

Análisis de las relaciones de cápsides llenas/vacías en los serotipos 1 y 6 de dependoparvovirus mediante cromatografía de líquidos biocompatible

Linealidad y reproducibilidad excelentes gracias al uso del sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II equipado con columnas de intercambio aniónico fuerte Agilent Bio SAX

Autor

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

La cromatografía de intercambio iónico es una herramienta muy valiosa tanto para la purificación de dependoparvovirus (AAV) como para el análisis de sus atributos de calidad. En este estudio se aborda la determinación de la relación de cápsides llenas/vacías en muestras de AAV-1 y AAV-6 mediante el sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II equipado con columnas de intercambio aniónico fuerte Agilent Bio SAX. El método ofreció una linealidad y una reproducibilidad excelentes, lo que confirma al instrumento de LC Bio 1290 Infinity II como un sistema avanzado de cromatografía de líquidos con un rendimiento que lo convierte en líder dentro del sector.

Introducción

Durante la producción de AAV recombinantes, existe una proporción importante de cápsides virales sin carga genética que, por este motivo, se denominan cápsides "vacías"¹. Se ha demostrado que las cápsides vacías reducen la eficacia de la transducción de genes de las preparaciones de AAV²; por lo tanto, las autoridades reguladoras las consideran impurezas relacionadas con el proceso y es necesario caracterizarlas³.

Es este estudio se utilizó el sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II equipado con una columna Agilent Bio SAX para determinar la relación de cápsides llenas/vacías en muestras purificadas de AAV-1 y AAV-6. El sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II proporciona una ruta de flujo biocompatible. Al combinarlo con las columnas de PEEK de intercambio aniónico fuerte Agilent Bio SAX con partículas no porosas de copolímero de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB), el sistema de LC garantiza la integridad de las biomoléculas al minimizar las interacciones superficiales indeseadas, lo que hace que resulte idóneo para aplicaciones con moléculas grandes.

Experimento

Se adquirieron patrones de referencia de AAV a Vigene Biosciences, que se utilizaron como muestras enriquecidas en cápsides llenas y vacías. Todos los productos químicos se adquirieron a Sigma-Aldrich, salvo que se indique lo contrario.

Instrumentos

En este estudio se utilizaron dos configuraciones del sistema de LC Bio 1290 Infinity II (Figura 1). El sistema de LC se equipó con una bomba cuaternaria flexible o una bomba binaria de alta velocidad. La bomba flexible admite cuatro líneas de disolvente a la vez, lo que reduce el número de fases móviles diferentes que es necesario preparar durante el desarrollo de métodos. La bomba de alta velocidad combina una eficiencia máxima de mezcla con un volumen mínimo de

retardo, y ofrece unos niveles excelentes de sensibilidad y reproducibilidad. Ambas configuraciones son resistentes a la corrosión por elevadas concentraciones salinas y pueden soportar retropresiones elevadas de hasta 1.300 bar. Se empleó un detector de fluorescencia Agilent 1260 Infinity II en línea para conseguir la alta sensibilidad necesaria para el análisis de muestras de AAV relativamente diluidas.



Figura 1. Sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II.

Tabla 1. Composición de las fases móviles.

	Bomba flexible	Bomba de alta velocidad
Tipo de bomba	Cuaternaria	Binaria
Composición de la fase móvil	A: Agua desionizada B: Cloruro de tetrametilamonio 1 M C: HCl 0,3 M D: Bis-tris propano 0,2 M A, B, C y D contienen MgCl ₂ 2 mM	A: Bis-tris propano 70 mM (pH 9,0) B: Bis-tris propano 70 mM + cloruro de tetrametilamonio 1 M (pH 9,0) A y B contienen MgCl ₂ 2 mM

Tabla 2. Condiciones del gradiente de la bomba flexible.

Tiempo	% A	% B	% C	% D	Flujo (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

Tabla 3. Condiciones del gradiente de la bomba de alta velocidad.

Tiempo	% A	% B	Flujo (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

Cromatografía

Se utilizó una columna Agilent Bio SAX NP5 con hardware de PEEK (2,1 × 50 mm, 5 µm, referencia 5190-2472) para separar las cápsides de AAV llenas y vacías. La elución con un gradiente salino se realizó usando la fase móvil y las condiciones del gradiente que se muestran en las Tablas 1-3.

Para el método con la bomba flexible, se usó el software Agilent Buffer Advisor para determinar los porcentajes de cada componente de la fase móvil necesarios para obtener una solución de bis-tris propano 70 mM (pH 9,0) durante el análisis. Los patrones de AAV-1 y AAV-6 se diluyeron en una solución de tris-HCl 50 mM (pH 7,4) antes del análisis, tanto individualmente (a modo de muestras enriquecidas en cápsides llenas y vacías) como en mezclas. La adquisición y el análisis de los datos se controlaron mediante el software Agilent OpenLab CDS, utilizando los ajustes de integración especificados en la tabla 4.

Tabla 4. Ajustes de integración del software Agilent OpenLab CDS 2.3.

Parámetro	Valor
Sensibilidad de pendiente	0,02
Anchura de pico	2
Rechazo por área	0,05
Rechazo por altura	0,05
Modo de hombros	Tangencial
Modo de división tangencial	Recto
Relación pico trasero/altura de división	0,05
Relación pico delantero/altura de división	0,05
Relación del valle de división	20
Modo de corrección de la línea de base	Clásico
Relación pico/valle	500
Sustracción del blanco	Sí

Resultados y comentarios

La estimación inicial de los factores relativos de respuesta del AAV-1 y AAV-6 se realizó inyectando cantidades idénticas de cápsides de muestras enriquecidas en cápsides llenas o vacías. Se observó que las cápsides llenas eran más brillantes que las cápsides vacías, con una relación de respuesta aparente respecto a las cápsides vacías de alrededor de 1,2 para ambos serotipos. Este valor concuerda con la relación de respuesta publicada de 1,3 para el AAV-6.²⁴

Tal como se aprecia en la Figura 2, se consiguió separar las cápsides llenas y vacías en las muestras de las mezclas con resoluciones aceptables ($R = 1,1$ para el AAV-1 y $R = 1,3$ para el AAV-6) usando la bomba flexible. Se observó que la recuperación de muestras presentaba una correlación negativa (no se muestran los datos), lo que concuerda con las observaciones recogidas en las publicaciones⁵. Por lo tanto, se mantuvo un valor bajo de flujo para este método (0,1 ml/min) durante el gradiente analítico.

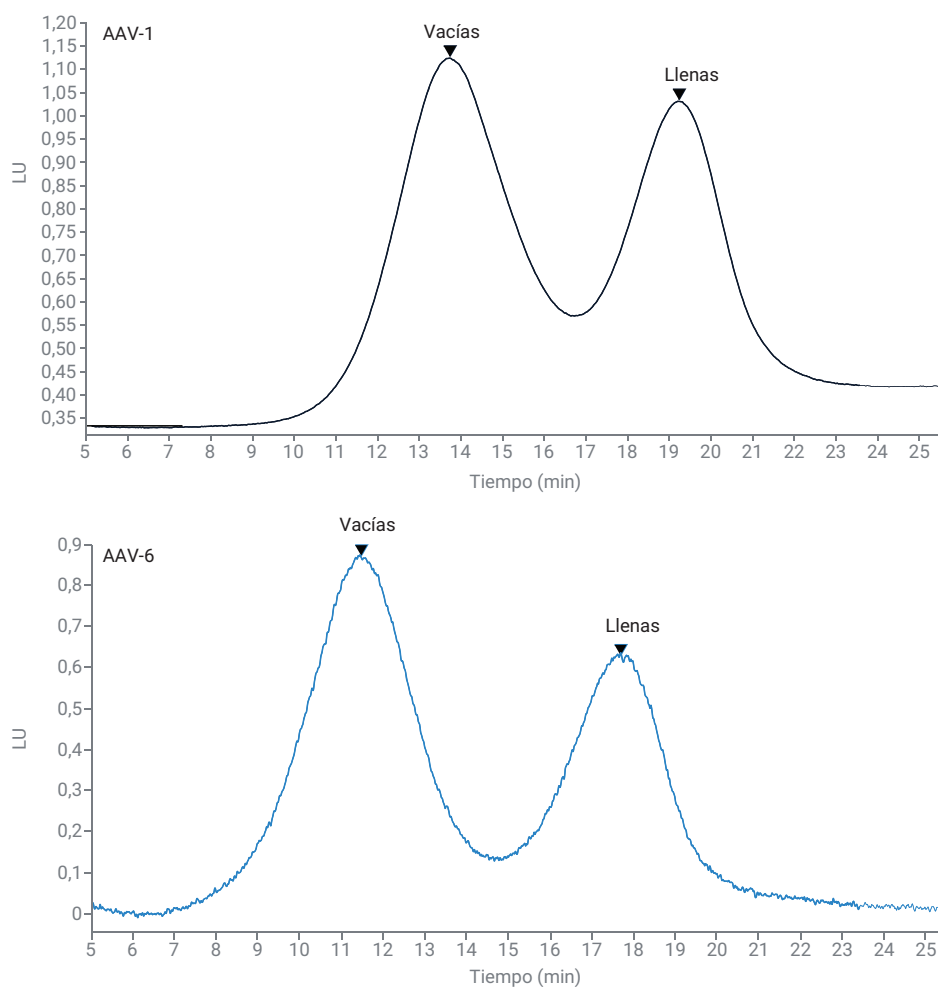


Figura 2. Separación de mezclas de cápsides llenas y vacías usando la bomba cuaternaria flexible de Agilent.

El método se transfirió a un sistema de LC Bio 1290 Infinity II equipado con una bomba binaria de alta velocidad. Se inyectaron repetidamente mezclas con cápsides llenas y vacías en diferentes proporciones a lo largo de tres días para evaluar la exactitud, la linealidad y la reproducibilidad del ensayo. Tal como se observa en los cromatogramas superpuestos de la Figura 3, los tiempos de retención y las formas de los picos de las cápsides llenas y vacías fueron reproducibles para un amplio intervalo de relaciones de cápsides.

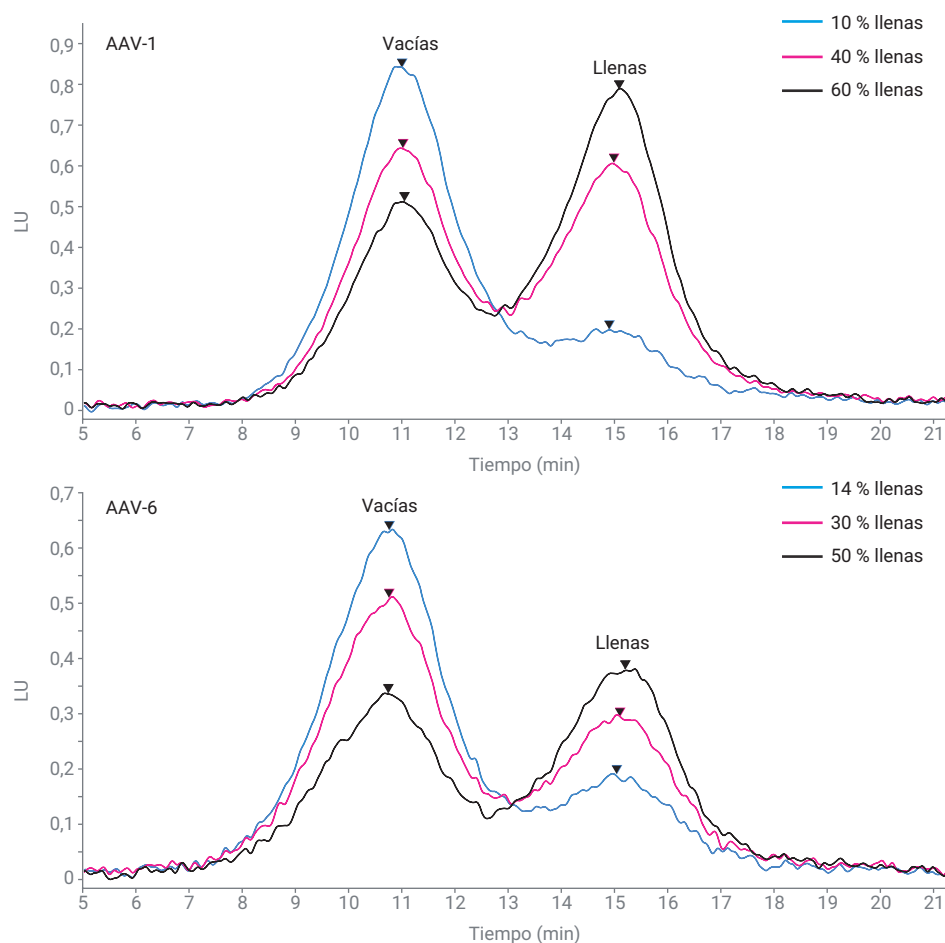


Figura 3. Separación de muestras de AAV-1 y AAV-6 con diferentes relaciones de cápsides llenas/vacías usando la bomba binaria de alta velocidad de Agilent.

Tal como se había demostrado previamente⁶, se constató que las alturas de pico relativas proporcionan estimaciones más exactas y robustas de la relación de cápsides llenas/vacías en comparación con las áreas de pico

relativas. Esta observación se debe a que los picos presentaron una cierta formación de colas y no se resolvieron por completo. La Figura 4 ilustra las diferencias de linealidad y exactitud entre el AAV-1 y el AAV-6, utilizando para

ello las alturas o áreas de pico relativas como estimadores. Las líneas de tendencia de las alturas de pico relativas estuvieron próximas al origen y tuvieron valores de R^2 más elevados.

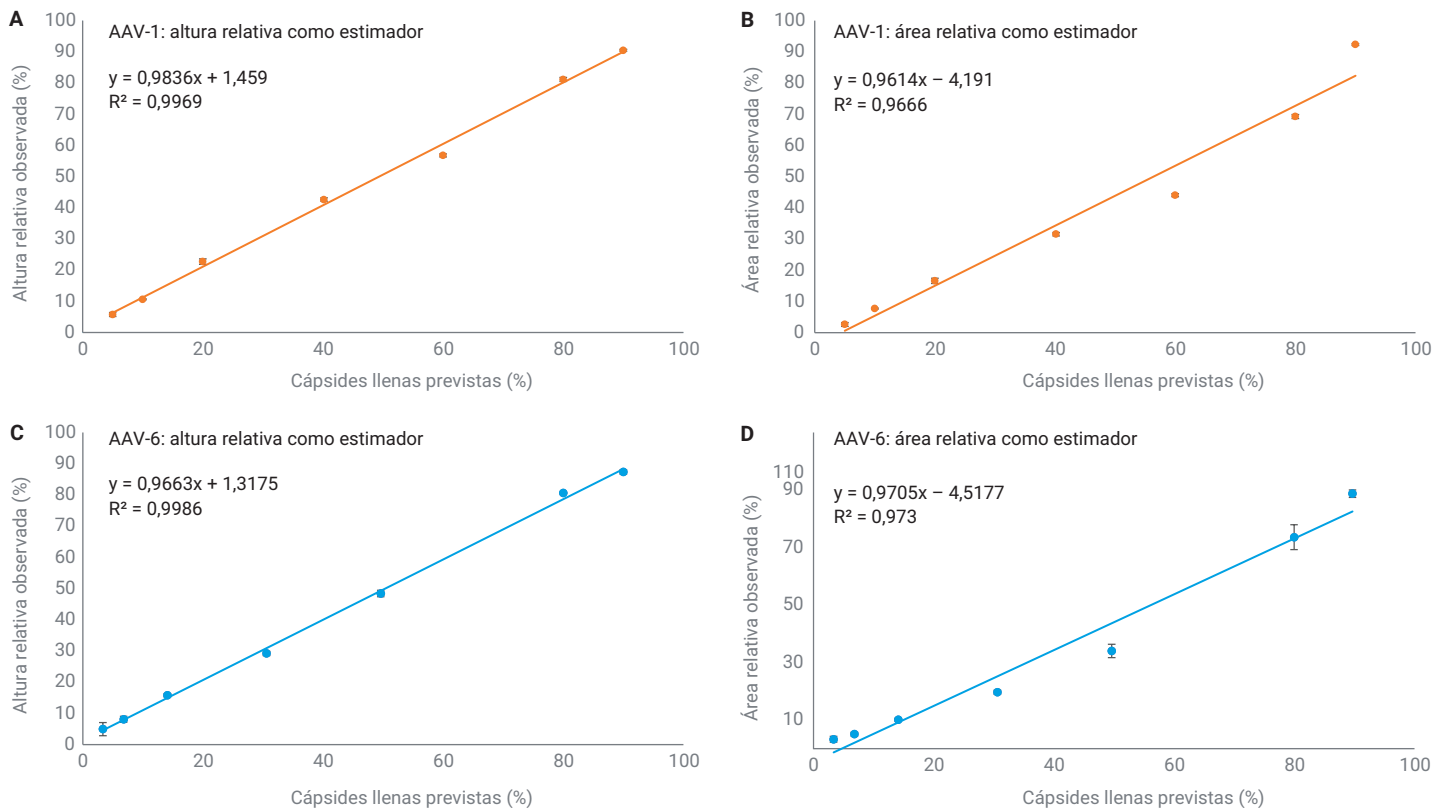


Figura 4. Comparación de las alturas y las áreas de pico relativas como estimadores de la relación de cápsides llenas/vacías. La altura de pico relativa (A y C) proporciona una exactitud y una linealidad mayores en comparación con el área de pico relativa (B y D).

La Figura 5 muestra la reproducibilidad interdiaria del método. Las desviaciones estándar relativas (RSD) de las relaciones de cápsides llenas/vacías fueron $\leq 10,1\%$ para el AAV-1 y $\leq 11,2\%$ para el AAV-6; esos valores se obtuvieron con muestras que contenían, aproximadamente, entre un 5 y un 90 % de cápsides llenas. Los resultados demuestran que el intervalo lineal del

método es amplio. El límite inferior de cuantificación para ambos serotipos fue $\leq 5\%$ de cápsides llenas, asumiendo un valor aceptable de RSD inferior al 15 %. La reproducibilidad de los tiempos de retención de los picos de las cápsides llenas y vacías también fue muy alta, con valores de RSD $\leq 2,4\%$ para ambos serotipos para todas las muestras analizadas.

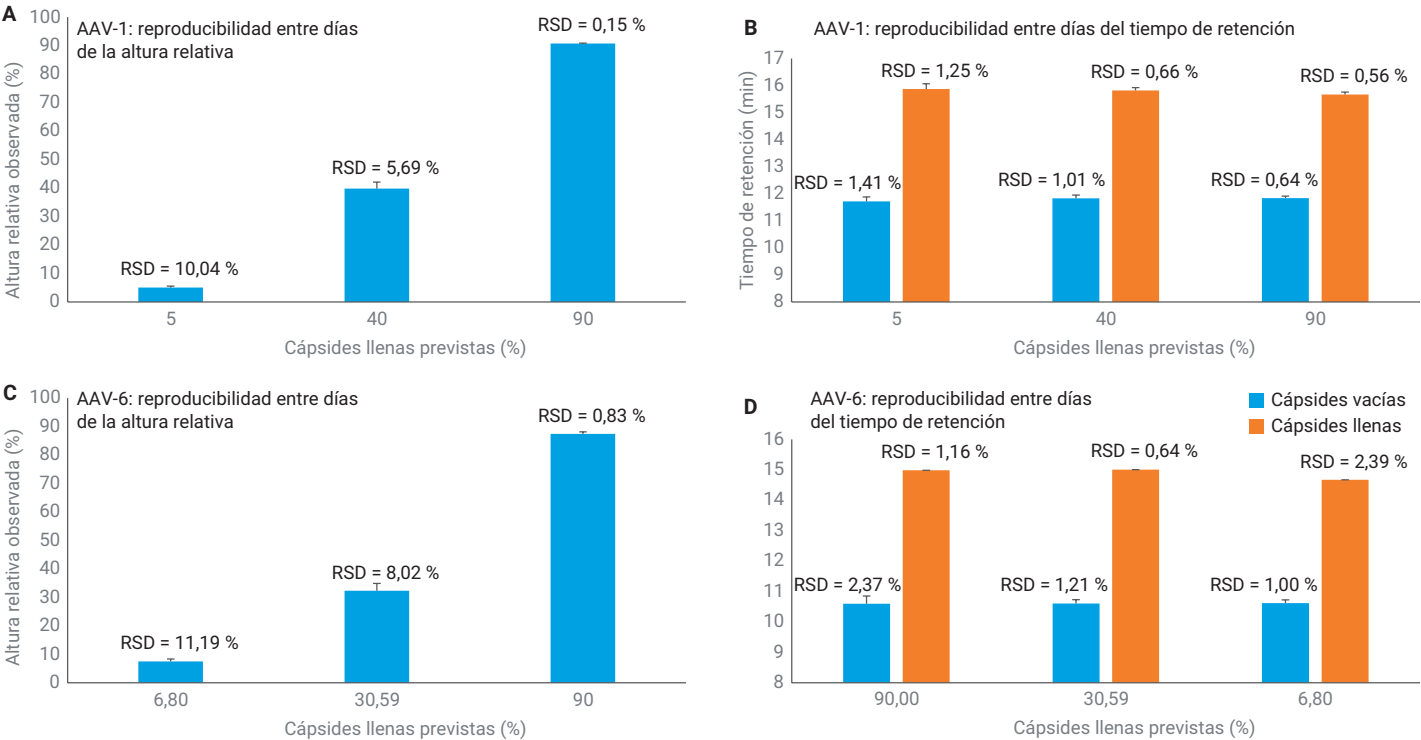


Figura 5. Reproducibilidad interdiaria de la altura relativa (estimador) y los tiempos de retención de los picos.

Conclusión

Este estudio demuestra que la relación de cápsides llenas/vacías en muestras de AAV-1 y AAV-6 puede medirse de forma exacta y reproducible mediante el sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II equipado con columnas de intercambio aniónico fuerte Agilent Bio SAX.

Referencias

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. *Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU.*, **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

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

DE10415602

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Impreso en EE. UU., 16 de febrero de 2022
5994-4589ES