



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114173827 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 28

(21) 申请号 202080055070.0

(22) 申请日 2020.06.26

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114173827 A

(43) 申请公布日 2022.03.11

(30) 优先权数据  
62/868,282 2019.06.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.01.28

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2020/039971 2020.06.26

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/264411 EN 2020.12.30

(73) 专利权人 武田药品工业株式会社  
地址 日本国大阪府大阪市中央区道修町四  
丁目1番1号

(72) 发明人 C·菲德勒 M·施耐德  
M·哈斯拉赫 J·科恩

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300  
专利代理师 汤国华

(51) Int.Cl.  
A61K 48/00 (2006.01)  
C12N 7/00 (2006.01)  
C12N 7/02 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 15/864 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2016128408 A1, 2016.08.18  
审查员 王斯奇

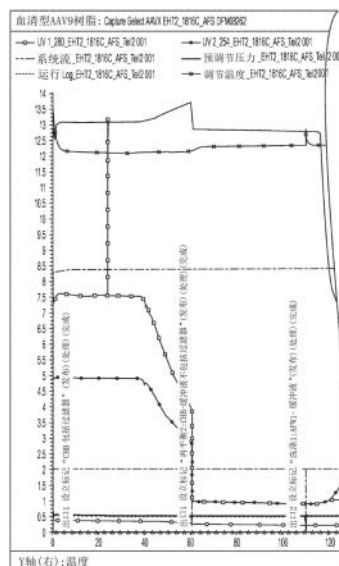
权利要求书5页 说明书75页 附图8页

(54) 发明名称

腺相关病毒纯化方法

(57) 摘要

本文提供了生产腺相关病毒(AAV)产品的方法和纯化腺相关病毒的方法。将AAV加样到亲和树脂上,在室温下进行洗涤步骤,并且在较低温度下从亲和树脂上洗脱AAV。本文公开了用于洗涤步骤和洗脱的各种缓冲液。



1. 纯化腺相关病毒(AAV)的方法,其中,所述方法包括:
  - (a) 在室温和允许溶液中的AAV与亲和树脂结合的条件下,将含有AAV的溶液加样到针对AAV的亲和树脂上;
  - (b) 在室温下进行至少一个洗涤步骤;以及
  - (c) 在1°C至12°C的温度下从亲和树脂上洗脱AAV;其中,所述AAV为AAV9,所述亲和树脂为POROS™ CaptureSelect™ AAVx树脂。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(c)中的温度为2°C至8°C。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述方法还包括:在将含有AAV的溶液加样到亲和树脂上之前,使含有AAV的溶液与阴离子交换剂接触,以及从阴离子交换剂中洗脱含有AAV的溶液。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,在室温下进行至少2个洗涤步骤。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,在室温下进行至少3个洗涤步骤。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中,在室温下进行至少4个洗涤步骤。
7. 根据权利要求4所述的方法,其中,进行2个洗涤步骤。
8. 根据权利要求5所述的方法,其中,进行3个洗涤步骤。
9. 根据权利要求6所述的方法,其中,进行4个洗涤步骤。
10. 根据权利要求4至9中任一项所述的方法,其中,所述洗涤步骤连续地进行。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含10mM至200mM的TrisHCl和50mM至500mM的盐。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含25mM至100mM的TrisHCl和75mM至250mM的盐。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含40mM至60mM的TrisHCl和100mM至150mM的盐。
14. 根据权利要求11至13中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为7.5至9.2。
15. 根据权利要求11至13中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为8.0至9.0。
16. 根据权利要求11至13中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为8.0至8.8。
17. 根据权利要求14至16中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含50mM的TrisHCl和125mM的盐,pH为8.5。
18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含10mM至2000mM的乙酸钠和0.001%至1%w/w的聚山梨醇酯80。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含50mM至200mM的乙酸钠和0.005%至0.3%w/w的聚山梨醇酯80。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含90mM至110mM的乙酸钠和0.05%至0.2%w/w的聚山梨醇酯80。
21. 根据权利要求18至20中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为5.0至7.4。

22. 根据权利要求18至20中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为5.5至7.0。

23. 根据权利要求18至20中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为5.5至6.5。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含100mM的乙酸钠和0.1%w/w的聚山梨醇酯80,pH为6.0。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含10mM至200mM的TrisHCl和10%至75%w/w的乙二醇。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含25mM至100mM的TrisHCl和25%至70%w/w的乙二醇。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含40mM至60mM的TrisHCl和40%至60%w/w的乙二醇。

28. 根据权利要求25至27中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为7.5至9.2。

29. 根据权利要求25至27中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为8.0至9.0。

30. 根据权利要求25至27中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为8.0至8.8。

31. 根据权利要求28至30中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含50mM的TrisHCl和50%w/w的乙二醇,pH为8.5。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含10mM至200mM的甘氨酸、1mM至100mM的组氨酸、20mM至500mM的盐、1%至10%w/w的海藻糖和0.0005%至1%w/w的聚山梨醇酯80。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含30mM至80mM的甘氨酸、5mM至20mM的组氨酸、50mM至200mM的盐、3%至8%w/w的海藻糖和0.001%至0.1%w/w的聚山梨醇酯80。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含40mM至60mM的甘氨酸、5mM至15mM的组氨酸、90mM至110mM的盐、4%至6%w/w的海藻糖和0.001%至0.05%w/w的聚山梨醇酯80。

35. 根据权利要求32至34中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为6.0至8.0。

36. 根据权利要求32至34中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为6.5至7.5。

37. 根据权利要求32至34中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为7.0至7.4。

38. 根据权利要求35至37中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含50mM的甘氨酸、10mM的组氨酸、100mM的盐、5%w/w的海藻糖和0.005%w/w的聚山梨醇酯80,pH为7.0。

39. 根据权利要求1至38中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含1mM至

200mM的TrisHCl、50mM至500mM的盐和0.001%至1%w/w的聚山梨醇酯80。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含5mM至50mM的TrisHCl、75mM至250mM的盐和0.005%至0.3%w/w的聚山梨醇酯80。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含10mM至30mM的TrisHCl、140mM至160mM的盐和0.05%至0.2%w/w的聚山梨醇酯80。

42. 根据权利要求39至41中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为6.0至8.8。

43. 根据权利要求39至41中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为6.5至8.5。

44. 根据权利要求39至41中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液的pH为7.0至8.0。

45. 根据权利要求42至44中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗涤缓冲液包含20mM的TrisHCl、150mM的盐和0.1%w/w的聚山梨醇酯80,pH为7.4。

46. 根据权利要求1至45中任一项所述的方法,其中,步骤(c)包括用至少一种洗脱缓冲液洗脱AAV。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中,至少一种洗脱缓冲液与至少一种洗涤缓冲液相同。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中,至少一种洗脱缓冲液与在步骤(c)中洗脱AAV之前最后的洗涤步骤中所用的最后的洗涤缓冲液相同。

49. 根据权利要求47所述的方法,其中,第一洗脱缓冲液与在步骤(c)中洗脱AAV之前最后的洗涤步骤中所用的最后的洗涤缓冲液相同。

50. 根据权利要求46至49中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗脱缓冲液包含10mM至200mM的甘氨酸、1mM至100mM的组氨酸、20mM至500mM的盐、1%至10%w/w的海藻糖和0.0005%至1%w/w的聚山梨醇酯80。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述至少一种洗脱缓冲液包含30mM至80mM的甘氨酸、5mM至20mM的组氨酸、50mM至200mM的盐、3%至8%的海藻糖和0.001%至0.1%w/w的聚山梨醇酯80。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中,所述至少一种洗脱缓冲液包含40mM至60mM的甘氨酸、5mM至15mM的组氨酸、90mM至110mM的盐、4%至6%w/w的海藻糖和0.001%至0.05%w/w的聚山梨醇酯80。

53. 根据权利要求50至52中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗脱缓冲液的pH为6.0至8.0。

54. 根据权利要求50至52中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗脱缓冲液的pH为6.5至7.5。

55. 根据权利要求50至52中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗脱缓冲液的pH为7.0至7.4。

56. 根据权利要求53至55中任一项所述的方法,其中,所述至少一种洗脱缓冲液包含50mM的甘氨酸、10mM的组氨酸、100mM的盐、5%w/w的海藻糖和0.005%w/w的聚山梨醇酯80,pH为7.0。

57. 根据权利要求46至56中任一项所述的方法, 其中, 所述至少一种洗脱缓冲液包含1mM至200mM的TrisHCl、50mM至500mM的盐和0.001%至1%w/w的聚山梨醇酯80。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中, 所述至少一种洗脱缓冲液包含5mM至50mM的TrisHCl、75mM至250mM的盐和0.005%至0.3%w/w的聚山梨醇酯80。

59. 根据权利要求58所述的方法, 其中, 所述至少一种洗脱缓冲液包含10mM至30mM的TrisHCl、140mM至160mM的盐和0.05%至0.2%w/w的聚山梨醇酯80。

60. 根据权利要求57至59中任一项所述的方法, 其中, 所述至少一种洗脱缓冲液的pH为6.0至8.8。

61. 根据权利要求57至59中任一项所述的方法, 其中, 所述至少一种洗脱缓冲液的pH为6.5至8.5。

62. 根据权利要求57至59中任一项所述的方法, 其中, 所述至少一种洗脱缓冲液的pH为7.0至8.0。

63. 根据权利要求60至62中任一项所述的方法, 其中, 所述至少一种洗脱缓冲液包含20mM的TrisHCl、150mM的盐和0.1%w/w的聚山梨醇酯80, pH为7.4。

64. 根据权利要求1至63中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤和第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含10mM至200mM的TrisHCl和50mM至500mM的盐, pH为7.5至9.2; 以及

第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含10mM至2000mM的乙酸钠和0.001%至1%w/w的聚山梨醇酯80, pH为5.0至7.4。

65. 根据权利要求1至63中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤和第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含10mM至2000mM的乙酸钠和0.001%至1%w/w的聚山梨醇酯80, pH为5.0至7.4; 以及

第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含10mM至200mM的TrisHCl和50mM至500mM的盐, pH为7.5至9.2。

66. 根据权利要求1至63中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤和第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含10mM至200mM的TrisHCl和50mM至500mM的盐, pH为7.5至9.2; 以及

第二洗涤步骤和第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含10mM至2000mM的乙酸钠和0.001%至1%w/w的聚山梨醇酯80, pH为5.0至7.4。

67. 根据权利要求1至63中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤和第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含10mM至2000mM的乙酸钠和0.001%至1%w/w的聚山梨醇酯80, pH为5.0至7.4; 以及

第二洗涤步骤和第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含10mM至200mM的TrisHCl和50mM至500mM的盐, pH为7.5至9.2。

68. 根据权利要求64或66所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤和第三洗涤步骤中分别所用的第一缓冲液和第三缓冲液各自包含50mM的TrisHCl和125mM的盐, pH为8.5。

69. 根据权利要求65或67所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤和第三洗涤步骤中分别所用的第一缓冲液和第三缓冲液各自包含100mM的乙酸钠和0.1%w/w的聚山梨醇酯80, pH为6.0。

70. 根据权利要求64或66所述的方法,其中,第二洗涤步骤中所用的第二缓冲液包含100mM的乙酸钠和0.1%w/w的聚山梨醇酯80,pH为6.0。

71. 根据权利要求65或67所述的方法,其中,第二洗涤步骤中所用的第二缓冲液包含50mM的TrisHCl和125mM的盐,pH为8.5。

72. 根据权利要求66所述的方法,其中,第四洗涤步骤中所用的第四缓冲液包含100mM的乙酸钠和0.1%w/w的聚山梨醇酯80,pH为6.0。

73. 根据权利要求67所述的方法,其中,第四洗涤步骤中所用的第四缓冲液包含50mM的TrisHCl和125mM的盐,pH为8.5。

74. 根据权利要求64或67所述的方法,其中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含10mM至200mM的TrisHCl和50mM至500mM的盐,pH为7.5至9.2。

75. 根据权利要求65或66所述的方法,其中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含10mM至2000mM的乙酸钠和0.001%至1%w/w的聚山梨醇酯80,pH为5.0至7.4。

76. 根据权利要求74所述的方法,其中,所述缓冲液包含50mM的TrisHCl和125mM的盐,pH为8.5。

77. 根据权利要求75所述的方法,其中,所述缓冲液包含100mM的乙酸钠和0.1%w/w的聚山梨醇酯80,pH为6.0。

78. 根据权利要求11至77中任一项所述的方法,其中,所述盐选自:NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl或乙酸钠。

79. 根据权利要求11至77中任一项所述的方法,其中,所述盐选自:NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl或乙酸钠中的一种以上的组合。

80. 根据权利要求78所述的方法,其中,所述盐为NaCl。

81. 根据权利要求11至17、64至68、71、73或74中任一项所述的方法,其中,所述缓冲液包含50mM TrisHCl和125mM NaCl,pH为8.5。

82. 根据权利要求1至81中任一项所述的方法,其中,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平为99.0%以上。

83. 根据权利要求1至82中任一项所述的方法,其中,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平为99.9%以上。

84. 根据权利要求1至83中任一项所述的方法,其中,由洗脱步骤(c)洗脱的至少60%的AAV衣壳为完整AAV衣壳。

85. 根据权利要求1至84中任一项所述的方法,其中,所述AAV9包含肽,所述肽包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3的序列。

## 腺相关病毒纯化方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年6月28日提交的美国临时申请号62/868,282的优先权,其公开内容通过引用整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及纯化腺相关病毒(AAV)的材料和方法。

### 背景技术

[0004] 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种小的无包膜病毒,其包裹有线性单链DNA基因组。由于AAV的增殖性感染仅在辅助病毒(例如腺病毒或疱疹病毒)存在下发生, AAV属于细小病毒科依赖病毒属。

[0005] 为了在临床中安全使用AAV,已对AAV基因组内的几个位置进行了基因修饰。例如,已从许多病毒载体中的AAV基因组中去除病毒复制所需的Rep基因和位点特异性整合所需的元件。此种重组AAV(rAAV)以染色体外状态存在,在基因组DNA中的整合效率非常低。因此,rAAV在宿主细胞中诱导随机突变的可能性即使没有完全消除也会降低。由于这些特性和缺乏致病性,rAAV作为基因治疗载体在临床前和临床应用的多个方面显示出极大前景。

[0006] 尽管已投入很大努力来设计高效、大规模的方法来纯化适合人类施用的AAV产品,但仍需要更好的AAV纯化方法。在AAV的纯化过程中,可以更有效地去除宿主细胞培养基质中的各种其他蛋白质和材料。因此,需要包括从最终AAV产品中去除宿主细胞材料的步骤的AAV纯化方法。

### 发明内容

[0007] 在细胞培养中产生AAV载体的一个特征是复杂基质(包含来自破碎细胞的材料)的形成。特别地,宿主细胞蛋白、蛋白酶体、细胞碎片和潜在病毒特异性受体通常存在于来自破碎细胞的材料中。所公开的方法包括在生理适用的pH下产生更高纯度的条件下从最终AAV产品中去除宿主细胞材料的步骤。

[0008] 在一个方面,本文提供了纯化腺相关病毒(AAV)的方法,该方法包括:

[0009] (a) 在允许溶液中AAV与亲和树脂结合的条件下,将含有AAV的溶液加样到针对AAV上的表位的亲和树脂上;

[0010] (b) 在室温下进行至少一个洗涤步骤;以及

[0011] (c) 在低于18°C的温度下从亲和树脂上洗脱AAV。

[0012] 室温为18°C至26°C。室温可以为18°C、18.5°C、19°C、19.5°C、20°C、20.5°C、21°C、21.5°C、22°C、22.5°C、23°C、23.5°C、24°C、24.5°C、25°C、25.5°C或26°C。室温可以为18°C、约18.5°C、约19°C、约19.5°C、约20°C、约20.5°C、约21°C、约21.5°C、约22°C、约22.5°C、约23°C、约23.5°C、约24°C、约24.5°C、约25°C、约25.5°C或26°C。

[0013] 在一些实施方式中,步骤(c)中的温度为1°C至12°C。在一些实施方式中,步骤(c)

中的温度为2℃至8℃。在一些实施方式中,步骤(c)中的温度为1℃、1.5℃、2℃、2.5℃、3℃、3.5℃、4℃、4.5℃、5℃、5.5℃、6℃、6.5℃、7℃、7.5℃、8℃、8.5℃、9℃、9.5℃、10℃、10.5℃、11℃、11.5℃或12℃。在一些实施方式中,步骤(c)中的温度为约1℃、约1.5℃、约2℃、约2.5℃、约3℃、约3.5℃、约4℃、约4.5℃、约5℃、约5.5℃、约6℃、约6.5℃、约7℃、约7.5℃、约8℃、约8.5℃、约9℃、约9.5℃、约10℃、约10.5℃、约11℃、约11.5℃或约12℃。

[0014] 在一些实施方式中,该方法还包括:在将含有AAV的溶液加样到亲和树脂上之前,使含有AAV的溶液与阴离子交换剂接触,以及从阴离子交换剂上洗脱含有AAV的溶液。

[0015] 在一些实施方式中,由洗脱步骤获得的AAV的HC杂质水平为 $\leq 99.9\%$ 。在一些实施方式中,由洗脱步骤获得的AAV的HC杂质水平为 $\leq 99.0\%$ 。

[0016] 在一些实施方式中,AAV为AAV9。在一些实施方式中,AAV9包含野生型VP1。在一些实施方式中,AAV9包含SEQ ID NO:1的VP1。

[0017] 在一些实施方式中,该方法还包括:使含有AAV的溶液与过滤器接触,所述过滤器包含带正电荷的基团,所述带正电荷的基团可有效耗竭含有AAV的溶液中的酸性带电污染物。

[0018] 在一些实施方式中,该方法还包括:对AAV级分进行纳滤,去除大于35nm的病毒。

[0019] 在一些实施方式中,该方法还包括精制(polish)步骤,所述精制步骤包括进行阳离子交换色谱。

[0020] 在一些实施方式中,该方法还包括:通过AAV特异性ELISA检测AAV级分。

[0021] 在一些实施方式中,AAV特异性ELISA为对AAV具有特异性的夹心ELISA。

[0022] 在另一方面,本文提供了通过上述任何方法生产的AAV产品。

[0023] 在一个方面,本文提供了纯化腺相关病毒(AAV)的方法,该方法包括:(a)在室温和允许溶液中的AAV与亲和树脂结合的条件下,将含有AAV的溶液加样到针对AAV的亲和树脂上;(b)在室温下进行至少一个洗涤步骤;(c)在低于18℃的温度下从亲和树脂上洗脱AAV。

[0024] 在一些实施方式中,步骤(c)中的温度为1℃至12℃。在一些实施方式中,步骤(c)中的温度为2℃至8℃。

[0025] 在一些实施方式中,该方法还包括:在将含有AAV的溶液加样到亲和树脂上之前,使含有AAV的溶液与阴离子交换剂接触,以及从阴离子交换剂上洗脱含有AAV的溶液。

[0026] 在一些实施方式中,在室温下进行至少2个洗涤步骤。在一些实施方式中,在室温下进行至少3个洗涤步骤。在一些实施方式中,在室温下进行至少4个洗涤步骤。

[0027] 在一些实施方式中,进行2个洗涤步骤。在一些实施方式中,进行3个洗涤步骤。在一些实施方式中,进行4个洗涤步骤。

[0028] 在一些实施方式中,洗涤步骤连续地进行。

[0029] 在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,洗涤缓冲液的pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。

[0030] 在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,洗涤缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6.5或约6.0。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。

[0031] 在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约10%至约75% (w/w) 乙二醇。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约25%至约70% (w/w) 乙二醇。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约40%至约60% (w/w) 乙二醇。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇。在一些实施方式中,洗涤缓冲液的pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇,pH为约8.5。

[0032] 在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约200mM甘氨酸、约1mM至约100mM组氨酸、约20mM至约500mM盐、约1%至约10% (w/w) 海藻糖和约0.0005%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约30mM至约80mM甘氨酸、约5mM至约20mM组氨酸、约50mM至约200mM盐、约3%至约8% (w/w) 海藻糖和约0.001%至约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约40mM至约60mM甘氨酸、约5mM至约15mM组氨酸、约90mM至约110mM盐、约4%至约6% (w/w) 海藻糖和约0.001%至约0.05% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM甘氨酸、约10mM组氨酸、约100mM盐、约5% (w/w) 海藻糖和约0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,洗涤缓冲液的pH为约6.0至约8.0、约6.5至约7.5、约7.0至约7.4,或约7.0。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM甘氨酸、约10mM组氨酸、约100mM盐、约5% (w/w) 海藻糖和约0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约7.0。

[0033] 在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约1mM至约200mM TrisHCl、约50mM至约500mM盐和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约5mM至约50mM TrisHCl、约75mM至约250mM盐和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约30mM TrisHCl、约140mM至约160mM盐和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约20mM TrisHCl、约150mM盐和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,洗涤缓冲液的pH为约6.0至约8.8、约6.5至约8.5、约7.0至约8.0,或约7.4。在一些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含约20mM TrisHCl、约150mM盐和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约7.4。

[0034] 在一些实施方式中,步骤(c)包括用至少一种洗脱缓冲液洗脱AAV。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液与至少一种洗涤缓冲液相同。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液与在步骤(c)中洗脱AAV之前最后的洗涤步骤中所用的最后的洗涤缓冲液相同。在一些实施方式中,第一洗脱缓冲液与在步骤(c)中洗脱AAV之前最后的洗涤步骤中所用的最后

的洗涤缓冲液相同。

[0035] 在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,洗脱缓冲液的pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。

[0036] 在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,洗脱缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6.5,或约6.0。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。

[0037] 在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约10%至约75% (w/w) 乙二醇。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约25%至约70% (w/w) 乙二醇。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约40%至约60% (w/w) 乙二醇。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇。在一些实施方式中,洗脱缓冲液的pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇,pH为约8.5。

[0038] 在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约10mM至约200mM甘氨酸、约1mM至约100mM组氨酸、约20mM至约500mM盐、约1%至约10% (w/w) 海藻糖和约0.0005%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约30mM至约80mM甘氨酸、约5mM至约20mM组氨酸、约50mM至约200mM盐、约3%至约8%的海藻糖和约0.001%至约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约40mM至约60mM的甘氨酸、约5mM至约15mM的组氨酸、约90mM至约110mM盐、约4%至约6% (w/w) 海藻糖和约0.001%至约0.05% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约50mM甘氨酸、约10mM组氨酸、约100mM盐、约5% (w/w) 海藻糖和约0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,洗脱缓冲液的pH为约6.0至约8.0、约6.5至约7.5、约7.0至约7.4,或约7.0。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约50mM甘氨酸、约10mM组氨酸、约100mM盐、约5% (w/w) 海藻糖和约0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约7.0。

[0039] 在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约1mM至约200mM TrisHCl、约50mM至约500mM盐和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约5mM至约50mM TrisHCl、约75mM至约250mM盐和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约10mM至约30mM TrisHCl、约140mM至约160mM盐和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一

种洗脱缓冲液包含约20mM TrisHCl、约150mM盐和0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,洗脱缓冲液的pH为约6.0至约8.8、约6.5至约8.5、约7.0至约8.0,或约7.4。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液包含约20mM TrisHCl、约150mM盐和0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约7.4。

[0040] 在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5的缓冲液。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。

[0041] 在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,第一洗涤步骤、第二洗涤步骤、第三洗涤步骤和/或第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。

[0042] 在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5的第一缓冲液。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM TrisHCl和

约125mM盐,pH为约8.5。

[0043] 在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第二洗涤缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。

[0044] 在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5的第三缓冲液。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。

[0045] 在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,洗脱洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5的缓冲液。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。

[0046] 在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5的第一缓冲液。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM TrisHCl和

约125mM盐,pH为约8.5。

[0047] 在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第二洗涤缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。

[0048] 在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5的第三缓冲液。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。

[0049] 在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第四洗涤缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。

[0050] 在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,洗脱缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲

液,所述缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。

[0051] 在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。

[0052] 在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐, pH为约8.5的第二缓冲液。

[0053] 在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第三洗涤缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。

[0054] 在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,洗脱缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲

液,所述缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。

[0055] 在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第一洗涤缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。

[0056] 在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5的第二缓冲液。在一些实施方式中,第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐, pH为约8.5。

[0057] 在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,第三缓冲步骤的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0、约5.5至约6,或约6。在一些实施方式中,第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。

[0058] 在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5的第四缓冲液。在一些实施方式中,

第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。

[0059] 在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在一些实施方式中,洗脱洗涤步骤包括向亲和树脂中加入pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0、约8.0至约8.8,或约8.5的缓冲液。在一些实施方式中,步骤(c)包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。

[0060] 在一些实施方式(例如上述实施方式)中,盐选自:NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl、乙酸钠,以及NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl和乙酸钠中的一种以上的组合。在一些实施方式(例如上述实施方式)中,盐为NaCl。

[0061] 在一些实施方式中,缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM NaCl,pH为约8.5。

[0062] 在一些实施方式中,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平为99.9%以上。在一些实施方式中,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平为99.0%以上。

[0063] 在一些实施方式中,由洗脱步骤(c)洗脱的至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的AAV衣壳为完整AAV衣壳。

[0064] 在一些实施方式中,亲和树脂为AAV<sub>x</sub>树脂。

[0065] 在一些实施方式中,AAV为AAV9。在一些实施方式中,AAV9包含肽,所述肽包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3的序列。

[0066] 在一些实施方式中,该方法还包括:使含有AAV的溶液与过滤器接触,所述过滤器包含带正电荷的基团,所述带正电荷的基团可有效耗竭含有AAV的溶液中的酸性带电污染物。

[0067] 在一些实施方式中,该方法还包括:对AAV级分进行纳滤,去除大于35nm的病毒。

[0068] 在一些实施方式中,该方法还包括精制步骤,所述精制步骤包括进行阳离子交换色谱。

[0069] 在一些实施方式中,该方法还包括:通过AAV特异性ELISA检测AAV级分。在一些实施方式中,AAV特异性ELISA为对AAV具有特异性的夹心ELISA。

[0070] 在另一方面,本文提供了通过根据本文公开的实施方式中任一项所述的方法生产的AAV产品。

## 附图说明

[0071] 图1显示了根据实施例3的分离程序的色谱图。

[0072] 图2A和图2B显示了根据实施例4的分离程序的色谱图。加样区和洗涤-洗脱区用“分屏”功能分隔开。蓝色:UV 280nm,紫色:UV 254nm,红色:电导率。

[0073] 图3显示了根据实施例6的分离程序的色谱图。

### 具体实施方式

[0074] 本文提供了生产腺相关病毒 (AAV) 产品的方法、纯化AAV的方法,以及从包含空AAV衣壳和完整AAV衣壳的浓缩AAV级分纯化完整AAV衣壳的方法。

[0075] 细胞培养中产生AAV载体的一个特征是复杂基质(包含来自破碎细胞的材料)的形成。特别地,宿主细胞蛋白、蛋白酶体、细胞碎片和潜在病毒特异性受体通常存在于来自破碎细胞的材料中。所公开的方法包括在生理适用的pH下产生更高纯度的条件下从最终AAV产品中去除宿主细胞材料的步骤。

[0076] 在一个方面,本文提供了纯化腺相关病毒 (AAV) 的方法,该方法包括:

[0077] (a) 在允许溶液中AAV与亲和树脂结合的条件下,将含有AAV的溶液加样到针对AAV上的表位的亲和树脂上;

[0078] (b) 在室温下进行至少一个洗涤步骤;以及

[0079] (c) 在低于18°C的温度下从亲和树脂上洗脱AAV。

[0080] 在某些方面,该方法包括通过从室温降低缓冲液温度来从亲和树脂洗脱AAV衣壳。在某些实施方式中,可以使用相同的缓冲液,在1°C至12°C的降低的温度下,从相同树脂上洗脱AAV。在某些实施方式中,可以使用相同的缓冲液,在2°C至8°C的降低的温度下,从相同树脂上洗脱AAV。通过从室温降低温度来增加AAV的洗脱是令人惊讶和出乎意料的。不受特定理论的束缚,此结果令人惊讶且出乎意料,因为虽然已知更低的温度会延长抗体和抗原之间的结合达到平衡的时间,但本领域技术人员不能预期当将温度降至低于室温时已经结合的抗原易于释放。

[0081] 温度变化洗脱方案具有在低温下温和洗脱以帮助保持AAV颗粒的结构和/或感染性的益处。根据本文所述各种实施方式的洗脱可以防止暴露于低pH(例如,在接近中性的pH下洗脱)并保持AAV的高效价。此外,使用温和的洗脱缓冲液可以易于在制造环境中实施且效率更高,因为洗脱步骤不需要更换缓冲液。此外,温度变化洗脱方案使得完整AAV衣壳的含量更高。

[0082] 在某些实施方式中,AAV9可在约20°C至25°C的温度下与本文所述的树脂结合,且可在相同缓冲系统中在约1°C至12°C的更低温度下洗脱。在某些实施方式中,AAV9可在约20°C至25°C的温度下与本文所述的树脂结合,且可在相同缓冲系统中在约2°C至8°C的更低温度下洗脱。例如,在包含125mM NaCl和50mM TrisHCl、pH为8.5的缓冲液中,AAV9可在室温下与CaptureSelect AAVx树脂结合,且可使用相同缓冲液在约1°C至12°C或约2°C至8°C的更低温度下从树脂上洗脱。再例如,在包含100mM乙酸钠和0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80、pH为6.0的缓冲液中,AAV9可在室温下与CaptureSelect AAVx树脂结合,且可使用相同缓冲液在约1°C至12°C或约2°C至8°C的更低温度下从树脂上洗脱。

[0083] 当根据本文所述的各种实施方式和实施例连续地进行洗涤步骤和洗脱步骤时,可以看到AAV产品纯度的进一步改进。

[0084] 定义

[0085] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则本公开的上下文中(尤其是以下权利要求的上下文中)所用的术语“一个”、“一种”和“该”以及类似指称应解释为涵盖单数和

复数。除非另有说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”将被解释为开放式术语(即,表示“包括但不限于”)。

[0086] 如本文所用,术语“衣壳”、“衣壳颗粒”和“颗粒”可互换使用,其指由至少一个完整AAV衣壳组成的AAV颗粒。

[0087] 如本文所用,关于AAV或AAV衣壳的术语“空(empty)”指缺乏完全(即,完整)目的基因(GOI)的那些。空AAV或空AAV衣壳或空AAV颗粒无法提供治疗益处。如本文所用,关于AAV或AAV衣壳或AAV颗粒的术语“完整(full)”指包含大部分完整GOI的那些。完整AAV衣壳可以为受体患者提供治疗益处。在某些实施方式中,“完整”还可以包括“不完全载体DNA”或“截短载体DNA”。在某些实施方式中,关于AAV或AAV衣壳或AAV颗粒的“过满(overfilled)”指可能含有双重包装的或更长的基因组或GOIDNA(例如高达两倍大小)的那些。在某些实施方式中,完全与不完全和/或截短和/或过满的载体DNA可以用其他分析方法来区分。此类方法包括但不限于通过毛细管电泳、AUC(分析超速离心)、%琼脂糖DNA(天然或碱性)、凝胶、Southern Blot、斑点杂交、UV分光光度法、弱阴离子交换色谱法和质谱法来确定DNA大小(参见ResolvingAdeno-Associated Viral Particle Diversity with Charge Detection Mass Spectrometry,Elizabeth E.Pierson等,Anal.Chem.,2016,88(13),第6718-6725页,其出于所有目的整体并入本文)。

[0088] 除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的描述仅意在用作单独提及落入该范围和每个端点的每个单独值的一种简写方法,并且每个单独的值和端点均涵盖于说明书中,如同其在本文中单独被引用一样。

[0089] 除非本文另有说明或上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法均可以任何合适的顺序进行。除非另外声明,否则本文提供的任何和所有示例或示例性语言(例如,“例如”)的使用仅意在更好地说明本公开,而不对本公开的范围构成限制。说明书中的任何语言都不应被解释为表示任何未要求保护的要素对于实施本公开是必不可少的。

[0090] 本文描述了本公开的优选实施方式,包括发明人已知用于实施本公开的最佳模式。在阅读上述描述后,那些优选实施方式的变型对于本领域普通技术人员而言将是显而易见的。发明人预期本领域技术人员会适当地使用这些变型,发明人意图以不同于本文具体所述方式来实施本公开。因此,本公开包括适用法律所允许的情况下所附权利要求中所述主题的所有变型和等同物。此外,除非本文另有说明或上下文明显矛盾,否则本公开涵盖上述元素的所有可能变型的任何组合。

[0091] 洗涤步骤、洗脱步骤以及缓冲液

[0092] 在一个方面,本文提供了纯化腺相关病毒(AAV)的方法。该方法包括:(a)在允许溶液中的AAV与亲和树脂结合的条件下,将含有AAV的溶液加样到针对AAV的亲和树脂上;(b)在室温下进行至少一个洗涤步骤;(c)在低于18°C的温度下从亲和树脂上洗脱AAV。

[0093] 亲和纯化步骤包括一个以上洗涤步骤。一个以上洗涤步骤之后可以进行一个以上洗脱步骤。在某些实施方式中,本公开的方法包括在亲和纯化步骤之前发生的过滤步骤。

[0094] 在一些实施方式中,进行至少2个洗涤步骤,各自涉及相同或不同的缓冲液。在一些实施方式中,进行至少3个洗涤步骤,各自涉及相同或不同的缓冲液。在一些实施方式中,进行至少4个洗涤步骤,各自涉及相同或不同的缓冲液。在一些实施方式中,进行至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、

19个或20个洗涤步骤,各自涉及相同或不同的缓冲液。在一些实施方式中,进行2个洗涤步骤。在一些实施方式中,进行3个洗涤步骤。在一些实施方式中,进行4个洗涤步骤。在某些实施方式中,洗涤缓冲液不同。在一些实施方式中,洗涤步骤连续地进行。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行(例如18°C至26°C,或18°C、18.5°C、19°C、19.5°C、20°C、20.5°C、21°C、21.5°C、22°C、22.5°C、23°C、23.5°C、24°C、24.5°C、25°C、25.5°C或26°C)。在某些实施方式中,所有洗涤步骤均在室温下进行。

[0095] 在某些实施方式中,使用至少一种洗涤缓冲液。在某些实施方式中,可以使用至少两种不同的洗涤缓冲液。在某些实施方式中,可以使用至少三种不同的洗涤缓冲液。在某些实施方式中,可以使用至少四种不同的洗涤缓冲液。在某些实施方式中,可以使用一种洗涤缓冲液。在某些实施方式中,可以使用两种不同的洗涤缓冲液。在某些实施方式中,可以使用三种不同的洗涤缓冲液。在某些实施方式中,可以使用四种不同的洗涤缓冲液。

[0096] 在某些实施方式中,进行至少一个洗脱步骤。在某些实施方式中,进行至少2个洗脱步骤,各自涉及相同或不同的缓冲液。在某些实施方式中,进行至少3个洗脱步骤,各自涉及相同或不同的缓冲液。在一些实施方式中,进行至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个洗脱步骤,各自涉及相同或不同的缓冲液。在某些实施方式中,进行一个洗脱步骤。在某些实施方式中,进行至少2个洗脱步骤。在某些实施方式中,进行至少3个洗脱步骤。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液与至少一种洗涤缓冲液相同。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液不同于洗涤缓冲液。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液与在洗脱AAV之前最后的洗涤步骤中所用的最后的洗涤缓冲液相同。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液与在洗脱AAV之前最后的洗涤步骤中所用的最后的洗涤缓冲液相同。在1°C至12°C(例如2°C至8°C,或1°C、1.5°C、2°C、2.5°C、3°C、3.5°C、4°C、4.5°C、5°C、5.5°C、6°C、6.5°C、7°C、7.5°C、8°C、8.5°C、9°C、9.5°C、10°C、10.5°C、11°C、11.5°C或12°C)的温度下进行洗脱。根据本文所述的各种实施方式的洗脱可以防止暴露于低pH(例如,在接近中性的pH下洗脱),并保持AAV的高效价。

[0097] 在某些实施方式中,使用至少一种洗脱缓冲液。在某些实施方式中,可以使用至少两种不同的洗脱缓冲液。在某些实施方式中,可以使用至少三种不同的洗脱缓冲液。在某些实施方式中,可以使用至少四种不同的洗脱缓冲液。在某些实施方式中,可以使用一种洗脱缓冲液。在某些实施方式中,可以使用两种不同的洗脱缓冲液。在某些实施方式中,可以使用三种不同的洗脱缓冲液。在某些实施方式中,可以使用四种不同的洗脱缓冲液。

[0098] 在某些实施方式中,可通过冷却柜(例如Unichromat 1500)、温度夹套(例如水冷却夹套)和/或使用洗脱用冷缓冲液来使温度变化为低于室温。在某些实施方式中,缓冲液在冷却前在室温下制备。在某些实施方式中,缓冲液的pH在冷却前在室温下测量。

[0099] 可以使用各种体积,例如约2×柱体积至约15×柱体积、约3×柱体积至约7×柱体积、约4×柱体积至约8×柱体积、约5×柱体积至约10×柱体积或约7×柱体积至约12×柱体积。例如,当柱体积为约2mL至约3mL时,可以使用10×柱体积。可以使用约5×柱体积或5×柱体积的任何洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液。或者,可以使用约10×柱体积或10×柱体积的任何洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液。可以进一步延长洗涤步骤的时间以提高AAV纯度。

[0100] 洗涤步骤可以有效地从AAV和/或亲和基质的基础树脂中去除强结合的污染物。同时,洗涤步骤中所用的缓冲液基本上不会洗脱AAV。

[0101] 在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液包含螯合剂(例如EDTA)。在某些实施方式中,洗涤缓冲液包含确保宿主细胞(例如HEK-HCP)的pH范围和耗竭率的单一氨基酸或两种以上氨基酸的任何组合,例如甘氨酸、精氨酸、色氨酸、氨基衍生物,例如牛磺酸(氧化半胱氨酸)、N-乙酰基-色氨酸和双甘氨酸。

[0102] 洗脱步骤可有效洗脱AAV衣壳。在某些实施方式中,相对于空AAV衣壳或过满AAV衣壳,洗脱步骤优选洗脱完整AAV衣壳。在某些实施方式中,洗脱缓冲液包含单一氨基酸或两种以上氨基酸的任何组合以确保pH和洗脱AAV,例如甘氨酸、精氨酸、色氨酸、氨基衍生物,例如牛磺酸(氧化半胱氨酸)、N-乙酰基-色氨酸和双甘氨酸。

[0103] 不希望受理论束缚,AAV的洗脱程度受第三缓冲液中乙二醇的量和盐的电导率两者影响。与50% (w/w) 乙二醇相比,缓冲液中至少55% (w/w) 乙二醇的量可以显著增加洗脱量。因此,在给定的乙二醇浓度下,增加的NaCl浓度可以增加洗脱的程度和速率。在给定的乙二醇浓度下,用多价盐代替NaCl也可以增加洗脱的程度和速率。

[0104] 不希望受理论束缚,如果盐恒定(例如150mM NaCl),则增加乙二醇的量可以增加缓冲液的洗脱强度。如果乙二醇含量恒定(例如55%),则增加盐的量可以增加缓冲液的洗脱强度。因此,在150mM NaCl中,洗脱强度从40%增加至45%至50%至55%至60% (w/w) 乙二醇。增加盐含量恒定的溶液的乙二醇含量会降低电导率。乙二醇量的增加会降低盐在缓冲液中的溶解度。

[0105] 在某些实施方式中,山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘油(1,2,3-丙三醇)或赤藓糖醇(内消旋-1,2,3,4-丁二醇)中的一种以上可与乙二醇组合使用或代替乙二醇。在某些实施方式中,洗脱缓冲液可包含约30%至约35%、约35%至约40%、约40%至约45%、约45%至约50%、约48%至约52%、约50%至约55%、约55%至约60%、约60%至约65%、约65%至约70%,或约70%至约75% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中,洗脱缓冲液可包含约50%或50% (w/w) 的乙二醇。在某些实施方式中,乙二醇的浓度为至少55% (w/w)。在某些实施方式中,乙二醇的浓度为至少56% (w/w)。在某些实施方式中,乙二醇的浓度为至少57% (w/w)。在某些实施方式中,乙二醇的浓度为至少58% (w/w)。

[0106] 例如,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含以下中的一种以上:TrisHCl、乙酸盐、磷酸盐、组氨酸、咪唑、赖氨酸、精氨酸、甘氨酸、牛磺酸、柠檬酸盐、HEPES、MES、MES-Na、硼酸盐、Bis-Tris、MOPS、Bicine、Tricine、TAPS、TAPSO、MES、PIPES、TES(2-[[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基]氨基]乙磺酸)、巴比妥钠(佛罗拿)、ADA(N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸)、ACES(N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸)、Bis-Tris丙烷、BES(N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸)、DIPSO(3-(N,N-双[2-羟乙基]氨基)-2-羟丙磺酸)、Trizma、HEPPSO(4-(2-羟乙基)哌嗪-1-(2-羟基丙磺酸))、POPSO(哌嗪-1,4-双(2-羟基丙磺酸)脱水物)、TEA、EPPS(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸)、HEPBS(N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(4-丁磺酸))、AMPD(2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇)、AMPSO(N-(1,1-二甲基-2-羟乙基)-3-氨基-2-羟丙磺酸)、单一氨基酸或两种以上氨基酸的任何组合,例如甘氨酸、精氨酸、色氨酸、氨基衍生物,例如牛磺酸(氧化半胱氨酸)、N-乙酰基-色氨酸和双甘氨酸。

[0107] 在一些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含乙酸钠、TrisHCl、精氨酸-HCl、赖氨酸-HCl、组氨酸-HCl、组氨酸、甘氨酸、牛磺酸、MES-Na、Bis-Tris、柠檬酸盐、乙酸盐、MES、HEPES、磷酸盐、TrisHCl、Bis-Tris、组氨酸、咪唑、ArgininHCl、LysinHCl、甘氨

酸、双甘氨酸、硼酸盐、MOPS、Bicine、Tricine、TAPS、TAPSO、PIPES、L-谷氨酸、天冬氨酸、BAPTA(1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N',N',N'-四乙酸)和/或N-乙酰基-D,L-色氨酸。

[0108] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还包含盐。在一些实施方式中,缓冲液包含TrisHCl和盐。在一些实施方式中,缓冲液包含精氨酸-HCl和盐。在一些实施方式中,缓冲液包含组氨酸和盐。

[0109] 对于本文所述的洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液,盐可以选自NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、钠柠檬酸盐、柠檬酸钾以及NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>、柠檬酸钠和柠檬酸钾中的一种以上的组合。在一些实施方式中,盐浓度为约50mM至约2000mM、约100mM至约1500mM、约100mM至约200mM、约200mM至约1000mM、约500mM至约900mM、约600mM至约800mM、约750mM或750mM。在一些实施方式中,盐浓度为约50mM至约2000mM、约100mM至约1500mM、约100mM至约200mM、约200mM至约1000mM、约500mM至约900mM、约600mM至约800mM NaCl、约750mM NaCl或750mM NaCl。在一些实施方式中,当使用NaCl的浓度梯度时,目标浓度为2000mM。在一些实施方式中,盐的浓度不超过500mM。在一些实施方式中,盐的浓度不超过200mM。在一些实施方式中,盐为NaCl。在一些实施方式中,盐为125mM NaCl。在一些实施方式中,盐为150mM NaCl。

[0110] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含一种以上有机溶剂或去污剂。例如,有机溶剂或去污剂可以为但不限于吐温80、聚山梨醇酯80、Triton X100、三(正丁基)磷酸酯(TNBP)、乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、DMSO、蔗糖或海藻糖。例如,去污剂可以为但不限于聚氧乙烯非离子表面活性剂(例如Brij 35)、4-壬基苯基-聚乙二醇(Arkopal N100)、辛基葡萄糖苷、正十二烷基β-D-麦芽糖苷、洋地黄皂苷、6-环己基己基β-D-麦芽糖苷或辛基吡喃葡萄糖苷。例如,乙二醇可以为PEG,例如但不限于PEG 2000、PEG 4000、PEG 6000(Macrogol)。例如,有机溶剂可以为但不限于甘油(1,2,3-丙三醇)和赤藓糖醇(内消旋-1,2,3,4-丁二醇)。在一些实施方式中,去污剂包含Triton X100、聚山梨醇酯80和三(正丁基)磷酸酯(TNBP)中的一种以上。在一些实施方式中,有机溶剂或去污剂可以为聚山梨醇酯80、乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、蔗糖或海藻糖。在一些实施方式中,缓冲液包含TrisHCl和DMSO。

[0111] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液中包含约0.0005%至约20%、约0.0005%至约15%、约0.0005%至约10%、约0.0005%至约5%、约0.0005%至约1%、约0.001%至约4%、约0.001%至约0.1%、约0.001%至约0.05%、约0.005%至约3%、约0.01%至约2.5%、约0.05%至约5%、约0.05%至约2%、0.05%至约0.2%,或约0.1%至约1.5% (w/w)的有机溶剂或去污剂。在一些实施方式中,有机溶剂或去污剂以约0.005% (w/w)存在。在一些实施方式中,有机溶剂或去污剂以约0.1% (w/w)存在。

[0112] 在一些实施方式中,有机溶剂或去污剂为聚山梨醇酯80(例如吐温80或Crillet)。在一些实施方式中,缓冲液包含聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,缓冲液包含精氨酸-HCl和聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,缓冲液包含牛磺酸和聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,缓冲液包含TrisHCl和聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,缓冲液包含乙酸钠和聚山梨醇酯80。

[0113] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约0.0005%至约20%、约0.0005%至约15%、约0.0005%至约10%、约0.0005%至约5%、约0.0005%至约1%、约

0.001%至约4%、约0.001%至约0.1%、约0.001%至约0.05%、约0.005%至约3%、约0.01%至约2.5%、约0.05%至约5%、约0.05%至约2%、0.05%至约0.2%，或约0.1%至约1.5% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约5% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约10% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约20% (w/w) 聚山梨醇酯80。

[0114] 在某些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约30%至约35%、35%至约40%、约40%至约45%、约45%至约50%、约48%至约52%、约50%至约55%、约55%至约60%、约60%至约65%、约65%至约70%，或约70%至约75% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50%或50% (w/w) 乙二醇。

[0115] 有机溶剂或去污剂不需要存在于所有所用的洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液中。在某些实施方式中，有机溶剂或去污剂不存在于任何所用的洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液中。在某些实施方式中，有机溶剂或去污剂存在于所用的至少一种洗涤缓冲液中。在某些实施方式中，有机溶剂或去污剂存在于所用的至少一种洗脱缓冲液中。在一些实施方式中，洗涤缓冲液（例如第一洗涤缓冲液）包含乙酸钠和聚山梨醇酯80。在一些实施方式中，洗涤缓冲液（例如第二洗涤缓冲液）包含乙酸钠和聚山梨醇酯80。在一些实施方式中，洗涤缓冲液包含吐温80、DMSO和三（正丁基）磷酸酯（TNBP）中的一种以上。在一些实施方式中，洗涤缓冲液包含Triton-X 100、聚山梨醇酯80和TNBP中的一种以上。在一些实施方式中，洗涤缓冲液（例如第三洗涤缓冲液）包含Tris和乙二醇。不希望受理论束缚，洗涤缓冲液中的有机溶剂和去污剂可有效去除强结合的宿主蛋白和病毒受体，同时还能灭活和/或分解脂质包膜病毒。

[0116] 在一些实施方式中，缓冲液还包含乙二醇、蔗糖、牛磺酸和/或甘油。在一些实施方式中，缓冲液包含精氨酸-HCl以及蔗糖和甘油中的一种。在一些实施方式中，缓冲液包含牛磺酸和乙二醇。在一些实施方式中，缓冲液包含TrisHCl和乙二醇。在一些实施方式中，缓冲液包含乙酸钠和乙二醇。

[0117] 在某些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可以为包含盐（例如NaCl）的基于Tris的缓冲液。在某些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可以为基于乙酸钠（NaAc）的缓冲液。在某些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含2-（N-吗啉代）乙磺酸的钠盐（MES-Na）、EDTA以及含有聚山梨醇酯80、DMSO和三（正丁基）磷酸酯（TNBP）的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM牛磺酸和0.2%至1.5% PEG（例如PEG 6000）。在某些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含Bis-Tris，以及含有Triton-X 100、聚山梨醇酯80和TNBP的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含：基于甘氨酸的缓冲液、基于柠檬酸钠的缓冲液或包含盐（例如NaCl）的基于精氨酸-HCl的缓冲液。在某些实施方式中，洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可以为包含乙二醇和/或NaCl的基于Tris的缓冲液、基于牛磺酸的缓冲液或包含NaCl的基于精氨酸-HCl的缓冲液。或者，山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、蔗糖或海藻糖中的一种以上可与乙二醇组合使用或代替乙二醇。在某些实施方式中，洗涤缓

冲液和/或洗脱缓冲液可包含乙酸钠和聚山梨醇酯80。

[0118] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约10mM至约500mM的TrisHCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约10mM至约400mM、约10mM至约300mM、约10mM至约200mM、约15mM至约175mM、约20mM至约150mM、约25mM至约125mM、约25mM至约100mM、约30mM至约90mM、约35mM至约75mM,或约40mM至约60mM TrisHCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约10mM至约15mM、约10mM至约30mM、约15mM至约20mM、约20mM至约25mM、约25mM至约30mM、约30mM至约35mM、约35mM至约40mM、约40mM至约45mM、约40mM至约50mM、约45mM至约50mM、约50mM至约55mM、约55mM至约60mM、约60mM至约65mM、约65mM至约70mM、约70mM至约75mM、约75mM至约80mM、约80mM至约90mM、约90mM至约100mM、约100mM至约110mM、约110mM至约120mM、约120mM至约130mM、约130mM至约140mM、约140mM至约150mM、约150mM至约160mM、约160mM至约170mM、约170mM至约180mM、约180mM至约190mM,或约190mM至约200mM TrisHCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM或50mM TrisHCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约20mM或20mM TrisHCl。

[0119] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约25mM、约50mM、约75mM、约100mM、约125mM、约150mM、约175mM、约200mM、约225mM、约250mM、约275mM、约300mM、约325mM、约350mM、约375mM、约400mM、约425mM、约450mM、约475mM、约500mM、约525mM、约550mM、约575mM、约600mM、约625mM、约650mM、约675mM、约700mM、约725mM、约750mM、约775mM、约800mM、约825mM、约850mM、约875mM、约900mM、约925mM、约950mM、约975mM、约1000mM、约1025mM、约1050mM、约1075mM、约1100mM、约1125mM、约1150mM、约1175mM、约1200mM、约1225mM、约1250mM、约1275mM、约1300mM、约1325mM、约1350mM、约1375mM、约1400mM、约1425mM、约1450mM、约1475mM、约1500mM、约1525mM、约1550mM、约1575mM、约1600mM、约1625mM、约1650mM、约1675mM、约1700mM、约1725mM、约1750mM、约1775mM、约1800mM、约1825mM、约1850mM、约1875mM、约1900mM、约1925mM、约1950mM、约1975mM或约2000mM TrisHCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM或50mM TrisHCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约20mM或20mM TrisHCl。

[0120] 在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约50mM至约500mM的盐。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约55mM至约400mM、约60mM至约350mM、约70mM至约300mM、约75mM至约250mM、约80mM至约200mM、约90mM至约175mM,或约100mM至约150mM的盐。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约75mM至约100mM、约100mM至约125mM、约125mM至约150mM、约150mM至约175mM、约175mM至约200mM、约200mM至约225mM,或约225mM至约250mM盐。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约150mM或150mM盐。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约125mM或125mM盐。

[0121] 在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约50mM至约500mM NaCl。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约55mM至约400mM、约60mM至约350mM、约70mM至约300mM、约75mM至约250mM、约80mM至约200mM、约90mM至约175mM,或约100mM至约150mM NaCl。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约75mM至约100mM、约100mM至约125mM、约125mM至约150mM、约150mM至

约175mM、约175mM至约200mM、约200mM至约225mM,或约225mM至约250mM NaCl。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约150mM或150mM NaCl。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约125mM或125mM NaCl。

[0122] 在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约10%至约75% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约20%至约72%、约25%至约70%、约30%至约65%,或约40%至约60% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约30%至约35%、约35%至40%、约40%至约45%、约45%至约50%、约48%至约52%、约50%至约55%、约55%至约60%、约60%至约65%、约65%至约70%,或约70%至约75% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50%或50% (w/w) 乙二醇。

[0123] 在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含有机溶剂或去污剂。在一些实施方式中,有机溶剂或去污剂为聚山梨醇酯80(例如吐温80或Crillet)。在某些实施方式中,聚山梨醇酯80可以为约0.0005%至约5%、约0.0005%至约1%、约0.001%至约4%、约0.001%至约0.1%、约0.001%至约0.05%、约0.005%至约3%、约0.01%至约2.5%、约0.05%至约5%、约0.05%至约2%、0.05%至约0.2%,或约0.1%至约1.5% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约0.05%至约0.08%、约0.08%至约0.11%、约0.11%至约0.14%、约0.14%至约0.17%,或约0.17%至约0.20% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约0.1%或0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约0.005%或0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。

[0124] 在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0,或约8.0至约8.8。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约7.5至约7.7、约7.7至约7.9、约7.9至约8.1、约8.1至约8.3、约8.3至约8.5、约8.5至约8.7、约8.7至约8.9,或约8.9至约9.2。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约7.4或7.4。在某些实施方式中,TrisHCl洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约8.5或8.5。

[0125] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含50mM TrisHCl和125mM盐。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0,或约8.0至约8.8。在某些实施方式中,缓冲液的pH为约8.5或8.5。

[0126] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM

TrisHCl和约10%至约75% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约25%至约70% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约40%至约60% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含50mM TrisHCl和50% (w/w) 乙二醇。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0,或约8.0至约8.8。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH为约8.5或8.5。

[0127] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约1mM至约200mM TrisHCl、约50mM至约500mM盐和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约5mM至约50mM TrisHCl、约75mM至约250mM盐和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含10mM至约30mM TrisHCl、约140mM至约160mM盐和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约20mM TrisHCl、约150mM盐和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含20mM TrisHCl、150mM盐和0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约6.0至约8.8、约6.5至约8.5,或约7.0至约8.0。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH为约7.4或7.4。

[0128] 在某些实施方式中,TrisHCl缓冲液是第一洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,TrisHCl缓冲液是第一洗涤缓冲液、第三洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,TrisHCl缓冲液是第二洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,TrisHCl缓冲液是第二洗涤缓冲液、第四洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,TrisHCl缓冲液是第二洗涤缓冲液,但不是洗脱缓冲液。在某些实施方式中,TrisHCl缓冲液是第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液,但不是洗脱缓冲液。可以使用约5×柱体积或5×柱体积的每种洗涤缓冲液。可以使用约10×柱体积或10×柱体积的每种洗涤缓冲液。可以使用约5×柱体积或5×柱体积的洗脱缓冲液。可以使用约10×柱体积或10×柱体积的洗脱缓冲液。

[0129] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约10mM至约2000mM乙酸钠。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约20mM至约1000mM、约30至约750mM、约40mM至约500mM、约50mM至约200mM、约75mM至约175mM、约80mM至约150mM、约85mM至约125mM,或约90mM至约110mM乙酸钠。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约75mM、约75mM至约100mM、约90mM至约110mM、约100mM至约125mM、约125mM至约150mM、约150mM至约175mM、约175mM至约200mM、约200至约250mM、约250mM至约300mM、约300mM至约350mM、约350至约400mM、约400至约450mM、约450mM至约500mM、约500至约550mM、约550至约600mM、约600至约650mM、约650至约700mM、约700至约750mM、约750至约800mM、约800mM至约850mM、约850mM至约900mM、约900至约950mM、约950mM至约1000mM、约1000至约1050mM、约1050至约1100mM、约1100至约1150mM、约1150至约1200mM、约1200至约1250mM、约1250至约1300mM、约1300至约1350mM、约1350至约1400mM、约1400至约1450mM、约1450至约

1500mM、约1500至约1550mM、约1550至约1600mM、约1600至约1650mM、约1650至约1700mM、约1700至约1750mM、约1750至约1800mM、约1800至约1850mM、约1850至约1900mM、约1900至约1950mM,或约1950mM至约2000mM乙酸钠。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约100mM或100mM乙酸钠。

[0130] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约25mM、约50mM、约75mM、约100mM、约125mM、约150mM、约175mM、约200mM、约225mM、约250mM、约275mM、约300mM、约325mM、约350mM、约375mM、约400mM、约425mM、约450mM、约475mM、约500mM、约525mM、约550mM、约575mM、约600mM、约625mM、约650mM、约675mM、约700mM、约725mM、约750mM、约775mM、约800mM、约825mM、约850mM、约875mM、约900mM、约925mM、约950mM、约975mM、约1000mM、约1025mM、约1050mM、约1075mM、约1100mM、约1125mM、约1150mM、约1175mM、约1200mM、约1225mM、约1250mM、约1275mM、约1300mM、约1325mM、约1350mM、约1375mM、约1400mM、约1425mM、约1450mM、约1475mM、约1500mM、约1525mM、约1550mM、约1575mM、约1600mM、约1625mM、约1650mM、约1675mM、约1700mM、约1725mM、约1750mM、约1775mM、约1800mM、约1825mM、约1850mM、约1875mM、约1900mM、约1925mM、约1950mM、约1975mM或约2000mM乙酸钠。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约100mM或100mM乙酸钠。

[0131] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约80mM、约70mM至约100mM、约80mM至约110mM、约90mM至约120mM、约100mM至约130mM、约120mM至约150mM、约140mM至约170mM,或约170mM至约200mM乙酸钠。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约60、约70mM、约80mM、约90mM、约100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM或约160mM乙酸钠。

[0132] 在某些实施方式中,乙酸钠洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含有机溶剂或去污剂。在一些实施方式中,有机溶剂或去污剂为聚山梨醇酯80(例如吐温80或Crillet)。在某些实施方式中,聚山梨醇酯80可以为约0.0005%至约5%、约0.0005%至约1%、约0.001%至约4%、约0.001%至约0.1%、约0.001%至约0.05%、约0.005%至约3%、约0.01%至约2.5%、约0.05%至约5%、约0.05%至约2%、0.05%至约0.2%,或约0.1%至约1.5%(w/w)聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液可包含约0.05%至约0.08%、约0.08%至约0.11%、约0.11%至约0.14%、约0.14%至约0.17%,或约0.17%至约0.20%(w/w)聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液可包含约0.1%或0.1%(w/w)聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液可包含约0.005%或0.005%(w/w)聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液可包含约0.1%(w/w)聚山梨醇酯80。

[0133] 在某些实施方式中,乙酸钠洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0,或约5.5至约6.5。在某些实施方式中,乙酸钠洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约5.2至约5.5、约5.5至约5.8、约5.8至约6.1、约6.1至约6.4,或约6.4至约6.8。在某些实施方式中,乙酸钠洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH为约6.0或6.0。

[0134] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1%(w/w)聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3%(w/w)聚山梨醇酯80。在某些实

施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含100mM乙酸钠和0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0,或约5.5至约6.5。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH为约6.0或6.0。

[0135] 在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液是第一洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液是第一洗涤缓冲液、第三洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液是第二洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液是第二洗涤缓冲液、第四洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液是第二洗涤缓冲液,但不是洗脱缓冲液。在某些实施方式中,乙酸钠缓冲液是第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液,但不是洗脱缓冲液。

[0136] 可以使用约5×柱体积或5×柱体积的每种乙酸钠洗涤缓冲液。可以使用约10×柱体积或10×柱体积的每种乙酸钠洗涤缓冲液。可以使用约5×柱体积或5×柱体积的乙酸钠洗脱缓冲液。可以使用约10×柱体积或10×柱体积的乙酸钠洗脱缓冲液。

[0137] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约10mM至约500mM的甘氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约10mM至约400mM、约10mM至约300mM、约10mM至约200mM、约15mM至约175mM、约20mM至约150mM、约25mM至约125mM、约25mM至约100mM、约30mM至约90mM、约35mM至约75mM,或约40mM至约60mM甘氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约30mM至约35mM、约35mM至约40mM、约40mM至约45mM、约45mM至约50mM、约50mM至约55mM、约55mM至约60mM、约60mM至约65mM、约65mM至约70mM、约70mM至约75mM、约75mM至约80mM、约80mM至约90mM、约90mM至约100mM、约100mM至约110mM、约110mM至约120mM、约120mM至约130mM、约130mM至约140mM、约140mM至约150mM、约150mM至约160mM、约160mM至约170mM、约170mM至约180mM、约180mM至约190mM,或约190mM至约200mM甘氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM或50mM甘氨酸。

[0138] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约25mM、约50mM、约75mM、约100mM、约125mM、约150mM、约175mM、约200mM、约225mM、约250mM、约275mM、约300mM、约325mM、约350mM、约375mM、约400mM、约425mM、约450mM、约475mM、约500mM、约525mM、约550mM、约575mM、约600mM、约625mM、约650mM、约675mM、约700mM、约725mM、约750mM、约775mM、约800mM、约825mM、约850mM、约875mM、约900mM、约925mM、约950mM、约975mM、约1000mM、约1025mM、约1050mM、约1075mM、约1100mM、约1125mM、约1150mM、约1175mM、约1200mM、约1225mM、约1250mM、约1275mM、约1300mM、约1325mM、约1350mM、约1375mM、约1400mM、约1425mM、约1450mM、约1475mM、约1500mM、约1525mM、约1550mM、约1575mM、约1600mM、约1625mM、约1650mM、约1675mM、约1700mM、约1725mM、约1750mM、约1775mM、约1800mM、约1825mM、约1850mM、约1875mM、约1900mM、约1925mM、约1950mM、约1975mM或约2000mM甘氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM或50mM甘氨酸。

[0139] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约1mM至约300mM组氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约1mM至约250mM、约1mM至约200mM、约

1mM至约100mM、约1.5mM至约175mM、约2.0mM至约150mM、约2.5mM至约125mM、约2.5mM至约100mM、约3.0mM至约90mM、约3.5mM至约75mM、约4.0至约60mM、约5.0mM至约50mM、约6.0mM至约40mM、约7.0至约30mM、约8.0mM至约20mM或约9.0mM至约15mM组氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约3.0mM至约3.5mM、约3.5mM至约4.0mM、约4.0mM至约4.5mM、约4.5mM至约5.0mM、约5.0mM至约5.5mM、约5.5mM至约6.0mM、约6.0mM至约6.5mM、约6.5mM至约7.0mM、约7.0mM至约7.5mM、约7.5mM至约8.0mM、约8.0mM至约9.0mM、约9.0mM至约10.0mM、约10.0mM至约11.0mM、约11.0mM至约12.0mM、约12.0mM至约13.0mM、约13.0mM至约14.0mM、约14.0mM至约15.0mM、约15.0mM至约16.0mM、约16.0mM至约17.0mM、约17.0mM至约18.0mM、约18.0mM至约19.0mM,或约19.0mM至约20.0mM组氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约10mM或10mM组氨酸。

[0140] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约2.5mM、约5.0mM、约7.5mM、约10.0mM、约12.5mM、约15.0mM、约17.5mM、约20.0mM、约22.5mM、约25.0mM、约27.5mM、约30.0mM、约32.5mM、约35.0mM、约37.5mM、约40.0mM、约42.5mM、约45.0mM、约47.5mM、约50.0mM、约52.5mM、约55.0mM、约57.5mM、约60.0mM、约62.5mM、约65.0mM、约67.5mM、约70.0mM、约72.5mM、约75.0mM、约77.5mM、约80.0mM、约82.5mM、约85.0mM、约87.5mM、约90.0mM、约92.5mM、约95.0mM、约97.5mM、约100.0mM、约102.5mM、约105.0mM、约107.5mM、约110.0mM、约112.5mM、约115.0mM、约117.5mM、约120.0mM、约122.5mM、约125.0mM、约127.5mM、约130.0mM、约132.5mM、约135.0mM、约137.5mM、约140.0mM、约142.5mM、约145.0mM、约147.5mM、约150.0mM、约152.5mM、约155.0mM、约157.5mM、约160.0mM、约162.5mM、约165.0mM、约167.5mM、约170.0mM、约172.5mM、约175.0mM、约177.5mM、约180.0mM、约182.5mM、约185.0mM、约187.5mM、约190.0mM、约192.5mM、约195.0mM、约197.5mM或约200.0mM组氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约10mM或10mM组氨酸。

[0141] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约1%至约75% (w/w) 海藻糖。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约2%至约50%、约2.5%至约25%、约3.0%至约20%,或约4.0%至约10% (w/w) 海藻糖。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含约3.0%至约3.5%、3.5%至约4.0%、约4.0%至约4.5%、约4.5%至约5.0%、约4.8%至约5.2%、约5.0%至约5.5%、约5.5%至约6.0%、约6.0%至约6.5%、约6.5%至约7.0%、或约7.0%至约7.5%、约7.5%至约8.0%、约8.0%至约8.5%、约8.5%至约9.0%、约9.0%至约9.5%、约9.5%至约10%、约10%至约15%、约15%至约20%、约20%至约25%、约25%至约30%、约30%至约35%、约35%至约40%、约40%至约45%、约45%至约50%、约50%至约55%、约55%至约60%、约60%至约65%、约65%至约70%、约70%至约75% (w/w) 海藻糖。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约5.0%或5.0% (w/w) 海藻糖。

[0142] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液还可包含有机溶剂或去污剂。在一些实施方式中,有机溶剂或去污剂为聚山梨醇酯80(例如吐温80或Crillet)。在某些实施方式中,聚山梨醇酯80可以为约0.0005%至约5%、约0.0005%至约1%、约0.0006%至约4%、约0.0007%至约0.1%、约0.0008%至约0.05%、约0.0009%至约3%、约0.001%至约2.5%、约0.002%至约5%、约0.003%至约2%,或0.004%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80。

在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约0.05%至约0.08%、约0.08%至约0.11%、约0.11%至约0.14%、约0.14%至约0.17%,或约0.17%至约0.20% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约0.1%或0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,聚山梨醇酯80可包含约0.005%或0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,聚山梨醇酯80为0.005%。

[0143] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约5.0至约9.0、约5.5至约8.0,或约6.0至约7.5。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约5.2至约5.5、约5.5至约5.8、约5.8至约6.1、约6.1至约6.4、约6.4至约6.8、约6.8至约7.0、约7.0至约7.2、约7.2至约7.4、约7.4至约7.8、约7.8至约8.0、约8.0至约8.2、约8.2至约8.4、约8.4至约8.6、约8.6至约8.8,或约8.8至约9.0。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH为约7.0或7.0。

[0144] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM甘氨酸、约1mM至约100mM组氨酸、约20mM至约500mM盐、约1%至约10%海藻糖和约0.0005%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约30mM至约80mM甘氨酸、约5mM至约20mM组氨酸、约50mM至约200mM盐、约3%至约8%海藻糖和约0.001%至约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约40mM至约60mM甘氨酸、约5mM至约15mM组氨酸、约90mM至约110mM盐、约4%至约6%海藻糖和约0.001%至约0.05% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM甘氨酸、约10mM组氨酸、约100mM盐、约5%海藻糖和约0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含50mM甘氨酸、10mM组氨酸、100mM盐、5%海藻糖和0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,缓冲液的pH为约6.0至约8.0、约6.5至约7.5,或约7.0至约7.4。在某些实施方式中,缓冲液的pH为约7.0至约7.4。

[0145] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM甘氨酸、约1mM至约100mM组氨酸、约20mM至约500mM NaCl、约1%至约10%海藻糖和约0.0005%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约30mM至约80mM甘氨酸、约5mM至约20mM组氨酸、约50mM至约200mM NaCl、约3%至约8%的海藻糖和约0.001%至约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约40mM至约60mM甘氨酸、约5mM至约15mM组氨酸、约90mM至约110mM NaCl、约4%至约6%海藻糖和约0.001%至约0.05% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM甘氨酸、约10mM组氨酸、约100mM NaCl、约5%海藻糖和约0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,洗脱缓冲液可包含50mM甘氨酸、10mM组氨酸、100mM NaCl、5%海藻糖和0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约7.5,或约7.0至约7.4。在某些实施方式中,缓冲液的pH为约7.0至约7.4。

[0146] 在某些实施方式中,甘氨酸缓冲液是第一洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,甘氨酸缓冲液是第一洗涤缓冲液、第三洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,甘氨酸缓冲液是第二洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,甘氨酸缓冲液是第

二洗涤缓冲液、第四洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施方式中,甘氨酸缓冲液是第二洗涤缓冲液,但不是洗脱缓冲液。在某些实施方式中,甘氨酸缓冲液是第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液,但不是洗脱缓冲液。

[0147] 可以使用约5×柱体积或5×柱体积的每种甘氨酸洗涤缓冲液。可以使用约10×柱体积或10×柱体积的每种甘氨酸洗涤缓冲液。可以使用约5×柱体积或5×柱体积的甘氨酸洗脱缓冲液。可以使用约10×柱体积或10×柱体积的甘氨酸洗脱缓冲液。

[0148] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约500mM<sup>2</sup>- (N-吗啉代)乙磺酸的钠盐(MES-Na)、约3mM至约30mM EDTA,以及含有聚山梨醇酯80、DMSO和三(正丁基)磷酸酯(TNBP)的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约75mM、约75mM至约100mM、约90mM至约110mM、约100mM至约125mM、约125mM至约150mM、约150mM至约175mM、约175mM至约200mM、约200至约250mM、约250mM至约300mM、约300mM至约350mM、约350至约400mM、约400至约450mM,或约450mM至约500mM MES-Na的钠盐。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM、约75mM、约90mM、约100mM、约125mM、约150mM、约175mM、约200mM、约250mM、约300mM、约350mM、约400mM、约450mM或约500mM MES-Na的钠盐。

[0149] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM牛磺酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约75mM、约75mM至约100mM、约90mM至约110mM、约100mM至约125mM、约125mM至约150mM、约150mM至约175mM,或约175mM至约200mM牛磺酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM、约75mM、约90mM、约100mM、约125mM、约150mM、约175mM或约200mM牛磺酸。

[0150] 在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约80mM至约400mM Bis-Tris。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约80mM至约100mM、约90mM至约110mM、约100mM至约125mM、约125mM至约150mM、约150mM至约175mM、约175mM至约200mM、约200至约250mM、约250mM至约300mM、约300mM至约350mM,或约350至约400mM Bis-Tris。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM、约75mM、约90mM、约100mM、约125mM、约150mM、约175mM、约200mM、约250mM、约300mM、约350mM或约400mM Bis-Tris。

[0151] 洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约30mM至约35mM、约35mM至约40mM、约40mM至约45mM、约45mM至约50mM、约50mM至约55mM、约55mM至约60mM、约60mM至约65mM、约65mM至约70mM、约70mM至约75mM,或约75mM至约80mM精氨酸-HCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM或50mM精氨酸-HCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约75mM至约100mM、约100mM至约125mM、约125mM至约150mM、约150mM至约175mM、约175mM至约200mM、约200mM至约225mM,或约225mM至约250mM NaCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约150mM或150mM NaCl。在某些实施方式中,第二缓冲液的pH可以为约7.5至约7.7、约7.7至约7.9、约7.9至约8.1、约8.1至约8.3、约8.3至约8.5、约8.5至约8.7、约8.7至约8.9,或约8.9至约9.2。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约8.5或8.5。

[0152] 洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM甘氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约100mM、约70mM至约120mM、约100mM至约150mM、约120mM至约170mM、约150mM至约200mM甘氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/

或洗脱缓冲液的pH可以为约7.5至约7.7、约7.7至约7.9、约7.9至约8.1、约8.1至约8.3、约8.3至约8.5、约8.5至约8.7、约8.7至约8.9,或约8.9至约9.2。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约8.5或8.5。

[0153] 洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约20mM柠檬酸钠。在某些实施方式中,第二缓冲液可包含约5mM至约10mM、约7mM至约12mM、约10mM至约15mM、约12mM至约17mM,或约15mM至约20mM柠檬酸钠。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约7.5至约7.7、约7.7至约7.9、约7.9至约8.1、约8.1至约8.3、约8.3至约8.5、约8.5至约8.7、约8.7至约8.9,或约8.9至约9.2。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约8.5或8.5。

[0154] 洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约20mM至约100mM组氨酸和约75mM至约250mM NaCl,pH为约7.5至约8.8。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约20mM至约40mM、约40mM至约60mM、约60mM至约75mM,或约75mM至约100mM组氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约20mM或20mM组氨酸。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约75mM至约100mM、约100mM至约125mM、约125mM至约150mM、约150mM至约175mM、约175mM至约200mM、约200mM至约225mM NaCl或约225mM至约250mM NaCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约150mM或150mM NaCl。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约7.5至约7.9、约7.8至约8.2、约8.1至约8.5、约8.4至约8.9,或约8.6至约9.0。在某些实施方式中,洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH可以为约8.0或8.0。

[0155] 洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约30mM至约200mM TrisHCl和约30%至约75% (w/w) 乙二醇,pH为约7.5至约9.2。洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约20mM至约80mM精氨酸-HCl和约50mM至约200mM盐,pH为约7.3至约8.8。洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇,pH为约8.5。洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约20mM至约150mM牛磺酸、约30%至约75% (w/w) 乙二醇和0.05%至0.2% (w/w) 辛基吡喃葡萄糖苷,pH为约7.3至约8.8。洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM精氨酸-HCl、约50mM至约200mM赖氨酸-HCl、约50mM至约200mM组氨酸-HCl、约1mM至约4mM N-乙酰-D,L-色氨酸和约10%至约40% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约7.3至约8.8。在某些实施方式中,如果盐(例如NaCl)存在于洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液中,在某些实施方式中盐的浓度不超过500mM,在某些实施方式中盐的浓度不超过200mM。在某些实施方式中,盐为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl、乙酸钠,或NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl和乙酸钠中的一种以上的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、蔗糖或海藻糖中的一种以上可与乙二醇组合使用或代替乙二醇。

[0156] 在某些实施方式中,第一洗涤步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液可以为基于TrisHCl的缓冲液。在某些实施方式中,第一洗涤步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液可以为基于乙酸钠(NaAc)的缓冲液。在某些实施方式中,第一洗涤步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液包含2-(N-吗啉代)乙磺酸的钠盐(MES-Na)、EDTA以及含有聚山梨醇酯80、DMSO和三(正丁基)磷酸酯(TNBP)的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中,第一洗涤步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM牛磺酸和0.2%至1.5% PEG(例如PEG

6000)。在某些实施方式中,第一洗涤步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液包含Bis-Tris以及含有Triton-X 100、聚山梨醇酯80和TNBP的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中,第一洗涤步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液包含乙酸钠和聚山梨醇酯80。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,第一洗涤步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液可以为包含NaCl的基于TrisHCl的缓冲液。

[0157] 在某些实施方式中,第二洗涤步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液可以为基于TrisHCl的缓冲液。在某些实施方式中,第二洗涤步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液可以为基于乙酸钠(NaAc)的缓冲液。在某些实施方式中,第二洗涤步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含2-(N-吗啉代)乙磺酸的钠盐(MES-Na)、EDTA以及含有聚山梨醇酯80、DMSO和三(正丁基)磷酸酯(TNBP)的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中,第二洗涤步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约50mM至约200mM牛磺酸和0.2%至1.5%PEG(例如PEG 6000)。在某些实施方式中,第二洗涤步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含Bis-Tris以及含有Triton-X 100、聚山梨醇酯80和TNBP的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中,第二洗涤步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含乙酸钠和聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,第二洗涤步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含TrisHCl和NaCl缓冲液。

[0158] 在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0159] 在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.05%至约0.2%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约6.0。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0160] 在某些实施方式中,使用至少两种洗涤缓冲液。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0161] 在某些实施方式中,使用至少两种洗涤缓冲液。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0162] 在某些实施方式中,使用至少两种洗涤缓冲液。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约90mM至约100mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0163] 在某些实施方式中,使用至少两种洗涤缓冲液。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。在某些实施方式中,至少一种洗涤缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0164] 在一些实施方式中,进行至少3个洗涤步骤;其中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.2至约6.8;至少一种洗涤缓冲液包含约30mM至约200mM TrisHCl和约75mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2;并且至少一种洗涤缓冲液包含约30mM至约200mM TrisHCl和约30%至约75% (w/w) 乙二醇,pH为约7.3至约8.8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0165] 在一些实施方式中,进行至少3个洗涤步骤。在一些实施方式中,至少一种缓冲液包含约100mM乙酸钠、约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在一些实施方式中,至少一种缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM NaCl,pH为约8.5。在一些实施方式中,至少一种缓冲液包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇,pH为约8.5。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0166] 在一些实施方式中,进行至少3个洗涤步骤;其中,第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约30mM至约200mM TrisHCl和约75mM至约500mM盐,所述第二缓冲液的pH为约7.5至约9.2;第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲

液,所述第三缓冲液包含约30mM至约200mM TrisHCl和约30%至约75% (w/w) 乙二醇,所述第三缓冲液的pH为约7.3至约8.8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0167] 在一些实施方式中,该方法还包括在第一洗涤步骤之前进行第四洗涤步骤,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约10mM至约30mM TrisHCl和约75mM至约250mM NaCl,所述第四缓冲液的pH为约6.5至约8.0。

[0168] 在一些实施方式中,进行至少3个洗涤步骤;其中,第一缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,所述第一缓冲液的pH为约6.0。在一些实施方式中,第二缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM NaCl,所述第二缓冲液的pH为约8.5。在一些实施方式中,第三缓冲液包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇,所述第三缓冲液的pH为约8.5。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0169] 在一些实施方式中,进行至少3个洗涤步骤;第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,所述第一缓冲液的pH为约5.5至约6.5;第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约10mM至约70mM TrisHCl和约75mM至约250mM NaCl,所述第二缓冲液的pH为约8.0至约9.0;第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约10mM至约70mM TrisHCl和约30%至约75% (w/w) 乙二醇,所述第三缓冲液的pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,该方法还包括在第一洗涤步骤之前进行第四洗涤步骤,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约10mM至约30mM TrisHCl和约75mM至约250mM NaCl,所述第四缓冲液的pH为约6.5至约8.0。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0170] 在一些实施方式中,进行至少3个洗涤步骤;第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,所述第一缓冲液的pH为约5.5至约6.5;第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约10mM至约70mM TrisHCl和约75mM至约250mM NaCl,所述第二缓冲液的pH为约8.0至约9.0;第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约10mM至约70mM TrisHCl和约30%至约75% (w/w) 乙二醇,所述第三缓冲液的pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,该方法还包括在第一洗涤步骤之前进行第四洗涤步骤,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约10mM至约30mM TrisHCl和约75mM至约250mM NaCl,所述第四缓冲液的pH为约6.5至约8.0。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0171] 在一些实施方式中,第一缓冲液包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,所述第一缓冲液的pH为约6.0。在某些实施方式中,第二缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM NaCl,所述第二缓冲液的pH为约8.5。在某些实施方式中,第三缓冲液包含约50mM

TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇,所述第三缓冲液的pH为约8.0。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0172] 在甚至更多实施方式中,进行至少3个洗涤步骤;第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM至约500mM 2-(N-吗啉代)乙磺酸的钠盐(MES-Na)、约3mM至约30mM EDTA以及含有聚山梨醇酯80、DMSO和三(正丁基)磷酸酯(TNBP)的溶剂/去污剂混合物,所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约30mM至约200mM TrisHCl或精氨酸-HCl和约75mM至约500mM盐,所述第二缓冲液的pH为约7.5至约9.2;第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约20mM至约80mM精氨酸-HCl和约50%至约60% (w/w) 蔗糖,所述第三缓冲液的pH为约7.3至约8.8。在一些实施方式中,盐选自:NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl、乙酸钠,以及NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl和乙酸钠中的一种以上的组合。在一些实施方式中,盐为NaCl。在一些实施方式中,盐的浓度不超过500mM。在一些实施方式中,盐的浓度不超过200mM。在一些实施方式中,第三缓冲液中的盐的浓度不超过500mM。在一些实施方式中,第三缓冲液中的盐的浓度不超过200mM。在一些实施方式中,该方法还包括在第一洗涤步骤之前进行第四洗涤步骤,第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液,所述第四缓冲液包含约20mM至约100mM精氨酸-HCl和约75mM至约250mM NaCl,所述第四缓冲液的pH为约7.5至约8.8。这些洗涤步骤中的一个以上或甚至所有这些洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。

[0173] 在一些实施方式中,该方法还包括在第一洗脱步骤之后和第二洗脱步骤之前进行洗涤步骤,洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第五缓冲液,所述第五缓冲液包含约20mM至约100mM精氨酸-HCl和约75mM至约250mM NaCl,所述第五缓冲液的pH为约7.5至约8.5。在一些实施方式中,第二洗脱步骤包括向亲和树脂中加入第二洗脱缓冲液,所述第二洗脱缓冲液包含约20mM至约100mM精氨酸-HCl、约40%至约60% (w/w) 甘油和约500mM至1000mM盐(例如NaCl),所述第二洗脱缓冲液的pH为约7.5至约8.5。

[0174] 附加洗涤步骤可以有效地使第一洗脱步骤和第二洗脱步骤之间的前沿效应(fronting effect)最小化,例如,提供仅由第一洗脱缓冲液和第二洗脱缓冲液本身而触发的洗脱,而不是由可能由第一洗脱缓冲液和第二洗脱缓冲液的混合物引起的前沿而触发的洗脱。在一些实施方式中,该方法还包括在第五洗涤步骤和第二洗脱步骤之后进行第六洗涤步骤,第六洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第六缓冲液,所述第六缓冲液包含约20mM至约100mM精氨酸-HCl和约75mM至约250mM NaCl,所述第六缓冲液的pH为约7.5至约8.5。

[0175] 在一些实施方式中,进行至少3个洗涤步骤;第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约80mM至约400mM Bis-Tris和约10克至约20克的溶剂/去污剂混合物,所述溶剂/去污剂混合物包含比率为约11:3:3(按重量计)的Triton-X 100、聚山梨醇酯80和TNBP,所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约5mM至约20mM柠檬酸钠,所述第二缓冲液的pH为约7.5至约9.2;第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约50mM至约200mM精氨酸-HCl、约50mM至约200mM赖氨酸-HCl、约50mM至约200mM组氨酸-HCl、约1mM至约4mM N-乙酰基-D,L-色氨酸和约10%至约40% (w/w) 聚山梨醇酯80,所述第

三缓冲液的pH为约7.3至约8.8。

[0176] 在某些实施方式中,第一洗脱步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液可以为基于TrisHCl的缓冲液。在某些实施方式中,第一洗脱步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液可以为基于乙酸钠(NaAc)的缓冲液。在某些实施方式中,第一洗脱步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液包含2-(N-吗啉代)乙磺酸的钠盐(MES-Na)、EDTA以及含有聚山梨醇酯80、DMSO和三(正丁基)磷酸酯(TNBP)的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中,第一洗脱步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM牛磺酸和0.2%至1.5%PEG(例如PEG 6000)。在某些实施方式中,第一洗脱步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液包含Bis-Tris以及含有Triton-X 100、聚山梨醇酯80和TNBP的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中,第一洗脱步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液包含乙酸钠和聚山梨醇酯80。这些洗脱步骤中的一个以上或甚至所有这些洗脱步骤在室温下进行。在某些实施方式中,第一洗脱步骤使用第一缓冲液,所述第一缓冲液可以为包含NaCl的基于TrisHCl的缓冲液。

[0177] 在某些实施方式中,第二洗脱步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液可以为基于TrisHCl的缓冲液。在某些实施方式中,第二洗脱步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液可以为基于乙酸钠(NaAc)的缓冲液。在某些实施方式中,第二洗脱步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含2-(N-吗啉代)乙磺酸的钠盐(MES-Na)、EDTA以及含有聚山梨醇酯80、DMSO和三(正丁基)磷酸酯(TNBP)的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中,第二洗脱步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约50mM至约200mM牛磺酸和0.2%至1.5%PEG(例如PEG 6000)。在某些实施方式中,第二洗脱步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含Bis-Tris以及含有Triton-X 100、聚山梨醇酯80和TNBP的溶剂/去污剂混合物。在某些实施方式中,第二洗脱步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含乙酸钠和聚山梨醇酯80。在某些实施方式中,第二洗脱步骤使用第二缓冲液,所述第二缓冲液包含TrisHCl和NaCl缓冲液。

[0178] 在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0179] 在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0180] 在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM甘氨酸、约1mM

至约100mM组氨酸、约20mM至约500mM盐、约1%至约10% (w/w) 海藻糖和约0.0005%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0至约8.0。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约30mM至约80mM甘氨酸、约5mM至约20mM组氨酸、约50mM至约200mM盐、约3%至约8% (w/w) 海藻糖和约0.001%至约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.5至约7.5。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约40mM至约60mM甘氨酸、约5mM至约15mM组氨酸、约90mM至约110mM盐、约4%至约6% (w/w) 海藻糖和约0.001%至约0.05% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约7.0至约7.4。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约50mM甘氨酸、约10mM组氨酸、约100mM盐、约5% (w/w) 海藻糖和约0.005% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约7.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C (例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0181] 在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约1mM至约200mM TrisHCl、约50mM至约500mM盐和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0至约8.8。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约5mM至约50mM TrisHCl、约75mM至约250mM盐和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.5至约8.5。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约10mM至约30mM TrisHCl、约140mM至约160mM盐和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约7.0至约8.0。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约20mM TrisHCl、约150mM盐和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约7.4。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C (例如,1°C至12°C或2°C至8°C,如上所述)。

[0182] 在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约10%至约75% (w/w) 乙二醇, pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约25%至约70% (w/w) 乙二醇, pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约40%至约60% (w/w) 乙二醇, pH为约8.0至约8.8。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇, pH为约8.5。

[0183] 在某些实施方式中,使用至少两种洗脱缓冲液。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐, pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C (例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0184] 在某些实施方式中,使用至少两种洗脱缓冲液。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐, pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬

酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0185] 在某些实施方式中,使用至少两种洗脱缓冲液。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0186] 在某些实施方式中,使用至少两种洗脱缓冲液。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。在某些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0187] 在一些实施方式中,进行至少3个洗脱步骤;其中,至少一种洗脱缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.2至约6.8;至少一种洗脱缓冲液包含约30mM至约200mM TrisHCl和约75mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2;至少一种洗脱缓冲液包含约30mM至约200mM TrisHCl和约30%至约75% (w/w) 乙二醇,pH为约7.3至约8.8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0188] 在一些实施方式中,进行至少3个洗脱步骤。在一些实施方式中,至少一种缓冲液包含约100mM乙酸钠、约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在一些实施方式中,至少一种缓冲液包含约50mM TrisHCl和约125mM NaCl,pH为约8.5。在一些实施方式中,至少一种缓冲液包含约50mM TrisHCl和约50% (w/w) 乙二醇,pH为约8.5。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0189] 在一些实施方式中,进行至少3个洗脱步骤;其中,第一洗脱步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液,所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;第二洗脱步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液,所述第二缓冲液包含约30mM至约200mM TrisHCl和约75mM至约500mM盐,所述第二缓冲液的pH为约7.5至约9.2;第三洗脱步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液,所述第三缓冲液包含约30mM至约200mM TrisHCl和约30%至约75% (w/w) 乙二醇,所述第三缓冲液的pH为约7.3至约8.8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0190] 在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液的pH为约5.8至约6.2,且包含约90mM至

约110mM乙酸钠和约0.09%至约0.11% (w/w) 聚山梨醇酯80/吐温80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液的pH为约6.5至约7.5,且包含约35mM至70mM甘氨酸、5mM至15mM组氨酸、50mM至200mM NaCl、3%至8%海藻糖和0.001%至0.005%Crillet™ 4。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液的pH为约8.2至约8.8,且包含约45mM至约55mM TrisHCl和约90mM至约150mM NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C (例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0191] 在一些实施方式中,第一洗脱缓冲液的pH为约5.8至约6.2,且包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.09%至约0.11% (w/w) 聚山梨醇酯80/吐温80。在一些实施方式中,第二洗脱缓冲液的pH为约6.5至约7.5,且包含约35mM至70mM甘氨酸、5mM至15mM组氨酸、50mM至200mM NaCl、3%至8%海藻糖和0.001%至0.005%Crillet™ 4。在一些实施方式中,第三洗脱缓冲液的pH为约8.2至约8.8,且包含约45mM至约55mM TrisHCl和约90mM至约150mM NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C (例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0192] 在一些实施方式中,第一洗脱缓冲液的pH为约5.8至约6.2,且包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.09%至约0.11% (w/w) 聚山梨醇酯80/吐温80;第二缓冲液的pH为约8.2至约8.8,且包含约45mM至约55mM TrisHCl和约110mM至约135mM NaCl;第三缓冲液的pH为约8.2至约8.8,且包含约45mM至约55mM TrisHCl和约45%至约55%乙二醇。在某些实施方式中,存在可选的第四缓冲液,所述第四缓冲液的pH为约7.2至约7.6,且包含约15mM至约25mM TrisHCl和约135mM至约165mM NaCl。在某些实施方式中,洗脱缓冲液的pH为约7.8至约8.2,且包含约45mM至约55mM TrisHCl、约45%至约55%乙二醇和约650mM至约850mM NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C (例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0193] 在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液的pH为约7.2至约7.6,且包含约15mM至约25mM TrisHCl和约135mM至约165mM NaCl。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液的pH为约5.8至约6.2,且包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.09%至约0.11% (w/w) 聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液的pH为约8.2至约8.8,且包含约45mM至约55mM TrisHCl和约110mM至约135mM NaCl。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液的pH为约7.5至约8.5,且包含约45mM至约55mM TrisHCl和约45%至约55%乙二醇。在一些实施方式中,至少一种洗脱缓冲液的pH为约7.8至约8.2,且包含约45mM至约55mM TrisHCl、约45%至约55%乙二醇和约650mM至约850mM NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C (例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0194] 在一些实施方式中,所述第一缓冲液的pH为约7.2至约7.6,且包含约15mM至约25mM TrisHCl和约135mM至约165mM NaCl;第二缓冲液的pH为约5.8至约6.2,且包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.09%至约0.11% (w/w) 聚山梨醇酯80;第三缓冲液的pH为约8.2至约8.8,且包含约45mM至约55mM TrisHCl和约110mM至约135mM NaCl;第四缓冲液的pH为约7.5至约8.5,且包含约45mM至约55mM TrisHCl和约45%至约55%乙二醇;第五洗脱缓冲液为pH为约7.8至约8.2,且包含约45mM至约55mM TrisHCl、约45%至约55%乙二醇和约650mM至约850mM NaCl。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C (例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0195] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18℃(例如,1℃至12℃,或2℃至8℃,如上所述)。

[0196] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18℃(例如,1℃至12℃,或2℃至8℃,如上所述)。

[0197] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约8.8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18℃(例如,1℃至12℃,或2℃至8℃,如上所述)。

[0198] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18℃(例如,1℃至12℃,或2℃至8℃,如上所述)。

[0199] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18℃(例如,1℃至12℃,或2℃至8℃,如上所述)。

[0200] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实

施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0201] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约8.8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0202] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0203] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,第二洗涤缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0204] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,第二洗涤缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0205] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,第二洗涤缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2%(w/w)聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约8.8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0206] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。在某些实施方式中,第二洗涤缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0207] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐,pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中,第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液可包含约10mM至约200mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0208] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0209] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐,pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中,第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0210] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐,pH为约8.5。在某些实施方式中,第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在某些实施方式中,盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、

$K_2SO_4$ 、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中,盐为NaCl。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0211] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0212] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0213] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0214] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0215] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0216] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0217] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中,洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中,洗脱步骤发生在低于18°C(例如,1°C至12°C,或2°C至8°C,如上所述)。

[0218] 在某些实施方式中,第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80,pH为约6.0。在某些实施方式中,第一洗脱缓冲液可包含约

100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。在某些实施方式中, 洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中, 洗脱步骤发生在低于18°C (例如, 1°C至12°C, 或2°C至8°C, 如上所述)。

[0219] 在某些实施方式中, 第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中, 第二洗涤缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM盐, pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中, 第一洗脱缓冲液可包含约10mM至约2000mM乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中, 盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中, 盐为NaCl。在某些实施方式中, 洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中, 洗脱步骤发生在低于18°C (例如, 1°C至12°C, 或2°C至8°C, 如上所述)。

[0220] 在某些实施方式中, 第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中, 第二洗涤缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM盐, pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中, 第一洗脱缓冲液可包含约50mM至约200mM乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中, 盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中, 盐为NaCl。在某些实施方式中, 洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中, 洗脱步骤发生在低于18°C (例如, 1°C至12°C, 或2°C至8°C, 如上所述)。

[0221] 在某些实施方式中, 第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中, 第二洗涤缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM盐, pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中, 第一洗脱缓冲液可包含约90mM至约110mM乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中, 盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中, 盐为NaCl。在某些实施方式中, 洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中, 洗脱步骤发生在低于18°C (例如, 1°C至12°C, 或2°C至8°C, 如上所述)。

[0222] 在某些实施方式中, 第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。在某些实施方式中, 第二洗涤缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM盐, pH为约8.5。在某些实施方式中, 第一洗脱缓冲液可包含约100mM乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。在某些实施方式中, 盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中, 盐为NaCl。在某些实施方式中, 洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中, 洗脱步骤发生在低于18°C (例如, 1°C至12°C, 或2°C至8°C, 如上所述)。

[0223] 在某些实施方式中, 第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约10mM至约2000mM

乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.0至约7.4。在某些实施方式中, 第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM 盐, pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中, 第一洗脱缓冲液可包含约10mM至约200mM TrisHCl和约50mM至约500mM 盐, pH为约7.5至约9.2。在某些实施方式中, 盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中, 盐为NaCl。在某些实施方式中, 洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中, 洗脱步骤发生在低于18°C (例如, 1°C至12°C, 或2°C至8°C, 如上所述)。

[0224] 在某些实施方式中, 第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约50mM至约200mM 乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.5至约7.0。在某些实施方式中, 第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM 盐, pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中, 第一洗脱缓冲液可包含约25mM至约100mM TrisHCl和约75mM至约250mM 盐, pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中, 盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中, 盐为NaCl。在某些实施方式中, 洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中, 洗脱步骤发生在低于18°C (例如, 1°C至12°C, 或2°C至8°C, 如上所述)。

[0225] 在某些实施方式中, 第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约90mM至约110mM 乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约5.5至约6.5。在某些实施方式中, 第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM 盐, pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中, 第一洗脱缓冲液可包含约40mM至约60mM TrisHCl和约100mM至约150mM 盐, pH为约8.0至约9.0。在某些实施方式中, 盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中, 盐为NaCl。在某些实施方式中, 洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中, 洗脱步骤发生在低于18°C (例如, 1°C至12°C, 或2°C至8°C, 如上所述)。

[0226] 在某些实施方式中, 第一洗涤缓冲液和第三洗涤缓冲液可包含约100mM 乙酸钠和约0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80, pH为约6.0。在某些实施方式中, 第二洗涤缓冲液和第四洗涤缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM 盐, pH为约8.5。在某些实施方式中, 第一洗脱缓冲液可包含约50mM TrisHCl和约125mM 盐, pH为约8.5。在某些实施方式中, 盐可以为NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、LiCl、CsCl、乙酸钠(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸钾或它们的组合。在某些实施方式中, 盐为NaCl。在某些实施方式中, 洗涤步骤在室温下进行。在某些实施方式中, 洗脱步骤发生在低于18°C (例如, 1°C至12°C, 或2°C至8°C, 如上所述)。

[0227] 洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的其他示例可见于W02019133677, 其出于所有预期目的整体并入本文。

[0228] 树脂

[0229] 在一些实施方式中, 亲和树脂为POROS™ CaptureSelect™ AAVx。

[0230] 在一些实施方式中, AAV为AAV8, 亲和树脂为POROS™ CaptureSelect™ AAV8。在一

些实施方式中, AAV为AAV9, 亲和树脂为POROS™ CaptureSelect™ AAV9。在一些实施方式中, AAV为AAV9, 亲和树脂为POROS™ CaptureSelect™ AAVx。

[0231] 在一些实施方式中, AAV为AAV8, 亲和树脂为POROS™ CaptureSelect™ AAV8, 洗脱缓冲液为酸性且不包含乙二醇。在一些实施方式中, AAV为AAV9, 亲和树脂为POROS™ CaptureSelect™ AAV9, 洗脱缓冲液为酸性且不包含乙二醇。在一些实施方式中, AAV为AAV9, 亲和树脂为POROS™ CaptureSelect™ AAVx, 洗脱缓冲液为酸性且不包含乙二醇。

[0232] 在一些实施方式中, AAV为AAV8, 亲和树脂为免疫亲和树脂, 其由固定在层析基质上的来自ADK8或ADK8/9型的针对AAV8的固定化单克隆抗体组成。在一些实施方式中, AAV为AAV9, 亲和树脂为免疫亲和树脂, 其由固定在层析基质上的来自ADK9或ADK8/9型的针对AAV9的固定化单克隆抗体组成。

[0233] rAAV颗粒的来源

[0234] 关于本公开的方法, AAV可以为任何AAV血清型。在某些实施方式中, 通过本文所述的方法纯化的AAV为AAV1血清型、AAV2血清型、AAV3血清型、AAV4血清型、AAV5血清型、AAV6血清型、AAV7血清型、AAV8血清型、AAV9血清型、AAV10血清型、AAV11血清型、AAV12血清型、AAV13血清型、AAAV血清型、BAAV血清型、AAV (VR-195) 血清型和AAV (VR-355) 血清型, 或嵌合AAV载体。在某些实施方式中, AAV为野生型。

[0235] 在某些实施方式中, AAV为AAV5血清型。在某些实施方式中, AAV为AAV9血清型。在某些实施方式中, AAV通过基因工程被修饰和/或被化学修饰。在某些实施方式中, AAV包含修饰的衣壳, 例如基因工程或化学修饰的AAV衣壳。在某些实施方式中, AAV载体包含VP1, VP1包含SEQ ID NO:1序列。在某些实施方式中, AAV载体包含VP2, VP2包含SEQ ID NO:2序列。在某些实施方式中, AAV载体包含VP3, VP3包含SEQ ID NO:3的序列。

[0236] 在一些实施方式中, AAV通过基因工程被修饰和/或被化学修饰。在某些实施方式中, AAV被基因修饰和/或化学修饰。在某些实施方式中, AAV被基因修饰。在某些实施方式中, AAV被化学修饰。

[0237] 在某些实施方式中, AAV已被基因修饰, 以产生用于基因治疗应用的具有改变的受体使用、抗原性、转导效率和/或组织嗜性的AAV载体。在某些实施方式中, AAV可被基因修饰以将肽配体、抗体、抗体片段、MHC和/或受体插入病毒衣壳中。在某些实施方式中, AAV可被基因修饰以插入用于标记病毒衣壳的肽。可能的修饰的非限制性实例可见于Büning H.、Bolyard C.M.、Hallek M.、Bartlett J.S., (2012) AAV载体颗粒的修饰和标记, 收录于: Snyder R.、Moullier P. 主编, 腺相关病毒, 分子生物学方法 (方法和方案), 第807卷, Humana出版社, 其出于所有预期目的整体并入本文。

[0238] 在某些实施方式中, AAV已被化学修饰以改变AAV载体的组织嗜性。例如, 可以利用针对特定氨基酸侧链的化学选择性反应来改变AAV衣壳上受体结合结构域内的电荷、极性、疏水性和氢键电位。此种改变AAV衣壳表面上的特定受体组成的能力允许产生具有改变的嗜性的合成载体。在某些实施方式中, 化学修饰的AAV载体可表现出化学修饰的AAV载体的改变的受体使用、抗原性、转导效率和/或组织嗜性。可能的修饰的非限制性实例可见于Büning H.、Bolyard C.M.、Hallek M.、Bartlett J.S., (2012) AAV载体颗粒的修饰和标记, 收录于: Snyder R.、Moullier P. 主编, 腺相关病毒, 分子生物学方法 (方法和方案), 第807卷, Humana出版社, 其出于所有预期目的整体并入本文。

[0239] 在某些实施方式中, AAV级分表示由转染的宿主细胞产生的AAV级分。在某些实施方式中, AAV级分表示从细胞培养物(包含用三质粒系统转染的宿主细胞)收获的上清液, 其中, 该系统的一种质粒包含目的基因或cDNA, 一种质粒编码衣壳蛋白VP1、衣壳蛋白VP2和/或衣壳蛋白VP3。在某些实施方式中, VP1、VP2和/或VP3为AAV8 VP1、AAV8 VP2和/或AAV8 VP3。在某些实施方式中, VP1、VP2和/或VP3为AAV9 VP1、AAV9 VP2和/或AAV9 VP3。用于产生rAAV的三质粒转染为本领域已知。参见, 例如, Qu等, 2015(同上); Mizukami等, “AAV载体生产纯化方案”(博士论文), 分子医学中心遗传治疗学部, 1998; 和Kotin等, Hum Mol Genet 20(R1):R2-R6(2011)。在某些实施方式中, 转染可以使用无机化合物(例如磷酸钙)或有机化合物、聚乙烯亚胺(PEI)或非化学方法(例如电穿孔)进行。在某些实施方式中, 宿主细胞为贴壁细胞。在某些实施方式中, 宿主细胞为悬浮细胞。在某些实施方式中, 宿主细胞为HEK293细胞或Sf9细胞。在某些实施方式中, 细胞培养物包含不含血清和蛋白质的培养基。在某些实施方式中, 培养基的化学成分确定且不含动物衍生组分(例如水解产物)。在某些实施方式中, 包含rAAV颗粒的级分表示包含用三质粒系统转染的HEK293细胞的级分。在某些实施方式中, 包含rAAV颗粒的级分描述于美国临时申请号62/417, 775和W02018128688, 其出于所有预期目的通过引用并入本文。

[0240] 在培养宿主细胞(例如HEK293细胞)产生AAV颗粒(例如AAV8、AAV9等)并将澄清的无细胞培养上清液浓缩和/或过滤后, 将病毒颗粒加样到亲和基质上。在某些实施方式中, 将病毒颗粒加样到pH为约7.4至约7.8的溶液中。在某些实施方式中, 将病毒颗粒加样到pH为约8.3至约8.7的溶液中。在某些实施方式中, 将病毒颗粒加样到的pH为约8.5的溶液中。在某些实施方式中, pH为8.3至8.7, 且溶液包含NaCl和TrisHCl。在某些实施方式中, 将病毒颗粒加样到包含约20mM TrisHCl和约150mM NaCl且pH为约8.5的溶液中。

#### [0241] 附加步骤和注意事项

[0242] 本公开的方法包括本文公开步骤的任何组合, 且可以可选地与一个以上附加步骤组合。因此, 在示例性方面, 本公开的方法还包括用本文所述的三质粒系统转染宿主细胞的步骤。在示例性方面, 本公开的方法包括从细胞培养物中收获上清液, 所述细胞培养物包含用三质粒系统转染的宿主细胞(例如HEK293细胞)。在示例性方面, 转染和收获步骤发生在本文所述的超速离心步骤之前。

[0243] 本公开的方法可以包括其他附加步骤, 所述附加步骤可以进一步提高AAV的纯度和去除其他不需要的组分和/或浓缩级分和/或调节级分以用于后续步骤。

[0244] 在某些实施方式中, 在上面列出的洗涤步骤之前进行可选的再平衡步骤。

[0245] 在某些实施方式中, 在从宿主细胞产物中亲和纯化含有AAV的溶液之前, 可以进行预纯化以去除一种以上复杂(complex)酸性蛋白质结构和宿主细胞DNA。预纯化可以通过阴离子交换以流穿(flow through)模式进行。可在本文所述的任何亲和纯化方法之前进行预纯化步骤。可以通过对此种含有AAV的溶液进行预纯化来去除以下中的一种以上: 组蛋白(例如, 1型组蛋白H2A、1-B型组蛋白H2B、组蛋白H4、组蛋白H1.4)、60S核糖体蛋白(例如, 60S核糖体蛋白L27、60S核糖体蛋白L6和60S核糖体蛋白L30)、细胞质肌动蛋白(例如, 细胞质肌动蛋白1)、微管蛋白(例如, 微管蛋白 $\beta$ -2A链)、异质核糖核蛋白C、Rep68蛋白、37kDa形式的HEK293层粘连蛋白受体(LamR 37kDa)和ATP依赖性分子伴侣HSC82。

[0246] 在某些实施方式中, 附加步骤可以为超速离心步骤。

[0247] 在示例性方面,该方法包括深度过滤步骤。在示例性方面,该方法包括:使用包含纤维素和珍珠岩且最小渗透率为约500L/m<sup>2</sup>的过滤器,对转染的HEK293细胞培养物上清液级分进行深度过滤。在示例性方面,该方法还包括:使用最小孔径为约0.2 $\mu$ m的过滤器。在示例性方面,在深度过滤之后,通过最小孔径为约0.2 $\mu$ m的过滤器进行过滤。在示例性方面,对深度过滤器和最小孔径为约0.2 $\mu$ m的过滤器之一或两者进行洗涤,收集洗涤液。在示例性方面,将洗涤液合并在一起,将其与深度过滤和用最小孔径为约0.2 $\mu$ m的过滤器过滤时获得的滤液合并。

[0248] 在一些实施方式中,该方法还包括:在将含有AAV的溶液加样到亲和树脂上之前,使含有AAV的溶液与阴离子交换剂接触,以及从阴离子交换剂上洗脱含有AAV的溶液。阴离子交换剂可以以流穿模式操作。

[0249] 在示例性方面,本公开的方法包括一个以上色谱步骤。在示例性方面,该方法包括负色谱步骤,使得不需要的组分结合到色谱树脂而所需AAV不结合到色谱树脂。在示例性方面,该方法包括负阴离子交换(AEX)色谱步骤或“非结合模式”的AEX色谱步骤。“非结合模式”的优点包括相对容易进行该程序和进行后续分析。

[0250] 因此,在示例性实施方式中,纯化AAV颗粒的方法包括:在允许AAV流出AEX色谱柱或膜的条件下,通过将包含AAV颗粒的级分加入AEX色谱柱或膜,来对所述级分进行负阴离子交换(AEX)色谱;以及收集AAV颗粒。在示例性方面,将级分加入到具有加样缓冲液的AEX色谱柱或膜,所述加样缓冲液包含约100mM至约150mM盐(例如NaCl),可选地,加样缓冲液的pH为约8至约9。在示例性方面,加样缓冲液包含约115mM至约130mM盐(例如NaCl),可选地,加样缓冲液包含约120mM至约125mM盐(例如NaCl)。在示例性方面,负AEX步骤在本文所述的超速离心步骤之前进行。

[0251] 在示例性方面,本公开的方法包括使用超滤/渗滤系统浓缩AAV级分。在示例性方面,本公开的方法包括一个以上切向流过滤(TFF)步骤。在示例性方面,AAV级分经历超滤/渗滤。在示例性方面,在进行包括负AEX色谱的步骤之前、在进行包括负AEX色谱的步骤之后,或者在进行包括负AEX色谱的步骤之前和之后,用超滤/渗滤系统浓缩AAV级分。在示例性方面,TFF步骤在本文所述的超速离心步骤之前进行。

[0252] 例如,在使用Baculo转染系统时,包膜病毒灭活可能特别重要。在示例性方面,本公开的方法包括对包含rAAV颗粒的级分进行过滤,以去除级分中尺寸大于rAAV颗粒的病毒。

[0253] 不希望受理论束缚,乙二醇本身或与另一种添加剂组合可以灭活此类脂质包膜病毒。示例性添加剂包括非离子去污剂、脂肪族试剂(例如TnBP)和去污剂(例如,聚山梨醇酯(例如吐温)、Triton X100、TnBP)。例如,溶剂-去污剂混合物可包含1%Triton X100、0.3%磷酸三正丁酯和0.3%吐温80。

[0254] 如下表1中所概述,可在各种亲和色谱运行中检测“柱上”脂质包膜病毒的灭活。

[0255] 表1:变体A、B和C中所用的溶剂去污剂处理

使用去污剂溶剂的步骤	变体 A	变体 B	变体 C
<b>洗涤 2</b> 可能在步骤: 加样, 洗涤 1, 洗涤 2, 洗涤 3, 洗涤 4, 洗脱	可能进行的 SD 处理 10-30g/kg 的混合物 ( 18.0g 吐温 80、3.4g DMSO 和 3.6g TnBP)	无	进行 SD 处理 16.6 g S/D 溶液(10.87g Triton X100、3.31g 聚 山梨醇酯 80 和 3.01g TnBP)
<b>洗涤 4</b> 可能在步骤: 洗涤 1, 洗涤 2, 洗涤 3, 洗涤 4	无	高 pH 8.5, 在 50-60% (w/w) 乙二醇和去 污剂 (例如 0.1-10% 辛基吡喃葡萄糖苷) 存 在下 不在洗脱液中	1-20% (w/w) 聚山梨 醇酯 80  可能在洗脱液中
洗涤 X	无	无	极性有机溶剂 50%二甲基亚砜

[0257] 含有DMSO的缓冲液洗涤X缓冲液在接近中性pH(例如pH 8.0)的CaptureSelect AAV8树脂上可有效触发AAV9而非AAV8的洗脱,此结果令人惊讶。在接近中性pH(例如pH 8.0)的CaptureSelect AAVx树脂上,含有DMSO的缓冲液洗涤X缓冲液可有效触发各种AAV的洗脱,所述AAV包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV、BAAV、AAV(VR-195)和AAV(VR-355),此结果令人惊讶。在某些实施方式中,AAV为AAV5血清型。在某些实施方式中,AAV为AAV6血清型。在某些实施方式中,AAV为AAV8血清型。在某些实施方式中,AAV为AAV9血清型。

[0258] 不希望受理论束缚,洗涤X缓冲液预期具有洗涤色谱柱和/或灭活或分解脂质包膜病毒的活性。未预料到洗涤X缓冲液会差异地洗脱AAV8和AAV9。

[0259] 在示例性方面,本公开的方法包括一个以上质量控制步骤,例如,测量在工艺的一个以上步骤(例如每个步骤之后)获得的AAV级分的效价或比活性的步骤。在示例性方面,本公开的方法包括对AAV具有特异性的ELISA。在示例性方面,ELISA为夹心ELISA。在示例性方面,夹心ELISA包含对AAV表位具有特异的抗体。在示例性方面,AAV表位是存在于组装的AAV衣壳上的构象表位。如本文所讨论,ELISA可以代替qPCR作为确定AAV级分效价的方式。在示例性方面,本公开的方法包括通过AAV特异性ELISA检测AAV级分,该方法不包括通过定量PCR检测效价的方法。在示例性方面,AAV特异性ELISA足以提供关于AAV级分的效价的代表性读数,因为AAV级分中的大多数衣壳为完整衣壳。

[0260] 在示例性方面,本公开的方法包括在本公开的一个以上步骤之后进行对AAV具有特异性的ELISA。在示例性方面,本公开的方法包括通过AAV特异性ELISA检测深度过滤后获得的AAV级分,以确定该级分中AAV的比活性。在示例性方面,本公开的方法包括通过AAV特异性ELISA检测在使用超滤/渗滤系统浓缩AAV级分后获得的AAV级分,以确定该级分中AAV的比活性。在示例性方面,本公开的方法包括通过AAV特异性ELISA检测在切向流过滤(TFF)步骤后获得的AAV级分,以确定该级分中AAV的比活性。在示例性方面,本公开的方法包括通过AAV特异性ELISA检测在负阴离子交换(AEX)色谱后获得的AAV级分,以确定该级分中AAV的比活性。在示例性方面,本公开的方法包括通过AAV特异性ELISA检测精制步骤后获得的AAV级分,以确定该级分中AAV的比活性。

[0261] 在一些实施方式中,该方法还包括:使含有AAV的溶液与过滤器接触,所述过滤器包含带正电荷的基团,所述带正电荷的基团可有效耗竭含有AAV的溶液中的酸性带电荷的

污染物。在一些实施方式中,该方法还包括:对AAV级分进行纳滤,去除大于35nm的病毒。在一些实施方式中,该方法还包括精制步骤,所述精制步骤包括进行阳离子交换色谱。用于阳离子交换色谱的示例性介质包括但不限于Capto™ S、Eshmuno® S和Fractogel® S03。在一些实施方式中,该方法还包括:通过AAV特异性(例如对AAV8或AAV9具有特异性)ELISA检测AAV级分。AAV特异性ELISA可以为对AAV(例如AAV8或AAV9)具有特异性的夹心ELISA。

#### [0262] AAV产品

[0263] 在另一个方面,提供了通过本文所述的任何方法生产的AAV产品。

[0264] 本文还提供了通过本公开的方法生产的AAV产品。在示例性方面,AAV产品包含由约1000L起始材料(例如细胞培养物)产生的至少约 $10^{12}$ 个病毒颗粒(vp)或由约1000L起始材料(例如细胞培养物)产生的至少约 $10^{13}$ 个病毒颗粒(vp)。在示例性方面,AAV产品是通过在没有转基因质粒的情况下转染rep-cap和Ad辅助质粒而产生的空衣壳。纯化的空质粒可用于从患者血液中耗竭或去除对AAV抗原具有特异性的抗体。

[0265] 在示例性方面,本公开的AAV产品是高纯度、高效价且适用于在人类中临床使用的。在示例性方面,AAV产品包含同质的群体和高纯度的AAV颗粒。在示例性方面,AAV产品包含全长载体DNA。在示例性实施方式中,AAV产品基本上不含不需要的污染物,所述污染物包括但不限于含有截短或不完整载体DNA的AAV颗粒、具有不完全蛋白质组成和寡聚结构的AAV颗粒或污染性病毒(例如非AAV、脂质包膜病毒)。在示例性实施方式中,AAV产品包含大量编码目的蛋白的cDNA。在示例性方面,本公开的AAV产品适合施用于人。在示例性方面,AAV产品是无菌和/或良好生产规范(GMP)等级的。在示例性方面,AAV产品符合《美国药典》第1046章或《欧洲药典》关于基因治疗药物产品的要求或美国食品和药物管理局(USFDA)或欧洲药品管理局(EMA)的规定。在示例性方面,AAV产品是一种即用型产品,用于直接施用于人而几乎不进行加工或处理。

[0266] 关于本发明的方法,AAV级分在示例性方面为浓缩的AAV级分。在某些实施方式中,AAV级分包含至少 $1 \times 10^{10}$ 个、 $1 \times 10^{11}$ 个或 $1 \times 10^{12}$ 个AAV衣壳/mL。在某些实施方式中,AAV级分包含至少 $1 \times 10^{12}$ 个AAV衣壳/mL。AAV衣壳可以包括空AAV衣壳和完整AAV衣壳。在某些实施方式中,与空AAV和/或过满的AAV衣壳相比,AAV级分包含更多的完整AAV衣壳。

[0267] 在某些实施方式中,从洗脱步骤洗脱的AAV衣壳的至少约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%是完整AAV衣壳。

[0268] 在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产 and 纯化AAV的方法得到的产品所包含的完整衣壳多出至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产 and 纯化AAV的方法得到的产品所包含的完整衣壳多出约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、

25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产和纯化AAV的方法得到的产品所包含的完整衣壳多出至少约6%。在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产和纯化AAV的方法得到的产品所包含的完整衣壳多出至少约10%。在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产和纯化AAV的方法得到的产品所包含的完整衣壳多出至少约20%。在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产和纯化AAV的方法得到的产品所包含的完整衣壳多出约6%。在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产和纯化AAV的方法得到的产品所包含的完整衣壳多出约10%。在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产和纯化AAV的方法得到的产品所包含的完整衣壳多出约16%。在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产和纯化AAV的方法得到的产品所包含的完整衣壳多出约20%。

[0269] 在各种实施方式中,与由不进行洗涤步骤的比较程序所得的产率相比,在本文所述的纯化步骤之后通过ITR-qPCR法测得的AAV(例如AAV9)的产率(重量/体积)高出至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或65%。

[0270] 在各种实施方式中,与由不进行洗涤步骤的比较程序所得的产率相比,在本文所述的纯化步骤之后通过ITR-qPCR法测得的AAV(例如AAV9)的产率(重量/重量)高出至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或65%。

[0271] 有利地,该方法可扩展至大量起始材料(例如细胞培养物)。在某些实施方式中,本文提供的方法是能够由至少或约500L、至少或约600L、至少或约700L、至少或约800L、至少或约900L、至少或约1000L的体积纯化AAV的大规模方法。在某些实施方式中,该方法可扩展至起始材料(例如细胞培养物)的最小体积为至少或约1250L、至少或约1500L、至少或约2000L、至少或约2500L、至少或约3000L、至少或约4000L、至少或约5000L、至少或约6000L、至少或约7000L、至少或约8000L、至少或约9000L、至少或约10,000L或更大体积。例如,该方法以最小体积为约1000L或约10,000L或25,000L以上的产生AAV的细胞培养物来进行。

[0272] 本文所述的产生和纯化AAV的方法也是有利的,因为该方法导致产生高滴度AAV。在某些实施方式中,包含至少约 $10^{10}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。在某些实施方式中,包含至少约 $10^{11}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。在某些实施方式中,包含至少约 $10^{12}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。在某些实施方式中,包含至少约 $10^{13}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。在某些实施方式中,包含至少约 $10^{14}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。在某些实施方式中,包含至少约 $10^{15}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。在某些实施方式中,包含至少约 $10^{16}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV

产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。在某些实施方式中,包含至少约 $10^{17}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。在某些实施方式中,包含至少约 $2 \times 10^{16}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。在某些实施方式中,包含至少约 $5 \times 10^{17}$ 个病毒颗粒(vp)的AAV产品由约1000L的起始材料(例如细胞培养物)产生。

[0273] 本文所述方法的另一个优点是该方法产生高纯度的AAV产品。在某些实施方式中,通过本公开的方法产生的AAV产品基本上不含一种以上污染物:宿主细胞蛋白、宿主细胞核酸(例如游离宿主细胞DNA和游离质粒DNA)、质粒DNA、空病毒衣壳、热休克蛋白70(HSP70)、乳酸脱氢酶(LDH)、蛋白酶体、污染性非AAV病毒(例如脂包膜病毒)、宿主细胞培养组分(例如抗生素)、支原体、热原、细菌内毒素、细胞碎片(例如由膜脂、蛋白质和其他生物聚合物组成的碎片)和外源因子。当根据本文所述的产生和纯化AAV的方法对AAV进行纯化时,可能无法检测到以下杂质中的一种以上或甚至全部:组蛋白H2A 1型、组蛋白H2B 1-B型、组蛋白H4、热休克蛋白70kDa 1A、丙酮酸激酶PKM、延伸因子2、ATP-柠檬酸合酶、组蛋白H1.4、免疫球蛋白重链恒定区 $\gamma$  1(来自酸性洗脱方法的固定化配体)、60S核糖体蛋白L27、果糖-二磷酸醛缩酶A、热休克同源蛋白71kDa、细胞质肌动蛋白1、S-甲酰谷胱甘肽水解酶、天冬酰胺合成酶(谷氨酰胺水解)、L-乳酸脱氢酶B链、微管蛋白 $\beta$ -2A链、X染色体RNA结合基序蛋白、60S核糖体蛋白L6、细胞质苏氨酸tRNA连接酶、免疫球蛋白 $\kappa$ 常数、60S核糖体蛋白L30、含WD重复的蛋白1、腺苷高半胱氨酸酶、异质核糖核蛋白C、蛋白Rep68、Thimet寡肽酶、D-3-磷酸甘油酸脱氢酶和ATP依赖性分子伴侣HSC82。根据本文所述的产生和纯化阴离子AAV的方法,在洗涤步骤之前添加阴离子交换步骤也可使以下物质无法检测到:组蛋白H1.4、60S核糖体蛋白L27、细胞质肌动蛋白1、微管蛋白 $\beta$ -2A链、60S核糖体蛋白L6、60S核糖体蛋白L30、异质核糖核蛋白C、蛋白Rep68和ATP依赖性分子伴侣HSC82。

[0274] 在示例性实施方式中,本公开的方法提供了纯化的AAV产品,其中,起始材料(例如细胞培养物)中发现的至少或约50%的污染物被去除。在示例性实施方式中,本公开的方法提供了纯化的AAV产品,其中,起始材料(例如细胞培养物)中发现的至少或约60%的污染物被去除。在示例性实施方式中,本公开的方法提供了纯化的AAV产品,其中,起始材料(例如细胞培养物)中发现的至少或约70%的污染物被去除。在示例性实施方式中,本公开的方法提供了纯化的AAV产品,其中,起始材料(例如细胞培养物)中发现的至少或约80%的污染物被去除。在示例性实施方式中,本公开的方法提供了纯化的AAV产品,其中,起始材料(例如细胞培养物)中发现的至少或约90%的污染物被去除。

[0275] 在某些实施方式中,与没有进行相同洗涤方案的比较程序相比,本文所述的生产 and 纯化AAV的方法使包括蛋白质杂质(例如宿主细胞(HC)杂质)在内的杂质的数量减少高出约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96.0%、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%、96.6%、96.7%、96.8%、96.9%、97.0%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98.0%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%。在一些实施方式中,由洗脱步骤获得的AAV的杂质水平 $\leq 99.9\%$ 。在一些实施方式中,由洗脱步骤获得的AAV的杂质水平 $\leq 99.0\%$ 。

[0276] 在某些实施方式中,本文所述的生产 and 纯化AAV的方法得到的产品的纯度为至少

约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96.0%、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%、96.6%、96.7%、96.8%、96.9%、97.0%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98.0%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%或99.2%纯。在一些实施方式中,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平为99.9%以上。在一些实施方式中,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平为99.0%以上。

[0277] 在某些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和在较低温度下洗脱)获得的产品相比,本文所述的生产 and 纯化AAV的方法得到的产品的纯度高出至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96.0%、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%、96.6%、96.7%、96.8%、96.9%、97.0%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98.0%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%或99.2%。在一些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和较低温度下洗脱)获得的产品相比,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平高出99.9%。在一些实施方式中,与通过比较程序(不进行相同的洗涤方案和较低温度下洗脱)获得的产品相比,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平高出99.0%。

[0278] 在某些实施方式中,通过本公开的方法生产的AAV产品适合施用于人。在某些实施方式中,AAV为重组AAV(rAAV)。在某些实施方式中,通过本公开的方法生产的AAV产品是无菌的和/或良好生产规范(GMP)等级的。在某些实施方式中,通过本公开的方法生产的AAV产品符合《美国药典》第1046章或《欧洲药典》关于基因治疗药物产品的要求或美国食品和药物管理局(USFDA)或欧洲药品管理局(EMA)的规定。

[0279] 此外,由本文所述的方法生产的AAV产品是高效价的。AAV产品(例如AAV8或AAV9产品)的效价可以用以下来描述:(1)体内生物效价(例如小鼠中活性蛋白的产生),表示为U(FIX或FVIII)/mL小鼠血浆;或(2)体外生物效价。体外生物效价测试检测AAV载体感染细胞(例如HepG2细胞)的潜力,这些细胞表达目的蛋白并将目的蛋白分泌到培养基中,通过ELISA技术和/或酶活性确定数量。测量体内和体外生物效价的合适方法为本领域已知并且也在本文中描述。

[0280] 在进一步实施方式中,由本文所述的方法产生的AAV产品表现出优异的比活性。AAV的“比活性”由qPCR与 $\mu\text{g}$  AAV8的比率表示。在示例性实施方式中,由本文所述方法生产的AAV产品显示出优异的每 $\mu\text{g}$  AAV的GOI比率,这表明AAV产品具有大量的“完整”病毒颗粒。在某些实施方式中,本公开的方法包括通过AAV特异性ELISA检测AAV级分。在某些实施方式中,AAV特异性ELISA足以提供关于AAV级分效价的代表性读数,因为AAV级分中的大多数衣壳为完整衣壳。

[0281] 非限制性实施方式:

[0282] 1. 纯化腺相关病毒(AAV)的方法,其中,该方法包括:

[0283] (a) 在室温和允许溶液中的AAV与亲和树脂结合的条件下,将含有AAV的溶液加样到针对AAV的亲和树脂上;

[0284] (b) 在室温下进行至少一个洗涤步骤;以及

[0285] (c) 在低于18°C的温度下从亲和树脂上洗脱AAV。

- [0286] 2. 根据实施方式1所述的方法,其中,步骤(c)中的温度为1℃至12℃。
- [0287] 3. 根据实施方式1所述的方法,其中,步骤(c)中的温度为2℃至8℃。
- [0288] 4. 根据实施方式1至3中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括:在将含有AAV的溶液加样到亲和树脂上之前,使含有AAV的溶液与阴离子交换剂接触,以及从阴离子交换剂中洗脱含有AAV的溶液。
- [0289] 5. 根据实施方式1至4中任一项所述的方法,其中,所述洗涤步骤中的至少一个包括向亲和树脂中加入包含有机溶剂和/或去污剂的缓冲液。
- [0290] 6. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含乙酸钠。
- [0291] 7. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含TrisHCl和盐。
- [0292] 8. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含组氨酸、组氨酸-HCl、精氨酸-HCl、赖氨酸-HCl、甘氨酸、牛磺酸、MES-Na、Bis-Tris和N-乙酰基-D,L-色氨酸中的一种以上。
- [0293] 9. 根据实施方式7或8所述的方法,其中,所述盐为NaCl。
- [0294] 10. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含氯化镁。
- [0295] 11. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含TrisHCl和乙二醇。
- [0296] 12. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含精氨酸-HCl以及蔗糖和甘油中的一种。
- [0297] 13. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含牛磺酸和乙二醇。
- [0298] 14. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含精氨酸-HCl、赖氨酸-HCl和组氨酸-HCl。
- [0299] 15. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含TrisHCl和DMSO。
- [0300] 16. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述有机溶剂或去污剂为聚山梨醇酯80、乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、DMSO、蔗糖或海藻糖。
- [0301] 17. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述去污剂包含Triton X100、聚山梨醇酯80和三(正丁基)磷酸酯(TNBP)中的一种以上。
- [0302] 18. 根据实施方式17所述的方法,其中,所述去污剂包含聚山梨醇酯80。
- [0303] 19. 根据实施方式5至18中任一项所述的方法,其中,所述缓冲液包含约0.05%至约30% (w/w)的有机溶剂或去污剂。
- [0304] 20. 根据实施方式5所述的方法,其中,所述缓冲液包含约0.05%至约0.2% (w/w)的有机溶剂或去污剂。
- [0305] 21. 根据实施方式1至20中任一项所述的方法,其中,在室温下进行至少2个洗涤步骤。
- [0306] 22. 根据实施方式1至21中任一项所述的方法,其中,在室温下进行至少3个洗涤步骤。
- [0307] 23. 根据实施方式1至22中任一项所述的方法,其中,在室温下进行至少4个洗涤步骤。
- [0308] 24. 根据实施方式21所述的方法,其中,进行2个洗涤步骤。
- [0309] 25. 根据实施方式22所述的方法,其中,进行3个洗涤步骤。
- [0310] 26. 根据实施方式23所述的方法,其中,进行4个洗涤步骤。

- [0311] 27. 根据实施方式1至26中任一项所述的方法,其中,所述洗涤步骤连续地进行。
- [0312] 28. 根据实施方式1至27中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约200mM的TrisHCl和约50mM至约500mM的盐。
- [0313] 29. 根据实施方式28所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约25mM至约100mM的TrisHCl和约75mM至约250mM的盐。
- [0314] 30. 根据实施方式29所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约40mM至约60mM的TrisHCl和约100mM至约150mM的盐。
- [0315] 31. 根据实施方式28至30中任一项所述的方法,其中,所述洗涤缓冲液的pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0,或约8.0至约8.8。
- [0316] 32. 根据实施方式31所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM的TrisHCl和约125mM的盐,pH为约8.5。
- [0317] 33. 根据实施方式1至32中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约200mM的乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 的聚山梨醇酯80。
- [0318] 34. 根据实施方式33所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM至约200mM的乙酸钠和约0.005%至约0.3% (w/w) 的聚山梨醇酯80。
- [0319] 35. 根据实施方式34所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约90mM至约110mM的乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 的聚山梨醇酯80。
- [0320] 36. 根据实施方式33至35中任一项所述的方法,其中,所述洗涤缓冲液的pH为约5.0至约7.4、约5.5至约7.0,或约5.5至约6.5。
- [0321] 37. 根据实施方式36所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约100mM的乙酸钠和约0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,pH为约6.0。
- [0322] 38. 根据实施方式1至37中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约200mM的TrisHCl和约10%至约75% (w/w) 的乙二醇。
- [0323] 39. 根据实施方式38所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约25mM至约100mM的TrisHCl和约25%至约70% (w/w) 的乙二醇。
- [0324] 40. 根据实施方式39所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约40mM至约60mM的TrisHCl和约40%至约60% (w/w) 的乙二醇。
- [0325] 41. 根据实施方式38至40中任一项所述的方法,其中,所述洗涤缓冲液的pH为约7.5至约9.2、约8.0至约9.0,或约8.0至约8.8。
- [0326] 42. 根据权利要求41所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM的TrisHCl和约50% (w/w) 的乙二醇,pH为约8.5。
- [0327] 43. 根据实施方式1至42中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约200mM的甘氨酸、约1mM至约100mM的组氨酸、约20mM至约500mM的盐、约1%至约10% (w/w) 的海藻糖和约0.0005%至约1% (w/w) 的聚山梨醇酯80。
- [0328] 44. 根据实施方式43所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约30mM至约80mM的甘氨酸、约5mM至约20mM的组氨酸、约50mM至约200mM的盐、约3%至约8% (w/w) 的海藻糖和约0.001%至约0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80。
- [0329] 45. 根据实施方式44所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约40mM至约60mM的甘氨酸、约5mM至约15mM的组氨酸、约90mM至约110mM的盐、约4%至约6% (w/w) 的海藻糖

和约0.001%至约0.05% (w/w)的聚山梨醇酯80。

[0330] 46.根据实施方式43至45中任一项所述的方法,其中,所述洗涤缓冲液的pH为约6.0至约8.0、约6.5至约7.5,或约7.0至约7.4。

[0331] 47.根据实施方式46所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约50mM的甘氨酸、约10mM的组氨酸、约100mM的盐、约5% (w/w)的海藻糖和约0.005% (w/w)的聚山梨醇酯80,pH为约7.0。

[0332] 48.根据实施方式1至47中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约1mM至约200mM的TrisHCl、约50mM至约500mM的盐和约0.001%至约1% (w/w)的聚山梨醇酯80。

[0333] 49.根据实施方式48所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约5mM至约50mM的TrisHCl、约75mM至约250mM的盐和约0.005%至约0.3% (w/w)的聚山梨醇酯80。

[0334] 50.根据实施方式49所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约30mM的TrisHCl、约140mM至约160mM的盐和约0.05%至约0.2% (w/w)的聚山梨醇酯80。

[0335] 51.根据实施方式48至50中任一项所述的方法,其中,所述洗涤缓冲液的pH为约6.0至约8.8、约6.5至约8.5,或约7.0至约8.0。

[0336] 52.根据实施方式51所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约20mM的TrisHCl、约150mM的盐和约0.1% (w/w)的聚山梨醇酯80,pH为约7.4。

[0337] 53.根据实施方式1至52中任一项所述的方法,其中,步骤(c)包括用至少一种洗脱缓冲液洗脱AAV。

[0338] 54.根据实施方式53所述的方法,其中,至少一种洗脱缓冲液与至少一种洗涤缓冲液相同。

[0339] 55.根据实施方式54所述的方法,其中,至少一种洗脱缓冲液与在步骤(c)中洗脱AAV之前最后的洗涤步骤中所用的最后的洗涤缓冲液相同。

[0340] 56.根据实施方式54所述的方法,其中,第一洗脱缓冲液与在步骤(c)中洗脱AAV之前最后的洗涤步骤中所用的最后的洗涤缓冲液相同。

[0341] 57.根据实施方式53至56中任一项所述的方法,其中,至少一种洗脱缓冲液包含约10mM至约200mM的甘氨酸、约1mM至约100mM的组氨酸、约20mM至约500mM的盐、约1%至约10% (w/w)的海藻糖和约0.0005%至约1% (w/w)的聚山梨醇酯80。

[0342] 58.根据实施方式57所述的方法,其中,至少一种洗脱缓冲液包含约30mM至约80mM的甘氨酸、约5mM至约20mM的组氨酸、约50mM至约200mM的盐、约3%至约8%的海藻糖和约0.001%至约0.1% (w/w)的聚山梨醇酯80。

[0343] 59.根据实施方式58所述的方法,其中,至少一种洗脱缓冲液包含约40mM至约60mM的甘氨酸、约5mM至约15mM的组氨酸、约90mM至约110mM的盐、约4%至约6% (w/w)的海藻糖和约0.001%至约0.05% (w/w)的聚山梨醇酯80。

[0344] 60.根据实施方式57至59中任一项所述的方法,其中,所述洗涤缓冲液的pH为约6.0至约8.0、约6.5至约7.5,或约7.0至约7.4。

[0345] 61.根据实施方式60所述的方法,其中,至少一种洗脱缓冲液包含约50mM的甘氨酸、约10mM的组氨酸、约100mM的盐、约5% (w/w)的海藻糖和约0.005% (w/w)的聚山梨醇酯80,pH为约7.0。

[0346] 62. 根据实施方式53至61中任一项所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约1mM至约200mM的TrisHCl、约50mM至约500mM的盐和约0.001%至约1% (w/w) 的聚山梨醇酯80。

[0347] 63. 根据实施方式62所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约5mM至约50mM的TrisHCl、约75mM至约250mM的盐和约0.005%至约0.3% (w/w) 的聚山梨醇酯80。

[0348] 64. 根据实施方式63所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约10mM至约30mM的TrisHCl、约140mM至约160mM的盐和约0.05%至约0.2% (w/w) 的聚山梨醇酯80。

[0349] 65. 根据实施方式62至64中任一项所述的方法,其中,所述洗涤缓冲液的pH为约6.0至约8.8、约6.5至约8.5,或约7.0至约8.0。

[0350] 66. 根据实施方式65所述的方法,其中,至少一种洗涤缓冲液包含约20mM的TrisHCl、约150mM的盐和约0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,pH为约7.4。

[0351] 67. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法,其中,第一洗涤步骤和第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约200mM的TrisHCl和约50mM至约500mM的盐,pH为约7.5至约9.2;并且

[0352] 第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约2000mM的乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。

[0353] 68. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法,其中,第一洗涤步骤和第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约2000mM的乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4;并且

[0354] 第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约200mM的TrisHCl和约50mM至约500mM的盐,pH为约7.5至约9.2。

[0355] 69. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法,其中,第一洗涤步骤和第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约200mM的TrisHCl和约50mM至约500mM的盐,pH为约7.5至约9.2;并且

[0356] 第二洗涤步骤和第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约2000mM的乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4。

[0357] 70. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法,其中,第一洗涤步骤和第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约2000mM的乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,pH为约5.0至约7.4;并且

[0358] 第二洗涤步骤和第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入缓冲液,所述缓冲液包含约10mM至约200mM的TrisHCl和约50mM至约500mM的盐,pH为约7.5至约9.2。

[0359] 71. 根据实施方式67或69所述的方法,其中,第一缓冲液和第三缓冲液包含约50mM的TrisHCl和约125mM的盐,pH为约8.5。

[0360] 72. 根据实施方式68或70所述的方法,其中,第一缓冲液和第三缓冲液包含约100mM的乙酸钠和约0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,pH为约6.0。

[0361] 73. 根据实施方式67或69所述的方法,其中,第二缓冲液包含约100mM的乙酸钠和约0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,pH为约6.0。

[0362] 74. 根据实施方式68或70所述的方法,其中,第二缓冲液包含约50mM的TrisHCl和约125mM的盐,pH为约8.5。

[0363] 75. 根据实施方式69所述的方法, 其中, 第四缓冲液包含约100mM的乙酸钠和约0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80, pH为约6.0。

[0364] 76. 根据实施方式70所述的方法, 其中, 第四缓冲液包含约50mM的TrisHCl和约125mM的盐, pH为约8.5。

[0365] 77. 根据实施方式67或70所述的方法, 其中, 步骤(c) 包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含约10mM至约200mM的TrisHCl和约50mM至约500mM的盐, pH为约7.5至约9.2。

[0366] 78. 根据实施方式68或69所述的方法, 其中, 步骤(c) 包括向亲和树脂中加入缓冲液, 所述缓冲液包含约10mM至约2000mM的乙酸钠和约0.001%至约1% (w/w) 的聚山梨醇酯80, pH为约5.0至约7.4。

[0367] 79. 根据实施方式77所述的方法, 其中, 所述缓冲液包含约50mM的TrisHCl和约125mM的盐, pH为约8.5。

[0368] 80. 根据实施方式78所述的方法, 其中, 所述缓冲液包含约100mM的乙酸钠和约0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80, pH为约6.0。

[0369] 81. 根据实施方式1至80中任一项所述的方法, 其中, 至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约50mM至约500mM的2-(N-吗啉代) 乙磺酸的钠盐(MES-Na)、约3mM至约30mM的EDTA以及溶剂/去污剂混合物, 所述溶剂/去污剂混合物包含聚山梨醇酯80、DMSO和三(正丁基) 磷酸酯(TNBP), 所述至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH为约5.2至约6.8。

[0370] 82. 根据实施方式1至81中任一项所述的方法, 其中, 至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约30mM至约200mM的TrisHCl或精氨酸-HCl和约75mM至约500mM的盐, pH为约7.5至约9.2。

[0371] 83. 根据实施方式1至82中任一项所述的方法, 其中, 至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约20mM至约80mM的精氨酸-HCl和约50mM至约200mM的盐, pH为约7.3至约8.8。

[0372] 84. 根据实施方式1至83中任一项所述的方法, 其中, 至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约50mM至约200mM的牛磺酸和0.2%至1.5% (w/w) 的PEG(例如PEG6000), pH为约5.2至约6.8。

[0373] 85. 根据实施方式1至84中任一项所述的方法, 其中, 至少一种和/或洗脱洗涤缓冲液包含约30mM至约300mM的甘氨酸, pH为约7.5至约9.2。

[0374] 86. 根据实施方式1至85中任一项所述的方法, 其中, 至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约20mM至约150mM的牛磺酸、约30%至约75% (w/w) 的乙二醇和0.05%至0.2%的辛基吡喃葡萄糖苷, pH为约7.3至约8.8。

[0375] 87. 根据实施方式1至86中任一项所述的方法, 其中, 至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约80mM至约400mM的Bis-Tris和约10克至约20克的溶剂/去污剂混合物, 所述溶剂/去污剂混合物包含比率为约11:3:3(按重量计)的Triton-X 100、聚山梨醇酯80和TNBP, 所述至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液的pH为约5.2至约6.8。

[0376] 88. 根据实施方式1至87中任一项所述的方法, 其中, 至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约5mM至约20mM的柠檬酸钠, pH为约7.5至约9.2。

[0377] 89. 根据实施方式1至88中任一项所述的方法, 其中, 至少一种洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液包含约50mM至约200mM的精氨酸-HCl、约50mM至约200mM的赖氨酸-HCl、约50mM至

约200mM的组氨酸-HCl、约1mM至约4mM的N-乙酰基-D,L-色氨酸和约10%至约40% (w/w) 的聚山梨醇酯80, pH为约7.3至约8.8。

[0378] 90. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液, 所述第一缓冲液包含约50mM至约2000mM的乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 的聚山梨醇酯80, 所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;

[0379] 第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液, 所述第二缓冲液包含约30mM至约200mM的TrisHCl和约75mM至约500mM的盐, 所述第二缓冲液的pH为约7.5至约9.2; 以及

[0380] 第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液, 所述第三缓冲液包含约30mM至约200mM的TrisHCl和约30%至约75% (w/w) 的乙二醇, 所述第三缓冲液的pH为约7.3至约8.8。

[0381] 91. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液, 所述第一缓冲液包含约50mM至约500mM的2-(N-吗啉代) 乙磺酸的钠盐(MES-Na)、约3mM至约30mM的EDTA以及溶剂/去污剂混合物, 所述溶剂/去污剂混合物包含聚山梨醇酯80、DMSO和三(正丁基) 磷酸酯(TNBP), 所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;

[0382] 第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液, 所述第二缓冲液包含约30mM至约200mM的TrisHCl或精氨酸-HCl和约75mM至约500mM的盐, 所述第二缓冲液的pH为约7.5至约9.2; 以及

[0383] 第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液, 所述第三缓冲液包含约20mM至约80mM的精氨酸-HCl和约50mM至约200mM的盐, 所述第三缓冲液的pH为约7.3至约8.8。

[0384] 92. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液, 所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM的牛磺酸和0.2%至1.5% (w/w) 的PEG(例如PEG 6000), 所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;

[0385] 第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液, 所述第二缓冲液包含约30mM至约300mM的甘氨酸, 所述第二缓冲液的pH为约7.5至约9.2; 以及

[0386] 第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液, 所述第三缓冲液包含约20mM至约150mM的牛磺酸、约30%至约75% (w/w) 的乙二醇和0.05%至0.2% (w/w) 的辛基吡喃葡萄糖苷, 所述第三缓冲液的pH为约7.3至约8.8。

[0387] 93. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液, 所述第一缓冲液包含约80mM至约400mM的Bis-Tris和约10克至约20克的溶剂/去污剂混合物, 所述溶剂/去污剂混合物包含比率为约11:3:3(按重量计) 的Triton-X 100、聚山梨醇酯80和TNBP, 所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;

[0388] 第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液, 所述第二缓冲液包含约5mM至约20mM的柠檬酸钠, 所述第二缓冲液的pH为约7.5至约9.2; 以及

[0389] 第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液, 所述第三缓冲液包含约50mM至约200mM的精氨酸-HCl、约50mM至约200mM的赖氨酸-HCl、约50mM至约200mM的组氨酸-HCl、约1mM至约4mM的N-乙酰基-D,L-色氨酸和约10%至约40% (w/w) 的聚山梨醇酯80, 所述第三缓冲液的pH为约7.3至约8.8。

[0390] 94. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液, 所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM的乙酸钠和约0.05%至约

0.2% (w/w) 的聚山梨醇酯80, 所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;

[0391] 第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液, 所述第二缓冲液包含约20nM至约100mM的TrisHCl和约50nM至约200nM的盐, 所述第二缓冲液的pH为约7.5至约8.8; 以及

[0392] 第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液, 所述第三缓冲液包含约20mM至100mM的TrisHCl、约40%至约60% (w/w) 的乙二醇, 所述第三缓冲液的pH为约7.5至约8.8。

[0393] 95. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液, 所述第一缓冲液包含约50nM至约200mM的乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 的聚山梨醇酯80, 所述第一缓冲液的pH为约5.2至约6.8;

[0394] 第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液, 所述第二缓冲液包含约20nM至约100mM的TrisHCl和约50nM至约200nM的盐, 所述第二缓冲液的pH为约7.5至约8.8; 以及

[0395] 第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液, 所述第三缓冲液包含约20mM至100mM的TrisHCl、约40%至约60% (w/w) 的乙二醇, 所述第三缓冲液的pH为约7.5至约8.8。

[0396] 96. 根据实施方式7或29至95中任一项所述的方法, 其中, 所述盐选自: NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl、乙酸钠, 以及NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、柠檬酸钠、LiCl、CsCl和乙酸钠中的一种以上的组合。

[0397] 97. 根据实施方式96所述的方法, 其中, 所述盐为NaCl。

[0398] 98. 根据实施方式7或29至97中任一项所述的方法, 其中, 所述盐的浓度不超过500mM。

[0399] 99. 根据实施方式7或29至97中任一项所述的方法, 其中, 所述盐的浓度不超过200mM。

[0400] 100. 根据实施方式28至32或67至95中任一项所述的方法, 其中, 所述缓冲液包含约50mM的TrisHCl和约125mM的NaCl, pH为约8.5。

[0401] 101. 根据实施方式1至66中任一项所述的方法, 其中, 第一洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第一缓冲液, 所述第一缓冲液包含约50mM至约200mM的乙酸钠和约0.05%至约0.2% (w/w) 的聚山梨醇酯80, 所述第一缓冲液的pH为约5.5至约6.5;

[0402] 第二洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第二缓冲液, 所述第二缓冲液包含约10mM至约70mM的TrisHCl和约75mM至约250mM的NaCl, 所述第二缓冲液的pH为约8.0至约9.0; 以及

[0403] 第三洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第三缓冲液, 所述第三缓冲液包含约10mM至约70mM的TrisHCl和约30%至约75% (w/w) 的乙二醇, 所述第三缓冲液的pH为约8.0至约9.0。

[0404] 102. 根据实施方式101所述的方法, 其中, 所述方法还包括在第一洗涤步骤之前进行第四洗涤步骤, 第四洗涤步骤包括向亲和树脂中加入第四缓冲液, 所述第四缓冲液包含约10mM至约30mM的TrisHCl和约75mM至约250mM的NaCl, 所述第四缓冲液的pH为约6.5至约8.0。

[0405] 103. 根据实施方式100或102所述的方法, 其中, 第一缓冲液包含约100mM的乙酸钠和约0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80, 所述第一缓冲液的pH为约6.0。

[0406] 104. 根据实施方式100至103中任一项所述的方法, 其中, 第二缓冲液包含约50mM的TrisHCl和约125mM的NaCl, 所述第二缓冲液的pH为约8.5。

[0407] 105. 根据实施方式100至104中任一项所述的方法, 其中, 第三缓冲液包含约50mM

的TrisHCl和约50% (w/w) 的乙二醇,所述第三缓冲液的pH为约8.0。

[0408] 106. 根据实施方式1至105中任一项所述的方法,其中,酸性组分被去除。

[0409] 107. 根据实施方式106所述的方法,其中,所述酸性组分是宿主细胞DNA (例如HEK293 DNA),所述酸性组分被降低至低于250pg/ $\mu$ g AAV抗原的值(通过qPCR测量)。

[0410] 108. 根据实施方式106所述的方法,其中,所述酸性组分是宿主细胞DNA (例如HEK293 DNA),所述酸性组分被降低至低于250pg/ $\mu$ g AAV抗原的值(通过ELISA测量)。

[0411] 109. 根据实施方式1至108中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括通过梯度洗脱使洗脱缓冲液的电导率连续线性增加。

[0412] 110. 根据实施方式1至109中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括通过梯度洗脱使有机溶剂的浓度连续线性增加。

[0413] 111. 根据实施方式1至110中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括使亲和树脂与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液包含乙酸钠、甘氨酸、组氨酸、NaCl和/或聚山梨醇酯80。

[0414] 112. 根据实施方式111所述的方法,其中,所述盐浓度为约50mM至200mM。

[0415] 113. 根据实施方式111或112所述的方法,其中,所述pH为5.5至9.0。

[0416] 114. 根据实施方式111至113中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括使亲和树脂与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液包含50mM至200mM的NaCl和30mM至80mM的TrisHCl。

[0417] 115. 根据实施方式114所述的方法,其中,所述洗脱缓冲液的pH为8.0至9.0。

[0418] 116. 根据实施方式114所述的方法,其中,所述洗脱缓冲液包含至少约55% (w/w) 的乙二醇。

[0419] 117. 根据实施方式1至116中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括使亲和树脂与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液包含约50mM至200mM的乙酸钠、0.05%至0.2% (w/w) 的聚山梨醇酯80,所述洗脱缓冲液的pH为约5.5至6.5。

[0420] 118. 根据实施方式1至117中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括使亲和树脂与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液包含30mM至80mM的甘氨酸、5mM至20mM的组氨酸、50mM至200mM的NaCl、3%至8% (w/w) 的海藻糖和0.001%至0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,所述洗脱缓冲液的pH为6.5至7.5。

[0421] 119. 根据实施方式118所述的方法,其中,所述洗脱还包括:

[0422] (a) 使亲和树脂与第一洗脱缓冲液接触,所述第一洗脱缓冲液包含50mM至200mM的乙酸钠和0.05%至0.2% (w/w) 的聚山梨醇酯80,所述第一洗脱缓冲液的pH为约5.5至6.5;

[0423] (b) 使亲和树脂与第二洗脱缓冲液接触,所述第二洗脱缓冲液包含30mM至80mM的甘氨酸、5mM至20mM的组氨酸、50mM至200mM的NaCl、3%至8% (w/w) 的海藻糖和0.001%至0.1% (w/w) 的聚山梨醇酯80,所述洗脱缓冲液的pH为6.5至7.5;以及

[0424] (c) 使亲和树脂与第三洗脱缓冲液接触,所述第三洗脱缓冲液包含50mM至200mM的NaCl和30mM至80mM的TrisHCl,所述第三洗脱缓冲液的pH为8.0至9.0。

[0425] 120. 根据实施方式1至119中任一项所述的方法,其中,所述步骤连续地进行。

[0426] 121. 根据实施方式1至120中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括使亲和树脂与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液包含约2mM的氯化镁、约50mM的精氨酸-HCl、约750mM至约1000mM的NaCl和至少约50% (w/w) 的甘油,所述洗脱缓冲液的pH为至少约8.0。

[0427] 122. 根据实施方式1至121中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括使亲和树脂与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液包含约2mM的氯化镁、约50mM的牛磺酸、约600mM至约1000mM的NaCl、约0.05至约0.2% (w/w) 的辛基吡喃葡萄糖苷和约60% (w/w) 的乙二醇,所述洗脱缓冲液的pH至少约7.8。

[0428] 123. 根据实施方式122所述的方法,其中,所述洗脱还包括:

[0429] (a) 使亲和树脂与第五缓冲液接触,所述第五缓冲液包含约20mM至约100mM的TrisHCl和约75mM至约250mM的NaCl,所述第五缓冲液的pH为约8.0至约8.8;以及

[0430] (b) 使亲和树脂与第二洗脱缓冲液接触,所述第二洗脱缓冲液包含约1M的硫酸铵、约50mM的TrisHCl和约50% (w/w) 的乙二醇,所述第二洗脱缓冲液的pH为至少约6.8。

[0431] 124. 根据实施方式123所述的方法,其中,所述步骤连续地进行。

[0432] 125. 根据实施方式1至124中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括使亲和树脂与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液包含约1M的硫酸铵、约50mM的TrisHCl和约50% (w/w) 的乙二醇,所述洗脱缓冲液的pH至少为约6.8。

[0433] 126. 根据实施方式1 125中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括使亲和树脂与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液包含约20% (w/w) 的蔗糖、约10% (w/w) 的山梨糖醇、约5% (w/w) 的甘露糖醇或约5% (w/w) 的蔗糖、约15% (w/w) 的甘油、约50mM的组氨酸和约750mM至约1000mM的NaCl,所述洗脱缓冲液的pH至少约7.8。

[0434] 127. 根据实施方式126所述的方法,其中,所述洗脱还包括:

[0435] (a) 使亲和树脂与第五缓冲液接触,所述第五缓冲液包含约20mM至约100mM的组氨酸和约80mM至约120mM的NaCl,所述第五缓冲液的pH为约8.0至约8.8;以及

[0436] (b) 使亲和树脂与第二洗脱缓冲液接触,所述第二洗脱缓冲液包含约20mM至约100mM的组氨酸、约600mM至约900mM的NaCl和约5%至60% (w/w) 的DMSO,所述第五洗脱缓冲液的pH为约6.5至约8.5。

[0437] 128. 根据实施方式127所述的方法,其中,所述步骤连续地进行。

[0438] 129. 根据实施方式1至128中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括使亲和树脂与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液包含约100mM的甘氨酸-HCl和约200mM的NaCl,所述洗脱缓冲液的pH为约2.5。

[0439] 130. 根据实施方式109至129中任一项所述的方法,其中,所述洗脱缓冲液的pH为约8.0。

[0440] 131. 根据实施方式109至129中任一项所述的方法,其中,所述洗脱缓冲液的pH为8.0。

[0441] 132. 根据实施方式109至131中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括逐步增加反离子浓度。

[0442] 133. 根据实施方式109至132中任一项所述的方法,其中,所述洗脱包括逐步增加有机溶剂浓度。

[0443] 134. 根据实施方式1至133中任一项所述的方法,其中,所述洗脱缓冲液中的盐选自单价阴离子、二价阴离子或多价阴离子,例如氯离子、乙酸根、硫酸根和柠檬酸根。

[0444] 135. 根据实施方式1至134中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括:通过采用0.5mM至2.0mM盐酸中的0至100% (w/w) 20mM至50mM盐酸/800mM至1200mM NaCl的梯度进行

洗脱。

[0445] 136. 根据实施方式1至135中任一项所述的方法,其中,由洗脱步骤获得的AAV的HC杂质水平 $\leq 99.9\%$ 。

[0446] 137. 根据实施方式1至136中任一项所述的方法,其中,由洗脱步骤获得的AAV的HC杂质水平 $\leq 99.0\%$ 。

[0447] 138. 根据权利要求1至137中任一项所述的方法,其中,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平为99.0%以上。

[0448] 139. 根据权利要求1至138中任一项所述的方法,其中,由洗脱步骤获得的AAV的纯度水平为99.9%以上。

[0449] 140. 根据实施方式1至139中任一项所述的方法,其中,由洗脱步骤(c)洗脱的至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的AAV衣壳为完整AAV衣壳。

[0450] 141. 根据实施方式1至140中任一项所述的方法,其中,所述亲和树脂为AAV<sub>x</sub>树脂。

[0451] 142. 根据实施方式1至141中任一项所述的方法,其中,所述AAV为AAV9。

[0452] 143. 根据实施方式142所述的方法,其中,所述AAV9包含肽,所述肽包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3的序列。

[0453] 144. 根据实施方式1至143中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括:使含有AAV的溶液与过滤器接触,所述过滤器包含带正电荷的基团,所述带正电荷的基团可有效耗竭含有AAV的溶液中的酸性带电污染物。

[0454] 145. 根据实施方式1至144中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括:对AAV级分进行纳滤,去除大于35nm的病毒。

[0455] 146. 根据实施方式1至145中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括精制步骤,所述精制步骤包括进行阳离子交换色谱。

[0456] 147. 根据实施方式1至146中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括:通过AAV特异性ELISA检测AAV级分。

[0457] 148. 根据实施方式147所述的方法,其中,所述AAV特异性ELISA为对AAV具有特异性的夹心ELISA。

[0458] 149. 通过实施方式1至148中任一项所述的方法生产的AAV产品。

[0459] 实施例

[0460] 给出以下实施例仅用于说明本发明而不以任何方式限制其范围。

[0461] 实施例1

[0462] 以下实施例描述了用三质粒系统转染HEK293细胞系以产生包含编码目的蛋白的核酸的rAAV颗粒的示例性方法。

[0463] 贴壁HEK293细胞在悬浮条件下在市售培养基中生长,该市售培养基的化学成分确定且不含动物来源的组分、蛋白质和血清,例如描述于W02018128688第[0146]-[0150]段,其出于所有预期目的通过引用并入本文。用三种质粒转染细胞:(1) 辅助质粒,其提供对增殖性AAV感染必不可少的辅助病毒功能;(2) repcap-质粒,其携带有关病毒的衣壳生成、复制和包装的所有信息;和(3) 含有目的基因(GOI)的质粒,其被包装到所得rAAV颗粒中。GOI

的大小为2.6kB至3.0kB。携带目的基因的rAAV颗粒在转染后3至5天的时间内进入HEK293细胞系。

[0464] 收获转染的HEK293细胞培养物的上清液,例如描述于W02018128688的第[0151]-[0155]段、表1和表2,其出于所有预期目的通过引用并入本文。对收获的上清液进行浓缩和调节(渗滤),例如描述于W02018128688的第[0156]-[0160]段、表3和表4,其出于所有预期目的通过引用并入本文。对渗滤的浓缩物进行负色谱,例如描述于W02018128688的第[0161]-[0165]段和表5,其出于所有预期目的通过引用并入本文。

[0465] 实施例2

[0466] 在用三质粒系统(包含编码目的蛋白的cDNA以及AAV9的VP1、VP2和VP3)转染后,在HEK293细胞系中进行AAV9生产。AAV9包含约2.6kB至3.0kB的载体DNA。用Pa11 Omega T系列组件(100kDa)对澄清的无细胞培养上清液进行浓缩和渗滤。在非结合条件下(即,在包含125mM NaCl和50mM TrisHCl的pH 8.5的溶液中),将病毒颗粒加样到膜吸附器(Mustang Q; Pa11部件号XT140MSTGQP05)上。通过用25% HCl将含有AAV9的流穿液调节至pH为7.4至7.8,获得pH调节的加样物。

[0467] 进行以下程序。首先,用5×柱体积的缓冲液(包含100mM甘氨酸、200mM NaCl, pH为2.0)活化包含POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂(赛默飞世尔,目录号36742) ID为16mm、床高为50±0.5mm、面积为2.01cm<sup>2</sup>和体积为约10mL的色谱柱。然后用至少5×柱体积的pH 8.5的50mM TrisHCl和125mM NaCl平衡色谱柱。将pH调节的加样物加入到含有POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂的色谱柱上。

[0468] 然后在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤1(W1:50mM TrisHCl和125mM NaCl, pH 8.5)洗涤色谱柱。然后在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤2(W2:100mM乙酸钠和0.1%吐温80(即聚山梨醇酯80), pH 6.0)洗涤色谱柱。接着在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤1(W1:50mM TrisHCl和125mM NaCl, pH 8.5)洗涤色谱柱。然后在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤2(W2:100mM乙酸钠和0.1%吐温80, pH 6.0)洗涤色谱柱。对于所有这些洗涤步骤,线性流速为60cm/h。

[0469] 洗脱通过在+2℃至+8℃的较低温度下使用5×柱体积的上述W2来进行。然后在+2℃至+8℃的温度下,将5×柱体积的以下二级洗脱缓冲液(ELT缓冲液)加入色谱柱:50mM甘氨酸、10mM组氨酸、100mM NaCl、5%海藻糖、0.003% Crillett™ 4HP(即聚山梨醇酯80), pH 7.0。然后在+2℃至+8℃的温度下,将5×柱体积的以下洗脱缓冲液加入色谱柱:50mM TrisHCl和125mM NaCl, pH 8.5。这些洗脱步骤的线性流速为5cm/h。然后在+2℃至+8℃的温度下,将5×柱体积的纯化水入色谱柱。然后进行梯度洗脱。以15cm/h的线性流速和+2至+26℃的温度,加入15×柱体积的1mM至20mM HCl(在纯化水中)梯度以清空色谱柱。

[0470] 表2中更详细地描述上述程序,其中,“CV”表示在该步骤中添加的溶液的柱体积数。

[0471] 表2

步骤	缓冲液	缓冲液组成	CV	流速	温度		
1	活化	REG2	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	60 cm/h	+18-26°C	
2	平衡	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	≥5	60 cm/h	+18-26°C	
3	产品加样	含有调节后的 AAV 的溶液	--	x	60 cm/h	+18-26°C	
4	洗涤 1	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h	+18-26°C	
5	洗涤 2	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	60 cm/h	+18-26°C	
6	洗涤 3	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h	+18-26°C	
[0472]	7	洗涤 4	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	60 cm/h	+18-26°C
8	洗脱 1	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	5 cm/h	+2-8°C	
9	洗脱 2	ELT	50 mM 甘氨酸、10 mM 组氨酸、100 mM NaCl, 5%海藻糖、0.003% Crillet 4 HP, pH 7.0 (ELT-缓冲液)	5	5 cm/h	+2-8°C	
10	洗脱 3	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	5 cm/h	+2-8°C	
11	洗涤 5	PW	纯化水	5	5 cm/h	+2-8°C	
12	洗脱 4	梯度	梯度为 1 mM 至 20 mM HCl / 200 mM NaCl (在纯化水中)	15	20 cm/h	+2-26°C	

[0473] 将色谱柱从室温冷却至约+2°C至+8°C的方法包括:

[0474] -将色谱滑架 ÄKTA Pure 150置于冷却柜Unichromat 1500中;

[0475] -给色谱柱配备温度夹套(水冷);

[0476] -使用冷缓冲液进行洗脱;或

[0477] -以上方法的组合。

[0478] 所采集的样品各自通过ITR-qPCR、针对AAV抗原的ELISA和针对HEK293HCP的ELISA进行分析,以评估产率以及这些步骤中是否可能已经发生损失。

[0479] ELISA用于测量AAV9抗原的量。ELISA使用AAV-9滴定ELISA试剂盒(货号PRAAV9,德国海德堡Progen)在TECAN Roboter系统上进行。简而言之,将AAV9衣壳特异性的单克隆抗体(AAV8/9抗体(“ADK8/9抗体”,目录号03-651161,American Research Products,Inc.,马萨诸塞州沃尔瑟姆))包被在微量滴定条上,用于从AAV级分中捕获AAV9颗粒。通过两个步骤来检测捕获的AAV9颗粒。在第一步中,使对ADK8/9抗体具有特异性的生物素缀合的单克隆抗体与(ADK8/9和ADK8/9抗体的)免疫复合物结合。将链霉亲和素过氧化物酶缀合物加入与生物素缀合的单克隆抗体结合的免疫复合物中,链霉亲和素过氧化物酶缀合物与生物素反应。加入过氧化物酶底物溶液,发生显色反应(与结合的AAV9颗粒的量成正比)。在450nm处用光度计测量显色反应。

[0480] ITR-qPCR测定用于通过量化在编码目的基因(例如人因子VIII或人因子IX)的载

体中发现的反向串联重复来确定基因组拷贝滴度。HEK-HCP是通过ELISA测量的残留宿主细胞蛋白的量度。LDH通过比色活性测定法来确定。

[0481] 在体外生物效价测定中,病毒载体AAV9感染肝靶细胞系,其随后将功能性、可测量的编码蛋白质分泌到培养基中。在第一步中,HepG2靶细胞被AAV9转导感染。在孵育期间,编码的蛋白质被释放到细胞上清液中。在第二步中,通过活性测定直接测量进入细胞培养上清液的编码的蛋白质的活性。AAV9样品的测量值以相对于参考材料的百分比给出。该方法允许对AAV9基因治疗载体的生物学功能进行定量评估。

[0482] 进行SDS-PAGE分析,以确定当使用具有洗涤步骤的测试程序代替比较程序时是否存在热休克蛋白70kDa (HSP70) 的减少。如下进行Western Blot:使用抗Hsp70抗体 (Abcam, 目录号ab79852) 作为一抗 (1:2000稀释) 孵育2小时,使用山羊抗兔IgG (H+L) AP缀合物 (西格玛, 目录号A8025) 作为二抗 (1:1000稀释) 孵育1小时。

[0483] 进行SDS-PAGE银染测定,确定存在的杂质的总体水平。进行分析超速离心 (AUC), 量化AAV9的存在量,确定完整衣壳、空衣壳和相比于完整衣壳具有额外DNA (即,过满) 的衣壳的相对量。

[0484] 用12%抗AAV抗体进行Western Blot,确定根据测试程序和比较程序进行纯化后回收的AAV9的水平和纯度。用针对AAV9的VP1、VP2和VP3的单克隆抗体作为一抗,用山羊抗小鼠ALP抗体 (西格玛, 目录号A4656) 作为二抗,来进行Western Blot。

[0485] 下表3中概述了这些测定。

[0486] 表3

优先级	检测	级分 (BDS、UC 或二者)	样品体积 TMAE	储存和运输条件
1	AAV9 ELISA	所选级分	0.2 mL	≤ -60°C
2	分析超速离心 (AUC)	所选级分	0.5 mL	≤ -60°C
3	GOI 滴度 (ITR-qPCR)	所选级分	0.2 mL	≤ -60°C
4	AAV9 琼脂糖凝胶 DNA 分析 通过天然/碱性琼脂糖凝胶电泳	所选级分	0.2 mL	≤ -60°C
5	SDS PAGE (8%, WB, 银染)	所选级分	0.1 mL	≤ -60°C
6	生物效价	所选级分	0.2 mL	≤ -60°C
总量			1.4 mL	

[0487] 实施例3

[0488] 在用三质粒系统 (包含编码目的蛋白的cDNA以及AAV9的VP1、VP2和VP3) 转染后,在HEK293细胞系中进行AAV9生产。AAV9包含约2.6kB至3.0kB的载体DNA。用Pa11 Omega T系列组件 (100kDa) 对澄清的无细胞培养上清液进行浓缩和渗滤。在非结合条件下 (即,在包含125mM NaCl和50mM TrisHCl的pH 8.5的溶液中),将病毒颗粒加样到膜吸附器 (Mustang Q; Pa11部件号XT140MSTGQP05) 上。通过用25% HCl将含有AAV9的流穿液调节至pH为8.2至8.7,获得pH调节的加样物。

[0489] 进行以下程序。注意:本实施例中公开的所有缓冲液均在室温下制备,所有缓冲液的pH均在室温下测量。首先,用5×柱体积的100mM甘氨酸和200mM NaCl (pH为2.0) 活化包含POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂 (赛默飞世尔, 目录号36742) ID为16mm、床高为50±0.5mm、面积为2.01cm<sup>2</sup>和体积为约10mL的色谱柱。然后用至少10×柱体积的pH 8.5的

50mM TrisHCl和125mM NaCl平衡色谱柱。将pH调节的加样物加入到含有POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂的色谱柱上。

[0491] 然后在室温 (18°C至26°C) 下,用5×柱体积的洗涤1 (W1:50mM TrisHCl和125mM NaCl,pH 8.5) 洗涤色谱柱。然后在室温 (18°C至26°C) 下,用5×柱体积的洗涤2 (W2:100mM乙酸钠和0.1%吐温80,pH 6.0) 洗涤色谱柱。接着在室温 (18°C至26°C) 下,用5×柱体积的洗涤1 (W1:50mM TrisHCl和125mM NaCl,pH 8.5) 洗涤色谱柱。对于所有这些洗涤步骤,线性流速为60cm/h。

[0492] 通过加入10×柱体积的上述W1来进行洗脱,但在+2°C至+8°C的更低温度下进行。对于洗脱(即,下表4中的步骤7),通过将所有物品放入冷却柜(Unichromat 1500),使色谱滑架、色谱柱和缓冲液均降至低于+8°C。洗脱的线性流速为5cm/h。然后用5×柱体积的100mM甘氨酸和200mM NaCl (pH 2.0) 将柱子剥离(strip)。

[0493] 表4中更详细地描述上述程序,其中,“CV”表示在该步骤中添加的溶液的柱体积数。

[0494] 表4

步骤	缓冲液	缓冲液组成	量[CV]	流速	温度	
1	活化	REG2	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	60 cm/h +18-26°C	
2	平衡	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	10	60 cm/h +18-26°C	
3	产品加样	含有调节后的 AAV 的溶液	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	--	60 cm/h +18-26°C	
4	洗涤 1	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h +18-26°C	
[0495]	5	洗涤 2	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	60 cm/h +18-26°C
6	洗涤 3	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h +18-26°C	
7	洗脱	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	10	5cm/h +2-8°C	
8	洗涤 4	TBS	150 mM NaCl、20 mM TrisHCl、0.1%吐温 80, pH 7.4	5	60 cm/h +2-8°C	
9	剥离	REG2	100 mM 甘氨酸, 200 mM NaCl, pH 2.0	5	15cm/h +2-8°C	

[0496] 图1显示了上述程序的色谱图。下表5中显示了表4的方案的结果。E1合并液“低温洗脱液”值反映了在上表4的步骤7之后的量。“剥离”值反映了在上表4的步骤9之后的量。表5清楚地表明洗脱由温度向+2至+8°C的转变引起,因为W1和W3(不会导致AAV9显著洗脱)使用相同缓冲液(即125mM NaCl和50mM TrisHCl,pH 8.5)但在室温(即+18至25°C)下进行。

[0497] 表5

	温度 [°C]	量 [g]	qPCR vg/mL $\times 10^{11}$	qPCR 总量 vg $\times 10^{11}$	qPCR [%]	AAV9 抗原 cp/mL $\times 10^{11}$	AAV9 抗原总量 cp $\times 10^{11}$	抗原 [%]	qPCR/抗原 比率 vg/cp
[0498] 加样物	+22-28	1006.60	4.12	4147.19	100.0	6.235	6276.4	100.00	0.661
FT/W1	+22-28	1135.17	<LOQ	--	--	0.0975	110.68	1.76	--
W2	+22-28	52.38	<LOQ	--	--	0.046	2.4	0.04	--
W3	+22-28	51.81	<LOQ	--	--	0.046	2.38	0.04	--
E1 合并液	+2-8	48.93	64.20	3141.31	75.75	57.50	2813.48	44.83	1.117
剥离	+2-8	52.80	2.11	111.41	2.69	20.1	1061.28	16.91	0.105

[0499] LOQ: 低于检测限; --: 无法计算 (因为DNA量低于检测限); E1合并液为洗脱液。

[0500] 此外, 下表6中显示了表4中所述方法的测量的杂质含量。采集初始样品的杂质样品, 在步骤7之后再次采集杂质样品。

[0501] 表6

	量 [g]	HEK293 HCP [ $\mu\text{g/mL}$ ]	HEK293 HCP 总量 [ $\mu\text{g}$ ]	[%]
[0502] 加样物	1135.17	541.6	545174.56	100.00
E1 合并液	48.93	1.724	84.36	0.02

[0503] 表7显示了%完整衣壳和%过满衣壳 (基于粒径来确定)。如本文所用, 粒径在Svedbergs范围内给出 (基于颗粒的沉降速率)。

[0504] 表7

运行设置	%空衣壳 S 60 至 65	%不足 (Under Populated) S 70 至 74	%完整衣壳 S 86 至 90	%过满 S 99 至 104
[0505] E1 合并液	1.9	7.1	<b>87.5</b>	3.4
剥离	<b>71.1</b>	6.7	11.3	10.9

[0506] 如本文所用, 术语“qPCR产率”指存在的qPCR与加样物中的qPCR的初始量相比的百分比。如本文所用, 术语“抗原产率”指存在的AAV9与加样物中AAV9的初始量相比的百分比。通过qPCR测得的产率为75.8% (表5), 具有完整衣壳的AAV9为87.5% (表7), 这表明本实施例中描述的低温洗脱方案提供了AAV9完整衣壳的大量富集。

[0507] 将来自上述程序的色谱图数据与标准洗脱程序 (如表8所示, 100mM甘氨酸和200mM NaCl, pH 2.7) 进行比较, 下表9中显示了结果。两次运行的起始材料相同。

[0508] 表8

步骤	缓冲液	缓冲液组成	量[CV]	流速	温度	
1	活化	REG2	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	60 cm/h	+18-26°C
2	平衡	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	10	60 cm/h	+18-26°C
3	产品加样	含有调节后的 AAV 的溶液	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	--	60 cm/h	+18-26°C
4	洗涤 1	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h	+18-26°C
5	洗涤 2	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	60 cm/h	+18-26°C
6	洗涤 3	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h	+18-26°C
7	洗脱	REG	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.7	10	30 cm/h	+18-26°C

[0510] 表9

运行设置	%空衣壳 S 60 至 65	%不足 S 70 至 74	%完整衣壳 S 86 至 90	%过满 S 99 至 104
标准洗脱	18.8	7.1	71.1	3.0
冷洗脱	1.9	7.1	87.5	3.4

[0512] 表10和11提供了表8的标准洗脱程序的其他数据。

[0513] 表10

	量 [g]	qPCR [vg/mL $\times 10^{11}$ ]	qPCR 总量 [vg $\times 10^{11}$ ]	qPCR [%]	AAV9 抗原 [cp/mL $\times 10^{11}$ ]	AAV9 抗原总量 [cp $\times 10^{11}$ ]	AAV9 抗原 [%]	qPCR/抗原 比率 [vg/cp]
加样	6049	2.79	16861.59	100	5.76	34842.24	100	0.48
洗脱	136.87	142.5	19503.29	115.67	207.5	28399.53	81.51	0.69

[0515] 表11

	量 [g]	HEK293 HCP [ $\mu\text{g/mL}$ ]	HEK293 HCP 总量 [ $\mu\text{g}$ ]	[%]
加样	6049	528.4	3196291.60	100
洗脱	136.87	1.872	256.21	0.01

[0517] 如表5中所示, AAV9在室温(即约20°C至28°C)下结合CaptureSelect™ AAVx树脂, 令人惊讶且出人意料地发现, 结合的AAV9然后可以在同一缓冲系统中通过从高于+18°C至低于+8°C的温度变化进行洗脱。因此, 温度变化方案具有在低温下温和洗脱的益处, 有助于保持AAV颗粒的结构和感染性。同样, 在制造环境中使用温和的洗脱缓冲液也易于进行且效率更高, 因为洗脱步骤不需要更换缓冲液。此外, 有利地发现, 完整AAV9衣壳通过降低温度被洗脱, 而空的非特异性AAV9载体保持结合, 直至它们被剥离步骤的酸性洗脱液洗脱(参见表7)。

[0518] 实施例4

[0519] 实施例3证明了采用从高于+18℃至低于+8℃的温度变化,使用125mM NaCl和50mM TrisHCl的缓冲液(pH 8.5)能从CaptureSelect™ AAVx上洗脱AAV9。进行此实施例是为了研究采用从高于+18℃至低于+8℃的温度变化,使用替代缓冲系统从AAVx上洗脱AAV9的可能性。将AAV9加样到AAVx树脂上后,首先在较高温度范围内加入缓冲液作为洗涤缓冲液,然后在较低温度下加入缓冲液作为洗脱缓冲液。

[0520] 在用三质粒系统(包含编码目的蛋白的cDNA以及AAV9的VP1、VP2和VP3)转染后,在HEK293细胞系中进行AAV9生产。AAV9包含约2.6kB至3.0kB的载体DNA。用Pa11 Omega T系列组件(100kDa)对澄清的无细胞培养上清液进行浓缩和渗滤。在非结合条件下(即,在包含125mM NaCl和50mM TrisHCl的pH 8.5的溶液中),将病毒颗粒加样到膜吸附器(Mustang Q; Pa11部件号XT140MSTGQP05)上。通过用25% HCl将含有AAV9的流穿液调节至pH为8.2至8.7,获得pH调节的加样物。

[0521] 进行以下程序。注意:本实施例中公开的所有缓冲液均在室温下制备,所有缓冲液的pH均在室温下测量。

[0522] 首先在较高温度(+18至+28℃)下加入pH和电导率增加的三种缓冲液,以确认AAV9仍然结合到配体上。将色谱柱冷却至+2℃至+8℃(通过将所有物品放入冷却柜(Unichromat 1500),色谱滑架、色谱柱和缓冲液均被降至+8℃以下)后,然后加入相同缓冲液以研究洗脱特性。首先,用5×柱体积的缓冲液(包含100mM甘氨酸、200mM NaCl, pH为2.0)活化包含POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂(赛默飞世尔,目录号36742) ID为16mm、床高为50±0.5mm、面积为2.01cm<sup>2</sup>和体积为约10mL的色谱柱。然后用至少5×柱体积的pH 8.5的50mM TrisHCl和125mM NaCl平衡色谱柱。将pH调节的加样物加入到含有POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂的色谱柱上。

[0523] 然后在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤1(W1:50mM TrisHCl和125mM NaCl, pH 8.5)洗涤色谱柱。然后在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤2(W2:100mM乙酸钠和0.1%吐温80, pH 6.0)洗涤色谱柱。接着在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤1(W1:50mM TrisHCl和125mM NaCl, pH 8.5)洗涤色谱柱。然后室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤2(W2:100mM乙酸钠和0.1%吐温80, pH 6.0)洗涤色谱柱。对于所有这些洗涤步骤,线性流速为60cm/h。

[0524] 首先通过加入5×柱体积的上述W2进行洗脱,但是在+2℃至+8℃的更低温度下以5cm/h的线性流速进行。然后在+2℃至+8℃的温度下,将5×柱体积的以下二级洗脱缓冲液加入色谱柱:50mM甘氨酸、10mM组氨酸、100mM NaCl、5%海藻糖、0.005% Crillet4HP, pH 7.0(ELT-缓冲液)。然后在+2℃至+8℃的温度下,将5×柱体积的以下洗脱缓冲液加入色谱柱:50mM TrisHCl和125mM NaCl, pH 8.5。这些洗脱步骤的线性流速为30cm/h。然后在+2℃至+8℃的温度下,将5×柱体积的纯化水加入色谱柱。然后进行梯度洗脱。在20cm/h的线性流速和+2℃至+8℃的温度下,加入15×柱体积的1mM至20mM HCl/200mM NaCl(在纯化水中)的梯度。

[0525] 通过加入5×柱体积的以下再生缓冲液进行柱清洗:20mM HCl和200mM NaCl(在纯化水中),然后以60cm/h加入5×柱体积的50mM TrisHCl和125mM NaCl(pH 8.5),然后在线性流速30cm/h和+2℃至+8℃的温度下加入5×柱体积的1M L-精氨酸单盐酸盐+200mM NaCl。

[0526] 表12中更详细地描述上述程序,其中,“CV”表示在该步骤中添加的溶液的柱体积数。

[0527] 表12

步骤		缓冲液	缓冲液组成	量[CV]	流速	温度	
1	活化	REG2	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	60 cm/h	+18-26°C	
2	平衡	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	10	60 cm/h	+18-26°C	
3	产品加样	含有调节后的 AAV9 的溶液	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	--	60 cm/h	+18-26°C	
[0528]	4	洗涤 1	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h	+18-26°C
	5	洗涤 2	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	60 cm/h	+18-26°C
	6	洗涤 3	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h	+18-26°C
	7	洗涤 4	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	60 cm/h	+18-26°C
	8a	洗脱 1.1 冷却	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	5cm/h	+2-8°C
	8b	洗脱 1.2	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	30 cm/h	+2-8°C
	9	洗脱 2	ELT	50 mM 甘氨酸、10 mM 组氨酸、100 mM NaCl、5% 海藻糖、0.005% Crillet 4 HP, pH 7.0 (ELT-缓冲液)	5	30 cm/h	+2-8°C
	10	洗脱 3	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	30 cm/h	+2-8°C
	11	洗涤 5	PW	纯化水	5	30 cm/h	+2-8°C
[0529]	12	洗脱 4	梯度	梯度为 1 mM 至 20 mM HCl / 200 mM NaCl (在纯化水中)	15	20 cm/h	+2-8°C
	13	剥离 1	STR1	20 mM HCl / 200 mM NaCl (在纯化水中)	5	60 cm/h	+2-8°C
	14	剥离 2	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h	+2-8°C
	15	剥离 3	STR3	1M L-精氨酸单盐酸盐+200 mM NaCl (天然 pH, 约 pH 5.6)	5	30 cm/h	+2-8°C

[0530] 下表13中显示了上述程序的结果(特别是从柱上洗脱的AAV9的百分比产率)。图2A-2B显示了上述程序的色谱图。

[0531] 表13

	温度 [°C]	量 [g]	ddPCR vg/mL $\times 10^{11}$	ddPCR 总量 vg $\times 10^{11}$	ddPCR [%]	AAV9 抗原 cp/mL $\times 10^{11}$	AAV9 抗原总量 cp $\times 10^{11}$	AAV9 抗原 [%]	qPCR/抗原 比率 vg/cp
加样	+22-28	1004.46	1.61	1617.18	100.00	2.86	2872.76	100.00	0.563
[0532] FT/W1	+22-28	1106.16	<LOQ	--	--	<0.038	<0.000	--	--
W2	+22-28	27.2	<LOQ	--	--	<0.038	<0.000	--	--
W3	+22-28	26.24	<LOQ	--	--	<0.038	<0.000	--	--
W4	+22-28	27.2	<LOQ	--	--	<0.038	<0.000	--	--
E1 (E1.1 +E1.2) *	+2-8	46.91	23.94	1122.80	69.43	*	1758.36	61.21	0.639
E2	+2-8	26.28	4.02	105.65	6.53	9.82	258.07	8.98	0.409
E3	+2-8	21.86	4.74	103.62	6.41	15.2	332.27	11.57	0.312
E4	+2-8	4.96	7.00	34.72	2.15	31.40	155.74	5.42	0.223

[0533] LOQ: 低于检测限; --: 无法计算 (因为DNA量低于检测限); \*: E1.1和E1.2的合并液, 在E1.1的主峰和E1.2的尾部收集洗脱液。

[0534] 如所示, 还用不同于125mM NaCl和50mM TrisHCl (pH 8.5) 的缓冲液证实了在更低温度范围内的洗脱。此外, 下表14中显示了表12中所述过程中的测量的杂质含量。在每个洗脱步骤 (步骤8a、8b、9、10和12) 之后采集杂质样品。

[0535] 表14

	量 [g]	HEK293 HCP $\mu\text{g/mL}$	HEK293 HCP 总量 $\mu\text{g}$	[%]
加样	1004.46	507.5	509763.45	100.00
[0536] E1.1	19.83	0.424	8.41	0.002
E1.2	27.08	<0.125	<3.385	--
E2	26.28	0.144	3.78	0.001
E3	21.86	<0.125	<2.733	--
E4	4.96	0.844	4.19	0.001

[0537] 下表15中显示了实施例3和实施例4的缓冲液的低温洗脱的比较结果。

[0538] 表15

步骤		实施例 4	量[CV]	实施例 3	量[CV]	温度
[0539]	1 活化	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	+18-26°C
	2 平衡	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	10	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	10	+18-26°C
	3 产品加样	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	--	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	--	+18-26°C
	4 洗涤 1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	+18-26°C
	5 洗涤 2	100 mM 乙酸钠、0.1% 吐温 80, pH 6.0	5	100 mM 乙酸钠、0.1% 吐温 80, pH 6.0	5	+18-26°C
	6 洗涤 3	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	+18-26°C
	7 洗涤 4	100 mM 乙酸钠、0.1% 吐温 80, pH 6.0	5	x	x	+18-26°C
	8 洗脱 1 冷却	100 mM 乙酸钠、0.1% 吐温 80, pH 6.0	10	x	x	+2-8°C
	9 洗脱 2	50 mM 甘氨酸、10 mM 组氨酸、100 mM NaCl、5%海藻糖、0.005% Criliet 4 HP, pH 7.0 (ELT-缓冲液)	5	x	x	+2-8°C
	10 洗脱 3	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	10	+2-8°C
	11 洗涤 5	纯化水	5	150 mM NaCl、20 mM TrisHCl、0.1%吐温 80, pH 7.4	5	+2-8°C
	12 洗脱 4	梯度为 1 mM 至 20 mM HCl / 200 mM NaCl (在纯化水中)	15	x	x	+2-8°C
[0540]	13 剥离 1	20 mM HCl / 200 mM NaCl (在纯化水中)	5	x	x	+2-8°C
	14 剥离 2	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	x	x	+2-8°C
	15 剥离 3	1 M L-精氨酸单盐酸盐 +200 mM NaCl (天然 pH, 约 pH 5.6)	5	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	+2-8°C

[0541] 表16

缓冲液组成	实施例 3				实施例 4			
	面积% 空	面积% 不足	面积% 完整	面积% 过满	面积% 空	面积% 不足	面积% 完整	面积% 过满
100mM 乙酸钠、0.1% 吐温 80, pH 6.0	n.a	n.a	n.a	n.a	11.8	0.5	<b>77.0</b>	10.6
50mM 甘氨酸、10mM 组氨酸、100mM NaCl、5%海藻糖、 0.005% Crillett 4 HP, pH7.0 (ELT-缓冲液)	n.a	n.a	n.a	n.a	-*	-*	-*	-*
125mM NaCl、50mM TrisHCl, pH8.5	1.9	7.1	<b>87.5</b>	3.4	29.5	2.0	<b>64.1</b>	4.3

[0543] n.a=不适用;\*=未检测(因为浓度太低而无法进行AUC分析)。

[0544] 用100mM乙酸钠、0.1% (w/w) 聚山梨醇酯 (pH 6.0) 在+2°C至+8°C (而不是室温) 下对洗脱进行了确认(参见表16)。值得注意,100mM乙酸钠在低温下的pH和电导率与125mM NaCl、50mM TrisHCl (pH 8.5) 相反,因为洗脱效率通常随pH从pH6增加到pH 8.5而增加。因此,实施例4证明温度是洗脱的驱动力,pH和电导率对洗脱的影响低于温度。还证实此种具有温度变化的亲和方法导致完整AAV衣壳的含量更高。

[0545] 因此,实施例3和4证明了从AAV<sub>x</sub>上洗脱AAV9的作用方式主要取决于降低温度,而与缓冲系统无关。

[0546] 实施例5

[0547] AAV9的分批吸附根据下述程序进行。首先将具有上述两种不同树脂的两组在室温下与含有AAV9的溶液一起孵育以结合AAV9,然后在更低温度下洗脱。下表17中概述了该程序。注意:本实施例中公开的所有缓冲液均在室温下制备,所有缓冲液的pH均在室温下测量。

[0548] 实施例5的步骤如下:平衡:将0.2g树脂加入15mL离心管中,用10mL的125mM NaCl、50mM TrisHCl (pH 8.5±0.2) 进行洗涤。将悬浮液以5500RPM离心 (HERAEUS MEGAFUGE 16R, 赛默飞科技) 10分钟,弃去上清液。将9.6g加样品加入到洗涤/平衡的树脂中,在室温下孵育15小时至16小时。将悬浮液以5500RPM离心10分钟。将上清液等分,检测AAV9抗原。用冷的1mL pH 8.5±0.2的125mM NaCl、50mM TrisHCl (+2°C至+8°C) 重悬沉淀物,孵育30分钟。将悬浮液以5500RPM离心10分钟。将上清液等分,检测AAV9抗原。AAV9包含约2.6kB至3.0kB的载体DNA。对于洗脱,使用冷缓冲液,实验在冷室中进行。

[0549] 表17

步骤	温度	Capture Select AAV9 冷洗脱	Capture Select AAVX 冷洗脱
树脂 (平衡)	+18°C至+30°C	0.2g	0.2g
加样	+18°C至+30°C	9.6g	9.6g
孵育	+18°C至+30°C	15 至 16h	
离心	+18°C至+30°C	10 分钟/5500 RPM	
[0550] <b>上清液</b>	去除上清液, 吸取样品, 进一步处理沉淀物		
洗脱	+2°C至+8°C	1 mL [125 mM NaCl、 50 mM Tris HCl, pH 8.5±0.2]	1 mL [125 mM NaCl、 50 mM Tris HCl, pH 8.5±0.2]
孵育	+2°C至+8°C	30 分钟	
离心	+2°C至+8°C	10 分钟/5500 RPM	
样品洗脱液	去除上清液, 吸取样品, 进一步处理沉淀物		

[0551] 下表18中显示了上述程序的结果 (特别是从柱上洗脱的AAV9的百分比产率)。

[0552] 表18

级分	温度	Capture Select AAV9 [%AAV9 抗原]	Capture Select AAVX [%AAV9 抗原]
[0553] <b>加样物</b>	+18°C至+30°C	100	100
<b>上清液</b>	+18°C至+30°C	-	6.2
<b>样品洗脱液</b>	+2°C至+8°C	-	36.7

[0554] 此外, 第二组使用在更低温度下孵育的不同树脂来研究在这些条件下的结合特性。下表19中概述了该过程。

[0555] 表19

步骤	温度	Capture Select AAV9 冷洗脱	Capture Select AAVX 冷洗脱
树脂 (平衡)	+2°C至+8°C	0.2g	0.2g
[0556] 含有 AAV9 的溶液 =加样	+2°C至+8°C	9.6g	9.6g
孵育	+2°C至+8°C	15 至 16h	
离心	+2°C至+8°C	10 分钟/5500 RPM	
<b>上清液</b>	去除上清液, 吸取样品, 进一步处理沉淀物		

[0557] 下表20中显示了上述程序的结果 (特别是从柱上洗脱的AAV9的百分比产率)。

[0558] 表20

级分	温度	Capture Select AAV9 [%AAV9 抗原]	Capture Select AAVX [%AAV9 抗原]
[0559] <b>加样物</b>	+2°C至+8°C	100	100
<b>上清液</b>	+2°C至+8°C	LOQ	63.7

[0560] AAV9在每个温度范围均与CaptureSelect™ AAV9结合, 洗脱在较低温度下不能触发。因此, 本实施例表明低温洗脱是AAV9和AAVx亲和树脂之间相互作用的特征。

[0561] 还观察到当温度从高于+18°C变化为低于+8°C时, AAV8和AAV6没有从AAVx树脂上洗脱。相反, AAV8和AAV6需要更苛刻的条件 (例如参见以下实施例6) 才能从AAVx亲和树脂上

洗脱。

[0562] 实施例6

[0563] 在用三质粒系统(含有编码目的蛋白的cDNA和AAV8的VP1、VP2和VP3)转染后,在HEK293细胞系中生产AAV8。用Pa11 Omega T系列组件(100kDa)对澄清的无细胞培养上清液进行浓缩和渗滤。在非结合条件下(即,在包含125mM NaCl和50mM TrisHCl的pH 8.5的溶液中),将病毒颗粒加样到膜吸附器(Mustang Q;Pa11部件号XT140MSTGQP05)上。通过使用25% HCl将含有AAV8的流穿液调节至pH为8.3至8.7,获得pH调节的加样物。

[0564] 进行以下测试程序。注意:本实施例中公开的所有缓冲液均在室温下制备,所有缓冲液的pH均在室温下测量。首先,用5×柱体积的缓冲液(包含100mM甘氨酸、200mM NaCl,pH为2.0)活化包含POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂(赛默飞世尔,目录号36742)ID为16mm、床高为50±0.5mm、面积为2.01cm<sup>2</sup>和体积为约10mL的色谱柱。然后用至少5×柱体积的pH 8.5的50mM TrisHCl和125mM NaCl平衡色谱柱。将pH调节的加样物加入到含有POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂的色谱柱上。

[0565] 然后在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤1(W1:50mM TrisHCl和125mM NaCl,pH 8.5)洗涤色谱柱。然后在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤2(W2:100mM乙酸钠和0.1%吐温80,pH 6.0)洗涤色谱柱。接着在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤1(W1:50mM TrisHCl和125mM NaCl,pH 8.5)洗涤色谱柱。然后室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤2(W2:100mM乙酸钠和0.1%吐温80,pH 6.0)洗涤色谱柱。对于所有这些洗涤步骤,线性流速为60cm/h。

[0566] 对于洗脱,通过将所有物品置于冷却柜(Unichromat 1500)中,使色谱滑架、柱和缓冲液均降至低于+8℃。首先通过加入5×柱体积的上述W2进行洗脱,但是在+2℃至+8℃的更低温度下以5cm/h的线性流速进行。然后在+2℃至+8℃的温度下,将5×柱体积的以下二级洗脱缓冲液加入色谱柱:50mM甘氨酸、10mM组氨酸、100mM NaCl、5%海藻糖、0.005% Crillet 4HP,pH 7.0(ELT-缓冲液)。然后在+2℃至+8℃的温度下,将5×柱体积的以下洗脱缓冲液加入色谱柱:50mM TrisHCl和125mM NaCl,pH 8.5。这些洗脱步骤的线性流速为30cm/h。然后在+2℃至+8℃的温度下,将5×柱体积的纯化水加入色谱柱。然后进行梯度洗脱。在20cm/h的线性流速和+2℃至+8℃的温度下,加入15×柱体积的1mM至20mM HCl/200mM NaCl(在纯化水中)的梯度。

[0567] 表21中更详细地描述上述程序,其中,“CV”表示在该步骤中添加的溶液的柱体积数。

[0568] 表21

步骤	缓冲液	缓冲液组成	量[CV]	流速	温度	
1	活化	REG2	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	60 cm/h +18-26°C	
2	平衡	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	10	60 cm/h +18-26°C	
[0569]	3	产品加样	含有调节后的 AAV8 的溶液	--	60 cm/h +18-26°C	
4	洗涤 1	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h +18-26°C	
5	洗涤 2	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	60 cm/h +18-26°C	
6	洗涤 3	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h +18-26°C	
7	洗涤 4	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	5	60 cm/h +18-26°C	
8	洗脱 1 冷却	W2	100 mM 乙酸钠、0.1%吐温 80, pH 6.0	10	5 cm/h +2-8°C	
9	洗脱 2	ELT	50 mM 甘氨酸、10 mM 组氨酸、100 mM NaCl、5% 海藻糖、0.005% Crillett 4 HP, pH 7.0 (ELT-缓冲液)	5	30 cm/h +2-8°C	
[0570]	10	洗脱 3	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	30 cm/h +2-8°C
11	洗涤 5	PW	纯化水	5	30 cm/h +2-8°C	
12	洗脱 4	梯度	梯度为 1 mM 至 20 mM HCl/200 mM NaCl (在纯化水中)	15	20 cm/h +2-8°C	
13	剥离 1	STR1	20 mM HCl/200 mM NaCl (在纯化水中)	5	60 cm/h +2-8°C	
14	洗涤 6	STR2	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h +2-8°C	

[0571] 下表22和图3中显示了上述程序的结果(特别是从柱上洗脱的AAV8的百分比产率)。

[0572] 表22

	量 [g]	ITR-qPCR vg/mL ×10 <sup>11</sup>	总量 ITR-qPCR vg×10 <sup>11</sup>	ITR-qPCR [%]	AAV8 抗原 cp/mL×10 <sup>11</sup>	AAV8 抗原总量 cp×10 <sup>11</sup>	抗原 [%]	qPCR/抗原 比率 vg/cp
加样	1636.44	19.00	31092.36	100%	23.2	37965.408	100%	0.819
FT/W1	1756.25	--	--	--	<0.0159	<27.924	--	--
W2	54.87	--	--	--	<0.0159	<0.872	--	--
W3	55.22	--	--	--	<0.0159	<0.878	--	--
W4	54.93	--	--	--	<0.0159	<0.873	--	--
E1	24.87	--	--	--	<0.0159	<0.395	--	--
E2	23.78	--	--	--	<0.0159	<0.378	--	--
E3	15.77	--	--	--	<0.0159	<0.251	--	--
E4	41.02	合并液	17182	55.26	合并液	28774	75.79	0.597

[0574] 如所示,通过使温度变化为+2℃至+8℃,不能将AAV8从AAVx上洗脱。

[0575] 实施例7

[0576] 以下程序是单一洗涤方案的实例。首先,用5×柱体积的缓冲液(包含100mM甘氨酸、200mM NaCl,pH为2.0)活化包含POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂(赛默飞世尔,目录号36742)ID为16mm、床高为50±0.5mm、面积为2.01cm<sup>2</sup>和体积为约10mL的色谱柱。然后用10×柱体积的50mM TrisHCl和125mM NaCl(pH 8.5)平衡色谱柱。将pH调节的加样物加入到含有POROS™ CaptureSelect™ AAVx亲和树脂的色谱柱上。

[0577] 然后在室温(18℃至26℃)下,用5×柱体积的洗涤1(W1:50mM TrisHCl和125mM NaCl,pH 8.5)洗涤色谱柱。通过使用5×至10×柱体积的上述W1进行洗脱,但在+2至+8℃的更低温度下进行。然后剥离色谱柱。

[0578] 表23中更详细地描述上述程序,其中,“CV”表示在该步骤中添加的溶液的柱体积数。

[0579] 表23

步骤	缓冲液	缓冲液组成	量[CV]	流速	温度	
1	活化	REG2	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	60 cm/h	+18-26℃
2	平衡	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	10	60 cm/h	+18-26℃
3	产品加样	含有调节后的AAV9的溶液	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	--	60 cm/h	+18-26℃
4	洗涤1	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5	60 cm/h	+18-26℃
5	洗脱1 冷却	W1	125 mM NaCl、50 mM TrisHCl, pH 8.5	5至10	5cm/h	+2-8℃
6	剥离	REG2	100 mM 甘氨酸、200 mM NaCl, pH 2.0	5	60 cm/h	+2-8℃

[0581] 实施例8

[0582] 以下序列显示了根据本公开的一些实施方式的AAV9 VP1序列的实例(SEQ ID NO: 1)。

	10	20	30	40	50
	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWWALKPGAP	QPKANQQHQD	NARGLVLPGY
	60	70	80	90	100
	KYLGPGNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LKYNHADAEF
	110	120	130	140	150
[0583]	QERLKEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRLLEPLG	LVEEAAKTAP	GKKRPVEQSP
	160	170	180	190	200
	QEPDSSAGIG	KSGAQPAKKR	LNFGQTDGTE	SVPDPQPIGE	PPAAPSGVGS
	210	220	230	240	250
	LTMASGGGAP	VADNNEGADG	VGSSSGNWHC	DSQWLGDRVI	TTSTRTWALP
	260	270	280	290	300
	TYNNHLYKQI	SNSTSGGSSN	DNAYFGYSTP	WGYFDFNRFH	CHFSPRDWQR
	310	320	330	340	350
	LINNNWGFRP	KRLNFKLFNI	QVKEVTDNNG	VKTIANNLTS	TVQVFTDSY
	360	370	380	390	400
	QLPYVLGSAH	EGCLPPFPAD	VFMIPQYGYL	TLNDGSQAVG	RSSFYCLEYF
	410	420	430	440	450
	PSQMLRTGNN	FQFSYEFENV	PFHSSYAHSQ	SLDRLMNPLI	DQYLYYLSKT
	460	470	480	490	500
	INGSGQNQQT	LKFSVAGPSN	MAVQGRNYIP	GPSYRQQRVS	TTVTQNNNSE
	510	520	530	540	550
[0584]	FAWPGASSWA	LNGRNSLMNP	GPAMASHKEG	EDRFFPLSGS	LIFGKQGTGR
	560	570	580	590	600
	DNVDADKVM	TNEEEIKTTN	PVATESYGQV	ATNHQSAQAQ	AQTGWVQNQG
	610	620	630	640	650
	ILPGMVWQDR	DVYLQGPPIWA	KIPHTDGNFH	PSPLMGGFGM	KHPPPQILIK
	660	670	680	690	700
	NTPVPADPPT	AFNKDKLNSF	ITQYSTGQVS	VEIEWELQKE	NSKRWNPEIQ
	710	720	730		
	YTSNYYKSNN	VEFAVNTEGV	YSEPRPIGTR	YLTRNL	

[0585] 以下序列显示了根据本公开的一些实施方式的AAV9 VP2序列的实例,其中,AAV9 VP2序列包含SEQ ID NO:2的序列。

```

138 140          150
      TAP GKKRPVEQSP
          160          170          180          190          200
QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS
          210          220          230          240          250
LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRVI TTSTRTWALP
          260          270          280          290          300
TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR
          310          320          330          340          350
LINNNWGFRL KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY
          360          370          380          390          400
[0586] QLPYVLGSAH EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF
          410          420          430          440          450
PSQMLRTGNN FQFSYEFENV PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT
          460          470          480          490          500
INGSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE
          510          520          530          540          550
FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS LIFGKQGTGR
          560          570          580          590          600
DNVDADKVM I TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG
          610          620          630          640          650
ILPGMVWQDR DVYLQGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK
          660          670          680          690          700
NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ
          710          720          730
[0587] YTSNYYKSNN VEFVNTTEGV YSEPRPIGTR YLTRNL

```

[0588] 以下序列显示了根据本公开的一些实施方式的AAV9 VP2序列的实例,其中,AAV9 VP3序列包含SEQ ID NO:3的序列。

	203	210	220	230	240	250
	MASGGGAP	VADNNEGADG	VGSSSGNWHC	DSQWLGDRVI	TTSTRTWALP	
		260	270	280	290	300
	TYNNHLYKQI	SNSTSGGSSN	DNAYFGYSTP	WGYFDFNRFH	CHFSPRDWQR	
		310	320	330	340	350
	LINNNWGFRP	KRLNFKLFNI	QVKEVTDNNG	VKTIANNLTS	TVQVFTDSDY	
		360	370	380	390	400
	QLPYVLGSAH	EGCLPPFPAD	VFMIPQYGYL	TLNDGSQAVG	RSSFYCLEYF	
		410	420	430	440	450
	PSQMLRTGNN	FQFSYEFENV	PFHSSYAHSQ	SLDRLMNPLI	DQYLYYLSKT	
		460	470	480	490	500
[0589]	INGSGQNQQT	LKFSVAGPSN	MAVQGRNYIP	GPSYRQQRVS	TTVTQNNNSE	
		510	520	530	540	550
	FAWPGASSWA	LNGRNSLMNP	GPAMASHKEG	EDRFFPLSGS	LIFGKQGTGR	
		560	570	580	590	600
	DNVDADKVM	TNEEEIKTTN	PVATESYGQV	ATNHQSAQAQ	AQTGWVQNQG	
		610	620	630	640	650
	ILPGMVWQDR	DVYLQGPiWA	KIPHTDGNFH	PSPLMGGF	KHPPPQILIK	
		660	670	680	690	700
	NTPVPADPPT	AFNKDKLNSF	ITQYSTGQVS	VEIEWELQKE	NSKRWNPEIQ	
		710	720	730		
	YTSNYYKSNN	VEFAVNTEGV	YSEPRPIGTR	YLTRNL		

[0590] 本文引用的所有参考文献(包括出版物、专利申请和专利)均以引用方式并入本文,其程度与每个参考文献单独且具体地指示以引用方式并入并在本文中全文阐述的程度相同。

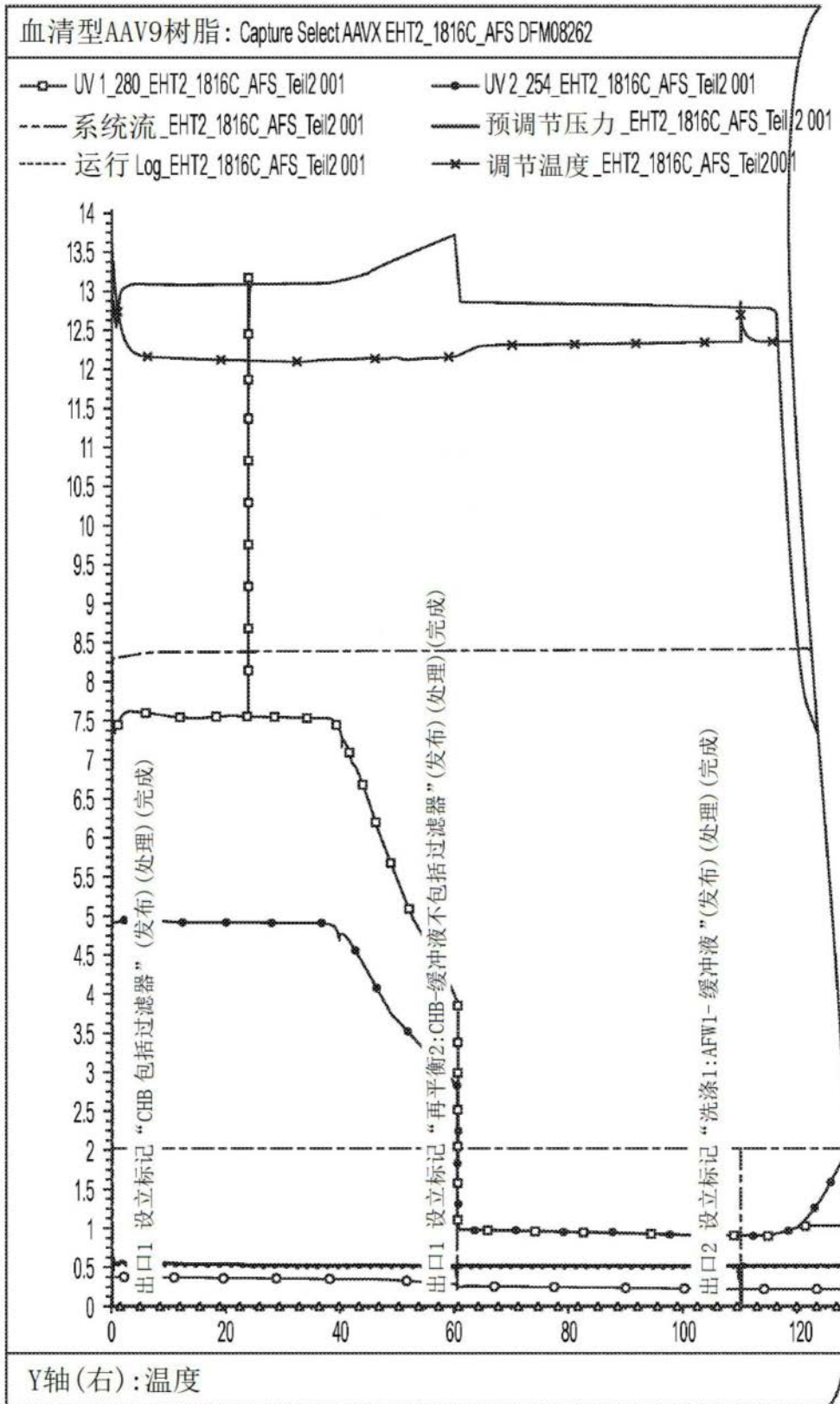


图1

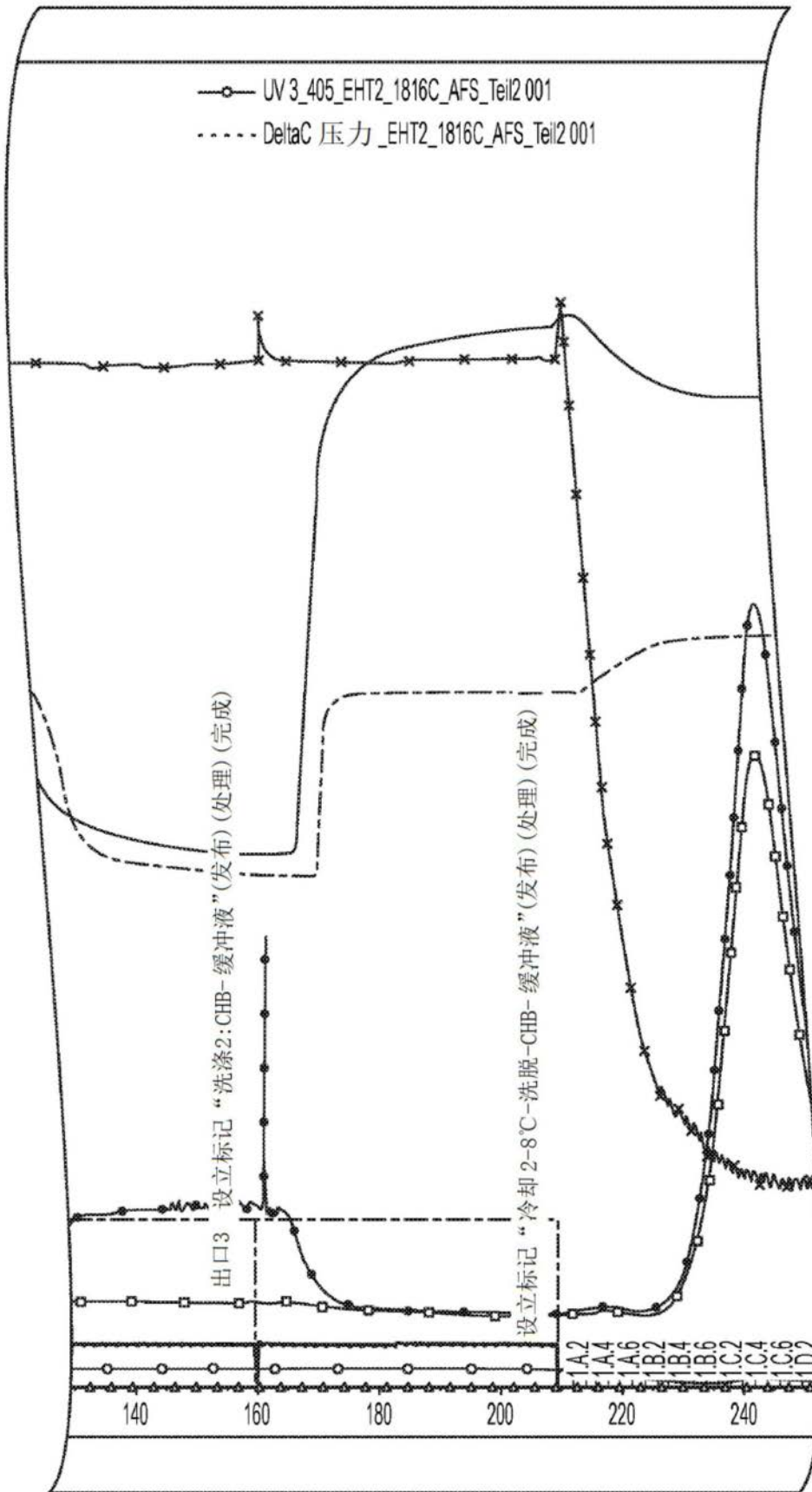


图1 (续)

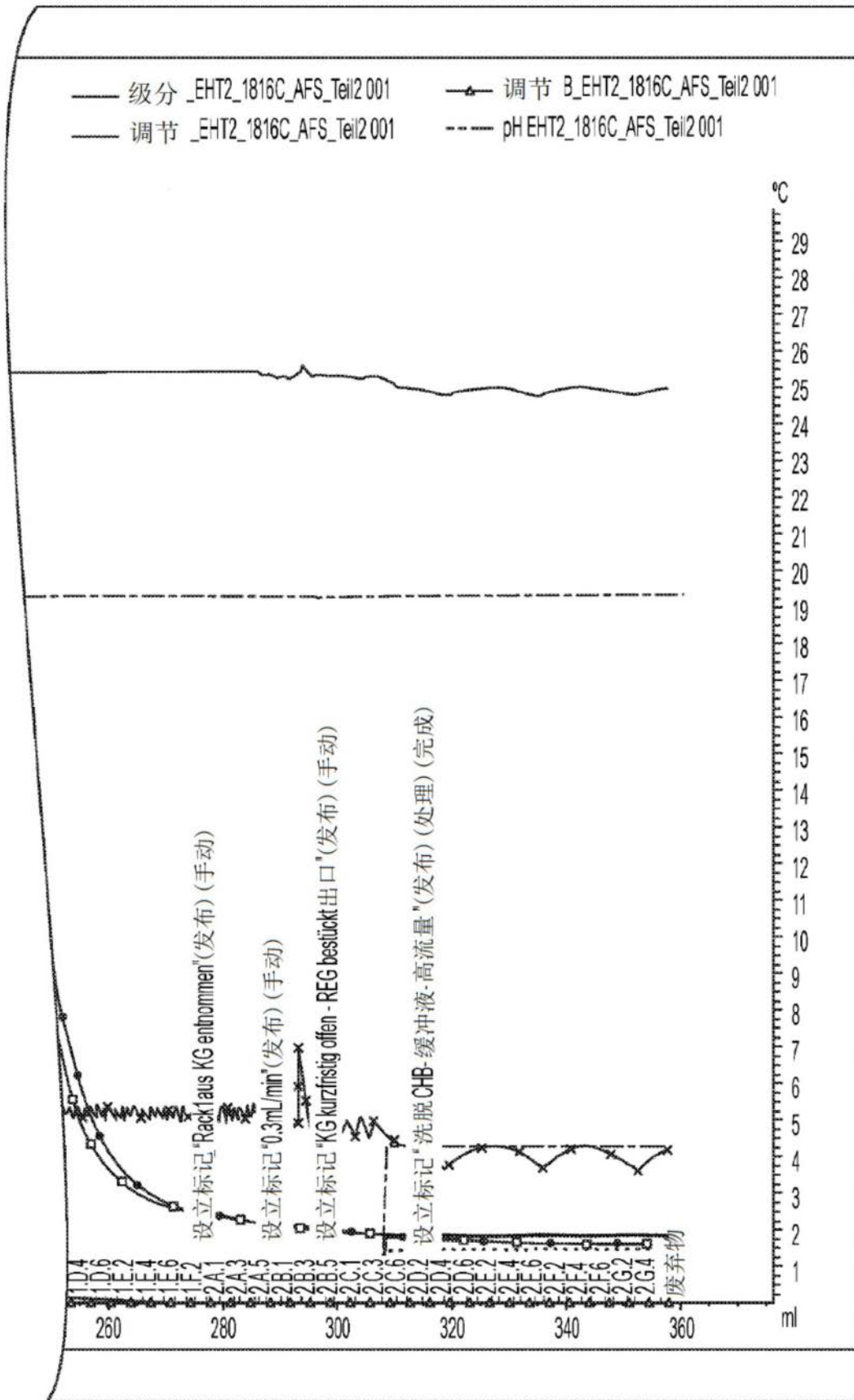


图1 (续)

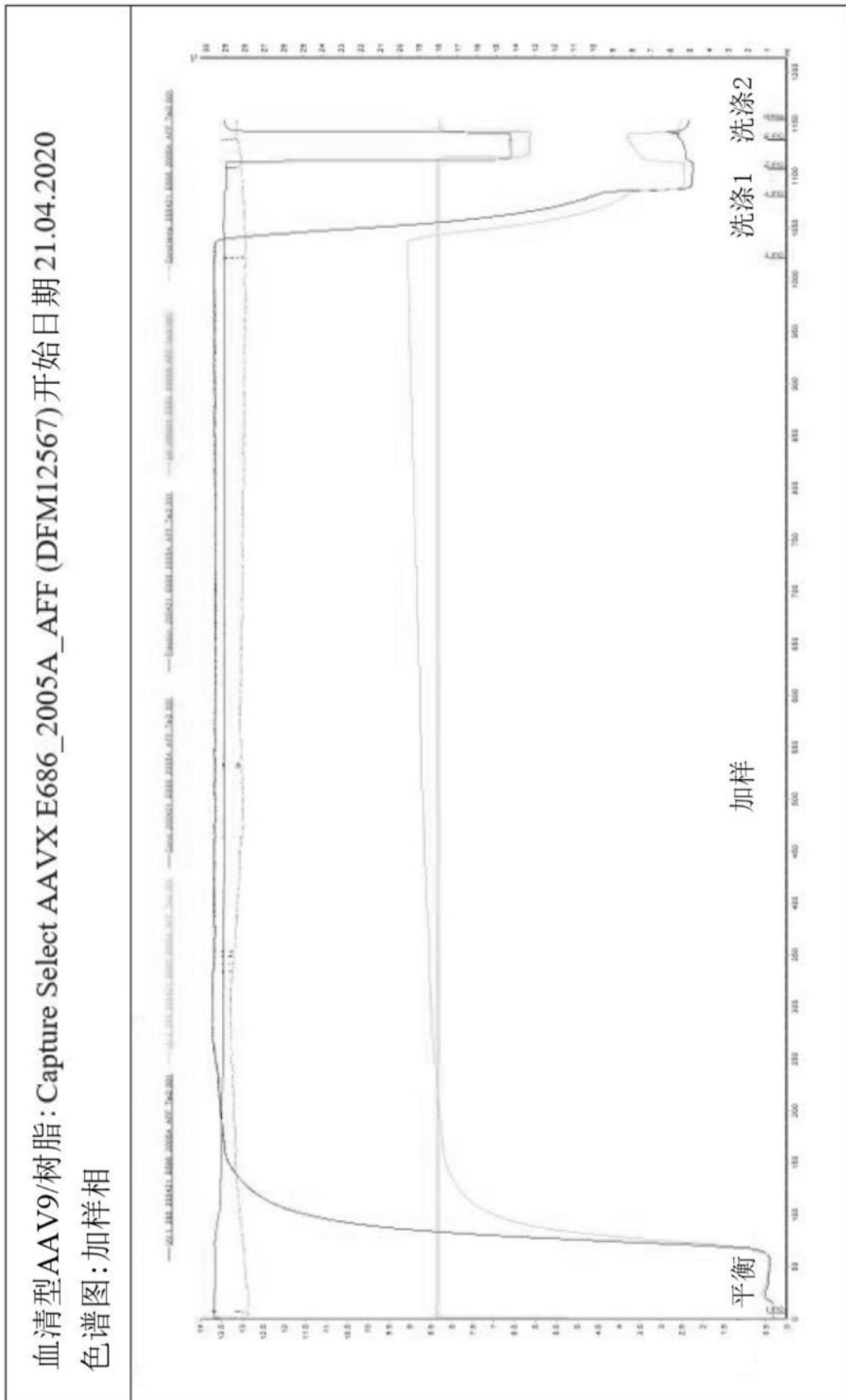


图2A

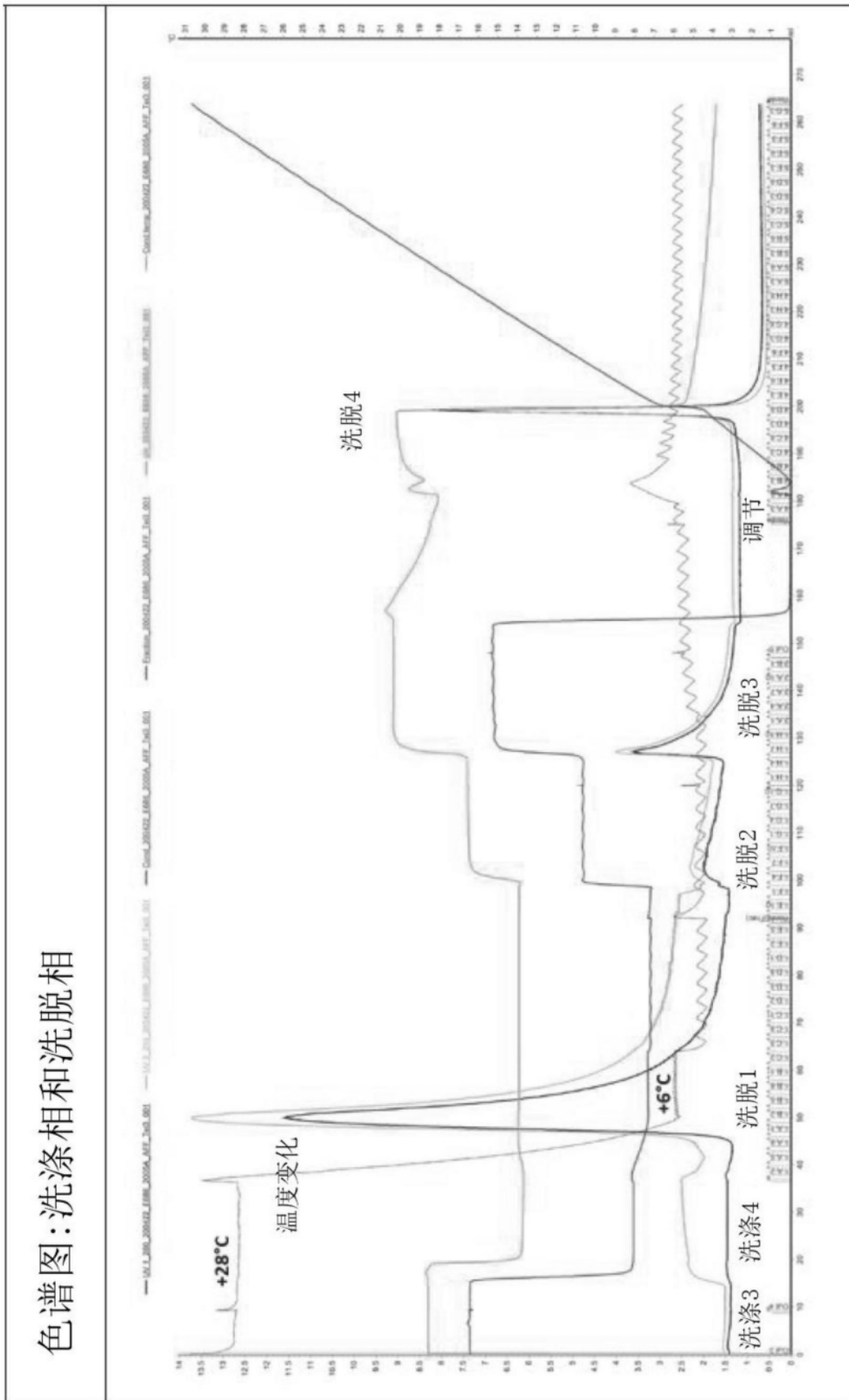


图2B

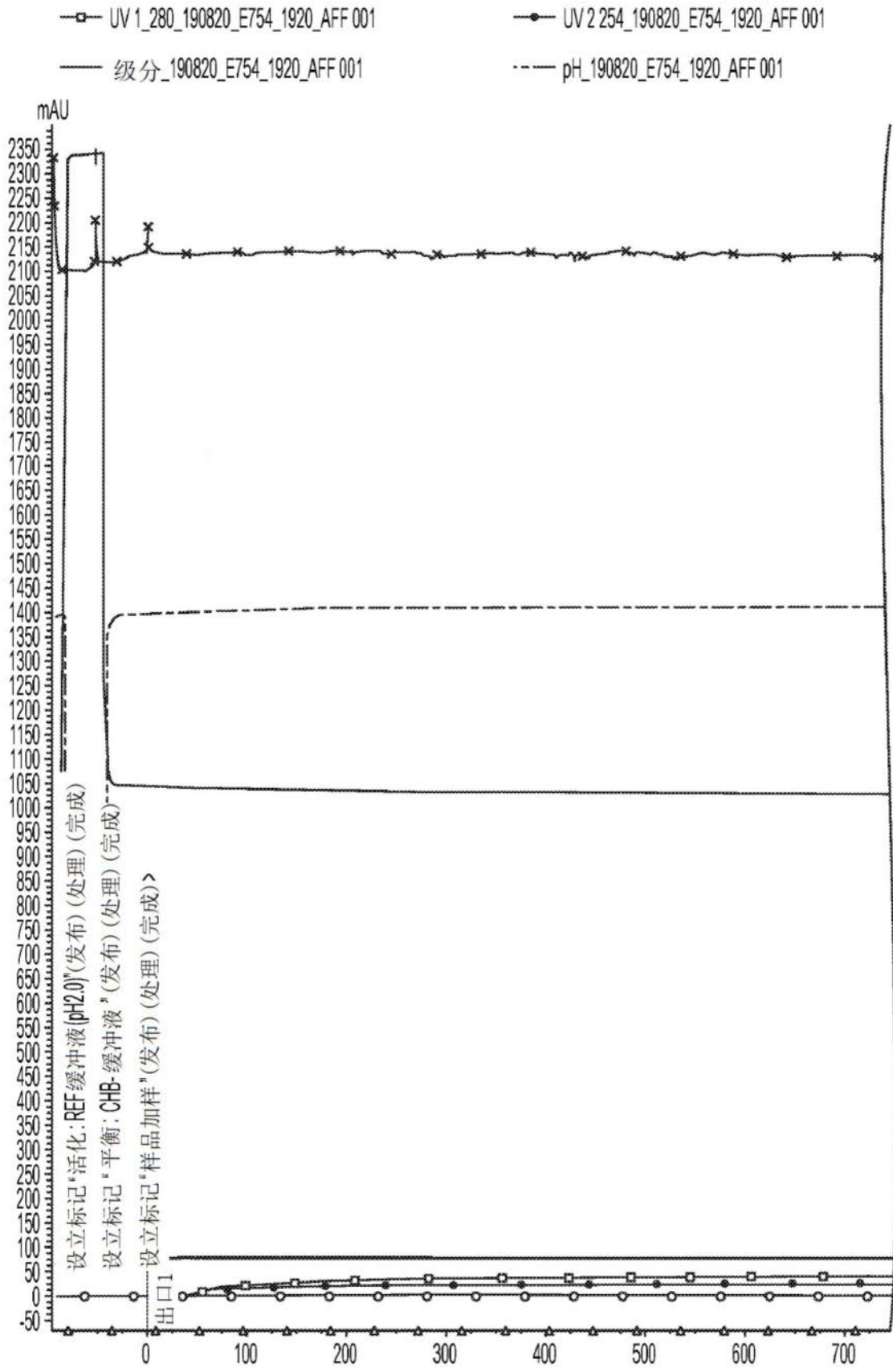


图3

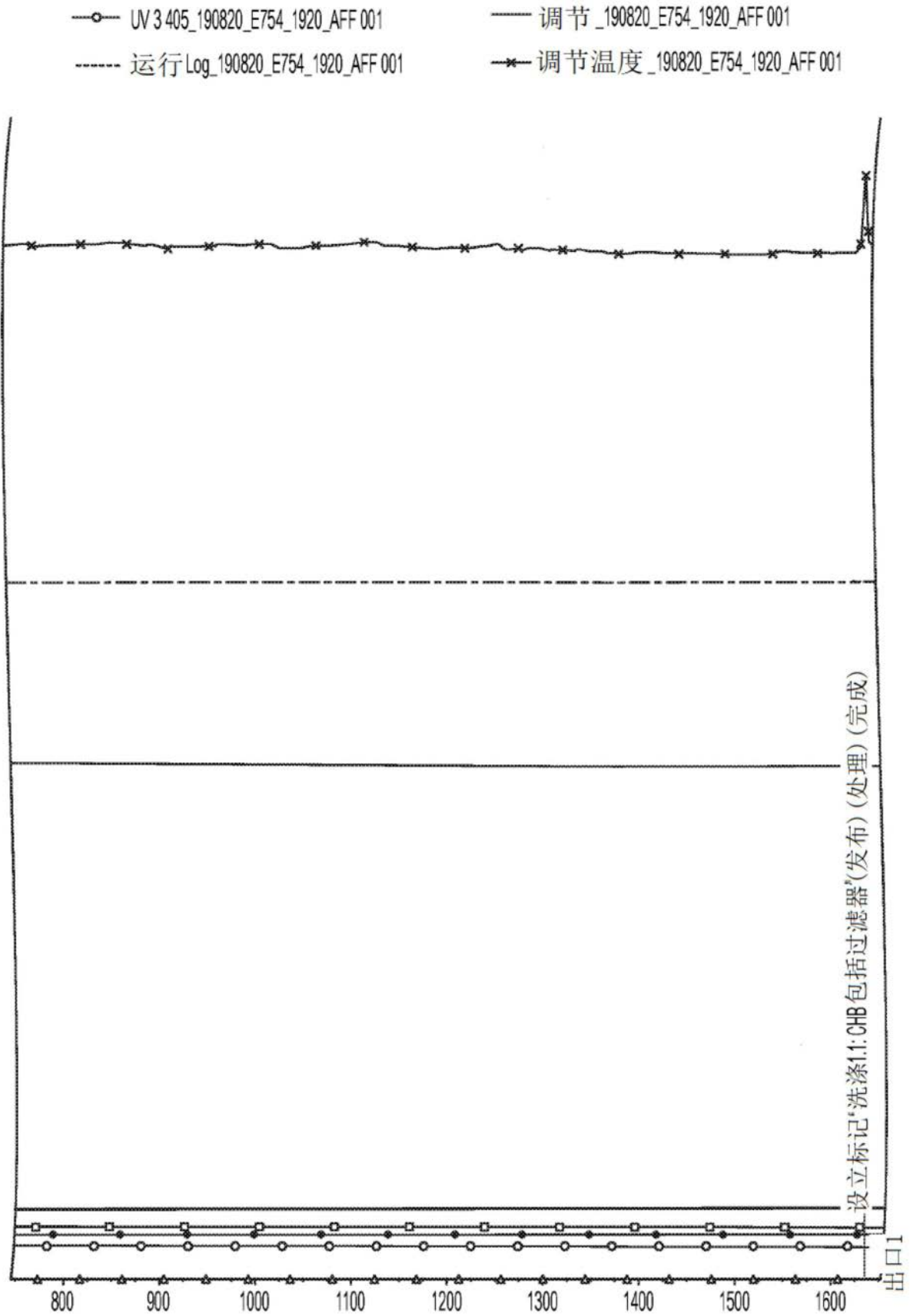


图3 (续)

▲ 调节 B\_190820\_E754\_1920\_AFF 001

— 预调节压力\_190820\_E754\_1920\_AFF 001

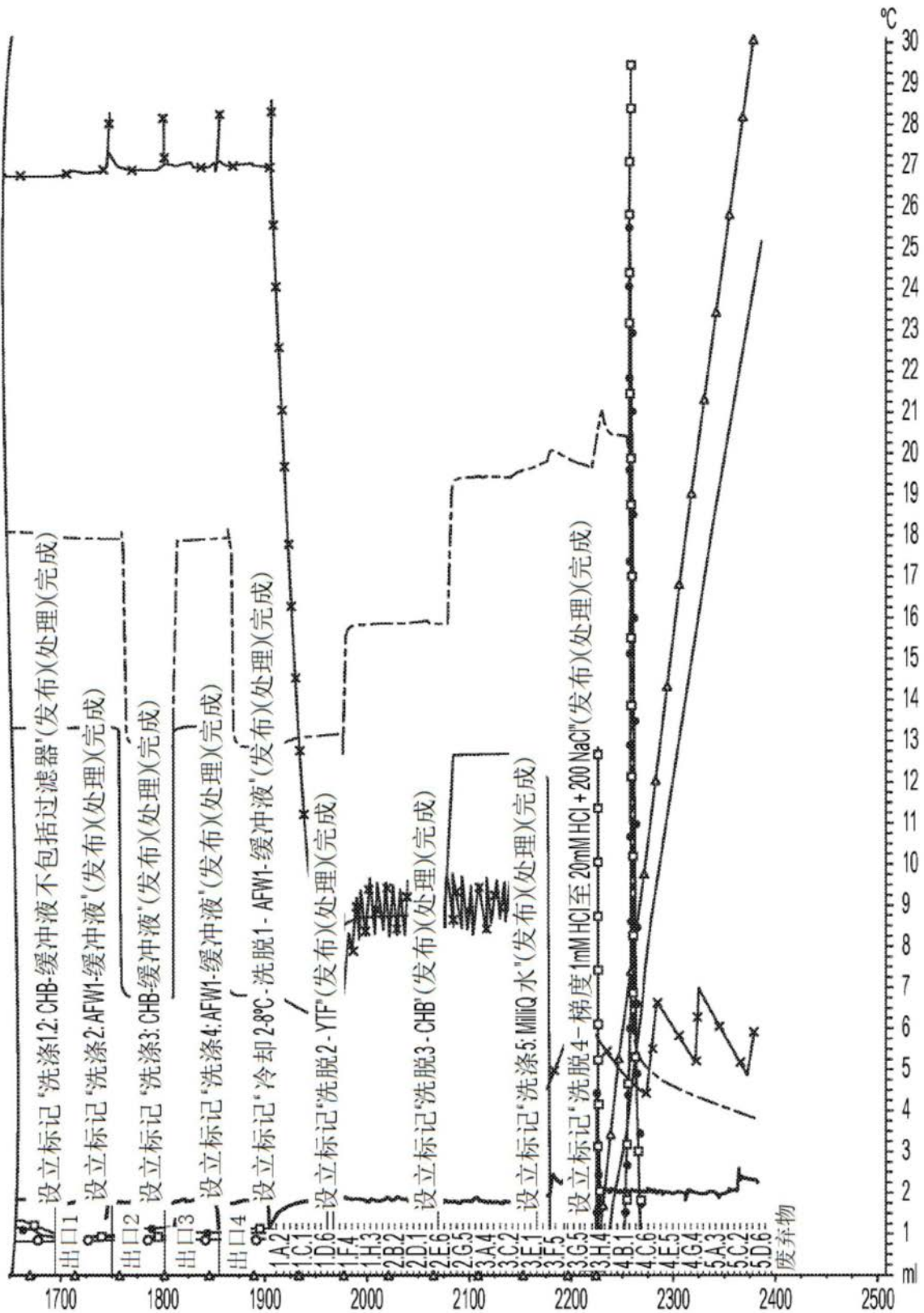


图3(续)