

Analyse des Verhältnisses von gefüllten zu leeren Kapsiden in Adeno-assoziierten Viren der Serotypen 1 und 6 mit biokompatibler Flüssigkeitschromatographie

Ausgezeichnete Linearität und Reproduzierbarkeit
mittels Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System mit
Agilent Bio SAX-Säulen mit starkem Anionenaustauscher

Autor

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Die Ionenaustauschchromatographie ist sowohl für die Aufreinigung von Adeno-assoziierten Viren (AAV) als auch für die Analyse ihrer Qualitätsmerkmale ein unentbehrliches Werkzeug. Diese Studie zeigt, wie das Verhältnis von gefüllten zu leeren Kapsiden in AAV-1- und AAV-6-Proben mittels Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System, ausgestattet mit Agilent Bio SAX-Säulen mit starkem Anionenaustauscher, ermittelt wird. Die Methode zeigt eine ausgezeichnete Linearität und Reproduzierbarkeit und etabliert das 1290 Infinity II Bio LC-System als fortschrittliches Flüssigkeitschromatographiesystem mit branchenführender Leistung.

Einleitung

Während der Produktion rekombinanter AAV enthält ein signifikanter Anteil der Viruskapside keine genetische Nutzlast und diese werden entsprechend als „leere“ Kapside bezeichnet.¹ Leere Kapside senken nachweislich die Wirksamkeit der Gentransduktion von AAV-Präparaten², weshalb sie von den Regulierungsbehörden als prozessbedingte Verunreinigung angesehen werden, die charakterisiert werden muss.³

In dieser Studie wurde das Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System mit Agilent Bio SAX-Säule verwendet, um das Verhältnis von gefüllten zu leeren Kapsiden in AAV-1- und AAV-6-Proben zu bestimmen. Das 1290 Infinity II Bio LC-System verfügt über einen biokompatiblen Flussweg. In Kombination mit den Agilent Bio SAX PEEK-Säulen mit starkem Anionenaustauscher und nicht porösen Poly(Styrol-Divinylbenzol)(PS-DVB)-Partikeln gewährleistet das LC-System die Integrität der Biomoleküle, indem unerwünschte Oberflächeninteraktionen minimiert werden. Das System ist somit ideal für Applikationen mit großen Molekülen geeignet.

Experimentelles

AAV-Referenzstandards wurden von Vigene BioSciences als mit gefüllten und leeren Kapsiden angereicherte Proben bezogen. Alle Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen, sofern nicht anders angegeben.

Geräte

In dieser Studie wurden zwei Konfigurationen des 1290 Infinity II Bio LC-Systems verwendet (Abbildung 1). Das LC-System war entweder mit einer quaternären flexiblen Pumpe oder einer binären Hochgeschwindigkeitspumpe ausgestattet. Die flexible Pumpe kann vier Lösemittelstränge gleichzeitig bedienen, wodurch die Anzahl der verschiedenen mobilen Phasen, die im Laufe der Methodenentwicklung vorbereitet werden müssen, reduziert wird. Die Hochgeschwindigkeitspumpe bietet eine hocheffiziente Mischleistung bei dem niedrigsten möglichen Totvolumen sowie eine hervorragende

Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit. Beide Konfigurationen sind beständig gegen Korrosion durch hohe Salzkonzentrationen und können einem hohen Rückdruck von bis zu 1300 bar standhalten. Ein Agilent 1260 Infinity II Fluoreszenzdetektor wurde eingesetzt, um die hohe Empfindlichkeit zu erreichen, die für die Analyse der relativ verdünnten AAV-Proben erforderlich ist.



Abbildung 1: Agilent 1290 Infinity II Bio LC.

Chromatographie

Eine Agilent Bio Sax NP5-Säule aus PEEK (2,1 x 50 mm, 5 µm, Bestellnummer 5190-2472) wurde zum Trennen der gefüllten und leeren AAV-Kapside verwendet. Die Salzgradientenelution wurde unter Verwendung der in den Tabellen 1 bis 3 angegebenen mobile Phase und Gradientenbedingungen durchgeführt.

Für die Methode mit flexibler Pumpe wurde die Software Agilent Buffer Advisor verwendet, um während der Analyse zu bestimmen, welcher Prozentsatz je Komponente der mobilen Phase erforderlich ist, um 70 mM *Bis-Tris*-Propan, pH 9,0, zu erhalten. Die AAV-1- und AAV-6-Standards wurden vor der Analyse mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, verdünnt, entweder einzeln als Proben mit leeren oder gefüllten Kapsiden oder als Mischungen. Die Datenerfassung und -analyse wurde von der Agilent OpenLab CDS-Software unter Verwendung der in Tabelle 4 gezeigten Integrationseinstellungen gesteuert.

Tabelle 1: Zusammensetzung der mobilen Phasen.

	Flexible Pumpe	Hochgeschwindigkeitspumpe
Pumpentyp	Quaternär	Binär
Zusammensetzung der mobilen Phase	A: Deionisiertes Wasser B: 1 M Tetramethylammoniumchlorid C: 0,3 M HCl D: 0,2 M <i>Bis-Tris</i> -Propan A bis D enthalten 2 mM MgCl ₂	A: 70 mM <i>Bis-Tris</i> -Propan, pH 9,0 B: 70 mM <i>Bis-Tris</i> -Propan + 1 M Tetramethylammoniumchlorid, pH 9,0 A und B enthalten 2 mM MgCl ₂

Tabelle 2: Gradientenbedingungen der flexiblen Pumpe.

Zeit	% A	% B	% C	% D	Flussrate (ml/min)
0	36,2	15	13,8	35	0,1
40	15,8	35	14,2	35	0,1
40,1	0,6	50	14,4	35	0,3
43	0,6	50	14,4	35	0,3

Tabelle 3: Gradientenbedingungen der Hochgeschwindigkeitspumpe.

Zeit	% A	% B	Flussrate (ml/min)
0	85	15	0,1
25	72,5	27,5	0,1
25,1	0	100	0,3
28	0	100	0,3

Tabelle 4: Integrationseinstellungen für die Software Agilent OpenLab CDS 2.3.

Parameter	Wert
Steigungsempfindlichkeit	0,02
Peakbreite	2
Minimale Fläche	0,05
Minimale Höhe	0,05
Schultermodus	Tangential
Tangent Skim Modus	Gerade
Höhenverhältnis Tail-Peak/Skim	0,05
Höhenverhältnis Front-Peak/Skim	0,05
Skim-Tal-Verhältnis	20
Basislinienkorrektur-Modus	Klassisch
Peak-Tal-Verhältnis	500
Blindproben-Subtraktion	Ja

Ergebnisse und Diskussion

Der Relative Response Factor von AAV-1 und AAV-6 wurde zuerst durch Injektion einer identischen Anzahl von Kapsiden entweder aus den Proben mit leeren oder gefüllten Kapsiden geschätzt. Die gefüllten Kapside waren heller als die leeren Kapside mit einem Response-Verhältnis von etwa 1,2 relativ zu den leeren Kapsiden für beide Serotypen. Dieser Wert stimmt mit dem veröffentlichten Response-Verhältnis von 1,3 für AAV-6,2 überein.⁴

Wie in Abbildung 2 gezeigt, wurden mit der flexiblen Pumpe die gefüllten und leeren Kapside in den gemischten Proben mit akzeptablen Auflösungen ($R = 1,1$ für AAV-1 und $R = 1,3$ für AAV-6) getrennt. Die Probenwiederfindung korrelierte negativ mit der Flussrate (Daten nicht abgebildet), was mit den in der Literatur berichteten Beobachtungen übereinstimmt.⁵ Daher wurde die Flussrate für diese Methode während des analytischen Gradienten bei einem niedrigen Wert von 0,1 ml/min gehalten.

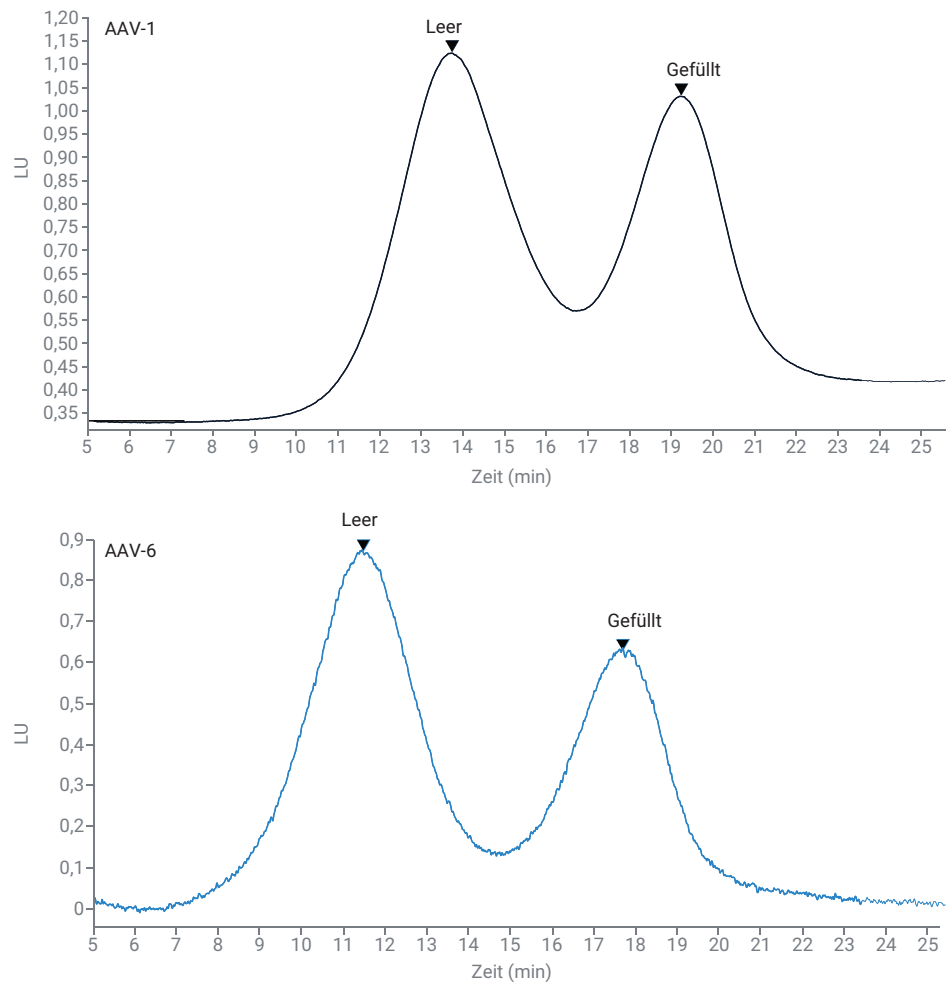


Abbildung 2: Trennung von Mischungen gefüllter und leerer Kapside mit der quaternären flexiblen Pumpe von Agilent.

Die Methode wurde auf ein 1290 Infinity II Bio LC-System mit einer binären Hochgeschwindigkeitspumpe übertragen. Abmischungen von gefüllten und leeren Kapsiden in unterschiedlichen Verhältnissen wurden über drei Tage wiederholt injiziert, um die Genauigkeit, Linearität und Reproduzierbarkeit des Assays zu beurteilen. Wie in den überlagerten Chromatogrammen in Abbildung 3 zu sehen ist, waren die Retentionszeiten und Peakformen der Peaks für gefüllte und leere Kapside über einen breiten Bereich von Kapsidverhältnissen reproduzierbar.

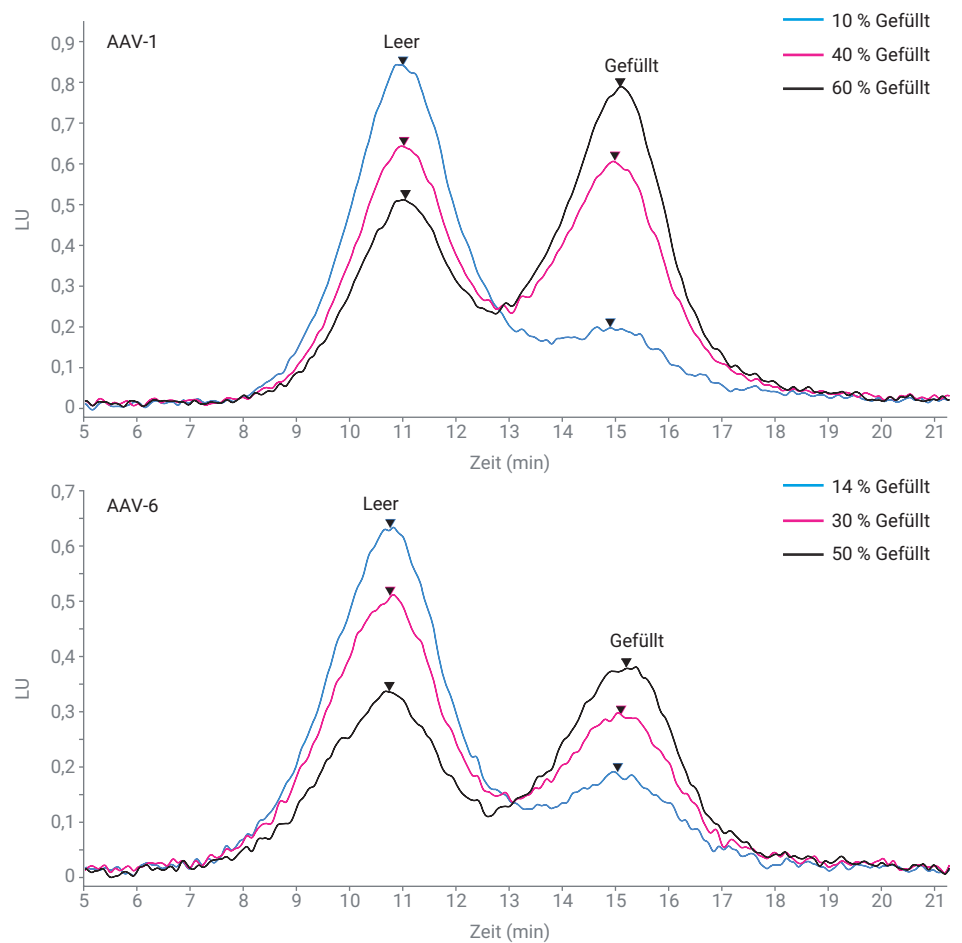


Abbildung 3: Trennung von AAV-1- und AAV-6-Proben mit unterschiedlichen Verhältnissen von gefüllten zu leeren Kapsiden mit der binären Hochgeschwindigkeitspumpe von Agilent.

Wie zuvor gezeigt wurde⁶, lieferten die relativen Peakhöhen im Vergleich zu den relativen Peakflächen genauere und robustere Schätzungen des Verhältnisses von gefüllten zu leeren Kapsiden. Das liegt daran, dass die Peaks

ein gewisses Maß an Tailing aufwiesen, also nicht vollständig aufgelöst wurden. In Abbildung 4 sind die Unterschiede der Linearität und Genauigkeit sowohl für AAV-1 als auch für AAV-6 unter Verwendung der relativen Peakhöhen

oder relativen Peakflächen als Schätzer dargestellt. Die linearen Trendlinien für die relativen Peakhöhen lagen näher am Ursprung und hatten höhere R²-Werte.

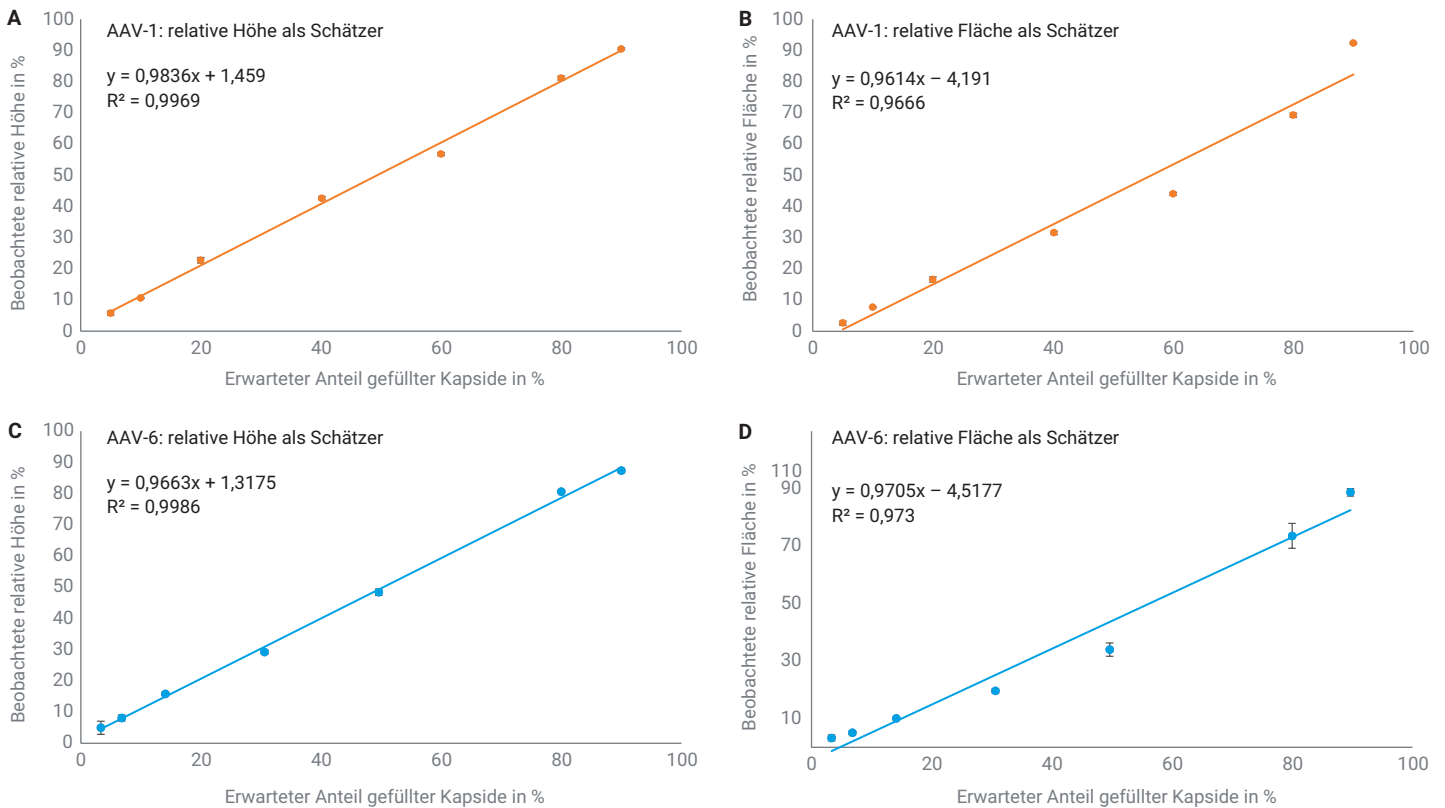


Abbildung 4: Vergleich der relativen Peakhöhen und der relativen Peakflächen als Schätzer des Verhältnisses von gefüllten zu leeren Kapsiden. Die relative Peakhöhe (A und C) bietet eine überlegene Genauigkeit und Linearität im Vergleich zur relativen Peakfläche (B und D).

Abbildung 5 zeigt die Reproduzierbarkeit der Methode von Tag zu Tag. Die relativen Standardabweichungen (RSD) des Verhältnisses von gefüllten zu leeren Kapsiden lagen für AAV-1 bei $\leq 10,1\%$ und für AAV-6 bei $\leq 11,2\%$ für Proben, die einen Anteil gefüllter Kapside von ~ 5 bis 90% enthielten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Methode einen breiten linearen Bereich aufweist. Die

untere Quantifizierungsgrenze für beide Serotypen lag bei einem Anteil von gefüllten Kapsiden von $\leq 5\%$, wobei eine RSD von unter 15% als akzeptabel angenommen wurde. Die Retentionszeiten der Peaks sowohl für gefüllte als auch für leere Kapside waren ebenfalls hochgradig reproduzierbar, wobei die RSD für beide Serotypen für alle getesteten Proben $\leq 2,4\%$ betrug.

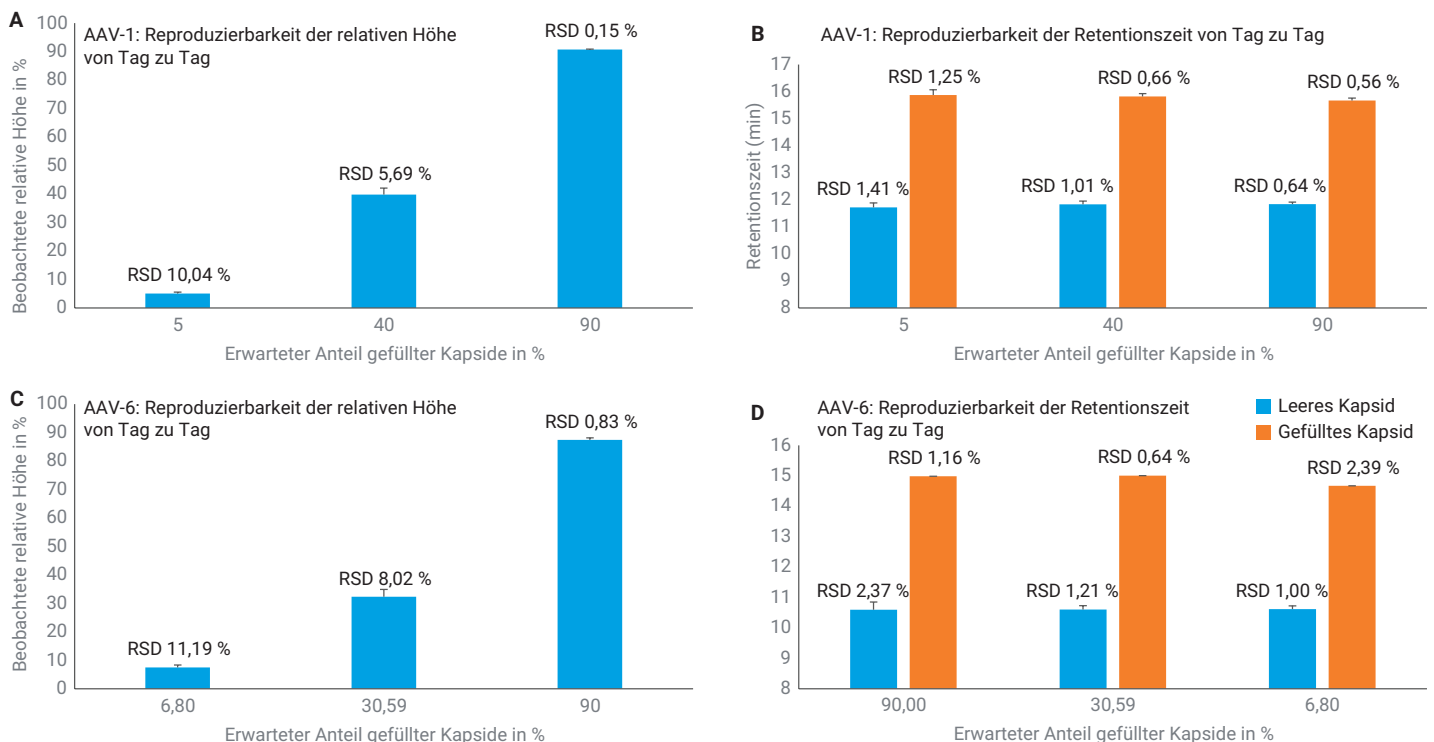


Abbildung 5: Reproduzierbarkeit der relativen Höhe als Schätzer und der Peak-Retentionszeiten von Tag zu Tag.

Schlussfolgerung

Diese Studie zeigt, dass mit dem Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System, ausgestattet mit Agilent Bio SAX-Säulen mit starkem Anionenaustauscher, das Verhältnis von gefüllten zu leeren Kapsiden in AAV-1- und AAV-6-Serotypproben genau und reproduzierbar gemessen werden kann.

Literatur

1. Clark, K. R. *et al.* Highly Purified Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors are Biologically Active and Free of Detectable Helper and Wild-Type Viruses. *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 1031–1039.
2. Gao, K. *et al.* Empty Virions in AAV8 Vector Preparations Reduce Transduction Efficiency and May Cause Total Viral Particle-Dose-Limiting Side Effects. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **2014**, *1*, 9.
3. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) - Guidance for Industry. *US Food and Drug Administration* **2020**.
4. Wang, C. *et al.* Developing an Anion Exchange Chromatography Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **2019**, *15*, 257–263.
5. Trilisky, E. I.; Lenhoff, A. M. Flow-Dependent Entrapment of Large Bioparticles in Porous Process Media. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104*, 127–133.
6. McCoy, R. W. *et al.* Results of a Cooperative Study Comparing the Precision of Peak Height and Area Measurements in Liquid Chromatography*. *J. Chromatogr. Sci.* **1984**, *22*, 425–431.

www.agilent.com

Änderungen vorbehalten.

DE10415602

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Gedruckt in den USA, 16. Februar 2022
5994-4589DEE