuantificación exacta, se incluye una muestra de estándar de referencia en cada medición.</p>		
<p><b>Liberación Selectiva de Ácidos Siálicos.</b> La hidrólisis ácida o la digestión enzimática moderadas se pueden usar para liberar de manera selectiva ácido siálico a partir de las cadenas de glicanos de glicoproteínas para cuantificación por métodos cromatográficos y para cuantificación de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>formas indeseables tales como el Neu5Gc. Resultan necesarias condiciones ácidas más agresivas a fin de liberar azúcares neutros y amino azúcares antes del análisis cromatográfico. El protocolo debe ser optimizado con respecto al rendimiento y la degradación de sacáridos para cada proteína a analizar.</p>		
<p><b>Digestión de Neuraminidasa para la Liberación de Ácido Siálico a partir de Glicoproteínas Intactas.</b> Diversos tipos de neuraminidasas han sido aisladas y estudiadas; la enzima derivada de <i>Clostridium perfringens</i> es la que se usa de manera más común para la liberación enzimática de ácidos siálicos a partir de las glicoproteínas. La enzima recombinante está disponible a través de proveedores comerciales. Se encuentran disponibles otras enzimas con diferentes especificidades que pueden ser utilizadas para distinguir diferentes tipos de enlaces. Las condiciones de hidrólisis deben optimizarse para cada producto, debido a que los parámetros cinéticos para diferentes enlaces, así como para Neu5Ac y Neu5Gc pueden variar. La eliminación selectiva de Neu5Ac con enlaces <math>\alpha 2 \rightarrow 3</math> y Neu5Ac con enlaces <math>\alpha 2 \rightarrow 6</math> a partir de glicanos escindidos es un medio conveniente para definir enlaces. Para análisis cuantitativos, se agrega una cantidad conocida de un estándar interno adecuado, a menudo 2-desoxiglucosa, después de la hidrólisis y eliminación del ácido.</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MONOSACÁRIDOS NO MARCADOS</b></p> <p>El único método usado para la identificación y cuantificación simultáneas de monosacáridos no marcados en hidrolizados es esencialmente HPAEC-PAD. Los métodos HPAEC-PAD también son aplicables a separaciones de oligosacáridos, por lo que se puede usar un único método instrumental para ambas aplicaciones. Para mayor información sobre los principios y componentes generales de cromatografía, ver <i>MGA 0241, Cromatografía</i>. El HPAEC-PAD facilita el análisis de monosacáridos y todas las clases de oligosacáridos sin derivatización. Debido a que son compuestos polihídricos, los carbohidratos son ácidos débiles con valores pKa de 12–14 y, a valores elevados de pH, incluso los carbohidratos neutros se ionizan y pueden ser separados como oxianiones mediante cromatografía de intercambio iónico.</p>		
<p>Aunque las separaciones pueden llevarse a cabo en intercambiadores aniónicos con poliestireno-divinilbenceno porosos estables en álcali, los carbohidratos tienden a presentar picos amplios como resultado de problemas de transferencia de masas. En las microesferas peliculares de relleno de la columna de intercambio aniónico, las microesferas de látex funcionalizadas (diámetro &lt;0,1 µm) se acoplan a microesferas no porosas uniformes de mayor tamaño (diámetro &lt;10 µm). El analito de carbohidrato interactúa con los grupos</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>funcionales en la superficie de las microesferas de látex, eliminando la difusión hacia dentro y hacia afuera de los poros y el ensanchamiento del pico asociado.</p>		
<p>La PAD es el método preferido para la detección de carbohidratos en HPAEC debido a que se basa en las soluciones con pH alto provistas por HPAEC de manera predeterminada. La detección amperométrica mide la corriente o la carga que resulta de la oxidación o reducción de moléculas de analito en la superficie de un electrodo de trabajo. Los electrones se transfieren del analito electroactivo al electrodo durante las reacciones de oxidación y en la dirección opuesta durante las reacciones de reducción. Este proceso permite la detección sensible y altamente selectiva de analitos que se pueden oxidar o reducir, pero las especies interferentes que no son electroactivas siguen sin ser detectadas. Los carbohidratos se oxidan fácilmente en electrodos de oro y platino a un pH elevado y la corriente generada es proporcional a la concentración de carbohidratos.</p>		
<p>Un sistema típico de detección amperométrica contiene un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. Los electrodos de oro son los más comunes para el análisis de carbohidratos, pero los productos de oxidación dañan la superficie del electrodo e inhiben la oxidación adicional. Una superficie estable y activa en el electrodo se logra mediante pulsaciones cíclicas entre potenciales positivos y negativos altos. Se usan diferentes</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>formas de onda para diferentes aplicaciones HPAEC-PAD y para diferentes electrodos de trabajo: los electrodos de oro desechables requieren el uso de formas de onda cuádruples y rápidas, pero otros electrodos de oro permiten el uso de un rango más amplio de formas de onda sin dañar la superficie del electrodo. Los electrodos desechables y las formas de onda rápidas se introdujeron para minimizar la influencia del electrodo de receso sobre la sensibilidad y precisión de aplicaciones cuantitativas de monosacáridos.</p>		
<p><b>MARCACIÓN DE MONOSACÁRIDOS CON FLUORÓFORO ANTES DE LA SEPARACIÓN Y LA CUANTIFICACIÓN</b> Un método alternativo a la identificación y cuantificación de monosacáridos presentes en un hidrolizado consiste en modificar los monosacáridos mediante aminación reductiva con un marcador fluoróforo fácilmente detectable que permita la detección de alta sensibilidad y mejore la separación cromatográfica de monosacáridos. Se puede usar un equipo de HPLC esencialmente estándar y, debido a que se pueden aplicar los mismos métodos de marcación a los oligosacáridos separados, es posible aplicar un método analítico congruente. La marcación con fluoróforo se ha usado en mucha menor medida que HPAEC-PAD para la identificación y cuantificación de monosacáridos. La marcación de derivados de ácido siálico por lo general se lleva a</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>cabo con 1,2-fenilendiamina (o DMB, 4,5-metilendioxi-derivados) y los productos resultantes se separan en una columna C-18 usando detección por fluorescencia.</p>		
<p><b>EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS</b> Los datos obtenidos de diferentes métodos analíticos para el análisis de glicanos se pueden analizar y evaluar para tres propósitos diferentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Confirmación de la identidad de estructuras individuales o familias de estructuras;</li> <li>• Confirmación de la conformidad de la sustancia sometida a ensayo con los requisitos cualitativos;</li> <li>• Confirmación de la conformidad de la sustancia sometida a ensayo con los requisitos cuantitativos.</li> </ul> <p>Las consideraciones específicas con respecto a los estándares de referencia y el desarrollo de métodos de cada nivel de análisis se establecen en las secciones 4 y 5, respectivamente.</p>		
<p><b>1.1. CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD DE ESTRUCTURAS INDIVIDUALES O FAMILIAS DE ESTRUCTURAS</b></p> <p>El objetivo analítico para un método de análisis de glicanos puede ser un monosacárido individual (por ejemplo, ácido siálico, fucosa), una estructura de oligosacárido definida (por ejemplo, glicano tetra-sialilado, tetra-antenario) o una familia de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>estructuras que comparten una característica analítica común (por ejemplo, tetra- glicanos sialilados, glicanos tri-antenarios, isoformas de glicoproteínas con la misma carga). La confirmación de la identidad del objetivo analítico es un paso esencial en el análisis y la evaluación de los datos, y puede lograrse absolutamente, mediante la verificación de la estructura molecular, o comparativamente, mediante la comparación con un estándar de referencia apropiado.</p>		
<p>1.1.1. Confirmación absoluta de identidad</p> <p>La confirmación absoluta de la identidad de las estructuras de glicanos se logra típicamente durante el desarrollo del producto y no debe ser necesariamente el objetivo de los análisis de rutina. La identidad de la diana analítica se asignará por referencia a una propiedad molecular conocida de la molécula. Dicha identificación absoluta de estructuras individuales puede requerir enfoques de varios pasos utilizando reacciones enzimáticas y químicas, técnicas de separación y métodos de detección en línea o fuera de línea, y utilizará más comúnmente la relación de carga a masa de un ión molecular, determinada mediante una espectrometría de masas adecuada, método utilizado como la base final para la asignación de estructura.</p>		
<p>1.1.2. Confirmación comparativa de identidad</p> <p>Durante la aplicación de rutina del método analítico, la identidad del objetivo analítico puede</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>confirmarse mediante comparación con estándares de referencia de idoneidad del proceso o del sistema. Estos pueden generarse a partir de glicoproteínas conocidas y bien caracterizadas, que pueden ser de la misma clase general que el producto que se está probando (por ejemplo, fetuina para glicoproteínas complejas ligadas a N), o pueden derivarse de un lote bien caracterizado del producto que se está analizando y que se ha establecido como un estándar de referencia. Las siguientes consideraciones se aplican a la asignación comparativa de identidad estructural:</p>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• En el caso de una alta reproducibilidad validada de los tiempos de retención, los tiempos de retención absolutos pueden utilizarse para una asignación correcta;</li> <li>• Como alternativa, se puede inyectar un marcador de glicanos al principio y al final de la secuencia de prueba y verificar si hay desviaciones en los tiempos de retención; basándose en estos cromatogramas de referencia, se pueden asignar los glicanos de las muestras de ensayo;</li> <li>• En los casos en los que no se dispone de un estándar para asignar todos los picos de glicanos en la muestra de prueba, se pueden utilizar tiempos de retención absolutos o normalizados para controlar y</li> </ul>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>etiquetar los picos de glicanos no identificados.</p>		
<p>1.2. CONFIRMACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LA SUSTANCIA QUE SE ESTÁ PROBANDO CON LOS REQUISITOS CUALITATIVOS</p> <p>En este nivel de evaluación, los resultados analíticos obtenidos con el producto que se está probando se evalúan para demostrar el cumplimiento de las especificaciones. Por lo general, esto se logra mediante la comparación con los datos obtenidos en paralelo utilizando un estándar de referencia de la sustancia que se está probando. Al evaluar los datos es necesario:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- verificar la idoneidad del sistema: establecer que el resultado analítico obtenido utilizando el patrón de referencia es ampliamente comparable al resultado esperado. Por ejemplo: en un procedimiento de mapeo de glicanos, esto se lograría comparando el mapa obtenido de la muestra con el mapa obtenido para la sustancia de referencia el cual debió ser proporcionado durante el establecimiento de dicha sustancia de referencia.</li> <li>- Demostrar la similitud de los mapas obtenidos con la sustancia de referencia y la sustancia de ensayo, utilizando los</li> </ul>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>critérios de cumplimiento específicos indicados en la monografía específica.</p>		
<p>1.3 CONFIRMACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LA SUSTANCIA QUE SE ESTÁ PROBANDO CON LOS REQUISITOS CUANTITATIVOS</p>		
<p>1.3.1. Medición cuantitativa de niveles de analitos y expresión de resultados.</p> <p>En algunos casos, p. Ej. medición de ácido siálico u otros monosacáridos, los datos se pueden expresar para obtener una relación molar de ácido siálico a glicoproteína. Los datos se calculan por comparación con un estándar de referencia para el ácido siálico y utilizando un método validado de determinación de proteínas. Puede utilizarse el método estándar interno o externo.</p>		
<p>1.3.2. Expresiones cuantitativas del perfil de separación</p> <p>Los perfiles o patrones de distribución pueden expresarse numéricamente de varias formas, incluido el procedimiento de normalización; el contenido porcentual de cada objetivo analítico, p. ej. entidad de glicano, se calcula determinando la respuesta de la entidad de glicano como un</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>porcentaje de la respuesta total de todas las entidades, excluyendo las debidas a disolventes o cualquier reactivo añadido, y las que se encuentran por debajo del límite de detección. Además, se pueden utilizar expresiones numéricas como el número Z, que son específicas del método y del producto y se definen en monografías específicas.</p>		
<p><b>2. NORMAS DE REFERENCIA</b></p> <p>Los estándares de referencia para el análisis de glicanos tienen 2 funciones: la verificación de la idoneidad del sistema y la confirmación de que el artículo bajo prueba cumple con los requisitos especificados.</p>		
<p>Los estándares de referencia utilizados para la verificación del sistema pueden ser:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Una sustancia de referencia adecuada;</li> <li>- restos de glicanos liberados de un patrón de referencia completamente caracterizado;</li> <li>- restos de glicanos bien caracterizados liberados de glicoproteínas (por ejemplo, fetuina, IgG);</li> <li>-Marcadores de glicanos caracterizados por su identidad y pureza.</li> </ul>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>El estándar de referencia utilizado para el cumplimiento de la glicoproteína bajo prueba es una preparación de las sustancias que se están probando. Cabe señalar que los procedimientos de análisis de glicanos descritos en monografías específicas prescriben el uso de un estándar de referencia para la sustancia que se está probando y para la cual se ha validado el procedimiento de análisis de glicanos.</p>		
<p><b>3. PUNTOS A TENER EN CUENTA EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS</b></p> <p>Esta sección proporciona los medios para medir el rendimiento general del método durante el desarrollo. El alcance del desarrollo del método y la validación analítica se selecciona en función de su idoneidad para un producto específico. Dependiendo del enfoque elegido, son necesarios varios pasos para el análisis de glicanos, por ejemplo:</p>		
<p>-Aislamiento y purificación (o desalación) de la glicoproteína;</p> <p>-Tratamiento enzimático (o químico) de la glicoproteína para liberar selectivamente glicanos</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>unidos a N u O de la cadena principal de la proteína;</p> <p>–Aislamiento y purificación de los glicanos liberados;</p> <p>–Verificación de residuos de ácido siálico y monosacáridos liberados;</p> <p>–Marcado cromóforo de los glicanos liberados;</p> <p>–Separación de los glicanos, nativos o marcados con fluorescencia;</p> <p>–Identificación y cuantificación de glicanos (por ejemplo, determinación del número Z);</p> <p>–Determinación de la ocupación del sitio basada en cantidades relativas de péptidos glicosilados y no glicosilados.</p>		
<p>Aislamiento y purificación de proteínas</p> <p>El aislamiento y la purificación de la glicoproteína de su matriz pueden ser necesarios para eliminar todas las sustancias interferentes (por ejemplo, excipientes, sales) y, cuando sea necesario, se especificarán en la monografía específica. Esto debe realizarse de manera reproducible para</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>garantizar una recuperación cuantitativa de la proteína.</p>		
<p>Liberación y aislamiento de oligosacáridos</p> <p>El enfoque elegido para la liberación de glicanos dependerá de la proteína bajo prueba y se basará en los tipos de glicosilación, es decir, glicosilación ligada a N u O. Los enfoques no compendiales disponibles para la liberación de glicanos deben optimizarse para determinar un perfil cuantitativo de todas las entidades de glicanos. Se deben optimizar los factores que afectan la eficiencia de la escisión, como la relación de concentración de enzima a proteína, la temperatura, el curso del tiempo de reacción y la desnaturalización de la proteína antes de la digestión.</p>		
<p>Cabe señalar que la reacción enzimática / química no debe alterar la composición de glicanos, p. Ej. no destruye los residuos de ácido siálico. Cuando hay más de un sitio de glicosilación, el tratamiento enzimático debería liberar proporcionalmente todos los restos de oligosacáridos unidos a la proteína, independientemente de su estructura y su posición individual en la proteína. Debe confirmarse la recuperación reproducible de todas las entidades de glicanos de la mezcla de reacción.</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Derivatización de glicanos liberados</b></p> <p>La derivatización se realiza habitualmente de acuerdo con protocolos no compendiales. Por lo tanto, debe verificarse la derivación reproducible de todas las entidades de glicanos. Esto se puede lograr mediante la optimización de las condiciones de reacción, como la cantidad de reactivo de derivatización, la temperatura y el tiempo de reacción. La reacción de derivatización no debe cambiar la composición de glicanos, p. Ej. no destruye los residuos de ácido siálico.</p>		
<p><b>Separación, identificación e idoneidad del sistema</b></p> <p>Los métodos empleados para el análisis de glicanos deben ser capaces de detectar y separar diferentes restos de glicanos para determinar una identificación y cuantificación fiables.</p>		
<p>Los criterios de aceptación para la idoneidad del sistema, que también cubren la escisión, la recuperación y el análisis de glicanos, dependen de los parámetros de prueba críticos que afectan el resultado.</p>		
<p>La comparación entre el mapa de glicanos de la sustancia sometida a ensayo y el de una sustancia de referencia, tratada en las mismas condiciones, es un indicador para evaluar el rendimiento del</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>procedimiento analítico. Para confirmar aún más los resultados obtenidos, los análisis pueden repetirse con un método ortogonal. El uso de un estándar de referencia (por ejemplo, sustancia de referencia del producto que se está examinando, marcador de glicanos de idoneidad del sistema) es esencial para el establecimiento de los parámetros de idoneidad del sistema y la validación del procedimiento analítico.</p>		
<p>Debe verificarse la reproducibilidad de la expresión cuantitativa (por ejemplo, estimación del número Z) de los perfiles de glicanos.</p>		
<p><b>CONCLUSIÓN</b> Por lo general, debido a la complejidad de las estructuras de los glicanos de las glicoproteínas y su variación inherente durante los procesos de producción, se requiere que los fabricantes desarrollen, mediante estudios de caracterización, criterios para controlar el patrón de glicosilación de un fármaco biológico cuando ocurra la glicosilación y que desarrollen el nivel de información requerido en cada etapa de la producción y en la liberación de partidas. Posteriormente, se pueden derivar procedimientos analíticos de tal manera que proporcionen información pertinente para cumplir con los requisitos de calidad. En general, resulta necesaria una combinación de métodos y técnicas, además de que se requiere un análisis estructural de glicanos más detallado en etapas tempranas del</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
desarrollo de fármacos. Las consideraciones sobre la validación son importantes a medida que progresa el desarrollo de métodos y el conocimiento de los productos.		

\*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

TABLA 1

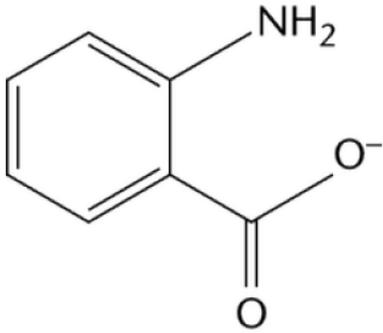
Agente	Especificidad
Liberación de glicanos con enlace N	
Péptido-N4 -(N-acetil-β-glucosaminil) asparagina amidasa	Hidrólisis del residuo del péptido-N4 -(N-acetil-β-glucosaminil) asparagina en la que el residuo de glucosamina puede estar aún más glicosilado, resultando en una N-acetil-β-D-glucosaminilamina (sustituida) y un péptido que contiene un residuo de aspartato.
Péptido-N-Glicosidasa F (PNGasa F)	Liberación de las cadenas de N-glicano que no contienen núcleo de fucosa con enlace (α1,3).
Péptido-N-Glicosidasa A (PNGasa A)	Liberación de las cadenas de N-glicano que contienen un núcleo de fucosa con enlace (α1,3).
Manosil-glicoproteína acetilglucosaminidasa endo-β-N-	Endohidrólisis de la unidad N,N'-diacetilquitobiosilo en glicopéptidos/glicoproteínas ricos en manosa que contienen la estructura – [Man(GlcNAc)2],Asn
Endo-β-N-acetilglucosaminidasa F (endo F)	Liberación de oligosacáridos ricos en manosa, híbridos y complejos

"2021, Año de la Independencia"

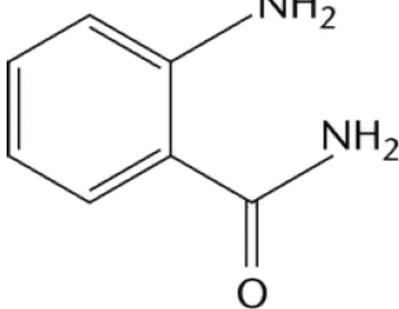
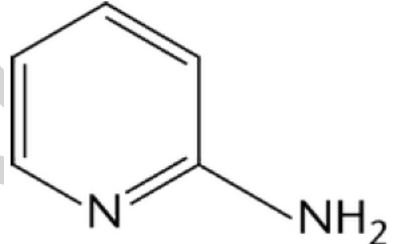
Endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H (endo H)	Liberación de oligosacáridos ricos en manosa e híbridos
<b>Liberación de glicanos con enlace O</b>	
Glicopéptido- $\alpha$ -N-Acetilgalactosaminidasa*	Hidrólisis de residuos D-galactosil-N-acetil- $\alpha$ -D-galactosaminídicos terminales

\* Esta enzima tiene un uso limitado debido a su alta especificidad de sustrato.

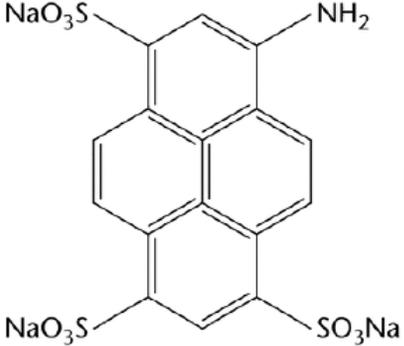
Tabla 2. Ejemplos de Marcadores Fluorescentes

Nombre	Acrónimo en inglés	Estructura	Técnica Analítica
Ácido 2-aminobenzoico	2-AA		HPLC

"2021, Año de la Independencia"

2- Aminobenzamida	2-AB		HPLC MS
Nombre	Acrónimo en inglés	Estructura	Técnica Analítica
2- Aminopiridina	2 -AP		HPLC

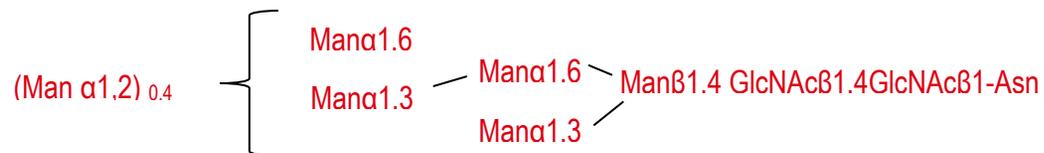
"2021, Año de la Independencia"

<p>Sal trisódica de 8-aminopireno-1,3,6-tri-sulfónico</p>	<p>APTS</p>		<p>CE</p>
---	-------------	--	-----------

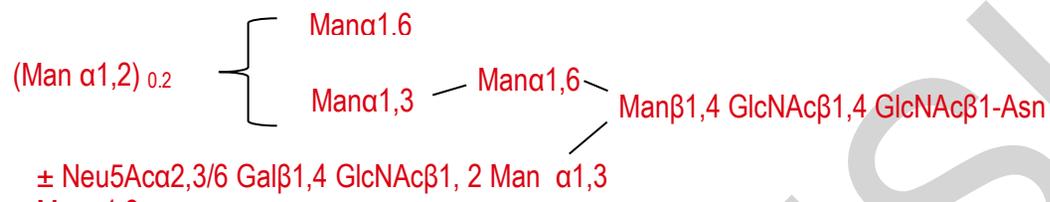
"2021, Año de la Independencia"

Figura 1. Tipos comunes de N-glicanos.

Tipo Rico en Manosa



Tipo híbrido



Tipo complejos

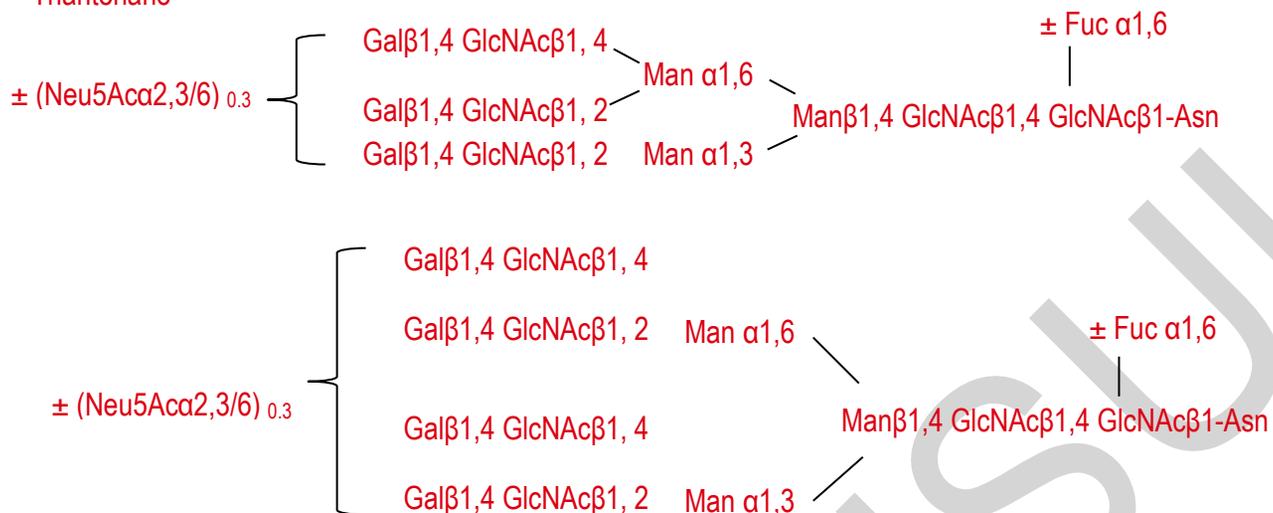
Biantenarico



"2021, Año de la Independencia"

Figura 2. Estructuras nucleares comunes de O-glicanos (resaltadas y subrayadas).

Triantenario



"2021, Año de la Independencia"

Núcleo 1	Galβ1,4 GlcNAcβ1, 6 Galβ1,3 GlcNAcβ1, 3	Galβ1,3 GlcNAcβ1, <u>Galβ1,3 GalNAc α1</u> -Ser (Thr)
Núcleo 2	Galβ1,4 (GlcNAcβ1,3 Galβ1,4) <sub>n</sub> <u>GlcNAcβ1,6</u>	<u>GalNAcα1</u> - Ser (Thr)
Núcleo 3	Galβ1,4 GlcNAcβ1, 6 Galβ1,3 GlcNAcβ1, 3	Galβ1,4 <u>GlcNAcβ1, 3 GalNAc α1</u> -Ser (Thr)
Núcleo 4	Galβ1,4 <u>GlcNAcβ1, 6</u> Galβ1,4 <u>GlcNAcβ1, 3</u>	<u>GalNAcα1</u> – Ser (Thr)
Núcleo 5	<u>GlcNAcβ1,6 GalNAc α1</u> – Ser	
Núcleo 6	<u>GalNAcβ1,3 GalNAc α1</u> – Ser	
Núcleo 7	<u>GalNAc α1,6 GalNAc α1</u> – Ser	
Núcleo 8	<u>Gal α1,3 GalNAc α1</u> – Ser (Thr)	

"2021, Año de la Independencia"

Figura 3. Diagrama de flujo de ayuda para la selección de opciones del análisis de glicanos.

