



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I886135 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：109121962

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 29 日

(51)Int. Cl. : C12N7/00 (2006.01)

C12N7/02 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

C12N15/864 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/06/28 美國

62/868,282

(71)申請人：日商武田藥品工業股份有限公司(日本) TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (JP)

日本

(72)發明人：菲德勒 克里斯汀 FIEDLER, CHRISTIAN (AT)；斯卡海恩德爾 馬克斯 SCHEINDEL, MARCUS (AT)；赫斯拉雀爾 梅恩哈德 HASSLACHER, MEINHARD (AT)；柯恩 加德蘭卡 KOEHN, JADRANKA (DE)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2016/128408A1

期刊 Nass et al. "Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes." Molecular Therapy: Methods & Clinical Development. Vol. 9 June 2018. p33-46.

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：3 共 165 頁

(54)名稱

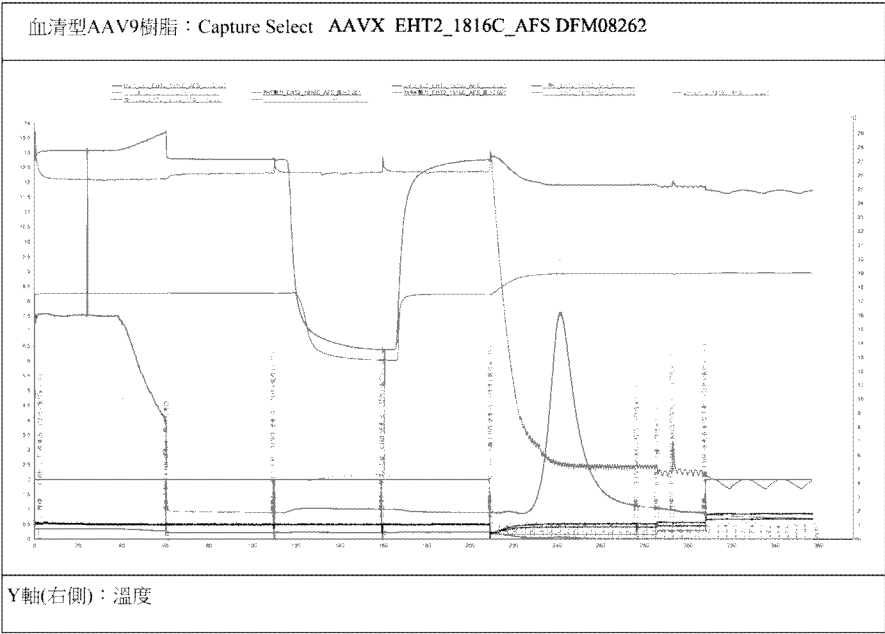
腺相關病毒純化方法

(57)摘要

本發明提供產生腺相關病毒(adeno-associated virus；AAV)產物之方法及純化腺相關病毒之方法。該方法係將 AAV 裝載至親和樹脂上，在室溫下進行洗滌步驟，且在較低溫度下從該親和樹脂溶離出 AAV。本發明揭示用於該等洗滌步驟及溶離之各種緩衝液。

Provided herein are methods of producing an adeno-associated virus (AAV) product and methods of purifying adeno-associated virus. AAV is loaded onto an affinity resin, wash steps are undertaken at room temperature, and AAV is eluted from the affinity resin at a lower temperature. Various buffers are disclosed for use in the wash steps and elution.

指定代表圖：



【圖1】



I886135

【發明摘要】

【中文發明名稱】

腺相關病毒純化方法

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS PURIFICATION METHODS

【中文】

本發明提供產生腺相關病毒(adeno-associated virus；AAV)產物之方法及純化腺相關病毒之方法。該方法係將AAV裝載至親和樹脂上，在室溫下進行洗滌步驟，且在較低溫度下從該親和樹脂溶離出AAV。本發明揭示用於該等洗滌步驟及溶離之各種緩衝液。

【英文】

Provided herein are methods of producing an adeno-associated virus (AAV) product and methods of purifying adeno-associated virus. AAV is loaded onto an affinity resin, wash steps are undertaken at room temperature, and AAV is eluted from the affinity resin at a lower temperature. Various buffers are disclosed for use in the wash steps and elution.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

腺相關病毒純化方法

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS PURIFICATION METHODS

【技術領域】

【0001】本發明係關於純化腺相關病毒(AAV)之材料及方法。

【先前技術】

【0002】腺相關病毒(AAV)為一種封裝線性單股DNA基因組之小型無包膜病毒。AAV屬於細小病毒(*Parvoviridae*)科及依賴病毒(*Dependovirus*)屬，因為AAV之產毒性感染(productive infection)僅在輔助病毒(諸如腺病毒或疱疹病毒)存在下發生。

【0003】為了使AAV安全地用於臨床中，已在AAV之基因組內的若干位置處進行了基因修飾。舉例而言，病毒複製所需的*Rep*基因及位點特異性整合所需的元件已自許多病毒載體中之AAV基因組中消除。此類重組AAV (rAAV)以染色體外狀態存在，且至基因組DNA中之整合效率極低。因此若未完全消除，則降低了rAAV在宿主細胞中誘導隨機突變誘發之可能性。由於此等特性且不具有病原性，rAAV已在臨床前及臨床應用之多個態樣中展現出作為基因療法載體之極大前景。

【0004】儘管已付出很大努力來設計用於純化適合於人類投與之AAV產物的有效、大規模方法，但仍需要較佳的AAV純化方法。存在來自宿主細胞培養基質之多種其他蛋白質及物質，其可在AAV純化期間更有效地移除。因此，需要AAV純化方法，該等方法包括自最終AAV產物移

除宿主細胞物質之步驟。

【發明內容】

【0005】細胞培養物中AAV載體產生之一種特徵為形成包含經破壞細胞之物質的複雜基質。特定言之，宿主細胞蛋白質、蛋白酶體、細胞碎片及潛在的病毒特異性受體通常存在於經破壞細胞之物質中。所揭示之方法包括在生理學上適用之pH下具有較大純度之條件下自最終AAV產物移除宿主細胞物質之步驟。

【0006】在一個態樣中，本文提供一種純化腺相關病毒(AAV)之方法，其包含

(a)在允許溶液中該AAV與親和樹脂之間結合的條件下，將含有AAV之溶液裝載至靶向該AAV上之抗原決定基的該親和樹脂上；

(b)在室溫下進行至少一個洗滌步驟；及

(c)在低於18°C之溫度下自該親和樹脂溶離該AAV。

【0007】室溫為18°C與26°C之間。室溫可為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。室溫可為18°C、約18.5°C、約19°C、約19.5°C、約20°C、約20.5°C、約21°C、約21.5°C、約22°C、約22.5°C、約23°C、約23.5°C、約24°C、約24.5°C、約25°C、約25.5°C或26°C。

【0008】在一些實施例中，步驟(c)之溫度在1°C與12°C之間。在一些實施例中，步驟(c)之溫度在2°C與8°C之間。在一些實施例中，步驟(c)之溫度為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、12°C。在一些實施例中，步驟(c)之溫度為約1°C、約

1.5°C、約2°C、約2.5°C、約3°C、約3.5°C、約4°C、約4.5°C、約5°C、約5.5°C、約6°C、約6.5°C、約7°C、約7.5°C、約8°C、約8.5°C、約9°C、約9.5°C、約10°C、約10.5°C、約11°C、約11.5°C或約12°C。

【0009】在一些實施例中，該方法進一步包含使該含有AAV之溶液與陰離子交換劑接觸且自該陰離子交換劑溶離該含有AAV之溶液，隨後將該含有AAV之溶液裝載至該親和樹脂上。

【0010】在一些實施例中，自該溶離步驟得到的該AAV之HC雜質含量 $\leq 99.9\%$ 。在一些實施例中，自該溶離步驟得到的該AAV之HC雜質含量 $\leq 99.0\%$ 。

【0011】在一些實施例中，該AAV為AAV9。在一些實施例中，該AAV9包含野生型VP1。在一些實施例中，該AAV9包含SEQ ID NO: 1之VP1。

【0012】在一些實施例中，該方法進一步包含使該含有AAV之溶液與包含帶正電基團的過濾器接觸，該過濾器可有效地自該含有AAV之溶液耗乏酸性帶電污染物。

【0013】在一些實施例中，該方法進一步包含奈米過濾AAV部分，以移除大於35 nm之病毒。

【0014】在一些實施例中，該方法進一步包含精良步驟，其包含進行陽離子交換層析法。

【0015】在一些實施例中，該方法進一步包含經由AAV特異性ELISA測試AAV部分。

【0016】在一些實施例中，AAV特異性ELISA為對AAV具有特異性之夾心(sandwich) ELISA。

【0017】在另一態樣中，本文提供一種藉由上文所述之方法中之任一者產生的AAV產物。

【0018】在一個態樣中，本文提供一種純化腺相關病毒(AAV)之方法，其包含：(a)在室溫下及在允許溶液中之該AAV與親和樹脂之間結合的條件下，將含有AAV之溶液裝載至靶向該AAV的該親和樹脂上；(b)在室溫下進行至少一個洗滌步驟；及(c)在低於18°C之溫度下自該親和樹脂溶離該AAV。

【0019】在一些實施例中，步驟(c)之溫度在1°C與12°C之間。在一些實施例中，步驟(c)之溫度在2°C與8°C之間。

【0020】在一些實施例中，該方法進一步包含使該含有AAV之溶液與陰離子交換劑接觸且自該陰離子交換劑溶離該含有AAV之溶液，隨後將該含有AAV之溶液裝載至該親和樹脂上。

【0021】在一些實施例中，至少兩個洗滌步驟在室溫下進行。在一些實施例中，至少三個洗滌步驟在室溫下進行。在一些實施例中，至少四個洗滌步驟在室溫下進行。

【0022】在一些實施例中，進行兩個洗滌步驟。在一些實施例中，進行三個洗滌步驟。在一些實施例中，進行四個洗滌步驟。

【0023】在一些實施例中，依次進行該等洗滌步驟。

【0024】在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約50 mM TrisHCl及

約125 mM鹽。在一些實施例中，該洗滌緩衝液之pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約8.5。

【0025】在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該洗滌緩衝液之pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6.5或約6.0。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約6.0。

【0026】在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約10至約75% (w/w)乙二醇。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約25 mM至約100 mM TrisHCl及約25%至約70% (w/w)乙二醇。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約40 mM至約60 mM TrisHCl及約40%至約60% (w/w)乙二醇。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇。在一些實施例中，該洗滌緩衝液之pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約8.5。

【0027】在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約10至約200 mM甘胺酸、約1至約100 mM組胺酸、約20至約500 mM鹽、約1至約10% (w/w)海藻糖及約0.0005至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約30 mM至約80 mM甘胺酸、約5至約20 mM組胺酸、約50至約200 mM鹽、約3至約8% (w/w)海藻糖及約0.001至約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約40至約60 mM甘胺酸、約5至約15 mM組胺酸、約90至約110 mM鹽、約4至約6% (w/w)海藻糖及約0.001至約0.05% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約50 mM甘胺酸、約10 mM組胺酸、約100 mM鹽、約5% (w/w)海藻糖、約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該洗滌緩衝液之pH為約6.0至約8.0、約6.5至約7.5或約7.0至約7.4或約7.0。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約50 mM甘胺酸、約10 mM組胺酸、約100 mM鹽、約5% (w/w)海藻糖、約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約7.0。

【0028】在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約1至約200 mM TrisHCl、約50至約500 mM鹽及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約5至約50 mM TrisHCl、約75至約250 mM鹽及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約10至約30 mM TrisHCl、約140至約160 mM鹽及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含約20 mM TrisHCl、約150 mM鹽及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該洗滌緩衝液之pH為約6.0至約8.8、約6.5至約8.5或約7.0至約8.0或約7.4。在一些實施例中，至少

一種洗滌緩衝液包含約20 mM TrisHCl、約150 mM鹽及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約7.4。

【0029】在一些實施例中，步驟(c)包含用至少一種溶離緩衝液溶離該AAV。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液與該等洗滌緩衝液中之至少一者相同。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液與在步驟(c)中之溶離該AAV之前用於最終洗滌步驟中之最後的洗滌緩衝液相同。在一些實施例中，該第一溶離緩衝液與在步驟(c)中之溶離該AAV之前用於最終洗滌步驟中之最後的洗滌緩衝液相同。

【0030】在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該溶離緩衝液之pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，且該至少一種溶離緩衝液之pH為約8.5。

【0031】在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇

酯80。在一些實施例中，該溶離緩衝液之pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6.5或約6.0。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種溶離緩衝液之pH為約6.0。

【0032】在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約10至約75% (w/w)乙二醇。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約25 mM至約100 mM TrisHCl及約25%至約70% (w/w)乙二醇。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約40 mM至約60 mM TrisHCl及約40%至約60% (w/w)乙二醇。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇。在一些實施例中，該溶離緩衝液之pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，且該至少一種溶離緩衝液之pH為約8.5。

【0033】在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約10至約200 mM甘胺酸、約1至約100 mM組胺酸、約20至約500 mM鹽、約1至約10% (w/w)海藻糖及約0.0005至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約30至約80 mM甘胺酸、約5至約20 mM組胺酸、約50至約200 mM鹽、約3至約8%海藻糖及約0.001至約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約40至約60 mM甘胺酸、約5至約15 mM組胺酸、約90至約110 mM鹽、約4至約6% (w/w)海藻糖及約0.001至約0.05% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約50 mM甘胺酸、約10 mM組胺酸、約100 mM鹽、約5% (w/w)海藻糖及約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實

施例中，該溶離緩衝液之pH為約6.0至約8.0、約6.5至約7.5或約7.0至約7.4或約7.0。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約50 mM甘胺酸、約10 mM組胺酸、約100 mM鹽、約5% (w/w)海藻糖及約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種溶離緩衝液之pH為約7.0。

【0034】在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約1至約200 mM TrisHCl、約50至約500 mM鹽及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約5至約50 mM TrisHCl、約75至約250 mM鹽及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約10至約30 mM TrisHCl、約140至約160 mM鹽及約0.05%至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約20 mM TrisHCl、約150 mM鹽及0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該溶離緩衝液之pH為約6.0至約8.8、約6.5至約8.5或約7.0至約8.0或約7.4。在一些實施例中，至少一種溶離緩衝液包含約20 mM TrisHCl、約150 mM鹽及0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種溶離緩衝液之pH為約7.4。

【0035】在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM

鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，該緩衝液之pH為約8.5。

【0036】在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，該第一洗滌步驟、該第二洗滌步驟、該第三洗滌步驟及/或該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加

緩衝液，該緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，該緩衝液之pH為約6.0。

【0037】在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，該第一緩衝液之pH為約8.5。

【0038】在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第二洗滌

緩衝液包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，該第二緩衝液之pH為約6.0。

【0039】在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，該第三緩衝液之pH為約8.5。

【0040】在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例

中，該溶離洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，該緩衝液之pH為約8.5。

【0041】在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。

【0042】在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第二

洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第二洗滌緩衝液包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。

【0043】在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。

【0044】在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第四洗滌步驟

包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約90至約110 mM 乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第四洗滌緩衝液包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。

【0045】在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該溶離緩衝液包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，該緩衝液之pH為約6.0。

【0046】在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約

0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約90至約110 mM 乙酸钠及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約100 mM 乙酸钠及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌緩衝液包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約100 mM 乙酸钠及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。

【0047】在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。

【0048】在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約10至約2000 mM 乙酸钠及約0.001至約

1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第三洗滌緩衝液包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。

【0049】在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該溶離緩衝液包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，該緩衝液之pH為約6.0。

【0050】在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加

第一緩衝液，該第一緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第一洗滌緩衝液包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。

【0051】在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包

含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。

【0052】在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該第三緩衝液步驟包含pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6或約6。在一些實施例中，該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。

【0053】在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含pH

為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。

【0054】在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在一些實施例中，該溶離洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8或約8.5。在一些實施例中，步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，該緩衝液之pH為約8.5。

【0055】在一些實施例(例如以上實施例)中，該鹽選自NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、檸檬酸鈉、LiCl、CsCl、乙酸鈉，及NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、檸檬酸鈉、LiCl、CsCl及乙酸鈉中之一或多者的組合。在一些實施例(例如以上實施例)中，該鹽為NaCl。

【0056】在一些實施例中，該緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM NaCl，該緩衝液之pH為約8.5。

【0057】在一些實施例中，自該溶離步驟得到的該AAV之純度含量為99.9%或更高。在一些實施例中，自該溶離步驟得到的該AAV之純度含量為99.0%或更高。

【0058】在一些實施例中，自該溶離步驟(c)溶離之至少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%的該等AAV衣殼為完整AAV衣殼。

【0059】在一些實施例中，該親和樹脂為AAV_x樹脂。

【0060】在一些實施例中，該AAV為AAV9。在一些實施例中，該AAV9包含含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2及/或SEQ ID NO: 3之序列的肽。

【0061】在一些實施例中，該方法進一步包含使該含有AAV之溶液與包含帶正電基團的過濾器接觸，該過濾器可有效地自該含有AAV之溶液耗乏酸性帶電污染物。

【0062】在一些實施例中，該方法進一步包含奈米過濾AAV部分，以移除大於35 nm之病毒。

【0063】在一些實施例中，該方法進一步包含精良步驟，其包含進行陽離子交換層析法。

【0064】在一些實施例中，該方法進一步包含經由AAV特異性ELISA測試AAV部分。在一些實施例中，AAV特異性ELISA為對AAV具有特異性之夾心ELISA。

【0065】在另一態樣中，本文提供一種AAV產物，其由根據本文所揭示之實施例中之任一者的方法產生。

【圖式簡單說明】

【0066】圖1描述了根據實例3之分離程序的層析圖。

【0067】圖2A及圖2B描繪了根據實例4之分離程序的層析圖。裝載區域及洗滌-溶離區域用「分區屏幕」功能分離。藍色：UV280 nm，紫色：UV254 nm，紅色：導電性。

【0068】圖3描繪了根據實例6之分離程序的層析圖。

【實施方式】

相關申請的交叉參考

【0069】本申請案主張2019年6月28日申請之美國臨時申請案第62/868,282號之優先權，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【0070】本文提供產生腺相關病毒(AAV)產物之方法、純化AAV之方法及自包含空AAV衣殼及完整AAV衣殼之濃縮的AAV部分純化完整AAV衣殼之方法。

【0071】細胞培養物中AAV載體產生之一種特徵為形成包含經破壞細胞之物質的複雜基質。特定言之，宿主細胞蛋白質、蛋白酶體、細胞碎片及潛在的病毒特異性受體通常存在於經破壞細胞之物質中。所揭示之方法包括在生理學上適用之pH下具有較大純度之條件下自最終AAV產物移除宿主細胞物質之步驟。

【0072】在一個態樣中，本文提供一種純化腺相關病毒(AAV)之方法，該方法包含

(a)在允許溶液中之該AAV與親和樹脂之間結合的條件下，將含有AAV之溶液裝載至靶向該AAV上之抗原決定基的該親和樹脂上；

(b)在室溫下進行至少一個洗滌步驟；及

(c)在低於18°C之溫度下自該親和樹脂溶離該AAV。

【0073】在某些態樣中，該方法包含藉由使緩衝液溫度自室溫降低

以使AAV衣殼自親和樹脂溶離。在某些實施例中，可使用相同緩衝液在溫度自1°C降低至12°C時使AAV自相同樹脂溶離。在某些實施例中，可使用相同緩衝液在溫度自2°C降低至8°C時使AAV自相同樹脂溶離。使溫度自室溫降低以增加AAV之溶離為驚人且出人意料的。不受特定理論束縛，此結果為驚人且出人意料的，因為雖然已知較低溫度延長了抗體與抗原之間的結合達到平衡之時間，但當將溫度降低至低於室溫時，熟習此項技術者將不預期已經結合之抗原容易釋放。

【0074】溫度變化溶離方案具有在低溫下溫和溶離以幫助保持AAV粒子之結構及/或感染性的益處。根據本文所述之各種實施例的溶離可防止較低pH暴露(例如在接近中性pH下溶離)且保持AAV之較高效能。另外，使用溫和溶離緩衝液可易於在製造環境中實施且因在溶離步驟中不需要緩衝液變化而更為高效的。此外，溫度變化溶離方案產生較高含量之完整AAV衣殼。

【0075】在某些實施例中，AAV9可在約20至25°C之溫度範圍下結合至本文所述之樹脂，且可在約1至12°C之較低溫度下在相同緩衝系統中溶離。在某些實施例中，AAV9可在約20至25°C之溫度範圍下結合至本文所述之樹脂，且可在約2至8°C之較低溫度下在相同緩衝系統中溶離。舉例而言，當在包含125 mM NaCl及50 mM TrisHCl之緩衝液中，在pH 8.5下且使用相同緩衝液在約1至12°C或約2至8°C之較低溫度下自樹脂溶離時，AAV9可在室溫下結合至CaptureSelect AAVx樹脂。作為另一實例，當在包含100 mM乙酸鈉及0.1% (w/w)聚山梨醇酯80之緩衝液中，在pH 6.0下且使用相同緩衝液在約1至12°C或約2至8°C之較低溫度下自樹脂溶離時，AAV9可在室溫下結合至CaptureSelect AAVx樹脂。

【0076】根據本文所述之各種實施例及實例，依次進行洗滌步驟及溶離步驟時可見到對AAV產物純度之進一步改進。

定義

【0077】除非本文另外指明或上下文中明顯矛盾，否則在描述本發明之上下文中(尤其在以下申請專利範圍之上下文中)使用之術語「一(a)」、「一(an)」及「該」及相似指示物均應解釋為涵蓋單數及複數。除非另外指出，否則術語「包含」、「具有」、「包括」及「含有」應理解為開端式術語(亦即，意謂「包括(但不限於)」)。

【0078】如本文所用，術語「衣殼」、「衣殼粒子」及「粒子」可互換使用且係指由至少一個完整AAV衣殼外殼構成之AAV粒子。

【0079】如本文所用，關於AAV或AAV衣殼之術語「空」係指缺乏所關注之完全(亦即完整)基因(GOI)之彼等者。空AAV或空AAV衣殼或空AAV粒子不能提供治療益處。如本文所用，關於AAV或AAV衣殼或AAV粒子之術語「完整」係指含有大部分完全GOI之彼等者。完整AAV衣殼可向接受者患者提供治療益處。在某些實施例中，「完整」亦可包括「不完全載體DNA」或「截短載體DNA」。在某些實施例中，關於AAV或AAV衣殼或AAV粒子之「過度填充」係指含有潛在雙重封裝或較長基因組或GOI DNA(例如至多兩倍大小)之彼等者。在某些實施例中，可用額外分析方法區分完全相對於不完全及/或截斷及/或過度填充的載體DNA。此類方法包括(但不限於)藉由毛細電泳法進行之DNA定尺寸、AUC(分析型超速離心)、%瓊脂糖DNA(非變性或鹼性)、凝膠、南方墨點法、點墨法雜交、UV分光光度法、弱陰離子交換層析法及質譜分析(參見Resolving Adeno-Associated Viral Particle Diversity with Charge Detection Mass

Spectrometry, Elizabeth E. Pierson等人, Anal. Chem., 2016, 88 (13), 第6718-6725頁, 其出於所有目的全文併入本文中)。

【0080】除非本文另外指出, 否則本文對值範圍之敘述僅意欲用作個別地提及屬於該範圍內之各個別值及各端點的簡寫方法, 且各個別值及端點係併入本說明書中, 如同其在本文中個別地敘述一般。

【0081】除非本文另外指明或另外與上下文明顯抵觸, 否則本文所述之所有方法均可以任何適合次序進行。除非另外主張, 否則本文中所提供之任何及所有實例或例示性語言(例如, 「諸如」)之使用僅意欲更好地闡明本發明, 且不對本發明之範疇形成限制。本說明書中之任何語言均不應解釋為指示實踐本發明所必需之任何未主張要素。

【0082】本文中描述了本發明之較佳實施例, 包括本發明人已知的用於實現本發明之最佳模式。在閱讀前述說明書之後, 彼等較佳實施例之變化對於一般熟習此項技術者可變得顯而易見。本發明人期望熟習此項技術者適當時採用該等變化, 且本發明人意欲以不同於本文中特定所述之方式來實踐本發明。因此, 本發明包括如適用法律准許的隨附於本文之申請專利範圍中所陳述的標的物之所有修改以及等效物。此外, 除非本文另外指示或另外明顯與上下文矛盾, 否則本發明涵蓋上述要素在其所有可能變化中的任何組合。

洗滌及溶離步驟及緩衝液

【0083】在一個態樣中, 本文提供一種純化腺相關病毒(AAV)。該方法包含(a)在允許溶液中之該AAV與親和樹脂之間結合的條件下, 將含有AAV之溶液裝載至靶向AAV的該親和樹脂上; (b)在室溫下進行至少一個洗滌步驟; 及(c)在低於18°C之溫度下自該親和樹脂溶離該AAV。

【0084】親和純化步驟包含一或多個洗滌步驟。該一或多個洗滌步驟之後可為一或多個溶離步驟。在某些實施例中，本發明之方法包含過濾步驟，其在親和純化步驟之前發生。

【0085】在一些實施例中，進行至少兩個洗滌步驟，各自包括相同或不同緩衝液。在一些實施例中，進行至少三個洗滌步驟，各自包括相同或不同緩衝液。在一些實施例中，進行至少四個洗滌步驟，各自包括相同或不同緩衝液。在一些實施例中，進行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個洗滌步驟，各自包括相同或不同緩衝液。在一些實施例中，進行兩個洗滌步驟。在一些實施例中，進行三個洗滌步驟。在一些實施例中，進行四個洗滌步驟。在某些實施例中，洗滌緩衝液不同。在一些實施例中，依次進行該等洗滌步驟。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫(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之間)下進行。在某些實施例中，所有洗滌步驟均在室溫下進行。

【0086】在某些實施例中，使用至少一種洗滌緩衝液。在某些實施例中，可使用至少兩種不同洗滌緩衝液。在某些實施例中，可使用至少三種不同洗滌緩衝液。在某些實施例中，可使用至少四種不同洗滌緩衝液。在某些實施例中，可使用一種洗滌緩衝液。在某些實施例中，可使用兩種不同洗滌緩衝液。在某些實施例中，可使用三種不同洗滌緩衝液。在某些實施例中，可使用四種不同洗滌緩衝液。

【0087】在某些實施例中，進行至少一個溶離步驟。在某些實施例中，進行至少兩個溶離步驟，各自包括相同或不同緩衝液。在某些實施例

中，進行至少三個溶離步驟，各自包括相同或不同緩衝液。在一些實施例中，進行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個溶離步驟，各自包括相同或不同緩衝液。在某些實施例中，進行一個溶離步驟。在某些實施例中，進行至少兩個溶離步驟。在某些實施例中，進行至少三個溶離步驟。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液與該等洗滌緩衝液中之至少一者相同。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液不同於洗滌緩衝液。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液與在溶離該AAV之前用於最終洗滌步驟中之最後的洗滌緩衝液相同。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液與在溶離該AAV之前用於最終洗滌步驟中之最後的洗滌緩衝液相同。溶離在1°C與12°C之間(例如2°C與8°C之間，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)的溫度下進行。根據本文所述之各種實施例的溶離可防止較低pH暴露(例如在接近中性pH下溶離)且保持AAV之較高效能。

【0088】 在某些實施例中，使用至少一種溶離緩衝液。在某些實施例中，可使用至少兩種不同溶離緩衝液。在某些實施例中，可使用至少三種不同溶離緩衝液。在某些實施例中，可使用至少四種不同溶離緩衝液。在某些實施例中，可使用一種溶離緩衝液。在某些實施例中，可使用兩種不同溶離緩衝液。在某些實施例中，可使用三種不同溶離緩衝液。在某些實施例中，可使用四種不同溶離緩衝液。

【0089】 在某些實施例中，低於室溫之溫度變化可出現於冷卻箱(例如，Unichromat 1500)、溫度夾套(例如，水冷卻夾套)及/或使用低溫緩衝

液進行溶離。在某些實施例中，在冷凍之前在室溫下製備緩衝液。在某些實施例中，若在冷凍之前在室溫下量測緩衝液之pH。

【0090】可使用各種體積，諸如約2個管柱體積至約15個管柱體積、約3個管柱體積至約7個管柱體積、約4個管柱體積至約8個管柱體積、約5個管柱體積至約10個管柱體積或約7個管柱體積至約12個管柱體積。舉例而言，當管柱體積為約2 ml至約3 ml時，可使用10個管柱體積。可使用約5個管柱體積或5個管柱體積之任何洗滌及/或溶離緩衝液。或者，可使用約10個管柱體積或10個管柱體積之任何洗滌及/或溶離緩衝液。可進一步延長洗滌步驟之時間，以改進AAV純度。

【0091】洗滌步驟可有效地自AAV及/或親和基質之鹼性樹脂移除牢固結合的污染物。同時，洗滌步驟中所用的緩衝液實質上不溶離AAV。

【0092】在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液包含螯合劑，例如EDTA。在某些實施例中，該洗滌緩衝液包含單一胺基酸或兩種或更多種胺基酸之任何組合，其確保pH範圍及宿主細胞(例如HEK)-HCP之耗乏率，例如甘胺酸、精胺酸、色胺酸、胺基酸之衍生物，例如牛磺酸(氧化半胱胺酸)、N-乙醯基-色胺酸及甘胺醯甘胺酸。

【0093】該等溶離步驟可有效溶離AAV衣殼。在某些實施例中，該等溶離步驟較佳溶離完整AAV衣殼，而非空AAV衣殼或過度填充的AAV衣殼。在某些實施例中，該溶離緩衝液包含單一胺基酸或兩種或更多種胺基酸之任何組合，以確保pH及AAV之溶離，例如甘胺酸、精胺酸、色胺酸、胺基酸之衍生物，例如牛磺酸(氧化半胱胺酸)、N-乙醯基-色胺酸及甘胺醯甘胺酸。

【0094】不希望受理論所束縛，AAV之溶離程度受乙二醇之量及第

三緩衝液中之鹽的導電性兩者影響。相較於50% (w/w)乙二醇，緩衝液中至少55% (w/w)乙二醇之量可顯著增加溶離之量。因此，在給定乙二醇濃度下，NaCl濃度增加可提高溶離程度及速率。在給定乙二醇濃度下，用多價鹽置換NaCl亦可提高溶離程度及速率。

【0095】不希望受理論所束縛，若鹽為恆定的，例如150 mM NaCl，則增加的乙二醇之量可增加緩衝液之溶離強度。若乙二醇含量為恆定的，例如55%，則增加的鹽之量可增加緩衝液之溶離強度。因此，在150 mM NaCl中，溶離強度自40%增加至45%至50%至55%至60% (w/w)乙二醇。具有恆定鹽含量之溶液的乙二醇含量增加可降低導電性。乙二醇之量增加可降低緩衝液中之鹽的溶解量。

【0096】在某些實施例中，山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、丙三醇(1,2,3-丙三醇)或赤藻糖醇(內消旋-1,2,3,4-丁四醇)中之一或多者可與乙二醇結合使用或代替乙二醇。在某些實施例中，溶離緩衝液可包含約30至約35%、約35至約40%、約40至約45%、約45至約50%、約48至約52%、約50至約55%、約55至約60%、約60至約65%、約65至約70%或約70至約75% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，溶離緩衝液可包含約50%或50% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，乙二醇之濃度為至少55% (w/w)。在某些實施例中，乙二醇之濃度為至少56% (w/w)。在某些實施例中，乙二醇之濃度為至少57% (w/w)。在某些實施例中，乙二醇之濃度為至少58% (w/w)。

【0097】舉例而言，洗滌及/或溶離緩衝液可包含以下中之一或多者：TrisHCl、乙酸鹽、磷酸鹽、組胺酸、咪唑、離胺酸、精胺酸、甘胺酸、牛磺酸、檸檬酸鹽、HEPES、MES、MES-Na、硼酸鹽、Bis-Tris、

MOPS、二甘胺酸、麥黃酮、TAPS、TAPSO、MES、PIPES、TES (2-[[1,3-二羥基-2-(羥基甲基)丙-2-基]胺基]乙磺酸)、鈉巴比妥(Veronal)、ADA(N-(2-乙醯胺基)亞胺二乙酸)、ACES(N-(2-乙醯胺基)-2-胺基乙烷磺酸)、Bis-Tris丙烷、BES(N,N-雙(2-羥基乙基)-2-胺基乙烷磺酸)、DIPSO(3-(N,N-雙[2-羥基乙基]胺基)-2-羥基丙磺酸)、Trizma、HEPPSO(4-(2-羥基乙基)哌嗪-1-(2-羥基丙磺酸))、POPSO(哌嗪-1,4-雙(2-羥基丙磺酸)脫水物)、TEA、EPPS (4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸)、HEPBS(N-(2-羥基乙基)哌嗪-N'-(4-丁磺酸)、AMPD(2-胺基-2-甲基-1,3-丙二醇)、AMPSO(N-(1,1-二甲基-2-羥基乙基)-3-胺基-2-羥基丙磺酸)、單一胺基酸或兩個或更多個胺基酸之任何組合，例如甘胺酸、精胺酸、色胺酸、胺基酸之衍生物，例如牛磺酸(氧化半胱胺酸)、N-乙醯基-色胺酸及甘胺醯甘胺酸。

【0098】在一些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液可包含以下中之一或多者：乙酸钠、TrisHCl、精胺酸-HCl、離胺酸-HCl及組胺酸-HCL、組胺酸、甘胺酸、牛磺酸、MES-Na、Bis-Tris、檸檬酸鹽、乙酸鹽、MES、HEPES、磷酸鹽、TrisHCl、Bis-Tris、組胺酸、咪唑、精胺酸HCl、離胺酸HCl、甘胺酸、甘胺醯甘胺酸、硼酸鹽、MOPS、二甘胺酸、三甘胺酸、TAPS、TAPSO、PIPES、L-麩胺酸、天冬胺酸、BAPTA(1,2-雙(o-胺基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸)及/或N-乙醯基-D,L-色胺酸。

【0099】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液進一步包含鹽。在一些實施例中，該緩衝液包含TrisHCl及鹽。在一些實施例中，該緩衝液包含精胺酸-HCl及鹽。在一些實施例中，該緩衝液包含組胺酸及鹽。

【0100】對於本文所述之洗滌及/或溶離緩衝液，該鹽可選自NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙 酸 鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸 檬 酸 鈉、檸 檬 酸 鉀，及NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、C₂H₃NaO₂、檸 檬 酸 鈉及檸 檬 酸 鉀中之一或多者的組合。在一些實施例中，該鹽濃度為約50至約2000 mM、約100至約1500 mM、約100至約200 mM、約200 mM至約1000 mM、約500至約900 mM、約600 mM至約800 mM、約750 mM或750 mM。在一些實施例中，該鹽濃度為約50至約2000 mM、約100至約1500 mM、約100至約200 mM、約200 mM至約1000 mM、約500至約900 mM、約600 mM至約800 mM NaCl、約750 mM NaCl或750 mM NaCl。在一些實施例中，當使用NaCl之濃度梯度時，目標濃度為2000 mM。在一些實施例中，該鹽之濃度不超過500 mM。在一些實施例中，該鹽之濃度不超過200 mM。在一些實施例中，該鹽為NaCl。在一些實施例中，該鹽為125 mM NaCl。在一些實施例中，該鹽為150 mM NaCl。

【0101】在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含一或多種有機溶劑或清潔劑。舉例而言，有機溶劑或清潔劑可為(但不限於)Tween 80、聚山梨醇酯80、Triton X100、磷酸三(正丁基)酯(TNBP)、乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、DMSO、蔗糖或海藻糖。舉例而言，清潔劑可為(但不限於)非離子聚氧化乙烯界面活性劑(例如，Brij 35)、4-壬基苯基-聚乙二醇(Arkopal N100)、辛基穀胺酸、正十二基β-D-麥芽糖苷、毛地黃皂苷、6-環己基己基β-D-麥芽糖苷或辛基吡喃葡萄糖苷。舉例而言，乙二醇可為PEG，諸如(但不限於)PEG 2000、PEG4000、PEG6000 (聚乙二醇)。舉例而言，有機溶劑可為(但不限於)丙

三醇(1,2,3-丙三醇)及赤藻糖醇(內消旋-1,2,3,4-丁四醇)。在一些實施例中，該清潔劑包含Triton X100、聚山梨醇酯80及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)中之一或多者。在一些實施例中，有機溶劑或清潔劑可為聚山梨醇酯80、乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、蔗糖或海藻糖。在一些實施例中，該緩衝液包含TrisHCl及DMSO。

【0102】在某些實施例中，有機溶劑或清潔劑存在於洗滌及/或溶離緩衝液中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約0.0005至約20%、約0.0005至約15%、約0.0005至約10%、約0.0005至約5%、約0.0005至約1%、約0.001至約4%、約0.001至約0.1%、約0.001至約0.05%、約0.005至約3%、約0.01至約2.5%、約0.05至約5%、約0.05至約2%、0.05至約0.2%或約0.1至約1.5% (w/w)。在一些實施例中，有機溶劑或清潔劑以約0.005%(w/w)存在。在一些實施例中，有機溶劑或清潔劑以約0.1%(w/w)存在。

【0103】在一些實施例中，該有機溶劑或清潔劑為聚山梨醇酯80(例如Tween 80或Crillet)。在一些實施例中，該緩衝液包含聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該緩衝液包含精胺酸-HCl及聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該緩衝液包含牛磺酸及聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該緩衝液包含TrisHCl及聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該緩衝液包含乙酸钠及聚山梨醇酯80。

【0104】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約0.0005至約20%、約0.0005至約15%、約0.0005至約10%、約0.0005至約5%、約0.0005至約1%、約0.001至約4%、約0.001至約0.1%、約0.001至約0.05%、約0.005至約3%、約0.01至約2.5%、約0.05至約5%、約0.05至約

2%、0.05至約0.2%或約0.1至約1.5% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約5% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約10% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約20% (w/w)聚山梨醇酯80。

【0105】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約30至約35%、35至約40%、約40至約45%、約45至約50%、約48至約52%、約50至約55%、約55至約60%、約60至約65%、約65至約70%或約70至約75% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50%或50% (w/w)乙二醇。

【0106】有機溶劑或清潔劑不必存在於所使用之所有洗滌及/或溶離緩衝液中。在某些實施例中，有機溶劑或清潔劑不存在於所使用之任何洗滌及/或溶離緩衝液。在某些實施例中，有機溶劑或清潔劑存在於所使用之洗滌緩衝液中之至少一者中。在某些實施例中，有機溶劑或清潔劑存在於所使用之溶離緩衝液中之至少一者中。在一些實施例中，洗滌緩衝液，例如第一洗滌緩衝液，包含乙酸鈉及聚山梨醇酯80。在一些實施例中，洗滌緩衝液，例如第二洗滌緩衝液，包含乙酸鈉及聚山梨醇酯80。在一些實施例中，洗滌緩衝液包含Tween 80、DMSO及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)中之一或多者。在一些實施例中，洗滌緩衝液包含Triton-X100、聚山梨醇酯80及TNBP中之一或多者。在一些實施例中，洗滌緩衝液，例如第三洗滌緩衝液，包含Tris及乙二醇。不希望受理論所束縛，洗滌緩衝液中之

有機溶劑及清潔劑可有效移除牢固結合的宿主蛋白質及病毒受體，同時亦不活化及/或崩解脂質包膜病毒。

【0107】在一些實施例中，該緩衝液進一步包含乙二醇、蔗糖、牛磺酸及/或丙三醇。在一些實施例中，該緩衝液包含精胺酸-HCl及蔗糖及丙三醇中之一者。在一些實施例中，該緩衝液包含牛磺酸及乙二醇。在一些實施例中，該緩衝液包含TrisHCl及乙二醇。在一些實施例中，該緩衝液包含乙酸鈉及乙二醇。

【0108】在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液可為包含鹽(例如NaCl)之基於Tris的緩衝液。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液，其可為基於乙酸鈉(sodium acetate/NaAcetate)之緩衝液。在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液可包含2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES-Na)之鈉鹽、EDTA及包含聚山梨醇酯80、DMSO及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)之溶劑/清潔劑混合物。在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液可包含50至約200 mM牛磺酸及0.2至1.5% PEG (例如PEG 6000)。在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液可包含Bis-Tris及包含Triton-X100、聚山梨醇酯80及TNBP之溶劑/洗滌劑混合物。在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液可包含包含鹽(例如NaCl)之基於甘胺酸的緩衝液、基於檸檬酸鈉的緩衝液或基於精胺酸-HCl的緩衝液。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可為包含乙二醇及/或NaCl之基於Tris的緩衝液、包含NaCl之基於牛磺酸的緩衝液或基於精胺酸-HCl的緩衝液。或者，山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、蔗糖或海藻糖中之一或多者可與乙二醇結合使用或代替乙二醇。在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液可包含乙酸鈉及聚山梨醇酯80。

【0109】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約10至約

500 mM之TrisHCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約10至約400 mM、約10至約300 mM、約10至約200 mM、約15至約175 mM、約20至約150 mM、約25至約125 mM、約25至約100 mM、約30至約90 mM、約35至約75 mM或約40至約60 mM TrisHCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約10至約15 mM；約10至約30 mM；約15至約20 mM；約20至約25 mM；約25至約30 mM；約30至約35 mM；約35至約40 mM；約40至約45 mM；約40至約50 mM；約45至約50 mM；約50至約55 mM；約55至約60 mM；約60至約65 mM；約65至約70 mM；約70至約75 mM；約75至約80 mM、約80至約90 mM；約90至約100 mM；約100至約110 mM；約110至約120 mM；約120至約130 mM；約130至約140 mM；約140至約150 mM；約150至約160 mM；約160至約170 mM；約170至約180 mM；約180至約190 mM；或約190至約200 mM TrisHCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM或50 mM TrisHCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約20 mM或20 mM TrisHCl。

【0110】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約25 mM、約50 mM、約75 mM、約100 mM、約125 mM、約150 mM、約175 mM、約200 mM、約225 mM、約250 mM、約275 mM、約300 mM、約325 mM、約350 mM、約375 mM、約400 mM、約425 mM、約450 mM、約475 mM、約500 mM、約525 mM、約550 mM、約575 mM、約600 mM、約625 mM、約650 mM、約675 mM、約700 mM、約725 mM、約750 mM、約775 mM、約800 mM、約825 mM、約850 mM、約875 mM、約900 mM、約925 mM、約950 mM、約975 mM、約

1000 mM、約1025 mM、約1050 mM、約1075 mM、約1100 mM、約1125 mM、約1150 mM、約1175 mM、約1200 mM、約1225 mM、約1250 mM、約1275 mM、約1300 mM、約1325 mM、約1350 mM、約1375 mM、約1400 mM、約1425 mM、約1450 mM、約1475 mM、約1500 mM、約1525 mM、約1550 mM、約1575 mM、約1600 mM、約1625 mM、約1650 mM、約1675 mM、約1700 mM、約1725 mM、約1750 mM、約1775 mM、約1800 mM、約1825 mM、約1850 mM、約1875 mM、約1900 mM、約1925 mM、約1950 mM、約1975 mM或約2000 mM TrisHCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM或50 mM TrisHCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約20 mM或20 mM TrisHCl。

【0111】在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約50至約500 mM鹽。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約55至約400 mM、約60至約350 mM、約70至約300 mM、約75至約250 mM、約80至約200 mM、約90至約175 mM或約100至約150 mM鹽。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約75至約100 mM；約100至約125 mM；約125至約150 mM；約150至約175 mM；約175至約200 mM；約200至約225 mM；或約225至約250 mM鹽。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可包含約150 mM或150 mM鹽。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可包含約125 mM或125 mM鹽。

【0112】在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約50至約500 mM NaCl。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝

衝液可進一步包含約55至約400 mM、約60至約350 mM、約70至約300 mM、約75至約250 mM、約80至約200 mM、約90至約175 mM或約100至約150 mM NaCl。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約75至約100 mM；約100至約125 mM；約125至約150 mM；約150至約175 mM；約175至約200 mM；約200至約225 mM；或約225至約250 mM NaCl。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可包含約150 mM或150 mM NaCl。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可包含約125 mM或125 mM NaCl。

【0113】在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約10至約75% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約20至約72%、約25%至約70、約30至約65%或約40%至約60% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約30至約35%；35至約40%；約40至約45%；約45至約50%；約48至約52%；約50至約55%；約55至約60%；約60至約65%；約65至約70%；或約70至約75% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50%或50% (w/w)乙二醇。

【0114】在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含有機溶劑或清潔劑。在一些實施例中，該有機溶劑或清潔劑為聚山梨醇酯80 (例如Tween 80或Crillet)。在某些實施例中，聚山梨醇酯80可為約0.0005至約5%、約0.0005至約1%、約0.001至約4%、約0.001至約0.1%、約0.001至約0.05%、約0.005至約3%、約0.01至約2.5%、約0.05至約5%、約0.05至約2%、0.05至約0.2%或約0.1至約1.5% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可包含約0.05至

約0.08%；約0.08至約0.11%；約0.11至約0.14%；約0.14至約0.17%；或約0.17至約0.20% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可包含約0.1%或0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可包含約0.005%或0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液可包含約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。

【0115】在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約7.5至約7.7；約7.7至約7.9；約7.9至約8.1；約8.1至約8.3；約8.3至約8.5；約8.5至約8.7；約8.7至約8.9；或約8.9至約9.2。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約7.4或7.4。在某些實施例中，TrisHCl洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約8.5或8.5。

【0116】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及125 mM鹽。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝

液之pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8。在某些實施例中，該緩衝液之pH為約8.5或為8.5。

【0117】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約10至約75% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約25 mM至約100 mM TrisHCl及約25%至約70% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約40 mM至約60 mM TrisHCl及約40%至約60% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及50% (w/w)乙二醇。約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約8.5或為8.5。

【0118】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約1至約200 mM TrisHCl、約50至約500 mM鹽及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約5至約50 mM TrisHCl、約75至約250 mM鹽及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約10 mM至約30 mM TrisHCl、約140 mM至約160 mM鹽及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約20 mM TrisHCl、約150 mM鹽及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約20 mM TrisHCl、150 mM鹽及0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙 酸 鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽

為NaCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約6.0至約8.8、約6.5至約8.5或約7.0至約8.0。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約7.4或7.4。

【0119】在某些實施例中，該TrisHCl緩衝液為第一洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，該TrisHCl緩衝液為第一洗滌緩衝液及第三洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，該TrisHCl緩衝液為第二洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，該TrisHCl緩衝液為第二洗滌緩衝液及第四洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，該TrisHCl緩衝液為第二洗滌緩衝液，但不為溶離緩衝液。在某些實施例中，TrisHCl緩衝液為第二洗滌緩衝液及第四洗滌緩衝液，但不為溶離緩衝液。可使用約5個管柱體積或5個管柱體積之各洗滌緩衝液。可使用約10個管柱體積或10個管柱體積之各洗滌緩衝液。可使用約5個管柱體積或5個管柱體積之溶離緩衝液。可使用約10個管柱體積或10個管柱體積之溶離緩衝液。

【0120】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約20至約1000 mM、約30至約750 mM、約40至約500 mM、約50至約200 mM、約75至約175 mM、約80至約150 mM、約85至約125 mM或約90至約110 mM乙酸鈉。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約75 mM；約75至約100 mM；約90至約110 mM；約100至約125 mM；約125至約150 mM；約150至約175 mM；約175至約200 mM；約200至約250 mM；約250至約300 mM；約300至約350 mM；約350至約400 mM；約400至約450 mM；約450至約500 mM；約500至約550 mM；約550至約600 mM；約600至約650 mM；約650至約700 mM；約700至約

750 mM；約750至約800 mM；約800至約850 mM；約850至約900 mM；約900至約950 mM；約950至約1000 mM；約1000至約1050 mM；約1050至約1100 mM；約1100至約1150 mM；約1150至約1200 mM；約1200至約1250 mM；約1250至約1300 mM；約1300至約1350 mM；約1350至約1400 mM；約1400至約1450 mM；約1450至約1500 mM；約1500至約1550 mM；約1550至約1600 mM；約1600至約1650 mM；約1650至約1700 mM；約1700至約1750 mM；約1750至約1800 mM；約1800至約1850 mM；約1850至約1900 mM；約1900至約1950 mM；或約1950至約2000 mM乙酸鈉。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約100 mM或100 mM乙酸鈉。

【0121】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約25 mM、約50 mM、約75 mM、約100 mM、約125 mM、約150 mM、約175 mM、約200 mM、約225 mM、約250 mM、約275 mM、約300 mM、約325 mM、約350 mM、約375 mM、約400 mM、約425 mM、約450 mM、約475 mM、約500 mM、約525 mM、約550 mM、約575 mM、約600 mM、約625 mM、約650 mM、約675 mM、約700 mM、約725 mM、約750 mM、約775 mM、約800 mM、約825 mM、約850 mM、約875 mM、約900 mM、約925 mM、約950 mM、約975 mM、約1000 mM、約1025 mM、約1050 mM、約1075 mM、約1100 mM、約1125 mM、約1150 mM、約1175 mM、約1200 mM、約1225 mM、約1250 mM、約1275 mM、約1300 mM、約1325 mM、約1350 mM、約1375 mM、約1400 mM、約1425 mM、約1450 mM、約1475 mM、約1500 mM、約1525 mM、約1550 mM、約1575 mM、約1600 mM、約

1625 mM、約1650 mM、約1675 mM、約1700 mM、約1725 mM、約1750 mM、約1775 mM、約1800 mM、約1825 mM、約1850 mM、約1875 mM、約1900 mM、約1925 mM、約1950 mM、約1975 mM或約2000 mM乙酸鈉。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約100 mM或100 mM乙酸鈉。

【0122】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約80 mM；約70至約100 mM；約80至約110 mM；約90至約120 mM；約100至約130 mM；約120至約150 mM；約140至約170 mM；約170至約200 mM乙酸鈉。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約60；約70 mM；約80 mM；約90 mM；約100 mM；約110 mM；約120 mM；約130 mM；約140 mM；約150 mM；或約160 mM乙酸鈉。

【0123】在某些實施例中，乙酸鈉洗滌及/或溶離緩衝液可進一步含有機溶劑或清潔劑。在一些實施例中，該有機溶劑或清潔劑為聚山梨醇酯80 (例如Tween 80或Crillet)。在某些實施例中，聚山梨醇酯80可為約0.0005至約5%、約0.0005至約1%、約0.001至約4%、約0.001至約0.1%、約0.001至約0.05%、約0.005至約3%、約0.01至約2.5%、約0.05至約5%、約0.05至約2%、0.05至約0.2%或約0.1至約1.5% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，乙酸鈉緩衝液可包含約0.05至約0.08%；約0.08至約0.11%；約0.11至約0.14%；約0.14至約0.17%；或約0.17至約0.20% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，乙酸鈉緩衝液可包含約0.1%或0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，乙酸鈉緩衝液可包含約0.005%或0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，乙酸鈉緩

衝液可包含約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。

【0124】在某些實施例中，乙酸鈉洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6.5。在某些實施例中，乙酸鈉洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約5.2至約5.5；約5.5至約5.8；約5.8至約6.1；約6.1至約6.4；或約6.4至約6.8。在某些實施例中，乙酸鈉洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約6.0或為6.0。

【0125】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6.5。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約6.0或6.0。

【0126】在某些實施例中，該乙酸鈉緩衝液為第一洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，該乙酸鈉緩衝液為第一洗滌緩衝液及第三洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，該乙酸鈉緩衝液為第二洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，該乙酸鈉緩衝液為第二洗滌緩衝液及第四洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，該乙酸鈉緩衝液為第二洗滌緩衝液但不為溶離緩衝液。在某些實施例中，該乙酸鈉緩衝液為第二及第四洗滌緩衝液，但不為溶離緩衝液。

【0127】可使用約5個管柱體積或5個管柱體積之各乙酸鈉洗滌緩衝液。可使用約10個管柱體積或10個管柱體積之各乙酸鈉洗滌緩衝液。可使用約5個管柱體積或5個管柱體積之溶離乙酸鈉緩衝液。可使用約10個管柱體積或10個管柱體積之溶離緩衝液乙酸鈉。

【0128】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約10至約500 mM之甘胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約10至約400 mM、約10至約300 mM、約10至約200 mM、約15至約175 mM、約20至約150 mM、約25至約125 mM、約25至約100 mM、約30至約90 mM、約35至約75 mM或約40至約60 mM甘胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約30至約35 mM；約35至約40 mM；約40至約45 mM；約45至約50 mM；約50至約55 mM；約55至約60 mM；約60至約65 mM；約65至約70 mM；約70至約75 mM；約75至約80 mM、約80至約90 mM；約90至約100 mM；約100至約110 mM；約110至約120 mM；約120至約130 mM；約130至約140 mM；約140至約150 mM；約150至約160 mM；約160至約170 mM；約170至約180 mM；約180至約190 mM；或約190至約200 mM甘胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM或50 mM甘胺酸。

【0129】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約25 mM、約50 mM、約75 mM、約100 mM、約125 mM、約150 mM、約175 mM、約200 mM、約225 mM、約250 mM、約275 mM、約300 mM、約325 mM、約350 mM、約375 mM、約400 mM、約425 mM、約450 mM、約475 mM、約500 mM、約525 mM、約550 mM、約575 mM、約600 mM、約625 mM、約650 mM、約675 mM、約700 mM、約

725 mM、約750 mM、約775 mM、約800 mM、約825 mM、約850 mM、約875 mM、約900 mM、約925 mM、約950 mM、約975 mM、約1000 mM、約1025 mM、約1050 mM、約1075 mM、約1100 mM、約1125 mM、約1150 mM、約1175 mM、約1200 mM、約1225 mM、約1250 mM、約1275 mM、約1300 mM、約1325 mM、約1350 mM、約1375 mM、約1400 mM、約1425 mM、約1450 mM、約1475 mM、約1500 mM、約1525 mM、約1550 mM、約1575 mM、約1600 mM、約1625 mM、約1650 mM、約1675 mM、約1700 mM、約1725 mM、約1750 mM、約1775 mM、約1800 mM、約1825 mM、約1850 mM、約1875 mM、約1900 mM、約1925 mM、約1950 mM、約1975 mM或約2000 mM甘胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM或50 mM甘胺酸。

【0130】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約1至約300 mM之組胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約1至約250 mM、約1至約200 mM、約1至約100 mM、約1.5至約175 mM、約2.0至約150 mM、約2.5至約125 mM、約2.5至約100 mM、約3.0至約90 mM、約3.5至約75 mM或約4.0至約60 mM、約5.0至約50 mM、約6.0至約40 mM、約7.0至約30 mM、約8.0至約20 mM、約9.0至約15 mM組胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液包含約3.0至約3.5 mM；約3.5至約4.0 mM；約4.0至約4.5 mM；約4.5至約5.0 mM；約5.0至約5.5 mM；約5.5至約6.0 mM；約6.0至約6.5 mM；約6.5至約7.0 mM；約7.0至約7.5 mM；約7.5至約8.0 mM、約8.0至約9.0 mM；約9.0至約10.0 mM；約10.0至約11.0 mM；約11.0至約12.0 mM；約12.0至約13.0 mM；

約13.0至約14.0 mM；約14.0至約15.0 mM；約15.0至約16.0 mM；約16.0至約17.0 mM；約17.0至約18.0 mM；約18.0至約19.0 mM；或約19.0至約20.0 mM組胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約10 mM或10 mM組胺酸。

【0131】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約2.5 mM、約5.0 mM、約7.5 mM、約10.0 mM、約12.5 mM、約15.0 mM、約17.5 mM、約20.0 mM、約22.5 mM、約25.0 mM、約27.5 mM、約30.0 mM、約32.5 mM、約35.0 mM、約37.5 mM、約40.0 mM、約42.5 mM、約45.0 mM、約47.5 mM、約50.0 mM、約52.5 mM、約55.0 mM、約57.5 mM、約60.0 mM、約62.5 mM、約65.0 mM、約67.5 mM、約70.0 mM、約72.5 mM、約75.0 mM、約77.5 mM、約80.0 mM、約82.5 mM、約85.0 mM、約87.5 mM、約90.0 mM、約92.5 mM、約95.0 mM、約97.5 mM、約100.0 mM、約102.5 mM、約105.0 mM、約107.5 mM、約110.0 mM、約112.5 mM、約115.0 mM、約117.5 mM、約120.0 mM、約122.5 mM、約125.0 mM、約127.5 mM、約130.0 mM、約132.5 mM、約135.0 mM、約137.5 mM、約140.0 mM、約142.5 mM、約145.0 mM、約147.5 mM、約150.0 mM、約152.5 mM、約155.0 mM、約157.5 mM、約160.0 mM、約162.5 mM、約165.0 mM、約167.5 mM、約170.0 mM、約172.5 mM、約175.0 mM、約177.5 mM、約180.0 mM、約182.5 mM、約185.0 mM、約187.5 mM、約190.0 mM、約192.5 mM、約195.0 mM、約197.5 mM或約200.0 mM組胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約10 mM或10 mM組胺酸。

【0132】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約

1至約75% (w/w)海藻糖。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約2至約50%、約2.5%至約25%、約3.0至約20%或約4.0%至約10% (w/w)海藻糖。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含約3.0至約3.5%；3.5至約4.0%；約4.0至約4.5%；約4.5至約5.0%；約4.8至約5.2%；約5.0至約5.5%；約5.5至約6.0%；約6.0至約6.5%；約6.5至約7.0%；或約7.0至約7.5%；約7.5至約8.0%；約8.0至約8.5%；約8.5至約9.0%；約9.0至約9.5%；約9.5至約10%；約10至約15%；約15至約20%；約20至約25%；約25至約30%；約30至約35%；約35至約40%；約40至約45%；約45至約50%；約50至約55%；約55至約60%；約60至約65%；約65至約70%；約70至約75% (w/w)海藻糖。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約5.0%或5.0% (w/w)海藻糖。

【0133】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可進一步包含有機溶劑或清潔劑。在一些實施例中，該有機溶劑或清潔劑為聚山梨醇酯80 (例如Tween 80或Crillet)。在某些實施例中，聚山梨醇酯80可為約0.0005至約5%、約0.0005至約1%、約0.0006至約4%、約0.0007至約0.1%、約0.0008至約0.05%、約0.0009至約3%、約0.001至約2.5%、約0.002至約5%、約0.003至約2%或0.004至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約0.05至約0.08%；約0.08至約0.11%；約0.11至約0.14%；約0.14至約0.17%；或約0.17至約0.20% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約0.1%或0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，聚山梨醇酯80可包含約0.005%或0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，聚山梨醇酯80為0.005%。

【0134】在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約5.0至約9.0、約5.5至約8.0或約6.0至約7.5。在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約5.2至約5.5；約5.5至約5.8；約5.8至約6.1；約6.1至約6.4；約6.4至約6.8；約6.8至約7.0；約7.0至約7.2；約7.2至約7.4；約7.4至約7.8；約7.8至約8.0；約8.0至約8.2；約8.2至約8.4；約8.4至約8.6；約8.6至約8.8；或約8.8至約9.0。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約7.0或7.0。

【0135】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約10至約200 mM甘胺酸、約1至約100 mM組胺酸、約20至約500 mM鹽、約1至約10%海藻糖及約0.0005至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約30至約80 mM甘胺酸、約5至約20 mM組胺酸、約50至約200 mM鹽、約3至約8%海藻糖及約0.001至約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約40至約60 mM甘胺酸、約5至約15 mM組胺酸、約90至約110 mM鹽、約4至約6%海藻糖及約0.001至約0.05% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM甘胺酸、約10 mM組胺酸、約100 mM鹽、約5%海藻糖及約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、100 mM鹽、5%海藻糖及0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸钠(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該緩衝液之pH為約6.0至約8.0、約6.5至約7.5或約7.0至約7.4。在某些實施例中，該緩衝液之pH

為約7.0至約7.4。

【0136】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約10至約200 mM甘胺酸、約1至約100 mM組胺酸、約20至約500 mM NaCl、約1至約10%海藻糖及約0.0005至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約30至約80 mM甘胺酸、約5至約20 mM組胺酸、約50至約200 mM NaCl、約3至約8%海藻糖及約0.001至約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約40至約60 mM甘胺酸、約5至約15 mM組胺酸、約90至約110 mM NaCl、約4至約6%海藻糖及約0.001至約0.05% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM甘胺酸、約10 mM組胺酸、約100 mM NaCl、約5%海藻糖及約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、100 mM NaCl、5%海藻糖及0.005% (w/w)聚山梨醇酯80。7.5或約7.0至約7.4。在某些實施例中，該緩衝液之pH為約7.0至約7.4。

【0137】在某些實施例中，甘胺酸緩衝液為第一洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，甘胺酸緩衝液為第一洗滌緩衝液及第三洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，甘胺酸緩衝液為第二洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，甘胺酸緩衝液為第二洗滌緩衝液及第四洗滌緩衝液及溶離緩衝液。在某些實施例中，甘胺酸緩衝液為第二洗滌緩衝液，但不為溶離緩衝液。在某些實施例中，甘胺酸緩衝液為第二洗滌緩衝液及第四洗滌緩衝液，但不為溶離緩衝液。

【0138】可使用約5個管柱體積或5個管柱體積之各甘胺酸洗滌緩衝

液。可使用約10個管柱體積或10個管柱體積之各甘胺酸洗滌緩衝液。可使用約5個管柱體積或5個管柱體積之甘胺酸溶離緩衝液。可使用約10個管柱體積或10個管柱體積之甘胺酸洗滌緩衝液。

【0139】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約500 mM 2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES-Na)之鈉鹽、約3至約30 mM EDTA及包含聚山梨醇酯80、DMSO及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)之溶劑/清潔劑混合物。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約75 mM；約75至約100 mM；約90至約110 mM；約100至約125 mM；約125至約150 mM；約150至約175 mM；約175至約200 mM；約200至約250 mM；約250至約300 mM；約300至約350 mM；約350至約400 mM；約400至約450 mM；或約450至約500 mM MES-Na之鈉鹽。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM；約75 mM；約90 mM；約100 mM；約125 mM；約150 mM；約175 mM；約200 mM；約250 mM；約300 mM；約350 mM；約400 mM；約450 mM；或約500 mM MES-Na之鈉鹽。

【0140】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約200 mM牛磺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約75 mM；約75至約100 mM；約90至約110 mM；約100至約125 mM；約125至約150 mM；約150至約175 mM；約175至約200 mM牛磺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM；約75 mM；約90 mM；約100 mM；約125 mM；約150 mM；約175 mM；約200 mM牛磺酸。

【0141】在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約80至約400 mM Bis-Tris。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約80至約100 mM；約90至約110 mM；約100至約125 mM；約125至約150 mM；約150至約175 mM；約175至約200 mM；約200至約250 mM；約250至約300 mM；約300至約350 mM；約350至約400 mM Bis-Tris。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM；約75 mM；約90 mM；約100 mM；約125 mM；約150 mM；約175 mM；約200 mM；約250 mM；約300 mM；約350 mM；約400 mM Bis-Tris。

【0142】該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約30至約35 mM；約35至約40 mM；約40至約45 mM；約45至約50 mM；約50至約55 mM；約55至約60 mM；約60至約65 mM；約65至約70 mM；約70至約75 mM；或約75至約80 mM精胺酸-HCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM或50 mM精胺酸-HCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約75至約100 mM；約100至約125 mM；約125至約150 mM；約150至約175 mM；約175至約200 mM；約200至約225 mM；或約225至約250 mM NaCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約150 mM或150 mM NaCl。在某些實施例中，該第二緩衝液之pH可為約7.5至約7.7；約7.7至約7.9；約7.9至約8.1；約8.1至約8.3；約8.3至約8.5；約8.5至約8.7；約8.7至約8.9；或約8.9至約9.2。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約8.5或8.5。

【0143】該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約200 mM甘胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約100 mM；約70

至約120 mM；約100至約150 mM；約120至約170 mM；約150至約200 mM甘胺酸。在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約7.5至約7.7；約7.7至約7.9；約7.9至約8.1；約8.1至約8.3；約8.3至約8.5；約8.5至約8.7；約8.7至約8.9；或約8.9至約9.2。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約8.5或8.5。

【0144】該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約20 mM檸檬酸鈉。在某些實施例中，該第二緩衝液可包含約5至約10 mM；約7至約12 mM；約10至約15 mM；約12至約17 mM；約15至約20 mM檸檬酸鈉。在某些實施例中，洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約7.5至約7.7；約7.7至約7.9；約7.9至約8.1；約8.1至約8.3；約8.3至約8.5；約8.5至約8.7；約8.7至約8.9；或約8.9至約9.2。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約8.5或8.5。

【0145】該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約20至約100 mM組胺酸及約75至約250 mM NaCl，其pH為約7.5至約8.8。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約20至約40 mM；約40至約60 mM；約60至約75 mM；或約75至約100 mM組胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約20 mM或20 mM組胺酸。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約75至約100 mM；約100至約125 mM；約125至約150 mM；約150至約175 mM；約175至約200 mM；約200至約225 mM NaCl；或約225至約250 mM NaCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約150 mM或150 mM NaCl。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之pH可為約7.5至約7.9；約7.8至約8.2；約8.1至約8.5；約8.4至約8.9；或約8.6至約9.0。在某些實施例中，該洗滌及/或溶離緩衝液之

pH可為約8.0或8.0。

【0146】該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約30至約200 mM TrisHCl及約30至約75% (w/w)乙二醇，其pH為約7.5至約9.2。該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約20至約80 mM精胺酸-HCl及約50至約200 mM鹽，其pH為約7.3至約8.8。該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，其pH為約8.5。該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約20至約150 mM牛磺酸、約30至約75% (w/w)乙二醇及0.05至0.2% (w/w)辛基吡喃葡萄糖苷，其pH為約7.3至約8.8。該洗滌及/或溶離緩衝液可包含約50至約200 mM精胺酸-HCl、約50至約200 mM離胺酸HCl、約50至約200 mM組胺酸-HCl及約1mM至約4 mM N-乙醯基-D,L-色胺酸及約10%至約40% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約7.3至約8.8。在某些實施例中，若鹽，例如NaCl存在於洗滌及/或溶離緩衝液中，則在某些實施例中，鹽之濃度不超過500 mM且在某些實施例中，鹽之濃度不超過200 mM。在某些實施例中，該鹽為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、檸檬酸鈉、LiCl、CsCl、乙酸鈉，或NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、檸檬酸鈉、LiCl、CsCl及乙酸鈉中之一或多者的組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、蔗糖或海藻糖中之一或多者可與乙二醇結合使用或代替乙二醇。

【0147】在某些實施例中，第一洗滌步驟使用第一緩衝液，其可為基於TrisHCl之緩衝液。在某些實施例中，第一洗滌步驟使用第一緩衝液，其可為基於乙酸鈉(sodium acetate/NaAcetate)之緩衝液。在某些實施例中，第一洗滌步驟使用第一緩衝液，該第一緩衝液包含2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES-Na)之鈉鹽、EDTA及包含聚山梨醇酯80、DMSO及磷酸三(正

丁基)酯(TNBP)之溶劑/清潔劑混合物。在某些實施例中，第一洗滌步驟使用第一緩衝液，該第一緩衝液包含50至約200 mM牛磺酸及0.2至1.5% PEG (例如PEG 6000)。在某些實施例中，第一洗滌步驟使用第一緩衝液，該第一緩衝液包含Bis-Tris及包含Triton-X100、聚山梨醇酯80及TNBP之溶劑/洗滌劑混合物。在某些實施例中，第一洗滌步驟使用第一緩衝液，該第一緩衝液包含乙酸钠及聚山梨醇酯80。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，第一洗滌步驟使用第一緩衝液，其可為包含NaCl之基於TrisHCl的緩衝液。

【0148】 在某些實施例中，該第二洗滌步驟使用第二緩衝液，其可為基於TrisHCl之緩衝液。在某些實施例中，該第二洗滌步驟使用第二緩衝液，其可為基於乙酸钠(sodium acetate/NaAcetate)之緩衝液。在某些實施例中，該第二洗滌步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES-Na)之鈉鹽、EDTA及包含聚山梨醇酯80、DMSO及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)之溶劑/清潔劑混合物。在某些實施例中，該第二洗滌步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含約50至約200 mM牛磺酸及0.2至1.5% PEG (例如PEG 6000)。在某些實施例中，該第二洗滌步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含Bis-Tris及包含Triton-X100、聚山梨醇酯80及TNBP之溶劑/洗滌劑混合物。在某些實施例中，該第二洗滌步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含乙酸钠及聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該第二洗滌步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含TrisHCl及NaCl緩衝液。

【0149】 在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施

例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含或約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0150】在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0151】在某些實施例中，使用至少兩種洗滌緩衝液。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯

80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0152】在某些實施例中，使用至少兩種洗滌緩衝液。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0153】在某些實施例中，使用至少兩種洗滌緩衝液。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約90至約100 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0154】在某些實施例中，使用至少兩種洗滌緩衝液。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含或約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，至少一種洗滌緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0155】在一些實施例中，進行至少三個洗滌步驟；其中至少一種洗滌緩衝液包含約50至約2000 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，且pH為約5.2至約6.8；至少一種洗滌緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約75至約500 mM鹽，且pH為約7.5至約9.2；且至少一種洗滌緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約30至約75% (w/w)乙二醇，且pH為約7.3至約8.8。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0156】在一些實施例中，進行至少三個洗滌步驟。在一些實施例中，至少一種緩衝液包含約100 mM乙酸鈉、約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且pH為約6.0。在一些實施例中，至少一種緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM NaCl，且pH為約8.5。在一些實施例中，至少一種

緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，且pH為約8.5。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0157】在一些實施例中，進行至少三個洗滌步驟；其中第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約2000 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約75至約500 mM鹽，且其中該第二緩衝液之pH為約7.5至約9.2；且第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約30至約75% (w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約7.3至約8.8。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0158】在一些實施例中，該方法進一步包含在該第一洗滌步驟之前發生的第四洗滌步驟且包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約10至約30 mM TrisHCl及約75至約250 mM NaCl，且其中該第四緩衝液之pH為約6.5至約8.0。

【0159】在一些實施例中，進行至少三個洗滌步驟；其中該第一緩衝液包含約100 mM乙酸鈉、約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第一緩衝液之pH為約6.0。在一些實施例中，該第二緩衝液包含約50 mM

TrisHCl及約125 mM NaCl，且其中該第二緩衝液之pH為約8.5。在一些實施例中，該第三緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約8.5。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0160】 在一些實施例中，進行至少三個洗滌步驟；第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約200 mM 乙酸钠及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第一緩衝液之pH為約5.5至約6.5；第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約10至約70 mM TrisHCl及約75至約250 mM NaCl，且其中該第二緩衝液之pH為約8.0至約9.0；且第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約10至約70 mM TrisHCl及約30至約75% (w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約8.0至約9.0。在一些實施例中，該方法進一步包含在該第一洗滌步驟之前發生的第四洗滌步驟且包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約10至約30 mM TrisHCl及約75至約250 mM NaCl，且其中該第四緩衝液之pH為約6.5至約8.0。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0161】 在一些實施例中，進行至少三個洗滌步驟；第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約200 mM 乙酸钠及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第一緩衝液之pH為約5.5至約6.5；第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約10至約70 mM TrisHCl及約75至約250 mM NaCl，且其

中該第二緩衝液之pH為約8.0至約9.0；且第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約10至約70 mM TrisHCl及約30至約75% (w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約8.0至約9.0。在一些實施例中，該方法進一步包含在該第一洗滌步驟之前發生的第四洗滌步驟且包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約10至約30 mM TrisHCl及約75至約250 mM NaCl，且其中該第四緩衝液之pH為約6.5至約8.0。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0162】 在一些實施例中，該第一緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第一緩衝液之pH為約6.0。在一些實施例中，該第二緩衝液包含約50mM TrisHCl及約125 mM NaCl，且其中該第二緩衝液之pH為約8.5。在一些實施例中，該第三緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約8.0。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0163】 在又更多實施例中，進行至少三個洗滌步驟；第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約500 mM 2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES-Na)之鈉鹽、約3至約30 mM EDTA及包含聚山梨醇酯80、DMSO及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)之溶劑/清潔劑混合物，且其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl或精胺酸-HCl及約75至約500 mM鹽，且其中該第二緩衝液之pH為約7.5至約9.2；且第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝

液包含約20至約80 mM精胺酸-HCl及約50至約60% (w/w)蔗糖，且其中該第三緩衝液之pH為約7.3至約8.8。在一些實施例中，該鹽選自NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、檸檬酸鈉、LiCl、CsCl、乙酸鈉，及NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、檸檬酸鈉、LiCl、CsCl及乙酸鈉中之一或多者的組合。在一些實施例中，該鹽為NaCl。在一些實施例中，該鹽之濃度不超過500 mM。在一些實施例中，該鹽之濃度不超過200 mM。在一些實施例中，該第三緩衝液中之鹽的濃度不超過500 mM。在一些實施例中，該第三緩衝液中之鹽的濃度不超過200 mM。在一些實施例中，該方法進一步包含在該第一洗滌步驟之前發生的第四洗滌步驟且包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約20至約100 mM精胺酸-HCl及約75至約250 mM NaCl，且其中該第四緩衝液之pH為約7.5至約8.8。此等洗滌步驟中之一或多者或甚至所有此等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。

【0164】 在一些實施例中，該方法進一步包含在該第一溶離步驟之後且在第二溶離步驟之前進行的洗滌步驟，該洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第五緩衝液，該第五緩衝液包含約20至約100 mM精胺酸-HCl及約75至約250 mM NaCl，且其中該第五緩衝液之pH為約7.5至約8.5。在一些實施例中，該第二溶離步驟包含向該親和樹脂施加第二溶離緩衝液，該第二溶離緩衝液包含約20至約100 mM精胺酸-HCl、約40至約60% (w/w)丙三醇及約500至1000 mM鹽(例如，NaCl)，且其中該第二溶離緩衝液之pH為約7.5至約8.5。

【0165】 額外洗滌步驟可有效使第一溶離步驟與第二溶離步驟之間的正面作用降至最低，例如提供僅由第一溶離緩衝液及第二溶離緩衝液本

身觸發的溶離且不來自可由第一溶離緩衝液與第二溶離緩衝液之混合物產生的正面作用。在一些實施例中，該方法進一步包含在該第五洗滌步驟及該第二溶離步驟之後進行的第六洗滌步驟，該洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第六緩衝液，該第六緩衝液包含約20至約100 mM精胺酸-HCl及約75至約250 mM NaCl，且其中該第五緩衝液之pH為約7.5至約8.5。

【0166】在一些實施例中，進行至少三個洗滌步驟；第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約80至約400 mM Bis-Tris及約10至約20公克之包含以約11:3:3 (按重量計)之比率的Triton-X100、聚山梨醇酯80及TNBP之溶劑/洗滌劑混合物，且其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約5至約20 mmol檸檬酸鈉，且其中該第二緩衝液之pH為約7.5至約9.2；且第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約50至約200 mM精胺酸-HCl、約50至約200 mM 離胺酸HCl、約50至約200 mM組胺酸-HCl、約1mM至約4 mM N-乙醯基-D,L-色胺酸及約10%至約40% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第三緩衝液之pH為約7.3至約8.8。

【0167】在某些實施例中，該第一溶離步驟使用第一緩衝液，其可為基於TrisHCl之緩衝液。在某些實施例中，該第一溶離步驟使用第一緩衝液，其可為基於乙酸鈉(sodium acetate/NaAcetate)之緩衝液。在某些實施例中，該第一溶離步驟使用第一緩衝液，該第一緩衝液包含2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES-Na)之鈉鹽、EDTA及包含聚山梨醇酯80、DMSO及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)之溶劑/清潔劑混合物。在某些實施例中，該第一溶離步驟使用第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約200 mM牛磺酸及0.2

至1.5% PEG (例如PEG 6000)。在某些實施例中，該第一溶離步驟使用第一緩衝液，該第一緩衝液包含Bis-Tris及包含Triton-X100、聚山梨醇酯80及TNBP之溶劑/洗滌劑混合物。在某些實施例中，該第一溶離步驟使用第一緩衝液，該第一緩衝液包含乙酸鈉及聚山梨醇酯80。此等溶離步驟中之一或多者或甚至所有此等溶離步驟在室溫下進行。在某些實施例中，該第一溶離步驟使用第一緩衝液，其可為包含NaCl之基於TrisHCl的緩衝液。

【0168】在某些實施例中，該第二溶離步驟使用第二緩衝液，其可為基於TrisHCl之緩衝液。在某些實施例中，該第二溶離步驟使用第二緩衝液，其可為基於乙酸鈉(sodium acetate/NaAcetate)之緩衝液。在某些實施例中，該第二溶離步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES-Na)之鈉鹽、EDTA及包含聚山梨醇酯80、DMSO及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)之溶劑/清潔劑混合物。在某些實施例中，該第二溶離步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含約50至約200 mM牛磺酸及0.2至1.5% PEG (例如PEG 6000)。在某些實施例中，該第二溶離步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含Bis-Tris及包含Triton-X100、聚山梨醇酯80及TNBP之溶劑/洗滌劑混合物。在某些實施例中，該第二溶離步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含乙酸鈉及聚山梨醇酯80。在某些實施例中，該第二溶離步驟使用第二緩衝液，該第二緩衝液包含TrisHCl及NaCl緩衝液。

【0169】在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝

液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含或約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0170】在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0171】在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約10至約200 mM甘胺酸、約1至約100 mM組胺酸、約20至約500 mM鹽、約1至約10% (w/w)海藻糖及約0.0005至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0至約8.0。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約30 mM至約80 mM甘胺酸、約5至約20 mM組胺酸、約50至約200 mM鹽、約3至約8% (w/w)海藻糖及約0.001至約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.5至約7.5。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約40至約60 mM甘胺酸、約

5至約15 mM組胺酸、約90至約110 mM鹽、約4至約6% (w/w)海藻糖及約0.001至約0.05% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約7.0至約7.4。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約50 mM甘胺酸、約10 mM組胺酸、約100 mM鹽、約5% (w/w)海藻糖、約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約7.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙 酸 鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0172】在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約1至約200 mM TrisHCl、約50至約500 mM鹽及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0至約8.8。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約5至約50 mM TrisHCl、約75至約250 mM鹽及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.5至約8.5。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約10至約30 mM TrisHCl、約140至約160 mM鹽及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約7.0至約8.0。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約20 mM TrisHCl、約150 mM鹽及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約7.4。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙 酸 鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0173】在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約10至約200

mM TrisHCl及約10至約75% (w/w)乙二醇，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約25 mM至約100 mM TrisHCl及約25%至約70% (w/w)乙二醇，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約40 mM至約60 mM TrisHCl及約40%至約60% (w/w)乙二醇，其pH為約8.0至約8.8。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，其pH為約8.5。

【0174】在某些實施例中，使用至少兩種溶離緩衝液。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18℃(例如，在1℃與12℃之間或在2℃與8℃之間，如上文所論述)。

【0175】在某些實施例中，使用至少兩種溶離緩衝液。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例

中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C 與12°C 之間或在2°C 與8°C 之間，如上文所論述)。

【0176】在某些實施例中，使用至少兩種溶離緩衝液。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C 與12°C 之間或在2°C 與8°C 之間，如上文所論述)。

【0177】在某些實施例中，使用至少兩種溶離緩衝液。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含或約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，至少一種溶離緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C 與12°C 之間或在2°C 與8°C 之間，如上文所論述)。

【0178】在一些實施例中，進行至少三個溶離步驟；其中至少一種溶離緩衝液包含約50至約2000 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，且pH為約5.2至約6.8；至少一種溶離緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約75至約500 mM鹽，且pH為約7.5至約9.2；且至少一種

溶離緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約30至約75% (w/w)乙二醇，且pH為約7.3至約8.8。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0179】在一些實施例中，進行至少三個溶離步驟。在一些實施例中，至少一種緩衝液包含約100 mM乙酸鈉、約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且pH為約6.0。在一些實施例中，至少一種緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM NaCl，且pH為約8.5。在一些實施例中，至少一種緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，且pH為約8.5。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0180】在一些實施例中，進行至少三個溶離步驟；其中第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約2000 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；第二溶離步驟包含向該親和樹脂施加第二溶離緩衝液，該第二溶離緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約75至約500 mM鹽，且其中該第二緩衝液之pH為約7.5至約9.2；且第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約30至約75% (w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約7.3至約8.8。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、

K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0181】 在一些實施例中，該等溶離緩衝液中之至少一者之pH為約5.8至約6.2且包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.09至約0.11% (w/w)聚山梨醇酯80/Tween 80。在一些實施例中，該等溶離緩衝液中之至少一者之pH為約6.5至約7.5且包含約35至70 mM甘胺酸、5至15 mM組胺酸、50至200 mM NaCl、3至8%海藻糖及0.001至0.005% Crillet™ 4。在一些實施例中，該等溶離緩衝液中之至少一者之pH為約8.2至約8.8且包含約45至約55 mM TrisHCl及約90至約150 mM NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0182】 在一些實施例中，該第一溶離緩衝液之pH為約5.8至約6.2且包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.09至約0.11% (w/w)聚山梨醇酯80/Tween 80。在一些實施例中，該第二溶離緩衝液之pH為約6.5至約7.5且包含約35至70 mM甘胺酸、5至15 mM組胺酸、50至200 mM NaCl、3至8%海藻糖及0.001至0.005% Crillet™ 4。在一些實施例中，該第三溶離緩衝液之pH為約8.2至約8.8且包含約45至約55 mM TrisHCl及約90至約150 mM NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0183】 在一些實施例中，該第一溶離緩衝液之pH為約5.8至約6.2且包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.09至約0.11% (w/w)聚山梨醇酯80/Tween 80，該第二緩衝液之pH為約8.2至約8.8且包含約45至約55 mM

TrisHCl及約110至約135 mM NaCl，且該第三溶離緩衝液之pH為約8.2至約8.8且包含約45至約55 mM TrisHCl及約45至約55%乙二醇。在某些實施例中，存在視情況選用之第四緩衝液，其pH為約7.2至約7.6且包含約15至約25 mM TrisHCl及約135至約165 mM NaCl。在某些實施例中，該溶離緩衝液之pH為約7.8至約8.2且包含約45至約55 mM TrisHCl、約45至約55%乙二醇及約650至約850 mM NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0184】在一些實施例中，該等溶離緩衝液中之至少一者之pH為約7.2至約7.6且包含約15至約25 mM TrisHCl及約135至約165 mM NaCl。在一些實施例中，該等溶離緩衝液中之至少一者之pH為約5.8至約6.2且包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.09至約0.11% (w/w)聚山梨醇酯80。在一些實施例中，該等溶離緩衝液中之至少一者之pH為約8.2至約8.8且包含約45至約55 mM TrisHCl及約110至約135 mM NaCl。在一些實施例中，該等溶離緩衝液中之至少一者之pH為約7.5至約8.5且包含約45至約55 mM TrisHCl及約45至約55%乙二醇。在一些實施例中，該等溶離緩衝液中之至少一者之pH為約7.8至約8.2且包含約45至約55 mM TrisHCl、約45至約55%乙二醇及約650至約850 mM NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0185】在一些實施例中，該第一緩衝液之pH為約7.2至約7.6且包含約15至約25 mM TrisHCl及約135至約165 mM NaCl，該第二緩衝液之pH為約5.8至約6.2且包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.09至約0.11%

(w/w)聚山梨醇酯80，該第三緩衝液之pH為約8.2至約8.8且包含約45至約55 mM TrisHCl及約110至約135 mM NaCl，該第四緩衝液之pH為約7.5至約8.5且包含約45至約55 mM TrisHCl及約45至約55%乙二醇，且該第五溶離緩衝液之pH為約7.8至約8.2且包含約45至約55 mM TrisHCl、約45至約55%乙二醇及約650至約850 mM NaCl。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0186】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0187】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某

些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0188】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約8.8。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0189】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液可包含或約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0190】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例

中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0191】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0192】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約8.8。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0193】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含或為約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0194】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0195】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某

些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0196】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約8.8。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0197】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含或為約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8。在某些實施例中，該鹽可為

NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C 與12°C 之間或在2°C 與8°C 之間，如上文所論述)。

【0198】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液及該第四洗滌緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C 與12°C 之間或在2°C 與8°C 之間，如上文所論述)。

【0199】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液及該第四洗滌緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、

CsCl、乙酸鈉($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於 18°C (例如，在 1°C 與 12°C 之間或在 2°C 與 8°C 之間，如上文所論述)。

【0200】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液及該第四洗滌緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、 MgCl_2 、 CaCl_2 、LiCl、CsCl、乙酸鈉($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於 18°C (例如，在 1°C 與 12°C 之間或在 2°C 與 8°C 之間，如上文所論述)。

【0201】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含或為約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液及該第四洗滌緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、 MgCl_2 、 CaCl_2 、LiCl、CsCl、乙酸鈉($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施

例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0202】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0203】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0204】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0205】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該第

一溶離緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0206】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0207】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0208】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例

中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C 與12°C 之間或在2°C 與8°C 之間，如上文所論述)。

【0209】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C 與12°C 之間或在2°C 與8°C 之間，如上文所論述)。

【0210】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C (例如，在1°C 與12°C 之間或在2°C 與8°C 之間，如上文所論述)。

【0211】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在

某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0212】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0213】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液可包含或為約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些

實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0214】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.0至約7.4。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液及該第四洗滌緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，其pH為約7.5至約9.2。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉(C₂H₃NaO₂)、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、Na₂SO₄、K₂SO₄、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為NaCl。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0215】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約7.0。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液及該第四洗滌緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該鹽可為NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、LiCl、CsCl、乙酸鈉

($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為 NaCl 。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於 18°C (例如，在 1°C 與 12°C 之間或在 2°C 與 8°C 之間，如上文所論述)。

【0216】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約5.5至約6.5。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液及該第四洗滌緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽，其pH為約8.0至約9.0。在某些實施例中，該鹽可為 NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 LiCl 、 CsCl 、乙酸鈉($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為 NaCl 。在某些實施例中，該等洗滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於 18°C (例如，在 1°C 與 12°C 之間或在 2°C 與 8°C 之間，如上文所論述)。

【0217】在某些實施例中，該第一洗滌緩衝液及該第三洗滌緩衝液可包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，其pH為約6.0。在某些實施例中，該第二洗滌緩衝液及該第四洗滌緩衝液可包含或為約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，該第一溶離緩衝液可包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，其pH為約8.5。在某些實施例中，該鹽可為 NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 LiCl 、 CsCl 、乙酸鈉($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、檸檬酸鈉、檸檬酸鉀或其組合。在某些實施例中，該鹽為 NaCl 。在某些實施例中，該等洗

滌步驟在室溫下進行。在某些實施例中，溶離步驟發生於低於18°C(例如，在1°C與12°C之間或在2°C與8°C之間，如上文所論述)。

【0218】洗滌及/或溶離緩衝液之其他實例可見於WO2019133677中，其出於所有預期目的以全文併入本文中。

樹脂

【0219】在一些實施例中，該親和樹脂為POROS™ CaptureSelect™ AAVx。

【0220】在一些實施例中，該AAV為AAV8，該親和樹脂為POROS™ CaptureSelect™ AAV8。在一些實施例中，該AAV為AAV9，該親和樹脂為POROS™ CaptureSelect™ AAV9。在一些實施例中，該AAV為AAV9，該親和樹脂為POROS™ CaptureSelect™ AAVx。

【0221】在一些實施例中，該AAV為AAV8，該親和樹脂為POROS™ CaptureSelect™ AAV8，且該溶離緩衝液為酸性且不包含乙二醇。在一些實施例中，該AAV為AAV9，該親和樹脂為POROS™ CaptureSelect™ AAV9，且其中該溶離緩衝液為酸性且不包含乙二醇。在一些實施例中，該AAV為AAV9，該親和樹脂為POROS™ CaptureSelect™ AAVx，且其中該溶離緩衝液為酸性且不包含乙二醇。

【0222】在一些實施例中，該AAV為AAV8，且其中該親和樹脂為免疫親和樹脂，該免疫親和樹脂由固定於層析基質上之針對來自ADK8或ADK8/9類型之AAV8的固定單株抗體組成。在一些實施例中，該AAV為AAV9，且其中該親和樹脂為免疫親和樹脂，該免疫親和樹脂由固定於層析基質上之針對來自ADK9或ADK8/9之AAV9的固定單株抗體組成。

rAAV粒子之來源

【0223】關於本發明之方法，AAV可為任何AAV血清型。在某些實施例中，由本文所述之方法純化的AAV為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)血清型及AAV (VR-355)血清型或嵌合AAV載體。在某些實施例中，該AAV為野生型。

【0224】在某些實施例中，該AAV為AAV5血清型。在某些實施例中，該AAV為AAV9血清型。在某些實施例中，該AAV藉由基因工程改造進行修飾及/或經化學修飾。在某些實施例中，該AAV包含經修飾衣殼，例如經基因工程改造或經化學修飾的AAV衣殼。在某些實施例中，AAV載體包含VP1，其包含SEQ ID NO: 1之序列。在某些實施例中，AAV載體包含VP2，其包含SEQ ID NO: 2之序列。在某些實施例中，AAV載體包含VP3，其包含SEQ ID NO: 3之序列。

【0225】在一些實施例中，AAV藉由基因工程改造進行修飾及/或經化學修飾。在某些實施例中，AAV經基因及/或化學修飾。在某些實施例中，AAV經基因修飾。在某些實施例中，AAV經化學修飾。

【0226】在某些實施例中，AAV已經基因修飾以創建具有改變的受體使用、抗原性、轉導效率及/或組織趨向性的AAV載體，用於基因療法應用。在某些實施例中，AAV可經基因修飾以將肽配位體、抗體、抗體片段、MHC及/或受體插入至病毒衣殼中。在某些實施例中，AAV可經基因修飾以插入用於標記病毒衣殼之肽。可能的修飾之非限制性實例可見於B üning H., Bolyard C.M., Hallek M., Bartlett J.S. (2012) Modification

and Labeling of AAV Vector Particles. In: Snyder R., Moullier P. (編) Adeno-Associated Virus. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), 第807卷. Humana Press, 其出於所有預期目的以全文併入本文中。

【0227】在某些實施例中，AAV已經化學修飾以改變AAV載體之組織趨向性。舉例而言，可靶向特定胺基酸側鏈之化學選擇性反應可用於改變AAV衣殼上之受體結合域內的電荷、極性、疏水性及氫鍵結電位。用於改變AAV衣殼表面上之特定受體補償之此類能力允許產生具有改變的組織趨向性之合成載體。在某些實施例中，經化學修飾AAV載體可展現出經化學修飾AAV載體之改變的受體使用、抗原性、轉導效率及/或組織趨向性。可能的修飾之非限制性實例可見於Büning H., Bolyard C.M., Hallek M., Bartlett J.S. (2012) Modification and Labeling of AAV Vector Particles. In: Snyder R., Moullier P. (編) Adeno-Associated Virus. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), 第807卷. Humana Press, 其出於所有預期目的以全文併入本文中。

【0228】在某些實施例中，AAV部分表示由經轉染宿主細胞產生之AAV部分。在某些實施例中，AAV部分表示自包含經三重質體系統轉染之宿主細胞的細胞培養物捕獲之上清液，其中該系統之一個質體包含所關注之基因或cDNA，一個質體編碼衣殼蛋白質VP1、衣殼蛋白質VP2及/或衣殼蛋白質VP3。在某些實施例中，VP1、VP2及/或VP3為AAV8 VP1、AAV8 VP2及/或AAV8 VP3。在某些實施例中，VP1、VP2及/或VP3為AAV9 VP1、AAV9 VP2及/或AAV9 VP3。出於rAAV產生之目的的三重質體轉染在此項技術中已知。參見例如Qu等人, 2015, 前述及Mizukami等

人「A Protocol for AAV vector production and purification」PhD dissertation, Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, 1998；及Kotin等人, Hum Mol Genet 20(R1): R2-R6 (2011)。在某些實施例中，轉染可使用無機化合物(例如磷酸鈣)或有機化合物(聚乙二亞胺(PEI))或非化學方法(例如電穿孔)進行。在某些實施例中，該等宿主細胞為黏附細胞。在某些實施例中，該等宿主細胞為懸浮細胞。在某些實施例中，該等宿主細胞為HEK293細胞或Sf9細胞。在某些實施例中，該細胞培養物包含培養基，其為血清及不含蛋白質。在某些實施例中，培養基經化學定義且不含動物來源之組分，例如水解產物。在某些實施例中，包含rAAV粒子之部分表示包含經三重質體系統轉染之HEK293細胞的部分。在某些實施例中，包含rAAV粒子之部分描述於美國臨時申請案第62/417,775號及第WO2018128688號中，其出於所有預期目的以引用之方式併入本文中。

在培養宿主細胞(例如HEK293細胞)以產生AAV粒子(例如AAV8、AAV9等)之後，濃縮及/或過濾澄清的不含細胞之培養物上清液，將病毒粒子裝載至親和基質上。在某些實施例中，將病毒粒子裝載於pH在約7.4至約7.8範圍內之溶液中。在某些實施例中，將病毒粒子裝載於pH在約8.3至約8.7範圍內之溶液中。在某些實施例中，將病毒粒子裝載於pH為約8.5之溶液中。在某些實施例中，該pH為8.3至8.7且溶液包含NaCl及TrisHCl。在某些實施例中，將病毒粒子裝載於包含約20 mM TrisHCl及約150 mM NaCl且pH為約8.5之溶液中。

額外步驟及考慮

【0229】本發明之方法包含本文所揭示之步驟的任何組合，且可視

情況與一或多個額外步驟組合。因此，在例示性態樣中，本發明之方法進一步包含用如本文所述之三重質體系統轉染宿主細胞之步驟。在例示性態樣中，本發明之方法包含自經三重質體系統轉染之包含宿主細胞(例如 HEK293細胞)的細胞培養物捕獲上清液。在例示性態樣中，在本文所述之超速離心步驟之前進行轉染及捕獲步驟。

【0230】本發明之方法可包含其他額外步驟，其可進一步增加AAV純度及移除其他非所需組分及/或濃縮該部分及/或調節該部分以供後續步驟。

【0231】在某些實施例中，在以上列出之洗滌步驟之前進行視情況選用之重新平衡步驟。

【0232】在某些實施例中，在將含AAV溶液自宿主細胞產生親和純化之前，可進行預純化以移除複合酸性蛋白質結構及宿主細胞DNA中之一或多者。可藉由在流經模式下之陰離子交換進行預純化。預純化步驟可在本文所述之親和純化方法中之任一者之前進行。以下中之一或多者可藉由預純化此類含AAV之溶液移除：組蛋白(例如組蛋白H2A類型1、組蛋白H2B類型1-B、組蛋白H4、組蛋白H1.4)、60S核糖體蛋白質(例如60S核糖體蛋白質L27、60S核糖體蛋白質L6及60S核糖體蛋白質L30)、細胞質肌動蛋白(例如細胞質肌動蛋白1)、微管蛋白(例如微管蛋白 β -2A鏈)、非均質核核糖核蛋白C、Rep68蛋白、HEK293層黏連蛋白受體37 kDa形式(LamR 37kDa)及ATP依賴性分子伴隨蛋白HSC82。

【0233】在某些實施例中，該額外步驟可為超速離心步驟。

【0234】在例示性態樣中，該方法包含深度過濾步驟。在例示性態樣中，該方法包含使用包含纖維素及珍珠岩且最小滲透性為約500 L/m²之

過濾器使經轉染HEK293細胞培養物上清液之部分經受深度過濾。在例示性態樣中，該方法進一步包含使用最小孔徑為約0.2 μm 之過濾器。在例示性態樣中，深度過濾之後為經由最小孔徑為約0.2 μm 之過濾器過濾。在例示性態樣中，洗滌深度過濾器及最小孔徑為約0.2 μm 之過濾器中的一者或兩者且收集洗滌。在例示性態樣中，將該等洗滌合併在一起且與在深度過濾及使用最小孔徑為約0.2 μm 之過濾器過濾後得到的濾液合併。

【0235】在一些實施例中，該方法進一步包含使該含有AAV之溶液與陰離子交換劑接觸且自該陰離子交換劑溶離該含有AAV之溶液，隨後將該含有AAV之溶液裝載至該親和樹脂上。陰離子交換劑可在流經模式下操作。

【0236】在例示性態樣中，本發明之方法包含一或多個層析步驟。在例示性態樣中，該等方法包含陰性層析步驟，其中非所需組分結合於層析樹脂且所需AAV不結合於層析樹脂。在例示性態樣中，該等方法包含陰離子交換(AEX)層析步驟或在「非結合模式」下的AEX層析步驟。「非結合模式」之優點包括相對容易進行該程序及進行後續分析。

【0237】因此，在例示性實施例中，純化AAV粒子之方法包含藉由在允許AAV流動通過AEX層析管柱或膜之條件下將該部分施加至AEX層析管柱或膜上而對包含AAV粒子之部分進行陰離子交換(AEX)層析且收集AAV粒子。在例示性態樣中，使用包含約100 mM至約150 mM鹽(例如NaCl)之裝載緩衝液將該部分施加至AEX層析管柱或膜，視情況其中該裝載緩衝液之pH為約8至約9。在例示性態樣中，裝載緩衝液包含約115 mM至約130 mM鹽(例如NaCl)，視情況其中該裝載緩衝液包含約120 mM至約125 mM鹽(例如NaCl)。在例示性態樣中，在本文所述之超速離心步驟

之前進行陰性AEX步驟。

【0238】在例示性態樣中，本發明之方法包含使用超/透濾系統濃縮AAV部分。在例示性態樣中，本發明之方法包含一或多個切向流過濾(TFF)步驟。在例示性態樣中，AAV部分經歷超過濾/透濾。在例示性態樣中，該AAV部分在包含執行陰性AEX層析之步驟之前、在包含執行陰性AEX層析之步驟之後或在包含執行陰性AEX層析之前及之後用該超/透濾系統濃縮。在例示性態樣中，在本文所述之超速離心步驟之前進行TFF步驟。

【0239】例如當使用Baculo轉染系統時，包膜病毒之不活化可具有特別重要性。在例示性態樣中，本發明之方法包含過濾包含rAAV粒子之部分，以移除比該部分中之rAAV粒子更大尺寸的病毒。

【0240】不希望受理論所束縛，乙二醇本身或與另一添加劑組合可使此類脂質包膜病毒不活化。例示性添加劑包括非離子清潔劑、脂族試劑(例如TnBP)及清潔劑(例如聚山梨醇酯(例如Tween)、Triton X100、TnBP)。舉例而言，溶劑與清潔劑混合物可包含1% Triton X100、0.3%磷酸三正丁酯及0.3% TWEEN 80。

【0241】「在管柱上」之脂質包膜病毒的不活化可在如下表1中概述之各種親和層析操作下測試。

表1：變異體A、B及C中所用的溶劑清潔劑處理

施加清潔劑溶劑之步驟	變異體A	變異體B	變異體C
第2次洗滌 可能的步驟： 裝載，第1次洗滌 第2次洗滌、第3次洗滌、第4次洗滌、溶離	潛在SD-處理 10 g/kg至30 g/kg之以下混合物： 18.0g Tween 80 3.4g DMSO、 3.6g TnBP	無	建立的SD-處理 16.6 g之以下S/D溶液： 10.87g Triton X100 3.31g聚山梨醇酯80 3.01g TnBP

施加清潔劑溶劑之步驟	變異體A	變異體B	變異體C
第4次洗滌 可能的步驟： 第2次洗滌、第2次洗滌、第3次洗滌、第4次洗滌	無	在50至60%(w/w)乙二醇及清潔劑(例如0.1 -10%辛基吡喃葡萄糖苷)存在下，升高的pH 8.5溶離液中未見	1至20% (w/w)聚山梨醇酯80 溶離液中可能
第x次洗滌	無	無	極性有機溶劑50%二甲亞砜

【0242】在CaptureSelect AAV8樹脂上在接近中性pH (例如pH 8.0)下，含有DMSO之緩衝液第x次洗滌緩衝液可有效觸發AAV9而非AAV8之溶離，結果為出人意料的。在CaptureSelect AAVx樹脂上在接近中性pH (例如pH 8.0)下，含有DMSO之緩衝液第x次洗滌緩衝液可有效觸發各種AAV之溶離，包括(但不限於) AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAAV、BAAV、AAV (VR-195)及AAV (VR-355)，結果為出人意料的。在某些實施例中，該AAV為AAV5血清型。在某些實施例中，該AAV為AAV6血清型。在某些實施例中，該AAV為AAV8血清型。在某些實施例中，該AAV為AAV9血清型。

【0243】不希望受理論所束縛，預期第x次洗滌緩衝液具有洗滌管柱及/或不活化或崩解脂質包膜病毒之活性。未預期第x次洗滌緩衝液將差異地溶離AAV9而非AAV8。

【0244】在例示性態樣中，本發明之方法包含一或多個品質控制步驟，例如用以量測在該方法之一或多個步驟(例如在各步驟之後)之後得到的該等AAV部分之效能或比活性的步驟。在例示性態樣中，本發明之方法包含對AAV具有特異性之ELISA。在例示性態樣中，ELISA為夾心ELISA。在例示性態樣中，夾心ELISA包含對AAV抗原決定基具有特異性

之抗體。在例示性態樣中，AAV抗原決定基為存在於組裝的AAV衣殼上之構形抗原決定基。如本文所論述，ELISA可以確定AAV部分之效能的方式置換qPCR。在例示性態樣中，本發明之方法包含經由AAV特異性ELISA測試AAV部分，且該等方法不包括經由定量PCR量測效能之方法。在例示性態樣中，AAV特異性ELISA足以提供對AAV部分之效能的代表性讀數，因為AAV部分中之大部分衣殼為完整衣殼。

【0245】在例示性態樣中，本發明之方法包含在本發明之一或多個步驟之後對AAV具有特異性之ELISA。在例示性態樣中，本發明之方法包含經由AAV特異性ELISA測試在深度過濾之後得到的AAV部分以確定該部分中AAV之比活性。在例示性態樣中，本發明之方法包含經由AAV特異性ELISA測試在使用超/透濾系統濃縮AAV部分之後得到的AAV部分，以確定該部分中AAV之比活性。在例示性態樣中，本發明之方法包含經由AAV特異性ELISA測試在切向流過濾(TFF)步驟之後得到的AAV部分，以確定該部分中AAV之比活性。在例示性態樣中，本發明之方法包含經由AAV特異性ELISA測試在陰離子交換(AEX)層析之後得到的AAV部分，以確定該部分中AAV之比活性。在例示性態樣中，本發明之方法包含經由AAV特異性ELISA測試在精良步驟之後得到的AAV部分，以確定該部分中AAV之比活性。

【0246】在一些實施例中，該方法進一步包含使該含有AAV之溶液與包含帶正電基團的過濾器接觸，該過濾器可有效地自該含有AAV之溶液耗乏酸性帶電污染物。在一些實施例中，該方法進一步包含奈米過濾AAV部分，以移除大於35 nm之病毒。在一些實施例中，該方法進一步包含精良步驟，其包含進行陽離子交換層析法。用於陽離子交換層析之例示性介

質包括(但不限於) CaptoTM S、Eshmuno® S及Fractogel® SO3。在一些實施例中，該方法進一步包含經由例如對AAV8具有特異性或對AAV9具有特異性之AAV特異性ELISA測試AAV部分。AAV特異性ELISA可為對AAV (例如AAV8或AAV9)具有特異性之夾心ELISA。

AAV產物

【0247】在另一態樣中，提供一種AAV產物，其藉由本文所述之任何方法產生。

【0248】本文進一步提供由本發明之方法產生的AAV產物。在例示性態樣中，AAV產物包含至少約 10^{12} 個由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生之病毒粒子(vp)或至少約 10^{13} 個由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生之病毒粒子(vp)。在例示性態樣中，AAV產物為由轉染不具有轉殖基因質體之rep-cap及Ad輔助質體產生的空衣殼。純化的空質體可用於使對來自患者血液之AAV抗原具有特異性之抗體耗乏或移除該等抗體。

【0249】在例示性態樣中，本發明之AAV產物為高純度、高度強效的且適用於人類之臨床用途。在例示性態樣中，AAV產物包含具有均質群體及較高純度之AAV粒子。在例示性態樣中，AAV產物包含全長載體DNA。在例示性實施例中，AAV產物實質上不含非所需污染物，包括(但不限於)含有截短或不完整載體DNA之AAV粒子、具有不完全蛋白質組合物及寡聚結構之AAV粒子或污染病毒，例如非AAV脂質包膜病毒。在例示性實施例中，AAV產物含有大量編碼所關注蛋白質之cDNA。在例示性態樣中，本發明之AAV產物適用於向人類投與。在例示性態樣中，AAV產物為無菌的及/或具有良好製造規範(GMP)等級。在例示性態樣中，

AAV產物符合美國藥典第1046章或歐洲藥典關於基因療法藥品中所闡述之要求，或如美國食品和藥物管理局(USFDA)或歐洲藥物管理局(EMA)所授權。在例示性態樣中，AAV產物為用於在幾乎不需要處理或操作之情況下直接投與至人類之備用產物。

【0250】關於本發明之方法，AAV部分在例示性態樣中為濃縮的AAV部分。在某些實施例中，該AAV部分包含至少 1×10^{10} 個、 1×10^{11} 個或 1×10^{12} 個AAV衣殼/毫升。在某些實施例中，該AAV部分包含至少 1×10^{12} 個AAV衣殼/mL。AAV衣殼可包括空AAV衣殼及完整AAV衣殼。在某些實施例中，該AAV部分包含比空AAV及/或過度填充的AAV衣殼更多的完整AAV衣殼。

【0251】在某些實施例中，自該溶離步驟溶離的至少約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%、99%的AAV衣殼為完整AAV衣殼。

【0252】在某些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的衣殼相比，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物包含至少約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%的更多的完整衣殼。在某些實施例中，與由不使用相同洗滌方

案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的衣殼相比，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物包含約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%的更多的完整衣殼。在某些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的衣殼相比，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物包含至少約6%的更多的完整衣殼。在某些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的衣殼相比，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物包含至少約10%的更多的完整衣殼。在某些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的衣殼相比，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物包含至少約20%的更多的完整衣殼。在某些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的衣殼相比，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物包含約6%的更多的完整衣殼。在某些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的衣殼相比，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物包含約10%的更多的完整衣殼。在某些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的衣殼相比，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物包含約16%的更多的完整衣殼。在某些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的衣殼相比，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物包含約20%的

更多的完整衣殼。

【0253】在各種實施例中，在本文所述之純化步驟之後且如藉由 ITR-qPCR 分析所量測(以重量/體積為單位)，AAV (例如 AAV9)之產率與藉由未進行洗滌步驟之比較程序得到的產率相比大至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或 65%。

【0254】在各種實施例中，在本文所述之純化步驟之後且如藉由 ITR-qPCR 分析所量測(以重量/重量為單位)，AAV (例如 AAV9)之產率與藉由未進行洗滌步驟之比較程序得到的產率相比大至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或 65%。

【0255】有利地，該等方法可擴展至較大體積之起始物質，例如細胞培養物。在某些實施例中，本文所提供之方法為能夠自至少或約 500 L、至少或約 600 L、至少或約 700 L、至少或約 800 L、至少或約 900 L 或至少或約 1000 L 之體積純化 AAV 的大規模方法。在某些實施例中，該等方法可擴展至至少或約 1250 L、至少或約 1500 L、至少或約 2000 L、至少或約 2500 L、至少或約 3000 L、至少或約 4000 L、至少或約 5000 L、至少或約 6000 L、至少或約 7000 L、至少或約 8000 L、至少或約 9000 L、至少或約 10,000 L 或更高之最小體積的起始物質(例如，細胞培養物)。舉例而言，方法係在產生 AAV 之最小體積的約 1000 L 或約 10,000 L 或 25,000 L 或更高之細胞培養物的情況下進行。

【0256】本文所述之產生及純化 AAV 之方法亦為有利的，因為該等方法引起較高滴定 AAV 產生。在某些實施例中，包含至少約 10^{10} 個病毒粒子(vp)之 AAV 產物係由約 1000 L 起始物質(例如細胞培養物)產生。在某些實施例中，包含至少約 10^{11} 個病毒粒子(vp)之 AAV 產物係由約 1000 L 起始

物質(例如細胞培養物)產生。在某些實施例中，包含至少約 10^{12} 個病毒粒子(vp)之AAV產物由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生。在某些實施例中，包含至少約 10^{13} 個病毒粒子(vp)之AAV產物由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生。在某些實施例中，包含至少約 10^{14} 個病毒粒子(vp)之AAV產物由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生。在某些實施例中，包含至少約 10^{15} 個病毒粒子(vp)之AAV產物由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生。在某些實施例中，包含至少約 10^{16} 個病毒粒子(vp)之AAV產物由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生。在某些實施例中，包含至少約 10^{17} 個病毒粒子(vp)之AAV產物由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生。在某些實施例中，包含至少約 2×10^{16} 個病毒粒子(vp)之AAV產物由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生。在某些實施例中，包含至少約 5×10^{17} 個病毒粒子(vp)之AAV產物由約1000 L起始物質(例如細胞培養物)產生。

【0257】本文所述之方法的另一優勢為該等方法產生高純度之AAV產物。在某些實施例中，經由本發明方法產生的AAV產物實質上不含以下一或多種污染物：宿主細胞蛋白質、宿主細胞核酸(例如，游離宿主細胞DNA及游離質體DNA)、質體DNA、空病毒衣殼、熱衝擊蛋白質70 (HSP70)、乳酸脫氫酶(LDH)、蛋白酶體、污染物非AAV病毒(例如脂質包膜病毒)、宿主細胞培養物組分(例如抗生素)、黴漿菌、熱原質、細菌內毒素、細胞碎片(例如由膜脂質、蛋白質及其他生物學聚合物構成之碎片)及外來病原物。當根據本文所述之產生及純化AAV之方法純化AAV時，以下雜質中之一或多者或甚至全部可為不可偵測的：組蛋白H2A類型1、組蛋白H2B類型1-B、組蛋白H4、熱衝擊70 kDa蛋白質1A、丙酮酸激酶

PKM、延長因子2、ATP-檸檬酸酯合成酶、組蛋白H1.4、免疫球蛋白重鏈恆定 γ 1(來自酸性溶離方法之固定配位體)、60S核糖體蛋白質L27、果糖-二磷酸醛酶A、熱衝擊同源71 kDa蛋白質、細胞質肌動蛋白1、S-甲醯基麩胱甘肽羧化酶、天冬醯胺合成酶(麩醯胺酸水解)、L-乳酸脫氫酶B環、微管蛋白 β -2A環、X-染色體RNA-結合基元蛋白質、60S核糖體蛋白質L6、細胞質蘇氨酸tRNA接合酶、免疫球蛋白 κ 恆定、60S核糖體蛋白質L30、含WD重複序列蛋白質1、腺苷高半胱胺酸酶、非均質核核糖核蛋白質C、蛋白質Rep68、甲拌磷寡肽酶、D-3-磷酸甘油酸去氫酶、ATP依賴性分子伴隨蛋白HSC82。根據本文所述之產生及純化陰離子AAV之方法，在洗滌步驟之前添加陰離子交換步驟亦可使以下不可偵測：組蛋白H1.4、60S核糖體蛋白質L27、細胞質肌動蛋白1、微管蛋白 β -2A環、60S核糖體蛋白質L6、60S核糖體蛋白質L30、非均質核核糖核蛋白質C、蛋白質Rep68及ATP依賴性分子伴隨蛋白HSC82。

【0258】在例示性實施例中，本發明方法提供一種經純化AAV產物，其中移除起始物質(例如細胞培養物)中發現的至少或約50%污染物。在例示性實施例中，本發明方法提供一種經純化AAV產物，其中移除起始物質(例如細胞培養物)中發現的至少或約60%污染物。在例示性實施例中，本發明方法提供一種經純化AAV產物，其中移除起始物質(例如細胞培養物)中發現的至少或約70%污染物。在例示性實施例中，本發明方法提供一種經純化AAV產物，其中移除起始物質(例如細胞培養物)中發現的至少或約80%污染物。在例示性實施例中，本發明方法提供一種經純化AAV產物，其中移除起始物質(例如細胞培養物)中發現的至少或約90%污染物。

【0259】在某些實施例中，本文所述之產生及純化AAV之方法使包括蛋白質雜質(例如宿主細胞(HC)雜質)之雜質數目減少與在不使用相同洗滌方案下藉由比較程序得到的雜質相比大約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%。在一些實施例中，自該溶離步驟得到的該AAV之雜質含量 $\leq$ 99.9%。在一些實施例中，自該溶離步驟得到的該AAV之雜質含量 $\leq$ 99.0%。

【0260】在某些實施例中，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物之純度為至少約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%。在一些實施例中，自該溶離步驟得到的該AAV之純度含量為99.9%或更高。在一些實施例中，自該溶離步驟得到的該AAV之純度含量為99.0%或更高。

【0261】在某些實施例中，本文所述之產生及純化AAV之方法產生的產物之純度與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得

到的純度相比高至少約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%。在一些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的純度相比，自該溶離步驟得到的AAV之純度含量為99.9%或更高。在一些實施例中，與由不使用相同洗滌方案之比較程序且在較低溫度下溶離得到的純度相比，自該溶離步驟得到的AAV之純度含量為99.0%或更高。

【0262】在某些實施例中，經由本發明方法產生的AAV產物適用於向人類投與。在某些實施例中，AAV為重組AAV (rAAV)。在某些實施例中，經由本發明方法產生的AAV產物為無菌的及/或具有良好製造規範(GMP)等級。在某些實施例中，經由本發明方法產生的AAV產物符合美國藥典第1046章或歐洲藥典關於基因療法藥品中所闡述之要求，或如美國食品和藥物管理局(USFDA)或歐洲藥物管理局(EMA)所授權。

【0263】另外，由本文所述之方法產生的AAV產物為高度強效的。AAV產物(例如AAV8或AAV9產物)之效能可根據以下描述：(1)活體內生物效能(例如在小鼠中產生活性蛋白質)，其以單位(FIX或FVIII)/毫升小鼠血漿形式給出；或(2)活體外生物效能。活體外生物效能測試量測AAV載體感染細胞(例如，HepG2細胞)之潛能，該等細胞會表現所關注蛋白質並且分泌至培養基中，且藉由ELISA技術及/或酶活性來確定含量。用以量

測活體內及活體外生物效能之適合的方法為此項技術中已知的且亦描述於本文中。

【0264】在其他實施例中，由本文所述之方法產生的AAV產物展現出優異的比活性。AAV之「比活性」由qPCR與 μg AAV8之比率表示。在例示性實施例中，由本文所述之方法產生的AAV產物展現出每 μg AAV之GOI的優良比率，其表明AAV產物具有大量「完整」病毒粒子。在某些實施例中，本發明之方法包含經由AAV特異性ELISA測試AAV部分。在某些實施例中，AAV特異性ELISA足以提供對AAV部分之效能的代表性讀數，因為AAV部分中之大部分衣殼為完整衣殼。

非限制性實施例：

1. 一種純化腺相關病毒(AAV)之方法，其包含
 - (a)在室溫下及在允許溶液中之該AAV與親和樹脂之間結合的條件下，將含有AAV之溶液裝載至靶向該AAV的該親和樹脂上；
 - (b)在室溫下進行至少一個洗滌步驟；及
 - (c)在低於 18°C 之溫度下自該親和樹脂溶離該AAV。
2. 如實施例1之方法，其中步驟(c)中之該溫度在 1°C 與 12°C 之間。
3. 如實施例1之方法，其中步驟(c)中之該溫度在 2°C 與 8°C 之間。
4. 如實施例1至3中任一項之方法，其進一步包含使該含有AAV之溶液與陰離子交換劑接觸且自該陰離子交換劑溶離該含有AAV之溶液，隨後將該含有AAV之溶液裝載至該親和樹脂上。
5. 如實施例1至4中任一項之方法，其中該等洗滌步驟中之至少一者包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含有機溶劑及/或清潔劑。
6. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含乙酸鈉。

7. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含TrisHCl及鹽。
8. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含以下中之一或多者：組胺酸、組胺酸-HCl、精胺酸-HCl、離胺酸-HCl、甘胺酸、牛磺酸、MES-Na、Bis-Tris及N-乙醯基-D,L-色胺酸。
9. 如實施例7或實施例8之方法，其中該鹽為NaCl。
10. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含氯化鎂。
11. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含TrisHCl及乙二醇。
12. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含精胺酸-HCl及蔗糖及丙三醇中之一者。
13. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含牛磺酸及乙二醇。
14. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含精胺酸-HCl、離胺酸-HCl及組胺酸-HCl。
15. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含TrisHCl及DMSO。
16. 如實施例5之方法，其中該有機溶劑或清潔劑為聚山梨醇酯80、乙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、DMSO、蔗糖或海藻糖。
17. 如實施例5之方法，其中該清潔劑包含Triton X100、聚山梨醇酯80及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)中之一或多者。
18. 如實施例17之方法，其中該清潔劑包含聚山梨醇酯80。
19. 如實施例5至18中任一項之方法，其中該緩衝液包含約0.05%至約30% (w/w)有機溶劑或清潔劑。
20. 如實施例5之方法，其中該緩衝液包含約0.05%至約0.2% (w/w)有機溶劑或清潔劑。
21. 如實施例1至20中任一項之方法，其中至少兩個洗滌步驟在室

溫下進行。

22. 如實施例1至21中任一項之方法，其中至少三個洗滌步驟在室溫下進行。

23. 如實施例1至22中任一項之方法，其中至少四個洗滌步驟在室溫下進行。

24. 如實施例21之方法，其中進行兩個洗滌步驟。

25. 如實施例22之方法，其中進行三個洗滌步驟。

26. 如實施例23之方法，其中進行四個洗滌步驟。

27. 如實施例1至26中任一項之方法，其中依次進行該等洗滌步驟。

28. 如實施例1至27中任一項之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽。

29. 如實施例28之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約25至約100 mM TrisHCl及約75至約250 mM鹽。

30. 如實施例29之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約40至約60 mM TrisHCl及約100至約150 mM鹽。

31. 如實施例28至30中任一項之方法，其中該洗滌緩衝液之pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8。

32. 如實施例31之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約8.5。

33. 如實施例1至32中任一項之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。

34. 如實施例33之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約50至約

200 mM乙酸鈉及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。

35. 如實施例34之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約90至約110 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。

36. 如實施例33至35中任一項之方法，其中該洗滌緩衝液之pH為約5.0至約7.4、約5.5至約7.0或約5.5至約6.5。

37. 如實施例36之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約6.0。

38. 如實施例1至37中任一項之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約10至約75% (w/w)乙二醇。

39. 如實施例38之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約25 mM至約100 mM TrisHCl及約25%至約70% (w/w)乙二醇。

40. 如實施例39之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約40 mM至約60 mM TrisHCl及約40%至約60% (w/w)乙二醇。

41. 如實施例38至40中任一項之方法，其中該洗滌緩衝液之pH為約7.5至約9.2、約8.0至約9.0或約8.0至約8.8。

42. 如技術方案41之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約8.5。

43. 如實施例1至42中任一項之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約10至約200 mM甘胺酸、約1至約100 mM組胺酸、約20至約500 mM鹽、約1至約10% (w/w)海藻糖及約0.0005至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。

44. 如實施例43之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約30 mM至約80 mM甘胺酸、約5至約20 mM組胺酸、約50至約200 mM鹽、約3至約

8% (w/w)海藻糖及約0.001至約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。

45. 如實施例44之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約40至約60 mM甘胺酸、約5至約15 mM組胺酸、約90至約110 mM鹽、約4至約6% (w/w)海藻糖及約0.001至約0.05% (w/w)聚山梨醇酯80。

46. 如實施例43至45中任一項之方法，其中該洗滌緩衝液之pH為約6.0至約8.0、約6.5至約7.5或約7.0至約7.4。

47. 如實施例46之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約50 mM甘胺酸、約10 mM組胺酸、約100 mM鹽、約5% (w/w)海藻糖、約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約7.0。

48. 如實施例1至47中任一項之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約1至約200 mM TrisHCl、約50至約500 mM鹽及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。

49. 如實施例48之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約5至約50 mM TrisHCl、約75至約250 mM鹽及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。

50. 如實施例49之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約10至約30 mM TrisHCl、約140至約160 mM鹽及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。

51. 如實施例48至50中任一項之方法，其中該洗滌緩衝液之pH為約6.0至約8.8、約6.5至約8.5或約7.0至約8.0。

52. 如實施例51之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約20 mM TrisHCl及約150 mM鹽及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約7.4。

53. 如實施例1至52中任一項之方法，其中步驟(c)包含用至少一種溶離緩衝液溶離該AAV。

54. 如實施例53之方法，其中至少一種溶離緩衝液與該等洗滌緩衝液中之至少一者相同。

55. 如實施例54之方法，其中至少一種溶離緩衝液與在步驟(c)中之溶離該AAV之前用於最終洗滌步驟中之最後的洗滌緩衝液相同。

56. 如實施例54之方法，其中該第一溶離緩衝液與在步驟(c)中之溶離該AAV之前用於最終洗滌步驟中之最後的洗滌緩衝液相同。

57. 如實施例53至56中任一項之方法，其中至少一種溶離緩衝液包含約10至約200 mM甘胺酸、約1至約100 mM組胺酸、約20至約500 mM鹽、約1至約10% (w/w)海藻糖及約0.0005至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。

58. 如實施例57之方法，其中至少一種溶離緩衝液包含約30至約80 mM甘胺酸、約5至約20 mM組胺酸、約50至約200 mM鹽、約3至約8%海藻糖及約0.001至約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80。

59. 如實施例58之方法，其中至少一種溶離緩衝液包含約40至約60 mM甘胺酸、約5至約15 mM組胺酸、約90至約110 mM鹽、約4至約6% (w/w)海藻糖及約0.001至約0.05% (w/w)聚山梨醇酯80。

60. 如實施例57至59中任一項之方法，其中該洗滌緩衝液之pH為約6.0至約8.0、約6.5至約7.5或約7.0至約7.4。

61. 如實施例60之方法，其中至少一種溶離緩衝液包含約50 mM甘胺酸、約10 mM組胺酸、約100 mM鹽、約5% (w/w)海藻糖及約0.005% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種溶離緩衝液之pH為約7.0。

62. 如實施例53至61中任一項之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包

含約1至約200 mM TrisHCl、約50至約500 mM鹽及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80。

63. 如實施例62之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約5至約50 mM TrisHCl、約75至約250 mM鹽及約0.005至約0.3% (w/w)聚山梨醇酯80。

64. 如實施例63之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約10至約30 mM TrisHCl、約140至約160 mM鹽及約0.05%至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80。

65. 如實施例62至64中任一項之方法，其中該洗滌緩衝液之pH為約6.0至約8.8、約6.5至約8.5或約7.0至約8.0。

66. 如實施例65之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含約20 mM TrisHCl、約150 mM鹽及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該至少一種洗滌緩衝液之pH為約7.4。

67. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟及該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，且該緩衝液之pH為約7.5至約9.2，且

其中該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該緩衝液之pH為約5.0至約7.4。

68. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟及該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該緩衝液之pH為約

5.0至約7.4，且

其中該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，且該緩衝液之pH為約7.5至約9.2。

69. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟及該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，且該緩衝液之pH為約7.5至約9.2，且

其中該第二洗滌步驟及該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該緩衝液之pH為約5.0至約7.4。

70. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟及該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該緩衝液之pH為約5.0至約7.4，且

其中該第二洗滌步驟及該第四洗滌步驟包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，且該緩衝液之pH為約7.5至約9.2。

71. 如實施例67或實施例69之方法，其中該第一緩衝液及該第三緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，且該第一緩衝液及該第三緩衝液之pH為約8.5。

72. 如實施例68或實施例70之方法，其中該第一緩衝液及該第三緩衝液包含約100 mM乙酸鈉、約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該第一緩衝

液及該第三緩衝液之pH為約6.0。

73. 如實施例67或實施例69之方法，其中該第二緩衝液包含約100 mM乙酸鈉、約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該第二緩衝液之pH為約6.0。

74. 如實施例68或實施例70之方法，其中該第二緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，且該第二緩衝液之pH為約8.5。

75. 如實施例69之方法，其中該第四緩衝液包含約100 mM乙酸鈉、約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該第四緩衝液之pH為約6.0。

76. 如實施例70之方法，其中該第四緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，且該第四緩衝液之pH為約8.5。

77. 如實施例67或實施例70之方法，其中步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約200 mM TrisHCl及約50至約500 mM鹽，且該緩衝液之pH為約7.5至約9.2。

78. 如實施例68或實施例69之方法，其中步驟(c)包含向該親和樹脂施加緩衝液，該緩衝液包含約10至約2000 mM乙酸鈉及約0.001至約1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該緩衝液之pH為約5.0至約7.4。

79. 如實施例77之方法，其中該緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM鹽，且該緩衝液之pH為約8.5。

80. 如實施例78之方法，其中該緩衝液包含約100 mM乙酸鈉、約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且該緩衝液之pH為約6.0。

81. 如實施例1至80中任一項之方法，其中至少一種洗滌及/或溶離緩衝液包含約50至約500 mM 2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES-Na)之鈉鹽、約3至約30 mM EDTA及包含聚山梨醇酯80、DMSO及磷酸三(正丁基)酯

(TNBP)之溶劑/清潔劑混合物，且該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約5.2至約6.8。

82. 如實施例1至81中任一項之方法，其中至少一種洗滌及/或溶離緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl或精胺酸-HCl及約75至約500 mM 鹽，且該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約7.5至約9.2。

83. 如實施例1至82中任一項之方法，其中至少一種洗滌及/或溶離緩衝液包含約20至約80 mM精胺酸-HCl及約50至約200 mM鹽，且該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約7.3至約8.8。

84. 如實施例1至83中任一項之方法，其中至少一種洗滌及/或溶離緩衝液包含約50至約200 mM牛磺酸及0.2至1.5% (w/w) PEG (例如PEG 6000)，且該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約5.2至約6.8。

85. 如實施例1至84中任一項之方法，其中至少一種洗滌及/或溶離洗滌緩衝液包含約30至約300 mM甘胺酸，且該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約7.5至約9.2。

86. 如實施例1至85中任一項之方法，其中至少一種洗滌及/或溶離緩衝液包含約20至約150 mM牛磺酸、約30至約75% (w/w)乙二醇及0.05至0.2%辛基吡喃葡萄糖苷，且該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約7.3至約8.8。

87. 如實施例1至86中任一項之方法，其中至少一種洗滌及/或溶離緩衝液包含約80至約400 mM Bis-Tris及約10至約20公克之包含以約11:3:3 (按重量計)之比率的約Triton-X100、聚山梨醇酯80及TNBP之溶劑/洗滌劑混合物，且該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約5.2至約6.8。

88. 如實施例1至87中任一項之方法，其中至少一種洗滌及/或溶離

緩衝液包含約5至約20 mmol檸檬酸鈉，且該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約7.5至約9.2。

89. 如實施例1至88中任一項之方法，其中至少一種洗滌及/或溶離緩衝液包含約50至約200 mM精胺酸-HCl、約50至約200 mM離胺酸HCl、約50至約200 mM組胺酸-HCl及約1mM至約4 mM N-乙醯基-D,L-色胺酸及約10%至約40% (w/w)聚山梨醇酯80，且該洗滌及/或溶離緩衝液之pH為約7.3至約8.8。

90. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約2000 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；

其中該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約75至約500 mM鹽，且其中該第二緩衝液之pH為約7.5至約9.2；及

其中該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約30至約200 mM TrisHCl及約30至約75% (w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約7.3至約8.8。

91. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約500 mM 2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES-Na)之鈉鹽、約3至約30 mM EDTA及包含聚山梨醇酯80、DMSO及磷酸三(正丁基)酯(TNBP)之溶劑/清潔劑混合物，且其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；

其中該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩

衝液包含約30至約200 mM TrisHCl或精胺酸-HCl及約75至約500 mM 鹽，且其中該第二緩衝液之pH為約7.5至約9.2；及

其中該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約20至約80 mM精胺酸-HCl及約50至約200 mM鹽，且其中該第三緩衝液之pH為約7.3至約8.8。

92. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約200 mM牛磺酸及0.2至1.5% (w/w) PEG (例如PEG 6000)，其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；

其中該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約30至約300 mM甘胺酸，且其中該第二緩衝液之pH為約7.5至約9.2；及

其中該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約20至約150 mM牛磺酸、約30至約75% (w/w)乙二醇及0.05至0.2% (w/w)辛基吡喃葡萄糖苷，且其中該第三緩衝液之pH為約7.3至約8.8。

93. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約80至約400 mM Bis-Tris及約10至約20公克之包含以約11:3:3 (按重量計)之比率的約Triton-X100、聚山梨醇酯80及TNBP之溶劑/洗滌劑混合物，其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；

其中該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約5至約20 mmol檸檬酸鈉，且其中該第二緩衝液之pH為約7.5至

約9.2；及

其中該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約50至約200 mM精胺酸-HCl、約50至約200 mM離胺酸HCl、約50至約200 mM組胺酸-HCl及約1mM至約4 mM N-乙醯基-D,L-色胺酸及約10%至約40% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第三緩衝液之pH為約7.3至約8.8。

94. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50 nM至約200mM乙酸钠及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；

其中該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約20 nM至約100mM TrisHCl及約50 nM至約200 nM鹽，其中該第二緩衝液之pH為約7.5至約8.8；及

其中該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約20mM至100 mM TrisHCl、約40%至約60%(w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約7.5至約8.8。

95. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50 nM至約200mM乙酸钠及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，其中該第一緩衝液之pH為約5.2至約6.8；

其中該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約20 nM至約100mM TrisHCl及約50 nM至約200 nM鹽，其中該第二緩衝液之pH為約7.5至約8.8；及

其中該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約20mM至100 mM TrisHCl、約40%至約60% (w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約7.5至約8.8。

96. 如實施例7或29至95中任一項之方法，其中該鹽選自NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、檸檬酸鈉、LiCl、CsCl、乙酸鈉，及NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、檸檬酸鈉、LiCl、CsCl及乙酸鈉中之一或多者的組合。

97. 如實施例96之方法，其中該鹽為NaCl。

98. 如實施例7或29至97中任一項之方法，其中該鹽之濃度不超過500 mM。

99. 如實施例7或29至97中任一項之方法，其中該鹽之濃度不超過200 mM。

100. 如實施例28至32或67至95中任一項之方法，其中該緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約125 mM NaCl，該緩衝液之pH為約8.5。

101. 如實施例1至66中任一項之方法，其中該第一洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第一緩衝液，該第一緩衝液包含約50至約200 mM乙酸鈉及約0.05至約0.2% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第一緩衝液之pH為約5.5至約6.5；

其中該第二洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第二緩衝液，該第二緩衝液包含約10至約70 mM TrisHCl及約75至約250 mM NaCl，且其中該第二緩衝液之pH為約8.0至約9.0；且

其中該第三洗滌步驟包含向該親和樹脂施加第三緩衝液，該第三緩衝液包含約10至約70 mM TrisHCl及約30至約75% (w/w)乙二醇，且其中

該第三緩衝液之pH為約8.0至約9.0。

102. 如實施例101之方法，該方法進一步包含在該第一洗滌步驟之前發生的第四洗滌步驟且包含向該親和樹脂施加第四緩衝液，該第四緩衝液包含約10至約30 mM TrisHCl及約75至約250 mM NaCl，且其中該第四緩衝液之pH為約6.5至約8.0。

103. 如實施例100或實施例102之方法，其中該第一緩衝液包含約100 mM乙酸鈉及約0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且其中該第一緩衝液之pH為約6.0。

104. 如實施例100至103中任一項之方法，其中該第二緩衝液包含約50mM TrisHCl及約125 mM NaCl，且其中該第二緩衝液之pH為約8.5。

105. 如實施例100至104中任一項之方法，其中該第三緩衝液包含約50 mM TrisHCl及約50% (w/w)乙二醇，且其中該第三緩衝液之pH為約8.0。

106. 如實施例1至105中任一項之方法，其中移除酸性組分。

107. 如實施例106之方法，其中該酸性組分為宿主細胞DNA，諸如HEK293 DNA，且其中使該酸性組分減小至低於每微克AAV抗原250 pg之值，如由qPCR所量測。

108. 如實施例106之方法，其中該酸性組分為宿主細胞DNA，諸如HEK293 DNA，且其中使該酸性組分減小至低於每微克AAV抗原250 pg之值，如由ELISA所量測。

109. 如實施例1至108中任一項之方法，其中溶離包含藉由梯度溶離使溶離緩衝液之導電性連續線性增加。

110. 如實施例1至109中任一項之方法，其中溶離包含藉由梯度溶離

使有機溶劑之濃度連續線性增加。

111. 如實施例1至110中任一項之方法，其中溶離包含使該親和樹脂與包含乙酸鈉、甘胺酸、組胺酸、NaCl及/或聚山梨醇酯80之溶離緩衝液接觸。

112. 如實施例111之方法，其中該鹽濃度為約50至200 mM。

113. 如實施例111或實施例112之方法，其中該pH為5.5至9.0。

114. 如實施例111至113中任一項之方法，其中溶離包含使親和樹脂與包含50至200 mM NaCl及30至80 mM TrisHCl之溶離緩衝液接觸。

115. 如實施例114之方法，其中該溶離緩衝液之pH為8.0至9.0。

116. 如實施例114之方法，其中該溶離緩衝液包含至少約55%(w/w)乙二醇。

117. 如實施例1至116中任一項之方法，其中溶離包含使該親和樹脂與包含約50 mM至200 mM乙酸鈉、0.05%至0.2% (w/w)聚山梨醇酯80之溶離緩衝液接觸，且其中該溶離緩衝液之pH為約5.5至6.5。

118. 如實施例1至117中任一項之方法，其中溶離包含使該親和樹脂與包含30至80 mM甘胺酸、5至20 mM組胺酸、50至200 mM NaCl、3至8% (w/w)海藻糖及0.001至0.1% (w/w)聚山梨醇酯80之溶離緩衝液接觸，且其中該溶離緩衝液之pH為6.5至7.5。

119. 如實施例118之方法，其中溶離進一步包含

(a)使該親和樹脂與包含50至200 mM乙酸鈉、0.05%至0.2% (w/w)聚山梨醇酯80之第一溶離緩衝液接觸，且其中該第一溶離緩衝液之pH為約5.5至6.5；

(b)使該親和樹脂與包含30至80 mM甘胺酸、5至20 mM組胺酸、50

至200 mM NaCl、3至8% (w/w)海藻糖及0.001至0.1% (w/w)聚山梨醇酯80之第二溶離緩衝液接觸，且其中該溶離緩衝液之pH為6.5至7.5；及

(c)使該親和樹脂與包含50至200 mM NaCl及30至80 mM TrisHCl之第三溶離緩衝液接觸，且其中該第三溶離緩衝液之pH為8.0至9.0。

120. 如實施例1至119中任一項之方法，其中依次進行該等步驟。

121. 如實施例1至120中任一項之方法，其中溶離包含使該親和樹脂與包含約2 mM氯化鎂、約50 mM精胺酸-HCl、約750mM至約1000 mM NaCl及至少約50% (w/w)丙三醇之溶離緩衝液接觸，該緩衝液之pH為至少約8.0。

122. 如實施例1至121中任一項之方法，其中溶離包含使該親和樹脂與包含約2 mM氯化鎂、約50 mM牛磺酸、約600mM至約1000 mM NaCl、約0.05至約0.2% (w/w)辛基吡喃葡萄糖苷及約60% (w/w)乙二醇之溶離緩衝液接觸，該緩衝液之pH為至少約7.8。

123. 如實施例122之方法，其中溶離進一步包含

(a)使該親和樹脂與包含約20 mM至約100 mM Tris-HCl及約75 mM至約250 mM NaCl之第五緩衝液接觸，且其中該第五緩衝液之pH為約8.0至約8.8；及

(b)使該親和樹脂與包含約1 M硫酸銨、約50 mM Tris HCl及約50% (w/w)乙二醇之第二溶離緩衝液接觸，該第二溶離緩衝液之pH為至少約6.8。

124. 如實施例123之方法，其中依次進行該等步驟。

125. 如實施例1至124中任一項之方法，其中溶離包含使該親和樹脂與包含約1 M硫酸銨、約50 mM Tris HCl及約50% (w/w)乙二醇之溶離緩

衝液接觸，該緩衝液之pH為至少約6.8。

126. 如實施例1至125中任一項之方法，其中溶離包含使該親和樹脂與包含約20% (w/w)蔗糖、約10% (w/w)山梨糖醇、約5% (w/w)甘露糖醇或約5% (w/w)蔗糖、約15% (w/w)丙三醇、約50 mM組胺酸及約750至約1000 mM NaCl之溶離緩衝液接觸，該緩衝液之pH為至少約7.8。

127. 如實施例126之方法，其中溶離進一步包含

(a)使該親和樹脂與包含約20至約100 mM組胺酸、約80至約120 mM NaCl之第五緩衝液接觸，且其中該第五緩衝液之pH為約8.0至約8.8；且

(b)使該親和樹脂與包含約20 mM至約100 mM組胺酸、約600 mM至約900 mM NaCl及約5%至60% (w/w) DMSO之第二溶離緩衝液接觸，且其中該第五緩衝液之pH為約6.5至約8.5。

128. 如實施例127之方法，其中依次進行該等步驟。

129. 如實施例1至128中任一項之方法，其中溶離包含使該親和樹脂與包含約100 mM甘胺酸-HCl、約200 mM NaCl之溶離緩衝液接觸，該溶離緩衝液之pH為約2.5。

130. 如實施例109至129中任一項之方法，其中該溶離緩衝液之pH為約8.0。

131. 如實施例109至129中任一項之方法，其中該溶離緩衝液之pH為8.0。

132. 如實施例109至131中任一項之方法，其中溶離包含相對離子濃度逐步增加。

133. 如實施例109至132中任一項之方法，其中溶離包含有機溶劑濃度逐步增加。

134. 如實施例1至133中任一項之方法，其中溶離緩衝液中之鹽選自單價、二價或多價陰離子，諸如氯離子、乙酸根、硫酸根及檸檬酸根。

135. 如實施例1至134中任一項之方法，其進一步包含藉由施加0至100% (w/w) 20-50 mM鹽酸/800-1200 mM NaCl於0.5 mM至2.0 mM鹽酸之梯度溶離。

136. 如實施例1至135中任一項之方法，其中自該溶離步驟得到的該AAV之HC雜質含量 $\leq 99.9\%$ 。

137. 如實施例1至136中任一項之方法，其中自該溶離步驟得到的該AAV之HC雜質含量 $\leq 99.0\%$ 。

138. 如請求項1至137中任一項之方法，其中自該溶離步驟得到的該AAV之純度含量為99.0%或更高。

139. 如請求項1至138中任一項之方法，其中自該溶離步驟得到的該AAV之純度含量為99.9%或更高。

140. 如實施例1至139中任一項之方法，其中自該溶離步驟(c)溶離之至少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%的該等AAV衣殼為完整AAV衣殼。

141. 如實施例1至140中任一項之方法，其中該親和樹脂為AAVx樹脂。

142. 如實施例1至141中任一項之方法，其中該AAV為AAV9。

143. 如實施例142之方法，其中該AAV9包含含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2及/或SEQ ID NO: 3之序列的肽。

144. 如實施例1至143中任一項之方法，其中該方法進一步包含使該含有AAV之溶液與包含帶正電基團的過濾器接觸，該過濾器可有效地自該含有AAV之溶液耗乏酸性帶電污染物。

145. 如實施例1至144中任一項之方法，該方法進一步包含奈米過濾AAV部分，以移除大於35 nm之病毒。

146. 如實施例1至145中任一項之方法，該方法進一步包含精良步驟，其包含進行陽離子交換層析法。

147. 如實施例1至146中任一項之方法，該方法進一步包含經由AAV特異性ELISA測試AAV部分。

148. 如實施例147之方法，其中AAV特異性ELISA為對AAV具有特異性之夾心ELISA。

149. 一種AAV產物，其藉由如實施例1至148中任一項之方法產生。

【0265】以下實例僅為說明本發明而給出，且不得以任何方式限制其範疇。

實例1

【0266】以下實例描述用三重質體系統轉染HEK293細胞株以產生包含編碼所關注蛋白質之核酸的rAAV粒子之例示性方法。

【0267】使黏附HEK293細胞在懸浮液條件下在市售培養基中生長，該市售培養基經化學定義且不含動物來源之組分、蛋白質及血清，例如如WO2018128688之第[00146]至[00150]段中所述，其出於所有預期目的以引用之方式併入本文中。用三種質體轉染細胞：(1)輔助質體，其提供對於生產性AAV感染必需之輔助病毒功能；(2)*repcap*質體，其攜帶關於衣殼產生、複製及封裝病毒之所有資訊；及(3)含有所關注基因(GOI)之質

體，其封裝於所得rAAV粒子中。GOI之尺寸為2.6至3.0 kB。攜帶所關注基因之rAAV粒子在轉染後3至5天之時段處於HEK293細胞株中。

【0268】捕獲經轉染HEK293細胞培養物之上清液，例如如WO2018128688之第[00151]至[00155]段，表1及表2中所述，其出於所有預期目的以引用之方式併入本文中。濃縮且調節(透濾)捕獲的上清液，例如如WO2018128688之第[00156]至[00160]段，表3及表4中所述，其出於所有預期目的以引用之方式併入本文中。對透濾的濃縮物進行陰性層析，例如如WO2018128688之第[00161]至[00165]段，表5中所述，其出於所有預期目的以引用之方式併入本文中。

實例2

【0269】在用含有編碼所關注蛋白質之cDNA及AAV9之VP1、VP2及VP3的三重質體系統轉染之後，AAV9產生在HEK293細胞株中發展。AAV9含有約2.6至3.0 kB之載體DNA。使澄清的不含細胞之培養物上清液濃縮且用Pall Omega T-Series Cassette 100kDa透濾。使病毒粒子在非結合條件下(亦即在包含125 mM NaCl及50 mM TrisHCl之pH 8.5溶液中)裝載至膜吸附劑(MustangQ；Pall件號XT140MSTGQP05)上。藉由用25% HCl使含有AAV9流動通過以達到7.4與7.8之間的pH範圍，得到pH經調節的裝載液(Load)。

【0270】進行以下程序。首先，將含有POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂(目錄號36742；Thermo Fisher) ID 16mm之管柱(其床高度為 50 ± 0.5 mm，面積為 2.01 cm^2 及體積為約10 ml)用五個管柱體積之緩衝液活化，該緩衝液包含100 mM甘胺酸、200 mM NaCl (pH 2.0)。隨後用至少五個管柱體積之50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)平衡管

柱。將pH經調節的裝載液施加至含有POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂之管柱上。

【0271】隨後用五個管柱體積之第1次洗滌(W1)：50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第2次洗滌(W2)：100 mM乙酸鈉及0.1% Tween 80 (亦即聚山梨醇酯80)(pH 6.0)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第1次洗滌(W1)：50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第2次洗滌(W2)：100 mM乙酸鈉及0.1% Tween 80 (pH 6.0)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。對於所有此等洗滌步驟，線性流速為60 cm/h。

【0272】藉由施加五個管柱體積之以上第2次洗滌但在+2至+8°C之間的較低溫度下進行溶離。隨後在+2至+8°C之間的溫度下將五個管柱體積之以下二級溶離緩衝液(ELT緩衝液)施加至管柱：50 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、100 mM NaCl、5%海藻糖、0.003% Crillett™ 4 HP(亦即聚山梨醇酯80) (pH 7.0)。隨後在+2至+8°C之間的溫度下將五個管柱體積之以下溶離緩衝液施加至管柱：50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)。此等溶離步驟之線性流速為5 cm/h。隨後將五個管柱體積之純化水再次在+2至+8°C之間的溫度下施加至管柱。隨後進行梯度溶離。在15 cm/h之線性流速下及在+2至+26°C之間的溫度下施加十五個管柱體積之含1 mM至20 mM HCl之梯度的純化水，以清洗管柱。

【0273】以上程序更詳細地描述於表2中，其中「CV」表示在步驟中添加之溶液的管柱體積之數目。

表2：

步驟		緩衝液	緩衝液組成	CV	流速	溫度
1	活化	REG2	100mM甘胺酸、200mM NaCl pH 2.0	5	60 cm/h	+18-26℃
2	平衡	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	≥5	60 cm/h	+18-26℃
3	產物裝載	含有調節的 AAV之溶液	---	x	60 cm/h	+18-26℃
4	第1次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60 cm/h	+18-26℃
5	第2次洗滌	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	60 cm/h	+18-26℃
6	第3次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60 cm/h	+18-26℃
7	第4次洗滌	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	60 cm/h	+18-26℃
8	第1次溶離	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	5 cm/h	+2-8℃
9	第2次溶離	ELT	50mM甘胺酸、10mM組胺酸、 100mM NaCl、5%海藻糖、 0.003% Crillett 4 HP，pH 7.0 (ELT緩衝液)	5	5 cm/h	+2-8℃
10	第3次溶離	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	5 cm/h	+2-8℃
11	第5次洗滌	PW	純化水	5	5 cm/h	+2-8℃
12	第4次溶離	梯度	含1 mM至20 mM HCl/200mL NaCl之梯度的純化水	15	20 cm/h	+2-26℃

【0274】用於將管柱自室溫冷卻至約+2-8℃之方法包括：

- 冷卻機Unichromat1500中之層析滑座ÄKTA純150；
- 具有溫度夾套(水冷卻)之層析管柱；
- 用於溶離之冷緩衝液；或
- 以上之組合。

【0275】藉由ITR qPCR、針對AAV抗原之ELISA及針對HEK293

HCP之ELISA中之各者分析採集的樣品，以評估產率及該等步驟中是否可能發生損失。

【0276】使用ELISA量測AAV9抗原之數量。在TECAN Roboter系統上用AAV-9滴定ELISA套組(產品型號PRAAV9；Progen (德國，海德堡)進行ELISA。簡言之，將對AAV9衣殼具有特異性之單株抗體(AAV8/9抗體(「ADK8/9抗體」，目錄號03-651161, American Research Products公司, Waltham, MA))塗佈至微量滴定條帶上且用於自AAV部分捕獲AAV9粒子。藉由兩個步驟偵測到捕獲的AAV9粒子。在第一步驟中，對ADK8/9抗體具有特異性之與生物素結合的單株抗體結合至免疫複合物(ADK8/9及ADK8/9抗體之免疫複合物)。將抗生蛋白鏈菌素過氧化酶結合物添加至結合至與生物素結合的單株抗體之免疫複合物中且使該等抗生蛋白鏈菌素過氧化酶結合物與生物素反應。添加過氧化酶受質溶液且發生與所結合AAV粒子之量成正比的色彩反應。在450 nm下以光學形式量測色彩反應。

【0277】ITR-qPCR分析用於藉由量化編碼所關注基因(例如，人類因子VIII或人類因子IX)之載體中發現的反向串聯重複序列來確定基因組複本滴定。HEK-HCP為藉由ELISA量測殘餘宿主細胞蛋白質。藉由比色活性分析確定LDH。

【0278】在活體外生物效能分析中，病毒載體AAV9感染肝目標細胞株，其隨後使功能性可量測之編碼蛋白質分泌至培養基中。在第一步驟中，HepG2目標細胞經AAV9轉導感染。在培育期間，使編碼蛋白質釋放至細胞上清液中。在第二步驟中，藉由活性分析直接量測編碼蛋白質對細胞培養物上清液之活性。AAV9樣品之量測值以相對於參考物質之百分比形式給出。該方法允許定量評定AAV9基因療法載體之生物功能。

【0279】當使用具有洗滌步驟之測試程序代替比較程序時，進行 SDS-PAGE 分析，以確定熱衝擊蛋白質 70 kDa (HSP70) 是否降低。使用抗 Hsp70 抗體(Abcam，目錄號ab79852)作為初級抗體(以 1:2000 稀釋度)持續兩個小時且使用山羊抗兔 igG (H+L) AP 結合物(Sigma，目錄號A8025)作為二級抗體(以 1:1000 稀釋度)持續一小時進行西方墨點法。

【0280】進行 SDS-PAGE 銀染色分析，以確定所存在雜質之總含量。進行分析型超速離心(AUC)以定量所存在 AAV9 之量，以確定完整衣殼、空衣殼及相比於完整衣殼具有額外 DNA 之彼等衣殼(亦即過度填充的衣殼)的相對量。

【0281】根據測試及比較程序，使用 12% 抗 AAV 抗體進行西方墨點法，以確定在純化之後回收的 AAV9 之含量及純度。使用針對 AAV9 之 VP1、VP2 及 VP3 的單株抗體作為初級抗體，使用山羊抗小鼠 ALP 抗體 (Sigma，目錄號A4656)作為二級抗體進行西方墨點法。

【0282】此等分析概述於下表 3 中。

表3：

優先權	測試	部分(BDS、UC或兩者)	樣品體積 TMAE	儲存及剝離條件
1	AAV9 ELISA	所選擇部分	0.2 mL	≤ -60°C
2	分析型超速離心(AUC)	所選擇部分	0.5 mL	≤ -60°C
3	GOI 滴定(ITR-qPCR)	所選擇部分	0.2 mL	≤ -60°C
4	藉由非變性/鹼性瓊脂糖凝膠電泳進行 AAV9 瓊脂糖凝膠 DNA 分析	所選擇部分	0.2 mL	≤ -60°C
5	SDS PAGE (8%，WB，銀染色)	所選擇部分	0.1 mL	≤ -60°C
6	生物效能	所選擇部分	0.2 mL	≤ -60°C
總計			1.4 mL	

實例3

【0283】在用含有編碼相關蛋白質之cDNA及AAV9之VP1、VP2及VP3的三重質體系統轉染之後，AAV9產生在HEK293細胞株中發展。AAV9含有約2.6至3.0 kB之載體DNA。使澄清的不含細胞之培養物上清液濃縮且用Pall Omega T-Series Cassette 100kDa透濾。使病毒粒子在非結合條件下(亦即在包含125 mM NaCl及50 mM TrisHCl之pH 8.5溶液中)裝載至膜吸附劑(MustangQ；Pall件號XT140MSTGQP05)上。藉由用25% HCl使含有AAV9流動通過以達到8.2與8.7之間的pH範圍，得到pH經調節的裝載液。

【0284】進行以下程序。應注意，此實例中所揭示之所有緩衝液在室溫下進行且在室溫下量測所有緩衝液之pH。首先，將含有POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂(目錄號36742；Thermo Fisher) ID 16mm之管柱(其床高度為 50 ± 0.5 mm，面積為 2.01 cm^2 及體積為約10 ml)用五個管柱體積之100 mM甘胺酸、200 mM NaCl (pH 2.0)活化。隨後用至少10個管柱體積之50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)平衡管柱。將pH經調節的裝載液施加至含有POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂之管柱上。

【0285】隨後用五個管柱體積之第1次洗滌(W1)：50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第2次洗滌(W2)：100 mM乙酸鈉及0.1% Tween 80 (pH 6.0)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第1次洗滌(W1)：50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。對於所有此等洗滌步驟，線性流速為60 cm/h。

【0286】藉由施加10個管柱體積之以上第1次洗滌但在+2至+8°C之間的較低溫度下進行溶離。對於溶離(亦即，下表4中之步驟7)，經由將層

析滑座、管柱及緩衝液置放於冷卻櫃(Unichromat 1500)中，所有物件均降至低於+8℃。溶離之線性流速為5 cm/h。隨後用五個管柱體積之100 mM甘胺酸、200 mM NaCl在pH為2.0下汽提管柱。

【0287】以上程序更詳細地描述於表4中，其中「CV」表示在步驟中添加之溶液的管柱體積之數目。

表4：

步驟		緩衝液	緩衝液組成	量 [CV]	流速	溫度
1	活化	REG2	100mM甘胺酸、200mM NaCl pH 2.0	5	60cm/h	+18-26℃
2	平衡	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	10	60cm/h	+18-26℃
3	產物裝載	含有調節的 AAV之溶液	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	--	60cm/h	+18-26℃
4	第1次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+18-26℃
5	第2次洗滌	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	60cm/h	+18-26℃
6	第3次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+18-26℃
7	溶離	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	10	5cm/h	+2-8℃
8	第4次洗滌	TBS	150mM NaCl 20mM TrisHCl 0.1%Tween80 pH 7.4	5	60cm/h	+2-8℃
9	汽提	REG2	100mM甘胺酸、200mM NaCl pH 2.0	5	15cm/h	+2-8℃

【0288】來自以上程序之層析圖展示於圖1中。來自表4之方案的結果展示於下表5中。E1區「低溫溶離液」值反映上表4之步驟7之後的量。

「汽提」值反映上表4之步驟9之後的量。表5清楚地表明，溶離係由溫度變化(至+2- +8℃)引起，因為第1次洗滌及第3次洗滌使用相同緩衝液(亦

即125 mM NaCl及50 mM，pH 8.5)但在室溫(亦即+18至25℃)下進行，未引起AAV9之顯著溶離。

表5：

	溫度 [°C]	量 [g]	qPCR vg/ml x10 ¹¹	總 qPCR vg x10 ¹¹	qPCR [%]	AAV9 抗原 cp/ml x10 ¹¹	AAV9 總抗原 cp x10 ¹¹	抗原 [%]	比率 qPCR/抗原 vg/cp
裝載	+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區	+2-8	48.93	64.20	3141.31	75.75	57.50	2813.48	44.83	1.117
汽提	+2-8	52.80	2.11	111.41	2.69	20.1	1061.28	16.91	0.105

LOQ：低於偵測極限； ---：由於DNA量低於偵測極限，無法計算；

E1區為溶離液

【0289】此外，表4中所述之方法的所量測雜質含量展示於下表6中。採集初始樣品之雜質樣品且在步驟7之後重複。

表6：

	量 [g]	HEK293 HCP µg/ml	總HEK293 HCP µg	[%]
裝載液	1135.17	541.6	545174.56	100.00
E1區	48.93	1.724	84.36	0.02

【0290】表7檢查基於粒度確定之完整衣殼%及過度填充的衣殼%。如本文所用，粒度係在Svedberg之範圍內給出，其基於粒子之沈積率。

表7：

操作設置	空衣殼% S 60至65	群體下% S 70至74	完整衣殼% S 86至90	過度填充的% S 99至104
E1區	1.9	7.1	87.5	3.4
汽提	71.1	6.7	11.3	10.9

【0291】如本文所用，術語「產率qPCR」係指與裝載液中之qPCR

之初始量相比，存在的qPCR之百分比。如本文所用，術語「產率qPCR」係指與裝載液中之AAV9之初始量相比，存在的AAV9之百分比。如藉由qPCR (表5)所量測之75.8%產率及具有完整衣殼之AAV9的87.5% (表7)表示此實例中所述之低溫溶離液方案提供了AAV9完整衣殼之實質上富集。

【0292】將來自以上程序之層析圖資料與標準溶離程序(如表8中所示，100 mM甘胺酸及200 mM NaCl，pH 2.7)相比，且結果展示於下表9中。兩種操作之起始物質相同。

表8：

步驟		緩衝液	緩衝液組成	量 [CV]	流速	溫度
1	活化	REG2	100mM甘胺酸、200mM NaCl pH 2.0	5	60cm/h	+18-26℃
2	平衡	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	10	60cm/h	+18-26℃
3	產物裝載	含有調節的 AAV9之溶液	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	--	60cm/h	+18-26℃
4	第1次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+18-26℃
5	第2次洗滌	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	60cm/h	+18-26℃
6	第3次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+18-26℃
7	溶離	REG	100mM甘胺酸 200mM NaCl pH 2.7	10	30cm/h	+18-26℃

表9：

操作設置	空衣殼% S 60至65	群體下% S 70至74	完整衣殼% S 86至90	過度填充的% S 99至104
標準溶離	18.8	7.1	71.1	3.0
低溫溶離	1.9	7.1	87.5	3.4

【0293】表10及表11提供來自表8之標準溶離程序之額外資料。

表10：

	量 [g]	qPCR [vg/ml x10 ¹¹]	總 qPCR [vg x10 ¹¹]	qPCR [%]	AAV9 抗原 [cp/ml x10 ¹¹]	AAV9 總抗原 [cp x10 ¹¹]	AAV9 抗原 [%]	比率 qPCR/抗原 [vg/cp]
裝載	6049	2.79	16861.59	100	5.76	34842.24	100	0.48
溶離	136.87	142.5	19503.29	115.67	207.5	28399.53	81.51	0.69

表11：

	量 [g]	HEK293 HCP [μg/ml]	總HEK293 HCP [μg]	[%]
裝載	6049	528.4	3196291.60	100
溶離	136.87	1.872	256.21	0.01

【0294】如表5中所表明，AAV9在室溫(亦即約20-28℃)下結合於CaptureSelect™ AAVx樹脂上，且出人意料且意外地發現，所結合AAV9可隨後在相同緩衝系統中在高於+18℃至低於+8℃之溫度變化下溶離。因此，溫度變化方案具有在低溫下溫和溶離，以幫助保持AAV粒子之結構及/或感染性之益處。同樣，使用溫和溶離緩衝液可易於在製造環境中實施且更為高效，因為在溶離步驟中不需要緩衝液變化。此外，有利地發現，完整AAV9衣殼藉由降低溫度進行溶離，而空及非特異性AAV9載體保持結合，直至其用步驟汽提酸性溶離進行溶離(參見表7)。

實例4

【0295】實例3表明在高於+18℃至低於+8℃之溫度變化下使用125 mM NaCl及50 mM TrisHCl之緩衝液(pH 8.5)自CaptureSelect™ AAVx溶離AAV9。進行此實例以檢查用於在高於+18℃至低於+8℃之溫度變化下自AAVx溶離AAV9之替代緩衝系統的潛能。在將AAV9裝載至AAVx樹脂上之後，首先在較高溫度範圍下將緩衝液作為洗滌緩衝液且隨後在較低溫度下作為溶離緩衝液施加。

【0296】在用含有編碼相關蛋白質之cDNA及AAV9之VP1、VP2及VP3的三重質體系統轉染之後，AAV9產生在HEK293細胞株中發展。AAV9含有約2.6至3.0 kB之載體DNA。使澄清的不含細胞之培養物上清液濃縮且用Pall Omega T-Series Cassette 100kDa透濾。使病毒粒子在非結合條件下(亦即在包含125 mM NaCl及50 mM TrisHCl之pH 8.5溶液中)裝載至膜吸附劑(MustangQ；Pall件號XT140MSTGQP05)上。藉由用25% HCl使含有AAV9流動通過以達到8.2與8.7之間的pH範圍，得到pH經調節的裝載液。

【0297】進行以下程序。應注意，此實例中所揭示之所有緩衝液在室溫下進行且在室溫下量測所有緩衝液之pH。

【0298】首先在較高溫度(+18至+28°C)下施加pH及導電性增加的三種緩衝液，以證實AAV9仍結合於配位體上。在將管柱冷卻至+2至+8°C後，其中經由將層析滑座、管柱及緩衝液置放於冷卻櫃(Unichromat 1500)中，所有物件均降至低於+8°C，隨後施加相同緩衝液以檢查溶離特性。首先，將含有POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂(目錄號36742；Thermo Fisher) ID 11 mm之管柱(其床高度為57 mm，面積為0.95 cm²及體積為約5.4 ml)用五個管柱體積之緩衝液活化，該緩衝液包含100 mM甘胺酸、200 mM NaCl (pH 2.0)。隨後用至少五個管柱體積之50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)平衡管柱。將pH經調節的裝載液施加至含有POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂之管柱上。

【0299】隨後用五個管柱體積之第1次洗滌(W1)：50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第2次洗滌(W2)：100 mM乙酸鈉及0.1% Tween 80 (pH 6.0)及在

室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第1次洗滌(W1)：50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第2次洗滌(W2)：100 mM乙酸鈉及0.1% Tween 80 (pH 6.0)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。對於所有此等洗滌步驟，線性流速為60 cm/h。

【0300】首先藉由施加五個管柱體積之以上第2次洗滌但在+2至+8°C之間的較低溫度下以5 cm/h之線性流速進行溶離。隨後在+2至+8°C之間的溫度下將五個管柱體積之以下二級溶離緩衝液施加至管柱：50 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、100 mM NaCl、5%海藻糖、0.005% CrillettTM 4 HP (pH 7.0) (ELT緩衝液)。隨後在+2至+8°C之間的溫度下將五個管柱體積之以下溶離緩衝液施加至管柱：50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)。此等溶離步驟之線性流速為30 cm/h。隨後將五個管柱體積之純化水再次在+2至+8°C之間的溫度下施加至管柱。隨後進行梯度溶離。以20 cm/h之線性流速且在+2至+8°C之間的溫度下施加15個管柱體積之含1 mM至20 mM HCl、200 mM NaCl之梯度的純化水。

【0301】藉由施加五個管柱體積之以下再生緩衝液：含20 mM HCl、200 mM NaCl之純化水，接著以60 cm/h施加五個管柱體積之50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)，接著在+2至+8°C之間的溫度下以30 cm/h之線性流速施加五個管柱體積之1M L-精胺酸單氫氯化物+200 mM NaCl進行管柱清潔。

【0302】以上程序更詳細地描述於表12中，其中「CV」表示在步驟中添加之溶液的管柱體積之數目。

表12：

步驟		緩衝液	緩衝液組成	量 (CV)	流速	溫度
1	活化	REG2	100mM甘胺酸、200mM NaCl pH 2.0	5	60cm/h	+18-26℃
2	平衡	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	10	60cm/h	+18-26℃
3	產物裝載	含有調節的 AAV9之溶液	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	--	60cm/h	+18-26℃
4	第1次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+18-26℃
5	第2次洗滌	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	60cm/h	+18-26℃
6	第3次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+18-26℃
7	第4次洗滌	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	60cm/h	+18-26℃
8a	第1.1次 溶離 冷卻	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	5cm/h	+2-8℃
8b	第1.2次 溶離	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	30cm/h	+2-8℃
9	第2次 溶離	ELT	50mM甘胺酸、10mM組胺酸、 100mM NaCl、5%海藻糖、 0.005% Crillet 4 HP，pH 7.0 (ELT緩衝液)	5	30cm/h	+2-8℃
10	第3次 溶離	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	30cm/h	+2-8℃
11	第5次 洗滌	PW	純化水	5	30cm/h	+2-8℃
12	第4次 溶離	梯度	含1 mM至20 mM HCl/200 mM NaCl之梯度的 純化水	15	20cm/h	+2-8℃
13	第1次 汽提	STR1	含20mM HCl 200mM NaCl之 純化水	5	60cm/h	+2-8℃

14	第2次 汽提	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+2-8℃
15	第3次 汽提	STR3	1M精胺酸單氫氯化物+200 mM NaCl (pH非變性，約pH 5.6	5	30cm/h	+2-8℃

【0303】來自以上程序之結果，且特定言之，自管柱溶離之AAV9的產率百分比展示於下表13中。來自以上程序之層析圖展示於圖2A-2B中。

表13：

	溫度 [℃]	量 [g]	ddPCR vg/ml x10 ¹¹	總 ddPCR vg x10 ¹¹	ddPCR [%]	AAV9 抗原 cp/ml x10 ¹¹	AAV9 總抗原 cp x10 ¹¹	AAV9抗 原 [%]	比率 qPCR/抗原 vg/cp
裝載	+22-28	1004.46	1.61	1617.18	100.00	2.86	2872.76	100.00	0.563
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

LOQ：低於偵測極限； ---：由於DNA量低於偵測極限，無法計算；

*：E1.1及E1.2區，在E1.1的主峰及E1.2的尾部收集溶離液。

【0304】如所示，亦用除125 mM NaCl、50 mM Tris HCl (pH 8.5) 以外之緩衝液證實在較低溫度範圍下之溶離。此外，表12中所述之方法的所量測雜質含量展示於下表14中。在溶離步驟(步驟8a、8b、9、10及12)中之各者之後採集雜質樣品。

表14：

	量 [g]	HEK293 HCP μg/ml	總HEK293 HCP μg	[%]
裝載液	1004.46	507.5	509763.45	100.00
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

【0305】對實例3與實例4之緩衝液之間的低溫溶離之比較展示於下表15中。

表15：

步驟		實例4	量 [CV]	實例3	量 [CV]	溫度
1	活化	100mM甘胺酸、200mM NaCl pH 2.0	5	100mM甘胺酸、 200mM NaCl pH 2.0	5	+18-26℃
2	平衡	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	10	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	10	+18-26℃
3	產物裝載	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	--	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	--	+18-26℃
4	第1次洗滌	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	+18-26℃
5	第2次洗滌	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	+18-26℃
6	第3次洗滌	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	+18-26℃
7	第4次洗滌	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	x	x	+18-26℃
8	第1次溶離 冷卻	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	10	x	x	+2-8℃
9	第2次溶離	50mM甘胺酸、10mM組胺酸、100mM NaCl、5%海藻糖、0.005% Crillet 4 HP，pH 7.0 (ELT緩衝液)	5	x	x	+2-8℃

10	第3次 溶離	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	10	+2-8℃
11	第5次 洗滌	純化水	5	150mM NaCl 20mM TrisHCl 0.1%Tween80 pH 7.4	5	+2-8℃
12	第4次 溶離	含1 mM至20 mM HCl/200 mM NaCl之梯度的 純化水	15	x	x	+2-8℃
13	第1次 汽提	含20mM HCl 200mM NaCl之 純化水	5	x	x	+2-8℃
14	第2次 汽提	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	x	x	+2-8℃
15	第3次 汽提	1M精胺酸單氫氯化物+200 mM NaCl (pH原生，約pH 5.6	5	100mM甘胺酸、 200mM NaCl pH 2.0	5	+2-8℃

表16：

緩衝液 組成	實例3				實例4			
	空面 積%	子群體 面積%	完整面 積%	過度填充 的面積%	空面 積%	子群體 面積%	完整面 積%	過度填 充的面 積%
100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	n.a	n.a	n.a	n.a	11.8	0.5	77.0	10.6
50mM甘胺酸、10mM 組胺酸、100mM NaCl、5%海藻糖、 0.005% Crillet 4 HP， pH 7.0 (ELT緩衝液)	n.a	n.a	n.a	n.a	-*	-*	-*	-*
125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	1.9	7.1	87.5	3.4	29.5	2.0	64.1	4.3

n.a=未施加；*=因AUC分析之濃度過低未測試。

【0306】用100 mM乙酸鈉、0.1% (w/w)聚山梨醇酯(pH 6.0)在+2至

+8°C 之間且不在室溫下證實溶離(參見表16)。其值得注意的是，在低溫下 100 mM 乙酸鈉之 pH 及導電性與 125 mM NaCl、50 mM TrisHCl (pH 8.5) 相反，因為溶離效率通常隨著 pH 自 pH 6 增加至 pH 8.5 而增大。因此，實例4表明溫度為溶離之驅動力且 pH 及導電性對溶離之影響小於溫度。亦證實，具有溫度變化之此親和方法產生較高含量之完整 AAV 衣殼。

【0307】因此，實例3及4表明，自 AAV_x 溶離 AAV9 之作用模式主要取決於降低溫度，與緩衝系統無關。

實例5

【0308】根據下文所述之程序產生 AAV9 之批料吸收。在室溫下用含有 AAV9 之溶液培育兩組以上兩種不同的樹脂，首先結合 AAV9，接著在較低溫度下溶離。該程序概述於下表17中。應注意，此實例中所揭示之所有緩衝液在室溫下進行且在室溫下量測所有緩衝液之 pH。

【0309】實例5之步驟如下：平衡：將 0.2 g 樹脂插入 15 ml 法爾康管 (Falcon tube) 中且用 10 ml 125 mM NaCl、50 mM Tris HCl (pH 8.5±0.2) 洗滌。使懸浮液在 5500RPM 下離心 (HERAEUS MEGAFUGE 16R, THERMO SCIENTIFIC) 10 分鐘且丟棄上清液。將 9.6 g 裝載液添加至經洗滌/平衡樹脂中且在室溫下培育 15 小時至 16 小時。在 5500RPM 下使懸浮液離心 10 分鐘。等分上清液且測試 AAV9 抗原。用 1 ml 低溫 125 mM NaCl、50 mM Tris HCl (pH 8.5±0.2) (+2°C 至 +8°C) 使離心塊再懸浮且培育 30 分鐘。在 5500RPM 下使懸浮液離心 10 分鐘。等分上清液且測試 AAV9 抗原。AAV9 含有約 2.6 至 3.0 kB 之載體 DNA。對於溶離，使用低溫緩衝液，且在低溫室中進行實驗。

表17：

步驟	溫度	Capture Select AAV9 低溫溶離	Capture Select AAVX 低溫溶離
樹脂(平衡)	+18℃至+30℃	0.2g	0.2g
裝載液	+18℃至+30℃	9.6g	9.6g
培育	+18℃至+30℃	15至16h	
離心	+18℃至+30℃	10分鐘/5500RPM	
上清液	移除上清液，取出樣品，進一步處理離心塊		
溶離	+2℃至+8℃	1ml [125mM NaCl 50mM Tris HCl， pH 8.5±0.2]	1ml [125mM NaCl 50mM Tris HCl， pH 8.5±0.2]
培育	+2℃至+8℃	30分鐘	
離心	+2℃至+8℃	10分鐘/5500RPM	
樣品溶離液	移除上清液，取出樣品，進一步處理離心塊		

【0310】來自以上程序之結果，且特定言之，自管柱溶離之AAV9的產率百分比展示於下表18中。

表18：

部分	溫度	Capture Select AAV9 [AAV9抗原%]	Capture Select AAVX [AAV9抗原%]
裝載液	+18℃至+30℃	100	100
上清液	+18℃至+30℃	-	6.2
樣品溶離液	+2℃至+8℃	-	36.7

【0311】另外，第二組使用在較低溫度下培育之不同樹脂來研究此等條件下之結合特性。程序概述於下表19中。

表19：

步驟	溫度	Capture Select AAV9 低溫溶離	Capture Select AAVX 低溫溶離
樹脂(平衡)	+2℃至+8℃	0.2g	0.2g
含有AAV9之溶液 =裝載	+2℃至+8℃	9.6g	9.6g
培育	+2℃至+8℃	15至16h	

離心	+2℃至+8℃	10分鐘/5500RPM
上清液	移除上清液，取出樣品，進一步處理離心塊	

【0312】來自以上程序之結果，且特定言之，自管柱溶離之AAV9的產率百分比展示於下表20中。

表20：

部分	溫度	Capture Select AAV9 [AAV9抗原%]	Capture Select AAVX [AAV9抗原%]
裝載液	+2℃至+8℃	100	100
上清液	+2℃至+8℃	LOQ	63.7

【0313】AAV9在每一溫度範圍結合於CaptureSelect™ AAV9上，溶離無法在較低溫度下觸發。因此，此實例表明在低溫下之溶離為AAV9與AAVx親和樹脂之間相互作用之特徵。

【0314】亦觀測到，當溫度自高於+18℃變化至低於+8℃時，AAV8及AAV6未自AAVx樹脂溶離。替代地，AAV8及AAV6需要更嚴格條件，以使其自AAVx親和樹脂溶離(例如，參見以下實例6)。

實例6

【0315】在用含有編碼相關蛋白質之cDNA及AAV8之VP1、VP2及VP3的三重質體系統轉染之後，AAV8產生在HEK293細胞株中發展。使澄清的不含細胞之培養物上清液濃縮且用Pall Omega T-Series Cassette 100kDa透濾。使病毒粒子在非結合條件下(亦即在包含125 mM NaCl及50 mM TrisHCl之pH 8.5溶液中)裝載至膜吸附劑(MustangQ；Pall件號XT140MSTGQP05)上。藉由用25% HCl使含有AAV8流動通過以達到8.3與8.7之間的pH範圍，得到pH經調節的裝載液。

【0316】進行以下測試程序。應注意，此實例中所揭示之所有緩衝液在室溫下進行且在室溫下量測所有緩衝液之pH。首先，將含有

POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂(目錄號36742; Thermo Fisher) ID 16mm之管柱(其床高度為52 mm, 面積為2.01 cm²及體積為約10.5 ml)用5個管柱體積之包含100 mM甘胺酸、200 mM NaCl之緩衝液(pH 2.0)活化。隨後用至少五個管柱體積之50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)平衡管柱。將pH經調節的裝載液施加至含有POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂之管柱上。

【0317】隨後用五個管柱體積之第1次洗滌(W1): 50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第2次洗滌(W2): 100 mM乙酸鈉及0.1% Tween 80 (pH 6.0)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第1次洗滌(W1): 50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。隨後用五個管柱體積之第2次洗滌(W2): 100 mM乙酸鈉及0.1% Tween 80 (pH 6.0)及在室溫(18°C至26°C)下洗滌管柱。對於所有此等洗滌步驟, 線性流速為60 cm/h。

【0318】對於溶離, 經由將層析滑座、管柱及緩衝液置放於冷卻櫃(Unichromat 1500)中, 所有物件均降至低於+8°C。首先藉由施加五個管柱體積之以上第2次洗滌但在+2至+8°C之間的較低溫度下以5 cm/h之線性流速進行溶離。隨後在+2至+8°C之間的溫度下將五個管柱體積之以下二級溶離緩衝液施加至管柱: 50 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、100 mM NaCl、5%海藻糖、0.005% Crillett™ 4 HP, pH 7.0 (ELT緩衝液)。隨後在+2至+8°C之間的溫度下將五個管柱體積之以下溶離緩衝液施加至管柱: 50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)。此等溶離步驟之線性流速為30 cm/h。隨後將五個管柱體積之純化水再次在+2至+8°C之間的溫度下

施加至管柱。隨後進行梯度溶離。以20 cm/h之線性流速且在+2至+8℃之間的溫度下施加15個管柱體積之含1 mM至20 mM HCl、200 MM NaCl之梯度的純化水。

【0319】以上程序更詳細地描述於表21中，其中「CV」表示在步驟中添加之溶液的管柱體積之數目。

表21：

步驟		緩衝液	緩衝液組成	量 (CV)	流速	溫度
1	活化	REG2	100mM甘胺酸、200mM NaCl pH 2.0	5	60cm/h	+18-26℃
2	平衡	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	10	60cm/h	+18-26℃
3	產物裝載	含有經調節 AAV8之溶液	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	--	60cm/h	+18-26℃
4	第1次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+18-26℃
5	第2次洗滌	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	60cm/h	+18-26℃
6	第3次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+18-26℃
7	第4次洗滌	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	5	60cm/h	+18-26℃
8	第1次溶離 冷卻	W2	100mM乙酸鈉/ 0.1% Tween 80 pH 6.0	10	5cm/h	+2-8℃
9	第2次溶離	ELT	50mM甘胺酸、10mM組胺酸、 100mM NaCl、5%海藻糖、 0.005% Crillet 4 HP，pH 7.0 (ELT 緩衝液)	5	30cm/h	+2-8℃
10	第3次溶離	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	30cm/h	+2-8℃

11	第5次洗滌	PW	純化水	5	30cm/h	+2-8℃
12	第4次溶離	梯度	含1 mM至20 mM HCl/200 mM NaCl之梯度的純化水	15	20cm/h	+2-8℃
13	第1次汽提	STR1	含20mM HCl 200mM NaCl之純化水	5	60cm/h	+2-8℃
14	第6次洗滌	STR2	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+2-8℃

【0320】來自以上程序之結果，且特定言之，自管柱溶離之AAV8的產率百分比展示於下表22及圖3中。

表22：

	量 [g]	ITR-qPCR vg/ml x10 ¹¹	總 ITR-qPCR vg x10 ¹¹	ITR-qPCR [%]	AAV8 抗原 cp/ml x10 ¹¹	AAV8 總抗原 cp x10 ¹¹	抗原 [%]	比率 qPCR/抗原 vg/cp
裝載液	1636.44	19.00	31092.36	100.0%	23.2	37965.408	100.00%	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	區	17182	55.26	區	28774	75.79	0.597

【0321】如所示，AAV8無法在+2℃至+8℃之溫度變化的情況下自AAVx溶離。

實例7

【0322】以下程序為單次洗滌方案之實例。首先，將含有POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂(目錄號36742；Thermo Fisher) ID 16mm之管柱(其床高度為50±0.5 mm，面積為2.01 cm²及體積為約10 ml)用五個管柱體積之緩衝液活化，該緩衝液包含100 mM甘胺酸、200 mM NaCl (pH 2.0)。隨後用10個管柱體積之50 mM TrisHCl及125 mM NaCl

(pH 8.5)平衡管柱。將pH經調節的裝載液施加至含有POROS™ CaptureSelect™ AAVX親和樹脂之管柱上。

【0323】隨後用五個管柱體積之第1次洗滌(W1)：50 mM TrisHCl及125 mM NaCl (pH 8.5)及在室溫(18℃至26℃)下洗滌管柱。藉由施加五至10個管柱體積之以上第1次洗滌但在+2至+8℃之間的較低溫度下進行溶離。隨後對管柱進行汽提。

【0324】以上程序更詳細地描述於表23中，其中「CV」表示在步驟中添加之溶液的管柱體積之數目。

步驟		緩衝液	緩衝液組成	量 (CV)	流速	溫度
1	活化	REG2	100mM甘胺酸、200mM NaCl pH 2.0	5	60cm/h	+18-26℃
2	平衡	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	10	60cm/h	+18-26℃
3	產物裝載	含有調節的 AAV9之溶液	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	--	60cm/h	+18-26℃
4	第1次洗滌	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5	60cm/h	+18-26℃
5	第1次溶離 冷卻	W1	125mM NaCl / 50mM TrisHCl pH 8.5	5至10	5cm/h	+2-8℃
6	汽提	REG2	100mM甘胺酸、200mM NaCl pH 2.0	5	60cm/h	+2-8℃

實例8

【0325】以下序列說明根據本發明之一些實施例之AAV9 VP1序列 (SEQ ID NO: 1)的實例。

1020304050

MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY

60708090100

KYLGPNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LKYNHADAEF
110	120	130	140	150
QERLKEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRLLEPLG	LVEEAAKTAP	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
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
FAWPGASSWA	LNGRNSLMNP	GPAMASHKEG	EDRFFPLSGS	LIFGKQGTGR
560	570	580	590	600
DNVDADKVM	TNEEEIKTTN	PVATESYGQV	ATNHQSAQAQ	AQTGWVQNQG
610	620	630	640	650
ILPGMVWQDR	DVYLQGPWA	KIPHTDGNFH	PSPLMGGFGM	KHPPPQILIK
660	670	680	690	700
NTPVPADPPT	AFNKDKLSF	ITQYSTGQVS	VEIEWELQKE	NSKRWNPEIQ
710	720	730		
YTSNYYKSNN	VEFAVNTEGV	YSEPRPIGTR	YLTRNL	

【0326】以下序列說明根據本發明之一些實施例之AAV9 VP2序列

的實例，其中AAV9 VP2序列包含SEQ ID NO: 2之序列。

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
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
FAWPGASSWA	LNGRNSLMNP	GPAMASHKEG	EDRFFPLSGS	LIFGKQGTGR
560	570	580	590	600
DNVDADKVM	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		
YTSNYYKSNN	VEFAVNTEGV	YSEPRPIGTR	YLTRNL	

【0327】 以下序列說明根據本發明之一些實施例之AAV9 VP2序列的實例，其中AAV9 VP3序列包含SEQ ID NO: 3之序列。

203	210	220	230	240	250
MASGGGAP	VADNNEGADG	VGSSSGNWHC	DSQWLGDRV	ITSTRTWALP	
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	

FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFFPLSGS 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
YTSNYYKSNN VEFVNTEGV YSEPRPIGTR YLTRNL

【0328】 本文所引用之所有參考文獻(包括公開案、專利申請案及專利)均以引用的方式併入本文中，該引用程度就如同各參考文獻個別及特定指示以引用的方式併入且全文闡述於本文一般。

【序列表】

<110> 日商武田藥品工業股份有限公司 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED)

<120> 腺相關病毒純化方法

<140> 109121962

<141> 2020-06-29

<150> US 62/868,282

<151> 2019-06-28

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 736

<212> PRT

<213> 腺相關病毒9

<400> 1

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
 20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110

Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Pro
115					120					125					
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
130					135					140					
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly
145					150					155					160
Lys	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
165					170					175					
Gly	Asp	Thr	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	Pro
180					185					190					
Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
195					200					205					
Ala	Pro	Val	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ser
210					215					220					
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile
225					230					235					240
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu
245					250					255					
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Asp	Asn
260					265					270					
Ala	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg
275					280					285					
Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn
290					295					300					
Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile

1133164876-0

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val

705

710

715

720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

725

730

735

<210> 2

<211> 599

<212> PRT

<213> 腺相關病毒9

<400> 2

Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro

1

5

10

15

Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys

20

25

30

Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro

35

40

45

Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu

50

55

60

Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly

65

70

75

80

Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln

85

90

95

Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu

100

105

110

Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser

115

120

125

Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp

130

135

140

Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp

145	150	155	160
Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu			
165	170	175	
Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn			
180	185	190	
Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe			
195	200	205	
Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu			
210	215	220	
Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr			
225	230	235	240
Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser			
245	250	255	
Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn			
260	265	270	
Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser			
275	280	285	
Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp			
290	295	300	
Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn			
305	310	315	320
Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val			
325	330	335	
Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val			
340	345	350	

Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn	Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	
			355				360					365				
Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	
	370					375					380					
Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	
385					390					395					400	
Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly	Lys	Gln	Gly	Thr	Gly	Arg	Asp	Asn	Val	
				405					410					415		
Asp	Ala	Asp	Lys	Val	Met	Ile	Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	
			420					425					430			
Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Tyr	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Asn	His	Gln	
	435						440					445				
Ser	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Gln	Thr	Gly	Trp	Val	Gln	Asn	Gln	Gly	Ile	
	450					455					460					
Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	Asp	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	
465					470					475					480	
Ile	Trp	Ala	Lys	Ile	Pro	His	Thr	Asp	Gly	Asn	Phe	His	Pro	Ser	Pro	
				485					490					495		
Leu	Met	Gly	Gly	Phe	Gly	Met	Lys	His	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	
			500					505					510			
Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Ala	Phe	Asn	Lys	Asp	
			515				520					525				
Lys	Leu	Asn	Ser	Phe	Ile	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	
	530					535					540					
Glu	Ile	Glu	Trp	Glu	Leu	Gln	Lys	Glu	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	

545

550

555

560

Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe

565

570

575

Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr

580

585

590

Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

595

<210> 3

<211> 534

<212> PRT

<213> 腺相關病毒9

<400> 3

Met Ala Ser Gly Gly Gly Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala

1

5

10

15

Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp

20

25

30

Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro

35

40

45

Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly

50

55

60

Gly Ser Ser Asn Asp Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly

65

70

75

80

Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp

85

90

95

Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn

100

105

110

Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly

115

120

125

Val Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr

130135140

Asp Ser Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly

145150155160

Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly

165170175

Tyr Leu Thr Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe

180185190

Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn

195200205

Phe Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr

210215220

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln

225230235240

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln

245250255

Gln Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln

260265270

Gly Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser

275280285

Thr Thr Val Thr Gln Asn Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala

290295300

Ser Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro

305310315320

Ala Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser
325 330 335

Gly Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp
340 345 350

Ala Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn
355 360 365

Pro Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser
370 375 380

Ala Gln Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu
385 390 395 400

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
405 410 415

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu
420 425 430

Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
435 440 445

Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys
450 455 460

Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu
465 470 475 480

Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
485 490 495

Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala
500 505 510

Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg

515

520

525

Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

530

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種純化腺相關病毒(adeno-associated virus；AAV)之方法，其包含
(a)將含有AAV之溶液在介於18°C及26°C之間之溫度下及在允許該溶液中之該AAV與靶向該AAV的親和樹脂之間結合的條件下裝載至該親和樹脂上；

(b)在介於18°C及26°C之間之溫度下進行至少一個洗滌步驟；及

(c)在介於1°C至12°C之間之溫度變化下從該親和樹脂溶離出該AAV；

其中該AAV為AAV9，且其中該親和樹脂為AAV_x樹脂。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中步驟(c)中之該溫度介於2°C與8°C之間。

【請求項3】

如請求項1或2之方法，其中至少兩個洗滌步驟在室溫下進行。

【請求項4】

如請求項1或2之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含10 mM至200 mM TrisHCl及50 mM至500 mM鹽，且具有7.5至9.2之pH。

【請求項5】

如請求項4之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含50 mM TrisHCl及125 mM鹽，且具有8.5之pH。

【請求項6】

如請求項1或2之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含10 mM至2000 mM乙酸鈉及0.001%至1% (w/w)聚山梨醇酯80，且具有5.0至7.4之pH。

【請求項7】

如請求項6之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鈉及0.1% (w/w)聚山梨醇酯80，且具有6.0之pH。

【請求項8】

如請求項1或2之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含10 mM至200 mM TrisHCl及10%至75% (w/w)乙二醇，且具有7.5至9.2之pH。

【請求項9】

如請求項1或2之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含10 mM至200 mM甘胺酸、1 mM至100 mM組胺酸、20 mM至500 mM鹽、1%至10% (w/w)海藻糖及0.0005%至1% (w/w)聚山梨醇酯80，且具有6.0至8.0之pH。

【請求項10】

如請求項1或2之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含1 mM至200 mM TrisHCl、50 mM至500 mM鹽及0.001%至1% (w/w)聚山梨醇酯80，且具有6.0至8.8之pH。

【請求項11】

如請求項1或2之方法，其中步驟(c)包含用至少一種溶離緩衝液溶離出該AAV。

【請求項12】

如請求項11之方法，其中至少一種溶離緩衝液與該等洗滌緩衝液中至少一者相同。

【請求項13】

如請求項12之方法，其中至少一種溶離緩衝液與在步驟(c)中溶離出

該AAV之前用於最終洗滌步驟中之最後的洗滌緩衝液相同。

【請求項14】

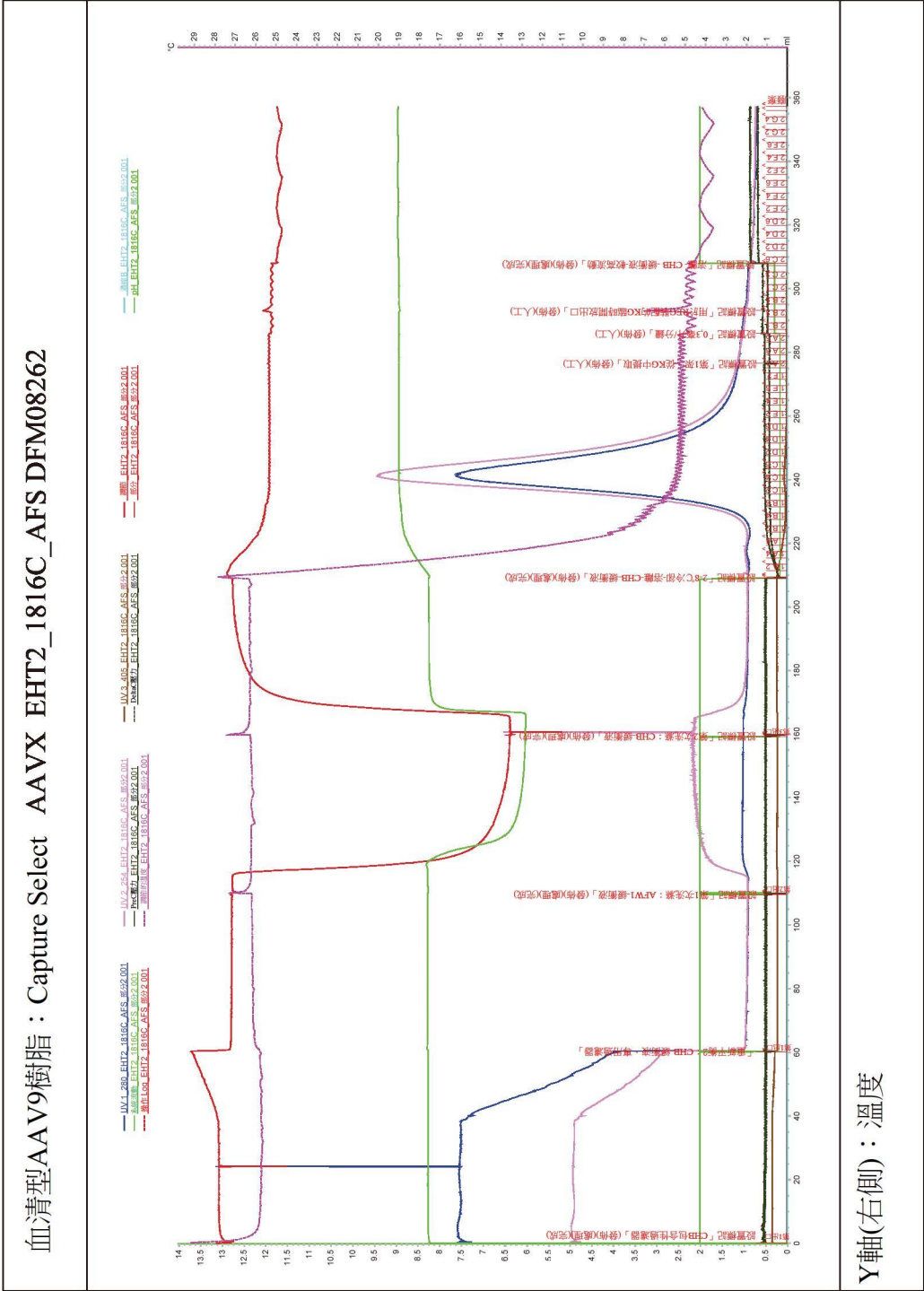
如請求項12之方法，其中該第一溶離緩衝液與在步驟(c)中溶離出該AAV之前用於該最終洗滌步驟中之最後的洗滌緩衝液相同。

【請求項15】

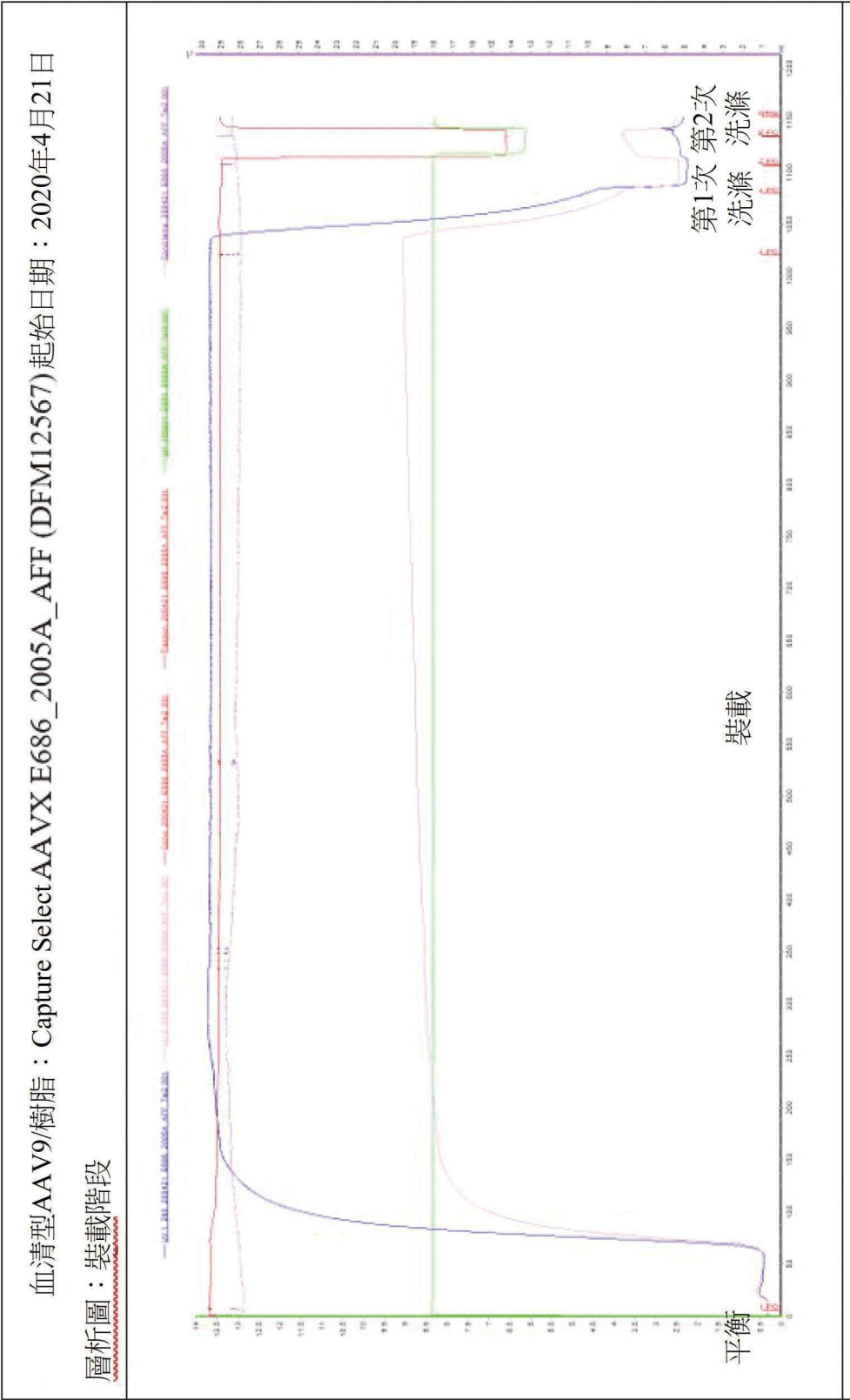
如請求項4之方法，其中該緩衝液包含50 mM TrisHCl及125 mM NaCl，且具有8.5之pH。

【請求項16】

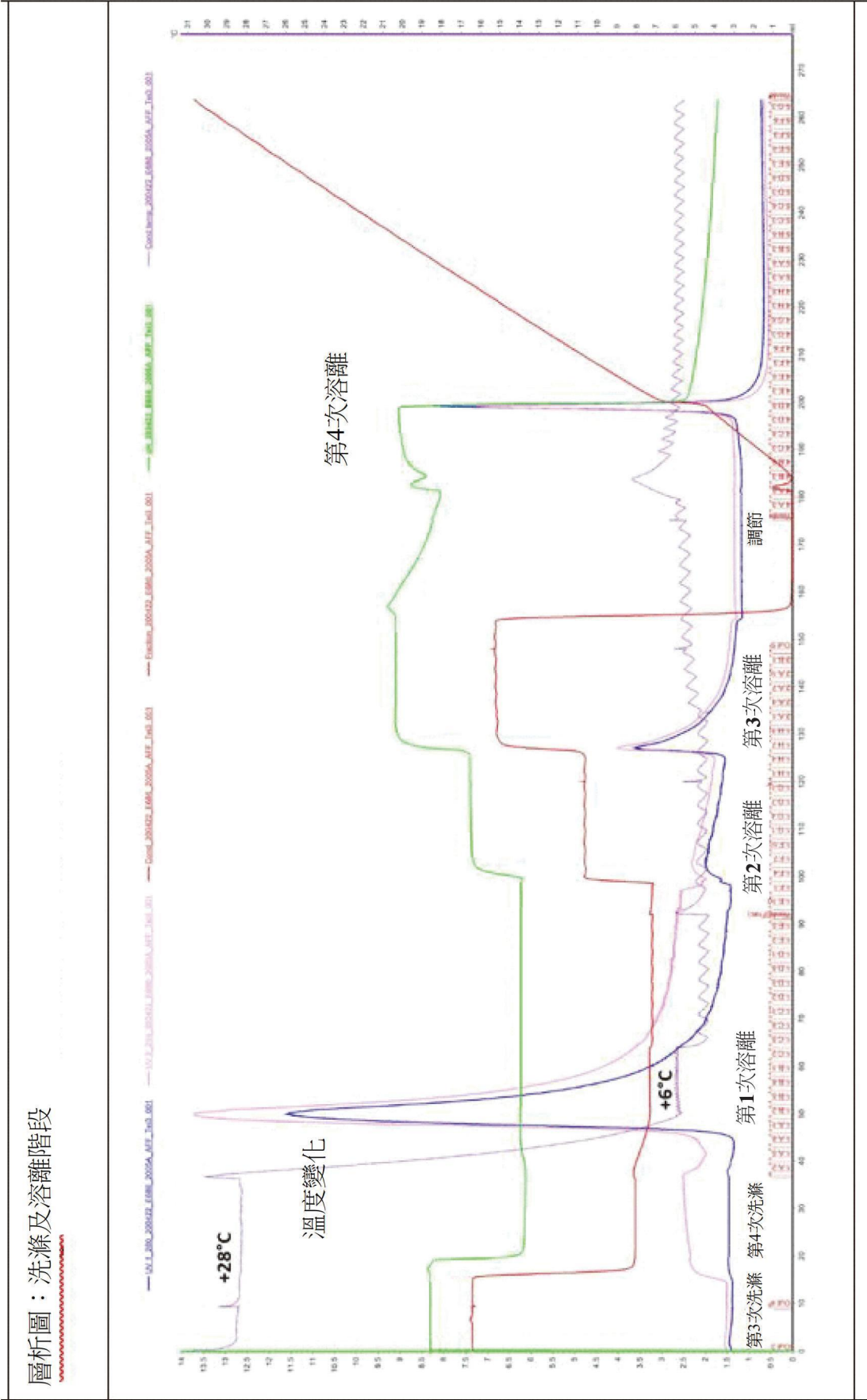
如請求項1或2之方法，其中從溶離步驟(c)溶離出至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的AAV衣殼為完整AAV衣殼。



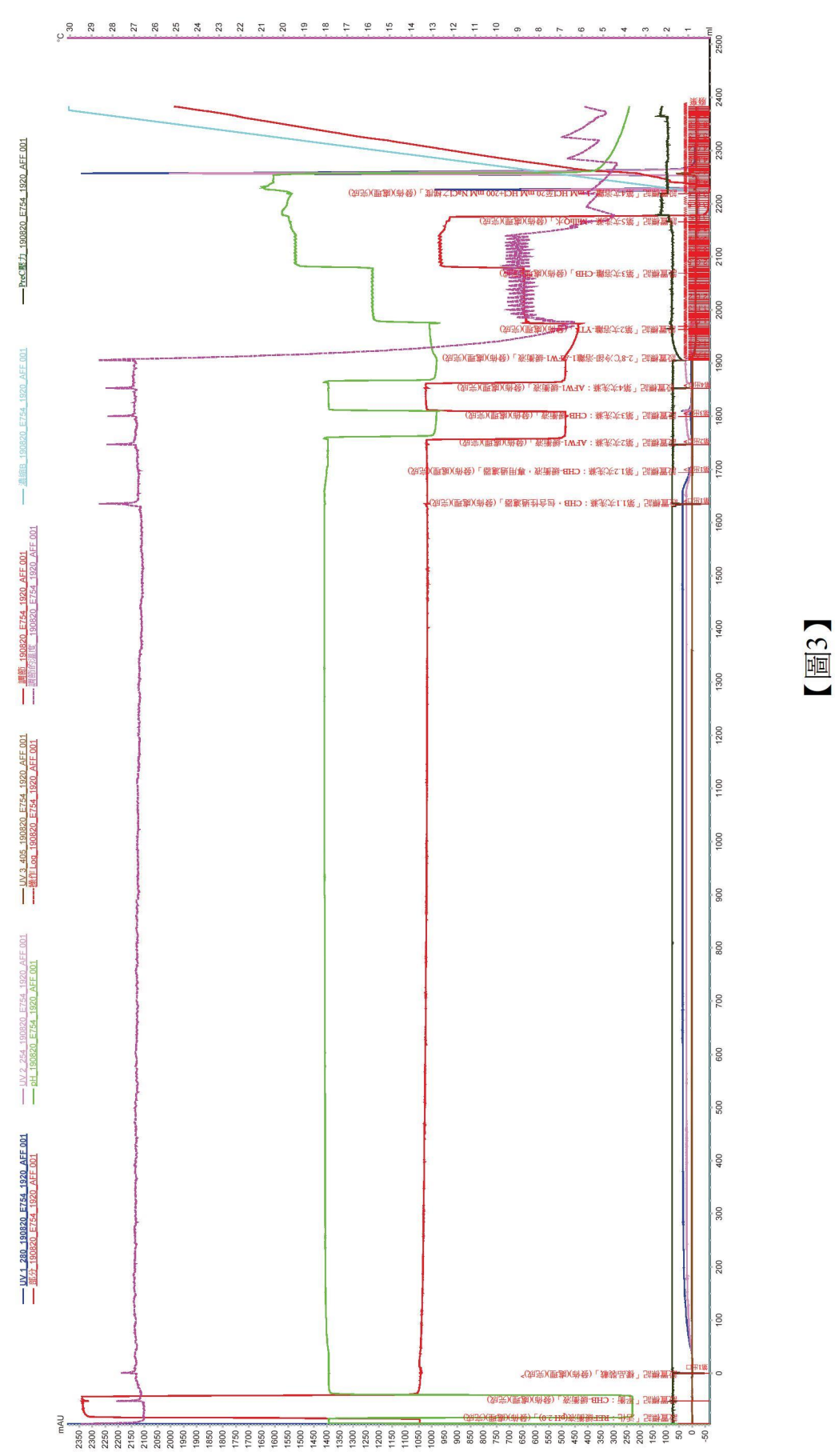
【圖1】



【圖2A】



【圖2B】



【圖3】