

Vaccinegate:

Relazione tecnica analisi MALDI relativa
al composto insolubile presente nel vaccino
Infanrix Hexa



Relazione tecnica analisi MALDI-TOF relativa al composto insolubile presente nel vaccino Infanrix Hexa

1. Razionale dell'indagine

Il vaccino denominato Infanrix Hexa mostra la presenza di un componente solido insolubile che è stato investigato mediante digestione enzimatica con tripsina seguita da un'analisi liquido-cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa.¹⁻² Detta analisi non ha fornito alcuna attribuzione principalmente a causa di due fattori:

- A. **Elevata insolubilità.** L'analita (la macromolecola) si comporta come un composto di natura lipidica essendo insolubile in solventi ad alta polarità (es: H₂O) ma solubile in solventi a bassa polarità (es: DMSO).
- B. **Resistenza alla digestione enzimatica.** Il composto mostra una notevole resistenza alla digestione enzimatica con tripsina anche dopo aver eseguito numerosi lavaggi volti ad allontanare i sali di alluminio e altri composti ionici che potenzialmente possono inibire la digestione.

Dalle osservazioni sperimentali ottenute si è quindi deciso di investigare la natura del composto mediante l'ausilio della tecnologia MALDI-TOF-MS³ che agisce allo stato solido utilizzando un laser ad azoto, operante ad alta energia (337 nm) per l'analisi del campione.

2. Scopo dello studio

Verificare la natura del composto lipofilo rilevato osservabile all'interno del vaccino Infanrix Hexa mediante l'ausilio della tecnica MALDI-TOF-MS operante allo stato solido

3. Materiali e metodi

M.1 - S.O.P. - MALDI-TOF-MS

Sono state analizzate due formulazioni del vaccino:

- A. Formulazione tal quale non diluita;
- B. Formulazione diluita (1:50 utilizzando H₂O bidistillata) per ridurre l'effetto di soppressione ionica causato da adiuvanti e sostanze saline.

M.2 - S.O.P. - MALDI-TOF-MS

Il campione è stato centrifugato e la frazione solida è stata collezionata dopo aver allontanato il surnatante. Il precipitato è stato lavato con vari solventi a varia polarità (H₂O, CH₃OH, CH₃CN, Isopropanolo) allo scopo di allontanare eventuali sali o contaminanti che possano interferire con la reazione di ionizzazione all'interno della sorgente MALDI. Il precipitato residuo è stato solubilizzato, completamente, in DMSO ed analizzato mediante la tecnologia MALDI-TOF-MS.

4. Risultati ottenuti

Il campione solido mostra un'attività anomala in quanto sembra essere in grado di ritenere i composti chimici. Il cristallo che si forma durante l'analisi MALDI (Figura 1) sembra infatti assorbire completamente l'additivo (matrice) che si utilizza per rendere il composto visibile durante l'analisi (mezzo fotoassorbente alla luce laser: acido sinapico). Il composto è ritenuto all'interno di una struttura cristallografica altamente resistente che non viene scalfita nemmeno dalla luce del laser operante a 337 nm di lunghezza d'onda. Ciò è mostrato dall'assenza di segnale sia della matrice

¹ Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11:49-79. doi: 10.1146/annurev-bioeng-061008-124934.

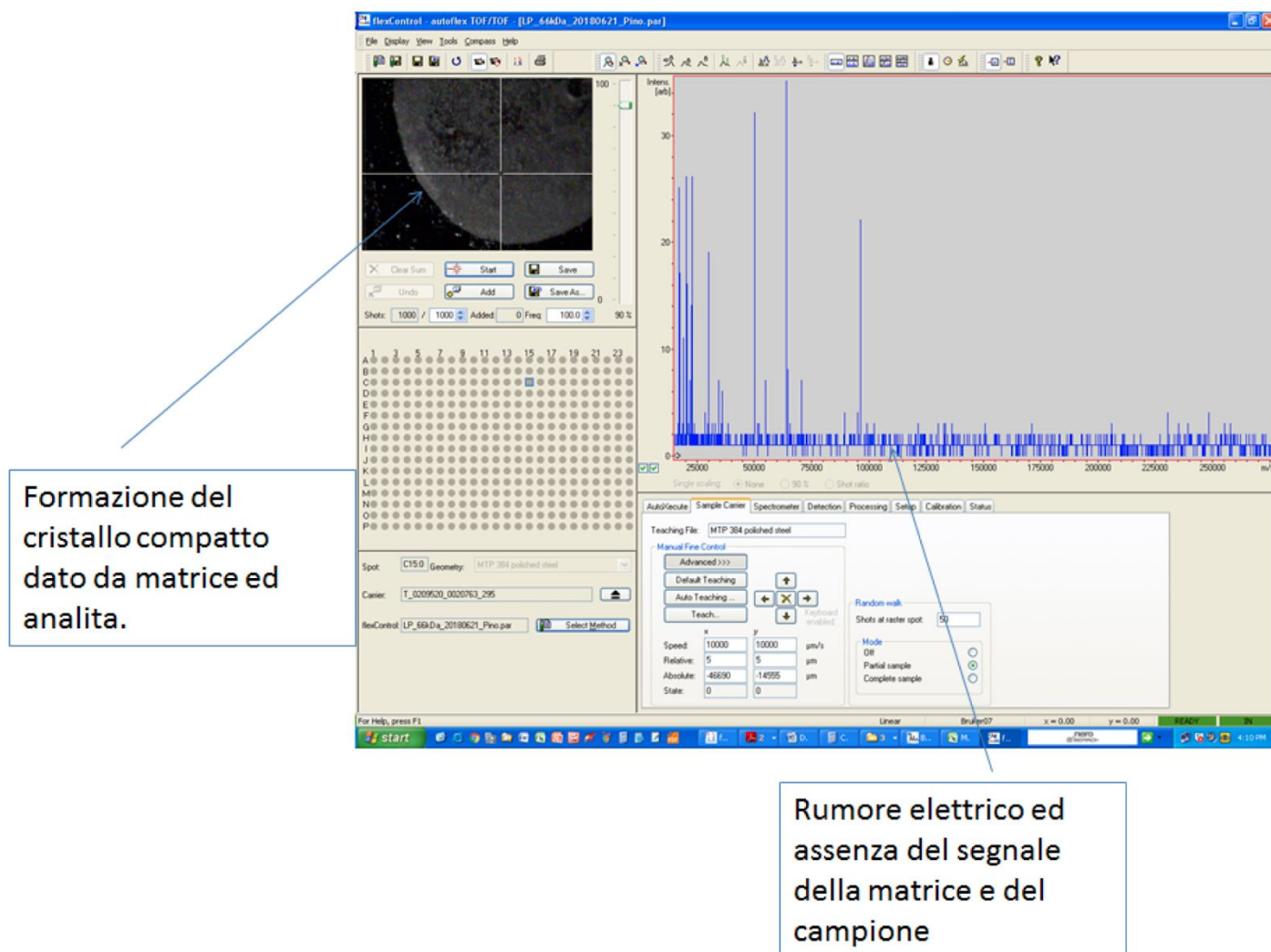
² Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, Tziotis D, Lehmann R, Schmitt-Kopplin P. Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J Chromatogr A.* 2013 May 31;1292:51-65. doi: 10.1016/j.chroma.2013.04.017.

³ Cristoni S, Bernardi LR. Development of new methodologies for the mass spectrometry study of bioorganic macromolecules. *Mass Spectrom Rev.* 2003 Nov-Dec;22(6):369-406.



all'interno dello spettro di massa MALDI (Figura 1) che mostra solo segnali dovuti a rumore chimico strumentale.

Figura 1



5. Conclusioni

Dalle analisi eseguite non è stato possibile identificare il composto ma rilevare alcune proprietà chimico-fisiche su cui porre attenzione:

- A. Insolubilità del composto in mezzi polari;
- B. Potenziale capacità del composto di aggregare e sequestrare analiti di natura organica;
- C. Composto non volatile anche se irraggiato con la luce laser del MALDI.

Le caratteristiche su menzionate sono tipiche di diversi composti tra cui:

- A. Resine funzionalizzate (utilizzate ad esempio nella variante della tecnologia MALDI denominata SELDI, proprio per la loro proprietà di non vaporizzare sotto l'emissione della luce laser);⁴
- B. Composti macromolecolari a conformazione alterata, aggregata e ritentiva (insolubili con elevata resistenza alla digestione es: prioni);⁵⁻⁶

⁴ Zhu Y, Valdes R Jr, Jortani SA. Application of bioaffinity mass spectrometry for analysis of ligands. *Ther Drug Monit.* 2005 Dec;27(6):694-9.

⁵ Sajani G, Pastrana MA, Dynin I, Onisko B, Requena JR. Scrapie prion protein structural constraints obtained by limited proteolysis and mass spectrometry. *J Mol Biol.* 2008 Sep 26;382(1):88-98. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.070.

⁶ Vázquez-Fernández E, Young HS, Requena JR, Wille H. The Structure of Mammalian Prions and Their Aggregates. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;329:277-301. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.08.013.

