



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120283059 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 08

(21) 申请号 202380077976.6

(22) 申请日 2023.10.11

(30) 优先权数据

63/379,115 2022.10.11 US

63/489,684 2023.03.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.05.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2023/060237 2023.10.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/079655 EN 2024.04.18

(71) 申请人 梅里特斯英国第二有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 J·塞纳拉特纳 S·戴维斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 肖传馨 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

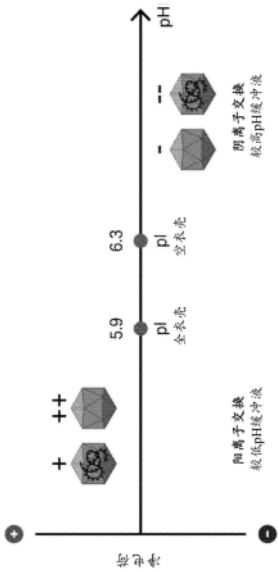
权利要求书2页 说明书23页 附图20页

(54) 发明名称

纯化AAV衣壳的色谱方法

(57) 摘要

本公开提供了产生和纯化重组腺相关病毒(AAV)载体的方法,其包括使用弱分配模式的阴离子交换色谱将全衣壳与空衣壳分离。本公开还提供了通过所述方法富集的rAAV全衣壳群体、通过所述方法分离和富集的rAAV全衣壳群体、以及包括所述富集的全衣壳群体的药物组合物。



1. 一种在全衣壳和空衣壳的混合物中富集重组腺相关病毒 (rAAV) 全衣壳的方法, 所述方法包括以下步骤:

(i) 提供包括rAAV全衣壳和空衣壳的溶液;

(ii) 平衡阴离子交换 (AEX) 柱或膜; 以及

(iii) 使所述包含rAAV全衣壳和空衣壳的溶液经受弱分配模式AEX色谱, 以将所述空衣壳与所述全衣壳分离, 从而得到富含全衣壳的AEX洗脱液。

2. 如权利要求1所述的方法, 其中所述溶液是亲和色谱洗脱液, 并且步骤(iii) 包括将所述亲和色谱洗脱液施加至平衡的AEX柱或膜, 洗涤所述AEX柱或膜至少一次, 以及将rAAV全衣壳从所述AEX柱或膜洗脱, 其中所述弱分配模式导致全衣壳取代所述AEX柱或膜上的结合空衣壳, 并且所述空衣壳流过所述AEX柱或膜以产生AEX流通, 而所述全衣壳保持与所述AEX柱或膜结合直至洗脱。

3. 如权利要求2所述的方法, 其中所述亲和色谱洗脱液在经受平衡的AEX柱或膜之前被稀释至目标盐浓度。

4. 如权利要求3所述的方法, 其中所述目标盐浓度在约85mM至约95mM的范围内。

5. 如权利要求4所述的方法, 其中所述目标盐浓度为约90mM并且所述盐为NaCl。

6. 如权利要求1所述的方法, 其中在用包含rAAV全衣壳和空衣壳的溶液负载之前, 所述AEX柱或膜用平衡缓冲液平衡, 所述平衡缓冲液包含约50mM Tris、约85mM至约95mM NaCl和大于约0.5% (w/v) 聚山梨醇酯80, 其中所述平衡缓冲液的pH为约9.0。

7. 如权利要求6所述的方法, 其中所述平衡缓冲液包含约50mM Tris、约90mM NaCl和约0.75% 聚山梨醇酯80, 其中所述平衡缓冲液的pH为约9.0。

8. 如权利要求2所述的方法, 其中洗涤所述AEX柱或膜至少一次包括第一洗涤缓冲液, 所述第一洗涤缓冲液包含(i) 约50mM tris; (ii) 约85mM至约95mM NaCl, 和(iii) 大于约0.5% (w/v) 聚山梨醇酯80, 其中所述第一洗涤缓冲液的pH为约9.0。

9. 如权利要求8所述的方法, 其中所述第一洗涤缓冲液包含(i) 约50mM tris; (ii) 约90mM NaCl, 和(iii) 约0.75% 聚山梨醇酯80, 其中所述第一洗涤缓冲液的pH为约9.0。

10. 如权利要求2所述的方法, 其中洗涤所述AEX柱或膜至少一次还包括用第二洗涤缓冲液进行第二次洗涤, 所述第二洗涤缓冲液包含(i) 约50mM tris; (ii) 约100mM至约125mM NaCl, 和(iii) 大于约0.5% (w/v) 聚山梨醇酯80, 其中所述第二洗涤缓冲液的pH为约9.0。

11. 如权利要求10所述的方法, 其中所述第二洗涤缓冲液包含(i) 约50mM tris; (ii) 约125mM NaCl, 和(iii) 约0.75% 聚山梨醇酯80, 其中所述第二洗涤缓冲液的pH为约9.0。

12. 如权利要求2所述的方法, 其中用洗脱缓冲液将所述全衣壳从所述AEX柱或膜上洗脱, 所述洗脱缓冲液包含(i) 约50mM tris; (ii) 约125mM-250mM NaCl, 和(iii) 大于约0.5% (w/v) 聚山梨醇酯80, 其中所述洗脱缓冲液的pH为约9.0。

13. 如权利要求12所述的方法, 其中所述洗脱缓冲液包含(i) 约50mM tris; (ii) 约250mM NaCl, 和(iii) 约0.75% 聚山梨醇酯80, 其中所述洗脱缓冲液的pH为约9.0。

14. 如权利要求1所述的方法, 其中所述AEX色谱柱或膜包括高流速吸附膜。

15. 如权利要求14所述的方法, 其中所述高流速吸附膜包括Sartobind®Q色谱膜。

16. 如权利要求1所述的方法, 所述方法还包括使所述AEX洗脱液或其样品经受分析超速离心以量化全衣壳富集的步骤。

17. 如权利要求1所述的方法,其中富集的全衣壳包括AAV血清型2衣壳蛋白和包含转基因的多核苷酸序列。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述转基因是水通道蛋白1(AQP1)。

19. 如权利要求1所述的方法,其中所述富集的全衣壳包括超过80%的全衣壳。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述富集的全衣壳包括约81.5%的全衣壳。

21. 如权利要求19所述的方法,其中所述富集的全衣壳包括超过90%的全衣壳。

22. 如权利要求1所述的方法,其中所述富集的全衣壳包括超过95%的全衣壳。

23. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包括使包含所述富集的全衣壳的所述AEX洗脱液经受切向流过滤,从而得到纯化的全衣壳制剂的步骤。

24. 一种从全衣壳和空衣壳的混合物中分离并富集rAAV全衣壳的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 通过裂解病毒生产细胞并澄清所得裂解物,从所述细胞中分离出rAAV全衣壳和空衣壳的混合物;

(ii) 使澄清的裂解物经受亲和色谱,从而得到亲和色谱洗脱液;以及

(iii) 使所述亲和色谱洗脱液经受弱分配模式AEX色谱,以将空衣壳与全衣壳分离,从而得到包含富集的全衣壳的AEX洗脱液。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

26. 如权利要求25所述的方法,其中所述细胞在悬浮液中培养。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述细胞在摇瓶、旋转瓶、细胞袋或生物反应器中培养。

28. 一种全衣壳群体,所述全衣壳群体由根据权利要求1至27中任一项所述的方法富集。

29. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求28所述的全衣壳群体。

纯化AAV衣壳的色谱方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年10月11日提交的美国临时申请序列号63/379,115和2023年3月10日提交的美国临时申请序列号63/489,684的优先权权益,所述临时申请以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本公开提供了产生和纯化重组腺相关病毒(AAV)载体的方法,其包括使用弱分配模式的阴离子交换色谱将全衣壳与空衣壳分离。

背景技术

[0004] 腺相关病毒(AAV)是一种复制缺陷型细小病毒。AAV颗粒包含具有三种衣壳蛋白(VP1、VP2和VP3)的衣壳,包封长度约为4.8kb的单链DNA基因组,所述基因组可以是正链或负链。含有任一链的颗粒都具有感染性,并且通过将亲本感染单链转化为双链体形式并随后扩增来发生复制,后代单链由此被置换并包装成衣壳。

[0005] AAV依赖于与其它病毒(主要是腺病毒)的共同感染来进行复制。其单链基因组含有三个基因,rep(复制)、cap(衣壳)和aap(组装),所述基因通过使用三个启动子、替代翻译起始位点和差异剪接产生至少九种基因产物。这些编码序列的两侧是基因组复制和包装所需的反向末端重复序列(ITR)。rep基因编码四种蛋白(Rep78、Rep68、Rep52和Rep40),它们参与病毒基因组复制和包装,而cap表达产生病毒衣壳蛋白(VP1、VP2和VP3),它们形成保护病毒基因组的衣壳外壳,并积极参与细胞结合和内化。aap基因在与cap基因重叠的替代阅读框中编码组装激活蛋白(AAP)。认为这种AAP蛋白为衣壳组装提供了支架功能。

[0006] AAV颗粒具有使其作为包括基因疗法和遗传疫苗等治疗应用的载体有吸引力的特征。AAV感染多种细胞类型,包括许多哺乳动物细胞,因此有可能靶向体内许多不同的组织。AAV感染缓慢分裂和非分裂细胞。对于治疗应用,使用重组AAV(rAAV),其中基因组包含异源转基因,并且典型地保留ITR,但缺乏病毒rep、cap和aap基因。在不存在Rep蛋白的情况下,侧接ITR的转基因可形成转录活性核染色体外元件或附加体,其基本上可在转导细胞的一生中持续存在。

[0007] rAAV载体产生方法的重要目标是实现一致、高的载体产生率,同时最大限度地减少与产物相关的杂质的产生,所述杂质包括AAV衣壳化残留DNA杂质和空衣壳。以每个细胞产生的载体基因组(VG)来测量,rAAV载体产生力可能变化很大,从每个细胞少于 10^3 至 2×10^5 VG不等。除了更高的成本效益之外,高生产率的一个重要优势是,当起始材料中rAAV载体产物与总收获生物量的比率较高时,纯化可更有效。

[0008] 在rAAV载体生产过程中,去除产物相关杂质是rAAV纯化的重要部分。尽管使用超速离心可将空衣壳与全衣壳分离,但可扩展的色谱方法已被证明更具挑战性。作为一种替代方案,通常研究结合和洗脱模式下的阴离子交换色谱,试图重现超速离心所达到的高全衣壳比率。然而,全衣壳和空衣壳的相似特性导致产物产量与全衣壳比例之间的尖锐权衡,

这使选择最佳条件变得困难。这也受到AAV衣壳与色谱基质之间的复杂相互作用的阻碍,这常常会导致进一步的产物损失。因此,需要一种能够减少产物相关杂质(例如空衣壳)的rAAV纯化方法。

发明内容

[0009] 本发明提供了生产和纯化rAAV颗粒的方法,其包括使用弱分配模式的阴离子交换色谱将全衣壳与空衣壳分离(全衣壳的富集)。本文描述了一种在全衣壳和空衣壳混合物中富集rAAV全衣壳的方法,其中所述方法包括:

[0010] (i) 提供包括rAAV全衣壳和空衣壳的溶液;

[0011] (ii) 平衡阴离子交换(AEX)柱或膜;以及;

[0012] (iii) 使包含rAAV全衣壳和空衣壳的溶液经受弱分配模式AEX色谱,以将空衣壳与全衣壳分离,从而得到富含全衣壳的AEX洗脱液。

[0013] 在所述方法的实施方案中,溶液是亲和色谱洗脱液,并且步骤(iii)包括将亲和色谱洗脱液施加至平衡的AEX柱或膜上,洗涤AEX柱或膜至少一次,以及将rAAV全衣壳从AEX柱或膜洗脱。在这些方法中,弱分配模式导致全衣壳从AEX柱或膜中置换出结合的空衣壳,并且空衣壳流过AEX柱或膜以产生AEX流通,而全衣壳仍结合至AEX柱或膜上直到洗脱。

[0014] 在一些实施方案中,亲和色谱洗脱液在经受平衡的AEX柱或膜之前被稀释至目标盐浓度。目标盐浓度通常在约85mM至约95mM的范围内。目标盐浓度可以是例如约90mM,并且盐可以是例如NaCl。

[0015] 在所述方法的实施方案中,在用包含rAAV全衣壳和空衣壳的溶液负载之前,用平衡缓冲液平衡AEX柱或膜,所述平衡缓冲液包含约10mM至约1000mM(例如约10、49、50、51、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mM) Tris、约85mM至约95mM NaCl(例如约84、84.9、85、86、87、88、89、89.5、90、90.5、91、92、93、94、95、95.5)和大于约0.5%(例如0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1.0%)(w/v)聚山梨醇酯80,其中平衡缓冲液的pH为约9.0(例如约8.8、8.9、9.0、9.1、9.2)。平衡缓冲液可包括约50mM Tris、约90mM NaCl和约0.75%聚山梨醇酯80,且pH为约9.0。

[0016] 在所述方法的实施方案中,洗涤AEX柱或膜至少一次包括第一洗涤缓冲液,其包括(i) 约10mM至约1000mM(例如约10、49、50、51、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mM) Tris; (ii) 约85mM至约95mM(例如约84、84.9、85、86、87、88、89、89.5、90、90.5、91、92、93、94、95、95.5) NaCl, 以及 (iii) 大于约0.5%(例如0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1.0%)(w/v)聚山梨醇酯80,其中第一洗涤缓冲液的pH为约9.0(例如约8.8、8.9、9.0、9.1、9.2)。第一洗涤缓冲液可包括例如(i) 约50mM tris; (ii) 约90mM NaCl和(iii) 约0.75%聚山梨醇酯80,并且pH为约9.0。

[0017] 在实施方案中,洗涤AEX柱或膜至少一次还包括用第二洗涤缓冲液进行第二次洗涤,所述第二洗涤缓冲液包括(i) 约10mM至约1000mM(例如约10、49、50、51、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mM) tris; (ii) 约100mM至约125mM(例如约99、100、101、105、110、120、124、125、126mM) NaCl, 和 (iii) 大于约0.5%(例如0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1.0%)(w/v)聚山梨醇酯80,其中第二洗涤缓冲液的pH为约9.0(例如约8.8、8.9、9.0、9.1、9.2)。第二洗涤缓冲液可包括例如(i) 约50mM tris; (ii) 约125mM NaCl和(iii) 约

0.75% 聚山梨醇酯80,并且pH为约9.0。

[0018] 在实施方案中,用洗脱缓冲液将全衣壳从AEX柱或膜上洗脱,所述洗脱缓冲液包括(i)约10mM至约1000mM(例如约10、49、50、51、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mM) tris; (ii)约125mM至约250mM(例如约124、125、126、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、251mM) NaCl,以及(iii)大于约0.5% (例如0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1.0%) (w/v) 聚山梨醇酯80,其中洗脱缓冲液的pH为约9.0(例如约8.8、8.9、9.0、9.1、9.2)。洗脱缓冲液可包括例如(i)约50mM tris; (ii)约250mM NaCl,和(iii)约0.75% 聚山梨醇酯80,其中洗脱缓冲液的pH为约9.0。

[0019] 在所述方法的实施方案中,AEX色谱柱或膜包括高流速吸附膜,例如Sartobind®Q色谱膜。在实施方案中,所述方法还可包括以下步骤:使包含富集的全衣壳的AEX洗脱液经受切向流过滤(TFF),从而产生全衣壳的纯化制剂(例如,药物物质)。

[0020] 在实施方案中,聚山梨醇酯20和泊洛沙姆188可用于本文所述的一种或多种缓冲液中。

[0021] 在所述方法的实施方案中,所述方法还包括使AEX洗脱液经受分析型超速离心以量化完全衣壳富集的步骤。

[0022] 在所述方法的实施方案中,富集的全衣壳可包括AAV血清型2衣壳蛋白和包含转基因(例如,诸如水通道蛋白1(AQP1)的转基因)的多核苷酸序列。

[0023] 在实施方案中,富集的全衣壳包括大于80%的全衣壳(例如,约80.5、81.5、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96%的全衣壳)、大于90%的全衣壳和大于95%的全衣壳。

[0024] 本文还描述了从全衣壳和空衣壳的混合物中分离和富集rAAV全衣壳的方法。所述方法包括:通过裂解细胞并澄清所得裂解物从病毒生产细胞中分离rAAV全衣壳和空衣壳的混合物;使澄清的裂解物经受亲和色谱,得到亲和色谱洗脱液;以及使亲和色谱洗脱液经受弱分配模式AEX色谱,以将空衣壳与全衣壳分离,得到包含富集的全衣壳的AEX洗脱液。在实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。细胞通常在悬浮液中,例如在摇瓶、旋转瓶、细胞袋或生物反应器中培养。

[0025] 本发明还提供了通过所述方法富集的rAAV全衣壳群体、通过所述方法分离和富集的rAAV全衣壳群体、以及包括所述富集的全衣壳群体的药物组合物。

附图说明

[0026] 图1是显示pI(1)之上和之下的空AAV衣壳和全AAV衣壳的电荷的图表。

[0027] 图2是显示弱分区过程的图表,其中由于所创建的环境,空衣壳被全衣壳取代。

[0028] 图3是显示洗涤2和平衡/进料NaCl浓度(mM)与空衣壳去除率(VP/mL)之间的关系图表。

[0029] 图4是显示洗涤2和平衡/进料NaCl浓度(mM)以及洗脱中的全衣壳比率(%)之间的关系图表。

[0030] 图5是显示洗涤2和平衡/进料NaCl浓度(mM)以及洗脱中的VG回收率(%)之间的关系图表。

[0031] 图6是显示基于洗涤2和平衡/进料NaCl浓度(mM)的最佳区域的图。

- [0032] 图7是显示负载比率与全衣壳 (VG) 和空衣壳 (VP) 突破 (%) 之间的关系的图表。
- [0033] 图8是优化的2升 (L) 规模的AAV-AQP1 AEX步骤的色谱图。
- [0034] 图9是显示结果汇总的图表,展示了AEX流程的可扩展性。2L规模是指使用10mL Sartobind®Q操作的过程,而80规模是指使用75mL Sartobind®Q操作的过程。
- [0035] 图10是显示突破实验结果的图表,展示了载体基因组和载体颗粒在流通中的突破程度。
- [0036] 图11是使用10mL Sartobind®Q进行以确认所述过程的实验(如示例2中所述)的色谱图摘录。该摘录的重点是柱洗涤2和洗脱阶段。
- [0037] 图12显示了对洗脱液进行的分析超速离心的结果,所述洗脱液由在10mL Sartobind®Q上进行的确认运行产生。
- [0038] 图13是初始阴离子交换色谱的色谱图。
- [0039] 图14显示了一条突破曲线,表明在90mM NaCl进料和平衡电导率下,VG突破和空衣壳突破均达到4E14 VG/mL的负载挑战。
- [0040] 图15是一对图表,显示了当VG负载挑战增加至4E14 vg/ml时柱上的VG浓度(顶部图表),以及当VG负载挑战增加至4E14 VG/mL时柱上的空衣壳比率(底部图表)。
- [0041] 图16是显示当VG负载挑战增加至4E14 VG/mL时柱上的全衣壳比率增加的图表
- [0042] 图17是显示在9mS/cm和8mS/cm下负载至4E14 VG/mL时柱上的全衣壳浓度的图表,以突出显示可实现的富集水平。
- [0043] 图18是在20L规模确认运行中优化的AAV-AQP1 AEX步骤的色谱图。
- [0044] 图19显示了“初始过程”和“最终过程”中USP、捕获色谱、离子交换色谱(IEX)和切向流过滤(TFF)中的每一者之后的VG回收率和全衣壳%值。
- [0045] 图20是显示20L和80L批次的全衣壳比率和VG回收率之间的比较的图表,以及显示分析超速离心(AUC)结果的图表,所述结果证实图8中的洗脱峰含有82%全衣壳。

具体实施方式

[0046] 本公开提供了生产和纯化rAAV的方法,其包括使用弱分配模式的阴离子交换色谱将全衣壳与空衣壳分离(全衣壳的富集)。在全衣壳和空衣壳的混合物中富集rAAV全衣壳的方法包括以下步骤:

- [0047] (i) 提供包括rAAV全衣壳和空衣壳的溶液;
- [0048] (ii) 平衡阴离子交换(AEX)柱或膜;以及
- [0049] (iii) 使包含rAAV全衣壳和空衣壳的溶液经受弱分配模式AEX色谱,以将空衣壳与全衣壳分离,从而得到富含全衣壳的AEX洗脱液。
- [0050] 在全衣壳和空衣壳的混合物中分离和富集rAAV全衣壳的方法包括以下步骤:
- [0051] (i) 通过裂解病毒生产细胞并澄清所得裂解物,从所述细胞中分离出rAAV全衣壳和空衣壳的混合物;
- [0052] (ii) 使澄清的裂解物经受亲和色谱,从而得到亲和色谱洗脱液;以及
- [0053] (iii) 使亲和色谱洗脱液经受弱分配模式AEX色谱,以将空衣壳与全衣壳分离,从而得到包含富集的全衣壳的AEX洗脱液。

[0054] 本发明还提供了通过所述方法富集的rAAV全衣壳群体、通过所述方法分离和富集的rAAV全衣壳群体、以及包括所述富集的全衣壳群体的药物组合物(例如药物、药物物质)。在实施方案中,所述方法提供增加的产生滴度和更高的全衣壳与空衣壳比率(F:E)。更具体地说,本公开提供了例如在全衣壳和空衣壳的混合物中富集rAAV全衣壳的方法。在实施方案中,生产产率大于50%,大于50%的空衣壳被去除,并且实现了大于80%的F:E比率。

[0055] 用于纯化rAAV的弱分区模式下的AEX

[0056] 本文所述的纯化和富集方法涉及从含有rAAV全衣壳和空衣壳的溶液中纯化rAAV全衣壳(即,含有重组基因组的rAAV颗粒)。所述溶液可以是任何rAAV生产/纯化方法的结果。通常,在经受AEX色谱之前,通过将溶液稀释至目标盐(例如NaCl)浓度进行调节。例如,可将所述溶液稀释至NaCl浓度为约90mM(例如约89、90、91mM),具有约10mM至约1000mM(例如约10、49、50、51、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mM) Tris、约0.75% (w/v) 聚山梨醇酯80,并且pH为约9.0(例如约8.8、8.9、9.0、9.1、9.2)。在实施方案中,溶液是亲和色谱洗脱液。亲和色谱是生产和纯化rAAV颗粒(例如rAAV全衣壳)的典型方法中的几个纯化步骤之一。rAAV的生产/纯化方法是本领域所熟知的,并且此类方法的实例如下所述。

[0057] 在本文所述的方法中,弱分配模式AEX色谱是一种用于将全衣壳与空衣壳分离的纯化技术(图1和2)。这种形式的色谱利用了含有病毒基因组的衣壳与空衣壳之间的电荷差异。目标pH值高于衣壳pI意味着含有VG的全衣壳比空衣壳携带更多的负电荷。在本文所述的纯化和富集方法中,弱分配描述了通过创建更有利于全衣壳结合的环境将全衣壳与空衣壳分离的过程。

[0058] 弱分配模式的阴离子交换色谱不同于历史上使用的流通模式AEX和结合和洗脱模式AEX方法(Liu等人,MAbs.2010;2(5):480-499;Kelley等人,Biotechnology and Bioengineering第101卷:553-566,2008)。在结合洗脱模式AEX中,首先将产物(感兴趣的)池负载至阴离子交换柱上,接着用较高的盐浓度以分步或线性梯度洗脱感兴趣的产物,使大部分杂质结合至柱上。在清洁或再生步骤中,将杂质从柱中洗脱。在流通模式AEX中,工作pH通常为8至8.2,产物负载以及平衡和洗涤缓冲液的电导率高达10mS/cm。选择的条件使得产物不会与柱结合,而核酸和宿主细胞蛋白质等酸性杂质会与柱结合。使用弱分配模式的阴离子交换色谱可实现包含亲和色谱和阴离子交换的双色谱回收过程,以获得感兴趣的产物。与流通色谱一样,所述过程以等度方式运行,但与流通模式不同的是,电导率和pH的选择使得产物和杂质的结合得到增强,从而达到产物分配系数(Kp)介于0.1-20之间,优选介于1与3之间。这利用了要去除的杂质比产物更具酸性的事实。产物和杂质都与阴离子交换树脂结合,但杂质的结合比流通模式更紧密,这可以提高杂质去除率。因此,在流通模式下无法有效去除的结合较弱的杂质可以在其分配系数(Kp)增加的条件下去除。与流通模式下的阴离子交换色谱相比,弱分配色谱由于病毒、宿主细胞蛋白和产物相关物种的清除率增加,因此可以实现双柱回收过程。弱分配色谱的一个方面是需要针对每种产物优化pH和反离子条件。这与一些平台色谱过程形成对比,所述过程能够对大多数产物在阴离子交换基质(树脂或膜)上使用标准化条件。

[0059] 在全衣壳和空衣壳混合物中富集rAAV全衣壳的方法中,提供了包括rAAV全衣壳和空衣壳的溶液。如上所论述,所述溶液可以是任何rAAV生产/纯化方法的结果,并且在实施方案中,所述溶液是亲和色谱洗脱液。将接收溶液的AEX柱或膜通常用合适的预平衡缓冲液

进行预平衡。例如,合适的预平衡缓冲液可包括约50mM Tris、约1M NaCl和约0.75%聚山梨醇酯80,且pH为约9.0(例如,约8.8、8.9、9.0、9.1、9.2)。预平衡步骤后,将AEX柱或膜用平衡缓冲液进行平衡。通常,平衡缓冲液包括约10mM至约1000mM(例如,约10、49、50、51、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mM) Tris、约85mM至约95mM(例如,约84、84.9、85、86、87、88、89、89.5、90、90.5、91、92、93、94、95、95.5) 盐(例如,NaCl),以及大于约0.5%(例如,0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1.0%) (w/v) 聚山梨醇酯80。在一些实施方案中,平衡缓冲液包括约50mM Tris、约90mM NaCl、大于0.5% (w/v) 聚山梨醇酯80和约0.75%聚山梨醇酯80,并且pH为约9.0。在所述方法中,可使用任何合适的AEX柱或膜。在实施方案中,使用高流速吸附膜。这种膜的一个实例是 **Sartobind® Q** 色谱膜。这种膜的另一个实例是 **Pall Corporation** 的 **Mustang® Q** 膜。

[0060] 在AEX柱或膜平衡之后,将溶液(在实施例1和2中称为“进料”、“进料材料”和“调节后的进料”)施加至平衡后的AEX柱或膜中。所述溶液可应用于任何合适的负载比。在实施例1和2中描述的实验中,使用 5×10^{13} - 1×10^{15} VG/mL的负载比率,并产生81.5%的全衣壳比率洗脱%。负载的溶液流通液通常由空衣壳组成(全衣壳将与柱或膜具有更强的相互作用并取代空衣壳)。在实施方案中,可以通过任何合适的方法分析流通液或其样品以确定其病毒基因组和病毒颗粒浓度。

[0061] 在溶液应用之后,AEX柱或膜要洗涤至少一次(例如,一次、两次、三次)。在至少第一次洗涤中,用第一洗涤缓冲液洗涤AEX柱或膜,所述第一洗涤缓冲液包括约10mM至约1000mM(例如约10、49、50、51、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mM) Tris、约85mM至约95mM(例如约84.5、84.9、85、85.5、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、95.5、96mM) NaCl和大于约0.5%(例如约0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1.0%) (w/v) 聚山梨醇酯80。第一洗涤缓冲液的pH通常为约9.0(例如,约8.8、8.9、9.0、9.1、9.2)。例如,第一洗涤缓冲液可包括约50mM tris、约90mM NaCl和约0.75%聚山梨醇酯80,且pH为约9.0。在实施方案中,用第二洗涤缓冲液进行第二次洗涤,所述第二洗涤缓冲液包括约10mM至约1000mM(例如约10、49、50、51、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mM) Tris、约100mM至约125mM NaCl(例如约99、100、101、105、110、120、124、125、126mM) NaCl和大于约0.5%(例如0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1.0%) (w/v) 聚山梨醇酯80。第二洗涤缓冲液的pH通常为约9.0(例如,约8.8、8.9、9.0、9.1、9.2)。例如,第二洗涤缓冲液可包括约50mM tris、约125mM NaCl和约0.75%聚山梨醇酯80,第二洗涤缓冲液的pH为约9.0。柱或膜洗涤通常主要由空衣壳组成,但也可能含有全衣壳。可以通过任何合适的方法来分析洗涤或洗涤级分(样品)的病毒基因组和病毒颗粒浓度。

[0062] 经过至少一次洗涤(例如两次洗涤)后,全衣壳从柱或膜洗脱,产生富含全衣壳的AEX洗脱液。通常用洗脱缓冲液将全衣壳从AEX柱或膜上洗脱,所述洗脱缓冲液包括约10mM至约1000mM(例如约10、49、50、51、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mM) Tris、约125mM至约250mM(例如约124、125、126、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、251mM) NaCl以及大于约0.5%(例如0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1.0%) (w/v) 聚山梨醇酯80。洗脱缓冲液的pH通常为约9.0(例如,约8.8、8.9、9.0、9.1、9.2)。洗脱缓冲液的一个实例是包含约50mM tris、约250mM NaCl和约0.75%聚山梨醇酯80且pH为约9.0的

缓冲液。可以分析富含全衣壳的AEX洗脱液样本的病毒基因组和病毒颗粒浓度,以及其全衣壳比率和病毒基因组回收率。因此,在实施方案中,所述方法还可括对富含全衣壳的AEX洗脱液或其样品进行pPCR和分析超速离心(AUC)以量化全衣壳的富集(例如,监测载体纯化的质量和功效,测量重组病毒颗粒制剂中空衣壳的相对量)。AUC是一种广泛适用且信息丰富的方法,用于研究大分子特征,诸如大小、形状、化学计量和结合特性,全部在真实的溶液状态环境中进行。AUC可以评估中等高浓度下的定量和定性信息。使用AUC表征重组病毒颗粒制剂的方法是已知的(参见例如以引用的方式并入本文中的美国专利公开案第20200225139号)。

[0063] 对于所有预平衡、平衡、洗涤和洗脱步骤,可以使用任何合适的膜体积(MV)和流速(MV/min)。表6和表8显示了合适的MV和MV/min的示例。在全衣壳和空衣壳的混合物中富集rAAV全衣壳的方法的具体示例在实施例1和2中描述。

[0064] 在实施方案中,富含全衣壳的AEX洗脱液经过TFF(例如,TFF透析)进一步纯化并制备可以作为基因疗法施用的制剂(例如,药物、药物物质)。

[0065] 在实施方案中,所述方法提供至少约30%,例如约30%-40%、至少65%、约65%-95%、至少80%、约80%-85%(例如79%、79.5%、80%、80.5%、81%、81.5%、82%、83%、85%、85%)、约90%-95%(例如89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%)等的rAAV全颗粒(全衣壳)与空AAV颗粒(空衣壳)的比率。可使用针对辅助质粒中相关序列或高拷贝数基因组序列设计的引物和探针,通过qPCR来评估核酸酶抗性、AAV衣壳化DNA杂质的水平。在qPCR之前进行的核酸酶处理的敏感性可区分核酸酶敏感的‘裸’残留DNA杂质和核酸酶不敏感的衣壳化残留DNA杂质。可使用衣壳特异性ELISA测定来测量总AAV衣壳,并通过比较衣壳颗粒滴度和VG滴度来确定空衣壳的量。分光光度法可用于已基本上去除非AAV衣壳杂质的样品。

[0066] 所述方法可扩展至制造规模,例如约5至约10、约10至约20、约20至约50、约50至约100(例如,79、80、81)、约100至约200或更多升的培养物,并且适用于包含多种AAV血清型/衣壳变体的rAAV。实施例1和2中描述的实验证明,可以大(制造)规模富集rAAV全衣壳。

[0067] 通过本文公开的方法产生、分离、纯化和富集的rAAV载体(rAAV全衣壳)可用于在靶细胞中表达转基因。这些rAAV载体可用于基因疗法,因为其可将包含可在靶细胞中维持和表达的转基因的多核苷酸引入靶细胞中。rAAV载体能够将异源多核苷酸序列(例如编码治疗蛋白或报告蛋白的多核苷酸序列和用于表达所述蛋白的调节元件)递送至人类患者的靶细胞。转基因实例的非详尽列表包括RPGR、RPE65、GAD65、GAD67、CNGB3和AQP1。在一些实施方案中,两个AAV ITR是AAV2 ITR。在所述方法中,AAV cap基因可来自AAV血清型或AAV变体,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV 11、AAV12、AAV13、AAVrh10、AAV-PHP.5、AAV-PHP.B、AAV-PHP.eB、AAV2-retro、AAV9-retro、AAVrh74、AAVrh和其混合体。

[0068] 术语“载体”是指用于将多核苷酸引入靶细胞中的媒介。载体可以是病毒载体(例如rAAV载体、HSV载体)或例如质粒的非病毒载体,或与例如脂质体、明胶或多胺的化合物相关的DNA。表达载体是含有编码基因产物(例如蛋白质或RNA)的多核苷酸序列的载体,其具有用于在宿主或靶细胞中表达的调节元件。

[0069] “rAAV”、“rAAV载体”、“rAAV颗粒”或“rAAV病毒体”是指包装在衣壳蛋白中(即,被

衣壳蛋白包裹),用于随后离体、体外或体内感染靶细胞的重组AAV载体基因组。这些短语排除空AAV衣壳和缺乏含有要在靶细胞中表达的转基因的完整重组AAV基因组的AAV衣壳。因此,除了衣壳之外,rAAV载体还包含rAAV基因组。“rAAV基因组”或“rAAV载体基因组”是指含有最终被包装或衣壳化以形成rAAV颗粒的感兴趣的转基因的多核苷酸序列。典型地,对于rAAV,大部分AAV基因组(包括例如rep、cap和aap基因)已被删除,一个或两个ITR序列与转基因一起保留为rAAV基因组的一部分。如本文所用,“转基因”是指编码基因产物(例如治疗蛋白或报告蛋白)和用于在靶细胞中表达基因产物的调节元件的多核苷酸序列。

[0070] “空衣壳”和“空颗粒”是指具有AAV衣壳但完全或部分缺乏包含转基因序列和一个或两个ITR的重组AAV基因组的AAV颗粒。此类空衣壳不起将转基因转移至一个或多个靶细胞中的作用。在实施方案中,分离的rAAV颗粒与空AAV颗粒分离。

[0071] rAAV基因组(包括例如ITR)可基于相同毒株或血清型(或亚组或变体),或者其可彼此不同。作为非限制性实例,基于一种血清型基因组的rAAV质粒或载体基因组或颗粒(衣壳)可与包装载体基因组的一种或多种衣壳蛋白相同。另外,rAAV基因组可源自AAV基因组(例如包含源自AAV2基因组的一种或多种ITR),其不同于包装rAAV载体基因组的一种或多种衣壳蛋白。

[0072] 可通过本文公开的方法产生、分离、纯化和富集的rAAV载体(rAAV全衣壳)包括包含源自任何AAV毒株或血清型的衣壳和基因组的任何rAAV载体。作为非限制性实例,rAAV载体衣壳和/或基因组可基于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-PHP-5、AAV-PHP-B、AAV-PHP-eB、AAV2-retro、AAV9-retro、AAVrh74、AAVrh、AAVrh.10(即含有AAVrh.10ITR和AAVrh.10衣壳蛋白的AAV)等。在实施方案中,rAAV载体包含源自相同AAV毒株或血清型的基因组和衣壳蛋白。例如,rAAV载体可以是rAAV2载体(即,含有AAV2ITR和AAV2衣壳蛋白的rAAV)。

[0073] 在实施方案中,AAV载体是假型rAAV载体,其含有来自一种AAV血清型的ITR和来自不同AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施方案中,假型rAAV是rAAV2/5(即,含有AAV2ITR和AAV5衣壳蛋白的rAAV);rAAV2/8(即,含有AAV2 ITR和AAV8衣壳蛋白的rAAV);rAAV2/9(即,含有AAV2 ITR和AAV9衣壳蛋白的AAV)rAAV2/10(即,含有AAV2 ITR和AAV10衣壳蛋白的rAAV)。在实施方案中,rAAV载体包含衣壳蛋白,其为变体AAV衣壳,例如AAV2变体rAAV2-retro(来自以引用方式并入本文中的WO 2017/218842的SEQ ID NO:44)。

[0074] 产生rAAV的方法

[0075] 如上所述,rAAV纯化和富集方法可应用于通过任何合适的产生方法获得或产生的含有rAAV全衣壳和空衣壳的溶液(例如,裂解物、洗脱液)。产生rAAV的方法是本领域众所周知的。通常,所述方法包括扩增生产细胞;将rAAV载体、AAV rep和cap以及辅助基因核酸序列引入生产细胞中;在可产生rAAV颗粒的条件下培养转导的生产细胞;以及分离rAAV颗粒。下面详细描述了产生rAAV的方法的具体实施方案。

[0076] 细胞系

[0077] rAAV载体产生方法通常需要某些元件,包括例如:(i) rAAV产生的许可宿主细胞(产生细胞);(ii) 可例如通过含有提供腺病毒辅助功能的基因的合适构建体来提供的辅助病毒功能;(iii) 转运包装rep/cap结构;以及(iv) 合适的产生培养基。

[0078] 产生细胞是一旦存在rAAV基因组产生构建体、辅助功能构建体和提供AAV功能(例

如表达rep和cap)的构建体时作为rAAV产生的许可宿主细胞的任何细胞。所述术语还可包括已转染的原始细胞的后代。因此,产生细胞也是已用外源DNA序列转染的宿主细胞,或其中所述DNA序列已整合至宿主细胞基因组中的宿主细胞的后代。应理解,由于天然、偶然或有意突变,单一亲本细胞的后代可不必在形态或在基因组或总DNA互补序列上与原始亲本完全相同。

[0079] 在实施方案中,用于产生rAAV颗粒的细胞是哺乳动物细胞,包括HEK293细胞、BHK细胞和HeLa细胞。示例性产生细胞/宿主细胞包括人胚肾(HEK)细胞,例如HEK293。在优选实施方案中,产生细胞适合在悬浮液中生长,包括适应悬浮液的HEK293细胞。在另外的优选实施方案中,产生细胞适合在无血清培养基中生长。在实施方案中,产生细胞在至少一个培养容器中增加,所述培养容器可以是例如摇瓶、旋转瓶、细胞袋或生物反应器中的一者或多者。

[0080] 可用于本文公开的rAAV产生、分离、纯化和富集方法的产生细胞系包括哺乳动物或昆虫细胞系。术语“细胞系”是指在适当的培养条件下能够在体外连续或长时间生长和分裂的细胞群。细胞系可以但不一定是源自单个祖细胞的克隆群。在细胞系中,在此类克隆群的储存或转移期间以及在组织培养物中长时间传代期间,核型可能会发生自发或诱导的变化。因此,源自细胞系的后代细胞可能与祖先细胞或培养物不完全相同。

[0081] 为了发生rAAV产生,产生细胞系可能需要rAAV基因组产生构建体、辅助功能构建体和/或AAV rep/cap构建体中的一者或多者存在于产生细胞内。这些可作为三个构建体(例如三个质粒)引入,或者产生细胞可能已经具有一种或多种稳定整合至产生细胞基因组中的构建体,所述构建体提供这些功能中的一些或全部。在实施方案中,一种或多种辅助基因可包括一种或多种腺病毒基因、单纯疱疹病毒1型基因或杆状病毒基因的全部或部分。如本文所用,关于细胞的术语“稳定的”或“稳定整合的”意指核酸序列,例如选择标记和/或异源核酸序列,或质粒或载体(或其部分)已插入染色体(例如,通过同源重组、非同源末端连接、转染等)或在染色体外维持在受体细胞或宿主生物体中,并且已保留在染色体中或在染色体外维持一段时间。

[0082] 扩增产生细胞系

[0083] 在本文所述的方法的实施方案中,在引入rAAV基因组产生构建体和/或提供辅助病毒功能和AAV功能的其它构建体的步骤之前,使用扩增阶段或扩增步骤来增加产生细胞的数量。扩增阶段或扩增步骤可在一个或多个细胞培养容器中进行。例如,扩增阶段或扩增步骤可在一系列体积增加的细胞培养容器中进行。用于扩增产生细胞系的细胞培养基可以是适合于产生细胞生长(即数量增加)的任何培养基。在优选的实施方案中,扩增阶段培养基不含动物组分,并且不包括例如源自动物的血清或其它组分。化学成分明确、不含动物组分的培养基可商购获得。

[0084] 在实施方案中,将抗结块补充剂(有时在本文中称为抗结块剂(ACA))添加至扩增培养基中以减少细胞聚集。ACA可从例如Irvine Scientific商购获得。抗结块补充剂可在一个或多个时间点添加至扩增阶段培养基中。在实施方案中,抗结块补充剂包含硫酸葡聚糖、肝素和/或抑制产生细胞聚集的其它硫酸化糖胺聚糖。在实施方案中,抗结块补充剂包含肝素钠,其可以约25 μ g/ml至约250 μ g/ml,例如约25 μ g/ml、约50 μ g/ml、约100 μ g/ml、约150 μ g/ml和/或约200 μ g/ml的浓度添加至培养基中。

[0085] 在实施方案中,扩增阶段培养基包含和/或被补充以包含浓度为约2mM至约6mM(例如约2mM、约3mM、约4mM、约5mM或约6mM)的谷氨酰胺、谷氨酰胺前体或包含谷氨酰胺的氨基酸二肽中的一者或多者。谷氨酰胺、谷氨酰胺前体或包含谷氨酰胺的氨基酸二肽中的一者或多者可以是例如L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺、L-谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸-L-谷氨酰胺、谷氨酰胺蛋白质水解物、L-谷氨酸和谷氨酰胺二肽中的一者或多者。作为二肽L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺提供的谷氨酰胺补充剂的市售实例是GlutaMAX(ThermoFisher)。

[0086] 在实施方案中,扩增阶段培养基包含和/或被补充以包含非离子多元醇表面活性剂,例如泊洛沙姆188(聚乙烯和聚丙烯醚二醇的共聚物)。在实施方案中,非离子多元醇表面活性剂以约0.05%至约0.2%(w:v)(例如约0.05%、约0.1%、约0.1%或约0.2%)存在于扩增阶段培养基中。在实施方案中,扩增阶段培养基包含约4mM L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺二肽和0.1%(w:v)泊洛沙姆188。

[0087] 在实施方案中,扩增阶段培养基的pH维持在约7.1至约7.5(例如约7.1、约7.2、约7.3、约7.4或约7.5)的pH。在实施方案中,通过CO₂鼓泡将pH维持在约7.2至约7.4。在实施方案中,在将一种或多种多核苷酸构建体引入细胞之前,将培养基的pH改变至约6.9并停止CO₂鼓泡。

[0088] 引入一种或多种多核苷酸构建体

[0089] rAAV载体生成典型地需要提供基本生物合成机制的产生细胞系,以及(i)提供rAAV基因组的构建体(感兴趣的转基因和侧接AAV ITR的相关调节元件)和(ii)一种或多种具有额外基因的构建体,所述额外基因提供指导rAAV载体产生所需的基因产物。这些额外的基因包括支持载体基因组复制和包装所需的AAV衍生基因(例如AAV rep和cap)和辅助病毒衍生基因(例如腺病毒E1a、E1b、E2a、E4和VA)。

[0090] “辅助病毒基因”或“辅助病毒衍生基因”是指非AAV衍生的病毒基因,复制依赖于所述基因的基因产物AAV。所述术语包括AAV复制所需的蛋白质和/或RNA,包括参与AAV基因转录激活、阶段特异性AAV mRNA剪接和AAV DNA复制的蛋白质和/或RNA。辅助病毒基因可源自任何已知的AAV辅助病毒,例如腺病毒、疱疹病毒和牛痘病毒。因此,“辅助病毒功能”是指由AAV产生所需的辅助病毒基因(例如腺病毒E1a、E1b、E2a、E4和VA)提供的那些功能。这些辅助病毒功能可在引入产生细胞中的一种或多种载体上提供,由产生细胞稳定表达,或两者的组合。

[0091] 如本文所用,“AAV功能”或“AAV辅助功能”是指AAV衍生的编码序列,其可在产生细胞中表达以提供以反式起作用以用于生产性AAV复制和包装的AAV基因产物。因此,AAV功能包括AAV开放阅读框(ORF),包括rep和cap以及其它功能,例如某些AAV血清型的aap。此类AAV功能由一种或多种多核苷酸构建体提供,所述构建体可以是质粒载体、非质粒载体或已整合至产生细胞染色体中的提供AAV辅助功能的多核苷酸构建体。提供可用于本文公开的方法中的AAV功能的质粒是可商购的。

[0092] 在所述方法的实施方案中,一种或多种辅助病毒基因由产生细胞(例如HEK293细胞)组成型表达,而其它辅助病毒基因例如通过转染一种或多种编码AAV产生所需的剩余辅助病毒基因的多核苷酸构建体而引入产生细胞中。AAV衍生基因(例如rep和cap)可包含于含有一种或多种辅助病毒基因的相同多核苷酸构建体中,或者可包含于单独的多核苷酸构建体上。在将提供或编码rAAV基因组的多核苷酸构建体(例如rAAV基因组产生构建体)引入

产生细胞系后,产生rAAV颗粒。在实施方案中,在用(i) rAAV基因组产生载体和(ii)提供辅助病毒基因(例如E4、E2a和VA)和AAV基因(例如rep和cap)的一种或多种载体瞬时转染产生细胞后产生rAAV颗粒。在实施方案中,这些载体是质粒。

[0093] 在本文公开的方法的实施方案中,在扩增阶段之后,将包含侧接ITR的转基因的第一多核苷酸构建体和包含辅助病毒基因以及AAV rep和cap基因的第二多核苷酸构建体引入扩增的产生细胞中。当第一和第二多核苷酸构建体是质粒时,此系统可称为双质粒系统。

[0094] 在本文公开的方法的实施方案中,在扩增阶段之后,将包含侧接ITR的转基因的第一多核苷酸构建体、包含辅助病毒基因的第二多核苷酸构建体以及包含AAV rep和cap基因的第三核苷酸构建体引入扩增的产生细胞中。当第一、第二和第三多核苷酸构建体是质粒时,此系统可称为三质粒系统。

[0095] 在使用一种或多种重组质粒来制造rAAV载体的情况下,“rAAV基因组产生质粒”是指包含包含以下的质粒:转基因(可操作地连接至调节序列)和旨在包装至rAAV中的一种或多种ITR,以及对质粒的克隆和扩增很重要,但不包装或衣壳化至rAAV载体中的非rAAV基因组组分(质粒主链)。如本文所用的术语“构建体”是指重组多核苷酸构建体(即,具有衍生自不同来源的元件的多核苷酸),其可以是质粒。

[0096] 术语“转导”和“转染”是指将多核苷酸引入宿主细胞或靶细胞中。在实施方案中,宿主细胞是产生细胞,例如HEK293细胞。在实施方案中,通过瞬时转染方法将rAAV基因组产生质粒与提供辅助病毒功能和AAV功能的一种或多种质粒一起引入产生细胞中。瞬时转染产生细胞以引入包含转基因和ITR的第一多核苷酸构建体(例如rAAV基因组产生质粒);和任选地提供AAV功能(rep和cap基因)和辅助病毒功能的第二和/或第三多核苷酸构建体可通过标准转染方法来完成,所述标准转染方法包括例如磷酸钙共沉淀、基于阳离子脂质的转染和基于阳离子聚合物的转染。基于阳离子脂质的转染包括例如Lipofectamine (DOSPA (2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙亚胺)和DOPE(1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)的3:1混合物)。基于阳离子聚合物的转染包括例如使用直链和/或支链聚乙烯亚胺(PEI)、聚-L-赖氨酸、聚-L-精氨酸、聚酰胺胺树枝状聚合物等。在实施方案中,使用基于PEI的转染试剂进行产生细胞的瞬时转染。PEI可以是直链或支链聚合物。在实施方案中,PEI是20-25kD直链PEI。例如,在实施方案中,PEI是jetPEI或PEIpro(可从Polyplus获得)。另外,可使用包含阳离子脂质和阳离子聚合物两者的转染试剂来进行产生细胞的瞬时转染。

[0097] 或者,rAAV可使用杆状病毒载体在昆虫细胞(例如sf9细胞)中或在HSV感染的幼仓鼠肾(BHK)细胞(例如BHK21)中产生。在这两种方法中,当与两种或更多种携带rAAV基因组和再一种AAV rep和cap以及rAAV复制和包装所需的辅助病毒功能的重组病毒共感染时,分别在宿主细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞中触发rAAV产生。

[0098] 产生rAAV颗粒

[0099] 通常,产生阶段(也称为产生步骤)之后是将rAAV基因组载体和/或提供辅助病毒功能和/或AAV功能的载体引入产生细胞的步骤。在实施方案中,通过在引入rAAV基因组载体之后培养细胞至少约48小时(例如47.5、48、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、96.5或97小时)来产生rAAV颗粒。在实施方案中,将转染的产生细胞培养(即维持产生阶段)约72至约100小时、约90小时至约100小时、约92小时至约98小时、或约94至约98小时。在实施方

案中,产生阶段维持约96小时。

[0100] 产生阶段培养基可以是适合在产生细胞中产生rAAV的任何细胞培养基。在实施方案中,产生培养基不含动物产品,例如血清。在本文中,“不含”意味着培养基中具有不可检测水平的动物产品,例如血清。在实施方案中,产生培养基的pH与扩增阶段培养基的pH相比降低。在实施方案中,产生培养基的pH维持在约6.8至约7.4(例如约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3或约7.14)。在实施方案中,pH维持在约6.9至约7.3。

[0101] 在所述方法的实施方案中,产生阶段包括将钙离子添加至产生阶段细胞培养基中。将钙离子添加至产生培养基中,在本文中也称为钙补充,包括添加钙盐形式的钙离子(Ca^{2+}),例如 CaCl_2 。可在引入rAAV基因组载体后(例如转染后)的产生阶段期间一次或多次添加钙离子。例如,可在产生阶段开始后(即转染后)约0小时至约48小时之间,例如约1小时、约6小时、约10小时、约12小时、约20小时、约24小时、约30小时、约36小时、和/或约48小时一次或多次添加钙离子。

[0102] 可将钙离子(例如, CaCl_2)添加至产生培养基中以实现培养基中的钙离子总浓度大于0.3mM且小于10mM。在实施方案中,添加钙离子至总浓度为约1mM至约9mM、约1mM至约8mM、约1mM至约7mM、约2mM至约9mM、约2mM至约8mM、约2mM至约7mM、约2mM至约6mM、约2mM至约5mM、或约2mM至约4mM。

[0103] 在实施方案中,产生阶段包括将谷氨酰胺、谷氨酰胺前体或包含谷氨酰胺的氨基酸二肽中的一者或多者添加至产生阶段培养基中。谷氨酰胺、谷氨酰胺前体或包含谷氨酰胺的氨基酸二肽中的一者或多者可以是例如L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺、L-谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸-L-谷氨酰胺、谷氨酰胺蛋白质水解物、L-谷氨酸和谷氨酰胺二肽中的一者或多者。包含谷氨酰胺、谷氨酰胺前体或包含谷氨酰胺的氨基酸二肽中的至少一者的溶液可在例如转染后约6小时、约12小时、约24小时、约48小时或约72小时中的一个或多个时间添加至产生阶段培养基中。

[0104] 在实施方案中,产生阶段包括将山梨醇添加至产生阶段培养基中。山梨醇可在产生阶段期间的一个或多个时间点,例如在转染后约6小时、约12小时、约20小时、约24小时和/或约48小时添加至产生阶段培养基中。在实施方案中,向产生培养基中添加山梨醇至约50mM至约200mM、或约80mM至约120mM的浓度。在实施方案中,向产生培养基中添加山梨醇至约100mM的浓度。

[0105] 在实施方案中,产生阶段包括向产生阶段培养基中添加抗结块补充剂。抗结块补充剂可在一个或多个时间点添加至产生阶段培养基中(例如在转染后约6、约10、约12、约20、约24、约48或约72小时中的一者或多者)。在实施方案中,抗结块补充剂包含硫酸葡聚糖、肝素和/或抑制产生细胞聚集的其它硫酸化糖胺聚糖。在实施方案中,抗结块补充剂包含肝素钠,其可以约25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至约250 $\mu\text{g}/\text{ml}$,例如约25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和/或约200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度添加至培养基中。

[0106] 在实施方案中,抗结块补充剂不添加至产生阶段培养基,或仅在产生阶段结束前不久添加至产生阶段培养基,例如在产生阶段结束的约24小时内、约12小时内、约6小时内、约3小时内、约2小时内或约1小时内。

[0107] 分离和纯化rAAV

[0108] 本文所述的方法的实施方案包括在产生阶段结束时分离和纯化rAAV颗粒(rAAV全

衣壳)。在实施方案中,可在引入rAAV载体,和/或辅助功能和/或AAV rep/cap序列之后(换句话说,在产生阶段开始之后)约48小时或更长时间(例如47.5、48、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、96.5、97小时)分离rAAV颗粒。例如,可在引入rAAV载体,和/或辅助功能和/或AAV rep/cap序列之后约90至约100小时、约92小时至约98小时、或约94至约98小时分离rAAV颗粒。在实施方案中,在引入rAAV载体和/或辅助功能和/或AAV rep/cap序列之后约96小时,rAAV颗粒被分离(例如,细胞被裂解)。分离rAAV可包括多个步骤,包括例如裂解生产细胞得到细胞裂解物、澄清裂解物得到澄清的裂解物以及随后的纯化步骤。

[0109] rAAV颗粒可在产生后保留在产生细胞内,并且释放细胞内rAAV载体的方法包括物理和化学破坏,例如使用洗涤剂、微流化和/或均质化。在实施方案中,使用两性去垢剂、N,N-二甲基十四胺N-氧化物(TDAO)(可从MilliporeSigma Burlington,MA以 **Devirion®** C16的形式商购获得)实现细胞膜破裂(裂解)和从细胞中释放rAAV或AAV颗粒(回收)。例如,当回收rAAV5、AAV5、rAAV2或AAV2颗粒时,可以使用约0.1%至约0.5%(例如0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.51%)的 **Devirion®** C16。在其它实施方案中,使用高渗休克(外部渗透压增加)来裂解细胞并释放rAAV或AAV颗粒。例如,在回收rAAV8或AAV8颗粒时,可以对生产细胞进行高渗休克,培育持续时间为约90至约120分钟(例如约89、90、95、100、105、115、120、121分钟),并且NaCl浓度为约400mM(例如约399、400、401mM)。在细胞裂解期间和/或随后在细胞裂解之后,可添加核酸酶,例如全能核酸酶(benzonase)以降解污染DNA。典型地,将所得裂解产物澄清以去除细胞碎片并提供澄清的细胞裂解物。在实施方案中,澄清的裂解物以弱分配模式经受AEX,以将全衣壳与空衣壳分离,如本文所述。

[0110] 实施例

[0111] 实施例1.使用弱分配模式的阴离子交换色谱来提供高的空AAV衣壳去除率和产物产率

[0112] 开发了阴离子交换步骤来最大限度地富集AAV-AQP1(AAV2)的全衣壳。全衣壳和空衣壳的相似特性导致产物产量与全衣壳比例之间的权衡,这使选择最佳条件变得困难。筛选不同的表面活性剂类型和浓度,以最大限度地提高AAV2载体的产物产率。探索设计空间导致弱分区模式被鉴定为结合洗脱模式的替代模式(图1、2),并且鉴定了仅在流通中就能去除>50%的空衣壳的条件。结合高NaCl洗涤,获得了含有>80%全衣壳的洗脱液。结果表明,使用本文所述的新条件,可以稳健地实现通过分析超速离心(AUC)确认的>80%的全衣壳比率和>50%的产物产率。了解设计空间并鉴定过程故障点意味着所述过程可以在制造规模上重现。

[0113] 在初始实验设计中,从初始AEX平台拟合实验中鉴定了进一步优化的参数和范围,并列于表1中:

[0114] 表1

[0115]	参数	范围
	负荷挑战 (VG/mL)	5×10^{13} - 1×10^{14}
	平衡/进料NaCl浓度 (mM)	65-90
	洗涤2NaCl浓度 (mM)	100-125
	洗脱NaCl浓度 (mM)	200-300

[0116] 分析了洗涤2和平衡/进料NaCl浓度 (mM) 与 (i) 空衣壳去除、(ii) 洗脱中的全衣壳

比率以及 (iii) 洗脱中的VG回收率之间的关系。结果在图3-5中示出。实验设计研究 (DOE) 的结果 (图6) 结合起来突出显示了设计空间内的最佳区域,符合预期结果。基于洗涤2和平衡/进料NaCl浓度的最佳区域的参数和值如表2所示:

[0117] 表2

参数	值
流通中的空衣壳	大于50%
洗涤2中的空衣壳去除率	大约10%
洗脱中的VG回收率	大约50%
洗脱中的全衣壳比率	大约50%

[0119] 为了解负载比率如何影响弱分配,分析了负载比率与全衣壳 (VG) 和空衣壳 (VP) 突破之间的关系。结果 (图7) 表明,通过增加负载比率可以使弱分区的效果最大化。参数和值如表3所示:

[0120] 表3

参数	值
负载比率 (VG/ml.)	1×10^{15}
平衡/进料NaCl浓度 (mM)	90

[0122] 参考图7,利用机会窗口意味着至多80%的空衣壳可以突破,而只有10%的全衣壳在流通过程中丢失。

[0123] 整理研究结果,图3所示的结果表明,为了最大程度地去除空衣壳,洗涤2和洗脱都需要高NaCl浓度。增加洗涤2NaCl导致VG损失高达30%;在洗脱阶段仍可恢复50%的VG回收率。参数和优化范围如表4所示:

[0124] 表4

参数	优化范围
负载比率 (VG/ml.)	1×10^{14}
平衡/进料NaCl浓度 (mM)	90
洗涤2NaCl浓度 (mM)	125
洗脱NaCl浓度 (mM)	250

[0126] 图8显示了优化的2L规模的AAV-AQP1 AEX步骤的色谱图,注意到反转突出显示了80%的全衣壳比率 (260nm和280nm UV吸光度迹线的反转通常表示由于存在衣壳化的DNA,因此全衣壳比率较高)。参数和值如表5所示:

[0127] 表5

[0128]	参数	值
	流通中的空衣壳(%)	>40%
	流通中的全衣壳(%)	<1%
	洗涤 2 中的全衣壳(%)	33%
	洗涤 2 中的空衣壳(%)	20%
	洗脱中的 VG 回收率(%)	53%
	洗脱中的全衣壳比率(%)	80%

[0129] 如图9所示,对于VG回收率和全衣壳率,所述过程均可从2L扩展至80L。

[0130] 实施例2:AEX弱分区方案,用于富集全衣壳并提高产率

[0131] 下面描述的实验证明,本文所述的rAAV纯化方法在全衣壳比率和VG回收率方面是一致的,表明所述过程是可扩展的。

[0132] 材料

[0133] AAV进料材料

[0134] 本研究中所述的实验的进料材料由血清型2的腺相关病毒(AAV)衣壳组成,其中包装有编码水通道蛋白1基因的转基因。

[0135] 这些衣壳是使用暂时转染了三重质粒复合物的HEK293细胞通过细胞培养产生的。细胞培养的产生阶段完成后,使用Triton X-100裂解细胞以释放AAV,然后用全能核酸酶处理得到的裂解物。接着使用0.2 μ m PES过滤器澄清裂解物。

[0136] 使用AAVX(ThermoFisher)亲和色谱树脂和AKTA Avant(Cytiva)色谱系统对AAV衣壳进行初步纯化。此纯化是如下进行的:将澄清的裂解物上样至5cm床高的AAVX柱上,上样率为每mL AAVX树脂200mL澄清的裂解物,并且停留时间为1分钟。捕获的AAV衣壳使用由50mM甘氨酸、180mM NaCl、0.25% (w/v) 聚山梨醇酯80,pH 2.7组成的洗脱缓冲液洗脱。

[0137] 化学品

[0138] 这些实验中使用的所有化学品均为从Merck KGaA采购的GMP(良好生产规范)级试剂。

[0139] 方法

[0140] 阴离子交换色谱

[0141] 所有小规模阴离子交换色谱(AEX)实验均使用1mL Sartobind Q(Sartorius)AEX膜和AKTA Avant(Cytiva)色谱系统进行。

[0142] 用于这些实验的缓冲液由50mM tris、0.75% (w/v) 聚山梨醇酯80,pH 9和实验阶段所需的各种浓度的NaCl组成。用于这些实验的进料是AAVX洗脱液,其通过用50mM tris、0.75% (w/v) 聚山梨醇酯80,pH 9.0稀释至目标NaCl浓度进行调节。表6描述了本研究中AEX实验所使用的方法。

[0143] 表6:AEX实验所使用的方法的概述

[0144]

阶段	缓冲液	膜体积 [MV]	流速 [MV/min]
预平衡	50 mM Tris、1 M NaCl、0.75% 聚山梨醇酯 80, pH 9.0	15	10
平衡	参见实验细节	15	10
样品应用	调节后的进料		10
柱洗涤 1	参见实验细节	10	10
柱洗涤 2	参见实验细节	10	10

[0145]

洗脱	参见实验细节	15	10
汽提	50 mM Tris、1 M NaCl、0.75% 聚山梨醇酯 80, pH 9.0	10	10
CIP	0.5 M NaOH	15	10
平衡	50 mM Tris、0.75%聚山梨醇 80, pH 9.0	10	10

[0146] 实验设计

[0147] 进行了DoE研究以评估负载、洗涤和洗脱阶段NaCl浓度以及负载比对全衣壳比率和载体基因组 (VG) 恢复的影响。这项研究包括16次运行,并且表7描述了每次实验中测试的参数值。每次运行都收集流通液、洗涤液2和洗脱液样品,并分析其载体基因组和载体颗粒浓度。

[0148] 表7:为评估测试过程变量对全衣壳纯化的影响而进行的实验设计研究

[0149]

运行	平衡/进料 NaCl 浓度 [mM]	洗涤 2 NaCl 浓度 [mM]	洗脱 NaCl 浓度[mM]	负载比率 [VG/mL]
1	80	100	240	7.50×10^{13}
2	80	110	250	5.00×10^{13}
3	80	125	300	1.00×10^{14}
4	80	110	250	5.00×10^{13}
5	72.5	105	200	1.00×10^{14}
6	72.5	122.5	200	7.50×10^{13}
7	72.5	105	300	7.50×10^{13}
8	90	125	210	1.00×10^{14}
9	90	107.5	200	5.00×10^{13}
10	90	125	220	5.00×10^{13}
11	90	100	300	1.00×10^{14}
12	90	100	300	5.00×10^{13}
13	90	115	280	7.50×10^{13}
14	65	117.5	260	1.00×10^{14}
15	65	100	200	5.00×10^{13}
16	65	125	290	5.00×10^{13}

[0150] 突破实验

[0151] 进行了突破实验,以进一步评估负载比率对AEX过程的影响。将AEX膜负载至 1×10^{15} VG/mL的负载比率,进料已调节至NaCl浓度为90mM。将流通液分成1mL的级分,并分析所得级分以确定其VG和VP浓度。

[0152] 确认和扩大实验

[0153] 通过在10mL Sartobind Q模块上进行纯化来确认优化流程。表8详细说明了此运行所用的方法。对流通、柱洗涤2和洗脱的样品进行了VG和VP浓度分析。另外,通过分析超速离心和qPCR来分析洗脱样品,以确认全衣壳比率和VG回收率。

[0154] 表8:用于确认优化的AEX过程的方法。

[0155]

阶段	缓冲液	膜体积 [MV]	流速 [MV/min]
预平衡	50 mM Tris、1 M NaCl、0.75%聚山梨醇酯 80, pH 9.0	15	10
平衡	50 mM Tris、90 mM NaCl、0.75%聚山梨醇酯 80, pH 9.0	15	10
样品应用	进料调节至 90 mM NaCl		10
柱洗涤 1	50 mM Tris、90 mM NaCl、0.75%聚山梨醇酯 80, pH 9.0	10	10
柱洗涤 2	50 mM Tris、125 mM NaCl、0.75%聚山梨醇酯 80, pH 9.0	10	10
洗脱	50 mM Tris、250 mM NaCl、0.75%聚山梨醇酯 80, pH 9.0	15	10
汽提	50 mM Tris、1 M NaCl、0.75%聚山梨醇酯 80, pH 9.0	10	10
CIP	0.5 M NaOH	15	10
平衡	50 mM Tris、0.75%聚山梨醇酯 80, pH 9.0	10	10

[0156] 为了证明可扩展性,所述过程被扩大至75mL Sartobind® Q膜。此运行使用表8中详述的相同方法进行,并通过分析超速离心和qPCR分析洗脱样品以确定其全衣壳比率和VG回收率。

[0157] 分析方法

[0158] 本研究中产生的样本中的载体基因组浓度是使用特异于AQP1转基因区域的引物和探针通过qPCR确定的。使用Gyrolab® AAVX Titer Kit(Gyros Protein Technologies)确定载体颗粒浓度。

[0159] 在DoE和突破实验中,空衣壳比率是通过将载体基因组浓度除以载体颗粒浓度来估算的。在确认和放大实验中,使用Optima AUC(Beckman)通过分析超速离心来测量全衣壳比率。

[0160] 结果

[0161] DoE

[0162] 通过进行实验设计研究,调查了AEX过程的设计空间,目的是鉴定使全衣壳比率和VG回收率最大化的条件。本研究中探索的变量包括进料NaCl浓度、洗涤2NaCl浓度、洗脱NaCl浓度和负载比率。这些变量的测试范围详见表9。这些实验的结果详见表10,而该数据集中观察到的趋势则在图3、图4和图5中进行了说明。

[0163] 表9:实验设计研究中每个变量的测试范围

[0164]	参数	范围
	负荷挑战(VG/mL)	$5 \times 10^{13} - 1 \times 10^{14}$
	平衡/进料 NaCl 浓度(mM)	65 - 90
	洗涤 2 NaCl 浓度(mM)	100 - 125
	洗脱 NaCl 浓度(mM)	200 - 300

[0165] 表10:为探索AEX过程的设计空间而进行的实验设计研究的结果。

[0166]	平衡/进料 NaCl 浓度(mM)	洗涤 2 NaCl 浓度(mM)	洗脱 NaCl 浓度(mM)	负载比率 (VG/mL)	洗脱中的全衣壳比率(%)	洗脱中的 VG 回收率(%)	洗脱中的 VP 回收率(%)
	80	100	240	7.50E+13	30	100	19.3
	80	110	250	5.00E+13	64	100	55
	80	125	300	1.00E+14	87.3	100	64
	80	110	250	5.00E+13	4.8	100	138.7
	72.5	105	200	1.00E+14	41.6	100	0
	72.5	122.5	200	7.50E+13	60.3	97.3	0
	72.5	105	300	7.50E+13	16.38	79.25	49.56
	90	125	210	1.00E+14	49.6	31.88	10.37
	90	107.5	200	5.00E+13	47.16	51.63	4.71
	90	125	220	5.00E+13	38.05	28.46	15.9
	90	100	300	1.00E+14	49.4	58.29	1.11
	90	100	300	5.00E+13	36.15	56.39	1.69
	90	115	280	7.50E+13	47.72	52.24	6.45
	65	117.5	260	1.00E+14	44	94.21	0
	65	100	200	5.00E+13	26.28	109.8	46.42
	65	125	290	5.00E+13	21.67	62.73	105.53

[0167] 这些实验的进料的全衣壳比率估计不到10%。表10显示,一些测试条件导致估计的全衣壳比率显著增加(至多87%)。图3显示,较高的平衡/进料和洗涤2NaCl浓度导致洗脱池中的空衣壳减少。这是因为进料中较高的NaCl浓度会阻止空衣壳与AEX膜结合。类似地,柱洗涤2中的较高NaCl浓度将导致此阶段空衣壳的洗脱,从而将其从稍后的洗脱池中去除。

[0168] 图4显示了这些效应如何转化为洗脱池中更高的全衣壳比率。由于空衣壳被阻止结合或从柱上洗掉,因此得到的洗脱池具有较高的全衣壳比率。图5显示了增加进料和柱洗涤2NaCl浓度的影响。尽管全衣壳与AEX膜具有更强的相互作用,但随着进料和洗涤2NaCl浓度的增加并破坏这些相互作用,其中一些全衣壳会在流通和洗涤中丢失。图6结合了这些实验中看到的趋势,以突出显示可以实现高全衣壳比率和高VG回收率的区域。

[0169] 突破实验

[0170] 从上述DoE研究观察到,在较高的进料NaCl浓度下,空衣壳会流过膜而不会与Sartobind®Q AEX膜结合。通过进行突破实验进一步研究了这种效应。本实验如下进行:进料NaCl浓度为95mM,以使这种效应最大化,并将膜负载至 1×10^{15} VG/mL,以确保衣壳能够突

破进入流通液。

[0171] 对流通液样品进行分析以确定其VG和VP浓度,并且结果示于图10中。这些结果表明,在这些进料条件下,载体粒子在实验开始后几乎立即开始突破。但由于载体基因组直到负载率达到约 2.5×10^{14} VG/mL时才发生突破,因此可以得出结论,突破的载体颗粒为空衣壳。

[0172] 研究结果还表明,载体基因组正在逐步突破。通常,预计会出现急剧的突破轮廓,表明色谱基质已达到饱和。然而,这种逐步突破表明可能正在发生弱分割。在弱分配下,由于全衣壳与膜之间的带电相互作用更强,因此全衣壳开始取代与色谱膜结合的空衣壳。这样做的好处是进一步增加最终从膜上洗脱的产物的全衣壳比率。

[0173] 确认运行和扩大规模

[0174] 通过使用10mL **Sartobind®Q**和表8中详细列出的过程条件进行更大规模的运行,确认了鉴定的过程条件。图11显示了此次运行的色谱图摘录,重点是柱洗涤2和洗脱阶段。该图显示260nm和280nm UV吸光度迹线的反转,这通常指示由于存在衣壳DNA,因此全衣壳比率较高。通过分析超速离心来分析此次运行的洗脱液,以确认全衣比率。发现全衣壳比率从进料中的31%增加至洗脱液中的81.5%。洗脱液的相应AUC迹线示于图12中。

[0175] 在75mL **Sartobind®Q**上进行了进一步运行,以确认所述过程的可扩展性。图9比较了10mL和75mL运行的结果。该图显示所述过程在全衣壳比率和VG回收率方面是一致的,表明所述过程是可扩展的。

[0176] 实施例3. 从初始AEX平台和其它实验中鉴定参数和范围

[0177] 进行了平台适配实验。图13显示了初始AEX色谱运行的色谱图。AEX步骤中使用的条件如下所示:

参数	值
目标负载挑战 (VG/mL)	6E13

[0178]

步骤	缓冲液
预平衡	50 mM Tris、1M NaCl、0.75% (w/v)聚山梨醇酯 80, pH 9.0
平衡	50 mM Tris、65 M NaCl、0.75% (w/v)聚山梨醇酯 80, pH 9.0
柱洗涤 1	50 mM Tris、65 M NaCl、0.75% (w/v)聚山梨醇酯 80, pH 9.0
柱洗涤 2	50 mM Tris、90 mM NaCl, pH 9
洗脱	50 mM Tris、185 M NaCl、0.75% (w/v)聚山梨醇酯 80, pH 9.0
汽提	50 mM tris、1 M NaCl、0.75% (w/v)聚山梨醇酯 80, pH 9.0

步骤	步长
预平衡	15 CV
平衡	15 CV
柱洗涤 1	10 CV
柱洗涤 2	10 CV
洗脱	15 CV
汽提	10 CV

[0179] 下表11中显示的参数和范围是从初始AEX平台适配实验(图13)中确定的。这些初始实验在图19中被称为“初始过程”,其表明初始过程中的USP、捕获色谱、离子交换色谱(IEX)和切向流过滤(TFF)之后的VG回收率和全衣壳%值。这些值与本文描述的本发明优化过程获得的值进行了比较(参见图19中的“最终过程”)。

[0180] 表11:自定义DOE条件

[0181]	参数	范围
	负荷挑战 (VG/mL)	$5 \times 10^{13} - 1 \times 10^{14}$
	进料全衣壳比率 (%)	<10
	平衡/进料NaCl浓度 (mM)	65-90
	洗涤2NaCl浓度 (mM)	100-125
	洗脱NaCl浓度 (mM)	200-300

[0182] 关于参数与洗脱中的空衣壳、全衣壳、VG回收率%的以下关系,参见图3-5:

[0183] • 图3:洗涤2和平衡/进料NaCl浓度 (mM) 与洗脱中存在的空衣壳 (VP/mL) 之间的关

系

[0184] • 图4:洗涤2和平衡/进料NaCl浓度 (mM) 以及洗脱中的全衣壳比率 (%) 之间的关系

[0185] • 图5:洗涤2和平衡/进料NaCl浓度 (mM) 以及洗脱中的VG回收率 (%) 之间的关系

[0186] 图6显示了基于图1-3中的洗涤2和平衡/进料NaCl浓度 (mM) 的最佳区域。图1和2是显示弱分区过程的图表,其中由于所创建的环境,空衣壳被全衣壳取代。图中显示了pI之上和之下的空AAV衣壳和全AAV衣壳的电荷。(Cytiva Life Sciences Marlborough, Massachusetts 2022.Enhanced AAV downstream processing)。

[0187] 进行了额外的突破实验,以鉴定在增加负载挑战时,在不同的进料和平衡电导率下是否以不同的速率利用弱分配。

[0188] 方法和材料

[0189] 运行1:进料材料和平衡缓冲液,电导率为90mM NaCl。

[0190] 运行2:进料材料和平衡缓冲液,电导率为80mM NaCl。

[0191] 将0.08mL Sartobind Q与AAV-AQP1中和的AAVX洗脱液一起上样至4E14 VG/mL,并对流通样品进行分级并使用qPCR来分析VG滴度以及使用Gyrolab来分析VP滴度。

[0192] 表12:AAQ-AQP1 AAVX材料的负载挑战

[0193]	参数	值
	负荷挑战 (VG/mL)	4E14

[0194] 表13:两个突破曲线实验中使用的缓冲液

	步骤	缓冲液
	平衡	运行 1: 50 mM Tris、90 mM NaCl、0.75% Tween 80, pH 9 运行 2: 50 mM Tris、80 mM NaCl、0.75% Tween 80, pH 9
[0195]	柱洗涤 1	运行 1: 50 mM Tris、90 mM NaCl、0.75% Tween 80, pH 9 运行 2: 50 mM Tris、80 mM NaCl、0.75% Tween 80, pH 9
	柱洗涤 2	50 mM Tris、125 mM NaCl, pH 9
	洗脱	50 mM Tris、250 mM NaCl, pH 9

[0196] 表14:色谱运行中各步骤的长度。用于第一次运行和第二次运行的方法。

[0197]	步骤	步长
	预平衡	10CV
	平衡	15CV
	样品应用	0.5mL级分
	柱洗涤1	15CV
	柱洗涤2	15CV
	洗脱	15V

[0198] 从图14可以看出,当计算空衣壳和全衣壳的突破曲线时,9mS/cm的目标电导率似乎有利于全衣壳的结合,而不是空衣壳的结合。为了检查柱上发生的情况,检查了当VG负载挑战增加至4E14 vg/ml时柱上的VG浓度(图15,顶部图表),并且检查了当VG负载挑战增加

至4E14 VG/mL时柱上的空衣壳比率(图15,底部图表)。为了确定对柱上的全衣壳比率的影响,对VG负载挑战增加时柱上的全衣壳比率进行了分析。如图16所示,在任何形式的洗涤或洗脱步骤之前,观察到从38%增加至>55%。与图14所示类似,当查看图17时,可以清楚地看到,以目标9mS/cm负载允许比以目标8mS/cm更高的富集水平,表明在尝试利用弱分配和最大化富集时,进料和平衡进料电导率很重要。

[0199] 关于在20L规模确认运行中优化的AAV-AQP1 AEX步骤的色谱图,参见图18。如图所示,获得了80%的全衣壳比率。此次确认运行的参数和值如下表15所示。再次参考图19,显示了“初始过程”值与“最终过程”值之间的差异。

[0200] 表15:

[0201]	参数	值
	流通中的空衣壳(%)	>40%
	流通中的全衣壳(%)	<1%
	洗涤2中的全衣壳(%)	33%
	洗涤2中的空衣壳(%)	20%
	洗脱中的VG回收率(%)	53%
	洗脱中的全衣壳比率(%)	80%

[0202] 对于扩大至20L和80L批次而言,图20显示了20L和80L批次的全衣壳比率与VG回收率的比较。该图还包括AUC结果,确认图18中的洗脱峰含有80%全衣壳。

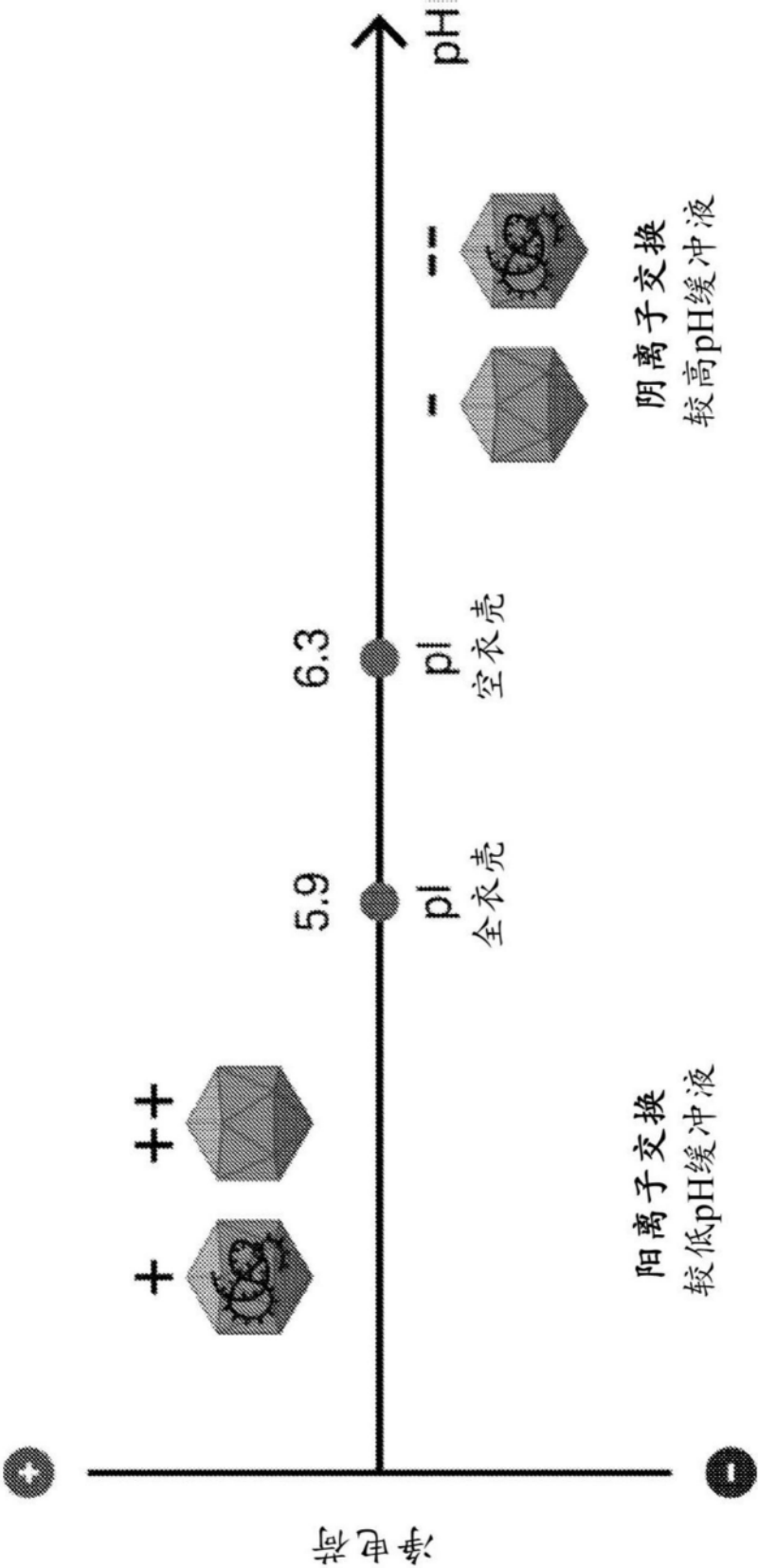


图1

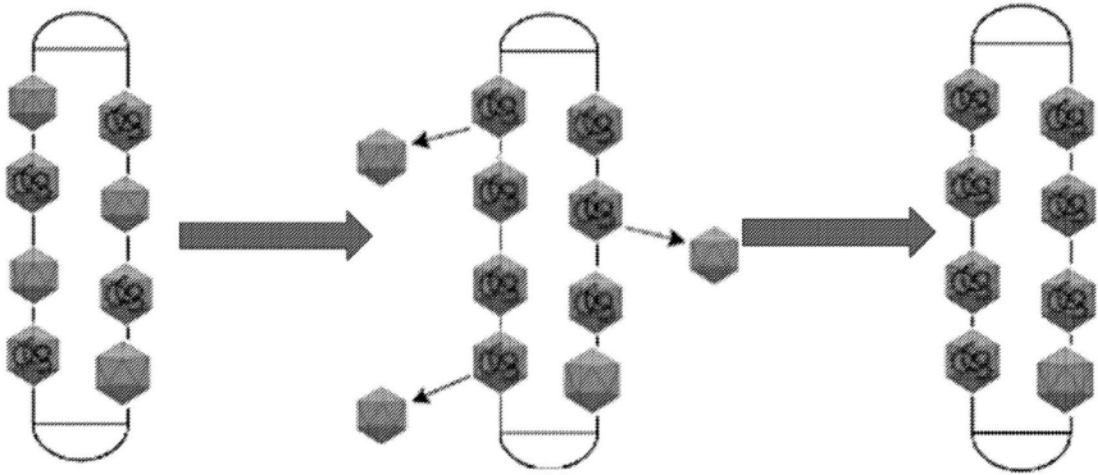


图2

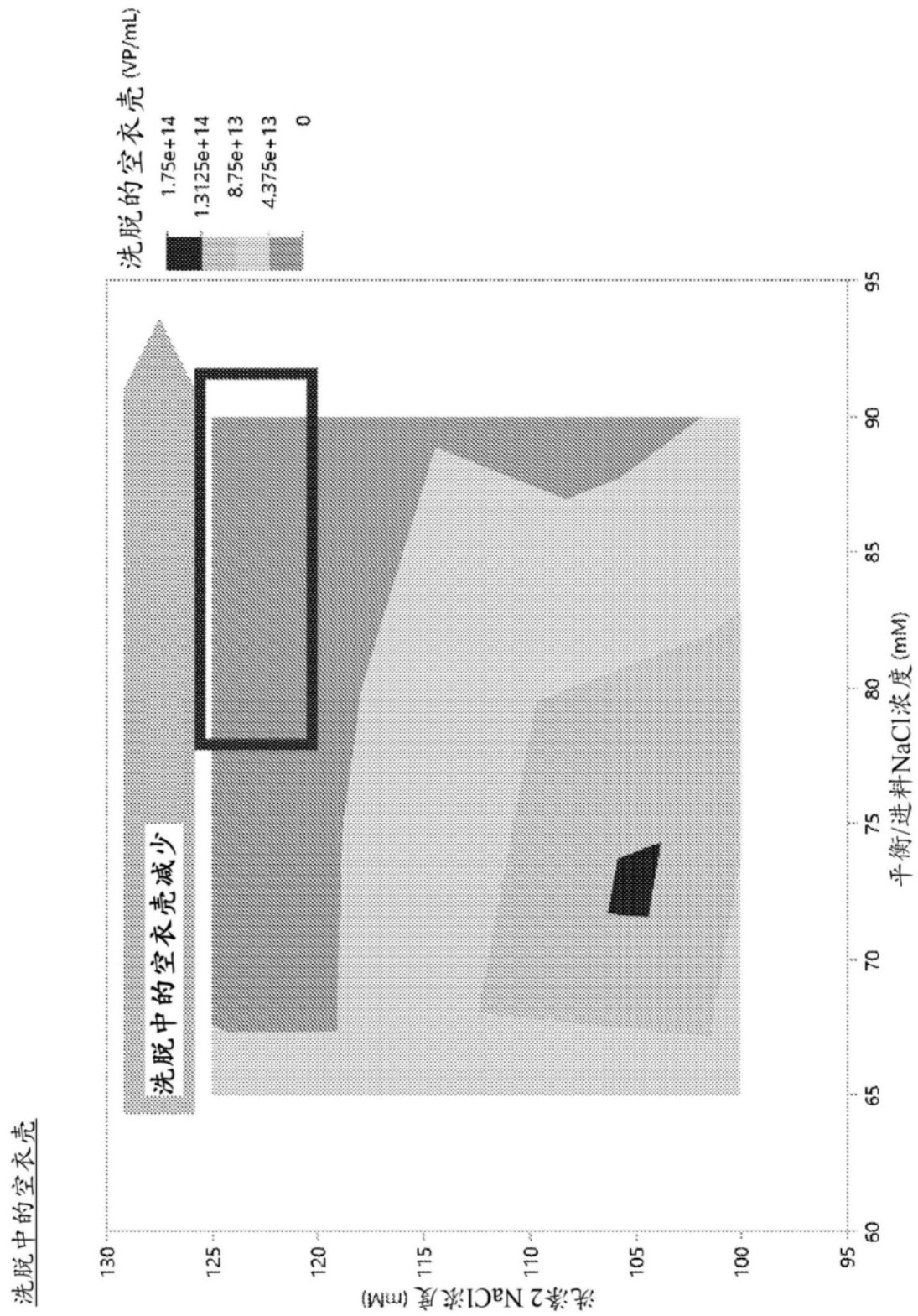


图3

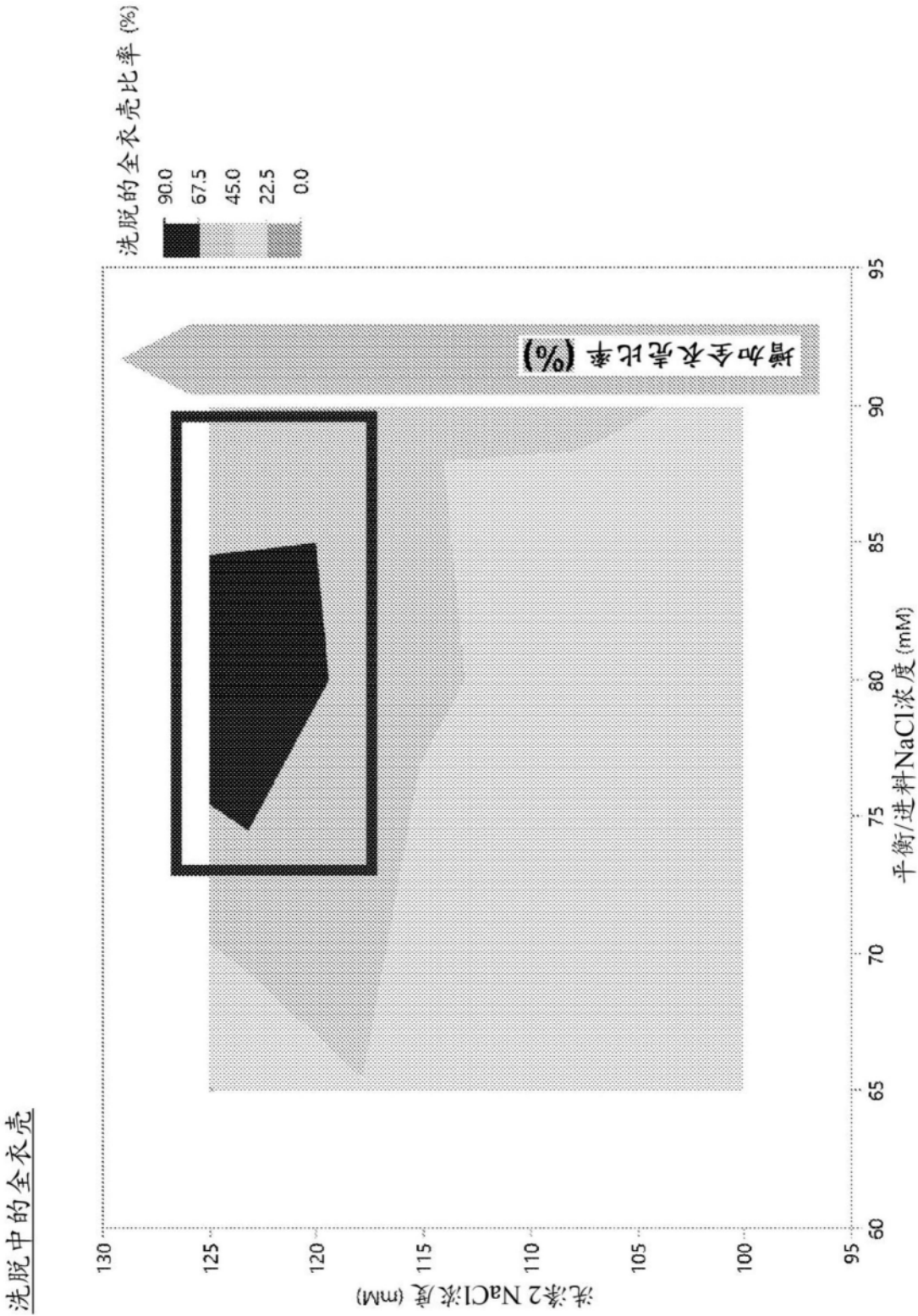


图4

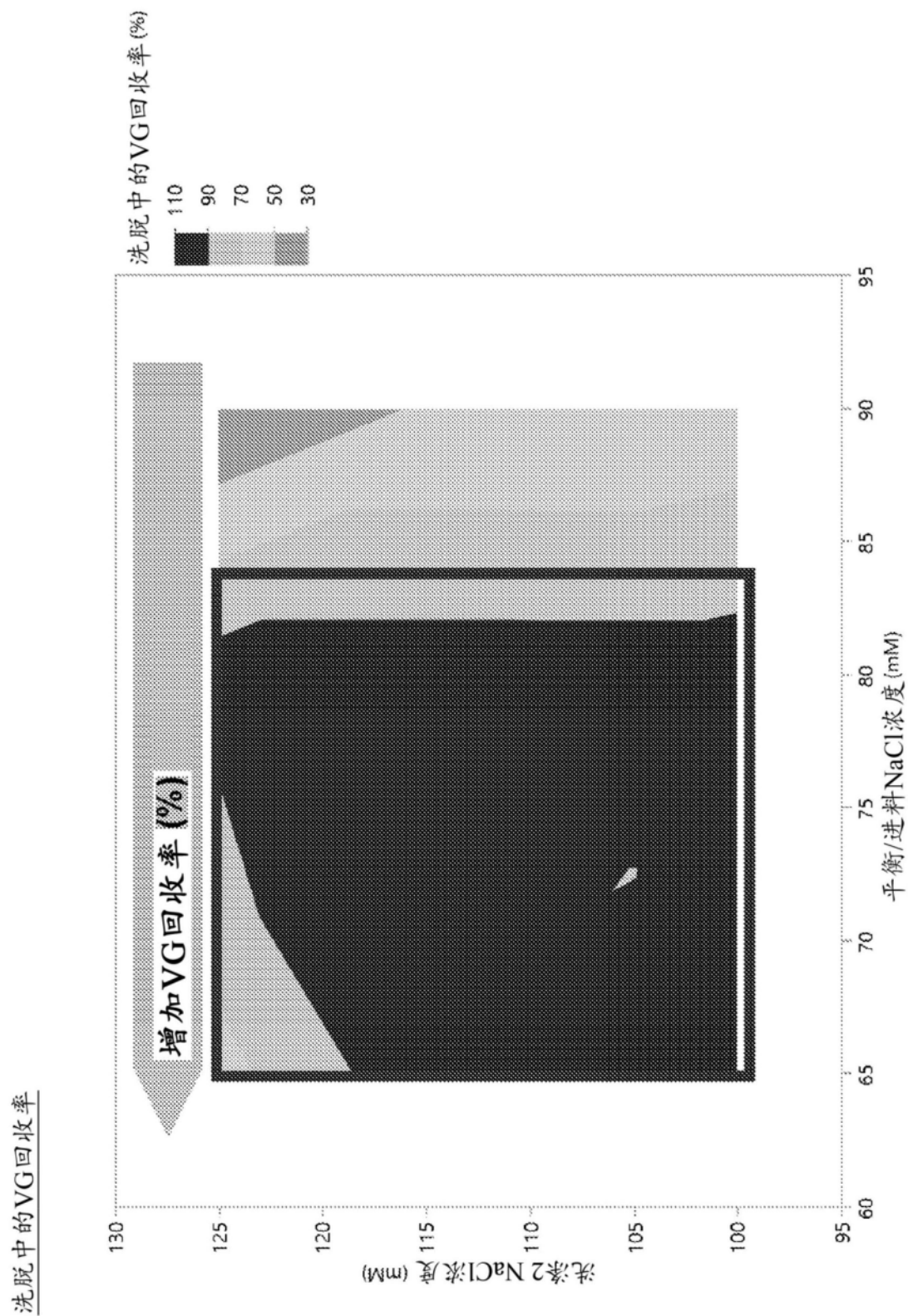


图5

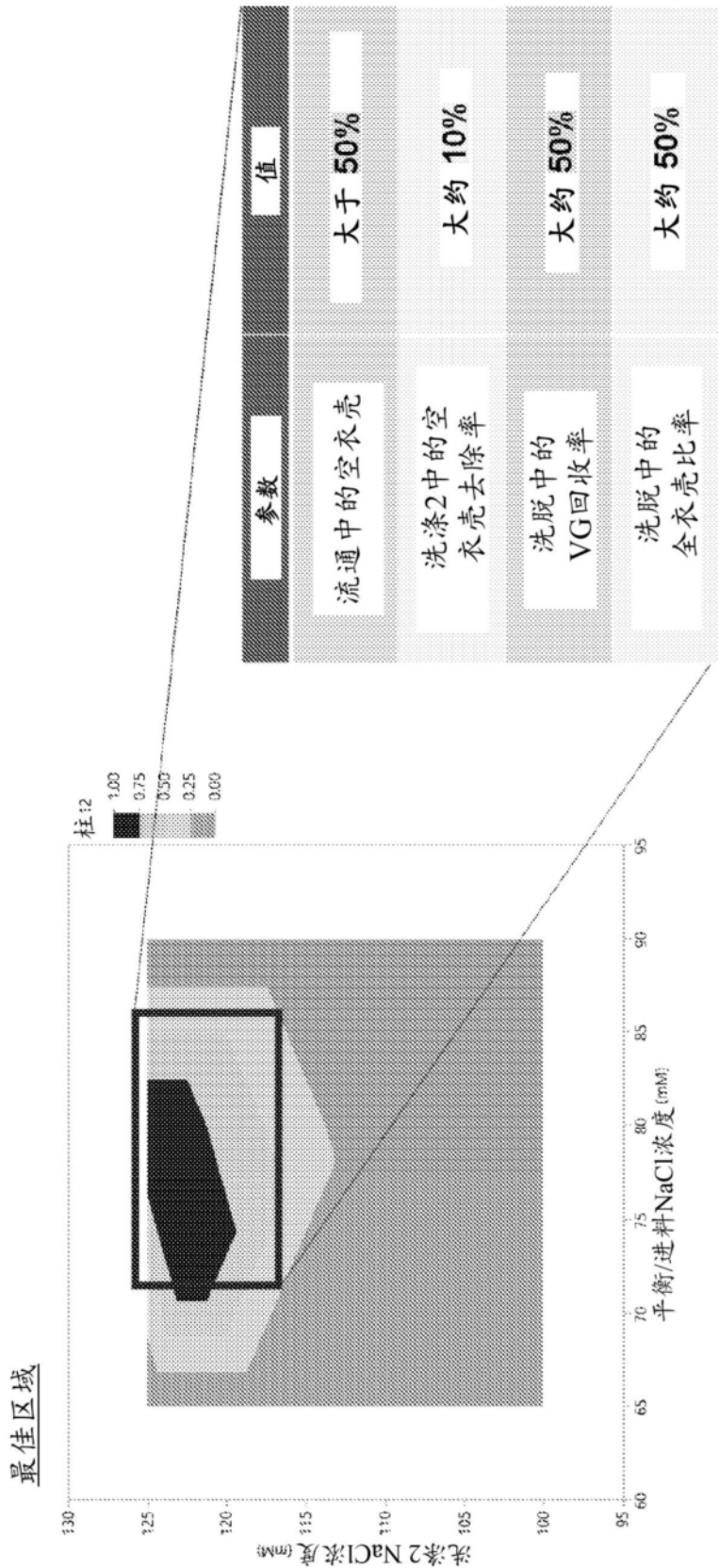


图6

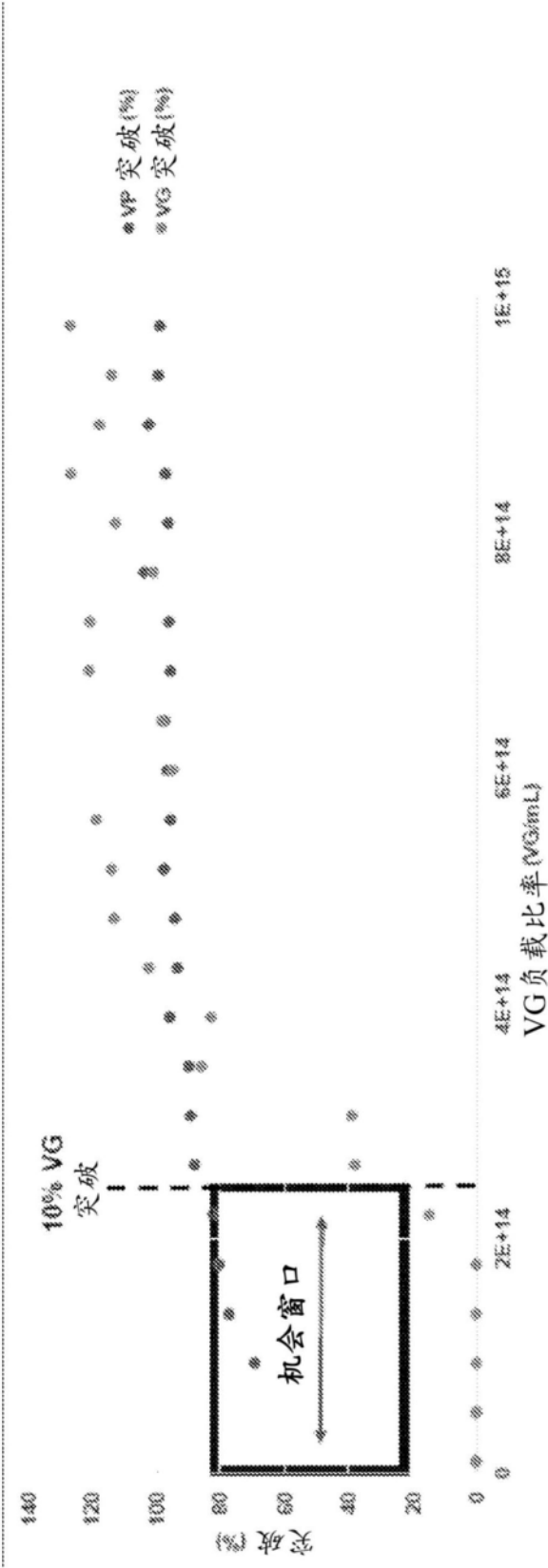


图7

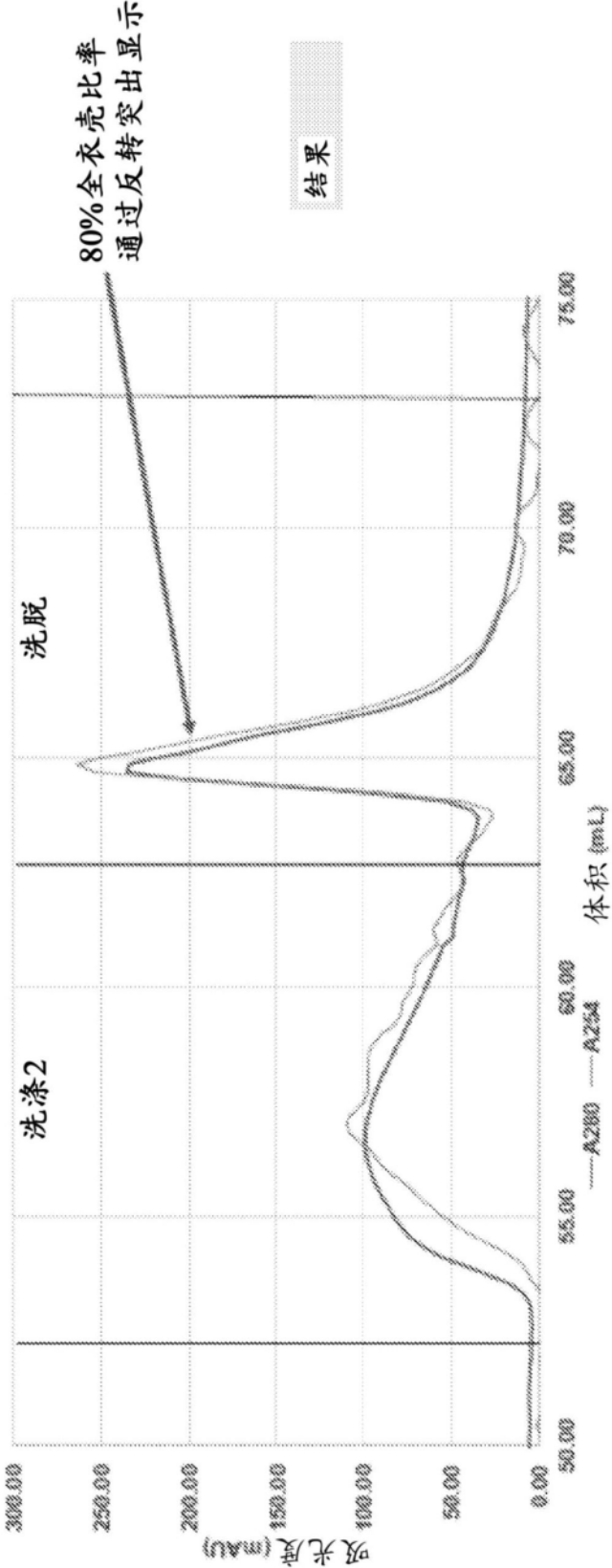


图8

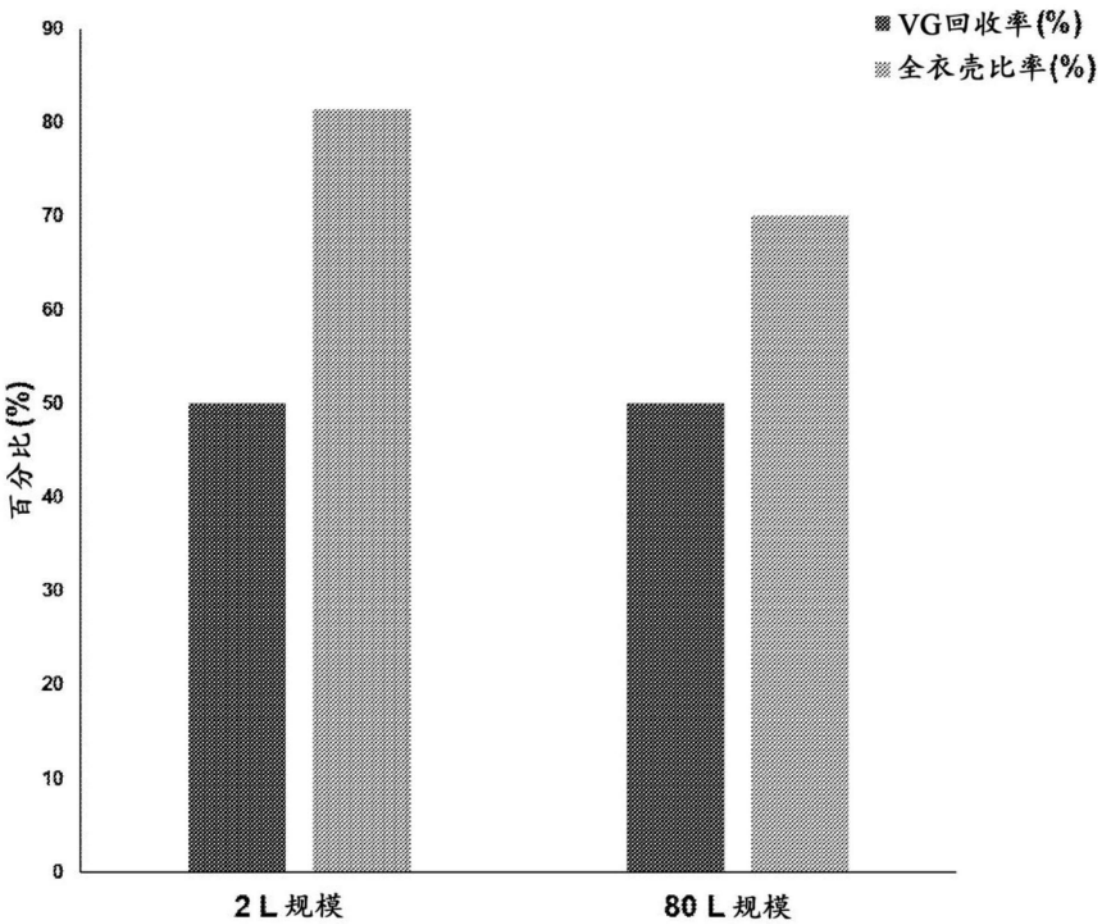


图9

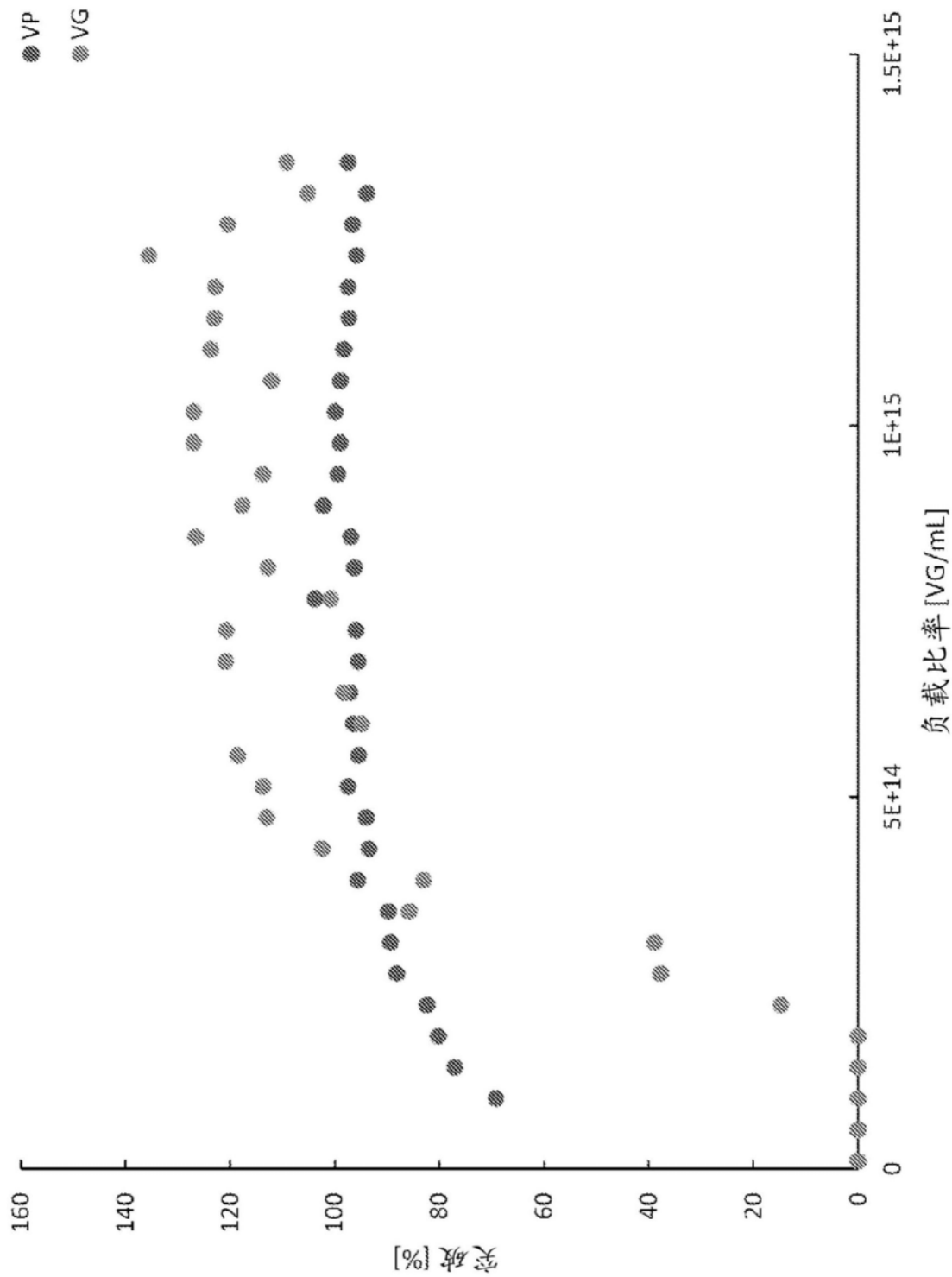


图10

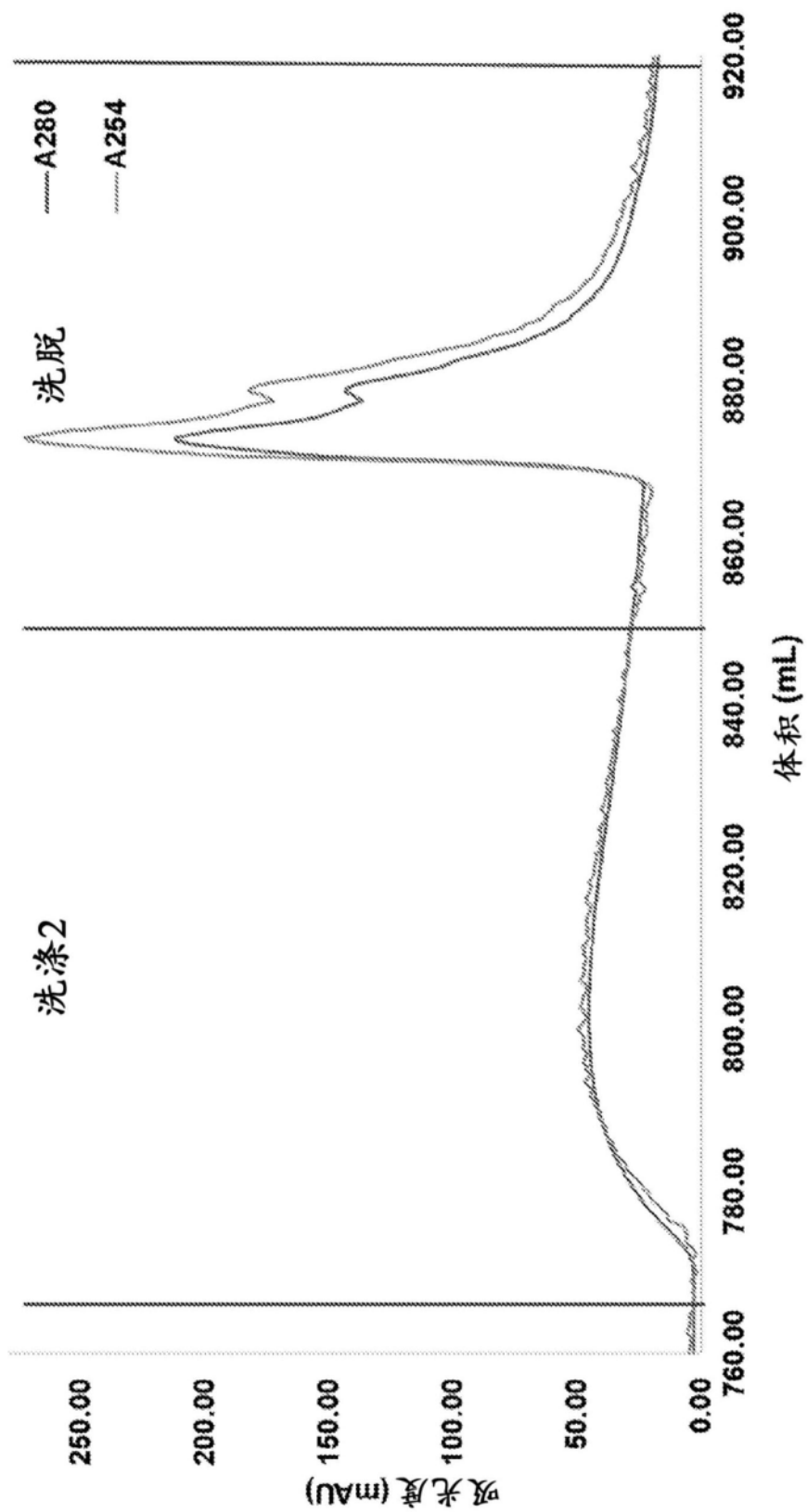


图11

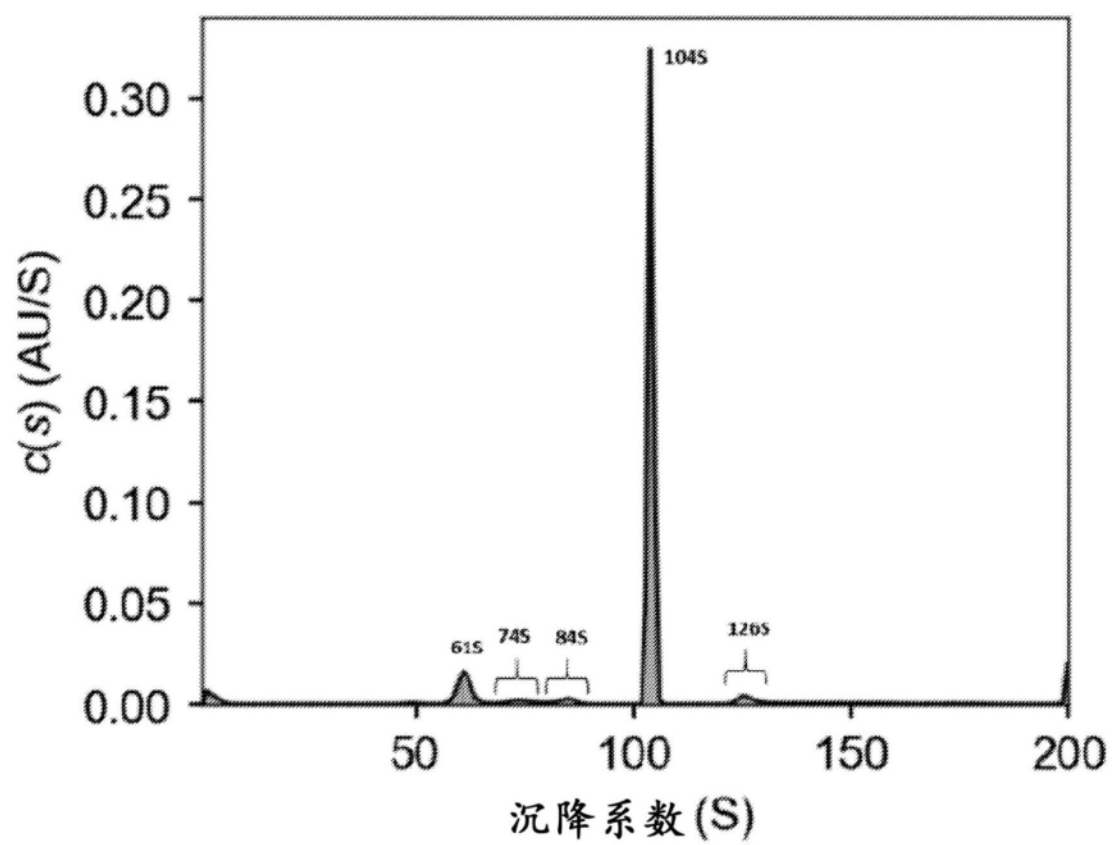


图12

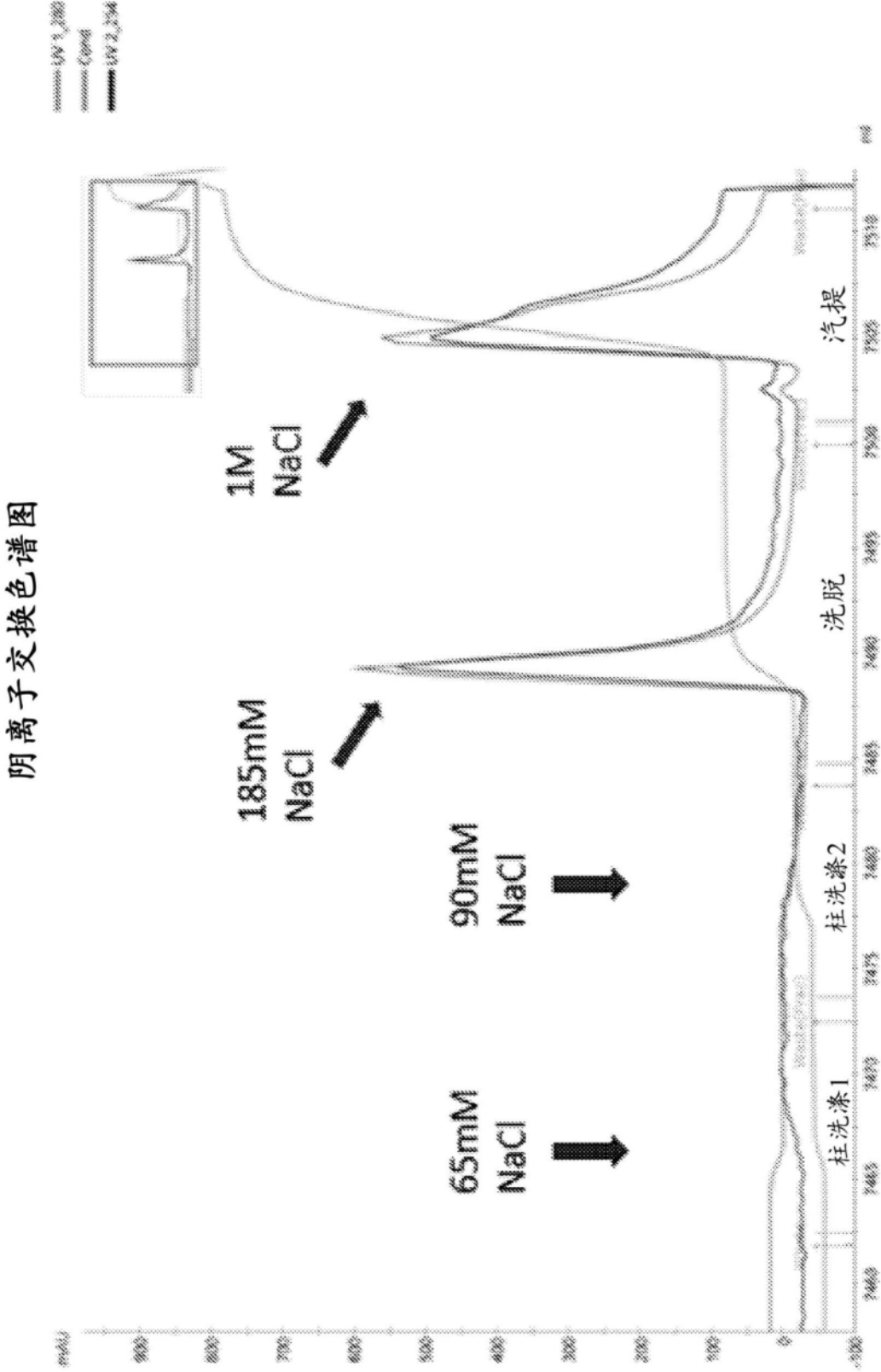


图13

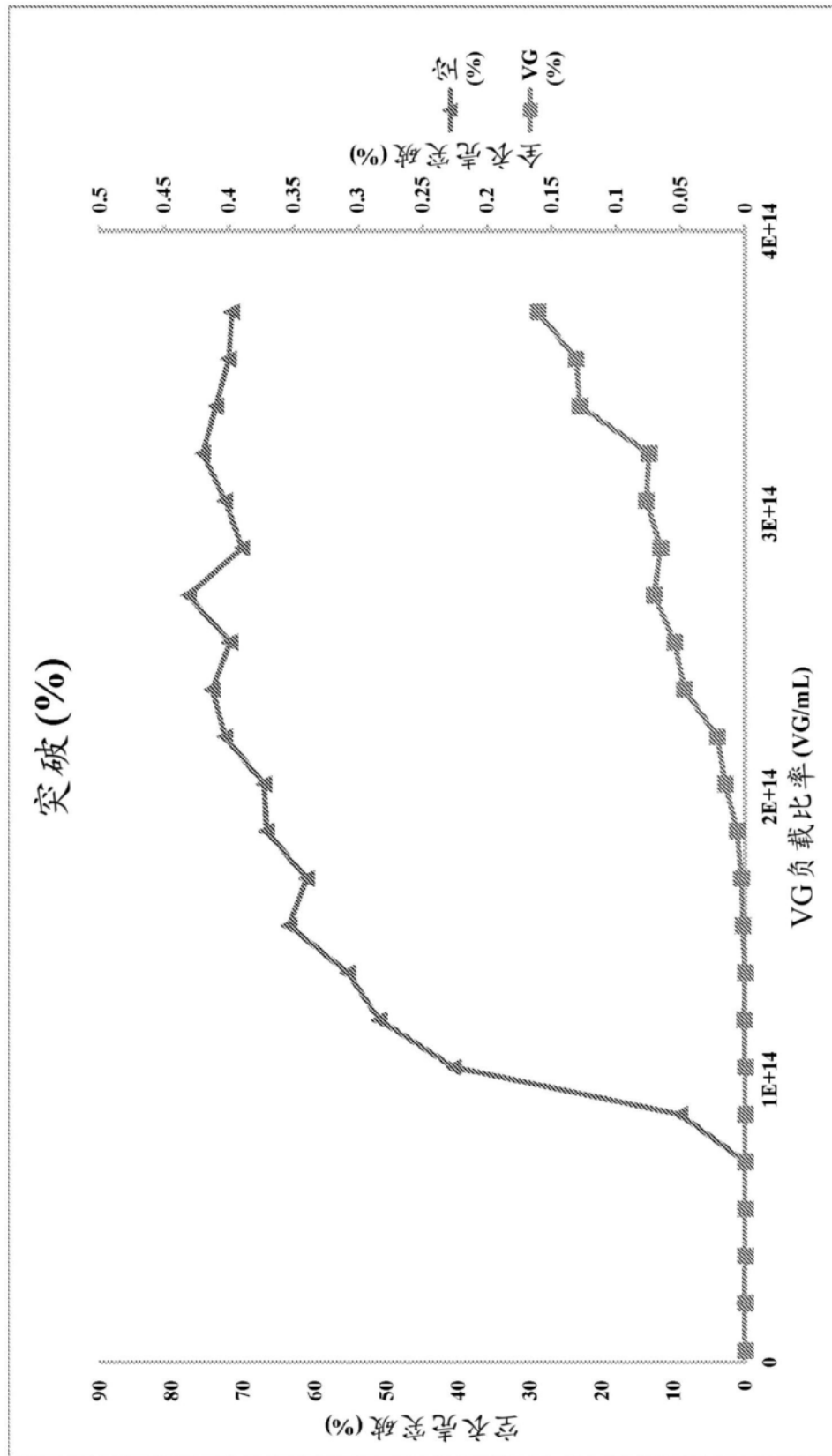


图14

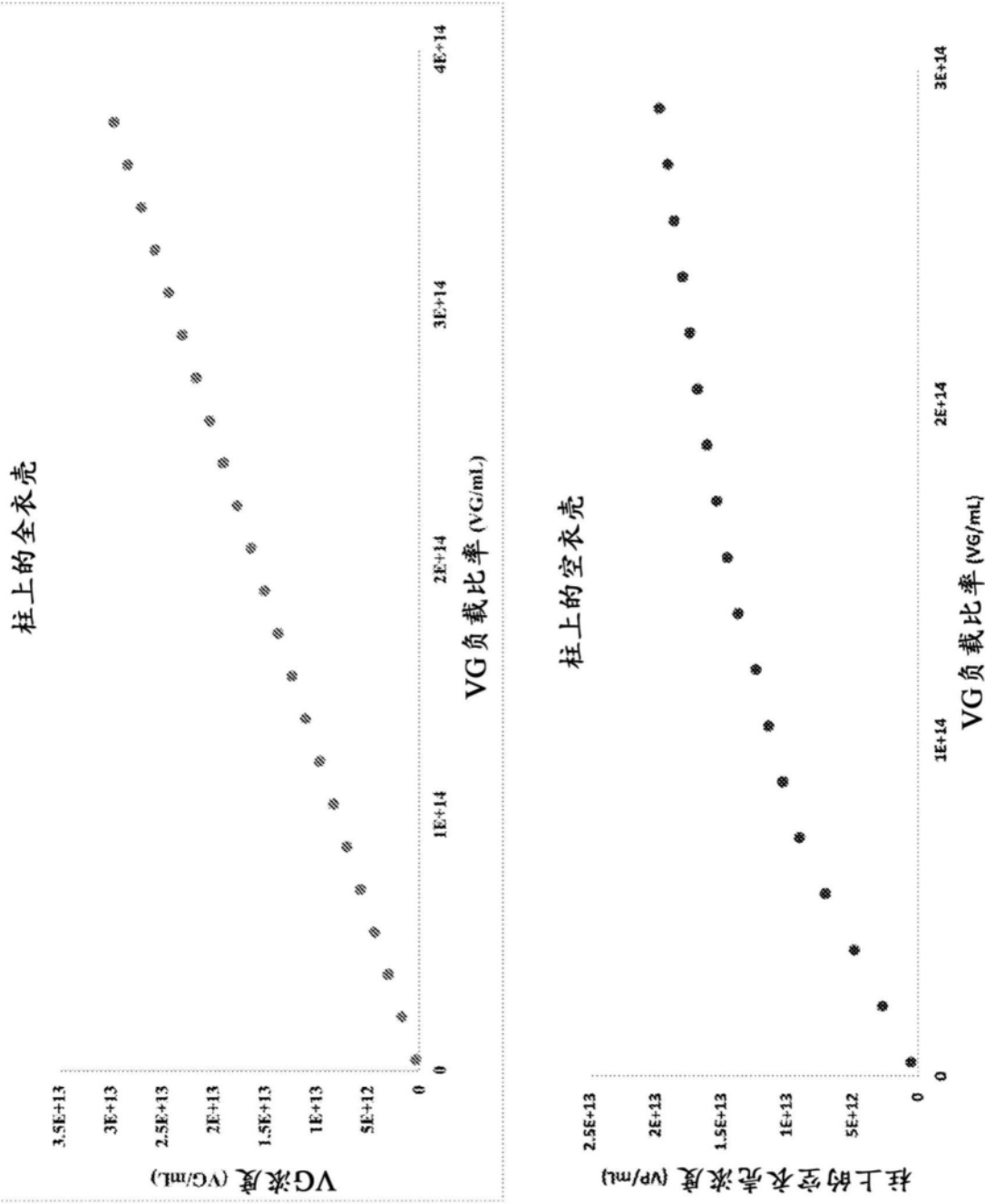


图15

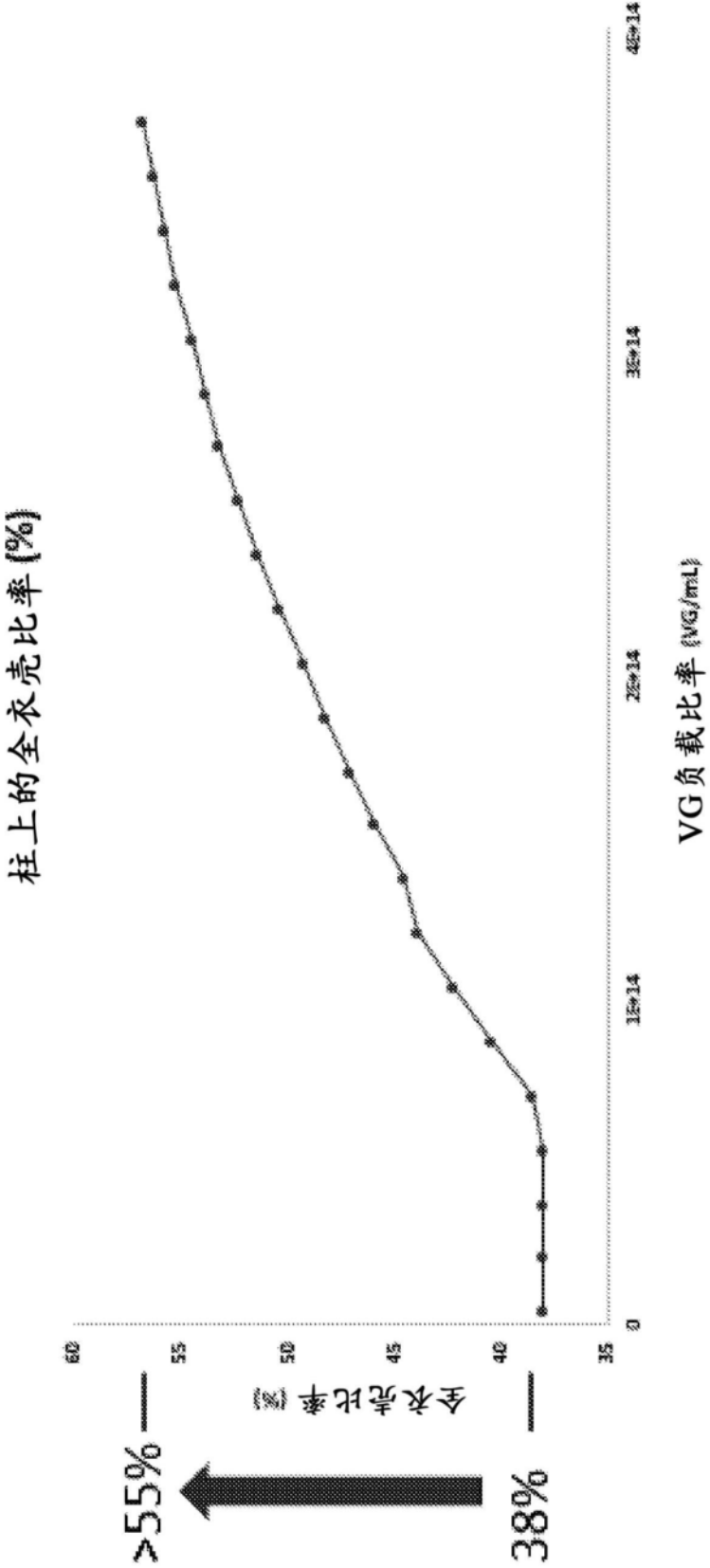


图16

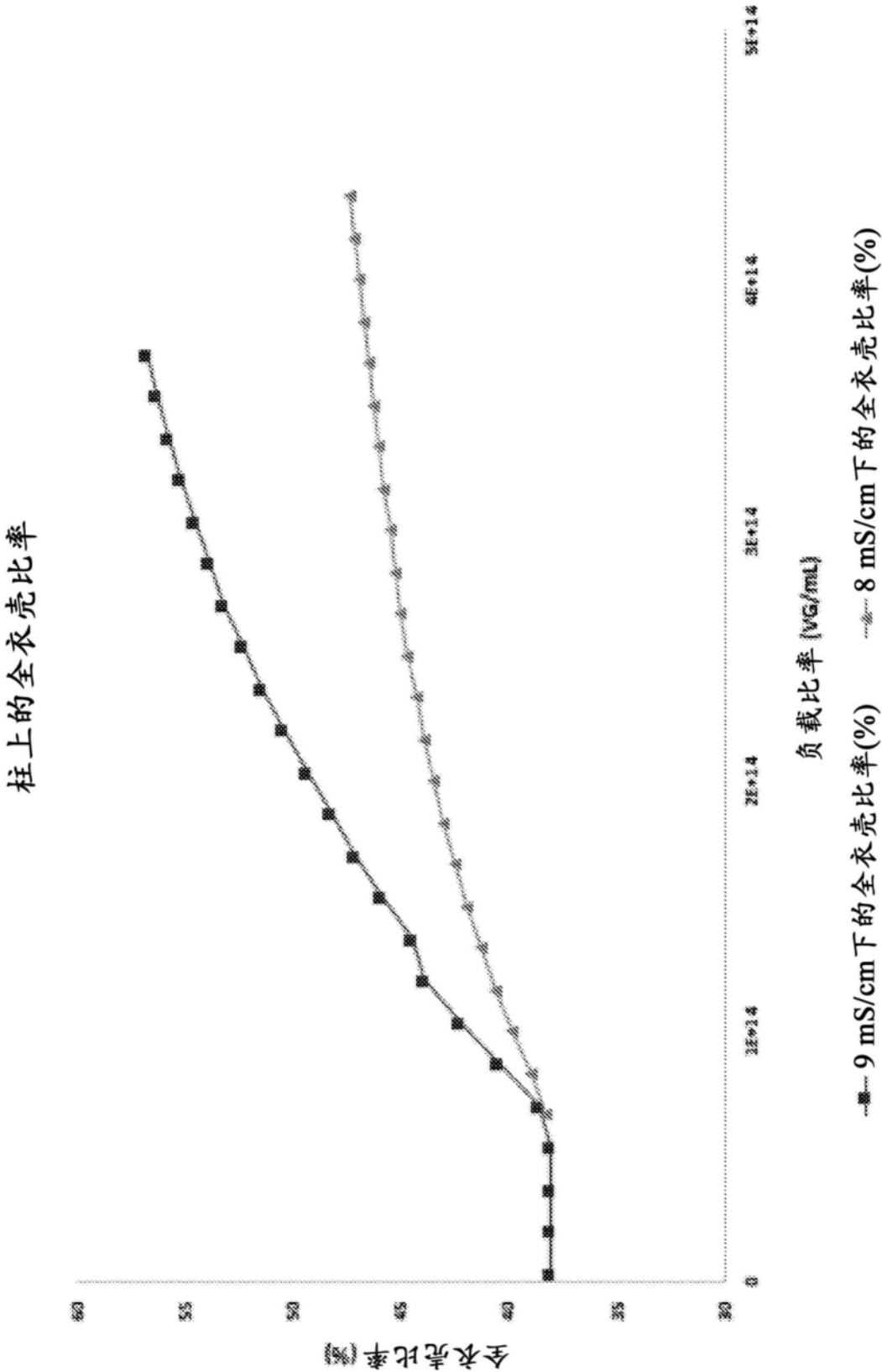


图17

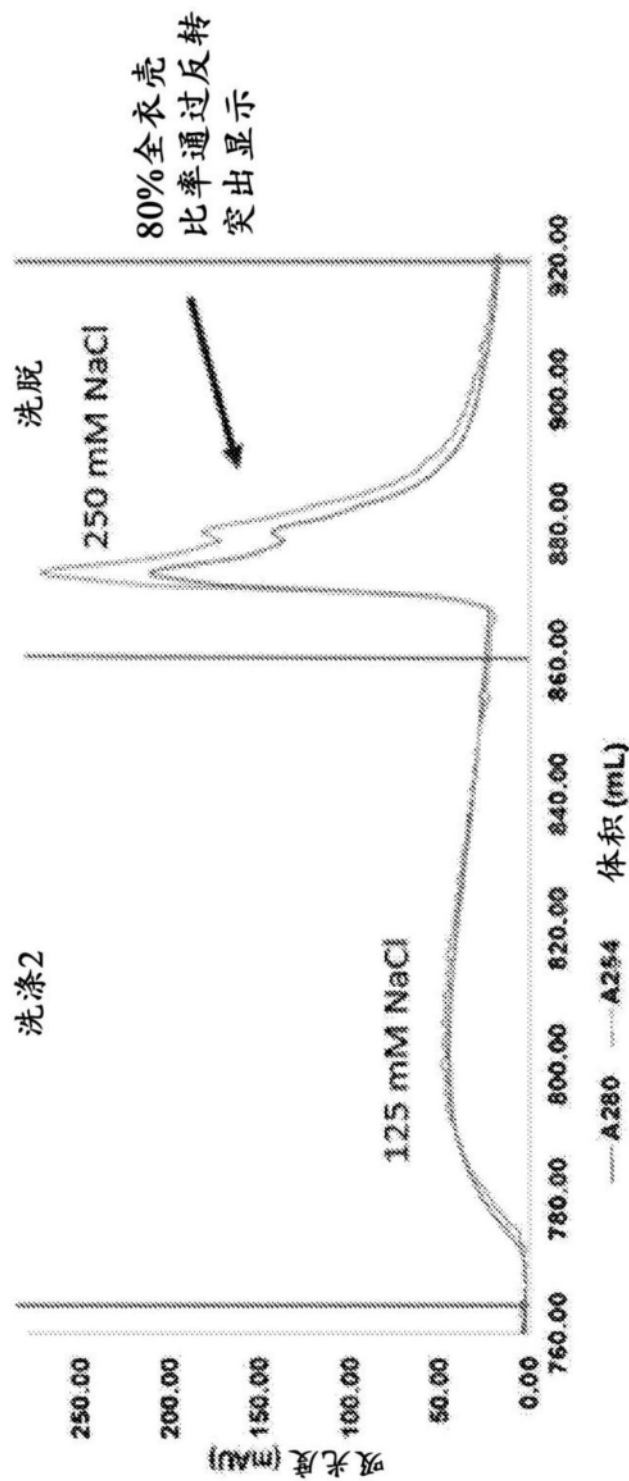


图18

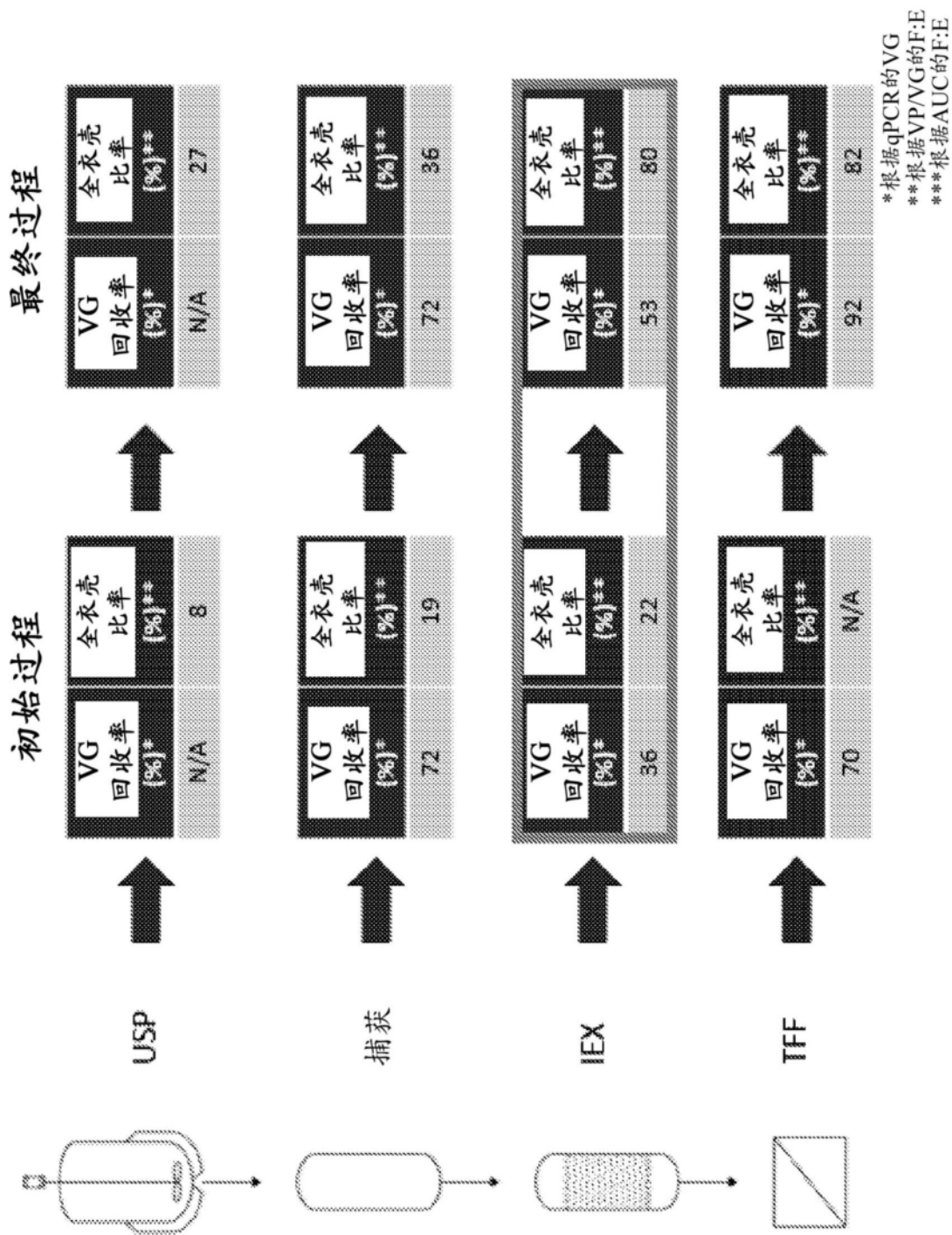


图19

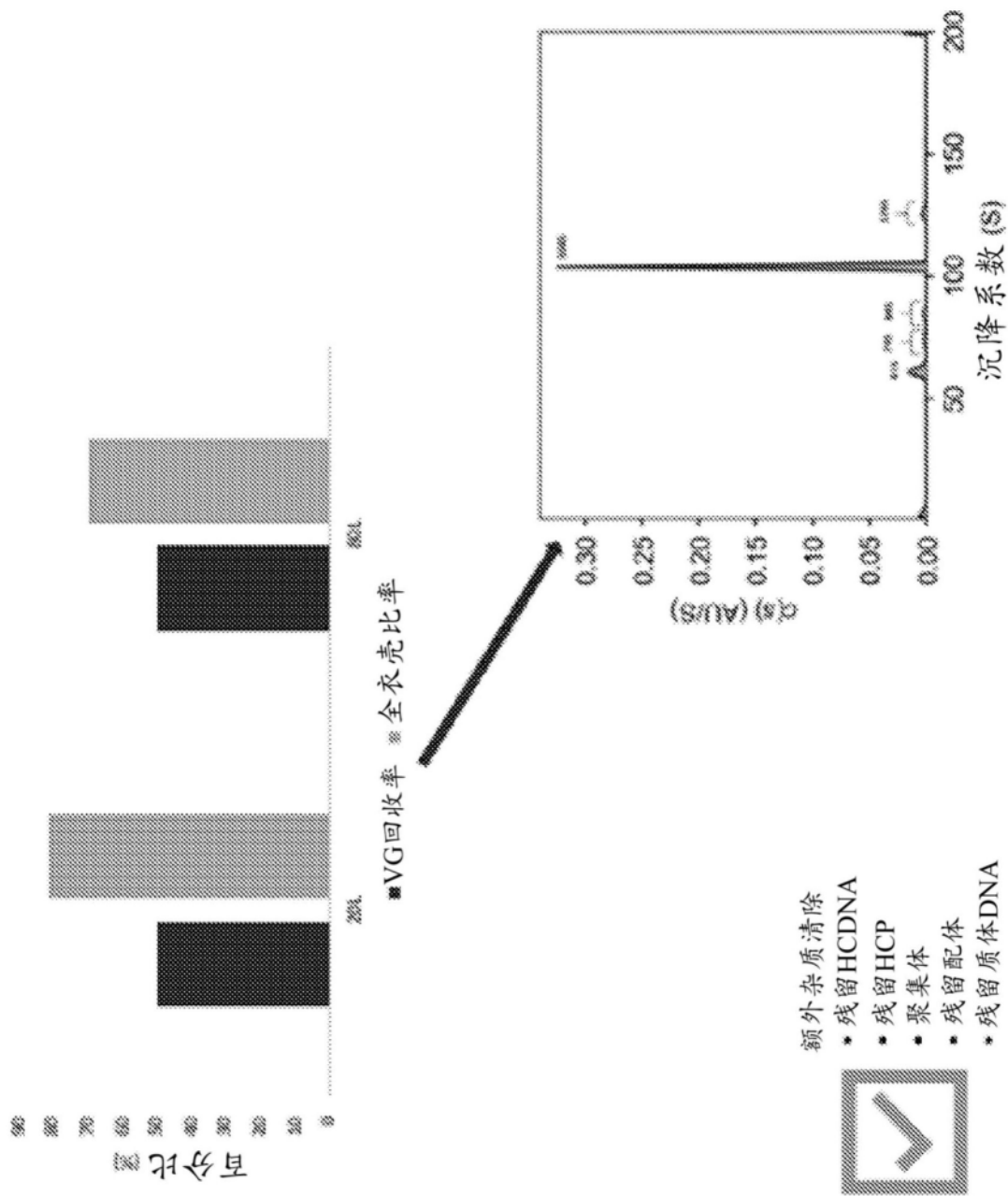


图20