

Analisi dei rapporti di capsidi pieni/vuoti nei sierotipi di virus adeno-associati 1 e 6 mediante cromatografia liquida biocompatibile

Linearità e riproducibilità eccellenti con il sistema
LC Agilent 1290 Infinity II Bio dotato di colonne SAX
a scambio anionico forte Agilent Bio

Autore

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

La cromatografia a scambio ionico è uno strumento indispensabile sia per la purificazione dei virus adeno-associati (AAV) che per l'analisi dei loro attributi per la qualità. Il presente studio dimostra la determinazione del rapporto di capsidi pieni/vuoti in campioni di AAV-1 e AAV-6 usando il sistema LC Agilent 1290 Infinity II Bio con colonne SAX a scambio anionico forte Agilent Bio. Il metodo mostra linearità e riproducibilità eccellenti, grazie alle quali il sistema LC 1290 Infinity II Bio può essere considerato un sistema di cromatografia liquida avanzato con prestazioni all'avanguardia nel settore.

Introduzione

Nel processo di produzione degli AAV ricombinanti, una proporzione significativa dei capsidi virali non contiene alcun carico genetico: tali capsidi sono pertanto definiti "vuoti".¹ È stato dimostrato che i capsidi vuoti riducono l'efficacia della trasduzione genetica delle preparazioni di AAV², e sono pertanto considerati dagli enti normativi impurezze legate al processo che devono essere sottoposte a caratterizzazione.³

Nel presente studio, si è utilizzato il sistema LC Agilent 1290 Infinity II Bio con colonna SAX Agilent Bio per determinare il rapporto di capsidi pieni/vuoti in campioni purificati di AAV-1 e AAV-6. Il sistema LC 1290 Infinity II Bio presenta un percorso del flusso biocompatibile. Abbinato alle colonne in PEEK a scambio anionico forte Agilent Bio SAX con poli(stirene divinilbenzene) (PS-DVB) non porosa, il sistema LC garantisce l'integrità delle biomolecole riducendo al minimo le interazioni di superficie indesiderate, ed è quindi ideale per applicazioni per grandi molecole.

Condizioni sperimentali

Gli standard di riferimento degli AAV sono stati acquistati da Vigene Biosciences come campioni arricchiti in capsidi pieni e vuoti. Tutte le sostanze chimiche sono state acquistate da Sigma-Aldrich, se non altrimenti specificato.

Strumentazione

Nel presente studio sono state utilizzate due configurazioni del sistema LC 1290 Infinity II Bio (Figura 1). Il sistema LC era dotato di una pompa quaternaria Flexible o in alternativa di una pompa binaria High Speed. Alla pompa Flexible è possibile collegare contemporaneamente quattro linee del solvente, riducendo il numero delle diverse fasi mobili che devono essere preparate durante lo sviluppo del metodo. La pompa High Speed combina la massima efficienza di miscelazione con il più basso volume di ritardo, fornendo eccellenti livelli di sensibilità e riproducibilità. Entrambe le configurazioni sono resistenti alla corrosione causata da

elevate concentrazioni di sali e possono tollerare alte pressioni fino a 1.300 bar. Si è utilizzato un rivelatore a fluorescenza Agilent serie 1260 Infinity II per ottenere l'elevata sensibilità richiesta in fase di analisi dei campioni di AAV relativamente diluiti.



Figura 1. Sistema LC Agilent 1290 Infinity II Bio.

Tabella 1. Composizione delle fasi mobili.

	Pompa Flexible	Pompa High Speed
Tipo di pompa	Quaternaria	Binaria
Composizione della fase mobile	A: Acqua deionizzata B: Cloruro di tetrametilammonio 1 M C: HCl 0,3 M D: bis-tris propano 0,2 M Da A a D contengono MgCl ₂ 2 mM	A: bis-tris propano 70 mM, pH 9,0 B: bis-tris propano 70 mM, + cloruro di tetrametilammonio 1 M, pH 9,0 A e B contengono MgCl ₂ 2 mM

Tabella 2. Condizioni del gradiente della pompa Flexible.

Tempo	%A	%B	%C	%D	Flusso (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

Tabella 3. Condizioni del gradiente della pompa High Speed.

Tempo	%A	%B	Flusso (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

Cromatografia

Una colonna Sax Agilent Bio NP5 con hardware in PEEK (2,1 × 50 mm, 5 µm, codice 5190-2472) è stata usata per separare i capsidi degli AAV pieni e vuoti. L'eluizione in gradiente salino è stata eseguita usando la fase mobile e le condizioni del gradiente mostrate nelle Tabelle da 1 a 3.

Per il metodo con la pompa Flexible, si è utilizzato il software Agilent Buffer Advisor per determinare le percentuali dei componenti di ciascuna fase mobile necessari per ottenere bis-tris propano 70 mM, pH 9,0, durante l'analisi. Gli standard AAV-1 e AAV-6 sono stati diluiti in Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 prima dell'analisi, sia come campioni distinti arricchiti con capsidi vuoti o pieni, che come miscele. L'acquisizione e l'analisi dei dati sono state controllate mediante il software Agilent OpenLab CDS utilizzando le impostazioni di integrazione mostrate nella Tabella 4.

Tabella 4. Impostazioni di integrazione del software Agilent OpenLab CDS versione 2.3.

Parametro	Valore
Sensibilità della pendenza	0,02
Larghezza del picco	2
Area Reject	0,05
Height Reject	0,05
Modalità spalle	Tangenziale
Modalità tangent-skim	Dritto
Rapporto coda del picco/altezza skim	0,05
Rapporto picco anteriore/altezza skim	0,05
Rapporto valle skim	20
Modalità correzione della linea di base	Classico
Rapporto picco-valle	500
Sottrazione del bianco	Sì

Risultati e discussione

I fattori di risposta relativa di AAV-1 e AAV-6 sono stati dapprima stimati iniettando quantità identiche di capsidi da entrambi i campioni arricchiti con capsidi pieni o vuoti. Si è osservato che i capsidi pieni erano più luminosi di quelli vuoti con un rapporto di risposta apparente relativo ai capsidi vuoti di circa 1,2 per entrambi i sierotipi. Questo valore mostra una buona corrispondenza con il rapporto di risposta pubblicato di 1,3 per AAV-6.⁴

Come mostrato nella Figura 2, le separazioni tra capsidi pieni e vuoti nei campioni misti sono state raggiunte con risoluzioni accettabili ($R = 1,1$ per AAV-1 e $R = 1,3$ per AAV-6) quando si è utilizzata la pompa Flexible. Si è riscontrato che il recupero del campione era negativamente correlato al flusso (dati non mostrati), in accordo con le osservazioni riportate in letteratura.⁵ Di conseguenza, il flusso per questo metodo è stato mantenuto basso, a un valore di 0,1 mL/min durante il gradiente analitico.

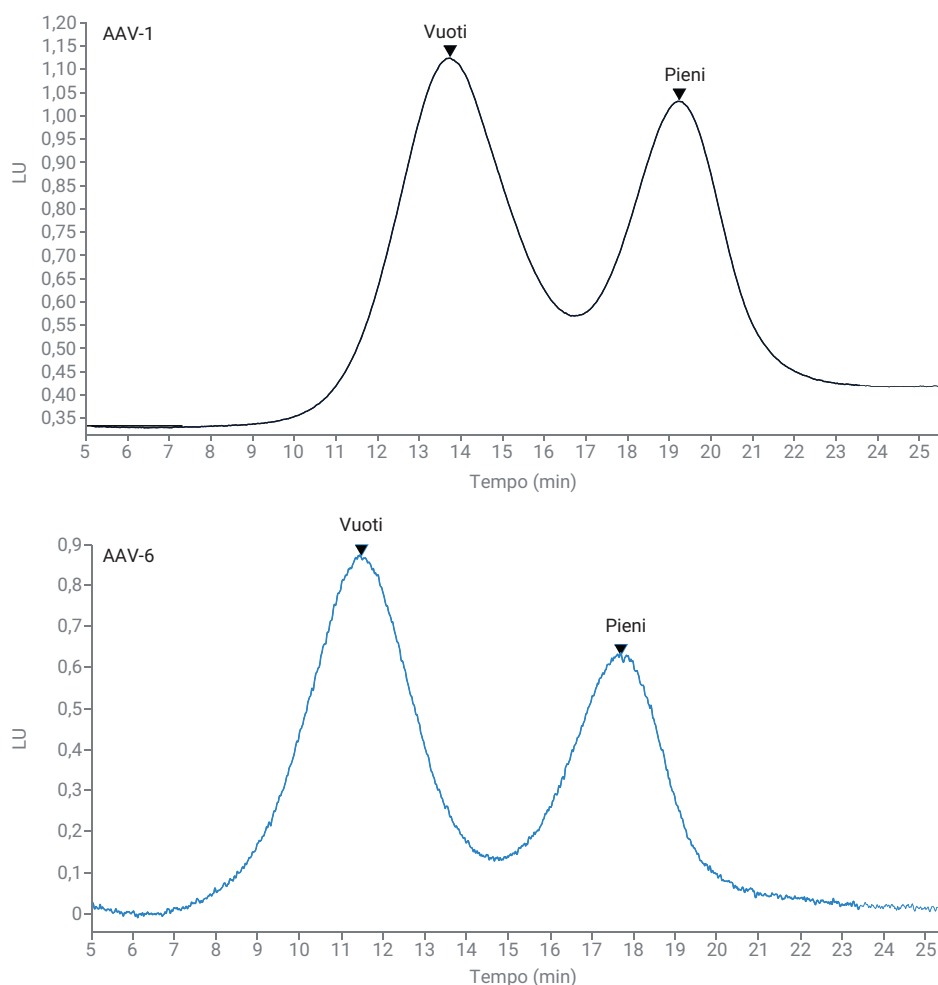


Figura 2. Separazione di miscele di capsidi pieni e vuoti usando la pompa quaternaria Flexible Agilent.

Il metodo è stato trasferito a un sistema LC 1290 Infinity II dotato di una pompa binaria High Speed. Miscele di capsidi pieni e vuoti in rapporti differenti sono state iniettate ripetutamente nel corso di tre giorni per valutare l'accuratezza, la linearità e la riproducibilità dell'analisi. Come mostrato nel cromatogramma sovrapposto in Figura 3, i tempi di ritenzione e le forme dei picchi dei capsidi pieni e vuoti sono riproducibili per un'ampia gamma di rapporti di capsidi.

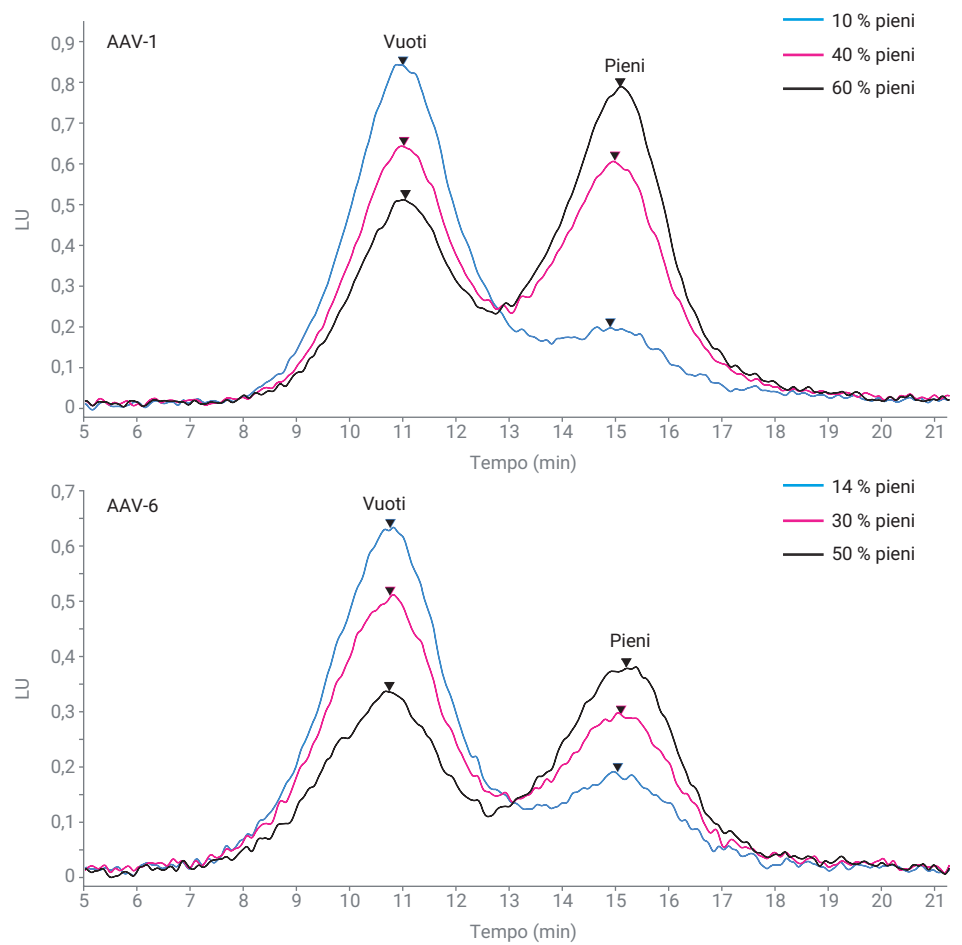


Figura 3. Separazione dei campioni di AAV-1 e AAV-6 con differenti rapporti di capsidi pieni/vuoti usando la pompa binaria High Speed Agilent.

Come dimostrato precedentemente⁶, le altezze relative dei picchi si sono dimostrate utili nel fornire stime più accurate e robuste del rapporto di capsidi pieni/vuoti rispetto alle aree relative dei picchi. Questa scoperta era dovuta al fatto

che i picchi presentavano un certo grado di scodamento e pertanto non erano pienamente risolti. La Figura 4 illustra le differenze in linearità e accuratezza per entrambi AAV-1 e AAV-6 utilizzando le

altezze o le aree relative dei picchi come stimatori. Le linee di tendenza per la linearità per le altezze relative dei picchi erano più vicine all'origine e presentavano valori R^2 più alti.

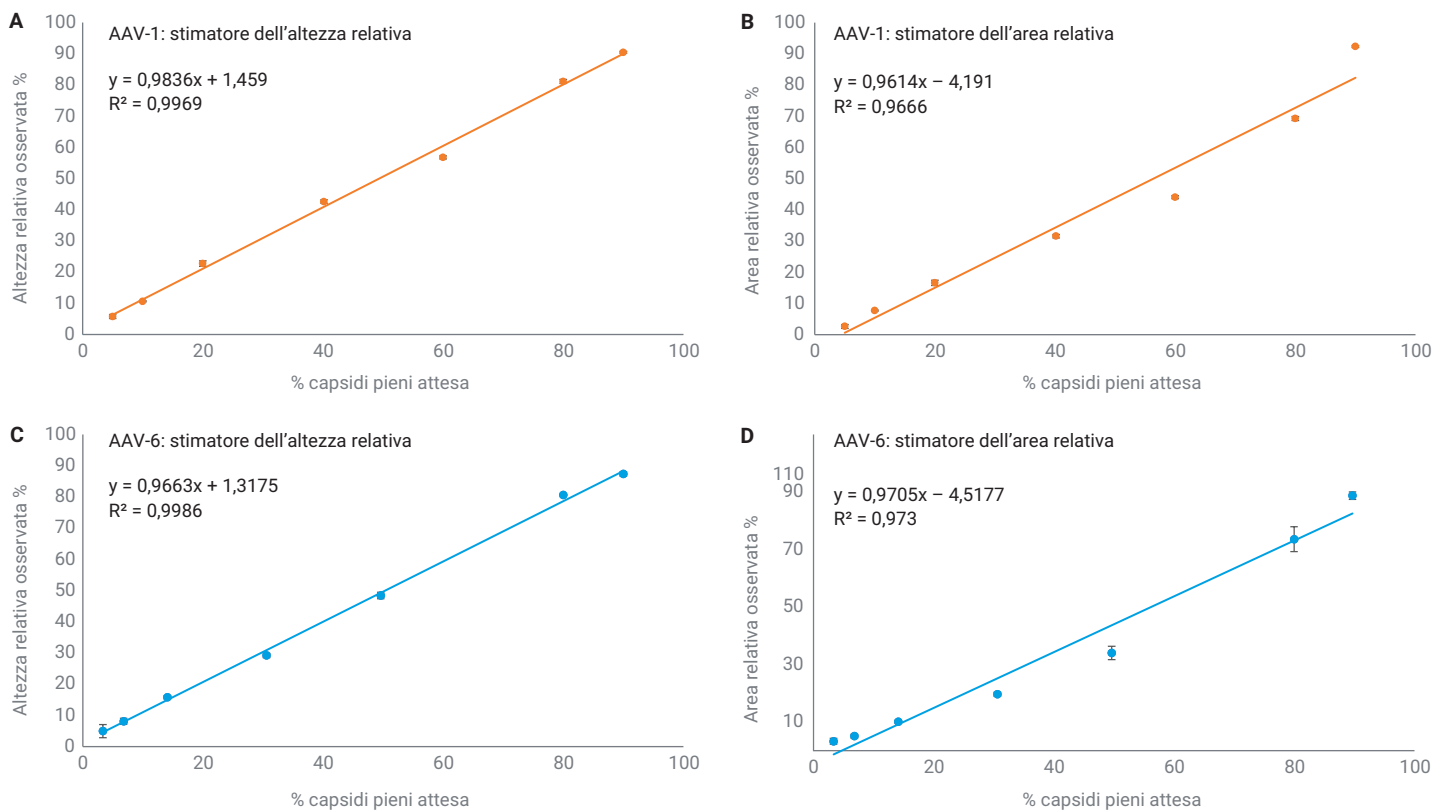


Figura 4. Confronto tra le altezze relative dei picchi e le aree relative dei picchi come stimatori del rapporto di capsidi pieni/vuoti. L'altezza relativa del picco (A e C) fornisce accuratezza e linearità superiori rispetto all'area relativa del picco (B e D).

La Figura 5 mostra la riproducibilità del metodo in giorni diversi. Le deviazioni standard relative (RSD) dei rapporti di capsidi pieni/vuoti erano $\leq 10,1\%$ per AAV-1 e $\leq 11,2\%$ per AAV-6 per i campioni che contenevano da 5 a 90% circa di capsidi pieni. I risultati mostrano che il metodo presenta un ampio intervallo lineare. Il

limite di quantificazione inferiore per entrambi i sierotipi era $\leq 5\%$ di capsidi pieni, assumendo una RSD accettabile inferiore al 15%. Anche i tempi di ritenzione per i picchi di entrambi i capsidi pieni e vuoti erano altamente riproducibili, con $RSD \leq 2,4\%$ per entrambi i sierotipi per tutti i campioni testati.

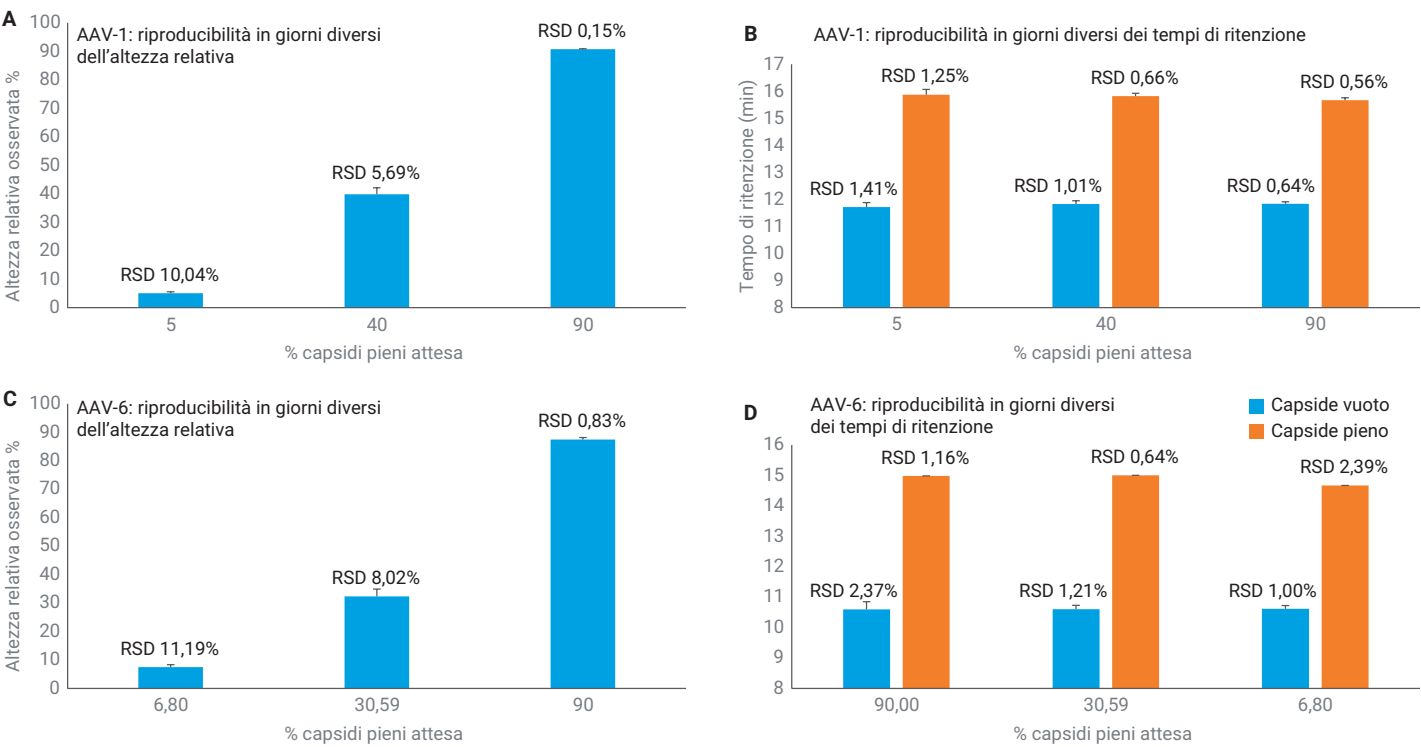


Figura 5. Riproducibilità in giorni diversi degli stimatori per le altezze relative e i tempi di ritenzione dei picchi.

Conclusione

Il presente studio dimostra che è possibile misurare in modo accurato e riproducibile i rapporti di capsidi pieni/vuoti nei sierotipi AAV-1 e AAV-6 usando il sistema LC Agilent 1290 Infinity II Bio con colonne SAX a scambio anionico forte Agilent Bio.

Bibliografia

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

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

DE10415602

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Stampato negli Stati Uniti, 16 febbraio 2022
5994-4589ITE