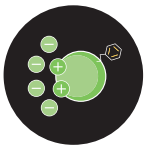
使用离子交换和混合模式层析纯化腺相关病毒

Sharon Bola and William H. Rushton
Bio-Rad Laboratories, Inc., 2000 Alfred Nobel Dr, Hercules, CA 94547, USA

阴离子交换



混合模式

摘要

重组腺相关病毒 (AAV) 是最有前景进行长期基因转导的载体之一。AAV 的工艺规模纯化具有相当大的挑战性，仍然缺乏有效的成本控制纯化策略。由于亲和填料具有高选择性，且易于整合到平台工艺中，因此亲和层析是目前基因治疗行业 AAV 纯化捕获步骤的最常用方法。亲和捕获步骤之后，采用精纯步骤进行完整病毒颗粒富集。这通常通过阴离子交换层析法进行。由于亲和填料制造成本高，导致其价格昂贵并且下游工艺成本高。本文所描述的研究展示了一种经济高效的 AAV8 非亲和捕获和精纯纯化工艺。使用阴离子交换 (AEX) 填料，（Nuiva HP Q）和疏水阴离子交换混合模式 (MM) 填料，（Nuiva aPrime 4A) 的优化工艺，使病毒回收率和 AAV8 完整病毒颗粒富集实现最大化。Nuvia HP-Q 填料捕获了 100% 的病毒颗粒，并通过去除宿主细胞蛋白 (HCP) 和 DNA 达到极高的纯度。Nuvia aPrime 4A 介质将空衣壳与完整病毒颗粒进行了分离，产率高，并进一步去除了 HCP 和 DNA。

简介

腺相关病毒最近已成为基因治疗的首选病毒载体。在基因治疗中，功能基因拷贝可以通过病毒载体以体内或体外两种途径之一传递。AAV 载体是体内基因转移治疗的递送载体，因为其先天免疫反应过程较温和，染色体整合不频繁，并且有多种血清型可用于特定的递送途径和目标组织（Asher 等人，2020 年）。目前，全球有 263 项基因治疗临床试验使用 AAV 载体，用于治疗癌症，眼部疾病，传染性疾病，单基因疾病，心血管疾病和神经系统疾病等广泛领域（https://a873679.fmphost.com/fmi/webd/GTCT，截止到 2023 年 10 月 24 日）。表 1 列出了一些正在进行临床试验或商业化生产的具有代表性的 AAV 药品，并根据靶器官列出了 AAV 血清型和剂量。

从处于临床阶段的基因治疗产品数量可以看出，市场对基于 AAV 的治疗方法的需求正在日益增长。如果成功的话，最终将需要具有成本效益的大规模生产工艺实现产业化生产。上游病毒生产始于构建表达产生功能性病毒颗粒所需成分的细胞。有很多不同的方法可以完成此操作，但对于慢病毒和 AAV 等病毒，最常用的方法是使用多种表达质粒瞬时转染人胚肾 293T (HEK 293T) 或 HEK 293 细胞。AAV 生产通常使用三个独立的质粒：一个顺式质粒，编码 AAV 反向末端重复序列 (ITR) 以及感兴趣的基因治疗；一个反式质粒，编码 AAV Rep 和 Cap 基因；以及一个辅助质粒（通常编码腺病毒辅助基因），AAV 依赖于该质粒来产生病毒。然后，通过化学或机械方式裂解，用核酸酶去除游离核酸。被瞬时转染的细胞培养几天后可以产生病毒颗粒（de Rooij 等人，2019 年）。随后细胞裂解液移至下游工艺，用于病毒颗粒的纯化。

BIO-RAD

表 1处于临床试验和商业化的基于 AAV 的药物清单。

靶器官	药品	疾病	公司	AAV 血清型	剂量	生产单位	分期
眼睛	Luxturna	视网膜营养不良	Spark Therapeutics, Inc.	AAV2	1.5 x 10 ^{11} vg/眼睛	HEK 293 中的三重转染	商业化
CNS	PTC-AADC	L-氨基酸脱羧酶缺乏症	PTC Therapeutics, Inc.	AAV2	1.8 x 10 ^{11} vg/大脑	三重转染	第 3 期
肝脏	ATM-061	B 型血友病	uniQure N.V.	AAV5	2 x 10^{13} vg/kg	采用杆状病毒表达技术的昆虫细胞 (Sf9)	第 3 期
肝脏	BENGENE-2	B 型血友病	Pfizer Inc.	AAV Spark100	5 x 10^{11} vg/kg	HEK 293 中的三重转染	第 3 期
肝脏	BMN 270	A 型血友病	BioMarin Pharmaceutical Inc.	AAV5	4–6 x 10^{13} vg/kg	采用杆状病毒表达技术的昆虫细胞 (Sf9)	第 3 期
神经-肌肉	Zolgensma	脊髓性肌萎缩	Novartis Gene Therapies, Inc.	AAV9	1 x 10^{14} vg/kg	HEK 293 中的三重转染	商业化
肌肉	SRP-9001	杜氏肌营养不良症	Sarepta Therapeutics, Inc.	AAV8	2 x 10^{14} vg/kg	HEK 293 中的转染	第 3 期
肌肉	SGT-001	杜氏肌营养不良症	Solid Biosciences Inc.	AAV9	始于 5 x 10^{13} vg/kg	瞬时转染	第 1 期和第 2 期
肌肉	PF-06939926	杜氏肌营养不良症	Pfizer Inc.	AAV9	3 x 10^{14} vg/kg	HEK 293 中的悬浮	第 3 期

AAV，腺相关病毒；CNS，中枢神经系统；vg，载体基因组。

上游表达产生的病毒含有多种与工艺和产物相关的杂质，因此需要采取纯化步骤来获得安全，高纯度的药品。在过去，基于离心的方案（基于 CsCl 或碘克沙醇）已被证明可以有效分离 AAV 颗粒并去除空衣壳等杂质。这些工艺是通用的且可在研究过程中快速实施，但对于大规模生产而言可能会变得成本效率低下，并且难以通过质量控制验证。因此，纯化步骤可由可控，可扩展的层析工艺所取代（Dobrowsky 等人，2021 年）。

由于具有高选择性，且易于集成到平台工艺中，因此亲和层析法是目前基因治疗行业 AAV 纯化捕获步骤的最常用方法。捕获步骤之后，采用精纯步骤（通常是 AEX 层析法）进行完整病毒颗粒富集。亲和填料的高成本可能导致下游工艺成本昂贵。事实上，下游工艺成本约占生物药品生产成本的 60%，因此需要控制成本，提高工艺效率和加速上市。近年来，多模式或混合模式层析法（其中填料中的配体以多种方式与蛋白质产物相互作用）因其具有优化下游纯化工艺流程的潜力而备受关注（Deorkar，2022 年）。本文介绍了一种经济高效的下游工艺，采用非亲和捕获步骤（Nuvia HP-Q 填料）和混合模式精纯步骤（Nuvia aPrime 4A 填料）处理 AAV8。该工艺经过优化，使病毒回收率和 AAV8 完整病毒颗粒富集实现最大化。

材料和方法

通过人胚肾 293T (HEK 293T) 细胞的悬浮培养，产生 AAV8，其携带编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的 DNA。当细胞浓度达到 2 x 10^6 细胞/ml时，进行了相应表达质粒的三重转染。收获时（转染后 72 hr），细胞裂解，用核酸酶处理，过滤，并将澄清的储液储存在–80°C 下。每次纯化实验前，将澄清的储液解冻，并在 37°C 下用 50 U/ml 核酸酶搅拌处理 1 hr。用四倍体积的平衡缓冲液（10 mM Tris，10 mM $MgCl_2$ 和 0.1% Tween 20，pH 8.8）超滤浓缩十倍后，用平衡缓冲液将截留物稀释五倍，然后上样到 Foresight™Nuvia HP-Q 柱（Bio-Rad Laboratories, Inc.，目录编号 12007020 或 12007021）。使用洗脱缓冲液（10 mM Tris，10 mM $MgCl_2$，0.1% Tween 20 和 2 M NaCl，pH 8.8），流速为 1 ml/min（停留时间 = 1 min）。首先，采用线性梯度洗脱，然后优化至阶段梯度洗脱。Foresight Nuvia HP-Q 柱分别使用 200，500 和 2,000 mM NaCl 执行洗脱步骤。

用平衡缓冲液将 200 mM NaCl 的洗脱峰按 1:5 稀释，然后上样到 Foresight Nuvia aPrime 4A 柱（Bio-Rad，#12007392 或 12007393）。Foresight Nuvia aPrime 4A 柱分别使用 100，200，500 和 2,000 mM NaCl 执行洗脱步骤。

采用 AAV8 滴定 ELISA (PROGEN Inc.，#PRAAV8) 对总 AAV 颗粒进行定量，并按照 iBET 内部操作流程通过实时 PCR 对含基因组的颗粒进行定量。使用 Pierce BCA 蛋白质检测试剂盒 (Thermo Fisher Scientific Inc.，#23225) 评估总蛋白质，并使用 Quant-iT PicoGreen dsDNA 检测试剂盒 (Thermo Fisher Scientific，#P11496) 对总 DNA 进行定量。使用 HEK 293 HCP ELISA 试剂盒 (Cygnus Technologies，#F650R) 测定宿主细胞蛋白。使用 Refeyn Samux 质谱光度计 (Refeyn Ltd.) 测定部分样品的 AAV8 满空比。

结果与讨论

对 Nuvia HP-Q 填料用作捕获步骤的评估

在 1 ml Foresight Nuvia HP-Q 柱上进行初步运行，使用 10 mM Tris (pH 8.8) 和 NaCl 进行洗脱。线性 NaCl 浓度梯度表明，200 和 500 mM NaCl 的洗脱步骤适合于确保高 AAV8 回收率，然后用 2 M NaCl 进行填料再生。对添加 10 mM $MgCl_2$ 和 0.1% Tween 20 的效果进行了评估。添加剂对 AAV8 回收率或杂质清除率没有显著

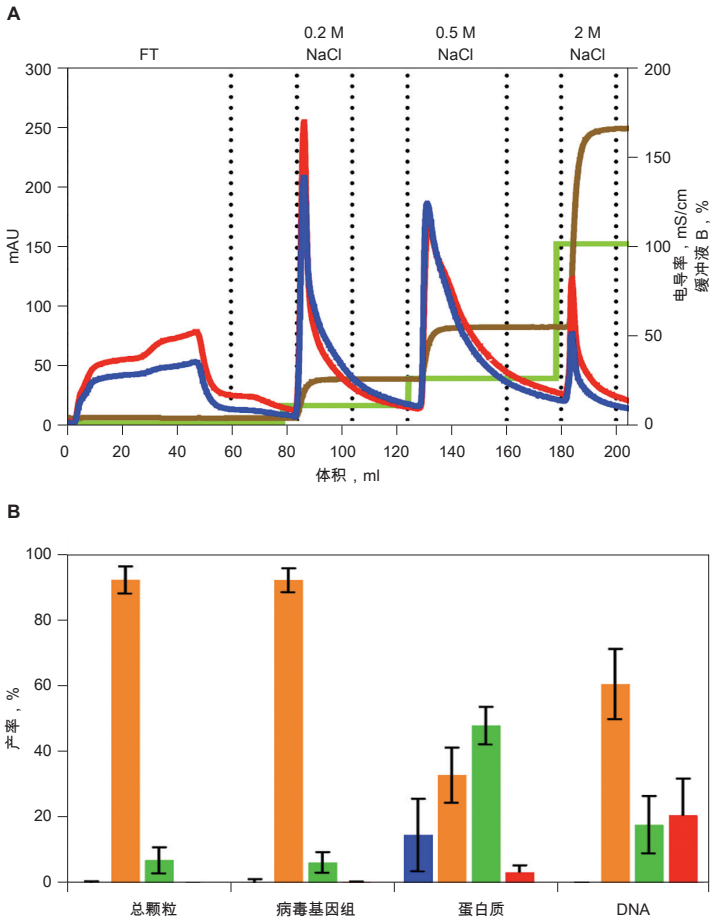


图 1使用 Foresight Nuvia HP-Q 层析法捕获 AAV8A ，使用缓冲液 b，2 M NaCl 捕获和洗脱 AAV 的层析图 (—)，以0.2，0.5 和 2 M NaCl 洗脱。OD 260 (—)；OD 280 (—)；电导率 (—)。**B**，Nuvia HP-Q 捕获步骤中 AAV8 总颗粒和含基因组颗粒的产率以及蛋白质和 DNA 的残留百分比。0.2 M NaCl (■)；0.5 M NaCl (■)；2 M NaCl (■)；FT (■)。AU，吸光度单位；FT，流穿液。

影响，但提高了 AAV8 的稳定性并减少了由于与管路非特异性吸附造成的病毒损失。Nuvia HP-Q 填料的洗脱曲线如图 1A 所示。

用 200 mM NaCl 洗脱后，AAV8 的总回收率大于 90%；然而，完整病毒颗粒和空颗粒没有得到有效分离（图 1B）。至于杂质，约有 35% 的洗脱蛋白质和 60% 的洗脱 DNA 存在于 200 mM NaCl 级分中。

在优化了 1 ml 规模的纯化条件后，使用 5 ml Foresight Nuvia HP-Q 柱进行了纯化运行。获得的结果与 1 ml 柱运行的结果相当，表明捕获步骤具有可扩展性。此外，在 5 ml 规模下评估结果显示，停留时间从 1 min 增加到 3 min 对 AAV8 回收率或杂质清除率没有显著影响（数据未显示）。

尝试在 1 min 停留时间内测定动态结合载量 (DBC)。在将 3 x 10^{13} 总颗粒/ml 填料上样后，层析柱的流穿液中仍然没有发现病毒，这表明 DBC 高于此值。

对 Nuvia aPrime 4A 填料用作捕获步骤的评估

与 Nuvia HP-Q AEX 捕获步骤一样，也对用作潜在捕获步骤的 MM 填料，Nuvia aPrime 4A 进行了评估，该填料采用 Tris (pH 8.8) 和 NaCl 进行 AAV8 的洗脱。在使用线性 NaCl 梯度进行初始运行后，确定 0.1，0.2 和 0.5 mM NaCl 的洗脱步骤，以分离完整病毒颗粒和空颗粒，并使用 2 M NaCl 进行柱再生。此外，还评估了添加 10 mM $MgCl_2$ 和 0.1% Tween 20 对 Nuvia aPrime 4A 填料性能的影响。正如在 Nuvia HP-Q 填料观察到的，没有发现对 AAV8 回收率或杂质清除率的显著影响。

当 Nuvia aPrime 4A 填料用于捕获步骤时，结果显示病毒在 100，200 和 500 mM NaCl 三个洗脱步骤中的回收率分别为 30%，40% 和 25%（图 2A）。然而，大约 60% 的含基因组的颗粒在 200 mM NaCl 步骤中洗脱，导致该组分中完整病毒颗粒富集。观察杂质蛋白质，分别在 100，200 和 500 mM NaCl 级分中洗脱了 3%，15% 和 65% 的上样量。在 100 和 200 mM NaCl 步骤中仅发现极少量的污染 DNA。大约 60% 的上样 DNA 在 500 mM NaCl 组分中洗脱，其余的在 2 M NaCl 组分中洗脱（图 2B）。

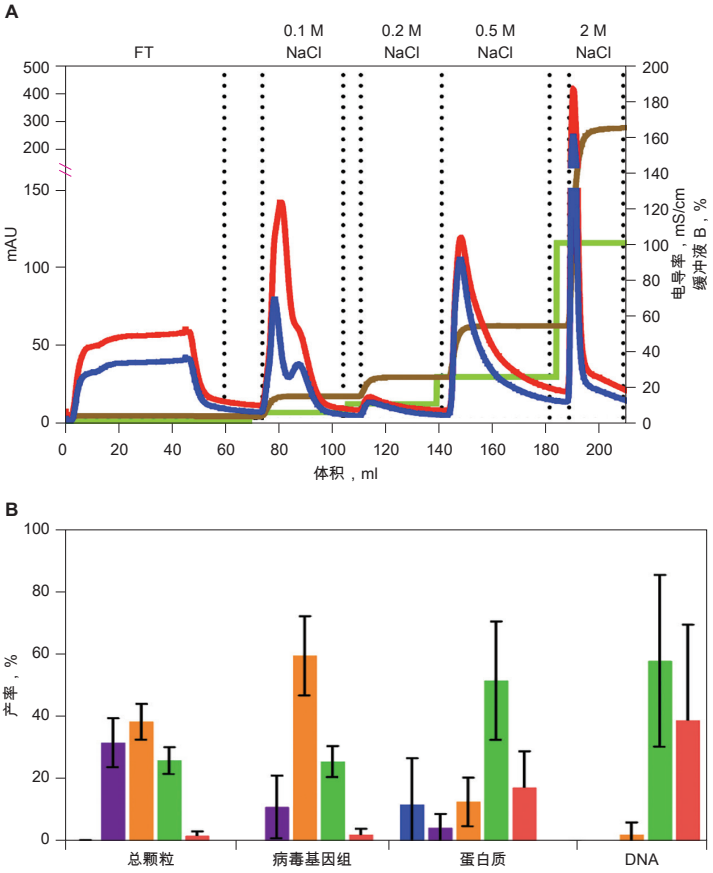


图 2使用 Foresight Nuvia aPrime 4A 层析法捕获 AAV8。
A，使用缓冲液 B，2 M NaCl 捕获和洗脱 AAV8 的层析图 (—)，以0.1，0.2，0.5 和 2 M NaCl 步进进行。OD 260 (—)；OD 280 (—)；电导率 (—)。**B**，Nuvia aPrime 4A 捕获步骤中 AAV8 总颗粒和含基因组颗粒的产率以及蛋白质和 DNA 的残留百分比。0.1 M NaCl (■)；0.2 M NaCl (■)；0.5 M NaCl (■)；2 M NaCl (■)；FT (■)。AU，吸光度单位；FT，流穿液。

在既定条件下，将其放大至 5 ml Foresight Nuvia aPrime 4A 柱。正如在 1 ml 柱实验中观察到的，在 200 mM NaCl 级分中获得了完整病毒颗粒富集。在 5 ml 规模下，评估了将停留时间从 1 min 增加到 3 min 的效果，结果显示对 AAV8 回收率或杂质清除率没有相关影响（数据未显示）。

测定了 Nuvia aPrime 4A 填料在 1 min 停留时间下的动态结合载量 (DBC)，得到的填料为 2.4 x 10^{13} 总颗粒/ml。

对 Nuvia aPrime 4A 填料用作精纯步骤的评估

通过将捕获步骤中的 200 mM NaCl 组分（按 1:5 稀释，将电导率降至约 5 mS/cm）上样到 Foresight Nuvia aPrime 4A 柱，对 Nuvia HP-Q 层析法后作为精纯填料的 Nuvia aPrime 4A 的层析进行了评估。在 Nuvia aPrime 4A 柱的 200 mM NaCl 洗脱液中观察到完整病毒颗粒富集（图 3），这与使用该填料作为捕获步骤时的情况类似。在 5 ml 层析柱中，该组分中完整病毒颗粒的回收率高于 1 ml 层析柱（约 67% vs. 32%）。为了回收在 500 mM NaCl 洗脱的 AAV8 颗粒（占总颗粒的 22% 和含基因组颗粒的 18%），运行了 60 个柱体积的 200 至 500 mM 线性 NaCl 梯度。结果表明，大多数 AAV8 颗粒在 100 和 200 mM NaCl 步进中洗脱（分别占总颗粒的 58% 和 14% 以及含基因组颗粒的 54% 和 32%），并且与之前的运行结果相吻合，在 200 mM NaCl 步骤中实现了完整病毒颗粒富集。捕获柱洗脱液中超过 70% 的蛋白质在 500 mM 和 2 M NaCl 步进中洗脱。富集的完整病毒颗粒组分中的 DNA 残留量低于 10 ng/ml 的检测限，表明 Nuvia aPrime 4A 填料对 DNA 的清除非常有效。

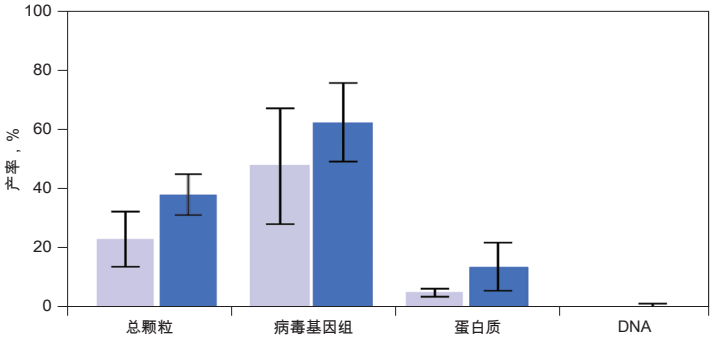


图 3使用 Nuvia HP-Q 和 Nuvia aPrime 4A 层析法进行两步纯化（ ）和使用 Nuvia aPrime 4A 层析法进行单步纯化（■）的 AAV8 回收率和残留杂质比较。

评估 Nuvia HP-Q 和Nuvia aPrime 4A 填料在分离完整和空衣壳时的效果

虽然使用 Nuvia HP-Q 填料作为捕获步骤时没有观察到完整衣壳富集，但 Nuvia aPrime 4A 填料在洗脱步骤中，特别是在 0.2 M NaCl 步进洗脱中，可将空衣壳与完整衣壳分离开来。如图 4 所示，Nuvia aPrime 4A 填料用作捕获步骤或精纯步骤时，表现出了相似的 AAV 病毒完整病毒颗粒和 AAV 病毒空颗粒分离效果。当 Nuvia aPrime 4A 填料用作精纯步骤时，完整病毒颗粒富集率提高了 1.7 倍，而当其用作捕获步骤时，完整病毒颗粒富集率提高了 1.6 倍。

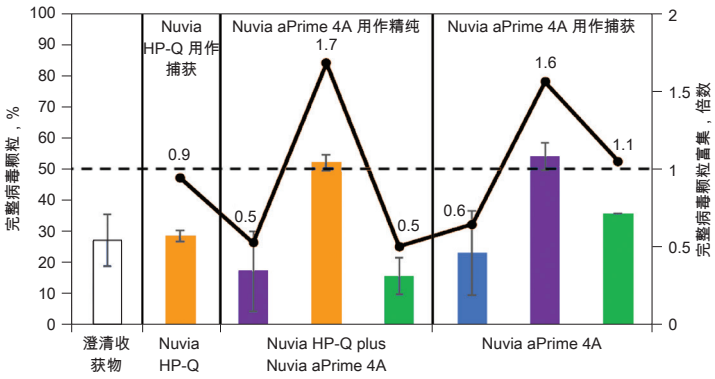


图 4从各个纯化步骤中回收并富集 AAV8 完整病毒颗粒。澄清收获物纯化经 Nuvia HP-Q，Nuvia HP-Q plus Nuvia aPrime 4A，或 Nuvia aPrime 4A 填料进行纯化，并采用 0.1 M NaCl (■)；0.2 M NaCl (■)；0.5 M NaCl (■) 步进洗脱。完整病毒颗粒 50% 产率 (---)；富集倍数 (—)。

结论

在上述研究中，我们发现阴离子交换层析法和多模式层析法能够有效纯化 AAV8。当 Nuvia HP-Q 填料用作捕获步骤时，在 200 mM NaCl 步进中进行 AAV8 洗脱，可获得高回收率，但是空颗粒和完整病毒颗粒之间没有明显分离。DNA 和蛋白质随病毒一起被洗脱。使用 Nuvia aPrime 4A 层析作为 Nuvia HP-Q 层析之后的精纯步骤，在 200 mM NaCl 组分中富集。获得高回收率和优异的杂质清除率。两种填料均具有较高的 DBC。该工艺流程可作为传统亲和法和超速离心梯度纯化工艺的替代方案，具有更灵活，更经济的特点。

参考资料

Asher DR et al. (2020). Clinical development on the frontier: Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy.Expert Opin Biol Ther 20, 263–274.

Deorkar N (2022). Solving cost and supply challenges in biopharma downstream processing.https://www.avantorsciences.com/pages/en/thought-leadership-solving-cost-and-supply-challenges-in-biopharma-downstream-processing，于 2023 年 10 月 24 日访问

de Rooij J et al. (2019). Upstream and downstream solutions for AAV manufacturing. Cell Gene Ther Insights 5, 1,017–1,029.

Dobrowsky T et al. (2021). AAV manufacturing for clinical use: Insights on current challenges from the upstream process perspective. Curr Opin Biomed Eng 20, 100353.

致谢

本应用说明中的研究是 Bio-Rad 和葡萄牙 iBET 之间的研究合作项目的成果。

请访问**bio-rad.com/library**，了解更多信息并索取样品。

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Website *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *00 800 00 24 67 23* ***Belgium*** *00 800 00 24 67 23* ***Brazil*** *4003 0399*
Canada *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *00 800 00 24 67 23* ***Denmark*** *00 800 00 24 67 23* ***Finland*** *00 800 00 24 67 23*
France *00 800 00 24 67 23* ***Germany*** *00 800 00 24 67 23* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *00 800 00 24 67 23* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *0 3 9636050*
Italy *00 800 00 24 67 23* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 080 007 7373* ***Luxembourg*** *00 800 00 24 67 23* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
The Netherlands *00 800 00 24 67 23* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *00 800 00 24 67 23* ***Poland*** *00 800 00 24 67 23* ***Portugal*** *00 800 00 24 67 23*
Russian Federation *00 800 00 24 67 23* ***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *00 800 00 24 67 23* ***Spain*** *00 800 00 24 67 23* ***Sweden*** *00 800 00 24 67 23*
Switzerland *00 800 00 24 67 23* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 651 8311* ***United Arab Emirates*** *36 1 459 6150* ***United Kingdom*** *00 800 00 24 67 23*

Bulletin 3586 Ver B CN US/EG *24-0302 0424 Sig 0124*