

LC|GC's **CHROM**academy

powered by crawford scientific

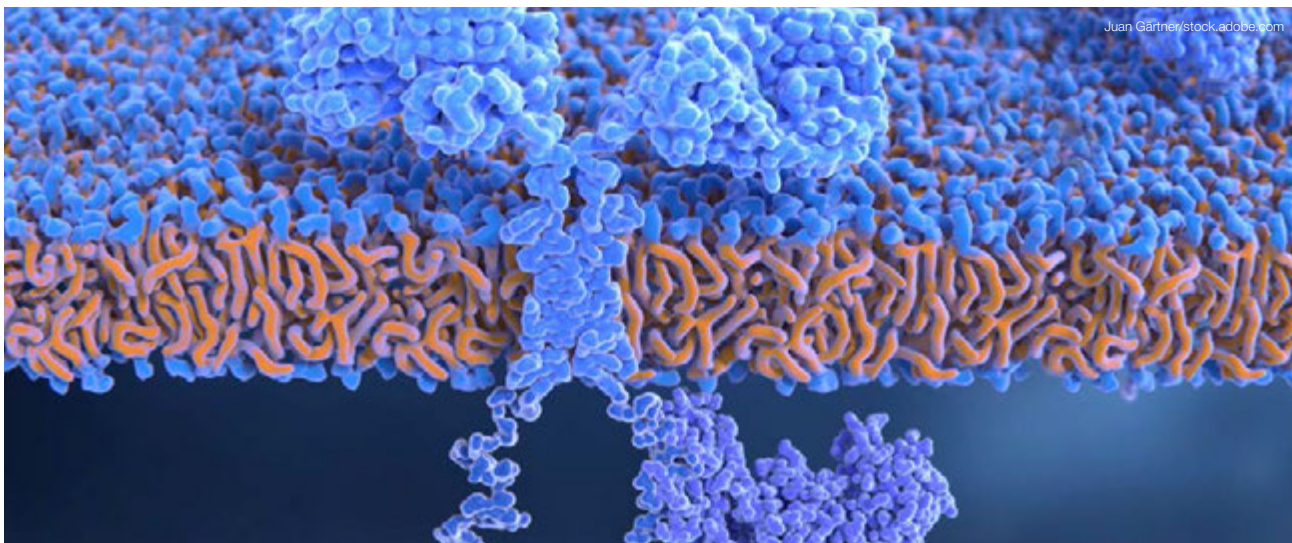


Soluciones innovadoras para la separación, identificación y cuantificación de biomoléculas

Glicosilación y análisis de ácidos siálicos de glicoproteínas bioterapéuticas

Cromatografía de líquidos bidimensional para separaciones de biomoléculas

Identificación, mapeo y cuantificación de glicopéptidos de la espícula del virus SARS-CoV-2



Glicosilación y análisis de ácidos siálicos de glicoproteínas bioterapéuticas

John Yan

Planteamientos para identificar diferentes N-glicanos sialilados y cuantificar el contenido de ácido siálico de glicoproteínas bioterapéuticas mediante enfoques con placas y LC/FLD/MS.

Introducción

El ácido siálico desempeña una función esencial en la mediación de la eficacia de las glicoproteínas terapéuticas recombinantes. La presencia o ausencia de ácido siálico en el extremo no reductor de los glicanos puede afectar a la farmacocinética de la proteína bioterapéutica, así como a su potencial inmunogenicidad. Por lo tanto, es necesario monitorizar y controlar la sialilación durante el proceso de fabricación. Este artículo presenta un planteamiento para identificar diferentes N-glicanos sialilados y cuantificar el contenido en ácido siálico de las glicoproteínas bioterapéuticas mediante enfoques con placas y cromatografía de líquidos (LC) acoplada a detección de fluorescencia (FLD) y espectrometría de masas (MS). Asimismo, aborda las ventajas que ofrecen los reactivos de tinción fluorescentes para el análisis de N-glicanos, la mejora de la cuantificación de ácidos siálicos y los flujos de trabajos analíticos, así como las opciones de separación cromatográfica que utilizan detección por fluorescencia y por espectrometría de masas (MS).

GLICOSILACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS SIÁLICOS DE GLICOPROTEÍNAS BIOTERAPÉUTICAS

Productos bioterapéuticos glicosilados

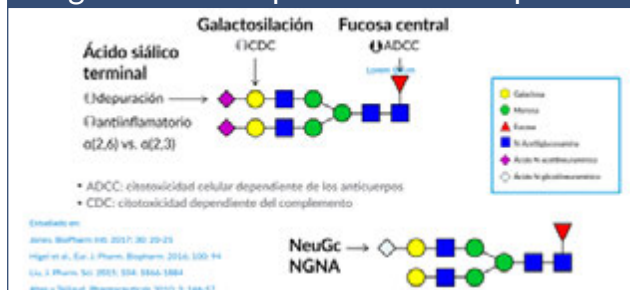
Aunque la glicómica no ha disfrutado de la misma atención que la genómica y la proteómica, se sabe que una quinta parte de todas las proteínas de la base de datos SwissProt están glicosiladas. La glicosilación puede afectar al plegamiento, la estabilidad y la funcionalidad de las proteínas y generar diversidad a causa de las diferencias en los sitios de glicosilación y la composición, longitud y estructura de los glicanos. Más del 60 % de los productos bioterapéuticos comercializados están glicosilados.

La glicosilación puede ser un atributo de calidad crítico y/o monitorizarse como atributo de calidad del producto. Los dos tipos principales de glicosilación son la adición de O-glicanos y de N-glicanos, pero la N-glicosilación, en la que los glicanos se unen al nitrógeno amídico de los restos de asparagina dentro de un secuencia de consenso definido, es el tipo de glicosilación más frecuente en los productos bioterapéuticos.

En 2010, Epogen fue el único producto biológico glicosilado de entre los diez fármacos más vendidos. Si avanzamos hasta 2018, siete de los diez productos farmacéuticos más vendidos fueron productos biológicos glicosilados; el fármaco más vendido fue Humira, lo que pone de manifiesto el cambio de rumbo general de la industria farmacéutica hacia los productos biofarmacéuticos.

Los productos biofarmacéuticos son muchísimo más complejos que las moléculas de bajo peso molecular desde el punto de vista de la caracterización analítica. Por ejemplo, la aspirina es un fármaco que es una molécula de bajo peso molecular, de aproximadamente 180 Da. En cambio, los productos biofarmacéuticos con inmunoglobulina G (IgG) tienen un peso molecular de alrededor de 150.000 Da y presentan diversas modificaciones postraduccionales (incluida la glicosilación) que pueden afectar a la eficacia del fármaco. Los glicanos están compuestos por

FIGURA 1: Efecto de la estructura de los N-glicanos en los productos bioterapéuticos.

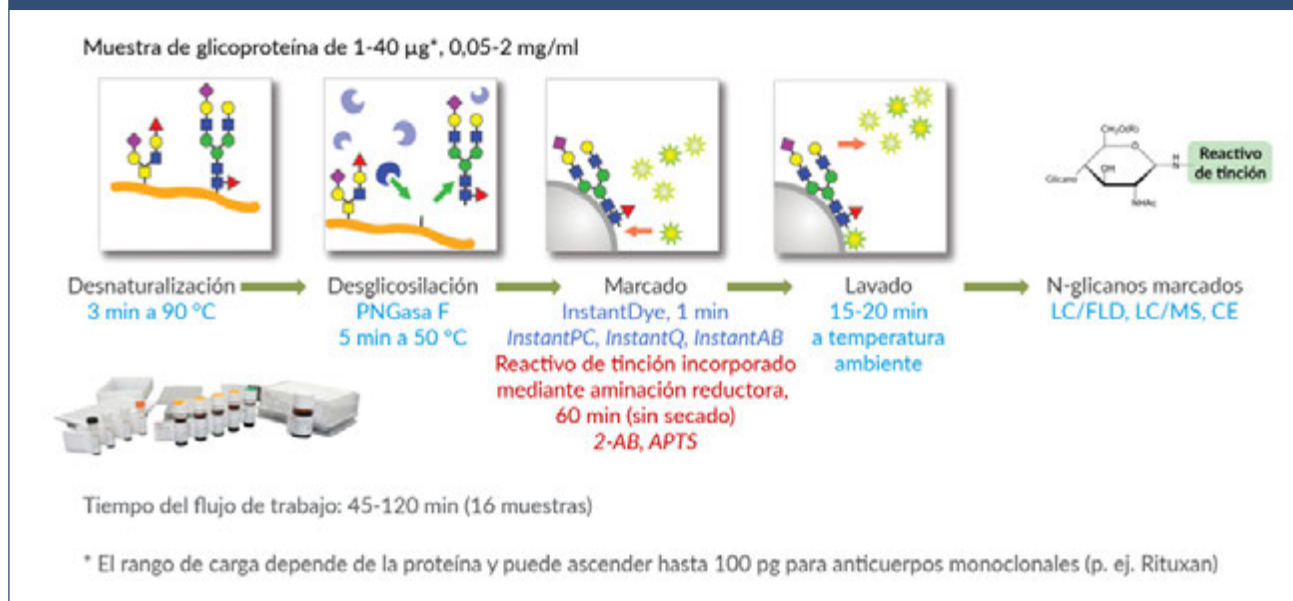


múltiples unidades de monosacáridos, como fucosa, manosa, galactosa, N-acetilglucosamina y diversos ácidos siálicos, tal como se muestra en la **FIGURA 1**. La presencia de fucosa central reduce la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC), lo que resulta importante para los antineoplásicos. Por este motivo, las empresas que desarrollan productos bioterapéuticos pueden buscar reducir la cantidad de fucosa central para maximizar la actividad de ADCC. También se ha reflejado en la bibliografía que la presencia de galactosilación puede incrementar la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), mientras que la presencia de un ácido siálico terminal puede reducir la tasa de depuración e incrementar el tiempo de permanencia del fármaco en el cuerpo.

Análisis de N-glicanos

Pueden utilizarse muchas técnicas diferentes para el análisis de N-glicanos. En lo que respecta a la proteína intacta, las separaciones por LC, combinadas con la espectrometría de masas exacta y de alta resolución, pueden usarse para obtener información sobre los tipos de glicanos presentes. Otra opción es utilizar una peptidasa para digerir la glicoproteína en péptidos que puedan separarse por LC, analizarse mediante MS en tándem y cotejarse con una base de datos para obtener información sobre los sitios específicos de glicosilación. Otro planteamiento consiste en analizar la liberación enzimática de N-glicanos a partir de la glicoproteína usando enzimas como

GLICOSILACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS SIÁLICOS DE GLICOPROTEÍNAS BIOTERAPÉUTICAS

FIGURA 2: Tecnología Gly-X de preparación de muestras de N-glicanos.

la PNGasa F. Los glicanos liberados pueden analizarse en ese mismo estado o, de forma más habitual, utilizando un marcador fluorescente que permita aplicar técnicas de separación por LC o electroforesis capilar (CE) con detección de fluorescencia, de tal forma que los datos obtenidos se suelen expresar como áreas relativas (%) de los diferentes glicanos.

Los glicanos también se pueden monitorizar a nivel de los monosacáridos individuales tras una hidrólisis ácida, ya sea directamente o con la aplicación previa de un marcador fluorescente.

Preparación de muestras de N-glicanos

La preparación convencional de muestras de N-glicanos puede ser un proceso muy laborioso y llevar entre uno y varios días, con etapas de desglicosilación hasta el día siguiente y marcado. Hace varios años, se presentó un flujo de trabajo con una solución integral que redujo el tiempo de preparación de muestras hasta las 5 horas, utilizando fluoróforos convencionales incorporados mediante aminación reductora,

como 2-aminobenzamida (2-AB) y trisulfonato de aminopireno. Se introdujeron mejoras adicionales mediante el uso de un reactivo de tinción rápido de glicosilamina, lo que redujo el tiempo de preparación hasta 3-4 horas. Más recientemente, se lanzó al mercado la plataforma de preparación de muestras AdvanceBio Gly-X. Esta nueva plataforma reduce el tiempo de preparación hasta las 2 horas en el caso de la aminación reductora (2-AB y APTS), y hasta menos de 1 hora cuando se utilizan reactivos de tinción instantáneos de glicosilamina (InstantPC).

En la **FIGURA 2** se muestra un esquema de la plataforma de preparación de muestras de N-glicanos AdvanceBio Gly-X. Primero, la glicoproteína se desnatura con un reactivo patentado durante 3 minutos a 90 °C, lo que abre la proteína para la posterior desglicosilación con PNGasa F, que tendrá lugar durante 5 minutos a 50 °C. Después, los glicanos liberados se marcan con un fluoróforo (como el reactivo de tinción de glicosilamina InstantPC) a lo largo de alrededor de 1 minuto, o bien con un reactivo de tinción incorporado mediante aminación reductora (como

GLICOSILACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS SIÁLICOS DE GLICOPROTEÍNAS BIOTERAPÉUTICAS

2-AB) durante 60 minutos. Después del marcado, los glicanos marcados se lavan para eliminar el exceso de reactivo de tinción y quedan listos para el análisis.

Separación de N-glicanos marcados con InstantPC

Un método que se suele usar para la separación y el análisis de glicanos marcados con reactivo de tinción fluorescente es la LC de interacción hidrófila (HILIC) con detección de fluorescencia. La detección por MS en línea es una opción para facilitar la identificación de diferentes glicanos. La **FIGURA 3** muestra un método con gradiente de HILIC de 60 minutos de duración utilizado para la separación y el análisis de glicanos marcados con InstantPC derivados del rituximab, un fármaco que es una IgG.

También se utilizó detección por MS. En la **FIGURA 4** se presenta la respuesta en el cromatograma de corriente iónica total correspondiente a los N-glicanos marcados de Enbrel. Como se puede observar, la respuesta en el cromatograma de corriente iónica total obtenido por MS para la muestra marcada con InstantPC es prácticamente idéntica a la obtenida por fluorescencia, lo que puede ayudar a identificar glicanos poco abundantes. Además, hay disponible una amplia variedad de patrones de N-glicanos marcados que pueden facilitar la identificación cuando no se pueda recurrir a la MS. Entre ellos se incluyen patrones de glicanos individuales, como N-glicanos biantenarios comunes que es probable que estén presentes en IgG expresadas en células de ovario de hámster chino, así como bibliotecas de glicanos previamente marcados como IgG humana y bibliotecas de estructuras sialiladas en α -(2,6) y α -(2,3).

Flujos de trabajo con 2-AB

La 2-AB es un reactivo de tinción que se ha utilizado tradicionalmente para el análisis

de glicanos liberados. Los flujos de trabajo convencionales con 2-AB pueden ser laboriosos; sin embargo, si se emplea un flujo de trabajo actualizado y eficiente, el marcado con 2-AB puede ser una buena opción para aquellos que busquen las ventajas de un flujo de trabajo rápido, pero necesiten tener la capacidad de relacionar datos nuevos con datos históricos. En la **FIGURA 2** se muestra un flujo de trabajo rápido utilizando la tecnología AdvanceBio Gly-X. Las etapas típicas de desnaturalización y desglucosilación en solución se combinan con una aminación reductora en la matriz en una placa de lavado de 96 pocillos, lo que evita tener que realizar una etapa adicional de secado. Después del marcado, los glicanos se lavan para eliminar el exceso de reactivo de tinción y quedan listos para el análisis. El tiempo de preparación es de unas 2 horas, muy inferior al de los métodos antiguos. La **FIGURA 5** muestra un ejemplo de la separación y el análisis de glicanos derivados del rituximab; aparecen principalmente los glicanos neutros biantenarios G0F, G1F y G2F marcados con 2-AB, con bajos valores de CV (%) para todas las especies principales de glicanos.

Cuantificación de ácido siálico

El ácido siálico desempeña una función esencial en la mediación de la eficacia de las glicoproteínas bioterapéuticas. La presencia o ausencia de ácido siálico en el extremo no reductor de los N-glicanos u O-glicanos puede afectar a la farmacocinética de la proteína, así como a su inmunogenicidad. Por lo tanto, resulta esencial mantener y controlar el contenido de ácido siálico de las proteínas terapéuticas. El kit de cuantificación de ácido siálico total AdvanceBio ofrece un planteamiento de alto rendimiento y elevada sensibilidad para la cuantificación de ácido siálico total. Estos ensayos con placas de 96 pocillos consisten en reacciones enzimáticas que comienzan por la transformación del ácido siálico liberado por la sialidasa A en peróxido de hidrógeno,

GLICOSILACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS SIÁLICOS DE GLICOPROTEÍNAS BIOTERAPÉUTICAS

FIGURA 3: Glicanos de rituximab marcados con InstantPC.

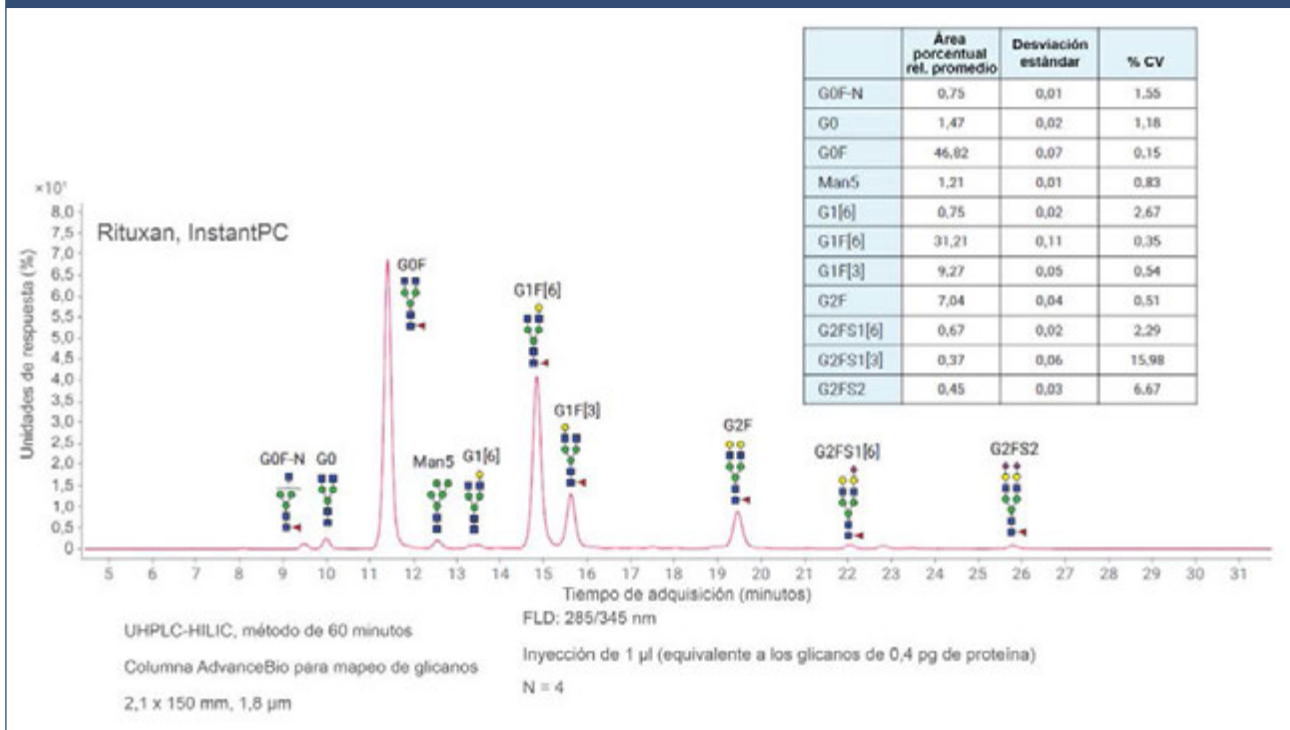
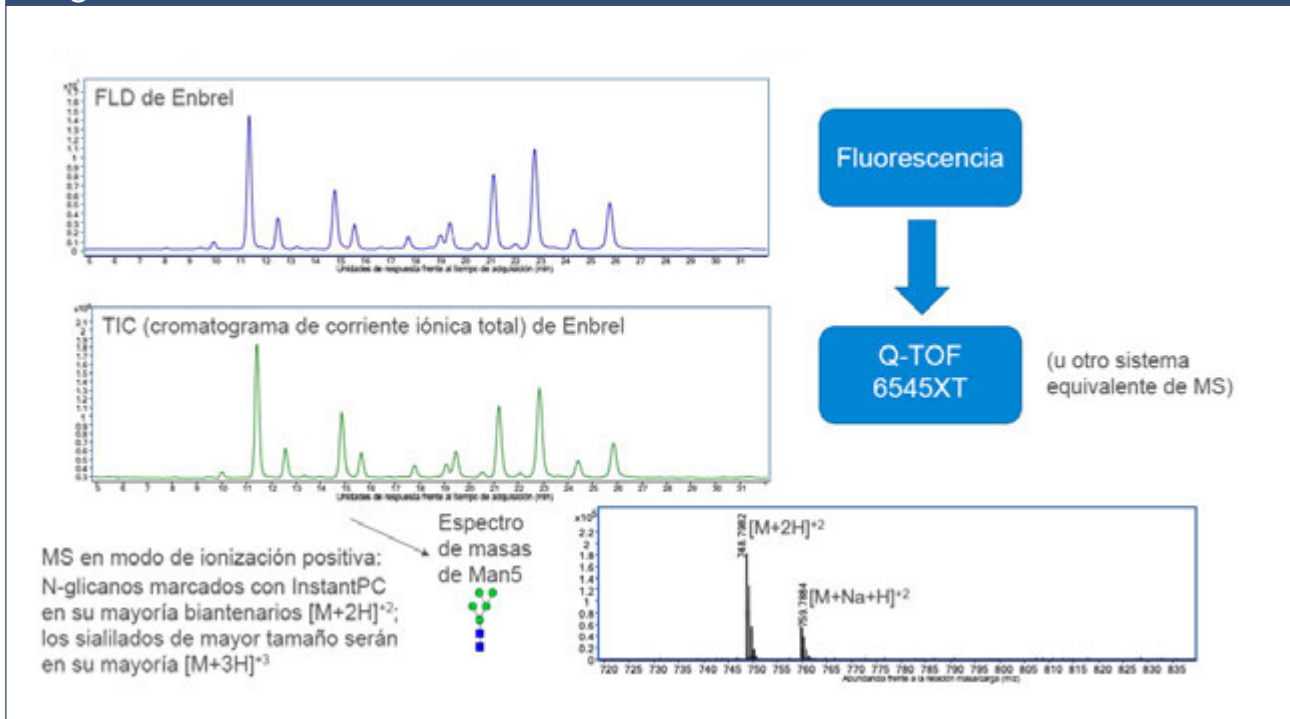
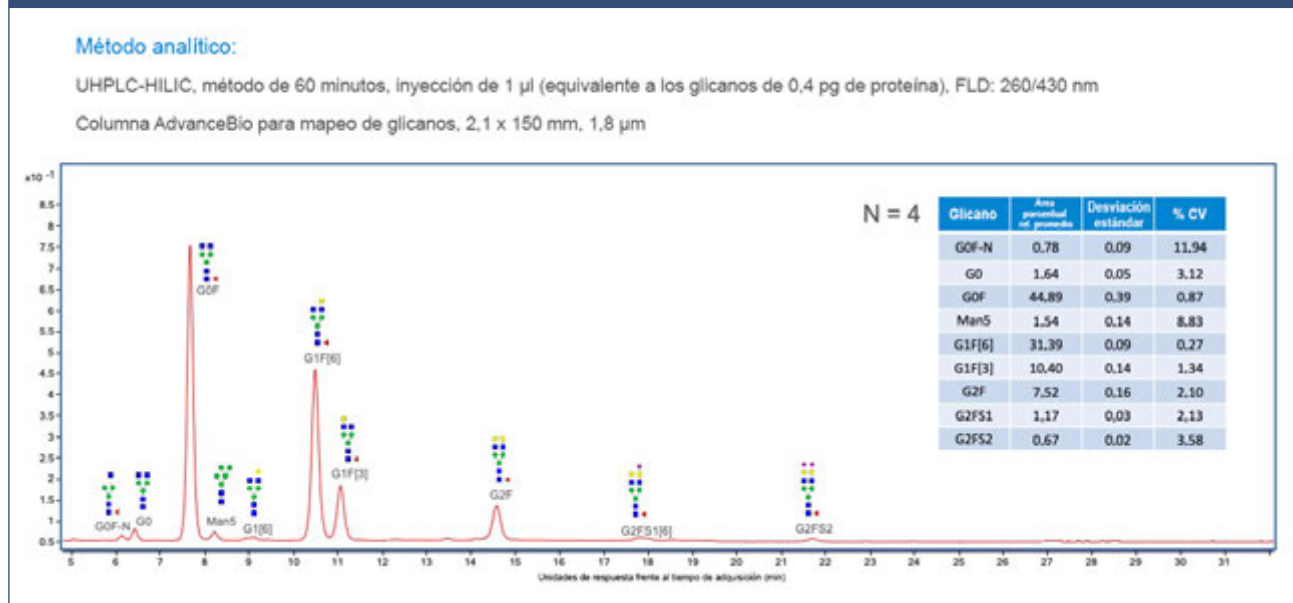


FIGURA 4: Cromatograma de corriente iónica total obtenido por MS para N-glicanos marcados con InstantPC de Enbrel.



GLICOSILACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS SIÁLICOS DE GLICOPROTEÍNAS BIOTERAPÉUTICAS

FIGURA 5: N-glicanos de rituximab marcados con Gly-X 2-AB Express.

que reacciona posteriormente en proporción 1:1 con un reactivo de tinción fluorescente, lo que genera una señal intensa de fluorescencia o absorbancia. Las diferentes glicoproteínas pueden tener distintos grados de glicosilación y, por consiguiente, de sialilación. Por lo tanto, es importante partir de una cantidad de proteína que genere una buena señal. Por ejemplo, MabThera contiene bajos niveles de ácido siálico, por lo que se requiere una cantidad mayor de proteína, mientras que la fetuina o Enbrel tienen un contenido mayor de ácido siálico y eso hace que se necesite menos proteína.

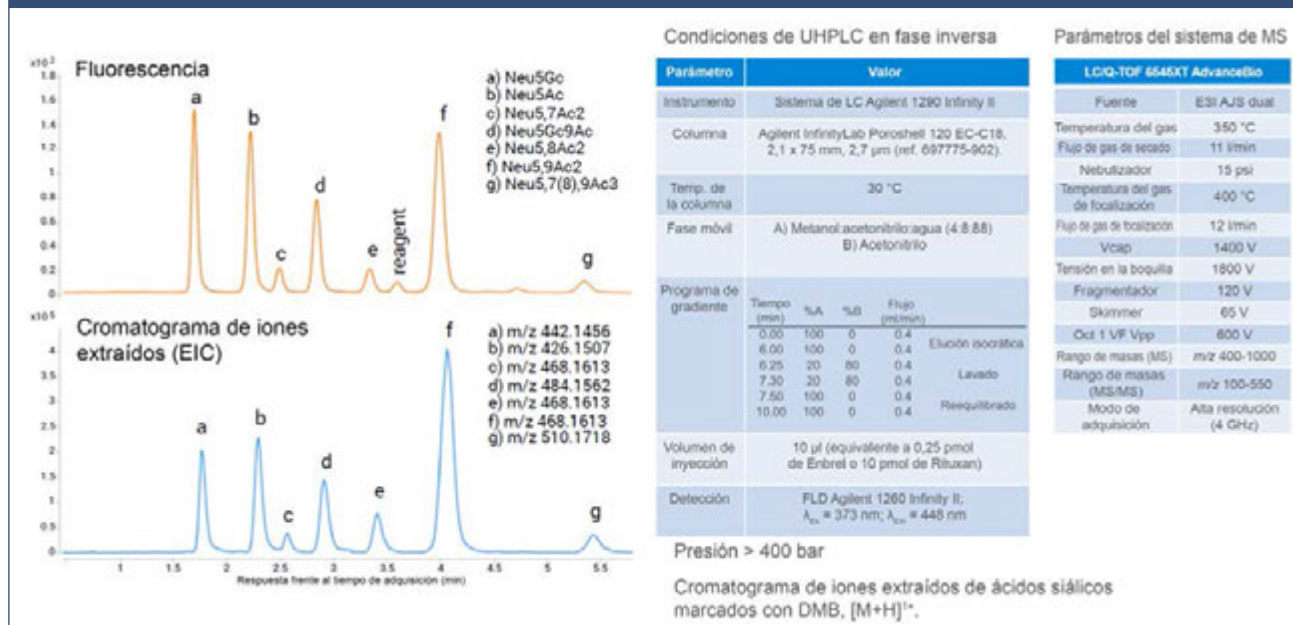
El ácido N-acetilneuramínico (NANA) y el ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) son tipos de ácidos siálicos con una estructura similar, y difieren únicamente en la adición de un grupo hidroxilo (en el caso del NGNA). Esta pequeña diferencia basta para hacer que el NGNA sea potencialmente inmunogénico para los seres humanos. Para distinguir entre ambos tipos de ácidos siálicos, un método habitual es la liberación de ácido siálico a partir del glicano y su marcado con un reactivo de tinción:

el 1,2-diamino-4,5-metilendioxi-benceno, diclorhidrato (DMB), un proceso utilizado por el kit AdvanceBio de caracterización y cuantificación de ácidos siálicos, que también incluye patrones de NANA y NGNA para cuantificación. El marcado va seguido de la separación por LC y la detección por fluorescencia y/o por MS. En la FIGURA 6 se muestra un ejemplo del análisis de un panel de referencia de ácidos siálicos (una mezcla de diferentes tipos de ácidos siálicos marcados con DMB) por LC seguida de detección de fluorescencia y por MS. Los dos primeros picos del cromatograma corresponden al NGNA y el

“La presencia o ausencia de ácido siálico en el extremo no reductor de los N-glicanos u O-glicanos puede afectar a la farmacocinética de la proteína, así como a su inmunogenicidad”.

GLICOSILACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS SIÁLICOS DE GLICOPROTEÍNAS BIOTERAPÉUTICAS

FIGURA 6: Panel de referencia de ácidos siálicos (SARP) marcados con DMB.



NANA, respectivamente, mientras que los picos restantes son diferentes versiones de ácido siálico observadas en la naturaleza.

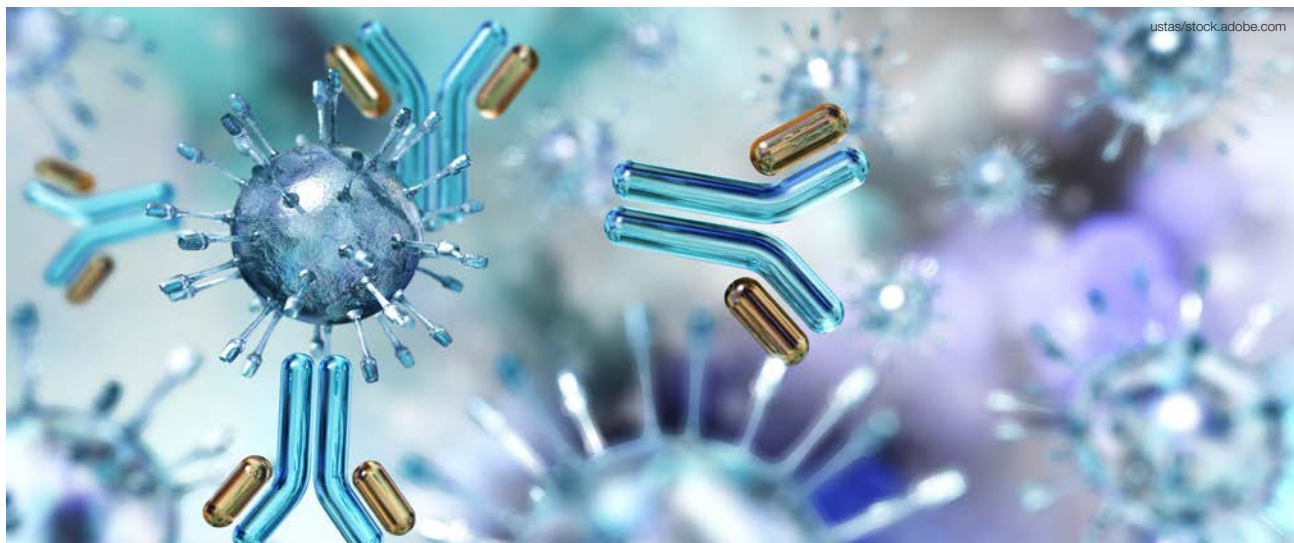
Conclusión

Los investigadores disponen de muchas herramientas diferentes para preparar, separar, detectar e identificar N-glicanos presentes en una glicoproteína terapéutica típica. Los flujos de trabajo modernos, como el del kit de preparación de muestras AdvanceBio Gly-X, utilizan técnicas que permiten liberar, marcar y separar glicanos con rapidez para su posterior cuantificación mediante detección de fluorescencia. Además de estos flujos de trabajo nuevos y rápidos de preparación de muestras, la eficiencia en términos de una ionización elevada de los nuevos reactivos de tinción, como InstantPC, posibilita una caracterización robusta de los glicanos liberados por MS. Estos nuevos flujos de trabajo también están disponibles con reactivos de tinción convencionales de marcado de glicanos, como la 2-AB, por lo que constituyen una opción cómoda y rápida de preparación de

muestras para aquellos que deseen establecer correlaciones entre datos nuevos e históricos. Además de para el análisis de glicanos liberados, Agilent también ofrece productos para la cuantificación y la determinación de perfiles de ácido siálico, lo que completa una sólida oferta de kits de herramientas para el análisis de productos bioterapéuticos glicosilados.

John Yan

El Dr. John Yan trabaja como químico de aplicaciones en Agilent.



Introducción a la cromatografía de líquidos bidimensional para separaciones de biomoléculas

Dwight R. Stoll

Fundamentos de la cromatografía de líquidos 2D y aplicaciones actuales para el bioanálisis.

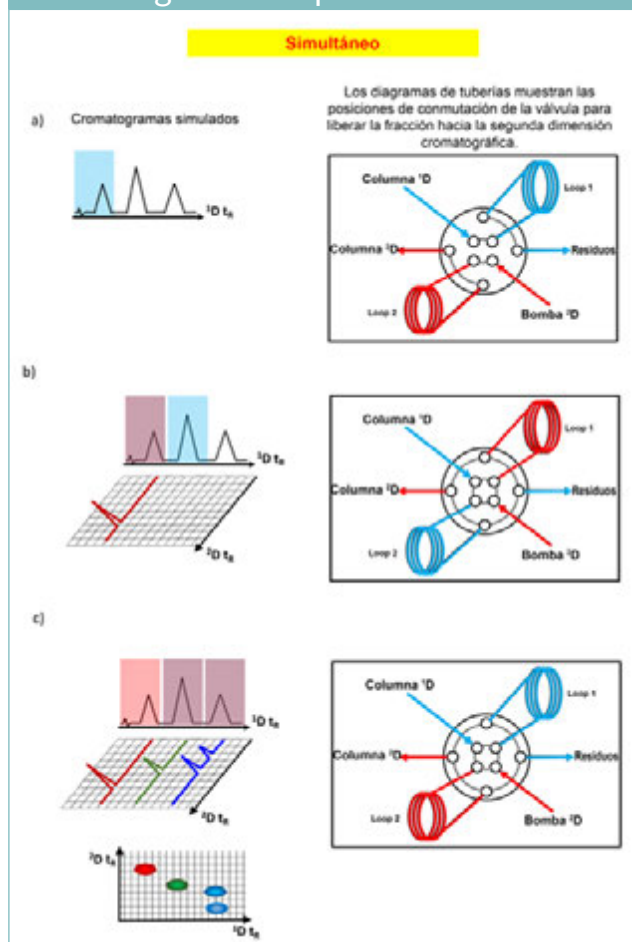
Introducción

Aunque la cromatografía de líquidos monodimensional (LC-1D) convencional sigue siendo una valiosa herramienta para el bioanálisis, añadir otra dimensión de separación cromatográfica puede resultar ventajoso. Las separaciones analíticas con dos columnas en tándem, o cromatografía de líquidos bidimensional (LC-2D), pueden aportar beneficios tangibles en cuanto a resolución de los analitos sin que eso exija ampliar de manera inconveniente el tiempo de separación. La adaptación de los parámetros de separación a las condiciones específicas de la mezcla y a los analitos de interés ayudará a maximizar el rendimiento analítico de la LC-2D. Este resumen servirá como introducción al concepto de las separaciones por cromatografía de líquidos en 2D, abordará algunos de los modos clave y los principios de funcionamiento de la LC-2D y, además, ofrecerá ejemplos pertinentes de los beneficios tangibles que ofrece la LC-2D para resolver desafíos bioanalíticos.

Fundamentos de la separación por LC-2D

En el análisis de biomoléculas, es muy frecuente que incluso muestras en apariencia simples resulten lo suficientemente complejas como para

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS BIDIMENSIONAL PARA SEPARACIONES DE BIOMOLÉCULAS

FIGURA 1: Funcionamiento de la cromatografía de líquidos bidimensional.

generar picos no resueltos en las separaciones cromatográficas. Debido a ello, puede haber casos en los que una sola etapa de cromatografía de líquidos simplemente no baste para separar las especies de una mezcla, en especial si hay analitos que puedan guardar una estrecha semejanza estructural (como mezclas de isómeros) o especies no identificadas que requieran la identificación de analitos. Aunque en la **FIGURA 1A** se presenta un ejemplo ideal, los cromatogramas simulados pueden aclarar por qué el uso de dos dimensiones de LC resulta valioso. En circunstancias en las que las separaciones en función de una única propiedad, como el tamaño o la carga, no ofrezcan suficiente resolución, la separación de los analitos aplicando ambas propiedades puede conseguir

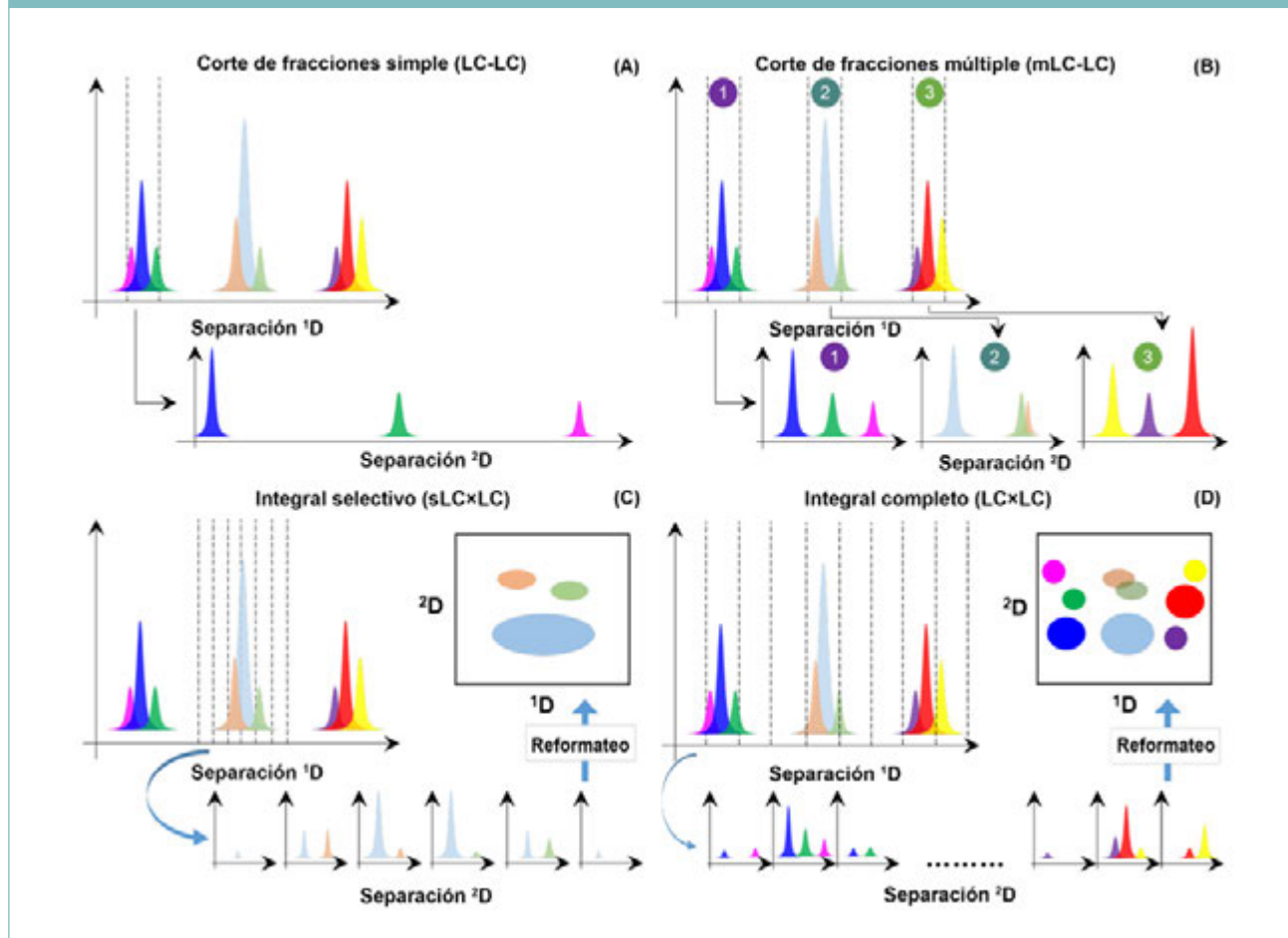
una resolución total.

Como manera de cuantificar la mejora de las separaciones que se observa gracias a la LC-2D, la capacidad de picos, un indicador de uso habitual, puede proporcionar una explicación numérica de los motivos por los que una segunda dimensión de LC es más valiosa desde un punto de vista analítico que el simple alargamiento de la columna para LC-1D. En cada dimensión cromatográfica, las determinaciones analíticas básicamente se agrupan en compartimentos según la eficacia de la separación y el ciclo de trabajo del instrumento. Esto genera un conjunto lineal de compartimentos para la respuesta del instrumento en función del tiempo. Al añadir una segunda dimensión, la capacidad de picos se multiplica hasta generar un conjunto en 2D de compartimentos de determinaciones. Mediante una selección juiciosa de las columnas y las condiciones de separación complementarias, resulta posible utilizar este espacio de separación para diferenciar analitos que no se hayan podido resolver previamente. Además, esta segunda dimensión puede añadirse según sea necesario para un determinado análisis, ya que los modos de funcionamiento de la LC-2D permiten la aplicación selectiva de la etapa de separación asociada a la segunda dimensión (2D).

Al igual que en el caso de la LC-1D, los instrumentos necesarios para la LC-2D requieren usar una válvula de conmutación, además de algunos componentes adicionales para la programación de las inyecciones de muestra. La programación correcta de la conmutación de la válvula y la carga de los dos loops de muestra posibilitan que el proceso de separación ocurra en ambas columnas simultáneamente (**FIGURA 1B**). Una fracción del efluente de la columna en 1D se deriva a un loop de muestra de volumen conocido y, una vez lleno, la solución del interior del loop de muestra se inyecta en la columna en 2D. Gracias a ello, los segmentos obtenidos mediante la separación en la primera dimensión (1D) se agrupan de forma eficaz antes de inyectarlos en la

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS BIDIMENSIONAL PARA SEPARACIONES DE BIOMOLÉCULAS

FIGURA 2: Modos de separación en 2D (6).



segunda columna. Los datos cromatográficos de la LC-2D revelan cómo se separan posteriormente los analitos de cada uno de los picos de la etapa en 1D conforme a las condiciones de la etapa en 2D. Cualquier separación posterior de los componentes que pueda producirse en la etapa en 2D, más allá de lo que suceda en la etapa en 1D, aparecerá en forma de picos adicionales en el cromatograma en 2D.

Selección de los modos de funcionamiento: de la LC-2D según la aplicación

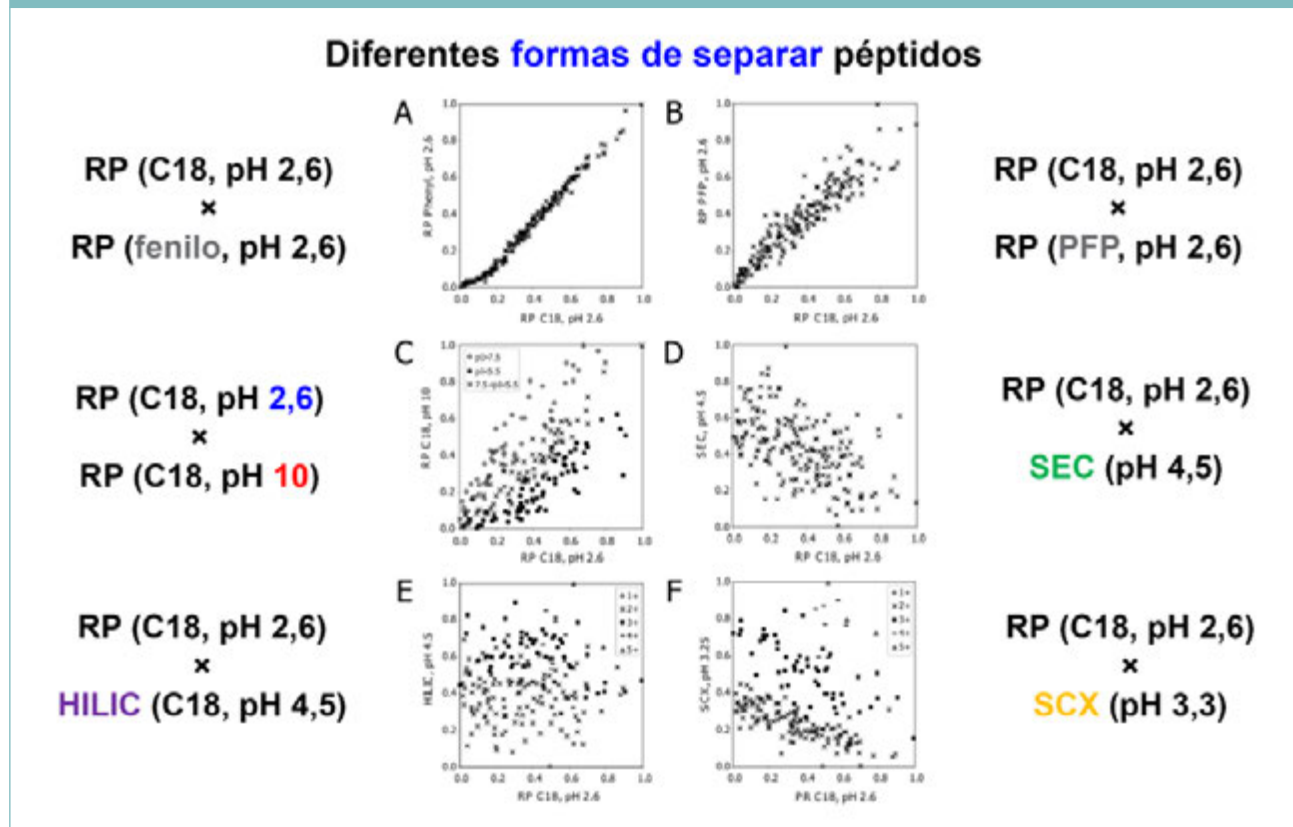
Dentro de los límites de la LC-2D, existen dos modos principales de funcionamiento, así

como dos modos que hibridan de forma eficaz ambos modos principales; esos cuatro modos se describen en la FIGURA 2.

El primero de los modos principales de funcionamiento se conoce como corte de fracciones simple y aparece abreviado como LC-LC (FIGURA 2A). El planteamiento de la LC-2D con corte de fracciones simple consiste en tomar el efluente de un único segmento de tiempo del cromatograma en 1D (por ejemplo, un solo pico o grupo de picos) y someter esa fracción de efluente a una separación en la columna en 2D. La LC-LC es la técnica más eficaz para conseguir una caracterización adicional de una única región de interés identificada en la etapa en 1D.

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS BIDIMENSIONAL PARA SEPARACIONES DE BIOMOLÉCULAS

FIGURA 3: Optimización del uso del espacio de separación en 2D (10).



En el caso del segundo modo principal de funcionamiento de la LC-2D, todo el eluyente de la etapa en 1D se dirige hacia la etapa en 2D en fracciones para su separación; esto recibe el nombre de LC-2D integral completa y, de forma abreviada, LCxLC (Figura 2d). La LCxLC proporciona el conjunto de datos más completo en relación con los componentes de una mezcla de interés. Este modo es el más adecuado para muestras muy complejas en las que exista la posibilidad de que haya múltiples especies sin resolver con picos solapados, o bien para la evaluación completa de una mezcla cuya composición se desconoce.

Además de los dos modos principales de funcionamiento para la LC-2D, hay disponibles dos modos híbridos: con corte de fracciones múltiple (mLC-LC) e integral selectivo (sLCxLC). El corte de fracciones múltiple se basa en unos

principios de funcionamiento similares a los del corte de fracciones simple, de tal forma que una fracción específica de eluyente de la etapa en 1D se inyecta para su separación en la etapa en 2D; sin embargo, se toman varias muestras de corte de fracciones en cada análisis cromatográfico (FIGURA 2B). La técnica de mLC-LC resulta útil en aquellas circunstancias que exijan mejorar la caracterización de varias regiones del cromatograma, pero sin llegar al amplio alcance de la LCxLC. En el modo integral selectivo, se aplica el concepto de muestreo de múltiples segmentos de tiempo de la LCxLC para un intervalo específico de tiempo, en lugar de para la duración íntegra del análisis (FIGURA 2C). El modo de funcionamiento del sLCxLC es idóneo para la evaluación exhaustiva de una especie específica; por ejemplo, para la caracterización a fondo de proteínas, en la que solo una fracción

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS BIDIMENSIONAL PARA SEPARACIONES DE BIOMOLÉCULAS

del análisis cromatográfico requiere un escrutinio analítico más profundo.

“Al igual que para la LC-1D convencional, para llevar a cabo la LC-2D se requiere un ajuste cuidadoso de las condiciones de separación en función de la sensibilidad del detector utilizado”.

Obtención de una resolución óptima gracias a la ortogonalidad de las columnas

La mejora multiplicadora de la capacidad de picos que puede obtenerse gracias a la LC-2D depende en gran medida del uso de fases estacionarias apropiadas y complementarias (u ortogonales) para las columnas en 1D y 2D. Intentar hacer separaciones por LC-2D usando dos columnas que tengan básicamente la misma fase estacionaria y unas condiciones idénticas para la fase móvil no garantizará una mejora productiva de la separación a consecuencia de añadir la segunda dimensión. Es decir, debe existir algún tipo de diferenciación entre las dimensiones que consiga esa mejora de la separación en 2D. Tal como se observa en el ejemplo de la Figura 3a, la combinación de una fase estacionaria C18 y una fase estacionaria con grupos fenilo junto con un pH idéntico de la fase móvil hace que no haya apenas dispersión de los picos de analito hacia regiones del espacio de separación que queden fuera de una línea con una correlación aproximada de 1:1 para la elución de analitos entre columnas. Sin embargo, mediante la simple sustitución de la columna en 2D por una fase estacionaria con grupos fenilo fluorados (FIGURA 3B), se generó una diferenciación adicional entre analitos en cada

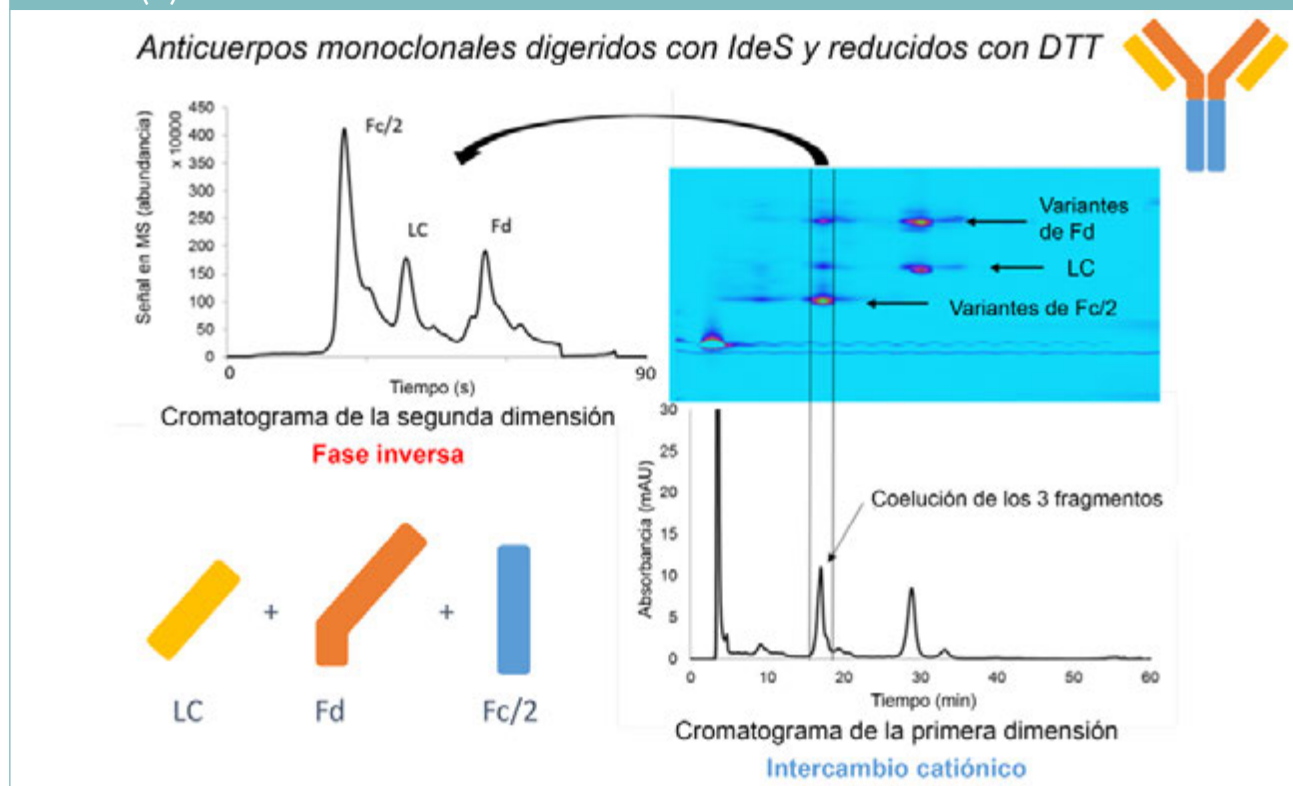
etapa de separación. Incluso aunque se utilizó el mismo tipo de columna para las etapas en 1D y 2D (FIGURA 3C), la modificación del pH de la fase móvil entre ambas dimensiones generó una diferencia suficientemente grande en las condiciones de separación que permitió mejorar claramente la resolución de los picos en el espacio analítico. Asimismo, la resolución puede mejorarse mediante el uso de columnas aún más diferenciadas entre dimensiones, tal como se muestra en la FIGURA 3D-F.

Optimización de la velocidad de muestreo en 2D para evitar el inframuestreo

Un aspecto clave para la programación de la separación en LC-2D es evitar el inframuestreo del efluente de la columna en 1D para la separación en 2D (el denominado problema de inframuestreo o remezcla). Si se toma un número demasiado pequeño de muestras en un pico en 1D, el efecto neto generado es básicamente un promedio (o remezcla) de cualquier especie separada en la etapa en 1D y, por consiguiente, una reducción del valor de la primera etapa de separación. Según la teoría de Murphy-Schure-Foley (1), deberían tomarse al menos cuatro muestras de la etapa en 1D a lo largo de la región de un pico cromatográfico para minimizar el impacto del inframuestreo. Asimismo, es necesario optimizar la velocidad de muestreo para equilibrar las velocidades en las etapas en 1D y 2D con el fin de obtener una capacidad de picos neta que sea óptima para el conjunto del sistema.

Al igual que para la LC-1D convencional, para llevar a cabo la LC-2D se requiere un ajuste cuidadoso de las condiciones de separación en función de la sensibilidad del detector utilizado. Para cada etapa cromatográfica (1D y 2D), las concentraciones de analito en el eluyente serán inferiores a las de la inyección inicial en cada columna. Por consiguiente, deben emplearse un

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS BIDIMENSIONAL PARA SEPARACIONES DE BIOMOLÉCULAS

FIGURA 4: LC-2D-MS a nivel de subunidades de anticuerpos monoclonales por LCxLC (7).

volumen de inyección y un tiempo de muestreo mínimos para garantizar que haya suficiente analito presente.

Solucionar las diferencias de la fase móvil entre dimensiones

Además de tener en cuenta el inframuestreo, otro aspecto importante de la LC-2D que hay que considerar es prevenir los efectos negativos de las diferencias de la fase móvil entre columnas. Este problema se debe a la elución de la fase móvil con el analito en la etapa en 1D, que pasa a convertirse en el disolvente de inyección para la etapa en 2D; por lo tanto, se requiere compatibilidad entre las fases móviles. Esto puede tener un impacto mínimo para ciertas combinaciones de columnas y fases móviles, y una importancia sustancial en otros casos. Por ejemplo, la fase móvil para una separación por intercambio iónico suele tener agua; por

consiguiente, suele ser compatible con la fase móvil principalmente acuosa existente al inicio de una separación en fase inversa. En cambio, la fase móvil de carácter fuertemente orgánico que se utiliza para la cromatografía en fase normal generaría problemas a la hora de acoplar una etapa en 1D en fase normal y una etapa en 2D en fase inversa, lo que podría dar lugar a picos con frente o a una menor separación de los analitos.

Sin embargo, la incompatibilidad de las fases móviles puede superarse gracias a la tecnología de modulación activa de disolventes (ASM). Desarrollada en colaboración con Agilent, los sistemas de LC-2D con tecnología ASM ajustan la composición del disolvente de la muestra que se inyecte en la columna en 2D con el fin de mejorar la compatibilidad. Gracias a la introducción de un loop de muestra en paralelo

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS BIDIMENSIONAL PARA SEPARACIONES DE BIOMOLÉCULAS

que diluye el efluente recogido de la primera dimensión antes de que la muestra alcance la columna en 2D, la concentración del disolvente de la inyección de la etapa en 2D se reduce. La tecnología ASM mejora la resolución de la etapa en 2D a pesar de la dilución de la muestra, ya que la menor concentración del disolvente previene el paso directo de los analitos que, de lo contrario, se produciría debido a la solubilidad inadecuadamente alta de los analitos en la fase móvil al comienzo de la separación.

Aprovechamiento de la LC-2D para conseguir análisis “2 en 1”

Una situación en la que la LC-2D constituiría un planteamiento ideal es aquella en la que se requieran dos o más experimentos independientes para conseguir los resultados que se obtendrían mediante un único análisis por LC-2D. Un ejemplo de esto es la caracterización de un pico no identificado en un cromatograma en condiciones incompatibles con la espectrometría de masas (MS); este caso fue estudiado por Luo et al (2). En lugar de desarrollar una separación adicional en condiciones compatibles con la MS, Luo et al. añadieron una segunda dimensión compatible con la MS en la primera etapa de LC, lo que permitió identificar directamente los picos no identificados. Tal como observaron Karongo et al., la sLCxLC aplicada a la caracterización de impurezas en péptidos terapéuticos reveló la presencia de tres impurezas que coeluían con el péptido de interés, que se habrían pasado por alto con la LC-1D (3). Mediante la combinación de una columna acquiral en fase inversa en la etapa en 1D y una columna quiral WAX en la etapa en 2D, Woiwode et al. demostraron que la sLCxLC permite la separación enantioselectiva de todos los aminoácidos en un único análisis (4). Para la caracterización de extractos de plantas, como los de té o vino, la LCxLC desempeñó un papel fundamental y permitió a Muller et al. (5) identificar especies fenólicas.

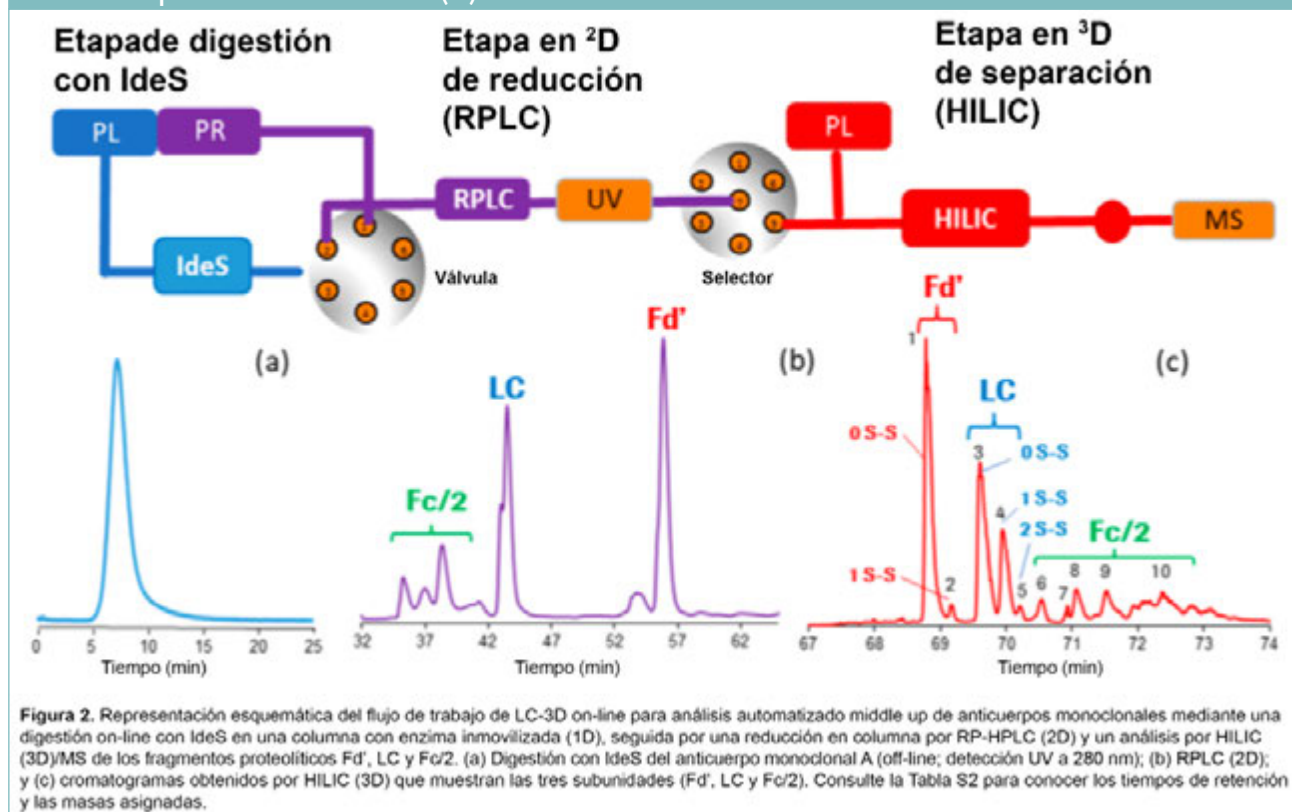
Métodos para la caracterización de proteínas a fondo

Otro tipo de análisis en el que la LC-2D puede ofrecer información especialmente útil es la caracterización de proteínas a fondo. En combinación con una etapa posterior de espectrometría de masas, las separaciones bidimensionales pueden simplificar enormemente el proceso de identificación de muestras. Mediante el tratamiento apropiado de las muestras y la LC-2D, seguidos de detección por MS, puede conseguirse una evaluación exhaustiva de la estructura y la composición de los anticuerpos monoclonales. Se ha comprobado que pueden identificarse subunidades de anticuerpos, cadenas ligeras y pesadas, glicanos unidos y componentes peptídicos mediante este tipo de planteamiento multidimensional (6). Asimismo, los resultados presentados por Sorensen et al. sustentan la necesidad de dos etapas de separación por LC debido a que, si únicamente se utilizara la primera dimensión de LC, se produciría la coelución de fragmentos de anticuerpos digeridos (FIGURA 4) (7).

Desarrollo de análisis automatizados por LC-2D

Uno de los desafíos del bioanálisis que la LC-2D puede ayudar a superar es el problema del laborioso proceso de preparación de muestras y la selección manual de picos para su posterior análisis. En lugar de realizar el tratamiento de cada muestra mediante una digestión con tripsina o una reducción *off-line* con ditiotreitól (DTT), estos pasos pueden integrarse con la LC-2D automatizada. Un ejemplo específico que conllevó la separación de anticuerpos por parte de Gstöttner et al. incluyó un flujo de trabajo en el que las muestras se separaron en primer lugar en una columna de intercambio iónico; después, las fracciones se recogieron *on-line*, se hicieron pasar a través de una columna reductora y, por último, se sometieron a una separación en fase

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS BIDIMENSIONAL PARA SEPARACIONES DE BIOMOLÉCULAS

FIGURA 5: Aplicaciones actuales: sistemas de caracterización automatizada para anticuerpos monoclonales (9).

inversa en 2D con detección por MS (8). De forma similar, Camperi et al. desarrollaron un procedimiento para caracterizar variantes de glicosilación de anticuerpos monoclonales en el que las muestras se sometieron a una digestión con IdeS, una reducción y una separación en una columna de fase inversa, así como a una separación por LC de interacción hidrófila (HILIC) antes de la detección por espectrometría de masas (FIGURA 5) (9). Se comprobó que el método automatizado de Camperi et al. no presentaba diferencias significativas respecto al tratamiento *off-line* de las muestras en experimentos de prueba conceptual.

Conclusión

Las separaciones multidimensionales son una técnica cada vez más conocida para obtener información analítica amplia, que supera a

la proporcionada por la LC-1D, sin apenas esfuerzo adicional. No obstante, para que esta tecnología ofrezca resultados óptimos sigue siendo necesario tener en cuenta los principios tradicionales en los que se fundamenta el análisis químico. Al igual que sucede con otros instrumentos analíticos, el desarrollo de métodos para sistemas de LC-2D exige que el modo de funcionamiento utilizado (LC-LC, mLCC-LC, sLCCxLC o LCxLC) esté adaptado al tipo de muestra y al tipo de información que se necesite obtener a partir del análisis. Además de considerar el modo de funcionamiento, es crucial utilizar condiciones de separación que sean suficientemente ortogonales. Para conseguir una resolución máxima en el espacio en 2D no solo pueden usarse fases estacionarias complementarias, sino también condiciones de la fase móvil (como el pH) dependiendo del

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS BIDIMENSIONAL PARA SEPARACIONES DE BIOMOLÉCULAS

tipo de analito; por lo tanto, tener en cuenta las propiedades moleculares es un factor crítico. Asimismo, hay que tener cuidado y evitar el inframuestreo en la etapa en 1D, ya que se podrían perder las ventajas de separación obtenidas en la primera dimensión. Sin embargo, esto debe equilibrarse con la sensibilidad del detector; las fracciones separadas en la etapa en 2D no deben tener un volumen tan bajo (y, por consiguiente, una cantidad tan baja de analito) que sea indetectable. Además, la compatibilidad de las fases móviles entre dimensiones debe analizarse para evitar diferencias siempre que sea posible. Si las diferencias entre las fases móviles son inevitables, habrá que recurrir a métodos alternativos adecuados y a la tecnología ASM.

Referencias

1. R. E. Murphy, et al., *Anal. Chem.* **70** (8), 1585-1594 (1998). DOI: 10.1021/ac971184b
2. H. Luo, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **137**, 139-145 (2017). DOI: 10.1016/j.jpba.2016.11.012
3. R. Karongo, et al., *J. Chrom. A*, **1627**, 461430 (2020). DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461430
4. U. Woiwode, et al., *J. Chrom. A*, **1562**, 69-77 (2018). DOI: 10.1016/j.chroma.2018.05.062
5. M. Muller, et al., *Chromatographia*, **82**, 181-196 (2019). DOI: 10.1007/s10337-018-3662-6
6. D. R. Stoll, et al., en *Advances in Chromatography*, (CRC Press: Boca Ratón, FL, 2018).
7. M. Sorensen, et al., *mAbs*, **8**(7), 1224-1234 (2016). DOI: 10.1080/19420862.2016.1203497
8. C. Gstöttner et al., *Anal. Chem.* **90** (3), 2119-2125 (2017). DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04372
9. J. Camperi et al., *Anal. Chem.* **92** (6), 4357-4363 (2020). DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05193
10. M. Gilar, et al., *Anal. Chem.* **77** (19), 6426-6434 (2005). DOI: 10.1021/ac050923i

Dr. Dwight R. Stoll

Profesor
Gustavus Adolphus College





Attila Németh/stock.adobe.com

Identificación, mapeo y cuantificación relativa de glicopéptidos de la espícula del virus SARS-CoV-2 mediante huella peptídica de masa y tiempo de retención

Rod Chalk

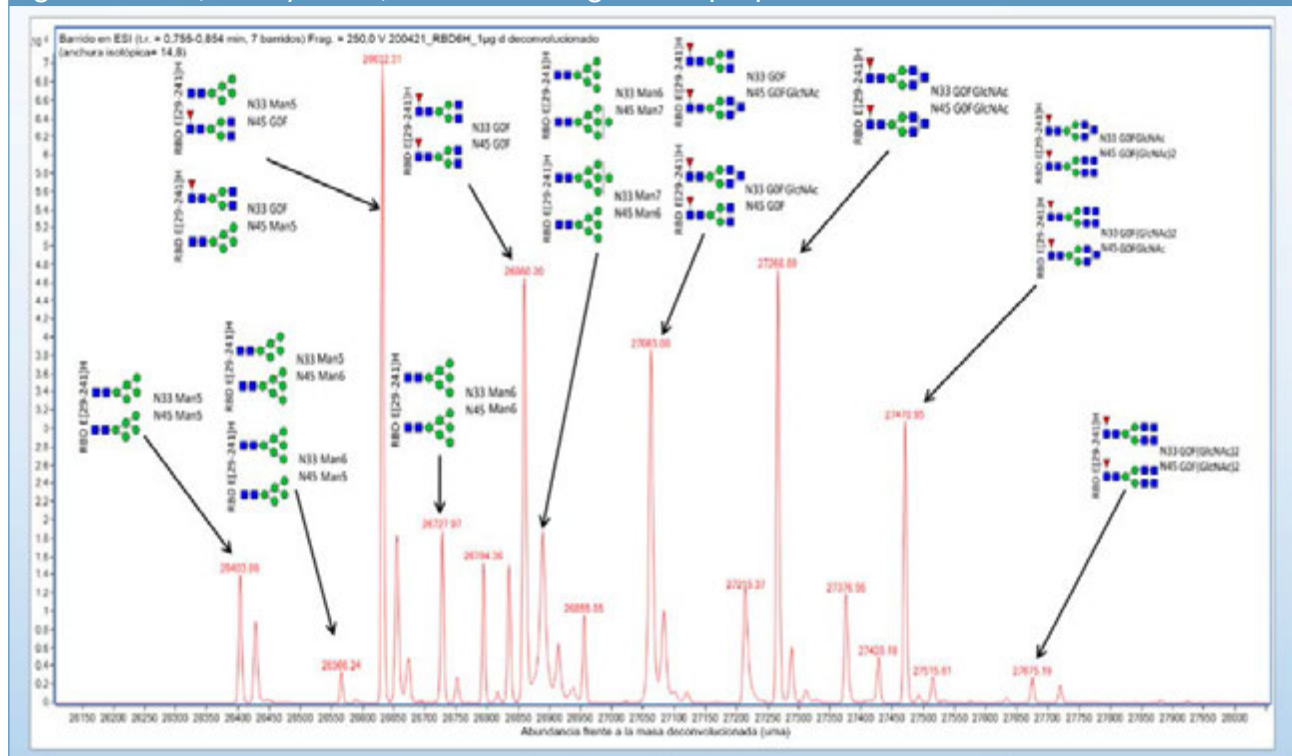
Una base de datos maestra para identificación mediante la huella peptídica y el mapeo de los glicopéptidos de la proteína espicular simplifica enormemente este proceso que, de otra manera, resultaría complejo y laborioso.

Introducción

Se cree que la glicosilación compleja presente en la proteína espicular del virus SARS-CoV-2 interviene en el escape inmunitario y puede hacer que resulte más patógeno. Muchos laboratorios están expresando la proteína espicular con fines de investigación y necesitan flujos de trabajo analíticos que sean fiables y permitan caracterizarla por completo. Esto resulta importante debido a que el patrón de glicosilación viene determinado por el sistema de expresión de la célula hospedadora utilizada, así como por las condiciones de crecimiento. Resulta difícil controlar de forma precisa dichas condiciones, lo que puede conducir a que existan diferencias entre los lotes de proteína espicular producida. La complejidad de esta glicosilación genera numerosos obstáculos técnicos para la caracterización completa de la proteína. Es probable que el análisis de masas intactas por cromatografía de líquidos/ espectrometría de masas (LC-MS) en fase inversa no sea factible debido al gran número de glicanos posibles en cada uno de los 22 sitios de glicosilación, lo que genera una polidispersidad enormemente alta y la consiguiente dilución de la señal. Incluso si fuera posible, no aportaría la información deseada sobre la posición para los glicanos. El análisis de glicanos liberados, aunque resulta factible, tampoco ofrece información sobre la posición.

IDENTIFICACIÓN, MAPEO Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GLICOPÉPTIDOS DE LA ESPÍCULA DEL VIRUS SARS-COV-2 MEDIANTE HUELLA PEPTÍDICA DE MASA Y TIEMPO DE RETENCIÓN

FIGURA 1: El dominio de unión al receptor de la espícula del virus SARS-CoV-2 tiene dos sitios de glicosilación (N343 y N331). Existen varios glicanos que pueden estar asociados a dichos sitios.



Este artículo aborda un innovador planteamiento que conlleva, como primer paso, la generación de una base de datos de masas y tiempos de retención de glicopéptidos mediante LC-Q-TOF-MS-MS. Después, dicha base de datos, que en esencia es un conjunto de huellas peptídicas de masa exacta y tiempo de retención para cada glicopéptido, puede incorporarse a un flujo de trabajo de caracterización que resulte sencillo, potente, rápido y robusto.

Desafíos asociados a la proteína espicular

La proteína espicular de secuencia completa tiene forma de trímero. La fracción del dominio de unión al receptor (RBD) del monómero espicular solo tiene dos sitios de glicosilación (N343 y N331), pero cada uno de ellos puede dar lugar a varios glicanos posibles. A pesar del bajo número de sitios de glicosilación del

RBD, su perfil de glicosilación es complejo y también presenta variación entre muestras, tal como puede observarse para su espectro de masas intactas (FIGURA 1). Debido a que hay dos sitios, en algunos casos existen dos posibles estructuras para una determinada masa; por lo tanto, no se puede determinar cuál de estas estructuras es la correcta, lo que impide la identificación completa.

El problema se complica aún más para la proteína espicular de secuencia completa. En ella existen 22 sitios de glicosilación y, aunque asumiéramos que solo pueden formarse seis glicanos por sitio, el número total de glicofomas posibles sería de unos 130.000 millones, lo que hace que el análisis de masas intactas sea inviable para la proteína espicular. Además, dicho análisis no proporcionaría información sobre la posición.

Una alternativa sería el análisis de glicopéptidos. En este caso, sería necesario generar un sitio de

IDENTIFICACIÓN, MAPEO Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GLICOPÉPTIDOS DE LA ESPÍCULA DEL VIRUS SARS-COV-2 MEDIANTE HUELLA PEPTÍDICA DE MASA Y TIEMPO DE RETENCIÓN

FIGURA 2: Separación de glicopéptidos en fase inversa.



glicosilación por péptido y, para cada sitio, efectuar obligatoriamente un mapeo. No basta con usar solo tripsina, ya que los dos sitios de glicosilación del RBD carecen de sitios de escisión por tripsina entre ellos. Asimismo, debido a que las masas de los precursores se desconocen, no se puede recurrir a la evaluación del grado de coincidencia mediante comparación con bases de datos de precursores, por lo que es preciso el análisis por MS/MS. No obstante, hay algunos inconvenientes que deben tenerse en cuenta: la molécula de glicopéptido es un híbrido formado por un esqueleto peptídico y una estructura de glicano con diferentes condiciones óptimas de fragmentación para cada uno de ellos. La fragmentación óptima del glicano deja el péptido sin fragmentar, mientras que la fragmentación óptima del péptido implica la pérdida de la información del glicano.

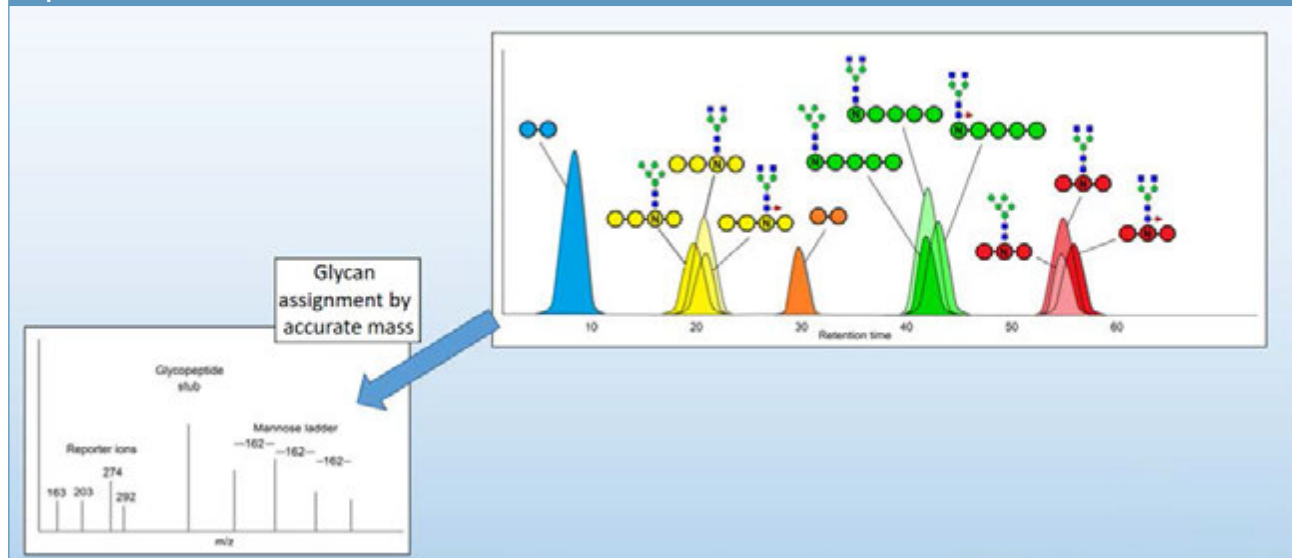
Mejora de la separación y la detección

Dado que el uso de múltiples enzimas conllevaría una complejidad aún mayor, los investigadores

del Centro de Desarrollo de Fármacos de la Universidad de Oxford decidieron utilizar una única enzima (elastasa) que provoca cortes más frecuentes que la tripsina y genera péptidos más cortos. Y, lo que es más importante, la elastasa genera un único péptido por sitio de glicosilación, lo que resulta esencial para conseguir un mapeo inequívoco. Dado que los glicanos son predominantemente polares, se pueden separar bien por cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (HILIC); por otra parte, los péptidos, que en comparación con ellos tienen un carácter apolar, se separan de forma óptima por HPLC en fase inversa (RP-HPLC). Los péptidos más cortos intensifican la señal en el cromatograma de corriente iónica total (TIC) del sistema de MS y pueden resolverse de forma más inmediata mediante RP-HPLC. Esta separación ofrece una excelente resolución para los péptidos, pero no consigue separar los glicanos individuales coeluidos (FIGURA 2), que aparecen como múltiples picos solapados.

IDENTIFICACIÓN, MAPEO Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GLICOPÉPTIDOS DE LA ESPÍCULA DEL VIRUS SARS-COV-2 MEDIANTE HUELLA PEPTÍDICA DE MASA Y TIEMPO DE RETENCIÓN

FIGURA 5: La escalera de manosa es la característica estructural de los glicanos que contienen manosa.



Aunque esto podría verse como un problema, los investigadores aprovecharon esta característica para desarrollar un nuevo método para identificar y mapear estos glicopéptidos. Mediante el uso de una columna AdvanceBio para mapeo de péptidos de Agilent, el equipo separó los péptidos y observó que los mismos péptidos con distintos glicanos eluían al mismo tiempo. Es decir, los glicanos con un tiempo de retención idéntico podían mapearse para relacionarlos con el mismo péptido. Dado que los glicanos de un mismo péptido tendrán un tiempo de retención idéntico y se conoce su masa exacta, la combinación de la masa exacta y el tiempo de retención aporta una huella peptídica que posibilita la identificación completa del glicopéptido.

Generación de la base de datos

Flujo de trabajo de descubrimiento de glicopéptidos. El flujo de trabajo (FIGURA 3) comienza con una digestión con elastasa hasta el día siguiente, que produce una mezcla de péptidos y glicopéptidos. A continuación, se lleva a cabo la RP-HPLC, en la que los glicanos de un mismo péptido coeluyen y pueden identificarse

mediante el tiempo de retención. Por ejemplo, el péptido GEVFNAT- tiene 27 glicofomas diferentes, y el cromatograma de corriente iónica expandido de la FIGURA 4 muestra que todas ellas eluyen dentro de un intervalo de tiempos de retención que abarca cuatro minutos. El siguiente paso es la identificación de los glicanos mediante la masa exacta. Existen numerosas especies en el análisis por LC-MS/MS. Los glicopéptidos se caracterizan mediante iones indicadores específicos que representan azúcares libres, el residuo del péptido y una escalera de manosa (una característica estructural de los glicanos que contienen manosa), tal como se ilustra esquemáticamente en la FIGURA 5. El espectro de masas deconvolucionado revela la secuencia completa del glicano, incluidos los azúcares individuales, con una exactitud en la determinación de las masas dentro de un margen de 10 ppm.

La segunda fase del flujo de trabajo consiste en la identificación de los péptidos. Esto se lleva a cabo mediante pseudo-MS3: un procedimiento que conlleva usar una alta tensión del fragmentador del instrumento de MS para

IDENTIFICACIÓN, MAPEO Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GLICOPÉPTIDOS DE LA ESPÍCULA DEL VIRUS SARS-COV-2 MEDIANTE HUELLA PEPTÍDICA DE MASA Y TIEMPO DE RETENCIÓN

En este caso no es necesario recurrir a la MS/MS, ya que ahora se puede hacer la comparación con la base de datos usando las masas y los tiempos de retención del análisis por LC-MS para asignar las estructuras de los glicopéptidos con un nivel adecuado de confianza. Esto puede hacerse de forma automática con la versión B.07 del software de análisis cualitativo Agilent MassHunter y la herramienta de extracción de características moleculares (FIGURA 6). Otra ventaja adicional de este flujo de trabajo es que no requiere un conocimiento específico del análisis de glicanos.

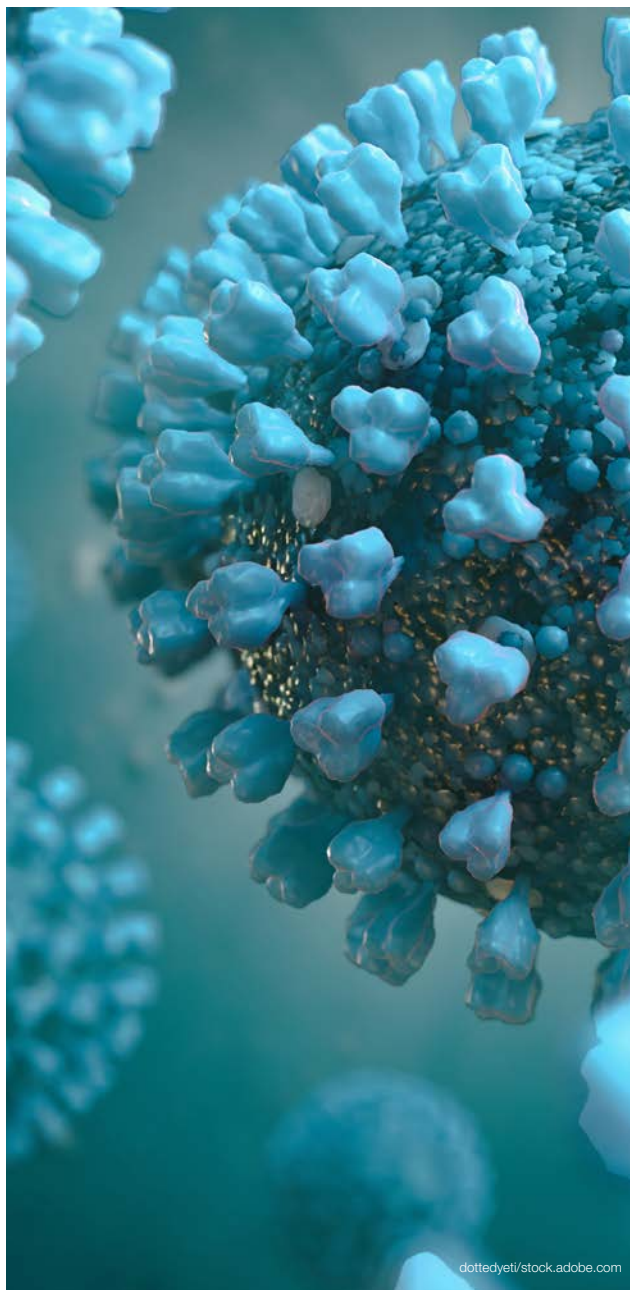
Conclusiones

La base de datos de masas y tiempos de retención, obtenida a partir de un análisis detallado del descubrimiento de péptidos, simplifica enormemente el mapeo de los glicopéptidos de la espícula del virus SARS-CoV-2, lo que evita tener que llevar a cabo un análisis complejo por MS/MS. Permite identificar las estructuras de los glicopéptidos utilizando únicamente los tiempos de retención y las masas exactas obtenidos por LC. Este sencillo flujo de trabajo puede transferirse a diversos instrumentos y configuraciones de HPLC-MS. El método detallado estará a disposición del público de forma gratuita (Chalk, R., Greenland, W. et al., "Identification, Mapping and Relative Quantitation of SARS-CoV-2 Spike Glycopeptides by Mass-Retention Time Fingerprinting", de próxima publicación); asimismo, la base de datos puede obtenerse en Internet (Chalk, R., Greenland, W. et al., (2020). SARS-COV2 Spike Glycopeptide Mass-Retention Time PCDL database (Version 1) [Data set]. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3958218>).

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos. Los productos Agilent NO están autorizados para fines de prueba, diagnóstico, tratamiento o mitigación de la COVID-19. Agilent no ha validado ningún producto para detectar el virus de la COVID-19.

Dr. Rod Chalk

Director del Departamento de Espectrometría de Masas, Centro de Descubrimiento de Fármacos de la Universidad de Oxford



dottedyeti/stock.adobe.com