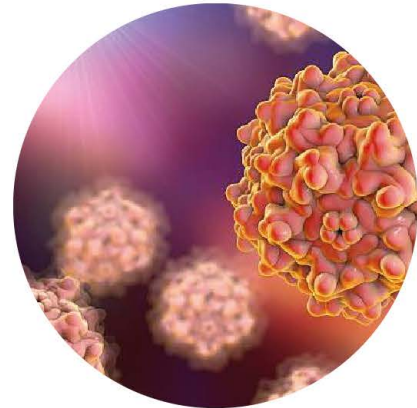




# APLICAÇÕES

AN-1166

## Utilizando a Coluna Biozen™ dSEC-7 por SEC-FL Para Reduzir o Consumo Elevado de Amostras Característico nas Análises de Agregados de Vírus Adeno-Associados (AAV)



Ramkumar Dhandapani, PhD e Bryan Tackett, PhD  
Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA

### Visão Geral

À medida que os AAVs continuam a progredir como um veículo promissor para distribuir medicamentos de terapia gênica, é importante ter estratégias analíticas eficazes para garantir que aspectos cruciais de qualidade, como a agregação, sejam avaliados.

O método considerado padrão-ouro para medir a agregação de AAV é a Ultracentrifugação Analítica (AUC). No entanto, é amplamente reconhecido que a AUC requer grandes volumes de amostras de AAV, complicando a análise, especialmente quando réplicas precisam ser realizadas. Além disso, essa exigência limita a quantidade de amostras disponíveis para medir CQAs adicionais durante os testes de rotina. A Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC), uma técnica analítica bem estabelecida para medir a agregação, tem sido demonstrada como uma solução alternativa viável.

Nesta nota de aplicação, apresentamos uma solução utilizando uma coluna Biozen dSEC-7 em conjunto com um detector de fluorescência, proporcionando uma análise confiável de agregados em menos de 10 minutos, utilizando apenas 0,5 µL de amostra de AAV.

Para avaliar o impacto do volume de injeção na detecção de agregados e na resolução entre agregado e monômero, foram analisados volumes de 0,5 µL a 2,0 µL de quatro serotipos de AAV (AAV2, 5, 8 e 9), como ilustrado nas Figuras 1 a 4. A resolução entre monômero e agregado foi consistentemente  $\geq 2,0$  para AAV2 e AAV8 em todos os volumes de injeção (Figuras 1 e 3). Já para AAV5 e AAV9 (Figuras 2 e 4), observou-se resoluções entre 1,5 e 2,0 em todos os volumes de injeção. Notavelmente, o AAV9 demonstrou uma resolução aprimorada de 1,6 para 2,0 à medida que o volume de injeção foi aumentado de 0,5 µL para 2,0 µL. O percentual de agregados permaneceu consistente em todos os volumes de injeção para todos os serotipos, sugerindo que a alta eficiência da coluna Biozen dSEC-7, combinada com o detector de fluorescência altamente sensível, permite uma detecção e separação precisas, mesmo em injeções tão pequenas quanto 0,5 µL.

### Condições Cromatográficas

**Coluna:** Biozen 3 µm dSEC-7

**Dimensões:** 150 x 4,6 mm

**Referência:** [00F-4789-E0](#)

**Fases Móveis:** 20 mM de Fosfato de Sódio, pH 6,6 + 350 mM de Cloreto de Potássio

**Fluxo:** 350 µL/min

**Volume de Injeção:** 0,5 µL, 1µL e 2µL

**Temperatura:** 25 °C

**Instrumento:** Waters® ACQUITY® H-Class Bio

**Deteção:** FLR - Ex 280 nm, Em 350 nm

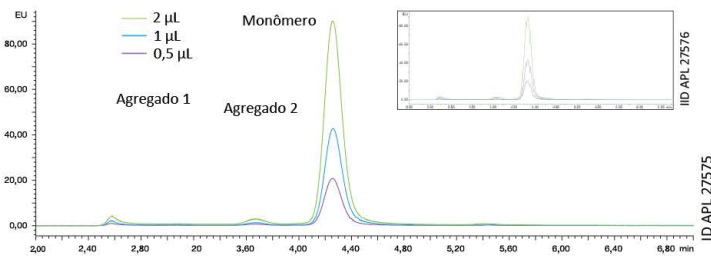
**Taxa de Amostragem:** 20 Hz

**Detector:** Waters ACQUITY H-Class FLR

**Amostra:** 1. AAV2-CAG-GFP, 2E13 vg/mL  
2. AAV5-CMV-GFP, 2E13 vg/mL  
3. AAV8-CMV-GFP, 2E13 vg/mL  
4. AAV9-CMV-GFP, 2E13 vg/mL

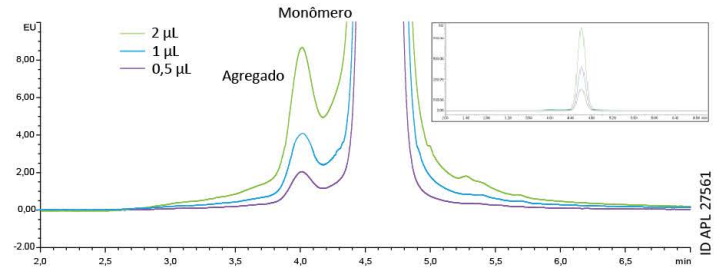


**Figura 1.** Separação de Monômero e Agregados de AAV2 em Diferentes Volumes de Injeção.



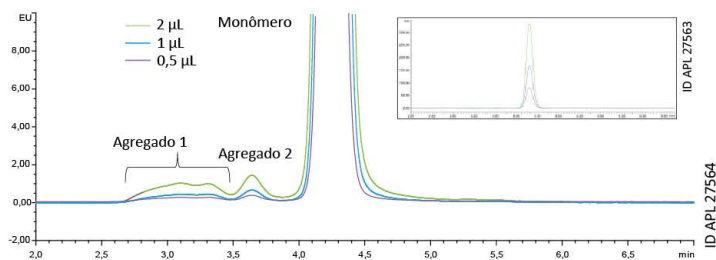
Volume de Injeção (µL)	Nome do pico	Tempo de Retenção (min)	% de Área	Resolução
0,5	Agregado 1	2,57	3,19	-
	Agregado 2	3,66	2,65	-
	Monômero	4,26	94,05	2,2
1,0	Agregado 1	2,58	3,12	-
	Agregado 2	3,67	2,46	-
	Monômero	4,26	94,42	2,2
2,0	Agregado 1	2,58	2,89	-
	Agregado 2	3,68	2,57	-
	Monômero	4,26	94,05	2,2

**Figura 2.** Separação de Monômero e Agregado AAV5 em Diferentes Volumes de Injeção.



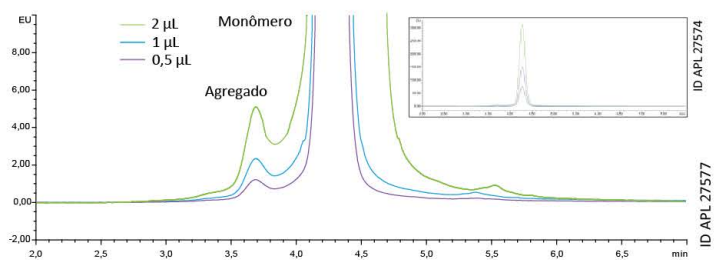
Volume de Injeção (µL)	Nome do Pico	Tempo de Retenção (min)	% Área	Resolução
0,5	Agregado	4,13	0,95	-
	Monômero	4,61	99,05	1,6
1	Agregado	4,01	1,00	-
	Monômero	4,60	99,00	1,5
2	Agregado	4,01	0,95	-
	Monômero	4,60	99,05	1,6

**Figura 3.** Separação de Monômero e Agregados AAV8 em Diferentes Volumes de Injeção.



Volume de Injeção (µL)	Nome do Pico	Tempo de Retenção (min)	% Área	Resolução
0,5	Agregado 1	2,07-3,45	1,10	-
	Agregado 2	3,64	0,50	-
	Monômero	4,25	98,40	2,4
1,0	Agregado 1	2,07-3,45	1,10	-
	Agregado 2	3,64	0,50	-
	Monômero	4,25	98,50	2,0
2,0	Agregado 1	2,65-3,45	1,14	-
	Agregado 2	3,64	0,50	-
	Monômero	4,25	98,39	2,2

**Figura 4.** Separação de Monômero e Agregado AAV9 em Diferentes Volumes de Injeção.



Volume de Injeção (µL)	Nome do Pico	Tempo de Retenção (min)	% Área	Resolução
0,5	Agregado	3,69	1,52	-
	Monômero	4,28	98,53	1,6
1	Agregado	3,69	1,47	-
	Monômero	4,28	98,48	1,7
2	Agregado	3,70	1,59	-
	Monômero	4,28	98,51	2,0