

Analyse du rapport capsides pleines/capsides vides dans des virus adéno-associés de sérotypes 1 et 6 par chromatographie en phase liquide biocompatible

Linéarité et reproductibilité excellentes sur un système LC Agilent 1290 Infinity II Bio équipé de colonnes échangeuses d'anions forts (SAX) Agilent Bio

Auteur

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

La chromatographie à échange d'ions est un outil précieux pour purifier les virus adéno-associés (AAV) et analyser leurs attributs de qualité. Cette étude traite de la détermination du rapport capsides pleines/capsides vides dans des échantillons d'AAV-1 et d'AAV-6 sur un système LC Agilent 1290 Infinity II Bio équipé de colonnes échangeuses d'anions forts (SAX) Agilent Bio. La méthode a montré une linéarité et une reproductibilité excellentes, faisant du LC 1290 Infinity II Bio un système de chromatographie liquide avancé aux performances à la pointe du marché.

Introduction

Lors de la production d'AAV recombinants, une importante proportion de capsides virales ne contient aucun matériel génétique, on parle alors de capsides « vides ». ¹ Il a été montré que les capsides vides réduisent l'efficacité de la transduction génique des préparations d'AAV ², et sont donc considérées par les organismes réglementaires comme une impureté issue du procédé, qui doit ainsi être caractérisée. ³

Dans cette étude, un système LC Agilent 1290 Infinity II Bio muni d'une colonne SAX Agilent Bio a été utilisé pour déterminer le rapport capsides pleines/capsides vides d'échantillons d'AAV-1 et d'AAV-6. Le LC 1290 Infinity II Bio possède un circuit biocompatible. Associé aux colonnes PEEK échangeuses d'anions forts (SAX) Agilent Bio remplies de poly(styrène divinylbenzène) (PS-DVB) non poreux, le système LC conserve l'intégrité des biomolécules en réduisant au maximum les interactions de surface indésirables, ce qui en fait l'outil idéal pour les applications avec de grosses molécules.

Méthode expérimentale

Des étalons d'AAV de référence ont été achetés auprès de Vigene Biosciences sous forme d'échantillons enrichis en capsides pleines et en capsides vides. Tous les produits chimiques ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich, sauf indication contraire.

Instruments

Deux configurations du LC 1290 Infinity II Bio ont été utilisées dans cette étude (figure 1). Le système LC a été équipé d'une pompe flexible quaternaire ou d'une pompe binaire à haut débit. La pompe flexible peut accueillir quatre lignes de solvant en même temps, ce qui réduit le nombre de phases mobiles à préparer durant le développement de méthodes. La pompe à haut débit assure un mélange à l'efficacité maximale avec un volume mort minimal, offrant d'excellents niveaux de

sensibilité et de reproductibilité. Les deux configurations résistent à la corrosion due aux fortes concentrations en sel et aux contrepressions jusqu'à 1300 bar. Un détecteur à fluorescence Agilent 1260 Infinity II a permis d'atteindre la grande sensibilité nécessaire à l'analyse des échantillons d'AAV relativement dilués.



Figure 1. LC Agilent 1290 Infinity II Bio.

Tableau 1. Composition des phases mobiles.

	Pompe flexible	Pompe à haut débit
Type de pompe	Quaternaire	Binaire
Composition des phases mobiles	A : eau déminéralisée B : chlorure de tétraméthylammonium 1 M C : HCl 0,3 M D : bis-tris propane 0,2 M A à D contiennent du MgCl ₂ 2 mM	A : bis-tris propane 70 mM, pH 9,0 B : bis-tris propane 70 mM + chlorure de tétraméthylammonium 1 M, pH 9,0 A et B contiennent du MgCl ₂ 2 mM

Tableau 2. Conditions de gradient avec la pompe flexible.

Temps	% A	% B	% C	% D	Débit (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

Tableau 3. Conditions de gradient avec la pompe à haut débit.

Temps	% A	% B	Débit (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

Chromatographie

Une colonne SAX NP5 Bio Agilent en PEEK (2,1 × 50 mm, 5 µm, référence 5190-2472) a servi à séparer les capsides d'AAV pleines des vides. Un gradient d'élution de sel a été appliqué selon les conditions de phase mobile et de gradient indiquées dans les tableaux 1 à 3.

Pour la méthode avec la pompe flexible, le logiciel Agilent Buffer Advisor a été utilisé pour déterminer le pourcentage de chaque composant des phases mobiles de façon à obtenir durant l'analyse du bis-tris propane 70 mM à pH 9,0. Les étalons d'AAV-1 et d'AAV-6 ont été dilués dans du Tris-HCl 50 mM à pH 7,4 avant l'analyse, soit individuellement sous forme d'étalons enrichis en capsides pleines ou vides, sous forme de mélanges. L'acquisition et l'analyse des données ont été contrôlées par le logiciel OpenLab CDS Agilent avec les paramètres d'intégration présentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Paramètres d'intégration du logiciel OpenLab CDS Agilent version 2.3.

Paramètre	Valeur
Sensibilité de la pente	0,02
Largeur de pic	2
Rejet d'aire	0,05
Rejet de hauteur	0,05
Mode épaules	Tangentiel
Mode Tangent Skim	Droit
Pic de pointe/Rapport hauteur-skim	0,05
Pic avant/Rapport hauteur-skim	0,05
Rapport skim-vallée	20
Mode de correction de la ligne de base	Classique
Rapport pic-vallée	500
Soustraction de blanc	Oui

Résultats et discussion

Les facteurs de réponse relative de l'AAV-1 et de l'AAV-6 ont tout d'abord été estimés en injectant un nombre identique de capsides issues des échantillons enrichis en capsides pleines ou des échantillons enrichis en capsides vides. Les observations ont montré que les capsides pleines étaient plus brillantes que les vides, avec un rapport de réponse apparent d'environ 1,2 pour les deux sérotypes comparativement aux capsides vides. Cette valeur concorde tout à fait avec le rapport de réponse publié pour l'AAV-6.2 qui est de 1,3.⁴

Comme illustré sur la figure 2, la séparation des capsides pleines et vides dans les échantillons mélangés a été assurée avec des résolutions acceptables ($R = 1,1$ pour l'AAV-1, et $R = 1,3$ pour l'AAV-6) grâce à la pompe flexible. Les résultats ont montré une corrélation négative entre le recouvrement des échantillons et le débit (données non présentées), en accord avec les observations figurant dans la littérature.⁵ C'est pourquoi, pour cette méthode, le débit a été maintenu à une faible valeur de 0,1 mL/min durant le gradient analytique.

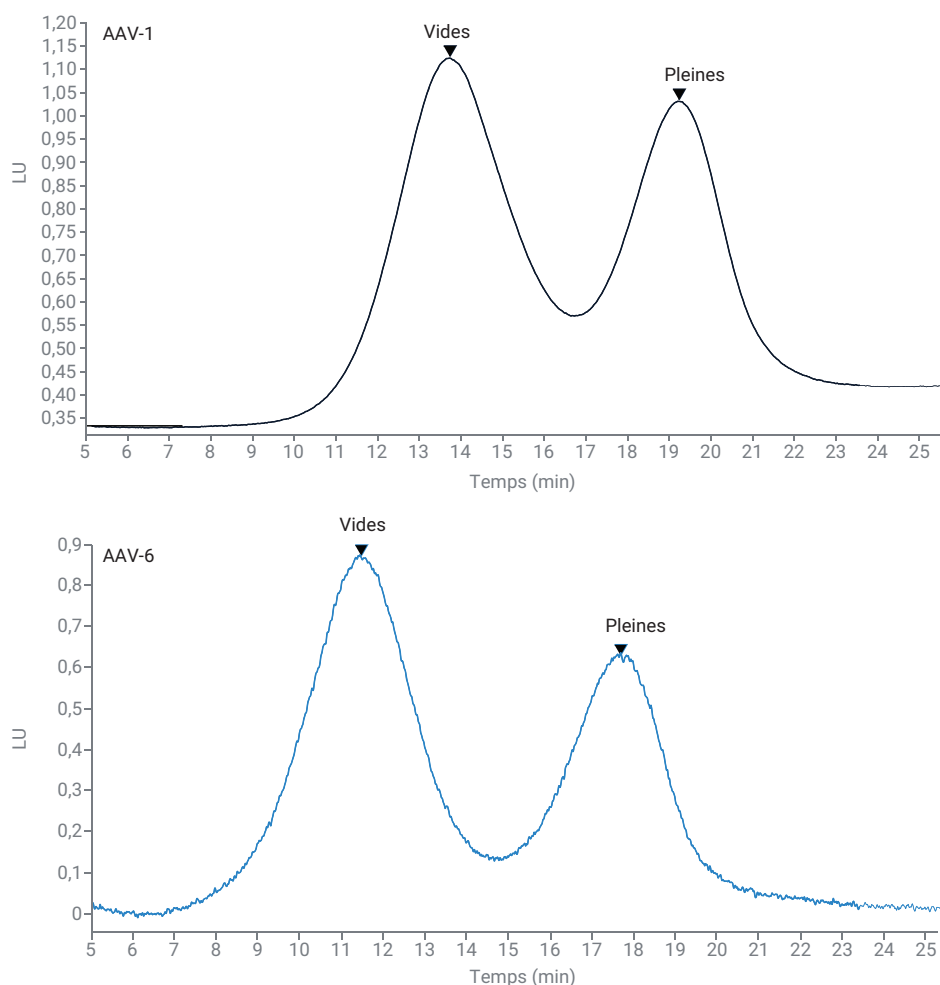


Figure 2. Séparation de mélanges de capsides pleines et vides avec la pompe flexible quaternaire Agilent.

La méthode a été transférée sur un système LC 1290 Infinity II Bio équipé d'une pompe binaire à haut débit. Des mélanges contenant à la fois des capsides pleines et des capsides vides à différents rapports ont été injectés à plusieurs reprises sur une durée de trois jours afin d'évaluer l'exactitude, la linéarité et la reproductibilité de l'analyse. Comme indiqué dans les chromatogrammes superposés de la figure 3, les temps de rétention et la forme de pic des pics correspondant aux capsides pleines et vides se sont avérés reproductibles sur une large gamme de rapports de capsides pleines/vides.

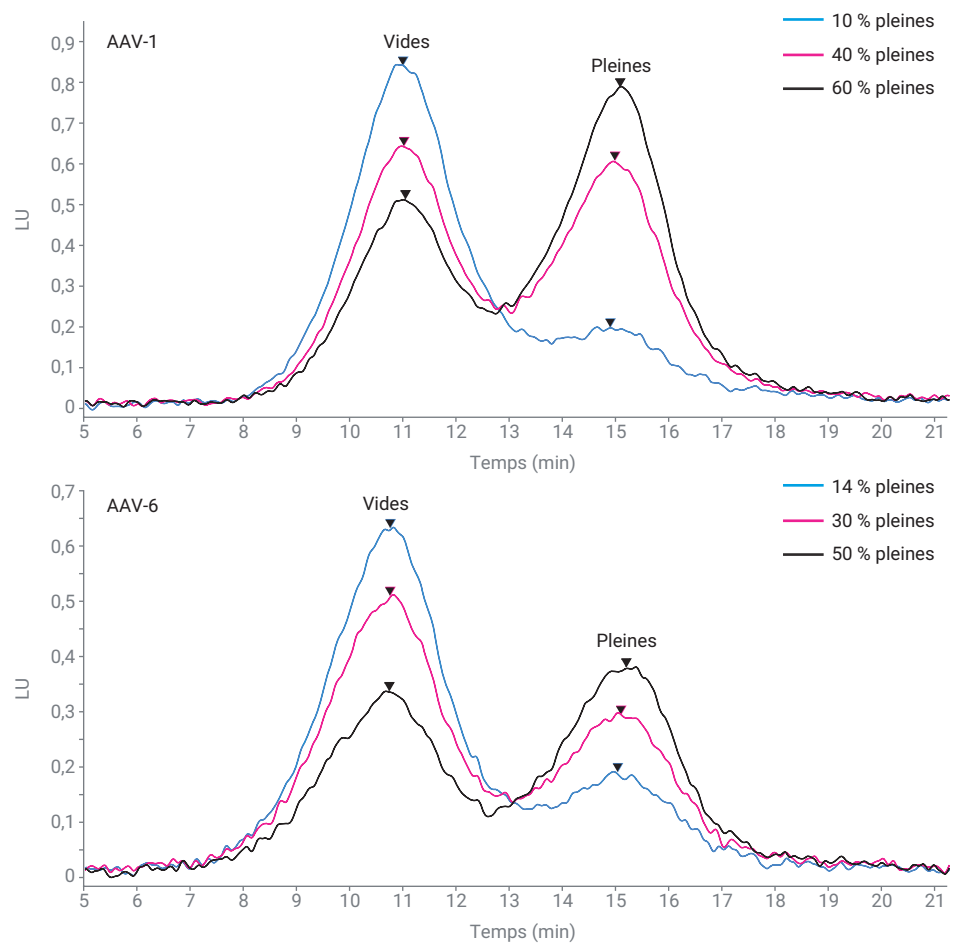


Figure 3. Séparation d'échantillons d'AAV-1 et d'AAV-6 présentant différents rapports capsides pleines/capsides vides avec la pompe binaire à haut débit Agilent.

Comme montré précédemment⁶, la hauteur relative des pics a donné des estimations plus exactes et plus robustes du rapport capsides pleines/vides que l'aire relative des pics. Ceci est dû à la présence d'un certain

degré de traînée sur les pics, d'où une résolution incomplète. La figure 4 illustre les différences de linéarité et d'exactitude obtenues pour l'AAV-1 et l'AAV-6 en se basant, pour l'estimation, sur la

hauteur relative et l'aire relative des pics. Les droites de tendance correspondant à la hauteur relative des pics étaient plus proches de l'origine et possédaient un R^2 plus élevé.

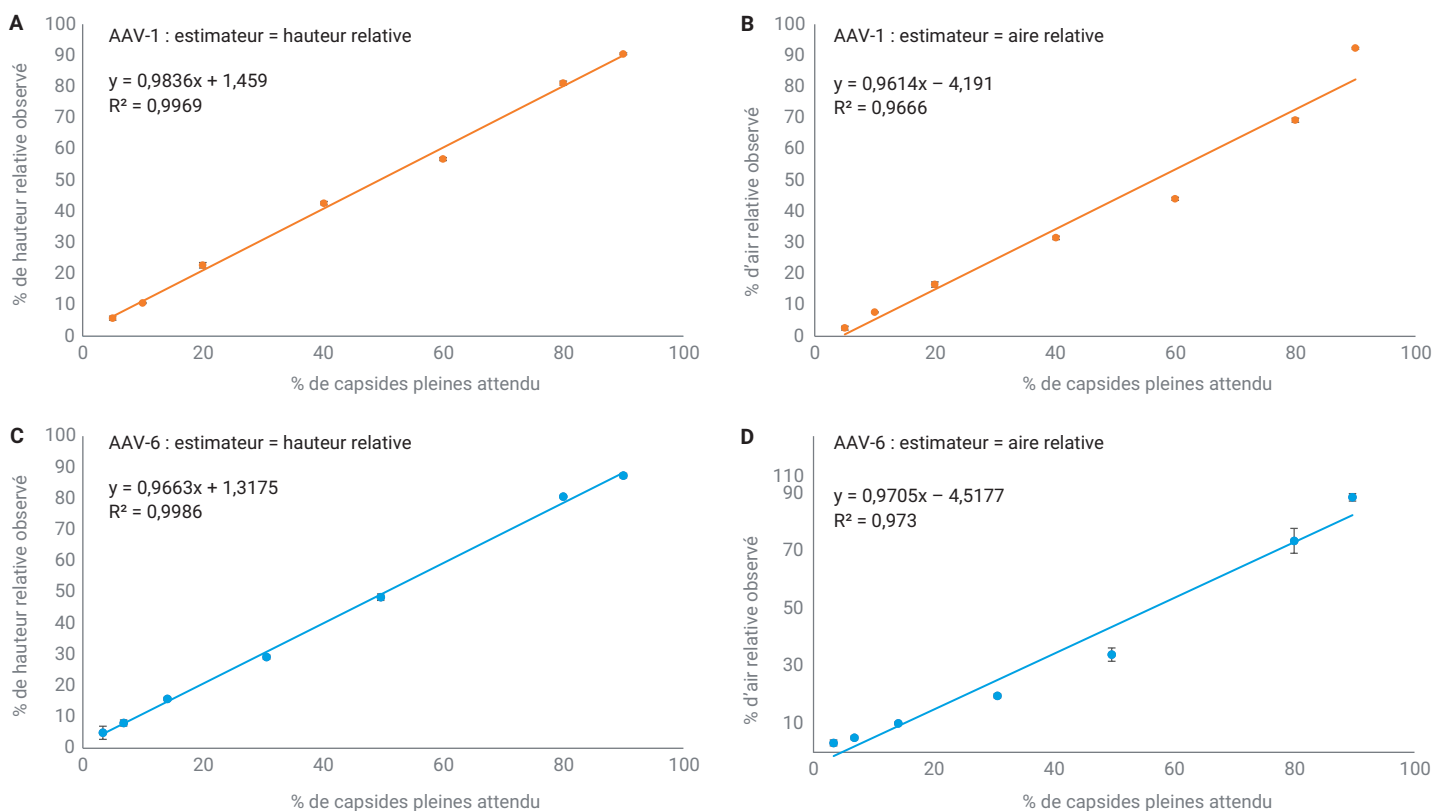


Figure 4. Comparaison de l'utilisation de la hauteur relative et de l'aire relative des pics comme estimateurs du rapport capsides pleines/vides. La hauteur relative des pics (A et C) donne une meilleure exactitude et une meilleure linéarité que l'aire relative des pics (B et D).

La figure 5 montre la reproductibilité interjournalière de la méthode. L'écart-type relatif (RSD) du rapport capsides pleines/vides était $\leq 10,1\%$ pour les échantillons d'AAV-1 et $\leq 11,2\%$ pour les échantillons d'AAV-6 contenant entre ~ 5 et 90% de capsides pleines. Les résultats montrent que la méthode possède une large plage linéaire.

La limite de quantification inférieure des deux sérotypes était $\leq 5\%$ pour les capsides pleines, en supposant un RSD acceptable inférieur à 15% . Le temps de rétention des pics des capsides pleines et des capsides vides était également très reproductible, avec un $RSD \leq 2,4\%$ pour les deux sérotypes sur tous les échantillons testés.

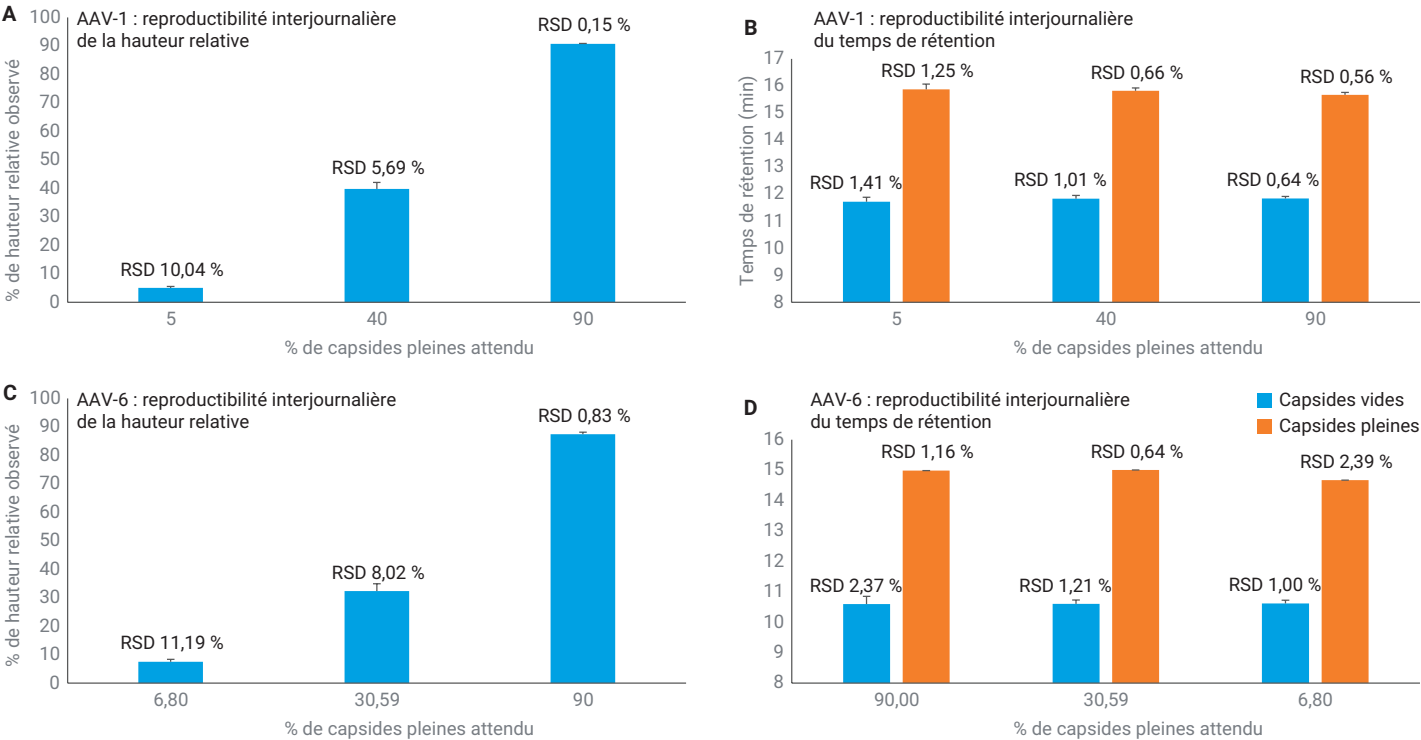


Figure 5. Reproductibilité interjournalière de la hauteur relative utilisée comme estimateur et du temps de rétention des pics.

Conclusion

Cette étude montre qu'il est possible de mesurer de manière exacte et reproductible le rapport capsides pleines/capsides vides des sérotypes AAV-1 et AAV-6 avec un système LC Agilent 1290 Infinity II Bio équipé de colonnes échangeuses d'anions forts (SAX) Agilent Bio.

Références

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

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

DE10415602

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Imprimé aux États-Unis, le 16 février 2022
5994-4589FR