

# LC|GC's **CHROM**academy

powered by **crawford scientific**

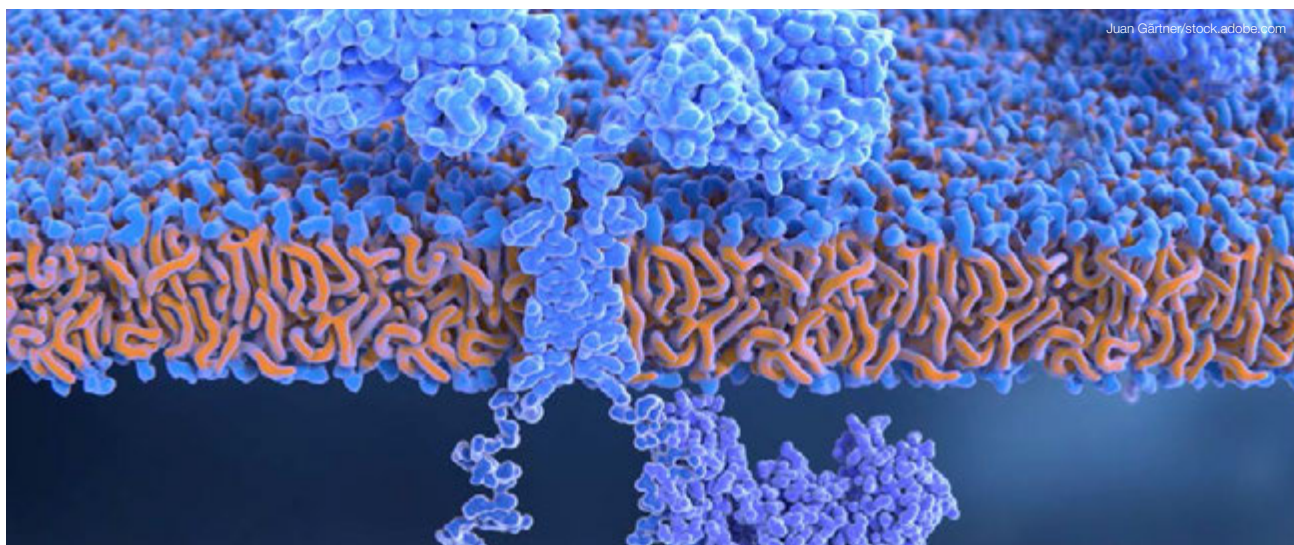


## *Soluzioni innovative per la separazione, l'identificazione e la quantificazione delle biomolecole*

Analisi della glicosilazione e dell'acido sialico di glicoproteine bioterapeutiche

Cromatografia liquida bidimensionale per separazioni di biomolecole

Identificazione, mappatura e quantificazione di glicopeptidi di spike da SARS-CoV-2



# Analisi della glicosilazione e dell'acido sialico di glicoproteine bioterapeutiche

John Yan

*Approcci all'identificazione di differenti specie di N-glicani sialilati e quantificazione del contenuto di acido sialico di glicoproteine bioterapeutiche usando metodologie basate su piastre e tecniche LC/FLD/MS.*

## Introduzione

L'acido sialico ricopre un ruolo critico nel mediare l'efficacia delle glicoproteine terapeutiche ricombinanti. La presenza o assenza dell'acido sialico sul terminale non riducente dei glicani può avere effetti sulla farmacocinetica della proteina bioterapeutica, oltre che sulla sua immunogenicità. Di conseguenza, la sialilazione deve essere monitorata e controllata durante il processo di fabbricazione. Questo articolo presenta un approccio per l'identificazione di differenti specie di N-glicani sialilati e la quantificazione del contenuto di acido sialico di glicoproteine bioterapeutiche usando metodologie basate su piastre e cromatografia liquida (LC) con rivelazione mediante fluorescenza (FL) e spettrometria di massa (MS). Sono inoltre discussi i vantaggi di coloranti fluorescenti per l'analisi degli N-glicani, quantificazione dell'acido sialico e flussi di lavoro di analisi migliorati, nonché opzioni di separazione cromatografica che utilizzano la rivelazione sia mediante fluorescenza che mediante spettrometria di massa (MS).

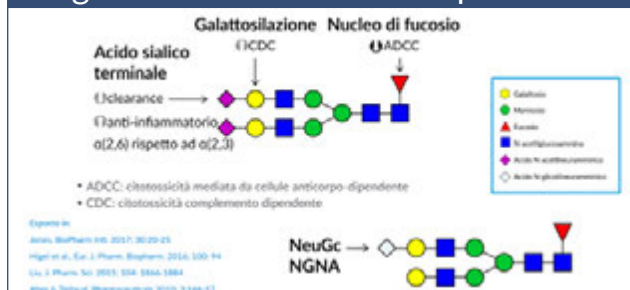
## ANALISI DELLA GLICOSILAZIONE E DELL'ACIDO SIALICO DI GLICOPROTEINE BIOTERAPEUTICHE

**Prodotti bioterapeutici glicosilati**

Sebbene la glicomica non sia stata oggetto della stessa attenzione della genomica e della proteomica, è noto che un quinto di tutte le proteine presenti nel database SwissPort sono glicosilate. La glicosilazione può avere effetti sul ripiegamento, sulla stabilità e sulla funzione della proteina e attribuire una diversità sulla base di differenze relative al sito di glicosilazione, composizione dei glicani, lunghezza dei glicani e struttura. Più del 60% dei prodotti biofarmaceutici commercializzati sono glicosilati. La glicosilazione può essere un attributo critico per la qualità e/o monitorata come attributo di qualità del prodotto. I due principali tipi di glicosilazione consistono nell'aggiunta di glicani O-linked e glicani N-linked. La glicosilazione N-linked, in cui i glicani sono legati all'azoto amidico dei residui di asparagina all'interno di una sequenza consenso definita, rappresenta tuttavia il tipo di glicosilazione osservato più di frequente nei farmaci bioterapeutici.

Nel 2010 Epogen è stato l'unico prodotto biologico tra i 10 prodotti farmaceutici più venduti che risulta anche essere glicosilato. Basta saltare al 2018 e sette dei 10 prodotti farmaceutici più venduti sono prodotti biologi glicosilati, con Humira come prodotto più venduto, il che evidenzia la migrazione generale dell'industria farmaceutica verso i prodotti biofarmaceutici.

I prodotti biofarmaceutici sono significativamente più complessi, dal punto di vista della caratterizzazione analitica, rispetto alle molecole piccole. L'aspirina, per esempio, un farmaco a molecole piccole, ha un peso molecolare di circa 180 Da. Per contro, i farmaci biofarmaceutici basati su immunoglobulina G (IgG) hanno un peso molecolare di circa 150.000 Da e presentano una varietà di modifiche post-traduzionali (inclusa la glicosilazione) che possono avere effetto sul funzionamento del farmaco. I glicani sono costituiti da più unità

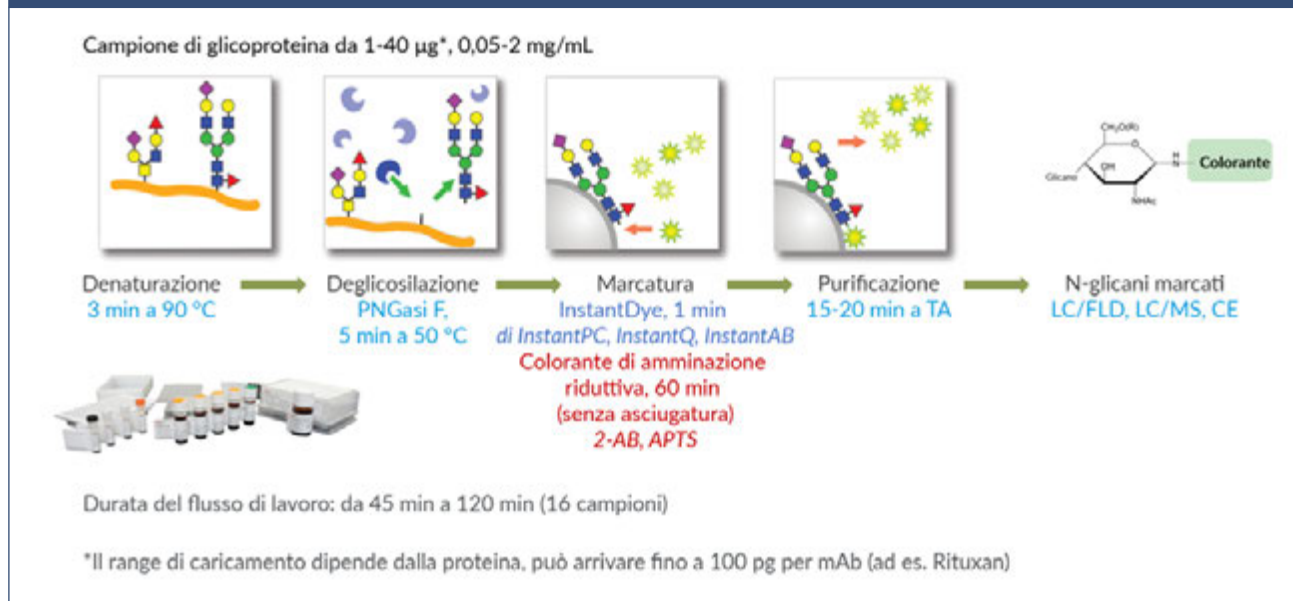
**FIGURA 1: effetto della struttura degli N-glicani sui farmaci bioterapeutici.**

di monosaccaridi come fucosio, mannosio, galattosio, N-acetilglucosammina e vari acidi sialici, come illustrato nella FIGURA 1. La presenza di un nucleo di fucosio riduce la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity), il che è importante per i prodotti terapeutici contro il cancro. Per questo motivo, le aziende che sviluppano prodotti bioterapeutici possono provare a ridurre la quantità di fucosio nel nucleo per massimizzare l'attività di ADCC. È stato inoltre mostrato in letteratura che la presenza di galattosilazione può aumentare l'attività di citotossicità complemento-dipendente (CDC, complement dependent cytotoxicity), mentre la presenza di un acido sialico terminale può ridurre il tasso di clearance, aumentando di conseguenza il tempo in cui il prodotto terapeutico rimane all'interno del corpo.

**Analisi di N-glicani**

Molte differenti tecniche possono essere usate per l'analisi di N-glicani. A livello di proteine intatte, possono essere usate separazioni LC, in combinazione con spettrometria in massa accurata ad alta risoluzione, per fornire informazioni sul tipo di glicani che sono presenti. Un'altra opzione è usare una proteasi per digerire le glicoproteine in peptidi che possano essere separati mediante LC ed analizzati mediante tandem MS, utilizzando la ricerca in database per ottenere informazioni di glicosilazione sito-specifica. Un altro approccio comporta

## ANALISI DELLA GLICOSILAZIONE E DELL'ACIDO SIALICO DI GLICOPROTEINE BIOTERAPEUTICHE

**FIGURA 2:** la tecnologia di preparazione di campioni di N-glicani Gly-X.

analizzare il rilascio enzimatico di N-glicani dalla glicoproteina usando enzimi come la PNGasi F. I glicani rilasciati possono essere analizzati così come sono oppure vengono comunemente marcati con un tag fluorescente per consentire tecniche di separazione mediante LC o elettroforesi capillare (CE) con rivelazione mediante fluorescenza, in cui i dati ottenuti sono generalmente espressi come aree percentuali relative delle differenti specie di glicani.

I glicani possono anche essere monitorati a livello di singoli monosaccaridi a seguito dell'idrolisi acida, direttamente oppure dopo marcatura con un tag fluorescente.

## Preparazione del campione di N-glicani

La tradizionale preparazione di un campione di N-glicani può essere un procedimento lungo che impiega da uno a più giorni, con fasi di deglicosilazione e marcatura da effettuare nell'arco di una notte. Diversi anni fa è stato introdotto un flusso di lavoro con una soluzione tutto-compreso che ha ridotto il

tempo di preparazione del campione a 5 ore usando fluorofori di amminazione riduttiva tradizionali come 2-amminobenzammide (2-AB) e amminopirene trisolfonato. Ulteriori miglioramenti sono stati ottenuti usando un colorante rapido reattivo alla glicosilamina, il che ha ridotto il tempo di preparazione a 3-4 ore. Più recentemente, è stata introdotta la piattaforma di preparazione del campione AdvanceBio Gly-X. Questa nuova piattaforma riduce il tempo di preparazione a 2 ore per l'amminazione riduttiva (2-AB, APTS) e meno di un'ora usando i coloranti istantanei reattivi alla glicosilamina (InstantPC).

Una rappresentazione schematica della piattaforma di preparazione dei campioni di N-glicani AdvanceBio Gly-X è mostrata nella **FIGURA 2**. La glicoproteina viene per prima cosa denaturata con un reagente proprietario per 3 minuti a 90 °C, aprendo la proteina per la deglicosilazione mediante PNGasi F, che avviene nel corso di 5 minuti a 50 °C. I glicani rilasciati vengono quindi marcati con un fluoroforo come il colorante InstantPC reattivo alla glicosilamina

## ANALISI DELLA GLICOSILAZIONE E DELL'ACIDO SIALICO DI GLICOPROTEINE BIOTERAPEUTICHE

in circa 1 minuto, oppure un colorante ad amminazione riduttiva come 2-AB in 60 minuti. Dopo la marcatura, i glicani marcati vengono purificati per rimuovere l'eccesso di colorante e sono quindi pronti per l'analisi.

## Separazione di N-glicani marcati con InstantPC

Un metodo comunemente usato per la separazione e l'analisi di glicani a cui sono stati applicati marcatori fluorescenti è la tecnica LC a interazione idrofilica (HILIC, hydrophilic interaction LC) con rivelazione a fluorescenza. È possibile anche utilizzare la tecnica MS in linea per facilitare l'identificazione delle differenti specie di glicani. La **FIGURA 3** evidenzia un metodo con gradiente HILIC della durata di 60 minuti usato per la separazione e l'analisi di glicani marcati con InstantPC provenienti da rituximab, un prodotto terapeutico a base di IgG.

Viene anche usata la rivelazione mediante MS. La **FIGURA 4** presenta la risposta del cromatogramma ionico totale per N-glicani marcati di Enbrel. Si può vedere che il cromatogramma ionico totale mediante MS per il campione marcato con InstantPC rispecchia quasi perfettamente la risposta alla fluorescenza, il che può aiutare a identificare le specie di glicani con minore abbondanza. Inoltre è disponibile un'ampia varietà di standard di N-glicani marcati che possono facilitare l'identificazione nei casi in cui la tecnica MS non sia disponibile. Ciò include standard di singoli glicani, come N-glicani biantennari comuni la cui presenza è probabile su molecole di IgG espresse in cellule ovariche di criceto cinese, come anche librerie di glicani premarcati come librerie di IgC umana e sialilati sia alfa-(2,6) che alfa-(2,3).

## Flussi di lavoro con 2-AB

2-AB è un colorante usato tradizionalmente per l'analisi di glicani rilasciati. Sebbene i tradizionali

flussi di lavoro con 2-AB possano essere dispendiosi in termini di tempo, la marcatura con 2-AB, quando utilizzata in un flusso di lavoro aggiornato ed efficiente, può essere una scelta adatta per chi desidera i benefici di un flusso di lavoro rapido ma deve essere in grado di mettere in relazione i nuovi dati con dati precedenti. Un flusso di lavoro rapido che usa la tecnologia AdvanceBio Gly-X è illustrato nella **FIGURA 2**. Le ben note fasi di denaturazione e deglicosilazione in soluzione vengono usate con l'amminazione riduttiva sulla matrice in una piastra di purificazione a 96 pozzetti, il che evita la necessità di una fase aggiuntiva di asciugatura. Dopo la marcatura, i glicani vengono purificati per rimuovere il colorante in eccesso e quindi sono pronti per l'analisi. Il tempo di preparazione è di circa 2 ore, da confrontare con la durata superiore di metodi meno recenti. La **FIGURA 5** mostra un esempio di separazione di glicani provenienti da rituximab; sono mostrati principalmente glicani G0F, G1F e G2F neutri biantennari marcati con 2-AB, con valori percentuali di CV bassi per tutte le principali specie di glicani.

## Quantificazione dell'acido sialico

L'acido sialico ricopre un ruolo critico nel mediare l'efficacia delle glicoproteine terapeutiche. La presenza o assenza dell'acido sialico in corrispondenza del terminale non riducente degli N- oppure O-glicani può avere effetti sulla farmacocinetica, come anche sulla immunogenicità della proteina. È pertanto essenziale che il contenuto di acido sialico delle proteine terapeutiche sia mantenuto e controllato. Il kit di quantificazione dell'acido sialico totale AdvanceBio offre un approccio sensibile e ad alta produttività per la quantificazione dell'acido sialico. Le analisi, configurate per piastra a 96 pozzetti, sono basate su reazioni enzimatiche che iniziano con la conversione mediante sialidasi-A dell'acido sialico rilasciato in perossido di idrogeno, che quindi reagisce in proporzione

ANALISI DELLA GLICOSILAZIONE E DELL'ACIDO SIALICO DI GLICOPROTEINE BIOTERAPEUTICHE

FIGURA 3: glicani di rituximab con InstantPC.

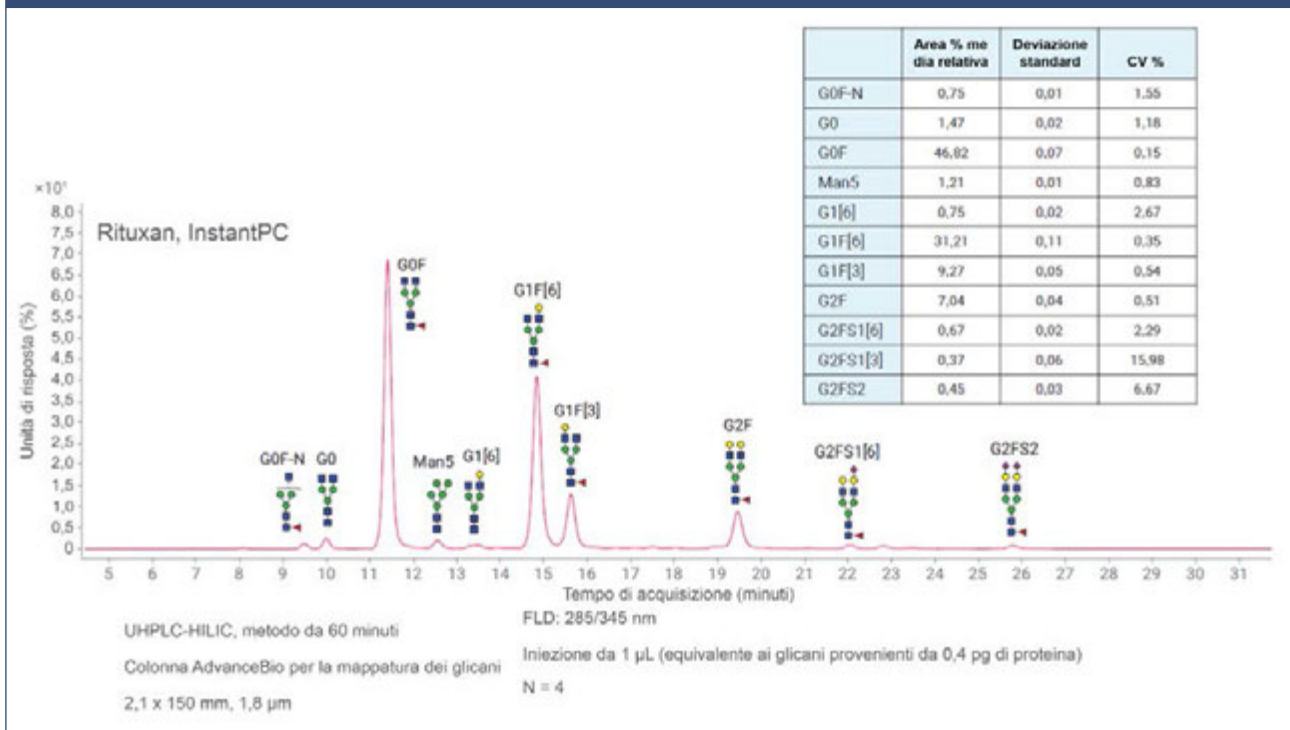
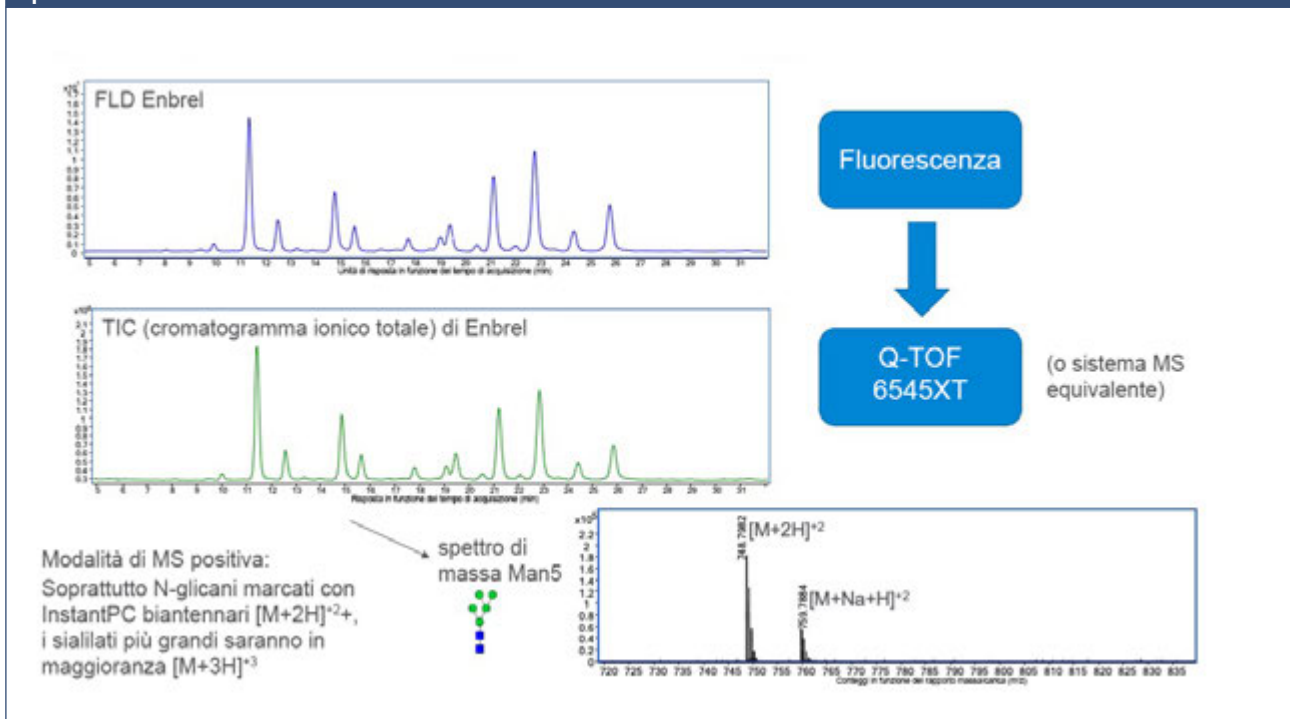
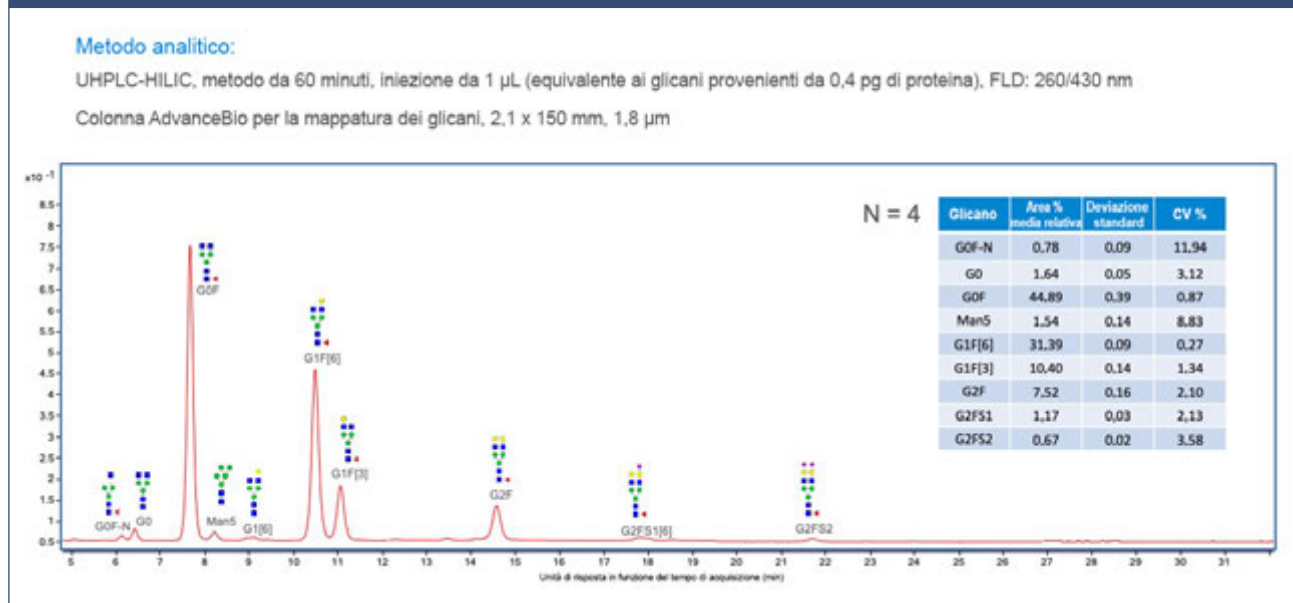


FIGURA 4: cromatogramma ionico totale mediante MS per N-glicani con InstantPC provenienti da Enbrel.



## ANALISI DELLA GLICOSILAZIONE E DELL'ACIDO SIALICO DI GLICOPROTEINE BIOTERAPEUTICHE

FIGURA 5: N-glicani di Rituximab con Gly-X 2-AB Express.



di uno a uno con un colorante fluorescente generando un intenso segnale di fluorescenza o assorbanza. Le differenti glicoproteine possono avere vario grado di glicosilazione, il che comporta anche vario grado di sialilazione. Di conseguenza, è importante iniziare con una quantità di proteina che dia un buon segnale. Per esempio, MabThera ha bassi livelli di acido sialico, per cui è necessaria una grande quantità di proteina, mentre la fetuina o Enbrel hanno un maggiore contenuto di acido sialico e pertanto richiedono meno proteina.

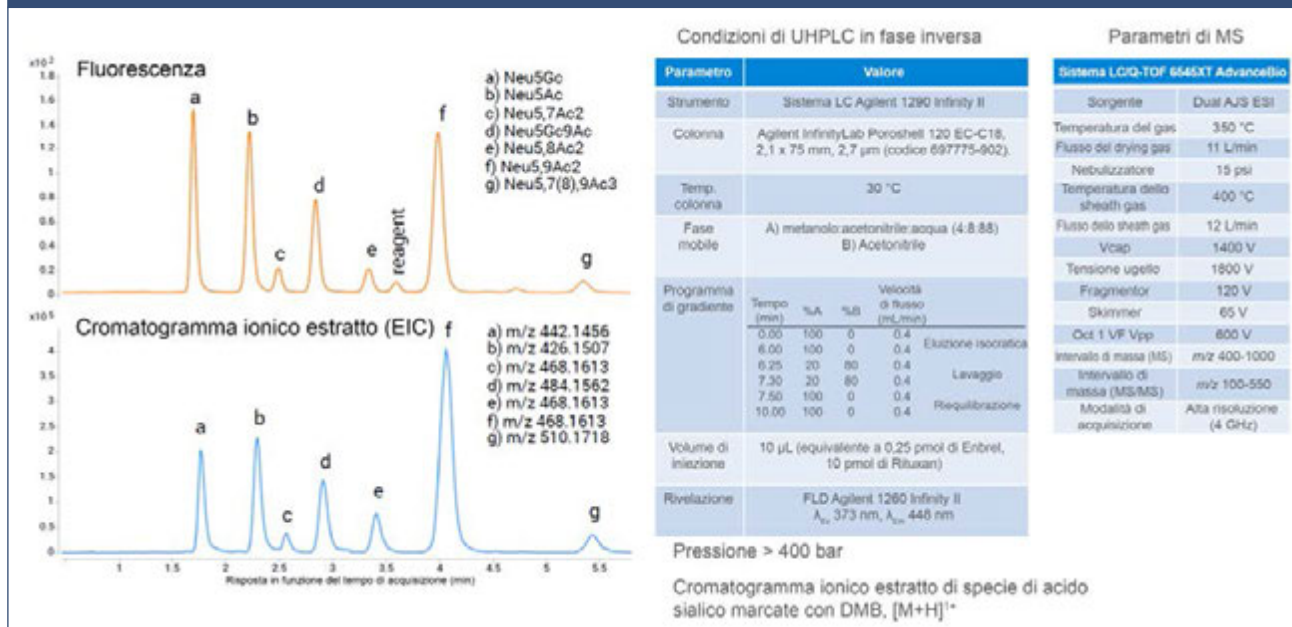
L'acido N-acetilneuramminico (NANA) e l'acido N-glicolilneuramminico (NGNA) sono tipi di acido sialico di struttura simile che differiscono solamente per l'aggiunta del gruppo idrossile (NGNA). Questa piccola differenza è sufficiente a rendere l'NGNA potenzialmente immunogenico per gli esseri umani. Per distinguere tra questi due tipi di acido sialico, un metodo comunemente usato è il rilascio dell'acido sialico dal glicano mediante la marcatura con il colorante: 1,2-diammino-4,5-metilenediossibenzene-2HCl (DMB), un procedimento utilizzato dal kit di profilazione

e quantificazione dell'acido sialico AdvanceBio, che include anche standard di NANA ed NGNA. La marcatura è seguita da separazione mediante LC e rivelazione mediante fluorescenza e/o MS. Un esempio dell'analisi di un pannello di riferimento dell'acido sialico, una miscela di tipi di acido sialico differenti marcati con DMB, è mostrato nella FIGURA 6 usando la tecnica LC seguita da rivelazione sia mediante fluorescenza che mediante MS. I primi due picchi del cromatogramma sono rispettivamente NGNA e NANA e i restanti picchi del cromatogramma sono differenti versioni dell'acido sialico che si osservano in natura.

***“La presenza o assenza dell'acido sialico in corrispondenza del terminale non riducente degli N- oppure O-glicani può avere effetti sulla farmacocinetica, come anche sulla immunogenicità della proteina.”***

ANALISI DELLA GLICOSILAZIONE E DELL'ACIDO SIALICO DI GLICOPROTEINE BIOTERAPEUTICHE

FIGURA 6: pannello di riferimento dell'acido sialico (SARP) marcato con DMB.



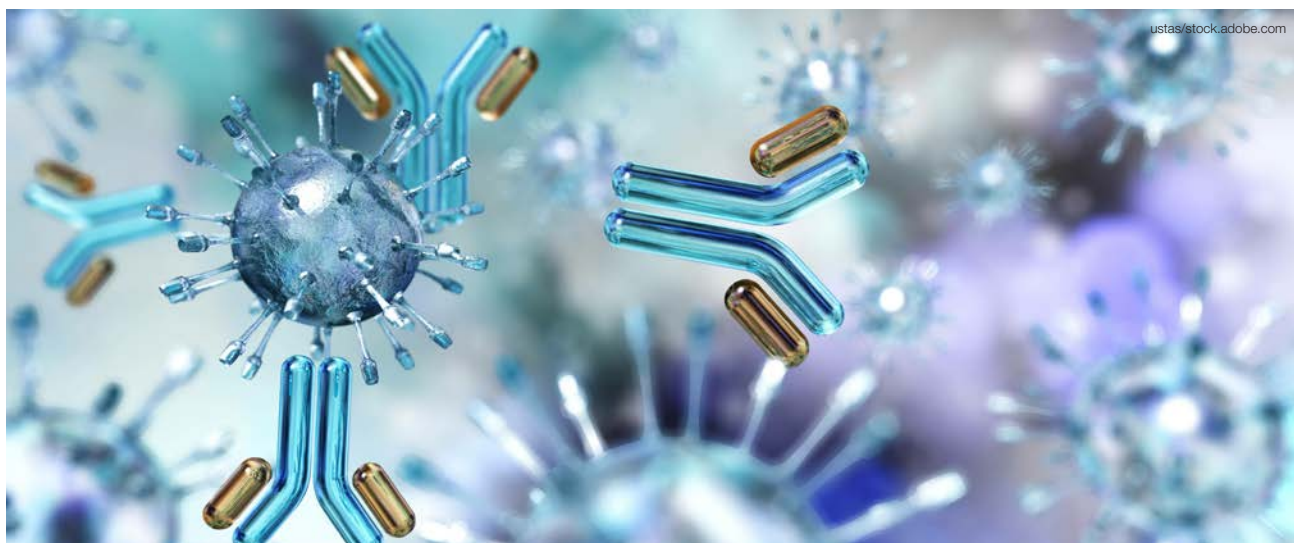
**Conclusion**

I ricercatori hanno a disposizione molti strumenti differenti per preparare, separare, rilevare e identificare gli N-glicani che sono presenti su una tipica glicoproteina bioterapeutica. Flussi di lavoro moderni, come il kit di preparazione del campione AdvanceBio Gly-X, sfruttano tecniche per rilasciare, marcare e separare in modo rapido i glicani per la quantificazione mediante rivelazione a fluorescenza. In aggiunta a questi nuovi flussi di lavoro rapidi per la preparazione del campione, l'elevata efficienza di ionizzazione dei nuovi coloranti, come InstantPC, consente un'affidabile caratterizzazione mediante MS dei glicani rilasciati. Questi nuovi flussi di lavoro sono disponibili anche con coloranti di marcatura dei glicani tradizionali, come 2-AB, il che offre un'opzione di preparazione del campione rapida e pratica per coloro che desiderano mettere i nuovi dati in relazione con i dati precedenti. Oltre all'analisi dei glicani rilasciati, Agilent offre prodotti per la quantificazione e profilazione dell'acido sialico,

completando così l'affidabile kit di strumenti offerto per l'analisi di prodotti bioterapeutici glicosilati.

**John Yan**

John Yan, Ph.D., è un chimico applicativo presso Agilent.



# Introduzione alla cromatografia liquida bidimensionale per le separazioni di biomolecole

Dwight R. Stoll

*Fondamenti di cromatografia liquida 2D e applicazioni contemporanee nella bioanalisi.*

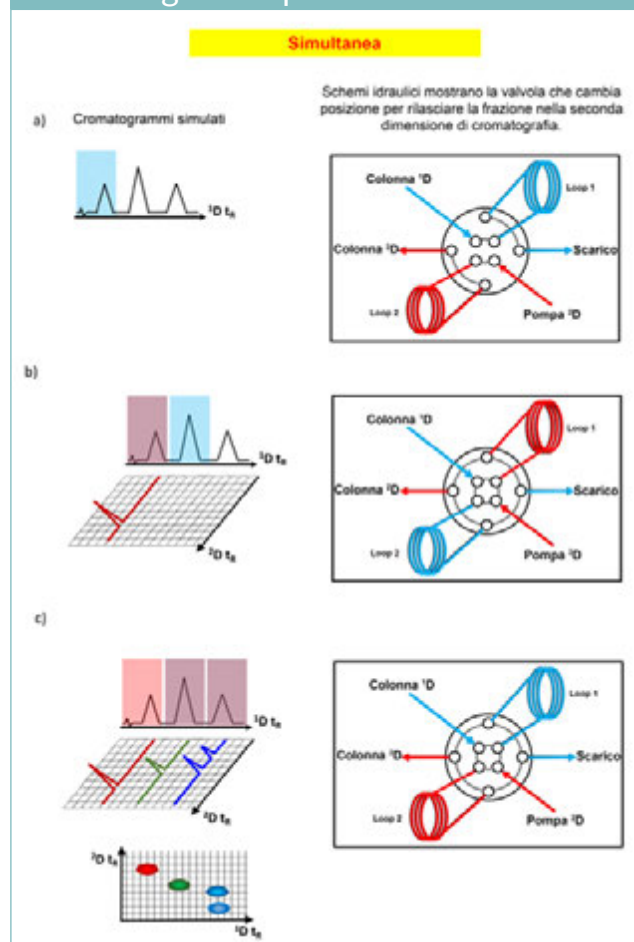
## Introduzione

Sebbene la cromatografia liquida monodimensionale (1D-LC) rimanga un valido strumento nella bioanalisi, può essere vantaggioso aggiungere un'altra dimensione alla separazione cromatografica. Le separazioni analitiche con due colonne in tandem, o cromatografia liquida bidimensionale (2D-LC), possono offrire guadagni tangibili nella risoluzione degli analiti senza bisogno di prolungare in modo oneroso il tempo di separazione. Adattare i parametri di separazione a specifiche condizioni di miscela e ad analiti target può aiutare a massimizzare la resa analitica della tecnica 2D-LC. Questo sommario serve da introduzione al concetto di separazioni mediante cromatografia liquida 2D, tratta alcune modalità e alcuni principi operativi fondamentali per la tecnica 2D-LC e fornisce inoltre esempi pertinenti dei vantaggi tangibili ottenuti dalla tecnica 2D-LC per la risoluzione di situazioni bioanalitiche problematiche.

## Fondamenti di separazione mediante 2D-LC

Molto spesso nell'analisi di biomolecole avviene che anche campioni apparentemente semplici siano abbastanza complessi da avere picchi non risolti nelle separazioni cromatografiche. Di conseguenza, vi possono essere

## INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA BIDIMENSIONALE PER LE SEPARAZIONI DI BIOMOLECOLE

**FIGURA 1:** come funziona la cromatografia liquida bidimensionale.

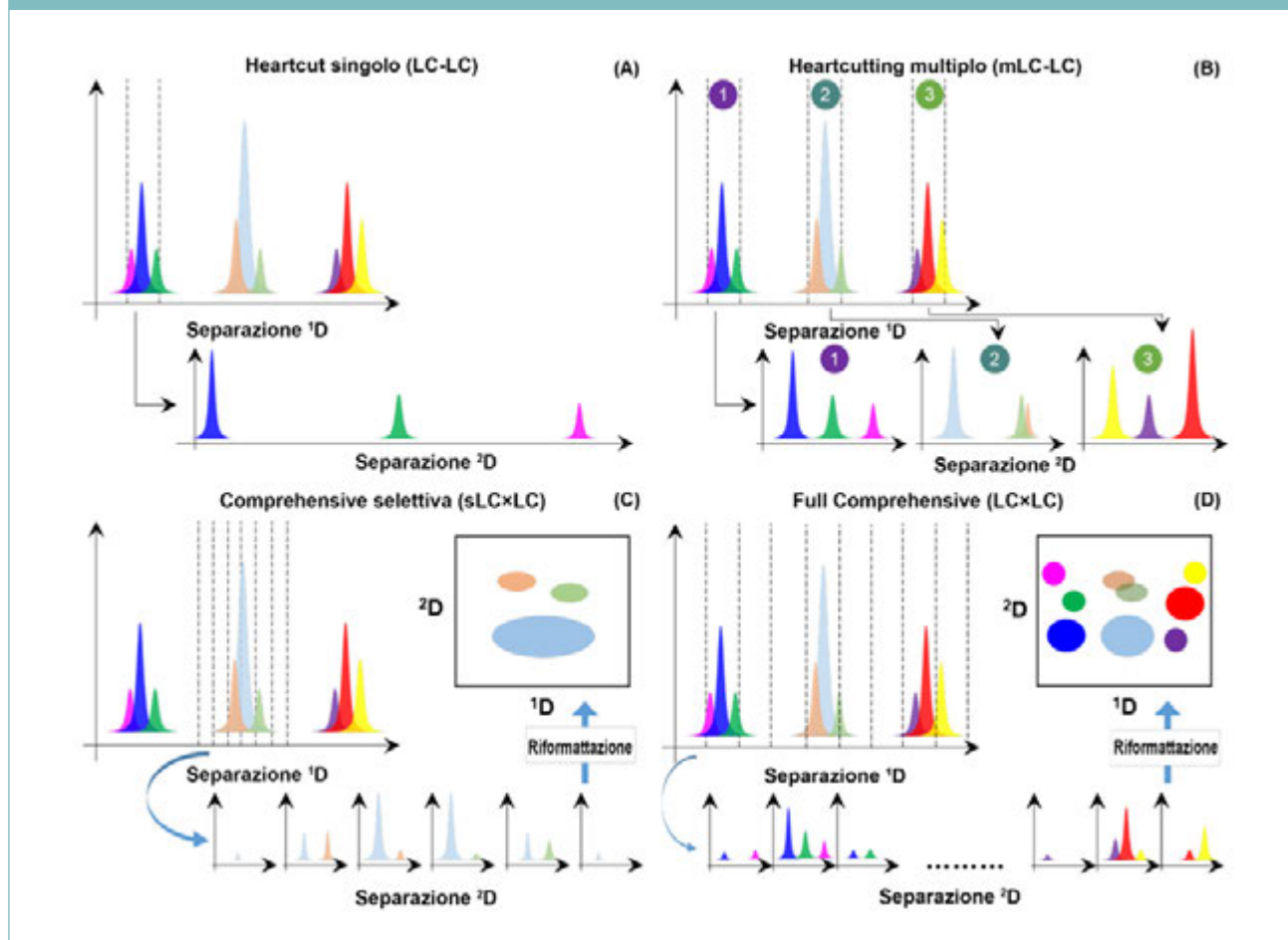
casi in cui un singolo stadio di cromatografia liquida semplicemente non è adeguato a separare le specie contenute in una miscela, in particolare per analiti che possono avere una struttura strettamente imparentata, come nel caso delle miscele isomeriche, o per specie ignote che richiedono l'identificazione degli analiti. Sebbene la **FIGURA 1A** offra un esempio idealizzato, i cromatogrammi simulati mostrati possono rendere più chiara l'utilità di usare la tecnica LC a due dimensioni. In condizioni in cui la separazione secondo un'unica proprietà, come la dimensione o la carica, non ottiene una risoluzione sufficiente degli analiti, separare gli analiti in base a entrambe le proprietà può dare come risultato specie completamente risolte.

Allo scopo di quantificare il potenziamento di separazioni osservate mediante 2D-LC, la misura della capacità di picco, usata comunemente, è in grado di fornire una spiegazione numerica del maggiore valore analitico di una seconda dimensione LC rispetto a un semplice prolungamento della colonna per 1D-LC. Per ogni dimensione cromatografica, le misurazioni analitiche sono essenzialmente raggruppate in bin in base all'efficacia della separazione e della velocità di risposta dello strumento. Ciò crea un insieme lineare di bin con la risposta dello strumento rispetto al tempo. Con l'aggiunta di una seconda dimensione, la capacità di picco viene moltiplicata per generare un insieme 2D di bin di misurazione. Con una scelta giudiziosa di colonne e condizioni di separazione complementari, è possibile fare uso di questo spazio di separazione per differenziare analiti precedentemente non risolti. La seconda dimensione può inoltre essere aggiunta come necessaria per una data analisi: le modalità operative 2D-LC permettono l'applicazione mirata seconda dimensione (2D) al momento opportuno della separazione.

Come nel caso della tecnica 1D-LC, la strumentazione necessaria per la tecnica 2D-LC comporta l'uso di una valvola di commutazione, ma con l'aggiunta di alcuni componenti per temporizzare le iniezioni del campione. Un'appropriata temporizzazione della commutazione della valvola e del caricamento dei due loop di campionamento consente al processo di separazione di verificarsi contemporaneamente nelle due colonne (**FIGURA 1B**). Una parte dell'effluente proveniente dalla colonna 1D viene deviata in un loop di campionamento separato di volume noto; una volta che il loop di campionamento si è riempito, la soluzione al suo interno viene iniettata nella colonna 2D. Di conseguenza, segmenti della separazione provenienti dalla prima dimensione (1D) vengono efficacemente raccolti prima

## INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA BIDIMENSIONALE PER LE SEPARAZIONI DI BIOMOLECOLE

FIGURA 2: modalità di separazione 2D (6).



di essere iniettati nella seconda colonna. I dati cromatografici ottenuti mediante 2D-LC rivelano di quanto gli analiti corrispondenti a ciascuno dei picchi 1D vengono ulteriormente separati in base alle condizioni di 2D. Qualsiasi separazione successiva dei componenti che possa verificarsi in 2D in aggiunta a quella in 1D viene rivelata sotto forma di picchi aggiuntivi nel cromatogramma 2D.

### Modalità operative 2D-LC mirate in base all'applicazione

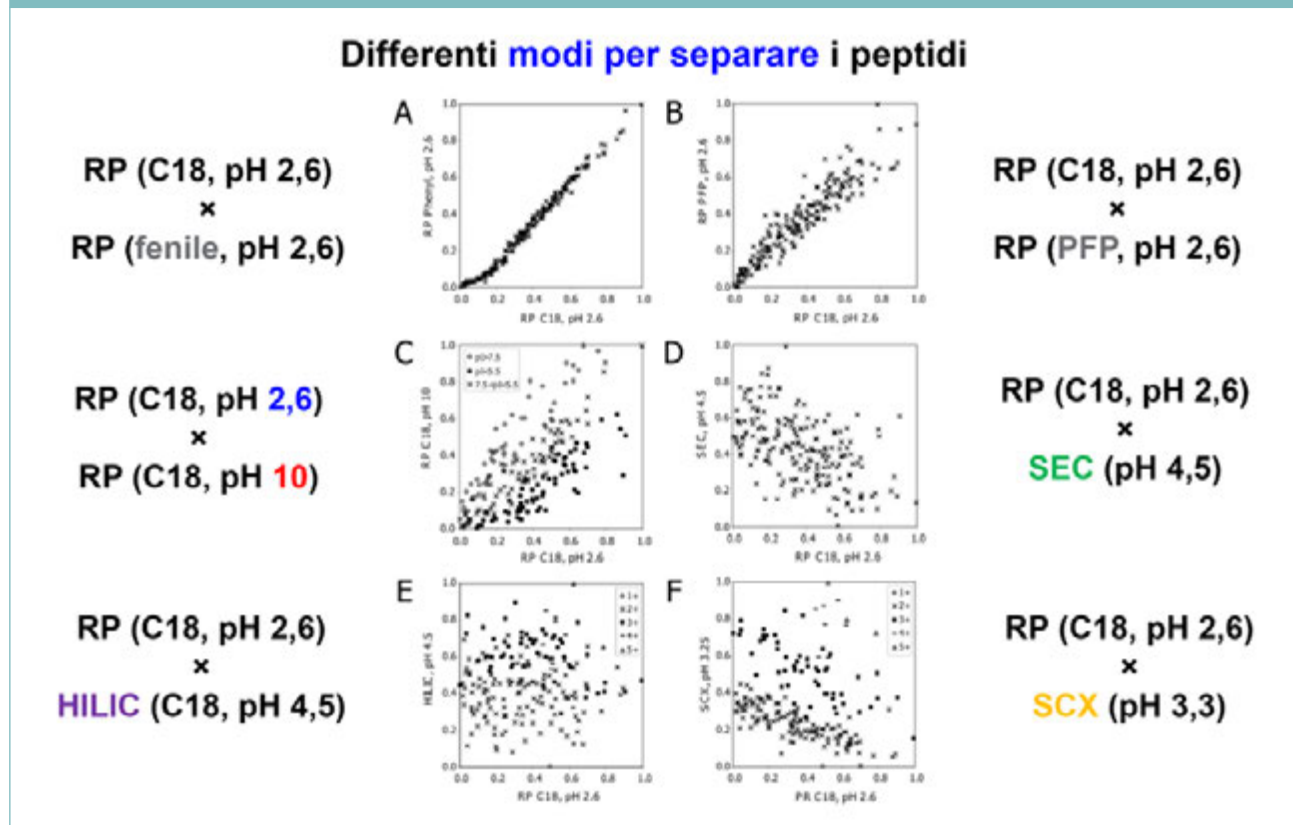
Nell'ambito della tecnica 2D-LC vi sono due modalità di funzionamento primarie, oltre a due modalità che sono in effetti ibridi delle modalità

di funzionamento primarie. Le quattro modalità sono illustrate nella FIGURA 2.

La prima delle modalità di funzionamento primaria è nota come heartcut singolo e abbreviata in LC-LC (FIGURA 2A). L'approccio della tecnica 2D-LC a heartcut singolo prevede di prelevare l'effluente proveniente da un singolo segmento temporale del cromatogramma 1D, come un singolo picco o un cluster di picchi, e sottoporre una porzione di tale effluente a separazione nella colonna 2D. La tecnica LC-LC è massimamente efficace per fornire una caratterizzazione aggiuntiva di una singola regione di interesse identificata dalla colonna 1D.

## INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA BIDIMENSIONALE PER LE SEPARAZIONI DI BIOMOLECOLE

FIGURA 3: ottimizzare l'uso dello spazio di separazione 2D (10).



Per la seconda modalità di funzionamento primaria in 2D-LC, tutto l'eluente proveniente dal cromatogramma 1D viene indirizzato alla colonna 2D sotto forma di frazioni, in un processo che è noto come *comprehensive 2D-LC completa* e abbreviato in *LCxLC* (Figura 2d). La tecnica *LCxLC* fornisce l'insieme di dati più completo per quanto riguarda i componenti di una miscela di target. Questa modalità è la più appropriata per campioni altamente complessi che potrebbero contenere più specie irrisolte e sovrapposte, oppure per una valutazione completa di una miscela ignota.

In aggiunta alle due modalità di funzionamento 2D-LC primarie, le due modalità ibride disponibili includono *heartcutting multiplo (mLC-LC)* e *modalità comprehensive selettiva (sLCxLC)*. L'*heartcutting multiplo* applica principi operativi

simili a quelli dell'*heartcut* singolo, in cui una specifica sezione di eluente proveniente dalla colonna 1D viene iniettata nella colonna 2D per essere separato, ma con più di una frazione di *heartcut* prelevato per ogni ciclo cromatografico (FIGURA 2B). La tecnica *mLC-LC* è utile nei casi in cui è necessaria una caratterizzazione avanzata di più di una regione del cromatogramma, ma in modo ridotto rispetto a quella offerta dalla tecnica *LCxLC*. Nel caso della modalità *comprehensive selettiva*, il concetto della tecnica *LCxLC* di campionare più segmenti temporali in una specifica finestra temporale viene applicato ma non per l'intera durata dell'analisi (FIGURA 2C). La modalità di funzionamento *sLCxLC* è ideale per una valutazione approfondita di una specifica specie target, come nel caso della caratterizzazione approfondita di una proteina, in cui solamente una porzione dell'analisi

## INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA BIDIMENSIONALE PER LE SEPARAZIONI DI BIOMOLECOLE

cromatografica richiede una più approfondita indagine analitica.

*“Come nel caso della tecnica 1D-LC tradizionale, l'applicazione della tecnica 2D-LC merita un'attenta messa a punto delle condizioni di separazione in base alla sensibilità del rivelatore utilizzato.”*

### Ottenere la risoluzione ottimale grazie all'ortogonalità delle colonne

Il miglioramento moltiplicativo della peak capacity (capacità di picchi) che può risultare dalla tecnica 2D-LC si basa grandemente sull'uso di fasi stazionarie opportunamente complementari, ovvero ortogonali, nelle colonne 1D e 2D. Cercare di eseguire separazioni 2D-LC con colonne che hanno essenzialmente le stesse condizioni di fase stazionaria e fase mobile non consente di ottenere alcun miglioramento produttivo della separazione per effetto dell'aggiunta della seconda dimensione. Per ottenere un miglioramento della separazione nello spazio 2D deve invece esserci una qualche forma di differenziazione tra le due dimensioni. Nella Figura 3a, per esempio, la combinazione delle fasi stazionarie C18 e fenile con lo stesso pH della fase mobile non consente di ottenere essenzialmente alcun allargamento tra i picchi degli analiti a regioni dello spazio di separazione all'esterno di una linea con correlazione approssimativamente di 1:1 per l'eluizione degli analiti tra le due colonne. È tuttavia sufficiente sostituire la colonna 2D con una fase stazionaria di fenile fluorurato (FIGURA 3B), per creare una distinzione più accentuata tra gli analiti in ciascuno stadio di separazione. Anche se si utilizza lo stesso

tipo di colonna sia per la colonna 1D che per la colonna 2D (FIGURA 3C), alterando il pH della fase mobile tra le due dimensioni si crea una differenza sufficientemente grande nelle condizioni di separazione da migliorare in modo apprezzabile la risoluzione dei picchi nello spazio analitico. Analogamente, è possibile ottenere un miglioramento della risoluzione usando colonne con differenze ancora più marcate tra le due dimensioni, come mostrato nelle FIGURE 3D-F.

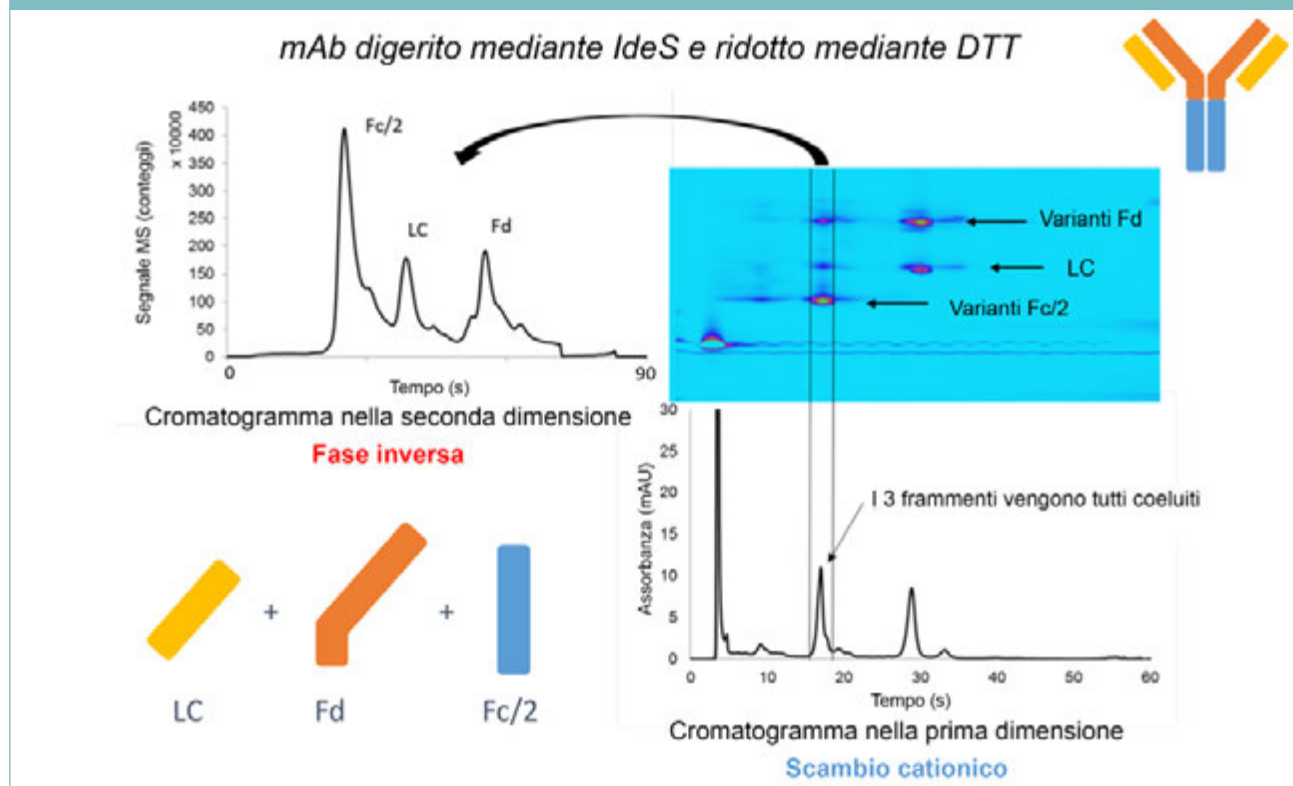
### Ottimizzare la velocità di campionamento 2D per evitare il sotto-campionamento

Un punto fondamentale per la temporizzazione delle separazioni 2D-LC è evitare il sotto-campionamento dell'effluente proveniente dalla colonna 1D nella separazione 2D, un problema che è noto come sotto-campionamento o ri-miscelazione. Se si acquisisce un numero troppo piccolo di campioni di un picco 1D, l'effetto netto che si crea è essenzialmente una media, o una ri-miscelazione, di qualsiasi specie che era stata separata nella colonna 1D e pertanto si riduce l'utilità del primo stadio di separazione. Secondo la teoria di Murphy-Schure-Foley (1), devono esserci non meno di quattro campioni presi dalla colonna 1D nella regione di un picco cromatografico per poter ridurre al minimo gli effetti del sotto-campionamento. È inoltre necessario ottimizzare la velocità di campionamento in modo da bilanciare le velocità sia nella colonna 1D che nella colonna 2D per ottenere una peak capacity (capacità di picchi) netta ottimale per il sistema nel suo complesso.

Come nel caso della tecnica 1D-LC tradizionale, l'applicazione della tecnica 2D-LC merita un'attenta messa a punto delle condizioni di separazione in base alla sensibilità del rivelatore utilizzato. Per ciascuno stadio di cromatografia (1D e 2D), la concentrazione degli analiti nell'eluente è più bassa rispetto a quella dell'iniezione iniziale in ciascuna colonna.

## INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA BIDIMENSIONALE PER LE SEPARAZIONI DI BIOMOLECOLE

FIGURA 4: 2D-LC-MS a livello di subunità di mAbs mediante LCxLC (7).



Di conseguenza, vi sono valori minimi di volume di iniezione e tempo di campionamento per garantire che sia presente una quantità sufficiente di analiti.

### Risolvere gli abbinamenti inadeguati della fase mobile tra le dimensioni

Oltre a tenere conto del sotto-campionamento, un altro importante aspetto della tecnica 2D-LC da considerare è la prevenzione degli effetti negativi dovuti a un abbinamento inadeguato delle fasi mobili tra le due colonne. Questo problema nasce dal fatto che la fase mobile che eluisce con un analita dalla colonna 1D diventa effettivamente il solvente di iniezione per la colonna 2D e pertanto è richiesta la compatibilità delle fasi mobili. Ciò può avere effetti minimi per alcune combinazioni di colonne e fasi mobili ma essere di notevole importanza per altre. Per esempio, la composizione della

fase mobile di una separazione a scambio ionico tipicamente ha un contenuto acquoso e pertanto è generalmente compatibile con la fase mobile principalmente acquosa presente all'inizio di una separazione a fase inversa. Al contrario, la fase mobile ad alto contenuto organico usata nella cromatografia in fase normale crea difficoltà per l'accoppiamento di una colonna 1D a fase normale con una colonna 2D a fase inversa (RP, reversed phase) e può dare come risultato il fenomeno di fronting o altre perdite di separazione degli analiti.

L'incompatibilità tra le fasi mobili può tuttavia essere risolta con la tecnologia di modulazione attiva del solvente (ASM, active solvent modulation). Sviluppata in accordo con Agilent, i sistemi 2D-LC con ASM funzionano in modo da regolare la composizione del solvente del campione che viene iniettato nella colonna 2D

## INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA BIDIMENSIONALE PER LE SEPARAZIONI DI BIOMOLECOLE

per migliorare la compatibilità. Introducendo un loop di campionamento parallelo che diluisce l'effluente raccolto dalla prima dimensione prima che il campione raggiunga la colonna 2D, la forza del solvente dell'iniezione 2D viene ridotta. La tecnologia ASM migliora la risoluzione 2D nonostante la diluizione del campione in quanto la riduzione della forza del solvente impedisce la penetrazione dell'analita che altrimenti si verificherebbe per via della solubilità inappropriatamente elevata dell'analita nella fase mobile all'inizio della separazione.

### Sfruttare la tecnica 2D-LC per ottenere due analisi al costo di una

Una categoria in cui la tecnica 2D-LC rappresenta un approccio ideale è quella in cui sarebbero necessari due o più esperimenti separati per ottenere gli stessi risultati che si ottengono da un'unica analisi 2D-LC. Un esempio è quando si caratterizza un picco ignoto in un cromatogramma in condizioni incompatibili con la spettrometria di massa (MS), una situazione esaminata da LUO et al. (2). Piuttosto che ideare una separazione aggiuntiva in condizioni di separazione compatibili con tecnica MS, Luo et al. hanno aggiunto una seconda dimensione compatibile con la tecnica MS al primo stadio di LC, permettendo l'identificazione diretta di picchi ignoti. Come osservato da Karongo et al., la tecnica sLCxLC applicata alla caratterizzazione delle impurezze in peptidi terapeutici ha rivelato la presenza di tre impurezze coeluite con il peptide di interesse che non sarebbero state individuate dalla tecnica 1D-LC (3). Tramite la combinazione di una colonna RP achirale in 1D e una colonna WAX chirale in 2D, Woiwode et al. hanno dimostrato che la tecnica sLCxLC permette la separazione enantioselettiva di tutti gli amminoacidi in un'unica analisi (4). Per caratterizzare estratti derivati dalle piante come quelli provenienti dal tè o dal vino, la tecnica LCxLC ha svolto un ruolo fondamentale

consentendo l'identificazione delle specie fenoliche da parte di Muller et al. (5).

### Metodi per la caratterizzazione approfondita delle proteine

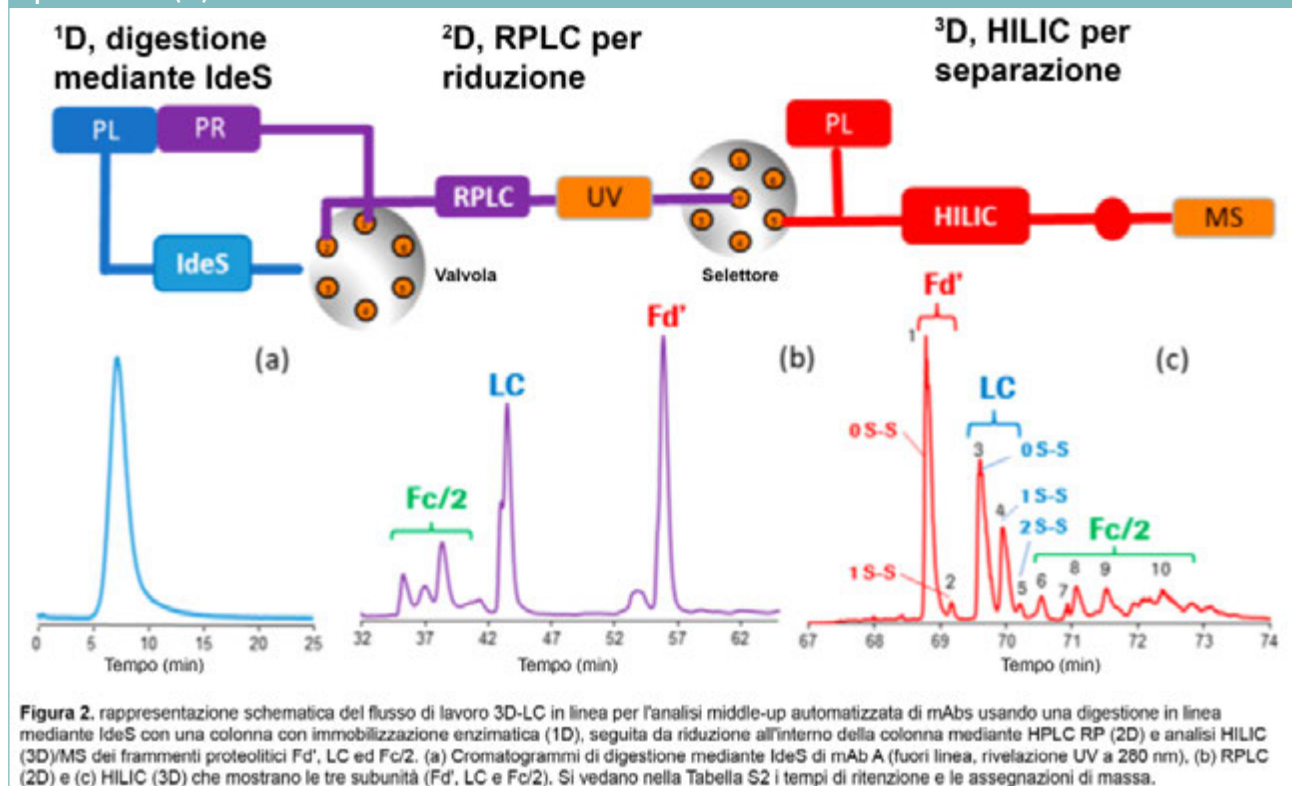
Un altro tipo di analisi in cui la tecnica 2D-LC permette di ottenere informazioni particolarmente utili è la caratterizzazione approfondita delle proteine. Se combinate con la spettrometria di massa nella parte terminale, le separazioni bidimensionali possono semplificare grandemente il processo di identificazione dei campioni. Una valutazione completa della struttura e della composizione degli anticorpi monoclonali può essere ottenuta con trattamenti appropriati del campione e l'applicazione della tecnica 2D-LC seguita dalla rivelazione mediante MS. È stato dimostrato che subunità di anticorpi, catene leggere e pesanti, glicani legati e peptidi componenti sono identificabili tramite questo tipo di approccio multidimensionale (6). Inoltre, i risultati riportati da Sorensen et al. confermano la necessità di due stadi di separazione LC per via della coeluzione di frammenti di anticorpi digeriti nel caso la prima dimensione LC venisse usata da sola (FIGURA 4) (7).

### Sviluppo di analisi 2D-LC automatizzate

Una delle difficoltà nel campo della bioanalisi che la tecnica 2D-LC può aiutare a superare è il problema del dispendio di tempo legato alla preparazione del campione e alla selezione manuale dei picchi per l'analisi successiva. Piuttosto che eseguire ogni trattamento del campione, come una digestione con tripsina o la riduzione con ditiotreitolo (DTT) off line queste fasi possono essere integrate con la tecnica 2D-LC automatizzata. Uno specifico esempio di Gstöttner et al. che comporta la separazione di anticorpi include un flusso di lavoro in cui i campioni vengono per prima cosa separati in una colonna a scambio ionico e raccolti in

## INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA BIDIMENSIONALE PER LE SEPARAZIONI DI BIOMOLECOLE

FIGURA 5: applicazioni contemporanee, sistemi di caratterizzazione automatizzati per mAb (9).



linea in frazioni, dopodiché queste possono essere inviate attraverso una colonna a reattore riduttore, a cui fanno seguito la separazione 2D-RP e la rivelazione mediante MS (8). In modo analogo, Camperi et al. hanno ideato una procedura per caratterizzare le varianti di glicosilazione degli anticorpi monoclonali, in cui i campioni sono sottoposti a digestione mediante IdeS, riduzione e separazione in una colonna RP e separazione LC (HILIC) mediante interazione idrofila prima della rivelazione mediante spettrometria di massa (FIGURA 5) (9). È stato riscontrato in esperimenti di verifica del principio che il metodo automatizzato da Camperi et al. non presenta differenze significative rispetto al trattamento off line del campione.

## Conclusioni

Le separazioni multidimensionali stanno rapidamente diventando note per il fatto di

fornire ampie informazioni analitiche che vanno oltre quelle della tecnica 1D-LC con solo poco sforzo in più. Affinché tuttavia questa tecnologia consenta di ottenere risultati ottimali, occorre comunque tenere conto dei principi tradizionali sottostanti all'analisi chimica. Come nel caso di altri strumenti analitici, lo sviluppo di metodi per la tecnica 2D-LC richiede che la modalità operativa usata (LC-LC, mLc-LC, sLCxLC, oppure LCxLC) sia mirata in base al tipo di campione e al tipo di informazione che si vuole ottenere dall'analisi. Dopo le considerazioni sulla modalità operativa, è fondamentale utilizzare condizioni di separazione che siano sufficientemente ortogonali. La massima risoluzione nello spazio 2D può essere il risultato non soltanto della complementarità delle fasi stazionarie, ma anche delle condizioni della fase mobile, come per esempio il pH, a seconda della classe di analiti, per cui è di importanza critica tenere

## INTRODUZIONE ALLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA BIDIMENSIONALE PER LE SEPARAZIONI DI BIOMOLECOLE

conto delle proprietà molecolari. Occorre inoltre fare attenzione a non effettuare un sottocampionamento dello stadio 1D, in quanto ciò potrebbe annullare i guadagni di separazione ottenuti nella prima dimensione. Ciò deve essere tuttavia bilanciato con la sensibilità del rivelatore; le frazioni separate in 2D non devono avere un volume, e quindi un contenuto di analiti, così ridotto da non essere rilevate. Occorre inoltre esaminare la compatibilità tra le fasi mobili per evitare, quando possibile, abbinamenti inadeguati. Quando un abbinamento inadeguato tra le fasi mobili è inevitabile, occorre utilizzare appropriate soluzioni alternative al problema e la tecnologia ASM.

## Bibliografia

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., in *Advances in Chromatography*, (CRC Press: Boca Raton, 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

## Dwight R. Stoll, PhD

Professor  
Gustavus Adolphus College



ustas/stock.adobe.com



Attila Németh/stock.adobe.com

## **Identificazione, mappatura e quantificazione relativa di glicopeptidi di spike da SARS-CoV-2 mediante l'identificazione dell'impronta digitale massa-tempo di ritenzione**

Rod Chalk

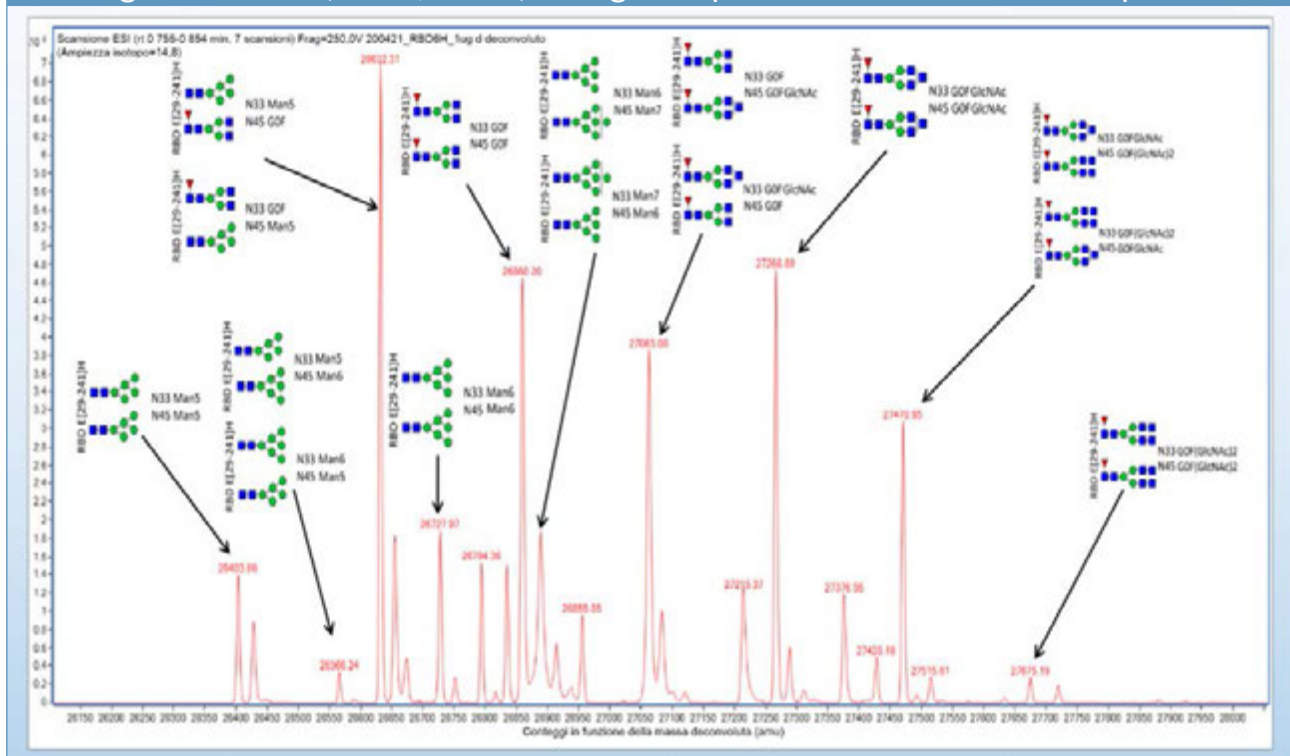
*Un database master per l'identificazione dell'impronta digitale e la mappatura dei glicopeptidi presenti sulla proteina spike semplifica notevolmente questo processo che sarebbe altrimenti lungo e complesso.*

### **Introduzione**

Si ritiene che la complessa glicosilazione presente nella proteina spike del virus SARS-CoV-2 sia coinvolta nella immuno-evasione e possa renderlo maggiormente patogeno. Molti laboratori stanno esprimendo la proteina spike per scopi di ricerca e necessitano di flussi di lavoro analitici affidabili per caratterizzarla in modo completo. Ciò è importante perché lo schema di glicosilazione è determinato dal sistema di espressione della cella ospite e anche dalle condizioni di crescita. Queste condizioni sono difficili da controllare in modo preciso e possono portare a variazioni da lotto a lotto della proteina spike che viene prodotta. La complessità di questa glicosilazione presenta numerosi ostacoli tecnici per la caratterizzazione completa della proteina. L'analisi di masse intatte mediante cromatografia liquida in fase inversa e spettrometria di massa (LC-MS) probabilmente non è fattibile in quanto il grande numero di possibili glicani in corrispondenza di ognuno dei 22 siti di glicosilazione dà come risultato una polidispersione eccezionalmente elevata e una conseguente diluizione del segnale. Se anche fosse possibile, non darebbe le informazioni posizionali desiderate per i glicani. L'analisi dei glicani rilasciati è possibile, ma anche questa non fornisce informazioni posizionali.

IDENTIFICAZIONE, MAPPATURA E QUANTIFICAZIONE RELATIVA DI GLICOPEPTIDI DI SPIKE DA SARS-COV-2  
MEDIANTE L'IDENTIFICAZIONE DELL'IMPRONTA DIGITALE MASSA-TEMPO DI RITENZIONE

**FIGURA 1:** il dominio di legame del recettore dello spike del SARS-CoV2 presenta due siti di glicosilazione (N343, N331). Vari glicani possono essere associati a questi siti.



Questo articolo descrive un nuovo approccio che comporta, come prima fase, la generazione di un database di massa e tempo di ritenzione di glicopeptidi utilizzando la tecnica LC-Q-TOF MS/MS. Questo database, che è sostanzialmente una raccolta di "impronte digitali" di massa accurata-tempo di ritenzione per ciascun glicopeptide, può quindi essere incorporato in un flusso di lavoro di caratterizzazione semplice, potente, rapido ed affidabile.

## La difficoltà presentata dalla proteina spike

La proteina spike a lunghezza completa esiste come trimer. La porzione del dominio di legame del recettore (RBD, receptor binding domain) del monomero spike ha solamente due siti di glicosilazione (N343 ed N331), ma ognuno di essi porta vari possibili glicani. Nonostante il basso numero di siti di glicosilazione per l'RBD, il suo

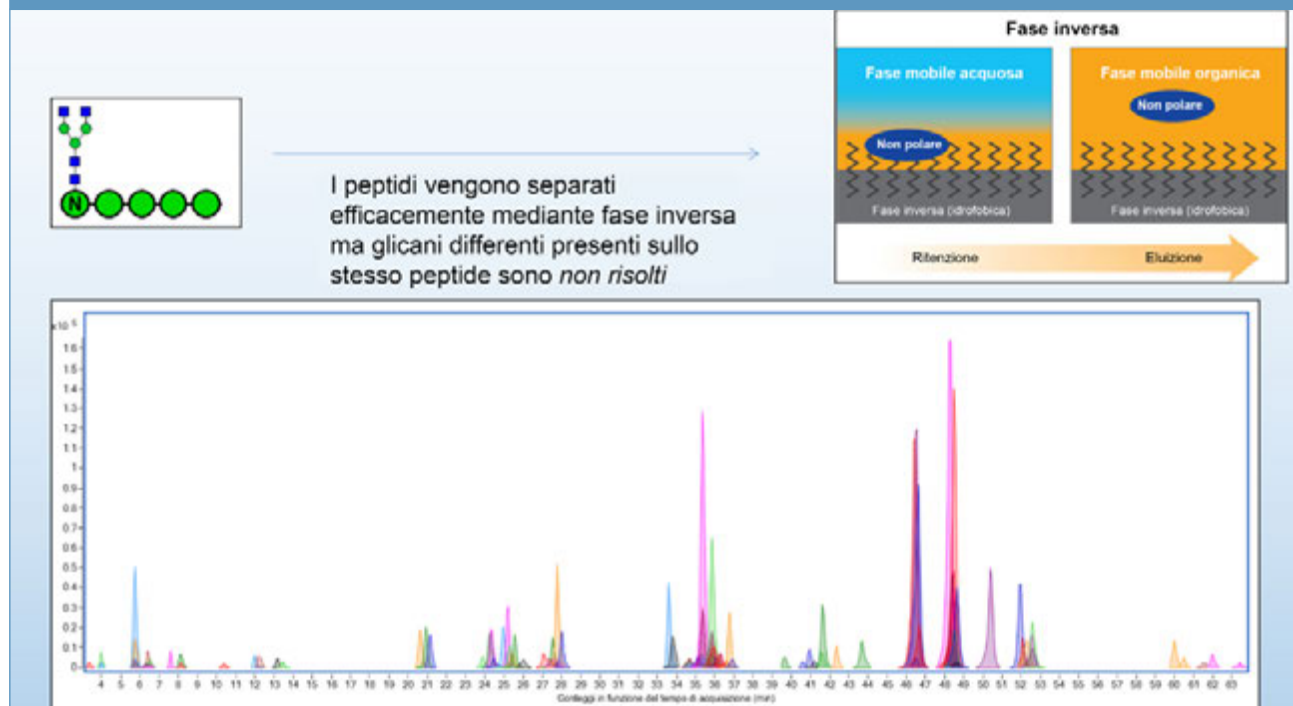
profilo di glicosilazione è complesso e presenta anche variazioni da campione a campione, come si può vedere dal suo spettro di massa intatta (FIGURA 1). Poiché vi sono due siti, in alcuni casi vi sono due possibili strutture per una data massa, pertanto non è possibile determinare quale di queste strutture è corretta, impedendo l'identificazione completa.

La situazione è più complicata per la proteina spike a lunghezza completa. In questo caso ci sono 22 siti di glicosilazione e anche assumendo solo sei glicani per sito, il numero totale di glicoforme possibili sarebbe intorno a 130 miliardi, rendendo impossibile effettuare l'analisi della massa intatta per la proteina spike. Inoltre, una tale analisi non fornirebbe informazioni posizionali.

Un'alternativa sarebbe l'analisi dei glicopeptidi. In questo caso è necessario generare un sito di glicosilazione per ogni peptide e che ogni

IDENTIFICAZIONE, MAPPATURA E QUANTIFICAZIONE RELATIVA DI GLICOPEPTIDI DI SPIKE DA SARS-COV-2  
MEDIANTE L'IDENTIFICAZIONE DELL'IMPRONTA DIGITALE MASSA-TEMPO DI RITENZIONE

FIGURA 2: separazione di glicopeptidi mediante fase inversa.



sito venga mappato in modo definitivo. Non è possibile utilizzare la tripsina da sola in quanto i due siti di glicosilazione all'interno dell'RBD sono privi di siti di clivaggio triptico tra di essi. Inoltre, poiché le masse del precursore sono ignote, non è possibile utilizzare la ricerca di corrispondenze con un database di precursori, pertanto è necessaria la tecnica MS/MS. Vi sono tuttavia alcuni problemi da considerare: la molecola di glicopeptide è un ibrido costituito dall'ossatura del peptide e da una struttura di glicano, ognuna delle quali ha condizioni di frammentazione ottimali differenti. La frammentazione ottimale per il glicano lascia il peptide non frammentato, mentre la frammentazione ottimale per il peptide implica la perdita delle informazioni del glicano.

### Separazione e rivelazione migliorate

Poiché l'uso di più enzimi presenterebbe complicazioni aggiuntive, i ricercatori del Centre for Medicines Discovery della Oxford University ha deciso di utilizzare un unico enzima, l'elastasi,

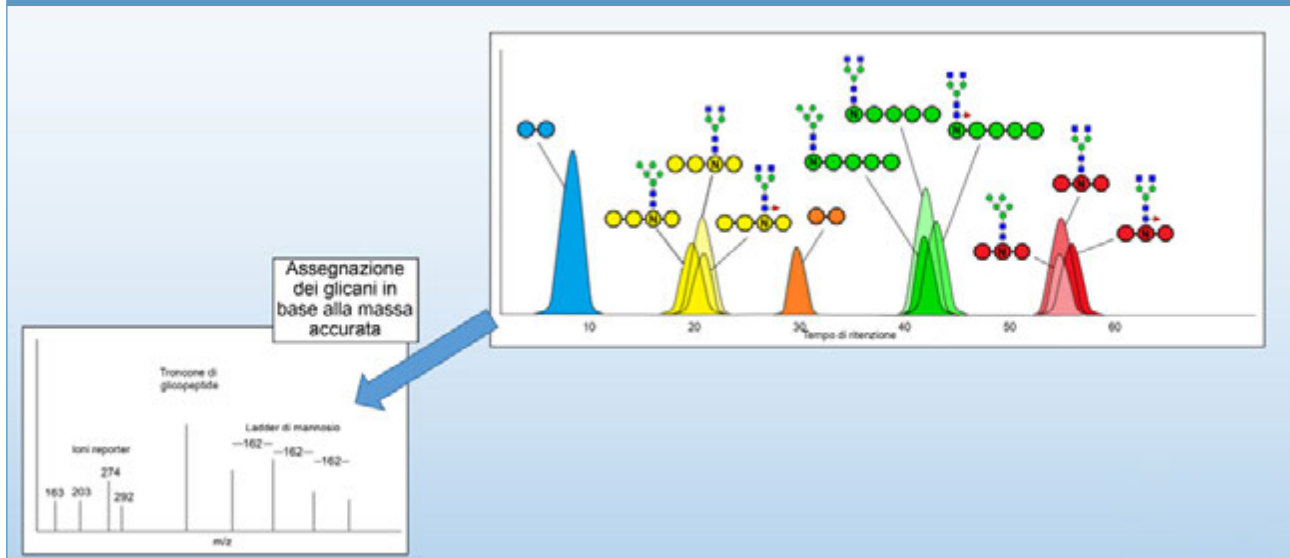
che taglia con maggiore frequenza rispetto alla tripsina e genera peptidi più corti. La cosa più importante è che l'elastasi genera un unico peptide per sito di glicosilazione, il che è essenziale per una mappatura senza ambiguità. Poiché sono prevalentemente polari, i glicani vengono separati in modo soddisfacente usando la cromatografia liquida a interazione idrofila (HILIC), mentre i peptidi, che a confronto sono non polari, si separano meglio mediante HPLC in fase inversa (RP, reverse phase). I peptidi più corti aumentano il segnale del cromatogramma ionico totale (TIC, total ion chromatogram) nel sistema MS e vengono più facilmente risolti mediante HPLC in RP. La separazione mostra un'eccellente risoluzione per i peptidi, ma non riesce a separare singoli glicani che coeluiscono (FIGURA 2) con l'aspetto di più picchi sovrapposti.

Benché ciò possa essere visto come un problema, i ricercatori hanno sfruttato questa caratteristica per sviluppare un nuovo metodo



IDENTIFICAZIONE, MAPPATURA E QUANTIFICAZIONE RELATIVA DI GLICOPEPTIDI DI SPIKE DA SARS-COV-2  
MEDIANTE L'IDENTIFICAZIONE DELL'IMPRONTA DIGITALE MASSA-TEMPO DI RITENZIONE

**FIGURA 5:** un ladder di mannosio è la caratteristica strutturale di un glicano contenente mannosio.



per identificare e mappare questi glicopeptidi. Utilizzando una colonna per la mappatura dei peptidi AdvanceBio peptide mapping di Agilent, il team ha separato i peptidi e ha osservato che gli stessi peptidi portano glicani differenti eluiti allo stesso tempo. Pertanto, i glicani con lo stesso tempo di ritenzione possono essere associati allo stesso peptide. Poiché i glicani provenienti dallo stesso peptide hanno lo stesso tempo di ritenzione e la loro massa esatta è nota, la combinazione fra massa accurata e tempo di ritenzione fornisce un'"impronta digitale" che consente l'identificazione completa dei glicopeptidi.

## Costruire il database

### Flusso di lavoro per la scoperta di glicopeptidi.

Il flusso di lavoro (FIGURA 3) inizia con una digestione mediante elastasi eseguita nell'arco di una notte, che produce una miscela di peptidi e glicoproteine. Successivamente viene effettuata la HPLC a RP, in cui i glicani provenienti dallo stesso peptide coeluiscono e possono essere identificati in base al loro tempo di ritenzione. Il peptide GEVFNAT-, per esempio, ha 27 glicoforme differenti e il cromatogramma

ionico espanso della FIGURA 4 mostra che tutte eluiscono entro una finestra di tempo di ritenzione di quattro minuti. La fase successiva consiste in identificare i glicani usando la massa accurata. Vi sono molte specie nell'analisi LC-MS/MS. I glicopeptidi sono caratterizzati da specifici ioni reporter che rappresentano gli zuccheri liberi, il troncone del peptide come anche un ladder di mannosio (una caratteristica strutturale di un glicano contenente mannosio), come illustrato schematicamente (FIGURA 5). Lo spettro di massa deconvoluto rivela l'intera sequenza dei glicani, con i singoli zuccheri, con un'accuratezza di massa entro 10 ppm.

La seconda fase del flusso di lavoro comporta l'identificazione dei peptidi. Ciò viene effettuato mediante pseudo MS3, una procedura che comporta l'uso di un'alta tensione del frammentatore nello spettrometro per eseguire la frammentazione dei glicopeptidi all'interno della sorgente e la perdita dei glicani. Selezionando il troncone del peptide come il target di massa nel quadrupolo ed eseguendo una dissociazione indotta da collisioni si ottiene la generazione della sequenza di peptidi.



**IDENTIFICAZIONE, MAPPATURA E QUANTIFICAZIONE RELATIVA DI GLICOPEPTIDI DI SPIKE DA SARS-COV-2  
MEDIANTE L'IDENTIFICAZIONE DELL'IMPRONTA DIGITALE MASSA-TEMPO DI RITENZIONE**

Agilent MassHunter Qualitative Analysis versione B.07 e lo strumento Molecular Feature Extraction (estrazione delle caratteristiche molecolari) (FIGURA 6). Un ulteriore vantaggio di questo flusso di lavoro è che non richiede alcuna conoscenza specialistica di analisi dei glicani.

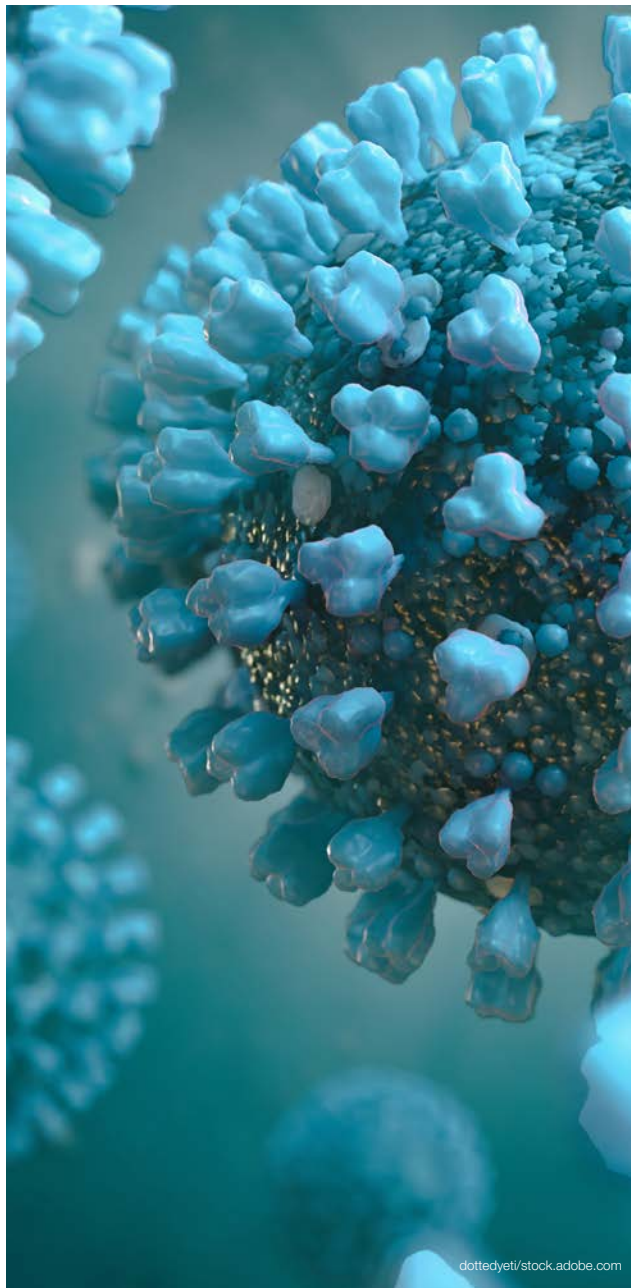
**Conclusioni**

Il database massa-tempo di ritenzione che risulta dall'analisi dettagliata di scoperta di peptidi semplifica notevolmente la mappatura dei glicopeptidi della proteina spike da SARS-CoV-2, eliminando la necessità di una complessa analisi MS/MS. Tale database consente di identificare le strutture dei glicopeptidi utilizzando solamente i loro tempi di ritenzione in LC e le loro masse accurate. Questo semplice flusso di lavoro è trasferibile a un'ampia varietà di strumenti e configurazioni per HPLC-MS. Il metodo dettagliato sarà disponibile in modo gratuito (Chalk, R., Greenland, W. et al., "Identification, Mapping and Relative Quantitation of SARS-CoV-2 Spike Glycopeptides by Mass-Retention Time Fingerprinting", in corso di stampa) e il database è ottenibile online (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 per scopi di ricerca. Non utilizzabile per procedure diagnostiche. I prodotti Agilent NON sono autorizzati per applicazioni di test, diagnosi, trattamento o mitigazione del COVID-19. Agilent non ha validato alcun prodotto per la rivelazione del nuovo coronavirus.*

**Rod Chalk, Ph.D.**

Head of Mass Spectrometry,  
Centre for Medicines Discovery  
Oxford University

dottedyeti/stock.adobe.com