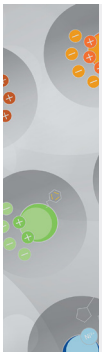

利用 CHT™ 陶瓷羟基磷灰石填料实现慢病毒载体纯化的指南

CHT 陶瓷羟基磷灰石

简介

细胞和基因治疗 (CGT) 是现代医疗保健行业中的一种突破性方法，为以前无法治愈的疾病提供颇有前景的治疗方案。通过基因或细胞水平的靶标，CGT 为多种疾病提供非凡的前景。因此，该方法已成为现代医疗保健行业发展最快的领域之一。近期，FDA 批准将 Lyfgenia（慢病毒载体）和 Casgevy (CRISPR-Cas9) 用于治疗镰状细胞病（2023 年美国 FDA），这证明对于以前治疗方案有限的疾病，基因治疗可以提供有效的方案。

慢病毒是逆转录病毒家族的包膜病毒，它们作为慢病毒载体 (LVV) 处于这些新治疗方案的前沿。作为载体，LVV 用于将基因有效地传递到各种细胞中，实现转基因表达。因此，慢病毒的用途广泛，包括功能基因组、重组蛋白生产和临床基因治疗（Ghosh 等人，2022 年，Moreira 等人，2021 年）。

尽管 LVV 具有通用性，但其生产仍存在挑战，比如低功能病毒滴度和高杂质水平。随着用途从体外细胞转导扩展到体内给药，对杂质去除的监管要求预计会增加。本文旨在指导科学家和制药公司使用 CHT 陶瓷羟基磷灰石填料克服 LVV 纯化挑战。

CHT 陶瓷羟基磷灰石填料

作为层析填料，CHT 陶瓷羟基磷灰石是球形、大孔形式的羟基磷灰石，以其物理和化学稳定性而闻名（表 1）。CHT 是配体和基质一体的多模式填料，表现为：与钙位点（C 位点）的金属螯合作用和与磷酸盐位点（P 位点）的阳离子交换作用。这些位点允许 CHT 可以独特而精准的分离各种治疗性药物，包括病毒（Kurosawa 等人，2012 年）。

表 1CHT II 型填料特性

官能团	Ca^{2+}，PO_4^{3-}，OH^-
平均颗粒大小	40 ± 4 µm 和 80 ± 8 µm
线性流速范围	50-400 厘米/小时
操作 pH 值范围	6.5–14
消毒	1-2 N NaOH
高压灭菌	121ºC，20 分钟，磷酸盐缓冲盐水，pH 7
密度，g/ml 床	0.63 g/ml

盐对 LVV 纯化的影响

LVV 的等电点 (pI) 介于 6.0 和 6.5 之间，因此在中性 pH 条件下带负电荷。阴离子交换层析法 (AEX) 是常用的 LVV 纯化策略，在该方法中，强和弱 AEX 填料均用于下游纯化。然而，从 AEX 填料中洗脱 LVV 需要高氯化钠浓度（高达 1 M），这对于 LVV 稳定性非常不利。在带有 1 M 氯化钠的不同缓冲液中培养时，LVV 的感染滴度显著下降，其中在 pH 7 的磷酸盐条件下，下降幅度最小（Ghosh 等人，2022 年）。

要提高 LVV 对 CHT 陶瓷羟基磷灰石填料的吸附，需要添加氯化钠（表 2）。为证明这一点，分别在添加和不添加氯化钠的条件下进行了纯化（图 1）。通过使用流式细胞术检测感兴趣的基因，即转导绿色荧光蛋白 (GFP)，测量 LVV 的感染滴度（图 2）。未添加氯化钠时，在从梯度洗脱过程中获得的组分中，仅检测到 51.7% 的总感染 LVV。而当平衡和洗脱缓冲液中添加了氯化钠时，这一比例增加至 99.8%。因此，建议添加适宜浓度的氯化钠，从而确保 LVV 稳定性，并提高纯化性能。

表 2实验条件

层析柱	4.6 x 35 mm
填料	CHT II 型 40 µm
样品	MpGFP HEK 293T 上清液，3.9 x 10^7 IU/ml，含 10% FBS
缓冲液 A	▪ 10 mM 磷酸钠，pH 7.2 ▪ 10 mM 磷酸钠，150 mM 氯化钠，pH 7.2
缓冲液 B	▪ 400 mM 磷酸钠，pH 7.2 ▪ 400 mM 磷酸钠，150 mM 氯化钠，pH 7.2
流速	360 厘米/小时

FBS，胎牛血清。

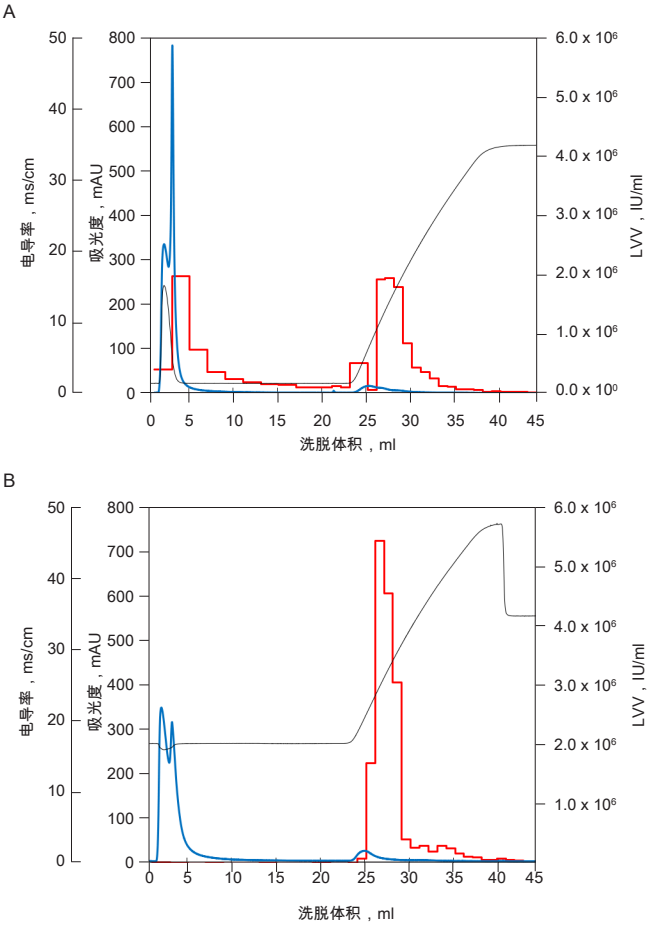

图 1未添加氯化钠 (A) 的 LVV 的吸附性，和在平衡缓冲液（缓冲液 A）与洗脱缓冲液（缓冲液 B）中添加了氯化钠 (B) 的 LVV 的吸附性将样品 (1 ml) 上样到层析柱，不做任何调整，并使用相应的平衡缓冲液（缓冲液 A）进行清洗，然后执行梯度洗脱（缓冲液 B）。通过使用流式细胞术 (—) 检测 MpGFP，测量慢病毒载体滴度 (IU/ml)。未添加氯化钠时 (**A**)，在上样和清洗组分中发现了 48.3% 的总感染病毒颗粒，在洗脱组分中发现了 51.7%。添加了氯化钠时 (**B**)，在上样和清洗组分中发现了 0.2% 的总感染病毒颗粒，在洗脱组分中发现了 99.8%。在 280 nm 时测量 UV 吸光度 (—)，并监测电导率 (—)。LVV，慢病毒载体。

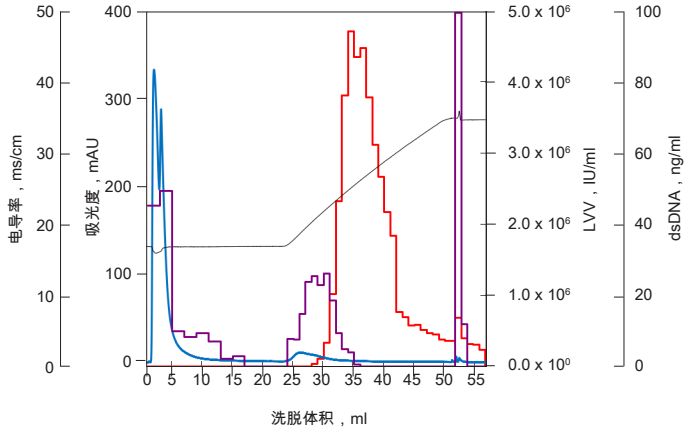

图 2分离流式细胞术检测到的感染 LVV。通过测量 GFP (—) 检测到的感染 LVV 在磷酸盐梯度开始时与蛋白质杂质分离，通过 UV 280 检测 (—)，并在梯度结束时与 dsDNA 杂质分离，通过 PicoGreen 检测 (—)。监测电导率 (—)。LVV，慢病毒载体。

工艺流程建议

可轻松确定适当的清洗和洗脱条件，以便从感染 LVV 中去除杂质。要实现有效的杂质去除率，建议采用以下工艺流程作为初步纯化策略（图 3）。表 3 列出了用于磷酸盐梯度洗脱的建议缓冲液。

图 3利用 CHT 陶瓷羟基磷灰石填料初步纯化 LVV 的建议工艺流程和缓冲液 LVV，慢病毒载体。

表 3适用于磷酸盐梯度洗脱实验的建议缓冲液

步骤名称	缓冲液组成	详细信息
平衡	10 mM 磷酸盐， 150 mM NaCl	直至 pH 和电导率稳定
样品上样	已澄清，不需要去除血清	10^7 IU/ml 的填料*
清洗	10 mM 磷酸钠， 150 mM NaCl	确保在清洗时检测到最小 LVV
洗脱	300 mM 磷酸钠， 150 mM NaCl	从 20 CV 开始，根据需要调整梯度

CV，柱体积；LVV，慢病毒载体。
* 初步实验的建议填料上样数量。实际样品上样数量将取决于慢病毒特点和上样条件。

所示结果表明，CHT 陶瓷羟基磷灰石填料能够与 LVV 良好结合，同时与感染 LVV 主峰保持有效的蛋白质和 DNA 分离。此外，可使用带有最少氯化钠的磷酸盐对 LVV 进行洗脱 (~150 mM)。与需要更高氯化钠浓度的典型阴离子交换填料相比（Ghosh 等人，2022 年），LVV 的 CHT 填料洗脱条件明显更温和，LVV 稳定性预计将得以提高。CHT 陶瓷羟基磷灰石 II 型填料可应对 LVV 生产和纯化带来的挑战，并在同一系列填料中获得类似结果。

致谢

实验由东京大学医科学研究所基因和细胞治疗中心分子和医学遗传学部门 Takashi Okada 教授的团队和 HOYA Technosurgical Corporation 联合开展。本研究文章得到了 HOYA Technosurgical Corporation 的支持。

参考资料

Ghosh R et al. (2022). Evaluation of lentiviral vector stability and development of ion exchange purification processes.Biotechnol Prog 38, e3286.

Kurosawa Y et al. (2012). Purification of dengue virus particles by one-step ceramic hydroxyapatite chromatography.World J Vaccines 02, 155–160.

Moreira AS et al. (2021). Advances in lentivirus purification. Biotechnol J 16, e2000019.

U.S. Food and Drug Administration (2023). FDA Approves First Gene Therapies to Treat Patients with Sickle Cell Disease. fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease, accessed June 28, 2024.

请访问 bio-rad.com/CHT，了解更多信息并索取样品。

BIO-RAD 和 CHT 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 在某些司法管辖区内的商标。
本文使用的所有商标均为其各自所有者的财产。© 2024 Bio-Rad Laboratories, Inc.

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 3685 Ver A CN US/EG *24-0399 0724 Sig 0124*