(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108085301 B
(45)授权公告日 2021.10.26

(21)申请号 201711129361.6

(22)申请日 2017.11.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108085301 A

(43)申请公布日 2018.05.29

(30)优先权数据
15/359,498 2016.11.22 US
15/489,591 2017.04.17 US

(73)专利权人 贺道耀
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 贺道耀

(74)专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理事务所(普通合伙) 44348
代理人 倪小敏 何锦标

(51)Int.Cl.
C12N 7/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 1244215 B,2010.11.03
CN 1244215 A,2000.02.09
CN 1922308 A,2007.02.28
WO 2005080556 A2,2005.09.01
WO 03097797 A2,2003.11.27
WO 9822588 A2,1998.05.28
US 2002127582 A1,2002.09.12
Ping Guo等.Rapid and simplified purification of recombinant adeno-associated virus.《Journal of Virological Methods》.2012,第183卷(第2期),第139-146页.

审查员 王冠男

权利要求书3页 说明书28页 附图18页

(54)发明名称

从宿主细胞提取和纯化腺相关病毒和腺病毒的方法及其组分和试剂盒

(57)摘要

本发明提供了从含有包装病毒颗粒的宿主细胞的样品中提取和纯化病毒颗粒的三级纯化的方法。三级纯化的方法包括:利用第一次分级分离溶液沉淀并去除大多数的杂质蛋白质;用第二次分级分离溶液沉淀并收集病毒颗粒,去除部分剩余杂质;收集到的病毒颗粒进一步用柱层析去除剩余杂质,得到超纯的病毒溶液。该方法还包括病毒宿主细胞的收集、细胞悬浮和细胞裂解等步骤。这种纯化方法操作简便、方便得到很高回收率的超纯度的病毒溶液、适宜于大量和小量制备,而且所用溶液和操作步骤都不含有对细胞的有毒物质。因此,这一方法展示了一种非常理想的包括腺相关病毒和腺病毒在内的载体病毒的纯化技术。本发明还包括根据上述技术设计出的试剂盒或包装。

CN 108085301 B

1.一种从包装细胞的样品中提取重组的腺相关病毒(AAV)或腺病毒(AdV)的病毒颗粒的方法,所述方法包括:

用碱性裂解溶液使细胞裂解,具体是在样品中加入碱性裂解溶液,使得样品含有0.1%至1%的洗涤剂并且对于AAV的pH为9.0 至11.5而对于AdV的pH为9.0 至10.5,从而使所述细胞裂解;

用盐析溶液沉淀并去除宿主细胞的蛋白杂质,具体是在细胞裂解之后的样品中加入盐析溶液,使得样品含有0.5 M 至2.0 M 的盐并且pH 为4.0 至7.0,从而使宿主细胞的蛋白沉淀;

移除被沉淀的蛋白,以获得含有所述病毒颗粒的上清液;然后

通过将包含聚乙二醇的沉淀溶液加入至移除被沉淀的蛋白之后的样品,使得样品包含5%至12%的聚乙二醇(PEG),从而使所述病毒颗粒沉淀并保存;以及

将沉淀的病毒颗粒进一步层析纯化;

其中所述洗涤剂选自脱氧胆酸盐、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷、烷基硫酸盐、聚山梨醇酯20(吐温-20)、Tergitol 型NP-40和十二烷基硫酸钠(SDS)中的一种或多种;

除了所述洗涤剂之外,所述碱性裂解溶液还包括选自以下的一种或多种试剂:N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS)、甘氨酸钠、磷酸钠;

所述盐析溶液包含的盐选自乙酸钠、乙酸钾、磷酸钠中的一种或多种;

所述层析使用的是基于二氧化硅的层析柱或树脂层析柱。

2.根据权利要求1 所述的方法,其中所述病毒颗粒是腺相关病毒血清型1-11 中的任何一种或者腺病毒类型A-G 中的任何一种。

3.根据权利要求1 所述的方法,其中所述层析使用的是离子交换层析柱。

4.根据权利要求1 所述的方法,其中所述洗涤剂是脱氧胆酸盐。

5.根据权利要求1 所述的方法,其中所述洗涤剂是脱氧胆酸盐和十二烷基硫酸钠(SDS)。

6.根据权利要求1 所述的方法,其中所述PEG 的平均分子量为3000 至10000。

7.根据权利要求1 所述的方法,其中所述方法不包括超速离心的使用。

8.根据权利要求1 所述的方法,其中所述方法不包括通过冻结-解冻循环进行的提取。

9.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法不包括亲和层析的使用。

10.一种从含有包装病毒颗粒的细胞的样品中提取重组的腺相关病毒(AAV)或腺病毒(AdV)的病毒颗粒的方法,所述方法包括:

通过将碱性裂解溶液加入至所述样品,使得样品包含0.1%至1%的洗涤剂并且对于AAV的pH为9.0 至11.5而对于AdV的pH为9.0 至10.5,使所述细胞裂解;然后

通过将盐析溶液加入至细胞裂解之后的样品,使得样品包含0.5 M 至2.0 M 的盐并且pH 为4.0 至7.0,从而使释放自被裂解的细胞的蛋白沉淀,其中所述盐选自乙酸钠、乙酸钾、磷酸钠中的一种或多种;然后

移除被沉淀的蛋白,以获得含有所述病毒颗粒的上清液;然后

通过将包含聚乙二醇的沉淀溶液加入至移除被沉淀的蛋白之后的样品,使得样品包含5%至12%的聚乙二醇(PEG),从而使所述病毒颗粒沉淀;并且然后

将沉淀的病毒颗粒进一步层析纯化；

其中所述方法不包括超速离心或冻结-解冻循环的使用；

其中所述洗涤剂选自脱氧胆酸盐、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷、烷基硫酸盐、聚山梨醇酯20(吐温-20)、Tergitol 型NP-40和十二烷基硫酸钠(SDS)中的一种或多种；

除了所述洗涤剂之外，所述碱性裂解溶液还包括选自以下的一种或多种试剂：N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS)、甘氨酸钠、磷酸钠；

所述层析使用的是基于二氧化硅的层析柱或树脂层析柱。

11.根据权利要求10所述的方法，其中所述层析使用的是离子交换层析柱。

12.一种试剂盒，其包括分开包装或一起包装的：

细胞裂解溶液，其包含：0.05%-1.0% (w/v)的洗涤剂，所述洗涤剂选自辛基葡萄糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、聚山梨醇酯20(吐温-20)、脱氧胆酸钠(DOC)、十二烷基硫酸钠(SDS)中的一种或多种，以及50-500 mM 的碱，所述碱选自甘氨酸钠、磷酸钠、N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS)中的一种或多种，对于腺相关病毒(AAV)的pH 为9.0-11.5而对于腺病毒(AdV)的pH为9.0-10.5；

第一次分级分离溶液，其包含1.0-5.0 M 的盐，所述盐选自乙酸钠、乙酸钾、磷酸钠或其组合，pH 为4.0-7.0；以及

第二次分级分离溶液，所述第二次分级分离溶液包含5%-12%的平均分子量为3000 至10000 的聚乙二醇(PEG)；

其进一步包括固相层析柱，所述固相层析柱选自基于二氧化硅的阳离子交换层析柱和基于二氧化硅的阴离子交换层析柱；

当所述固相层析柱是基于二氧化硅的阳离子交换层析柱时，其进一步包括：

(a)柱平衡溶液，其包含10-100 mM 乙酸钠、10-100 mM乙酸钾、或10-100 mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)，以及100-200 mM 氯化钠，pH 为4.0-7.0；

(b)柱洗涤溶液，其包含10-100 mM 乙酸钠、10-100 mM乙酸钾、或10-100 mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)，以及100-500 mM 氯化钠，pH 为4.0-7.0；或者

(c)柱洗脱溶液，其包含20-100 mM 乙酸钠、20-100 mM乙酸钾、20-100 mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、20-100 mM磷酸钠、或20-100 mM tris，以及200-1000 mM 氯化钠，pH 为5.0-9.0；

当所述固相层析柱是固相的基于二氧化硅的阴离子交换层析柱时，其进一步包括：

(a)柱平衡溶液，其包含10-100 mM 磷酸钠、10-100 mM甘氨酸钠、10-100 mM Tris、或10-100 mM MOPS，以及100-200 mM 氯化钠，pH 为7.0-10.0；

(b)柱洗涤溶液，其包含10-100 mM 磷酸钠、10-100 mM甘氨酸钠、10-100 mM Tris、或10-100 mM MOPS，以及100-500 mM 氯化钠，pH 为7.0-10.0；或者

(c)柱洗脱溶液，其包含20-100 mM 乙酸钠、20-100 mM磷酸钠、20-100 mM Tris、或20-100 mM MOPS，以及200-2000 mM 氯化钠或其他盐，pH 为5.0-9.0。

13.根据权利要求12所述的试剂盒，其进一步包括细胞悬浮溶液，所述细胞悬浮溶液包括无血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、或Tris 缓冲盐水(TBS)。

14.根据权利要求12 所述的试剂盒,其进一步包括沉淀悬浮溶液,所述沉淀悬浮溶液包含20-100 mM 磷酸盐缓冲液或Tris 缓冲液中的100-200 mM 氯化钠,pH 为6.0-9.0,或者无血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)。

15.根据权利要求12 所述的试剂盒,其进一步包括离心过滤器或病毒浓缩套件。

16.根据权利要求12 所述的试剂盒,其进一步包括用于使用所述试剂盒或包装来纯化病毒颗粒的说明书。

从宿主细胞提取和纯化腺相关病毒和腺病毒的方法及其组分和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和医药学研究领域，大体涉及病毒颗粒的纯化，更具体是，涉及从宿主细胞中提取、纯化在宿主细胞中完成包装的腺相关病毒和腺病毒等载体病毒颗粒的方法及其组分和试剂盒。

背景技术

[0002] 以病毒载体为介导的外源基因和小分子非编码RNA(例如siRNA 和miRNA)转入(delivery)是一种非常有效的工具，在基础研究和医疗研发中应用广泛。当前应用的病毒载体包括腺病毒、逆转录病毒、慢病毒、腺相关病毒(AAV)和单纯疱疹病毒(HSV)，在最近研究文献的应用中，逆转录病毒和慢病毒的应用最多。逆转录病毒和慢病毒属于逆转录病毒类，这类病毒在宿主细胞中完成包装后即分泌在细胞的培养基中。这种特征使得这些病毒能够通过超速离心从介质直接收集，因此，便捷的纯化是逆转录病毒和慢病毒应用广泛的原因。相比之下，腺病毒和腺相关病毒是所谓的“裸露病毒”，这类病毒在其宿主细胞中完成包装之后大多停留在宿主细胞之内，因而纯化困难。在过去数十年中研究者付出了许多努力，研发出多种纯化AAV 和腺病毒的方法，包括基于氯化铯(CsCl)和碘克沙醇的密度梯度超速离心、亲和层析法和离子交换层析法。遗憾的是这些方法要么操作费力和费时，要么所得病毒纯度和回收率低下。因为梯度超速离心可以制备较高纯度的病毒，它仍然是AAV 纯化的常用技术。但是，这种技术在应用中存在一些严重限制：(1)显著降低感染活性、(2)存在梯度介质相关的健康风险、(3)梯度介质可能的毒性、(4)生产规模的局限性和(5)操作程序繁琐。

[0003] AAV 和腺病毒是天然存在的病毒。AAV 是唯一的已经被广泛地证实不会引起细胞毒性和免疫反应的病毒载体，但腺病毒不同，已经被发现会引起免疫反应。除此之外，AAV表现出在分裂细胞和非分裂细胞(例如神经元细胞)中都能有效的转导和稳定的表达，因此，在基因疗法的基础研究和产业研发中被视为最为有效的病毒载体。一个例子是Glybera，它是在2012 年被欧盟批准的首个基因疗法药物，用AAV 作为载体成功地转导脂蛋白脂肪酶基因，以治疗脂蛋白脂肪酶缺乏症。当前在美国和全世界范围内，许多医药公司都在用 AAV作载体研发基因疗法药物。基于这样的应用进展，开发一种方便、高效的纯化AAV 病毒的新技术显得尤为迫切。

发明内容

[0004] 本发明在一些实施方式中展示出一些方法，用于宿主细胞的裂解及从宿主细胞中提取和纯化腺相关病毒(AAV)或腺病毒(AdV)。这些方法包括用一种碱性裂解溶液裂解细胞，这种碱性裂解溶液包含一种或多种有pH 缓冲能力的化合物或试剂 和适中的洗涤剂(detergent)；细胞裂解后用一种盐析溶液沉淀并去除大多数的宿主细胞的蛋白质，这种盐析溶液包含一种盐，且偏酸性。由此提取的病毒溶液可以用聚乙二醇 (PEG) 脱盐并富集、

然后用层析法进一步纯化。

[0005] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种从包装有重组AAV 或腺病毒病毒颗粒的宿主细胞样品中提取这些病毒颗粒的方法。在另一些实施方式中,这一方法包括用一种碱性裂解溶液裂解细胞,具体是在细胞样品中加入碱性裂解溶液,使样品中含有约0.1%至约1%的洗涤剂并保持pH 值约9.0 至约11.5。在一个实施方式中,这一方法进一步包含用一种盐析溶液沉淀并去除大多数的宿主细胞的蛋白质,这种盐析溶液的盐浓度为约0.5 M至约2.0 M,其pH 值为约4.0 至约7.0。

[0006] 在一些实施方式中,所述病毒颗粒是AAV 1-11 血清型中的任何一种血清型病毒,或者是腺病毒A-G 种类中的任何一种腺病毒。在一些实施方式中,所述洗涤剂是一种温和的洗涤剂。在一些实施方式中,所述洗涤剂选自于下列的一种或多种洗涤剂:如脱氧胆酸盐、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、烷基硫酸盐、聚山梨醇酯20(吐温-20)、Tergitol 型NP-40、及其它们的各种组合。在一些实施方式中,所述洗涤剂是脱氧胆酸盐。在一些实施方式中,所述洗涤剂是脱氧胆酸盐和十二烷基硫酸钠 (SDS)。

[0007] 在一些实施方式中,所述碱性裂解溶液具有约9.0至约11.5的pH值,除所述洗涤剂之外,这种碱性裂解溶液还包含一种或多种以下试剂,如N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS),甘氨酸/钠, 甘氨酸钾, 碳酸钠, 碳酸钾, 磷酸磷酸钠, 磷酸钾,及其它们的各种组合。在一些实施方式中,所述样品在加入碱性裂解溶液后含有约0.1%至1.0%的洗涤剂。

[0008] 在一些实施方式中,所述盐选自于下列的一种或多种盐类:如醋酸钠、醋酸钾、磷酸钠及其它们的各种组合。在一些实施方式中,所述盐析溶液不含有铵盐。

[0009] 在一些实施方式中,所述方法进一步包含有一种沉淀溶液(precipitation solution)来沉淀所述病毒颗粒,具体是在所述样品中加入这种沉淀溶液并使样品中含有约5%至约12% 的聚乙二醇 (PEG)。在一些实施方式中,所述PEG的平均分子量为约3000至约10000。

[0010] 在一些实施方式中,所述方法进一步包含经所述沉淀后的病毒悬浮液的层析(chromatography)。在一些实施方式中,所述层析是用基于二氧化硅层析(silica-based chromatography)、树脂层析或离子交换层析等的层析柱。

[0011] 在一些实施方式中,所述方法不包含有机溶剂的使用。在一些实施方式中,所述方法不包含使用超速离心技术。在一些实施方式中,所述方法不包含冻结/解冻循环提取步骤。在一些实施方式中,所述方法不包含使用亲和层析。

[0012] 在上述实施方式中,同时提供经所述方法纯化的腺相关病毒和腺病毒的制剂(formulations)和成分(compositions)。

[0013] 在另一实施方式中,本发明展示出从包装有重组腺相关病毒或腺病毒的细胞样品中提取和纯化这些病毒颗粒,所得到的病毒制剂至少含有每毫升10^{13} 病毒颗粒,这种病毒溶液应该含有至少每毫升10^{10} 病毒转染单位(transducing units),其中含有宿主细胞蛋白质对比病毒颗粒少于1/10000 ,而且不含有氯化铯(CsCl)或碘克沙醇(iodixanol)。在一些实施方式中,经纯化的上述病毒溶液含有少于1/10,000的空壳病毒颗粒。

[0014] 本发明在一些实施方式中,描述了用于病毒颗粒纯化的三级程序。在不同的实施方式中,所述方法包括:使用第一次分级分离溶液(first fractionation solution)沉淀

出病毒包装细胞的裂解样品中的大部分杂质并且保留病毒颗粒，使用第二次分级分离溶液(second fractionation solution)来选择性地沉淀病毒颗粒，以及进一步使用柱层析(column chromatography)去除剩余的杂质，以产出 超纯的病毒溶液。在这三个步骤之前，所述病毒纯化程序可以进一步包括病毒包装之后的细胞收集、细胞重新悬浮和细胞裂解(cell lysis)。所述技术提供了一个理想的方法，可以高回收率地产出超高纯度的病毒制剂，而且该技术不使用有毒化合物，易于操作，制备量可大可小。

[0015] 按照本发明应用的一个实施方式，它提供了一种试剂盒或包装，可以单独分装(compartments)或使用容器(containers)，所述试剂盒或包装包含有细胞裂解溶液(cell lysis solution)和第一次分级分离溶液。所述细胞裂解溶液(也称为碱性裂解溶液或裂解溶液)包含有约0.05%-1.0% (w/v)的洗涤剂，所述洗涤剂选自如下：辛基葡萄糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、聚山梨醇酯20(吐温-20)、脱氧胆酸钠(DOC)、十二烷基硫酸钠(SDS)及其各种组合；所述细胞裂解溶液还包含有约50-500 mM的碱，所述碱选自于如下：甘氨酸钠、磷酸钠、N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS)及其各种组合，pH为约9.0-12.0。所述第一次分级分离溶液(也称为盐析溶液或盐溶液)(salting solution or salt solution)包含有约1.0-5.0 M的盐，所述盐类选自如下：乙酸钠、乙酸钾、磷酸钠或其组合，pH为约4.0-7.0。

[0016] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含有第二次分级分离溶液(也称为沉淀溶液)(precipitation solution)，其包含有约5%-12%的聚乙二醇(PEG)，PEG的平均分子量为约3000至约10000。

[0017] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含有固相层析柱(solid phase chromatography column)，其选自如下：基于二氧化硅的(silica-based)层析柱和固相的基于二氧化硅的离子交换层析柱。在一些实施方式中，所述固相层析柱是基于二氧化硅的层析柱。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含有一个或多个以下组分：(a)柱平衡溶液(column equilibration solution)，其包含有约10-100 mM乙酸钠、乙酸钾、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)，磷酸钠、或tris盐酸盐，以及约100-200 mM氯化钠或其他渗透物质(例如其他盐或有机化合物)，pH为约5.0-9.0，(b)柱洗涤溶液(column washing solution)，其包含有约10-100 mM乙酸钠、乙酸钾、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、磷酸钠、或tris盐酸盐，以及约100-500 mM氯化钠或其他渗透物质(例如其他盐或有机化合物)，pH为约5.0-9.0，或者(c)柱洗脱溶液(column elution solution)，其包含有约20-100 mM乙酸钠、乙酸钾、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、磷酸钠、或tris盐酸盐，以及约200-2000 mM氯化钠或其他盐，pH为约5.0-9.0。

[0018] 在一些实施方式中，所述固相层析柱是基于二氧化硅的阳离子交换层析柱或其他固相阳离子交换层析柱。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含有一个或多个以下组分：(a)柱平衡溶液，其包含有约10-100 mM乙酸钠、乙酸钾、或3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)，以及约100-200 mM氯化钠或其他渗透物质(例如其他盐或有机化合物)，pH为约4.0-7.0，(b)柱洗涤溶液，其包含有约10-100 mM乙酸钠、乙酸钾、或3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)，以及约100-500 mM氯化钠或其他盐或有机化合物，pH为约4.0-7.0，或者(c)柱洗脱溶液，其包含有约20-100 mM乙酸钠、乙酸钾、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、磷酸钠或tris，以及约200-2000 mM氯化钠或其他盐，pH为约5.0-9.0。

[0019] 在一些实施方式中，所述固相层析柱是基于二氧化硅的阴离子交换层析柱或其他

固相阴离子交换层析柱。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含有一个或多个以下组分：(a)柱平衡溶液，其包含有约10-100 mM磷酸钠、甘氨酸钠、Tris或MOPS，以及约100-200 mM氯化钠或其他渗透物质(例如其他盐或有机化合物)，pH为约7.0-10.0，(b)柱洗涤溶液，其包含有约10-100 mM磷酸钠、甘氨酸钠、Tris或MOPS，以及约100-500 mM氯化钠或其他盐或有机化合物，pH为约7.0-10.0，或者(c)柱洗脱溶液，其包含有约20-100 mM乙酸钠、磷酸钠、Tris或MOPS，以及约200-2000 mM氯化钠或其他盐，pH为约5.0-9.0。

[0020] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含有细胞悬浮溶液，其包含有无血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium，DMEM)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、或Tris缓冲盐水(TBS)。

[0021] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含有沉淀(或沉淀物，pellet)悬浮溶液(或称为病毒悬浮溶液)，其包含有约20-100 mM磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液和约100-200 mM氯化钠或其他渗透物质(例如其他盐或有机化合物)，pH为约6.0-9.0，或无血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)。

[0022] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含有离心过滤器或病毒浓缩套件(set)。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含有使用所述试剂盒或包装纯化病毒颗粒的说明书。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装不包含有亲和层析树脂或柱。

附图说明

[0023] 图1通过小图A-D显示了实验数据，该数据展现了腺相关病毒(AAV)和腺病毒(AdV)对一定范围的pH值和对洗涤剂的耐受性，以便确立开发用于裂解病毒包装细胞的裂解溶液的基础。(A，B)AAV病毒的包装是由转导含GFP的AAV载体质粒和包装质粒进HEK293细胞来完成。含GFP的AdV病毒的扩增是由感染HEK293细胞来完成来。慢病毒(LtV)的包装是由转导含GFP的慢病毒载体质粒和包装质粒进293T细胞来完成，该病毒以用作比较。这里所用的病毒都是用8% PEG8000从其包装细胞的培养基中收集并悬浮于PBS中，然后和等体积的如图中所示的pH溶液混合。在室温下静置2小时之后，这些混有病毒的溶液用于感染HEK293细胞。感染后3-4天，将表达GFP的细胞进行拍摄并计数。图中显示的GFP细胞的图像是代表图(A)。GFP细胞数的分析数据如散点图所示，图中数据表达为GFP细胞数的平均百分比 ± SD，n=6(B)。(C，D)AAV或AdV病毒的制备如上所述，各病毒溶液与等体积的如图中所示的不同浓度的洗涤剂(十二烷基硫酸钠(SDS)或脱氧胆酸钠(DOC))混合，并如上所述在室温下静置2小时后感染细胞，n=5。

[0024] 图2通过小图A-B示出，含有适量洗涤剂的各种碱性溶液裂解包装AAV和AdV的细胞完全释放这些包装的病毒颗粒。根据在图1中确定的AAV和AdV对pH值和洗涤剂的耐受性，制备出如图中所示的7种碱性裂解溶液用于裂解包装AAV或AdV的HEK293细胞。这些裂解物如图1中所述的方法感染HEK293细胞，并且使用3次冻结/解冻(F/T)从包装AAV或AdV的细胞中得到的病毒提取物作为比较对照。(A)图中显示的GFP细胞的图像是代表图，(B)直方图表达为GFP细胞数的平均百分比 ± SD。*，$p<0.05$；**，$p<0.01$，对比冻结/解冻提取的病毒(对照)，n=4。

[0025] 图3通过小图A-C示出，AAV和AdV病毒显示出对一定范围的高浓度的盐的高耐受性，这使得应用盐沉淀能够成功地纯化这些病毒颗粒。(A)如图1所述制备AAV或AdV病毒，制

备的病毒溶液与图中所示的等体积的不同浓度的NaCl溶液混合。制备并使用LtV病毒作平行对照。在室温下2小时之后，如图1中所述，用这些病毒混合物感染细胞。散点图表达为GFP细胞数的平均百分比 ± SD，n=4。(B, C)使用如图2所述的7种碱性裂解溶液裂解包装AAV或AdV的细胞，然后使用盐析沉淀，即在各裂解物中加入3 M NaAc, pH 5.5的盐溶液。在混匀之后发生沉淀，用离心去除沉淀。保存上清液并用于如图1所述感染细胞。图中显示的图像是代表图(B)，直方图表达为GFP细胞数的平均百分比 ± SD(C)。*, p<0.05; **, p<0.01，对比来自冻结/解冻的病毒(对照)，n=4。

[0026] 图4通过小图A-C示出，盐沉淀去除大量的来自AAV和AdV包装细胞的碱性裂解物中蛋白杂质。(A, B)使用图2所述的7种碱性裂解溶液裂解正常的HEK293细胞(组1)或包装AAV的HEK293细胞(组2)，然后进行如图3所述的盐沉淀。由此提取的样品用于BCA蛋白测定(A)或SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析(B)。与此平行地，用3次冻结/解冻(F/T)得到提取物以作为对比性对照，用RIPA缓冲液制备细胞裂解物以作为总蛋白对照。从BCA测定获得的结果表达为蛋白量的平均百分比 ± SD，**p<0.01，对比冻结/解冻的病毒(对照)，n=6(A)。PAGE分析的结果如图所示的凝胶图像(B，上方)和表达为染色密度的平均百分比 ± SD，*, p<0.05; **, p<0.01，对比来自冻结/解冻的病毒(对照)，n=3(B，下方)。(C)包装AAV病毒或AdV病毒的细胞用甘氨酸/Na, pH 10.0的溶液进行裂解，并用如图所示的不同量的NaAc(pH5.0或5.5)或KAc(pH5.0或5.5)进行盐沉淀。由此提取的病毒溶液用于BCA测定。散点图表达为蛋白量的平均百分比 ± SD，n=5。

[0027] 图5通过小图A-D示出了在盐析过程之后PEG有效地将病毒颗粒从提取的病毒溶液中分级分离成沉淀物，达到脱盐、富集和进一步纯化病毒颗粒。包装AAV或AdV的细胞用甘氨酸/Na, pH 10.0溶液裂解，然后如图3所述进行盐析过程。由此提取的病毒溶液与如图所示的不同量的PEG8000混合。在PEG分级分离之后所得沉淀物用PBS悬浮，然后用来感染细胞或进行BCA测定。(A)感染细胞的结果显示为代表图的图像。(B)感染细胞的结果的直方图，表达为GFP细胞数的平均百分比 ± SD(C)。*, p<0.05; **, p<0.01，对比来自冻结/解冻的病毒(提取物)，n=6。(C)感染细胞的结果显示为代表图的图像，展示出PEG有效地将AAV和AdV的病毒颗粒分级分离成沉淀。悬浮液:PEG沉淀的病毒悬浮液；上清液:PEG沉淀后的上清液。(D)BCA测定结果的散点图，表达为蛋白量的平均百分比 ± SD, n=5。

[0028] 图6通过小图A-C示出了作为例子的基于二氧化硅的层析能够进一步纯化AAV和AdV病毒颗粒。(A)AAV颗粒或AdV颗粒如图3所述的碱性裂解/盐析沉淀提取，然后用基于二氧化硅的层析柱进一步纯化所提取的病毒溶液。输入:Input；流过:Flowthrough；洗脱液:Eluent。(B)在碱性裂解/盐析沉淀过程之后，AAV颗粒或AdV颗粒经PEG沉淀并重新悬浮在合适的溶液，然后用于基于二氧化硅的层析柱。输入:Input；流过:Flowthrough；洗脱液:Eluent。(C)从小图A和B中所述的层析柱上洗脱的AAV或AdV病毒溶液经Amicon离心过滤器(Ultrcel-100K)浓缩。经浓缩后的病毒溶液用qPCR进行滴定。计算出的这些病毒溶液的滴度如直方图所示，表达为每毫升病毒基因组拷贝的平均值 ± SD，n=4。

[0029] 图7通过小图A-G示出了作为例子的AAV的纯化证明了本方法产生高滴度、超纯的病毒溶液。包装AAV的细胞用RIPA缓冲液(RIPA)裂解后作为总蛋白样品，或者用冻结/解冻(F/T)提取后作为比较对照，或者用碱性裂解/盐析沉淀过程提取(提取物)、然后用PEG分级分离得到如图5所述的PEG沉淀的悬浮液(PEG悬浮液)。所述病毒悬浮液用于基于二氧化硅

的层析柱，其洗脱液用离心过滤器浓缩，得出如图6所述的病毒溶液(柱)。随后，上述样品用PAGE凝胶电泳(A，C)、BCA测定(B，D)或HEK293细胞的感染(E，F)进行分析。AAV病毒溶液的纯度经计算后表达为每pg蛋白的病毒转导单元(transducing unit，TU)(G)。(A-D)PAGE凝胶电泳的结果显示为代表图的图像(A，C)，BCA测定的结果显示为直方图，表达为蛋白量的平均百分比 ±SD，n=5(B，D)。(E-G)从感染获得的结果被示出为直方图，其被表达为GFP细胞数目的平均百分比±SD(E，n=6)，被表达为转导单元的平均值± SD(F，n=6)或每pg蛋白的病毒颗粒数目的平均值± SD(G，n=6)。

[0030] 图8通过小图A-F示出了本发明方法在纯化AAV病毒中具有高回收率和高纯度等特征，以此为例在商业市场上是无与伦比的。将包装了AAV的细胞收集并等分为4个部分，以用于4个不同程序进行的AAV纯化，在这四个程序中三个是采用来自不同的公司的商业试剂盒(标记为试剂盒A、试剂盒B和试剂盒C)、以及另一个则是如在图7中所述的程序(标记为C&M)。试剂盒A、试剂盒B和试剂盒C按照它们的产品说明书来进行使用，而C&M的使用程序包括碱性裂解、盐析过程、PEG分级分离以及基于二氧化硅的层析柱。所有纯化的病毒溶液都用Amicon Ultra-4柱式过滤器进行浓缩 得到相同体积的病毒PBS溶液，然后用于感染HEK293细胞(A-C)、PAGE凝胶电泳(D)和BCA测定(E)。感染细胞的结果显示为细胞的代表图(A)。经计算的病毒回收率和滴度作直方图，分别表达为GFP细胞数的平均百分比 ± SD(B，n=6)和转导单元的平均值 ± SD(C，n=6)。PAGE凝胶电泳结果显示为凝胶的代表图(D)，而BCA测定结果用作直方图，表达为蛋白量的平均百分比 ± SD(E，n=6)。经计算的AAV病毒溶液的纯度表达为每pg蛋白的转导单元(TU)的平均值 ± SD(F，n=6)。

[0031] 图9示出的示意图大概描述了本发明在一个纯化AAV和AdV病毒颗粒的实施方式中的示例性步骤。这些技术适应于纯化AAV、AdV以及包装后在宿主细胞之内的任何其他“裸露”病毒颗粒。所述纯化程序包括如图所示的四个主要步骤，所有这些步骤可以在3个小时或更短时间内完成：(1)用pH9.0-11.5的碱性裂解溶液(也被称为细胞裂解溶液)裂解包装了病毒的细胞，以释放病毒颗粒；(2)用盐析溶液进行盐析沉淀(也称为第一次分级分离)去除大量的宿主细胞蛋白杂质，并保留病毒颗粒在溶液中；(3)用PEG分级分离(也称为第二次分级分离)将病毒颗粒分离至沉淀部分，达到病毒颗粒的脱盐、富集以及进一步纯化；(4)用柱层析最终纯化病毒颗粒，随后用离心过滤器浓缩，以产出高滴度、超纯的病毒颗粒。这些技术在纯化病毒过程中不用任何有毒化合物，因此纯化所得到的病毒溶液能够满足大多数研究目的和临床前和临床试验的品质要求。

[0032] 图10通过小图A-C示出经测试的细胞裂解溶液将AAV和腺病毒颗粒从其包装细胞中完全释放。AAV病毒包装由转导含GFP的AAV病毒载体质粒和包装质粒进HEK293细胞来完成。含GFP的腺病毒的扩增由感染HEK293细胞的来完成。包装病毒的细胞经收集并重新悬浮在细胞悬浮溶液中，在细胞悬浮液中加入细胞裂解溶液，进行细胞裂解。与此平行地，用3次冻结/解冻提取包装了病毒的细胞用作比较对照。细胞裂解物(裂解)和冻结/解冻提取物(冻结/解冻)用于感染HEK293细胞。感染后3-4天，拍摄照片并计数表达GFP的细胞。AAV-GFP细胞的图像(A)和腺病毒-GFP细胞的图像(B)皆为的代表图。(C)直方图为GFP细胞数的平均百分比 ± SD。*，$p<0.05$，对比冻结/解冻提取的病毒溶液(对照)，n=6。

[0033] 图11通过小图A-C示出了第一次分级分离溶液有效地保留了溶液中的AAV和腺病毒颗粒。按如上所述，包装病毒并裂解细胞，然后在细胞裂解物中加入第一次分级分离溶

液，进行第一次分级分离并产生沉淀和溶液的两个相位。离心后，上清液(第一上清液)用于感染HEK293细胞，在感染后3-4天拍摄并计数表达GFP的细胞。(A)AAV-GFP细胞的图像以及(B)腺病毒-GFP细胞的图像皆为代表图。(C)直方图为GFP细胞数的平均百分比 ± SD。*, p<0.05; **, p<0.01，对比冻结/解冻提取的病毒溶液(冻结/解冻)，n=6。

[0034] 图12通过小图A和B示出了第一次分级分离溶液从细胞裂解物中去除了大部分的蛋白杂质。第一次分级分离后的上清液(第一上清液)用于SDS电泳和BCA测定进行蛋白含量测定。(A)SDS电泳和Coomasie染色的凝胶分析如凝胶图像所示，图像为代表图。(B)BCA测定的结果表达为蛋白量的平均百分比 ± SD，**, p<0.01，对比冻结/解冻提取的病毒溶液(冻结/解冻，或F/T)，n=4。

[0035] 图13通过小图A-C示出了第二次分级分离溶液有效地将病毒颗粒从第一次分级分离的上清液中次分级分离到沉淀部分。在第一次分级分离后的病毒上清液中加入第二次分级分离溶液进行第二次分级分离。离心后的沉淀物重新悬浮在沉淀悬浮溶液中。病毒沉淀悬浮液(病毒悬浮液)和第二上清液(第二上清液)于感染HEK293细胞，在感染后3-4天，拍摄并计数表达GFP的细胞。(A)AAV-GFP细胞的图像和(B)腺病毒-GFP细胞的图像皆为代表图。(C)直方图为GFP细胞数的平均百分比 ± SD。**, p<0.01，对比第二上清液，n=6。

[0036] 图14通过小图A和B示出了第二次分级分离溶液进一步去除了在第一分级分离后保留在溶液中的蛋白杂质。上述第二次分级分离后的病毒沉淀悬浮液(病毒悬浮液)用于SDS电泳和Coomasie染色的蛋白分析，并与冻结/解冻提取物(F/T)和用于第二次分级分离的第一上清液(第一上清液)作比较。(A)所示的凝胶图像是代表图。(B)BCA测定结果表达为蛋白量的平均百分比 ± SD，**, p<0.01，对比第一上清液(第一上清液)，n=4。

[0037] 图15通过小图A和B示出了固相层析柱能够进一步纯化AAV和腺病毒颗粒。(A)用于AAV纯化的不同类型的固相层析柱：上方小图，一个类型的柱(柱1)，其有效地从第一次分级分离后的第一上清液中回收AAV颗粒；中间小图和下方小图，其他类型的柱(柱2和3)，其有效地从第二次分级分离后的沉淀悬浮液中回收AAV颗粒。(B)以柱2作为例，从第二次分级分离后的沉淀悬浮液中回收腺病毒颗粒。AAV或腺病毒GFP的图像如图所示皆为感染细胞照片的代表图。洗脱液：Eluent；流过液：Flowthrough。

[0038] 图16通过小图A和B示出了经过柱纯化并浓缩过的病毒溶液的品质。上述层析柱的AAV或腺病毒洗脱液用离心过滤器浓缩，然后用SDS电泳和BCA测定进行蛋白分析。(A)如图所示的凝胶图像是照片的代表图。(B)柱2的洗脱液(洗脱液)的BCA测定结果表达为蛋白量的平均百分比 ± SD，**, p<0.01，对比PEG沉淀后的病毒沉淀悬浮液(病毒悬浮液)，n=4。

[0039] 图17通过小图A-D示出了AAV纯化试剂盒的商业产品和本发明的试剂盒或包装的一个实施方式的比较。收集包装了AAV的细胞并将其等分为4个部分，分别用于3个商业试剂盒(标记为试剂盒A、试剂盒B和试剂盒C，分别来自于不同的公司)和本发明的新式AAV纯化试剂盒(标记为新技术)对细胞中AAV病毒进行纯化。纯化过程和产品说明书中使用程序完全一样。所得四个病毒溶液用于感染细胞，并采用SDS电泳和BCE测定进行蛋白分析。(A)感染细胞的结果如图像所示，图像为照片的代表图。(B)感染细胞的结果作直方图，其表达为GFP细胞数的平均百分比 ± SD。(C)SDS电泳凝胶图像是照片的代表图。(D)BCA测定结果表达为蛋白量的平均百分比 ± SD，对比冻结/解冻提取的溶液(F/T)，n=4。

[0040] 图18示出了本发明的新式试剂盒或包装的结构和功能。在一些实施方式中，所述

试剂盒或包装包含两种或多种以下组分:细胞悬浮溶液,用于重新悬浮所收集的包装了病毒的细胞;细胞裂解溶液,用于裂解重新悬浮的包装了病毒的细胞;第一次分级分离溶液,用于病毒细胞裂解物的第一次分级分离;第二次分级分离溶液,用于第二次分级分离,从第一上清液收集病毒颗粒到沉淀部分;沉淀悬浮溶液,用于悬浮病毒沉淀物;固相层析柱、柱支撑套件或材料、柱平衡溶液、柱洗涤溶液和柱洗脱溶液,用于进行上述沉淀物悬浮液的柱层析法;以及离心过滤器或其他浓缩套件,用于层析柱后的病毒洗脱液的浓缩和缓冲液变更,得到超纯的、高滴度的病毒溶液。

[0041] 详细说明

[0042] 定义

[0043] 以下说明描述了本发明技术的示例性实施方式。但是,应该认识到,这些说明并非旨在作为对本发明的范围的限制,然而,其是作为示例性实施方式的说明而提供的。

[0044] 如在本说明书中使用的,以下单词、短语和符号通常旨在具有如以下阐述的意义,除非使用它们的上下文另有说明。

[0045] 用于提取和纯化AAV和AdV颗粒的常规方法需要先后使用冷冻/解冻循环和密度梯度超速离心。在一些方法中,没有使用亲和或离子交换层析来提高最终产品的纯度。这些方法通常导致病毒的感染性降低,伴有较低的回收率。再者,对于病毒的临床前和临床应用,梯度相关的健康毒性可能是显著的问题。

[0046] 本发明的一个实施方式提供了一种提取和纯化AAV和AdV病毒颗粒的方法,其病毒颗粒的回收率提高并且感染性更好。并且,在该方法中,不需要冷冻/解冻循环和密度梯度超速离心。该新方法更易于实施和易于扩展。如在下文进一步详细描述的,本发明的一个实施方式包括:使用碱性裂解溶液裂解包装有病毒的细胞,然后使用盐溶液沉淀并去除大量的宿主细胞蛋白质。进一步地,可以使用聚乙二醇(PEG)沉淀所提取的病毒颗粒,并使用层析法进行纯化。本文所述的方法适用于所有不同血清型和类型(species)的AAV(例如腺相关病毒血清型1-12)或AdV(腺病毒类型A-G及其各自的血清型)或其他在其被包装之后在细胞之内的 “裸露的”或非裸露的病毒。

[0047] “裸露的病毒”是指仅具有核衣壳(它是覆盖病毒的基因组的蛋白衣壳)并且缺少病毒包膜的病毒。裸露病毒的例子包括但不限于细小病毒(parvovirus)、乳多空病毒(papovavirus)、腺病毒和呼肠弧病毒(reovirus)。

[0048] “非裸露的病毒”(或包膜的病毒)是指具有围绕病毒的核蛋白核心的脂蛋白包膜的病毒。例子包括但不限于乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒。

[0049] 细胞裂解

[0050] 根据本发明的一个实施方式,使用碱性裂解溶液裂解包封AAV或AdV的细胞。优选地,所述裂解溶液包括缓冲约9.0至约12.0的pH的化合物或试剂。所述裂解溶液还可以包括洗涤剂,其优选是温和的(mild)洗涤剂或者有助于细胞裂解但不会降低病毒活性的洗涤剂。

[0051] 如本文使用的,“碱性裂解溶液”或“细胞裂解溶液”或更普遍的“裂解溶液”,是指包含了将pH维持高于7.0、或替代地高于7.5、8.0、8.5或9.0的化合物或试剂的溶液。所述碱性裂解溶液还可以包括有用于破碎细胞的洗涤剂。所述洗涤剂优选是温和的洗涤剂,例如脱氧胆酸盐、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、辛

基葡萄糖苷、烷基硫酸盐、聚山梨醇酯20(吐温-20)、Tergitol型NP-40、或其混合物。

[0052] 可以根据裂解溶液加入至样品之后所需的pH和在细胞样品中的成分的最终浓度，确定裂解溶液的pH和成分。在一个实施方式中，在将裂解溶液加入至细胞样品时，样品的pH优选是至少8.0，或者替代地至少8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4或11.5。在另一个实施方式中，样品的pH不高于12.0，或者替代地不高于11.9、11.8、11.7或11.6。在一些实施方式中，样品的pH为约8.5至约12.0、或约9.0至约12.0、或约9.0至约11.5、或约8.5至约11.5、或约9.0至约11.0、或约9.5至约12.0、或约9.5至约11.5、或约9.5至约11、或约9.5至约10.5、或约9.5至约10.0、或约10.0至约12.0、或约10.0至约11.5、或约10.0至约11.0、或约10.0至约10.5，但不限于此。可以通过化合物或试剂，例如浓度为约0.05 M至约0.5 M的碱，获得或调节裂解溶液的pH。

[0053] 在一些实施方式中，所述样品具有约0.05%至约1%的洗涤剂的最终浓度，并且因此裂解溶液中洗涤剂的浓度可以高于此。在一个实施方式中，在样品中洗涤剂的最终浓度为至少约0.05%，或者替代地至少约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%或0.9%。在另一个实施方式中，在样品中洗涤剂的最终浓度为不大于约1.5%，、或者替代地不大于约1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%或0.5%。在一些实施方式中，在样品中洗涤剂的最终浓度为约0.05%至约1.5%、约0.1%至约1.0%、约0.2%至约0.9%、约0.3%至约0.8%、或约0.4%至约0.7%，但不限于此。

[0054] 所使用的洗涤剂优选是温和的，而非强的洗涤剂，例如Triton X-100。适用于本发明的洗涤剂的非限制性的例子包括：脱氧胆酸盐、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、烷基硫酸盐、聚山梨醇酯20(吐温-20)、Tergitol型NP-40。在一个实施方式中，所使用的洗涤剂是脱氧胆酸盐，例如脱氧胆酸钠(DOC)。

[0055] 除了洗涤剂之外，所述裂解溶液还可以包括化合物成分，例如N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS)、甘氨酸/钠、甘氨酸/钾、碳酸钠、碳酸钾、磷酸钠、磷酸钾或其组合。

[0056] 盐析沉淀

[0057] 本发明发现，本发明的细胞裂解方法，无需冷冻/解冻循环，能够实现细胞的相当完全的裂解，同时维持病毒的高感染性。这种经裂解的病毒样品然后可以进行盐析沉淀过程，其去除了大部分污染的宿主细胞蛋白。

[0058] 在一个实施方式中，本方法的盐析沉淀步骤或者也被称为第一次分级分离，包括具有中性或酸性pH(例如约3.5至约7.0)的盐析溶液的加入，还包括浓度至少为0.5 M的盐。如本文使用的，“盐析溶液(salting solution)”是指具有所需的pH和本文公开的适当浓度的盐的溶液。如裂解溶液一样，可以根据病毒样品中所需的pH和盐浓度以及加入盐析溶液之前的样品的起始条件，确定盐析溶液的pH和盐浓度。

[0059] 在一个实施方式中，在加入盐析溶液时，病毒样品的pH为不高于约7.0，或者替代地不高于约6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2或6.1。在另一个实施方式中，在加入盐析溶液时，病毒样品的pH为高于约4.0，或者替代地高于约4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4或5.5。在一些实施方式中，在加入盐析溶液时，病毒样品的pH为约3.5至约7.0、约3.6至约7.0、约4.1至约6.5、约4.5至约6.5、约5.0至约7.0、约5.0至

约6.5、或约5.0至约6.0。

[0060] 在盐析溶液中使用的盐可以选自以下中的一种或多种:乙酸钠、乙酸钾或磷酸钠,但不限于此。在病毒样品中盐的最终浓度可以是约0.5 M及以上。在一个实施方式中,盐的最终浓度为至少0.5 M,或者替代地至少约0.6 M、0.7 M、0.8 M、0.9 M、1.0 M、1.1 M、1.2 M、1.3 M、1.4 M或1.5 M。在一个实施方式中,盐的最终浓度为不大于约3.0 M、2.5 M、2.0 M、1.9 M、1.8 M、1.7 M、1.6 M、1.5 M、1.4 M、1.3 M、1.2 M、1.1 M或1.0 M。在一些实施方式中,盐的最终浓度为约0.5 M至约3.0 M、约0.5 M至约2.5 M、约0.5 M至约2.0 M、约0.5 M至约1.5 M、约0.5 M至约1.0 M、约1.0 M至约1.5 M、约1.0 M至约2.0 M、约1.0 M至约2.5,但不限于此。

[0061] 一旦盐析溶液被加入至病毒样品,则大部分宿主细胞蛋白可以被沉淀并且通过离心从样品中移除,同时病毒颗粒停留在上清液中,其能够被进一步纯化。

[0062] 病毒颗粒沉淀和进一步纯化

[0063] 盐析步骤能够从样品中去除大部分蛋白,形成在样品中富集的病毒颗粒以及少许蛋白污染。这样的样品可以根据需要被进一步纯化,正如移除样品中的盐。在一个实施方式中,将所述样品与包含适当浓度的聚乙二醇(PEG)的沉淀溶液混合。

[0064] 如本文使用的,术语“沉淀溶液”一般地是指包括聚乙二醇(PEG)的溶液,当其被加入至病毒样品中时,能够使病毒颗粒沉淀。PEG的分子量通常是约3000至约15000,或者优选地约3000至约10000。在一个实施方式中,沉淀溶液中PEG的浓度为至少5%。如裂解溶液和盐析溶液一样,可以通过在病毒样品中加入沉淀溶液时在病毒样品中所需的PEG浓度,确定沉淀溶液中PEG的浓度。

[0065] 在一个实施方式中,病毒样品中的最终PEG浓度为至少5%,或者替代地至少约6%、7%、8%、9%、10%、11%或12%。在另一个实施方式中,病毒样品中的最终PEG浓度为不大于15%,或者替代地不大于14%、13%或12%。

[0066] 病毒样品中的PEG能够使病毒颗粒沉淀,其然后能够被重悬在适当的溶液中。

[0067] 在一个实施方式中,病毒样品或者被重悬的病毒颗粒可以进行层析。层析的非限制性的例子包括基于二氧化硅的层析、树脂层析或离子交换层析柱。使用层析的条件可以通过本领域的常规知识而设定。

[0068] 在一些实施方式中,本文描述的裂解、提取和纯化方法不需要(但不排除)一些在本领域中常用的技术。例如,在一些常规方法中,有机溶剂被用于裂解细胞或降解蛋白。但是,本发明技术不需要有机溶剂。

[0069] 另一种常用方法包括冷冻/解冻循环,这也不是本发明技术所需要的。另一种方法包括超速离心,其通常采用由氯化铯(CsCl)或碘克沙醇制成的梯度。超速离心或相关的梯度试剂也不是本发明技术所需要的。在一些实施方式中,同样不需要的是亲和层析。

[0070] 经纯化的病毒成分

[0071] 本发明还提供了通过本发明的任何实施方式的方法制备的病毒颗粒。容易理解的是,除了本发明技术提高病毒提取和纯化的效率之外,本发明技术的最终产物也优于通过常规技术获得的最终产物。

[0072] 例如,因为本发明技术不需要超速离心,所以最终产物必定不包括梯度试剂的任何污染,例如氯化铯(CsCl)或碘克沙醇。

[0073] 并且，与在从病毒中移除空的病毒颗粒上无效的亲和层析方法相比更优的是，本发明技术的最终产物会含有低得多的空颗粒的数量。因此，在一个实施方式中，所述最终产物包含每10,000个病毒颗粒少于1个空颗粒，或者替代地每20,000、50,000、100,000、500,000、10^6、10^7、10^8、10^9或10^{10}个病毒颗粒少于1个空颗粒。

[0074] 在本发明方法的产物和通过常规技术获得的产物之间的另一个差异是，本发明产物具有较少的蛋白污染。在一个实施方式中，所述最终产物包含少于约1/10,000 (w/w)宿主细胞蛋白比病毒颗粒的总量，或者替代地少于约1/20,000、1/50,000、1/100,000、1/500,000或1/1,000,000 (w/w) 宿主细胞蛋白。

[0075] 本发明技术的另一个优点是，与在现有技术中已经完成的相比，经纯化的病毒保留更好的感染性。在一个实施方式中，对于经制备的样品中的每10^{13}个颗粒，存在至少10^{10}个活性病毒的转导单元。在另一个实施方式中，对于经制备的样品中的每10^{13}个颗粒，存在至少$1x10^9$、$2x10^9$、$5x10^9$、$2x10^{10}$、$5x10^{10}$、$1x10^{11}$、$2x10^{11}$、$5x10^{11}$或$1x10^{12}$个病毒的转导单元。

[0076] 试剂盒和包装

[0077] 本发明还提供了试剂盒和包装，其包括有用于病毒纯化的两个或多个物品(items)，例如溶液、柱和过滤器。这种试剂盒和包装提供了执行本发明技术的便利方式。应该理解的是，所述试剂盒或包装可以不需要包括纯化方法所需的每一个单独的物品，因为这些物品中的一些可以立即制备或者从 其他来源获得。

[0078] 在一些实施方式中，本发明的试剂盒或包装包括以下中的两个或多个物品：细胞悬浮溶液、细胞裂解溶液(也被称为碱性裂解溶液或裂解溶液)、第一次分级分离溶液(也被称为盐析溶液溶液)、第二次分级分离溶液(也被称为沉淀溶液)、沉淀悬浮溶液(也被称为病毒悬浮溶液)、固相层析(色谱)柱、柱平衡溶液、柱洗涤溶液、柱洗脱溶液、离心过滤器、以及适当的柱适配器和注射器或其他柱支撑性套件或材料。这些物品中的每一个都已经通过例子进行描述并在下文中进一步说明。

[0079] 在一些实施方式中，细胞悬浮溶液包括无血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、或Tris缓冲盐水(TBS)或其他类型的盐水，或者由它们组成。细胞悬浮溶液的pH可以为约5.0-9.0、或6.0-8.0、或6.5-7.5。

[0080] 在一些实施方式中，细胞裂解溶液包括洗涤剂，其优选是温和的洗涤剂或者有助于细胞裂解但不会降低病毒活性的洗涤剂。洗涤剂的非限制性的例子包括：脱氧胆酸盐、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、烷基硫酸盐、聚山梨醇酯20(吐温-20)、Tergitol型NP-40、或其混合物。在一个实施方式中，所使用的洗涤剂是脱氧胆酸盐，例如脱氧胆酸钠(DOC)。

[0081] 除了洗涤剂之外，所述裂解溶液还可以包括碱，例如N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS)、甘氨酸/钠、甘氨酸/钾、碳酸钠、碳酸钾、磷酸钠、磷酸钾或其组合。

[0082] 在一个实施方式中，细胞裂解溶液包括：约0.05%-1.0% (w/v)的洗涤剂，其选自辛基葡萄糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、聚山梨醇酯20(吐温-20)、脱氧胆酸钠(DOC)、十二烷基硫酸钠(SDS)及其混合物，以及约50-500 mM的碱，其选自甘氨酸钠、磷酸钠、N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS)及其混合物。

[0083] 可以根据裂解溶液加入至样品之后所需的pH和在细胞样品中的成分的最终浓度，确定裂解溶液的pH和成分。在一个实施方式中，在将裂解溶液加入至细胞样品时，样品的pH

优选是至少8.0，或者替代地至少8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4或11.5。在另一个实施方式中，样品的pH不高于12.0，或者替代地不高于11.9、11.8、11.7或11.6。在一些实施方式中，样品的pH为约8.5至约12.0、或约9.0至约12.0、或约9.0至约11.5、或约8.5至约11.5、或约9.0至约11.0、或约9.5至约12.0、或约9.5至约11.5、或约9.5至约11、或约9.5至约10.5、或约9.5至约10.0、或约10.0至约12.0、或约10.0至约11.5、或约10.0至约11.0、或约10.0至约10.5，但不限于此。可以通过化合物或试剂，例如浓度为约0.05 M至约0.5 M的碱，获得或调节裂解溶液的pH。

[0084] 第一次分级分离溶液，也被称为盐析溶液，可以具有中性或酸性pH(例如约3.5至约7.0)并且包括浓度至少为0.5 M的盐。

[0085] 在第一次分级分离溶液中使用的盐可以选自以下中的一种或多种：乙酸钠、乙酸钾或磷酸钠，但不限于此。在病毒样品中盐的最终浓度可以是约0.5 M及以上。在一个实施方式中，盐的最终浓度为至少0.5 M，或者替代地至少约0.6 M、0.7 M、0.8 M、0.9 M、1.0 M、1.1 M、1.2 M、1.3 M、1.4 M或1.5 M。在一个实施方式中，盐的浓度为不大于约3.0 M、2.5 M、2.0 M、1.9 M、1.8 M、1.7 M、1.6 M、1.5 M、1.4 M、1.3 M、1.2 M、1.1 M或1.0 M。在一些实施方式中，盐的浓度为约0.5 M至约3.0 M、约0.5 M至约2.5 M、约0.5 M至约2.0 M、约0.5 M至约1.5 M、约0.5 M至约1.0 M、约1.0 M至约1.5 M、约1.0 M至约2.0 M、约1.0 M至约2.5，但不限于此。

[0086] 在一个实施方式中，第一次分级分离溶液的pH为不高于约7.0，或者替代地不高于约6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2或6.1。在另一个实施方式中，第一次分级分离溶液的pH为高于约4.0，或者替代地高于约4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4或5.5。在一些实施方式中，第一次分级分离溶液的pH为约3.5至约7.0、约3.6至约7.0、约4.1至约6.5、约4.5至约6.5、约5.0至约7.0、约5.0至约6.5、或约5.0至约6.0。

[0087] 在一个实施方式中，第一次分级分离溶液包括约1.0-5.0 M的盐，其选自乙酸钠、乙酸钾、磷酸钠或其组合，pH为约4.0-7.0。

[0088] 在一些实施方式中，第二次分级分离溶液(也被称为沉淀溶液)包括聚乙二醇(PEG)。PEG的分子量通常是约3000至约15000，或者优选地约3000至约10000。在一个实施方式中，第二次分级分离溶液中PEG的浓度为至少5%。在一个实施方式中，病毒样品中的PEG浓度为至少5%，或者替代地至少约6%、7%、8%、9%、10%、11%或12%。在另一个实施方式中，病毒样品中的最终PEG浓度为不大于15%，或者替代地不大于14%、13%或12%。在一个实施方式中，第二次分级分离溶液包括5%-12%的平均分子量为约3000至约10000的PEG。

[0089] 在一些实施方式中，沉淀悬浮溶液(也被称为病毒悬浮溶液)包括约20-100 mM磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液或其他缓冲盐水，其中含有50-200 mM氯化钠，pH为约6.0-9.0。在一些实施方式中，沉淀悬浮溶液是无血清的DMEM培养基。

[0090] 在一些实施方式中，不同类型的固相层析柱可以包括在所述试剂盒或包装中。非限制性的例子包括基于二氧化硅的层析柱和固相的基于二氧化硅的离子交换层析柱。每一类型的柱都适当地与优化的柱平衡溶液、柱洗涤溶液和/或柱洗脱溶液一起使用。

[0091] 在一些实施方式中，柱平衡溶液包含20-100mM乙酸钠或乙酸钾或磷酸钠或磷酸钾或甘氨酸钠或Tris缓冲液或3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)缓冲液，pH为4.0-10.0，含有50-

200mM氯化钠或其他盐，含有5-40%甲醇或异丙醇或乙醇或其他有机溶剂。

[0092] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含基于二氧化硅的阳离子交换层析柱和柱平衡溶液，其柱平衡溶液包含约10-100mM乙酸钠、乙酸钾、或3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)，以及约100-200mM氯化钠，pH为约4.0-8.0。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含基于二氧化硅的阴离子交换层析柱和柱平衡溶液，其柱平衡溶液包含约10-100mM甘氨酸钠、Tris、或MOPS，以及约100-200mM氯化钠，pH为约6.0-10.0。

[0093] 在一些实施方式中，柱洗涤溶液包含20-200mM乙酸钠或乙酸钾或磷酸钠或磷酸钾或甘氨酸钠或Tris缓冲液或3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)缓冲液，pH为4.0-10.0，含有50-500mM氯化钠或其他盐和5-20%甲醇或异丙醇或乙醇或其它有机溶剂。

[0094] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含基于二氧化硅的阳离子交换层析柱和柱洗涤溶液，其柱洗涤溶液包含约10-200mM乙酸钠、乙酸钾、或3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)，以及约100-500mM氯化钠，pH为约4.0-8.0。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含基于二氧化硅的阴离子交换层析柱和柱洗涤溶液，其柱洗涤溶液包含约10-200mM甘氨酸钠、Tris、或MOPS，以及约100-500mM氯化钠，pH为约6.0-10.0。

[0095] 在一些实施方式中，柱洗脱溶液包含20-200mM乙酸钠或乙酸钾或磷酸钠或磷酸钾或甘氨酸钠或Tris缓冲液或3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)，pH为4.0-10.0，含有50-2000mM氯化钠或其他盐。

[0096] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含基于二氧化硅的阳离子交换层析柱和柱洗脱溶液，其柱洗脱溶液包含约10-200mM乙酸钠、乙酸钾、或3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)，以及约100-2000 mM氯化钠，pH为约4.0-8.0。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含基于二氧化硅的阴离子交换层析柱和柱洗脱溶液，其柱洗脱溶液包含约10-200mM甘氨酸钠、Tris、或MOPS，以及约100-2000 mM氯化钠，pH为约6.0-10.0。

[0097] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含柱辅助套件或材料，以调节穿过柱的溶液流。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含柱辅助材料，其包括柱顶部适配器和注射器。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含柱辅助套件，如真空连接单元。

[0098] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装包含病毒浓缩套件，以浓缩从上述层析柱中病毒洗脱液。在一些实施方式中，病毒浓缩套件是一些离心过滤器或其他浓缩套件。

[0099] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装至少包含细胞裂解溶液和第一次分级分离溶液。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装至少包含细胞裂解溶液、第一次分级分离溶液、以及第二次分级分离溶液。在一些实施方式中，所述试剂盒或包装至少包含细胞裂解溶液、第一次分级分离溶液、以及固相提取样式的层析柱。在一些实施方式中，还包含细胞悬浮溶液、或沉淀悬浮溶液。在一些实施方式中，还提供了柱平衡溶液、柱洗涤溶液和/或柱洗脱溶液，用于柱层析。

[0100] 在一些实施方式中，所述试剂盒或包装进一步包含使用所述试剂盒或包装纯化病毒的说明书。

[0101] 方法和成分

[0102] 腺相关病毒(AAV)是感染人类和一些其他灵长类物种的小型病毒。目前尚不知道AAV可以引起疾病。该病毒只引起温和的免疫反应，进一步支持AAV病毒不具备明显的致病性。AAV用作基因疗法载体能够感染分裂细胞和静止细胞，并且持续在染色体外状态，不会

整合到宿主细胞的基因组中，虽然在天然病毒中确实发生携带病毒的基因整合到宿主基因组中。这些特征使AAV成为一种有吸引力的病毒载体的选择，尤其在制造基因治疗和制造等基因人类疾病模型在应用。

[0103] 研究最多的AAV血清型是它的血清型2。血清型2、3、5和6发现于人类细胞中，AAV血清型1、4和7-11发现于非人灵长类动物样本中。已经发现的有11种AAV血清型。AAV衣壳蛋白包含12个高变表面区域，大部分变异性发生在三叠近端峰中，但是这种细小病毒的基因组一般跨过血清型呈现高度保守的复制和结构基因。所有已知的血清型都能够感染来自多个不同的组织类型的细胞。组织特异性是由改变其嗜性范围的AAV载体的衣壳血清型和假型分型来决定的，这对于其在基因治疗中的应用可能是重要的。

[0104] 腺病毒(AdV)属于中等大小(90-100nm)、无外包膜(无外层脂质双层)的病毒，具有包含双链DNA基因组的二十面体核衣壳。它们具有范围广泛的脊椎动物宿主；在人类中，已经发现七个种类(A-G)、多于50个不同的腺病毒血清型，这些腺病毒会引起广泛的疾病，从年幼儿童的轻度呼吸道感染(也就是普通感冒)到成人的免疫系统减弱的危及生命的多器官疾病。

[0105] 重组AAV和AdV病毒及在合适的宿主细胞中包装这些病毒的方法在本领域内是众所周知的。AAV病毒生产细胞可以至少包括生成AAV颗粒所需的最小组件，其中包含AAV 病毒颗粒的DNA酶抗性基因组的生产涉及到在AAV衣壳里包装一个表达区段(expression cassette)。还如，所需的最小组件包括嵌入一个表达区段将到AAV衣壳、AAV cap和AAV rep，或某些功能片段，提供辅助功能。

[0106] 适合AAV和AdV生产的的细胞和细胞系已有阐述。细胞本身可以选自任何生物体，包括原核(例如细菌)细胞和真核细胞，包括昆虫细胞、酵母细胞和哺乳动物细胞。特别理想的宿主细胞选自于任何哺乳动物物种，包括但不限于：549、WEHI、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS 1、COS 7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、WI38、HeLa、HEK293、Saos、C2C12、L细胞、HT1080、HepG2和原发性成纤维细胞、肝细胞和成肌细胞，其衍生自哺乳动物，包括人、猴、小鼠、大鼠、兔和仓鼠。

[0107] 通常，最低限度的表达区段由以下组成：5’ AAV反向末端重复(ITR)，一种编码所需的治疗性免疫原、或可操作地连接至引导其表达的调节序列的抗原的核酸序列，以及3’ AAV ITR。在一个实施方式中，使用了AAV血清型2的5’和/或3’ ITR。但是，也可以选择来自其他合适来源的5’和3’ ITR。正是该表达区段包装进衣壳蛋白以形成AAV病毒(颗粒)。

[0108] 除了表达区段之外，所述细胞含有驱动细胞中AAV衣壳的表达的序列(cap序列)，以及来自与在表达区段中发现的AAV ITR的来源相同的来源或交叉互补来源的rep序列。AAV cap和rep序列可以独立地选自不同的AAV亲本序列，并且以本领域技术人员已知的适当方法来引入宿主细胞。虽然可以采用全长rep基因，但是已经发现其较小的片段，即rep78/68和rep52/40，足够来允许AAV的复制和包装。

[0109] 所述细胞还需要辅助功能，从而包装本发明的AAV。任选地，这些辅助功能可以由疱疹病毒提供。在另一个实施方式中，所述的每个必要辅助功能都由人类或非人类灵长类动物腺病毒源提供，例如可以由各种来源获得的，包括美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection，ATCC)(马纳萨斯，弗吉尼亚州(美国))。

[0110] 在一些实施方式中，本发明还提供用作治疗剂或疫苗剂的病毒纯化的成分和方

法。

实施例

[0111] 以下实施例用以阐明本发明的具体实施方式。本领域技术人员应该理解的是，在以下实施例中公开的技术代表了本发明在实践中运行良好的技术，并且因此可以被认为构成其实践的具体模式。但是，根据本发明，本领域技术人员应该理解，在一些特定的具体实施方式中可能有许多改变并仍然获得相同或相似的结果，而不脱离本发明的精神(spirit)和范围(scope)。

[0112] 实施例1:从宿主细胞裂解、提取和纯化腺相关病毒和腺病毒

[0113] 本实施例测试了将AAV和AdV病毒颗粒从它们的包装细胞(宿主细胞)中裂解、提取和纯化的方法。该实施例证明了本方法与常规方法相比，实现了病毒颗粒的更高的回收率和纯度。此外，本方法易于操作并且可以容易扩展(scaled up readily)。

[0114] 方法和材料

[0115] 从Fisher Scientific购得达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)和细胞培养皿。从Santa Cruz Biotechnology购得6孔和12孔细胞培养板。从Qiagen购得质粒DNA Maxiprep试剂盒。从Life Technologies购得Lipofectamine 2000转导试剂(Transfection Reagent)。从Fisher Scientific购得DNA酶I、Maxima Sybr Green qPCR主混合物(Master Mix,2X)、Pierce BCA蛋白测定试剂盒、SDS-PAGE微型凝胶(minigels)、Amicon Ultra-4离心过滤器和所有化学品。从Agilent Technologies, Inc.和Bonna-Agela Technologies Inc.购得基于二氧化硅的层析柱。

[0116] *细胞培养*

[0117] HEK293细胞在具有5% CO_2的37°C培养器中培养，其培养基为含有10%胎牛血清(FBS)的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)，每3-5日进行继代(split)培养。细胞按1:2继代培养在15-cm培养皿中进行AAC包装的转导或AdV扩增的感染。细胞继代培养至6孔或12孔细胞培养板上，以用作感染实验。

[0118] *AAV包装*

[0119] HEK293细胞继代至15-cm培养皿上，第二天使用Lipofectamine 2000转导试剂或磷酸钙沉淀法进行转导(transfection)。用于AAV包装的质粒DNA包括GFP重组AAV病毒载体质粒和AAV包装质粒。在过夜培养之后，将培养基替换为新鲜的生长培养基，经转导的细胞再培养两天，然后用2000 rpm离心5分钟来收集细胞。收集的包装有AAV的细胞立即用于病毒提取或者储存于-80°C直至使用。保存上清培养基，以用于PEG沉淀病毒颗粒。PEG沉淀使用6-8% 的PEG8000和在4°C 条件下静置1小时，再离心10,000 rpm 10分钟。PEG沉淀的病毒用PBS悬浮，经涡旋和移液管促溶后离心5000×g 5分钟，以得到上清病毒悬浮液。该病毒悬浮液用于如图1和图3小图A中所示的pH、洗涤剂和盐测试。

[0120] *AdV生成*

[0121] HEK293细胞继代培养至T75培养瓶，用Lipofectamine 2000转导GFP重组腺病毒质粒。转染后24小时，培养基替换为新鲜的生长培养基。细胞培养一周后，收集细胞。将细胞悬浮于PBS中并用3次冻结/解冻提取，离心5000×g 5分钟。将三分之一的上清液用于感染在T175中的HEK293细胞、以进一步生产病毒，其余的病毒上清液作为原储备液保存。一周培养

之后，收集感染的细胞，采用3次冻结/解冻提取病毒颗粒，病毒提取液作为储备保存于-80°C，直至用于病毒生产。用于测试试验， AdV病毒感染在15-cm 培养皿的HEK293细胞，培养3-5天至>90%细胞病变，然后用离心2000 rpm 5分钟收集细胞。收集的细胞沉淀立即用于病毒提取或者储存于-80°C直至使用。保存上清的培养基以用于PEG沉淀病毒颗粒。PEG沉淀如以上PEG沉淀AAV一样，这里得到的病 毒悬浮液同样用于pH、洗涤剂和盐测试中。

[0122] *条件测试*

[0123] 将AAV和AdV病毒溶液与等体积的如图中所示的pH缓冲溶液、洗涤剂溶液或盐溶液混合，并在室温下静置2小时，然后用于感染HEK293细胞。由观察GFP得到的感染率评估病毒活性。确定适于AAV和AdV病毒并维持其活性的pH值范围和洗涤剂量，以便设计细胞裂解溶液，从而能更容易地从其包装细胞中释放病毒颗粒。确定对于一系列盐溶液的病毒适用性，可以知道盐析沉淀在病毒纯化过程中应用的可能性。

[0124] *病毒纯化*

[0125] 宿主细胞的裂解是一个重要步骤，它能够达到病毒宿主细胞的快速裂解和病毒颗粒的完全释放。从条件测试中获得的结果是，AAV和AdV病毒能够在宽泛的pH值范围和一定的洗涤剂(例如十二烷基硫酸钠(SDS)和脱氧胆酸钠(DOC))的量之内维持其活性，由此设计出一系列的裂解溶液，包括如表2和表3中所示，含或不含洗涤剂的各种酸性溶液和碱性溶液。在发现含有洗涤剂(例如DOC或DOC加SDS)的碱性溶液可以有效裂解包装有AAV或AdV的细胞之后，地进而制备和测试了几种不同的碱性裂解溶液，如表4和表5所示。在此使用的合适的洗涤剂还可以包括脱氧胆酸盐、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、烷基硫酸盐、聚山梨醇酯20(吐温-20)、Tergitol型NP-40及其各种组合。在实验过程中，用离心2000 rpm 5分钟收集包装有AAV或AdV的细胞，然后用上述裂解溶液裂解细胞。用放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液[25mM Tris-Cl, pH 7-8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5%脱氧胆酸钠(DOC), 1% NP-40 和混合蛋白酶抑制剂]裂解细胞以作为总蛋白对照，或者用在-80°C下冻结并在37°C水浴中解冻的3次循环提取以作为比较对照。

[0126] 用作一个提取步骤，我们首先测试了采用盐析沉淀去除宿主细胞蛋白并保留病毒颗粒在上清液中的可能性。在如上所述的AAV和AdV病毒对盐的耐受性测试中发现，这两种病毒都显示出对高盐度的广泛适用性，由此我们配制了系列的不同盐溶液(表6)，以测试盐析沉淀在细胞裂解后提取病毒的作用。将所述盐溶液加入细胞裂解液，并快速混匀。盐析沉淀发生后，用高速离心澄清上述混合溶液，去除沉淀。上清液用于感染HEK293细胞，以验证停留在溶液中的病毒颗粒。已确证的是，盐析沉淀过程去除了大量的的宿主细胞蛋白杂质，并有效地在溶液中保留着病毒颗粒；这种经提取的病毒溶液相当地干净，可以进一步用于PEG分级分离或直接用于柱层析纯化。

[0127] 随着盐析过程之后，测试了PEG分级分离，以期达到病毒溶液的脱盐、富集和进一步纯化。先配制各种大小的PEG的储备溶液，这些PEG的平均分子量为3000至10000，在病毒溶液中加入PEG储备溶液，进行测试。混匀之后，将混合物冰浴0.5-2小时，然后高速离心15分钟，以沉淀病毒颗粒。沉淀的病毒颗粒重悬于PBS中，用于感染细胞以验证病毒，或者重悬于合适的缓冲液中，用于柱层析纯化。实验发现，这一步PEG分级分离产生出高纯度的病毒溶液，这种纯度的病毒可以适用于许多研究目的。

[0128] 下一个步骤是柱层析纯化AAV和AdV病毒颗粒，随后用离心过滤器浓缩，从而得到高滴度、超纯的病毒溶液。柱层析所用AAV或AdV病毒颗粒来自于盐析过程或者是PEG分级分离之后的重悬病毒溶液，将这些病毒溶液进行层析，所用的层析柱为基于二氧化硅的层析柱、树脂层析柱或离子交换层析柱。针对不同的层析柱，制备系列不同的病毒悬浮缓冲液、柱洗涤缓冲液和洗脱缓冲液，进行优化。从柱层析所得的病毒洗脱液用Amicon离心过滤器或其他离心过滤器浓缩。

[0129] *感染率检测*

[0130] 在本发明技术的研发中，感染HEK293细胞被用作观察各纯化步骤中AAV和AdV颗粒的病毒活性的主要手段。细胞继代培养至12孔或6孔培养板中，其培养基为含有5% FBS的DMEM，细胞的密度为80-90%，继代培养一天后用于感染。在每个培养孔中加入的病毒溶液量，根据病毒溶液的病毒浓度、离子强度和pH值而不同，为1-10 μl的病毒溶液或者在用于感染之前进行稀释后的病毒溶液。因为所用病毒都含有GFP，在荧光显微镜之下拍摄和计数GFP细胞，以此用来显示感染率。拍摄在4×镜头下进行，计数在10×镜头下进行。在感染之后的2-3日观察AdV感染率，而在3-5日观察AAV感染率。重要的是，在感染之后的GFP细胞要能够在10×镜头的范围内进行计数。如果GFP细胞数量过大或过小、不便计数，则感染实验必须重做，这时要调节的病毒溶液或者使用新的病毒溶液来重复感染。

[0131] *qPCR滴定*

[0132] 层析柱纯化的AAV和AdV病毒溶液用定量即时PCR(quantitative real-time PCR，qPCR)进行滴定。病毒溶液首先用DNA酶I处理，酶处理在含有5个单元的DNA酶I的10 μl反应混合物中进行，然后采用标准的qPCR循环模式滴定，在25 μl的qPCR反应混合物中含有2x Sybr Green qPCR主混合物和一对表1中所列出的引物。系列稀释10倍的病毒载体稀释液用作qPCR滴定中的标准样品。用标准曲线计算出病毒溶液的滴度，单位为每毫升(ml)的病毒基因组拷贝。

[0133] 表1. 用于qPCR滴定中的AAV和AdV引物。

[0134]

靶标	ID:序列	扩增子	滴定病毒
GFP	Fw_GFP: 5'-TCTGCACCACCGGCAAGCTGC-3' (SEQ ID NO:1)	76 bp	AAV 或 AdV
	Rv_GFP: 5'-GAGAAGCACTGCACGCCGTAG-3' (SEQ ID NO:2)		
hGH_PA	Fw_pA: 5'-GGTCTCCAACTCCTAATCTCAG-3' (SEQ ID NO:3)	102 bp	AAV
	Rv_pA: 5'-AAAATCAGAAGGACAGGGAAGG-3' (SEQ ID NO:4)		
CMV	Fw_CMV: 5'-TTCCTACTTGGCAGTACATCTACG-3'(SEQ ID NO:5)	128 bp	AdV
	Rv_CMV: 5'-GTCAATGGGGTGGAGACTTGG-3' (SEQ ID NO:6)		

[0135] *BCA测定*

[0136] 按BCA蛋白测定试剂盒的说明书进行二喹啉甲酸测定(BCA测定)，，确定病毒溶液的蛋白含量。简单地说，在96孔培养板中每孔加入25 μl样品溶液和200 μl BCA溶液(混合A和B，50:1)，进行测试。在37°C温育30分钟后，在板读数器(plate reader)上读取562 nm的读数。用牛血清白蛋白(BSA)10 mg/ml的储备液的系列稀释溶液，制造标准曲线。为了降低盐沉淀后高盐浓度的影响，使用了两个策略：(1)将高盐度样品在H2O中稀释5倍，即每孔加

入5 μl样品和20 μl H2O,以用于BCA测定;(2)制备相似的盐溶液(盐混合物),并将5 μl的盐混合物加入至包括标准稀释液的低盐样品的每个孔,以降低高盐在BCA测定中的影响。

[0137] *SDS-PAGE电泳*

[0138] 用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳直观地显示在病毒溶液中蛋白含量。将从碱性裂解/盐析沉淀获得的病毒溶液用H_2O稀释4倍,然后与5× SDS样品缓冲液混合。由冻结/解冻和RIPA裂解获得的样品溶液与5× SDS样品缓冲液混合,然后使用1× SDS样品缓冲液稀释。根据,将所有样品按照原始的细胞悬浮液具有相同的体积,相同体积的样品加载至10% SDS凝胶上。用140伏电泳约1小时,直至溴酚蓝染料到达凝胶的底部。电泳后,凝胶在固定溶液中固定,其固定溶液含有10% (v/v) 乙酸和50% (v/v) 甲醇,然后将凝胶转入至考马斯蓝染色溶液中染色过夜,考马斯蓝染色溶液含有10% (v/v) 乙酸、0.25% (w/v) 考马斯蓝R-250和50% (v/v) 甲醇。在含有50%甲醇和10%乙酸的脱色溶液中进行脱色。在完全脱色之后,将凝胶保持在5% (v/v) 乙酸中。使用扫描仪将凝胶扫描成图像,使用NIH Image J对凝胶染色密度进行量化分析。

[0139] 结果

[0140] *腺相关病毒和腺病毒在约3.6至约11.5的pH值的相对宽范围内维持其感染性。*

[0141] 该实施例首先测试了AAV和AdV对约3.6至约11.5的*相对宽范围*的pH值的适用性,以确定开发理想的细胞裂解溶液的pH值。病毒溶液在图中所示的pH溶液中,于室温静置2小时,然后用于感染HEK293细胞。通过对其GFP表达的观察,我们发现,AAV在所测试的pH 3.6至pH 11.5 相对宽的pH值范围内都维持其感染率,而AdV能够在pH3.6至pH10.5的pH值范围内维持其感染率,但是超过pH 11.0时就失去稳定性(图1小图A和B)。比较而言,LtV维持其感染率的pH值范围较窄,只能在pH 6.0至pH 9.5的范围内维持其感染率(表1小图A和B)。因此,这些结果建议将细胞裂解溶液的所需的pH值确定为:用于AAV,是pH 3.6至pH 11.5;而用于AdV,是3.6至pH 10.5。这样的pH值范围最有助于细胞的裂解并不会明显地影响病毒活性。

[0142] *腺相关病毒和腺病毒在约0.1%至约1.0%的脱氧胆酸钠的浓度范围内维持其感染率,但是对十二烷基硫酸钠敏感。*

[0143] 为了测试在细胞裂解溶液中使用洗涤剂来裂解AAV和/或AdV包装细胞的可能性,我们确定了这些病毒对洗涤剂的耐受性,所述洗涤剂包括常用于细胞裂解的十二烷基硫酸钠(SDS)、Triton X-100和脱氧胆酸钠(DOC)。病毒溶液在图中所示的洗涤剂溶液中静置2小时,然后用于感染细胞。在测试中使用的剂量范围内,HEK293细胞本身对Triton X-100非常敏感,但对SDS和DOC不那么敏感,这暗示Triton X-100可能对病毒也是有毒性。SDS处理对于两种病毒来说都是严苛的,AdV更为敏感,即使0.1% SDS全部抑制了病毒感染率,但是AAV感染率也随着SDS浓度的增加而急剧下降,在0.1% SDS下降30%而在0.5% SDS下降50%(图1小图C和D)。相反,两种病毒都在所测试的0.05%至1.0%的DOC浓度范围内维持高感染率(图1小图C和D)。因此,这些结果显示AAV和AdV 病毒具有对DOC的忍耐性,所以,DOC,而非SDS或Triton X-100,是适用于细胞裂解溶液中的洗涤剂的最佳选择。

[0144] *碱性溶液,而非酸性溶液,部分地裂解病毒宿主细胞*

[0145] 根据以上确定的合适的pH值,我们配制了几种酸性溶液和碱性溶液(表2),以测试HEK293细胞——病毒包装细胞是否能够在酸性和/或碱性条件下裂解。收集细胞并将其分

别重悬在这些溶液中,经混匀之后,我们发现,悬浮细胞的碱性溶液比悬浮细胞的酸性溶液澄清得多,在5000 rpm下离心2分钟之后,前者出现少许沉淀物(pellet)而后者出现多得多的沉淀物(pellet)(表2)。由此表明,pH9.0-11.5的碱性溶液部分地(但不是完全地)裂解病毒宿主细胞,而H3.6-5.0的酸性溶液不裂解细胞。因此,可以得出结论,虽然比酸性溶液更好,但是这些碱性溶液不能完全地裂解这些病毒宿主细胞。

[0146] 表2. HEK293细胞在碱性溶液中部分裂解但在酸性溶液中不裂解。

[0147]

裂解溶液			细胞裂解	
类型	组分	pH	可见	旋转 (5000 rpm, 2 min)
酸性	HCl, 0.1 – 0.5 N	~1	不裂解	出现沉淀
	NaAc, 0.1 – 0.5 M	3.6 – 5.0	不裂解	出现沉淀
碱性	NaOH, 0.1 – 0.5 N	~13	裂解	无沉淀
	甘氨酸/Na, 0.1 – 0.5 M	9.0 – 11.5	不完全裂解	小沉淀

[0148] *洗涤剂使得碱性溶液能够有效地裂解AAV和AdV包装细胞。*

[0149] 经上面的实验确定,AAV和AdV病毒对SDS敏感但是兼容DOC(图1小图C和D)。因此,在上述碱性溶液中加入0.1% - 1.0% DOC,另外再加入或不加入0.01% - 0.5% SDS,测试DOC或DOC加SDS是否促进细胞裂解,我们发现,洗涤剂的加入使得细胞在所测试的pH 9.6-11.5的pH范围的碱性溶液中完全裂解(表3)。其他洗涤剂包括脱氧胆酸盐、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、烷基硫酸盐、聚山梨醇酯20(吐温-20)、Tergitol型NP-40及其各种组合,也可能有助于细胞裂解。因此表明,理想的碱性裂解溶液应含有具有pH9.0-11.5缓冲能力的试剂或化合物以及适量的洗涤剂(例如DOC和SDS)。

[0150] 表3. 脱氧胆酸钠使得碱性溶液能够完全裂解HEK293细胞。

[0151]

碱性溶液				细胞裂解		
碱性溶液	pH	DOC	SDS	可见	旋转 1	旋转 2
NaOH, 0.1 – 0.5 N	~13	0.1 % – 1.0%	无	被裂解	无沉淀 (5K rpm 2 min)	无沉淀 (10K rpm 2 min)
		0.1 % – 1.0%	0.01% – 0.5%	被裂解		
甘氨酸/Na, 0.1 – 0.5 M	9.0 – 11.5	0.1 % – 1.0%	无	被裂解	无沉淀 (5K rpm 2 min)	无沉淀 (10K rpm 2 min)
		0.1% – 1.0%	0.01% – 0.5%	被裂解		

[0152] *多种碱性溶液再加入洗涤剂后有效地裂解HEK293细胞。*

[0153] 我们进一步观察了以表4中列出的作为例子的、含有洗涤剂DOC的不同类型的碱性溶液的细胞裂解,发现所有这些碱性溶液都有效地裂解HEK293细胞。然后,我们选择了如表5中列出的7种碱性溶液裂解包装有AAV和AdV的细胞,裂解之后观察病毒感染率。我们知道提取AAV和AdV颗粒最常用的是冻结/解冻(freeze/thaw),所以平行地使用三次冻结/解冻、

从其包装细胞中提取AAV或AdV颗粒作为比较对照。病毒感染率通过观察GFP表达的细胞来确定，一是拍摄GFP表达细胞的照片(图2小图A)和二是计数GFP表达细胞的个数(图2小图B)。我们发现，这些碱性溶液全部都有效地裂解宿主细胞并释放AAV和AdV病毒颗粒，显示出高于冻结/解冻提取的病毒溶液的感染率(图2小图A和B)。与上述pH测试结果相一致的是，pH11.0的碱性裂解溶液大大降低AdV感染率(图2小图A和B)。因此可以得出结论，含有适量的洗涤剂(例如DOC)的碱性溶液可以充分地裂解包装有AAV和AdV的细胞并能完全地释放病毒颗粒，而适合于AAV的是pH9.0至11.5，适合于AdV的是pH9.0至10.5。这种新的细胞裂解方法能够克服冻结/解冻方法的缺点如耗时长和降低细胞感染率。

[0154] 表4. 多种含DOC的碱性溶液有效地裂解HEK293细胞。

[0155]

碱性裂解溶液			细胞裂解
化学品	浓度	pH	
Na_2HPO_4	0.1－0.5 M	~9	好
K_2HPO_4	0.1－0.5 M	~9	好
甘氨酸/NaOH	0.1－0.5 M	9.5－10.5	好
Tris 碱	0.1－0.5 M	~10	好
CAPS/NaOH	0.1－0.5 M	10.0－11.5	好
Na_2CO_3/NaOH	0.1－0.5 M	10.5－11.0	好
Na_2HPO_4/NaOH	0.1－0.5 M	10.5－11.0	好

[0156] 表5.用于裂解包装病毒细胞的碱性溶液。

[0157]

碱性裂解溶液			病毒活性	
No.	化学品	pH	AAV	AdV
1	Na_2HPO_4	8.9	好	好
2	甘氨酸/NaOH	9.6	好	好
3		10.0	好	好
4		10.5	好	好
5	CAPS/NaOH	10.0	好	好
6		11.0	好	无
7	Na_2HPO_4/NaOH	11.0	好	无

[0158] *盐析沉淀适用于沉淀蛋白杂质而保留AAV和AdV病毒颗粒在溶液中。*

[0159] 伴随其包装细胞的裂解，在病毒溶液中存在大量的宿主细胞蛋白，如何去除这些蛋白杂质是病毒纯化中的主要问题。盐析沉淀是一种已知的技术，常用于蛋白化学中。为了测试盐析沉淀用于去除病毒溶液中蛋白的可能性，我们观察了AAV和AdV对于高盐溶液的耐受性，发现AAV和AdV在高达2.0 M NaCl的盐溶液中浸育后都维持高度一致的感染率，比较而言，LtV对于高盐溶液显示出较低的耐受性(图3小图A)。这些结果表明了一种可能性，即盐析沉淀可以用来去除病毒溶液中的蛋白杂质。

[0160] 在盐析沉淀的测试中，我们将包装有AAV和AdV的细胞用如表5中示出的7种碱性裂解溶液裂解，在这些细胞裂解液中加入0.5-3 M NaAc, pH 5.5并快速混匀，正如预期，出现大量的沉淀。通过离心去除沉淀，保存上清液用于感染细胞。病毒感染的结果显示，经盐析沉淀之后两种病毒颗粒都完全地保留在上清液中(图3小图B和C)。重要的是，我们发现，与冻结/解冻提取的方法相比，这种新型的采用碱性裂解/盐析沉淀的方法产生出AAV和AdV颗粒多20-40%(图3小图B和C)，由此说明碱性裂解比冻结/解冻更有效地从其宿主细胞中释放AAV和AdV病毒颗粒。

[0161] *盐析沉淀去除AAV和AdV溶液中大量的的宿主细胞蛋白。*

[0162] 为了确定盐析沉淀的有效性，我们采用两组样品：组1使用正常的HEK293细胞而组2使用包装有AAV的HEK293细胞，用碱性裂解溶液裂解这些细胞并随后进行盐析沉淀。离心去除沉淀后，上清液中的蛋白浓度用BCA测定法(图4小图A)和SDS-PAGE电泳(图4小图B)检测。两个检测结果都一致地显示，所有细胞裂解液中的大部分蛋白杂质都通过盐析而去除，比较的对照有由RIPA缓冲液裂解的总细胞裂解液和由冻结/解冻所得的提取液(图4小图A和B)。从这些结果中还观察到一个趋势，即较高pH的碱性裂解溶液导致更多蛋白的去除(图4小图A和B)。

[0163] 在观察各种盐溶液的盐析效果中发现，多种盐类适用于盐析沉淀，可以有效地沉淀出杂质而保留病毒颗粒在溶液中，但不包括铵盐，因为铵盐抑制AAV和AdV病毒的感染率(表6)。盐溶液的盐剂量和pH值的进一步实验证明，盐析沉淀的蛋白去除与盐的剂量相关，也随其pH变低而更有效(图4小图C)。

[0164] 表6. 各种盐类溶液及其在盐析沉淀中的效果。

[0165]

盐溶液			效果	
化学品	浓度	pH	蛋白移除	病毒活性
NaH2PO4	1.0－4.0 M	4.0－6.0	好	好
NaAc	1.0－4.0 M	4.0－6.0	好	好
KAc	1.0－4.0 M	4.0－6.0	好	好
NH4Ac	1.0－6.0 M	4.0－6.0	好	被抑制
NaCl	1.0－4.0 M	4.0－6.0	好	好
KCl	1.0－4.0 M	4.0－6.0	好	好

[0166] *聚乙二醇分级分离使AAV和AdV颗粒脱盐并富集*

[0167] 下一步骤将试图把病毒从高盐溶液中分离，可以用如下所述的柱层析或者用有机溶剂或聚合物(例如聚乙二醇(PEG))把病毒颗粒分级分离至一个溶液组分或者沉淀部分，。在脱盐的测试中发现，AAV和AdV的病毒颗粒能够在一个两相系统(包括Na-HPO4/PEG或K-PO4/PEG)中分级分离，或者用有机溶剂(例如丙酮和异丙醇)沉淀下来。但是，这些方法使得病毒感染率下降(数据未示出)。采用PEG3000至PEG 10000的PEG的测试显示出这两种病毒可以有效地从高盐溶液中分级分离至沉淀(数据未显示)。例如在图5小图A和B中所示，PEG8000能够在其相对宽的浓度范围内的沉淀AAV 和AdV病毒颗粒。感染细胞的结果显示，

PEG分级分离得到这两种病毒的极高的回收率(图5小图C),并且由于其对病毒颗粒的选择性沉淀而导致杂质蛋白的进一步去除(图5小图D)。因此可以得出结论,PEG分级分离是一个很好的方法,可以在碱性裂解/盐析沉淀过程之后使病毒颗粒脱盐、富集和进一步得到纯化。重要的是,从PEG分级分离获得的AAV或AdV的病毒溶液已是高质量的病毒制剂,适用于多种研究目的。

[0168] *各种柱层析产出超纯的AAV和AdV病毒颗粒*。

[0169] 虽然从PEG分级分离所得的病毒悬浮溶液具有高的质量且适用于多种研究目的,但是还是做了进一步的努力和探索,以提高病毒颗粒的纯度,从而满足所有的研究目的和/或在临床前或临床试验中应用的要求。一个理想的技术选择是一种类型的柱层析,柱层析是一种操作简单、效果好而且具有可扩展性的技术。我们在测试中发现,不同的柱层析都能够进一步纯化AAV和AdV病毒颗粒,包括基于二氧化硅的层析柱、树脂和离子交换层析柱(数据未示出)。如在图6中所示的例子显示,一种类型的阳离子交换柱用于纯化从如图3中所描述的碱性裂解/盐析沉淀提取的病毒溶液中的AAV或AdV颗粒(图6小图A),而基于二氧化硅的层析柱用于纯化如图5中所描述的PEG沉淀的病毒悬浮液中的AAV或AdV颗粒(图6小图B)。经浓缩从这些层析柱洗脱的病毒溶液之后,浓缩的病毒溶液用qPCR滴定,,滴定的结果显示AAV溶液有约10^{13} GC/ml的高滴度,而AdV溶液有高于10^{13} GC/ml的滴度(图6小图C)。

[0170] 我们在此所说的纯化AAV和AdV病毒颗粒的整个过程包含3个连续的去除蛋白杂质的步骤。细胞经碱性裂解后,采用高盐溶液进行的盐析沉淀是第一个步骤,可以去除大量的的宿主细胞蛋白,达约80-90%(图7小图A和B);PEG分级分离是第二个步骤,进一步去除伴随病毒颗粒的杂质蛋白,大概为余下杂质的70-80%(图7小图A和B)。层析纯化是最后的一个步骤,可以去除残留的污染蛋白并且确定病毒溶液的超纯度(图7小图C和D),再经离心过滤器进行浓缩后产出最终的高滴度病毒溶液(图7小图E-G)。这一新的操作程序用于这两种病毒纯化的特征在于超高的纯度(接近100%病毒颗粒)(图7小图C、D和G)、高回收率(>90%)(图7小图E)和高滴度(高达10^{10} TU/ml)(图7小图F)。

[0171] *本方法用于产出高纯度的AAV溶液展现出出无与伦比的优势*。

[0172] 作为例子的比较性研究,阐明了我们新的方法相对于已有商业产品的优势。从当前市场找到的三种AAV纯化试剂盒,分别标记为试剂盒A、试剂盒B和试剂盒C,它们购自于不同的公司。这些试剂盒按照各自产品的说明书(protocols),从包装有AAV的细胞中纯化AAV,并与我们上述的新的方法(标记为C&M)进行比较。图8显示经纯化的病毒溶液的感染细胞结果和蛋白测定结果,首先我们发现,C&M纯化的病毒溶液显示出高得多的感染率(小图A)和 >90%病毒回收率,然而试剂盒A、B和C纯化的病毒的回收率仅分别为28%、6%、4%(小图B);C&M纯化的病毒溶液的滴度接近10^{10} TU/ml,是各商业试剂盒纯化的病毒溶液的滴度的3-12倍(小图C),而且后者比前者含有多得多的杂质蛋白(小图D和E)。用每pg蛋白的病毒转导单元(TU)来评估病毒纯度,C&M纯化的病毒溶液显示出149.81 ± 4.60 TU/pg蛋白,该纯度是各商品试剂盒A-C纯化的病毒溶液的24-68倍(图8小图F)。因此可以得出结论,我们本发明的方法与当前的商业试剂盒相比展现出无与伦比的优势,它可以产出高滴度、高纯度的AAV溶液。

[0173] 总的来说,本研究展示出用于从其包装细胞中纯化AAV或AdV病毒颗粒的新型方法,包括一些重要步骤如下(图9):(1)用碱性溶液进行细胞裂解(细胞裂解液),该碱性溶液

包含具有pH值9.0-11.5的缓冲能力的化合物;(2)在上述细胞裂解液中加入盐析溶液进行的盐析沉淀过程,,以去除大量的宿主细胞蛋白杂质沉淀、保留AAV或AdV病毒颗粒在溶液中(病毒提取物);(3)在上述病毒提取物中加入PEG进行的PEG分级分离,,将病毒颗粒分级分离至沉淀部分并保留蛋白杂质在溶液中,该病毒沉淀可以悬浮于合适的溶液(病毒悬浮液),,由此达到病毒颗粒脱盐、富集和纯化;(4)柱层析采用各种基于二氧化硅的层析柱,以最终纯化上述病毒悬浮液,纯化的病毒溶液经离心过滤器浓缩,得到高滴度、超纯的病毒溶液。更多的是,这种方法操作非常简单而且省时,能够在约3小时内完成,适用于纯化AAV或AdV的所有血清型,也适用于任何其他保留在宿主细胞中的包装病毒种类。在所述方法中的各种溶液都不含有任何有毒化合物或试剂,因此纯化的病毒溶液能够满足大多数的研究目的和/或临床前和临床试验的品质要求。

[0174] 实施例2:病毒纯化试剂盒

[0175] 本实施例测试了一批试剂和材料,它们称作为病毒纯化试剂盒,用于纯化一些病毒颗粒。该实施例阐述了所述试剂盒能够大大地提高病毒纯化的品质和效率。

[0176] 方法和材料

[0177] 从Fisher Scientific购得达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)和细胞培养皿。从Santa Cruz Biotechnology购得6孔和12孔细胞培养板。从Qiagen购得质粒DNA Maxiprep试剂盒。从Life Technologies购得Lipofectamine 2000转导试剂。从Fisher Scientific购得DNA酶I、Maxima Sybr Green qPCR主混合物(2X)、Pierce BCA蛋白测定试剂盒、SDS-PAGE微型凝胶、Amicon Ultra-4离心过滤器和所有化学品。从Agilent Technologies, Inc.购得基于二氧化硅的层析柱。

[0178] *细胞培养*

[0179] HEK293细胞培养在5% CO_2的37°C培养器中,培养基为含有10%胎牛血清(FBS)的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM),每3-5日继代培养。细胞按1:2继代至15-cm培养皿中,进行转导和AAV病毒包装或进行感染、扩增腺病毒。细胞继代至6孔或12孔细胞培养板上,进行细胞感染实验。

[0180] *AAV包装*

[0181] HEK293细胞继代至15-cm培养皿上,第二天使用Lipofectamine 2000转导试剂或磷酸钙沉淀法进行转导。用于AAV包装的质粒DNA包括GFP重组的AAV病毒载体质粒和AAV包装质粒。经过夜培养之后,培养基替换为新鲜的生长培养基,继续培养转导过的细胞两天,然后用离心2000 rpm、5分钟来收集细胞。包装有AAV的细胞立即用于病毒提取或者保存于-80°C直至使用。

[0182] *腺病毒生成和扩增*

[0183] HEK293细胞继代至T75培养瓶里,用GFP重组腺病毒质粒加Lipofectamine 2000进行转导(transfection)。培养一周以生成病毒,然后收集细胞,用3次冻结/解冻提取,然后用离心5000×g、5分钟澄清提取液。随后,在培养于T75培养瓶的HEK293细胞中扩增腺病毒。

[0184] *感染率检测*

[0185] 细胞继代培养至12孔或6孔培养板,培养基为含有5% FBS的DMEM,在每个培养孔中的细胞密度为80-90%,继代培养一天后进行细胞感染实验。感染3-5日后,通过在荧光显微镜之下观察GFP细胞,对其进行拍摄和计数来研究感染性。具体是,在4× 镜头下拍摄照片,

在10×镜头下计数GFP细胞个数。重要的是在10×镜头下,感染后的GFP细胞应能够计数。如果在计数中GFP细胞的数目太多或者太少,则调节病毒溶液的用量来重复细胞感染实验,或者重新制备病毒溶液后重复细胞感染实验。

[0186] *BCA测定*

[0187] 使用二喹啉甲酸测定(BCA测定)法,按BCA蛋白测定试剂盒的说明书(protocol),测定病毒溶液的蛋白量。简单地说,将样品稀释2-10倍,然后在96孔培养板的每孔中加入25 μl样品溶液和200 μl BCA溶液(混合A和B,50:1),然后置培养板于37°C恒温箱中温浴30分钟,再在96孔板读数器(96-well plate reader)上读取562 nm的消光值。将牛血清白蛋白(BSA)10 mg/ml的储备液作系列稀释,然后用于制造标准曲线,根据标准曲线来计算样品的蛋白浓度。

[0188] *SDS-PAGE电泳*

[0189] 用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)直观地显示病毒溶液的蛋白含量。,所有样品都来自于相同的体积的原始细胞悬浮液的量再调节至相同体积,然后加载至10% SDS凝胶上,用140-160伏电泳约1小时,直至溴酚蓝染料到达凝胶的底部。电泳之后,凝胶固定在固定溶液中,其固定溶液含有10% (v/v) 乙酸和50% (v/v) 甲醇,再经考马斯蓝染色溶液染色过夜,考马斯蓝染色溶液含有10% (v/v) 乙酸、0.25% (w/v) 考马斯蓝R-250和50% (v/v) 甲醇。染色后的凝胶在含有50%甲醇和10%乙酸的脱色溶液中进行脱色。在完全脱色之后,将凝胶保持在5% (v/v) 乙酸中,用扫描仪将凝胶扫描成图像。

[0190] 示例性试剂盒的内容物

[0191] 所测试的病毒纯化试剂盒的主要组分包括以下溶液和材料:

[0192] *溶液*

[0193] 细胞悬浮溶液(Cell Suspension Solution):该溶液由以下组成:无血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)或Tris缓冲盐水(TBS)或其他缓冲盐水,pH为5.0-9.0。

[0194] 细胞裂解溶液(Cell Lysis Solution):该溶液由以下组成:50-500mM甘氨酸钠碱性溶液或磷酸钠碱性溶液或CAPS溶液或其他缓冲溶液,pH为9.0-12.0,还含有0.05%-1.0%洗涤剂,其是辛基葡萄糖苷或辛基硫代葡萄糖苷或聚山梨醇酯20(吐温-20)或脱氧胆酸钠(DOC)或十二烷基硫酸钠(SDS)或其他洗涤剂或其组合。

[0195] 第一次分级分离溶液(1st Fractionation Solution):该溶液由以下组成:1.0 M-5.0 M乙酸钠或乙酸钾或磷酸钠或氯化钠或其他盐溶液,pH为3.0-10.0。

[0196] 第二次分级分离溶液(2nd Fractionation Solution):该溶液由以下组成:约5%至约12%的平均分子量为约1500至约10000的聚乙二醇,还含有硫酸钠或氯化钠或乙酸钠或乙酸钾或磷酸钠或其他盐溶液,浓度为0.1-2.0 M。

[0197] 沉淀悬浮溶液(Pellet Suspension Solution):该溶液由以下组成:无血清的DMEM培养基或磷酸盐缓冲盐水(PBS)或Tris缓冲盐水(TBS)或其他缓冲盐水,pH为5.0-9.0。

[0198] 柱平衡溶液(Column Equilibration Solution):该溶液由以下组成:20-100 mM乙酸钠或乙酸钾或磷酸钠或磷酸钾或甘氨酸钠或Tris缓冲液或MOPS缓冲液,pH为4.0-10.0,还含有50-200 mM氯化钠或其他盐、含有5-40%甲醇或异丙醇或乙醇或其他有机溶剂。

[0199] 柱洗涤溶液(Column Washing Solution):该溶液由以下组成:20-200mM乙酸钠或

乙酸钾或磷酸钠或磷酸钾或甘氨酸钠或Tris缓冲液或MOPS缓冲液，pH为4.0-10.0，还含有50-500 mM氯化钠或其他盐、含有5-20%甲醇或异丙醇或乙醇或其他有机溶剂。

[0200] 柱洗脱溶液(Column Elution Solution)：该溶液由以下组成：20-200mM乙酸钠或乙酸钾或磷酸钠或磷酸钾或甘氨酸钠或Tris缓冲液或MOPS缓冲液，pH为4.0-10.0，还含有50-2000 mM氯化钠或其他盐。

[0201] *材料*

[0202] 固相层析柱(Solid phase chromatography columns)：所述试剂盒包含一次病毒纯化用一个的层析柱。层析柱填充有介质材料，例如二氧化硅(silica)或基于二氧化硅的离子交换介质(silica-based ion exchange media)或其他介质。填充柱的特征有高稳定性、高重复性和易于使用。

[0203] 离心过滤器或其他浓缩套件(Centrifugal filters or other concentration sets)：所述试剂盒包含一次病毒纯化用一个的离心过滤器或者其他浓缩套件。例如，所述离心过滤器可以有效地减少从上述层析柱洗脱的病毒溶液的体积并改变其缓冲溶液，得到合适的高滴度病毒溶液。

[0204] 其他辅助材料(Other supportive materials)：层析柱的辅助套件包括层析柱顶部的适配器(adapters)和注射器，用以给柱上部施加压力、让溶液通过层析柱流出；或者是用真空连接套件作辅助套件，连接至层析柱底部的尖端，用以在柱下部施加负压，让溶液通过层析柱流出。此外，在产品试剂盒里可能包含不同大小的实验室用试剂管，如1.5 ml微量管(microtubes)、15 ml离心管或50 ml离心管或其他试剂管。

[0205] 示例性的试剂盒使用方法

[0206] 所述病毒纯化试剂盒的操作程序(procedure)简单、高效，适用于从其包装细胞中纯化AAV、腺病毒或其他病毒。以下描述的是一些示例性的主要步骤：

[0207] 收集和重新悬浮病毒包装细胞(Collection and resuspension of the virus-packaged cells)：通过轻轻地移液培养基将病毒包装细胞悬浮，再把细胞悬浮液转移至离心管，并离心收集细胞。细胞沉淀物(cell pellets)重新悬浮于细胞悬浮溶液中。

[0208] 细胞裂解(Cell lysis)：在上述细胞悬浮液中加入裂解溶液，混匀并在室温下静置数分钟以完全裂解细胞。

[0209] 第一次分级分离(First fractionation)：在上述细胞裂解液中加入第一次分级分离溶液，将混合物完全混匀，再高速离心并保存上清病毒液。

[0210] 第二次分级分离(Second fractionation)：在上述上清病毒液中加入第二次分级分离溶液，完全混匀，在4°C或冰上静置该混合物数分钟，然后将混合物高速离心并保存病毒沉淀物，病毒沉淀物悬浮于沉淀悬浮溶液中。

[0211] 柱层析(Column chromatography)：固相层析柱使用快捷所述层析采用标准程序来进行，如上所述，这一程序包括用平衡溶液平衡(equilibration)、上样病毒样品(sampling)、用洗涤溶液洗涤(washing)、以及用洗脱溶液洗脱(elution)。简单地说，在用平衡溶液平衡层析柱之后，将第一次分级分离后的病毒上清液或者第二次分级分离后的病毒悬浮液上样到层析柱上，用洗涤溶液充分洗涤，再用洗脱溶液洗脱出病毒颗粒。上述的柱层析可以几分钟内完成。

[0212] 浓缩和缓冲液变更(Concentration and buffer changing)：上述柱层析后的病

毒洗脱液转移至离心过滤器(或其他浓缩套件),在台式离心机上离心以减小病毒溶液的体积,重复离心3次,每次都检查病毒体积,并在离心过滤器中补加所需的缓冲液。最后离心直至离心过滤器中剩余的溶液达到所需的体积,转移这余留的溶液至新的试剂管,这余留的溶液就是制备的病毒溶液。保存或分装后再保存制备的病毒溶液在-80°C冷冻柜里直至使用。

[0213] 试剂盒测试结果

[0214] *裂解溶液有效地从其包装细胞中释放出AAV和腺病毒的病毒颗粒*

[0215] 裂解溶液用作裂解两种病毒的包装细胞。与经冻结/解冻的提取液相比,细胞裂解后在细胞裂解物中的病毒都具有高感染率,无论AAV(图10小图A)还是腺病毒(图10小图B)。细胞感染数据的统计分析也显示,与经冻结/解冻的提取液相比,细胞裂解产生的病毒溶液具有更高的感染性(图10小图C)。这些数据显示用于所述产品中的细胞裂解比冻结/解冻提取能更有效地从其包装细胞中释放病毒颗粒。冻结/解冻提取是一种提取AAV和腺病毒的常用方法,这种提取方法是一个长过程,要花1小时以上,包括3-4个回合的冻结和解冻还有离心澄清。比较而言,所述试剂盒的裂解步骤仅用1-2分钟,而且更容易。

[0216] *第一次分级分离溶液有效地分级分离出大量的蛋白杂质至沉淀部分并保留AAV和腺病毒在溶液中*

[0217] 上面步骤的细胞裂解物用第一次分级分离溶液进行第一次分级分离。这一步骤有效地通过变性沉淀去除大量的蛋白杂质并保留病毒颗粒在溶液中。随着所述细胞裂解物中加入第一次分级分离溶液,大部分的宿主细胞蛋白变性而沉淀。溶液和沉淀这两个部分通过离心分离,保存上清液用于细胞感染以观察病毒活性。与冻结/解冻的提取液相比较,所述上清液更大程度地保持了AAV(图11小图A)和腺病毒(图11小图B)的病毒感染率。进一步的感染数据分析显示,两种病毒保留在来自第一次分级分离的上清液中的感染率比冻结/解冻的提取液中的更高(图11小图C)。上述上清液的蛋白含量作了与冻结/解冻的提取溶液的比较分析。SDS电泳(图12小图A)的结果和BCA测定(图12小图B)的结果一致,显示出在上清病毒液中的蛋白含量显著减少,多达80%的蛋白杂质被去除。因此,该实施例证明,第一次分级分离溶液一方面能够将大部分蛋白杂质移除至沉淀,并且另一方面能够有效地保持病毒颗粒在溶液中。

[0218] *第二次分级分离溶液有效地收集AAV或腺病毒颗粒至沉淀部分并遗留蛋白杂质在溶液中*

[0219] 第二次分级分离溶液旨在从上述上清液中收集病毒颗粒,然后悬浮在所需的溶液中以便进行柱层析。随着第二次分级分离,病毒沉淀物重新悬浮于所述的沉淀悬浮溶液中,然后用于细胞感染测试。细胞感染的观察结果,本试剂盒产品所用的第二次分级分离溶液有效地从第一次分级分离后的上清病毒液中回收AAV(图13小图A)和腺病毒颗粒(图13小图B),而仅有小部分的病毒颗粒残留在这第二次上清液中(约5-10%(图13小图C))。进而证明,第二次分级分离选择性地将病毒颗粒收集至沉淀部分而将蛋白杂质遗留在溶液中,因此病毒颗粒得到进一步地纯化(图14)。

[0220] 值得注意的是,从第二次分级分离中得到的病毒悬浮液已经具有高的纯度,因为细胞裂解液中的>90%蛋白杂质被去除(图14)。这种纯度的病毒溶液适用于多种采用培养细胞的实验目的,特别是用AAV介导的基因表达和功能的快速验证和测试或大规模筛选。

[0221] *所述产品中使用的固相层析柱快速地产出AAV和腺病毒的超纯病毒颗粒*

[0222] 本发明在病毒纯化试剂盒的产品中还有固相层析柱，例如基于二氧化硅的层析柱和离子交换层析柱或其他固相层析柱和离子交换层析柱。以图15所示的例子显示出，用这些层析柱可以得到高的病毒回收率。首先，几种类型的市售层析柱经测试，可以从第一次分级分离的上清液中回收AAV病毒颗粒(图15小图A，上部，柱1)，也可从第二次分级分离的病毒悬浮液中回收AAV病毒颗粒(图15小图A，中部和下部；柱2和3)。这些不同类型的固相层析柱在AAV纯化中显示出相似的效果，都能够滞留病毒颗粒在层析柱上、随后有效地用洗脱溶液把病毒颗粒从层析柱上洗脱下来。上述病毒洗脱液的细胞感染率的观察结果显示，所述柱层析的病毒回收率很高，达约90%(图15小图A)。这些层析柱用于腺病毒纯化得到了相似的结果，以用柱层析纯化第二次分级分离的病毒悬浮液作为范例其结果如图15小图B中所示。

[0223] 从层析柱得到的病毒洗脱液经离心过滤器浓缩可以获得高滴度的病毒溶液，随后用SDS电泳和BCA测定来测定经浓缩后的病毒溶液的纯度。SDS电泳凝胶的图像显示，使用层析柱2和3纯化第二次分级分离的病毒悬浮液所得的病毒溶液，经浓缩后显示出三个清晰的AAV衣壳蛋白，没有其他杂质；而使用层析柱1纯化第一次分级分离的上清病毒液所得的病毒溶液，经浓缩后显示其中还有一些杂质(图16小图A左边)。图16小图A右边展示了纯净的腺病毒溶液，它是用层析柱2纯化第二次分级分离的病毒悬浮液的病毒溶液。对从层析柱2获得的洗脱液进行BCA测定，结果表明了在所述两种病毒的纯化中柱层析的效果(图16小图B)，即柱层析产出超纯的病毒溶液(图16)。

[0224] *与商业病毒纯化试剂盒的比较*

[0225] 本发明所述的试剂盒与市售AAV纯化产品进行比较实验。这里使用了三种商业产品，分别标记为试剂盒A、试剂盒B和试剂盒C。本发明研发的试剂盒标记为“新技术”。

[0226] 包装有AAV的细胞分作等分体积，分别用于一个试剂盒平行地纯化AAV病毒，所得到的病毒溶液再用于感染细胞和蛋白分析。图17小图A和B展示出细胞感染的结果，表明每个产品用于纯化AAV病毒的效果。与三种商业试剂盒相比，本发明的试剂盒能回收更多的病毒颗粒，病毒回收率高出约4-9倍(图17小图B)。用SDS电泳分析，凝胶图像显示出用商业试剂盒A-C纯化的病毒溶液含有大量杂质，而用所述新式试剂盒纯化的病毒溶液基本不含杂质，在凝胶图像上仅显示出三种AAV衣壳蛋白(图17小图C)。进一步的BCA测定证实，用商业试剂盒纯化的病毒溶液含有高得多蛋白量(图17小图D)。所有这些结果证明，所述新式试剂盒与当前的商业产品比较显示出无与伦比的优势，只有所述新式试剂盒能产出高滴度、高纯度的AAV病毒溶液。

[0227] 以为例证，图18概述了本发明的试剂盒或包装。它们提供一个简单且高效的工具，可以用于纯化AAV、腺病毒和其他“裸露”病毒。

[0228] * * *

[0229] 除非另有定义，否则在本文中使用的所有技术和科学术语，都具有与本领域一般技术人员所通常理解的相同的含义。

[0230] 本文中所描述的发明可以在缺少在此没有具体公开的任何元素或限定的情况下实施。因此，例如，术语“包括”、“包含”、“含有”等，应该被宽泛地理解且没有限制。此外，在此使用的术语和表达已经被用作描述性的术语而非限制性术语，并且在这些术语和表达的

使用中没有旨在排除所示和所描述的特征的任何等价物或其部分，而应该认识的是，在本发明权利要求的范围之内各种修改都是可能的。

[0231] 因此，应该理解的是，虽然本发明已经具体地公开了由优选的实施方式和任选的特征，但是本领域技术人员可能进行各种修改、改进和改变所述发明在此公开的实施方式，而这样些的修改、改进和改变都被认为属于在本发明的范围之内。在此提供的材料、方法和实施范例代表着优选的实施方式，属于示例性的，而非旨在对本发明的范围进行限制。

[0232] 本发明在此广泛和笼统地进行了描述。在本发明的通用范围之内，变成为每个较窄的种类和亚属的组分都属于本发明的一部分。这包括在本发明的通用描述中从所属范畴去除的所有题材的附带条件或负面限制，不管去除的题材是否在此具体地描述过。

[0233] 此外，本发明的特征或者环节采用马库什组织(Markush groups)的术语进行描述，但本领域技术人员也将认识到，本发明进而也采用马库什组织的任何单个成员或成员的亚组的术语进行描述。

[0234] 在此提及的所有出版物、专利申请、专利、以及其他引用文献，其全文都明确地以引用的方式并入本文中，在某种程度上如同每个都单独地通过引用而并入本文中。如发生冲突，以本发明的这份文本的规范(包括定义)为准。

[0235] 应该理解的是，本发明虽然已经结合上述实施方式作了描述，但是前述说明和实施范例旨在进行说明，而非限制本发明的范围。另外要说明的是，，本发明范围内的优点和修改对于本领域技术人员来言将是显而易见的。

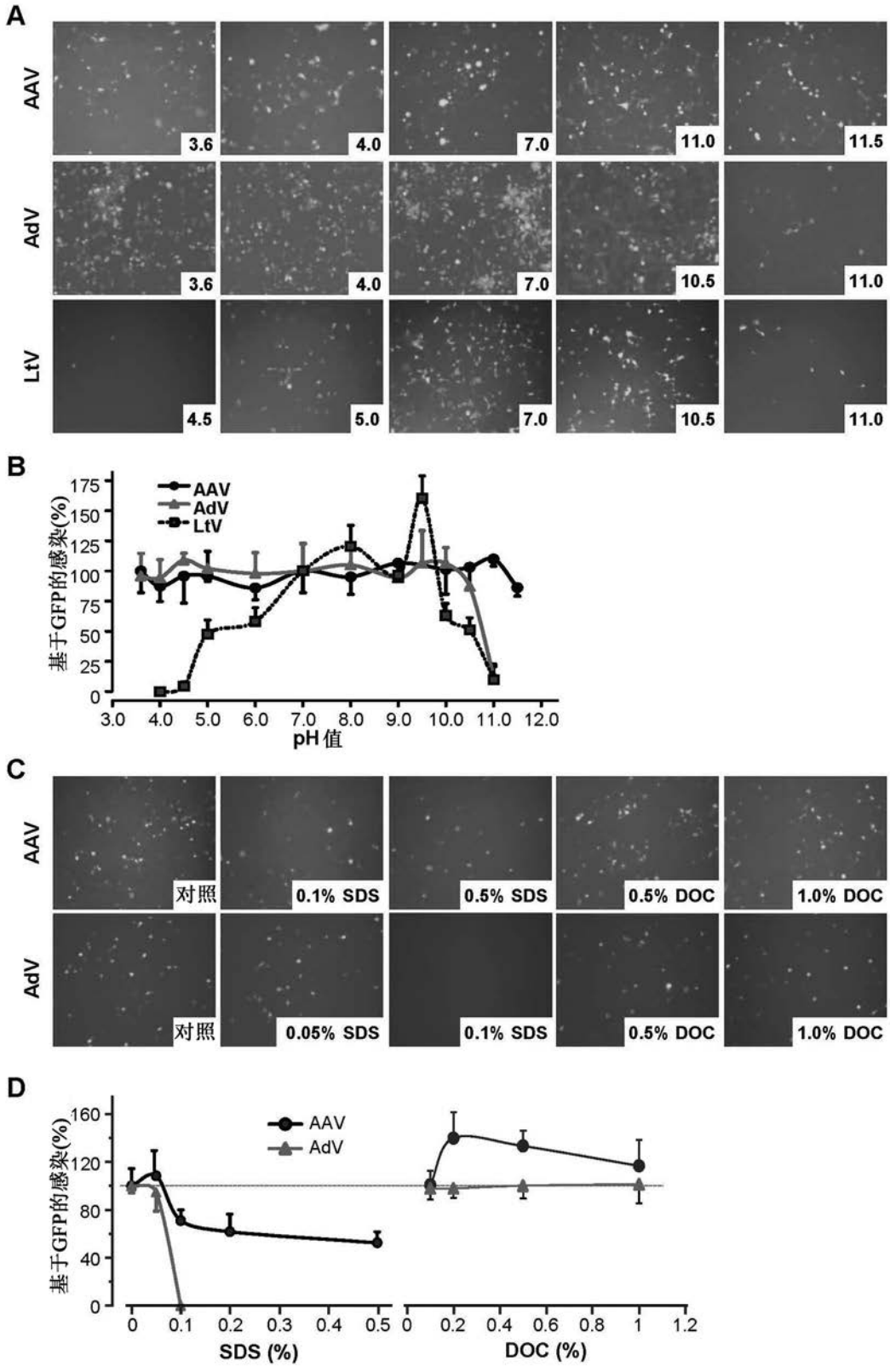

A
AAV
AdV
LtV
3.6
4.0
7.0
11.0
11.5
3.6
4.0
7.0
10.5
11.0
4.5
5.0
7.0
10.5
11.0
B
基于GFP的感染(%)
AAV
AdV
LtV
pH值
C
AAV
AdV
对照
0.1% SDS
0.5% SDS
0.5% DOC
1.0% DOC
对照
0.05% SDS
0.1% SDS
0.5% DOC
1.0% DOC
D
基于GFP的感染(%)
AAV
AdV
SDS (%)
DOC (%)

图1

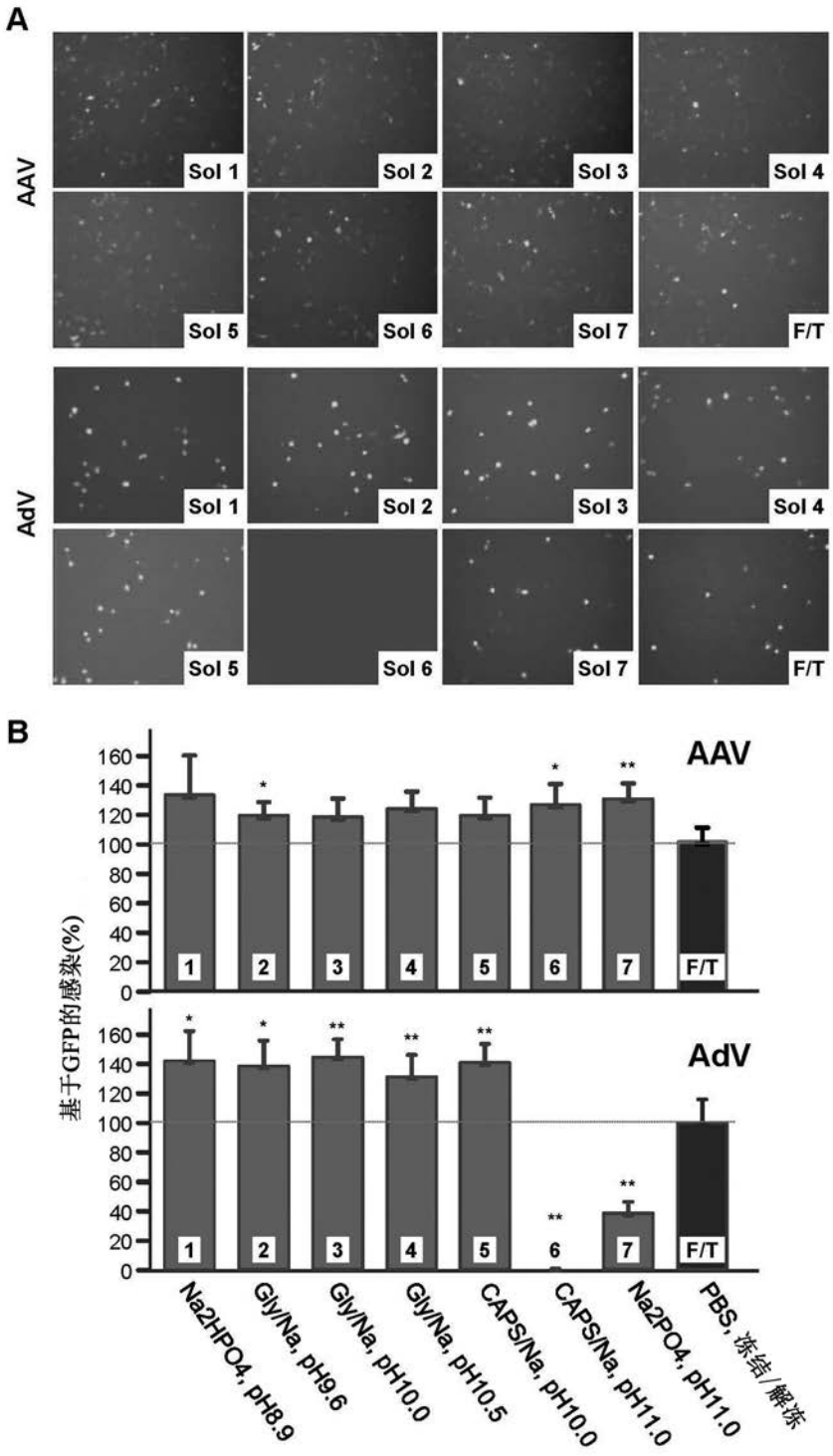

A
AAV
Sol 1
Sol 2
Sol 3
Sol 4
Sol 5
Sol 6
Sol 7
F/T
AdV
Sol 1
Sol 2
Sol 3
Sol 4
Sol 5
Sol 6
Sol 7
F/T
B
基于GFP的感染(%)
AAV
AdV
1
2
3
4
5
6
7
F/T
Na2HPO4, pH8.9
Gly/Na, pH9.6
Gly/Na, pH10.0
Gly/Na, pH10.5
CAPS/Na, pH10.0
CAPS/Na, pH11.0
Na2PO4, pH11.0
PBS, 冻结/解冻

图2

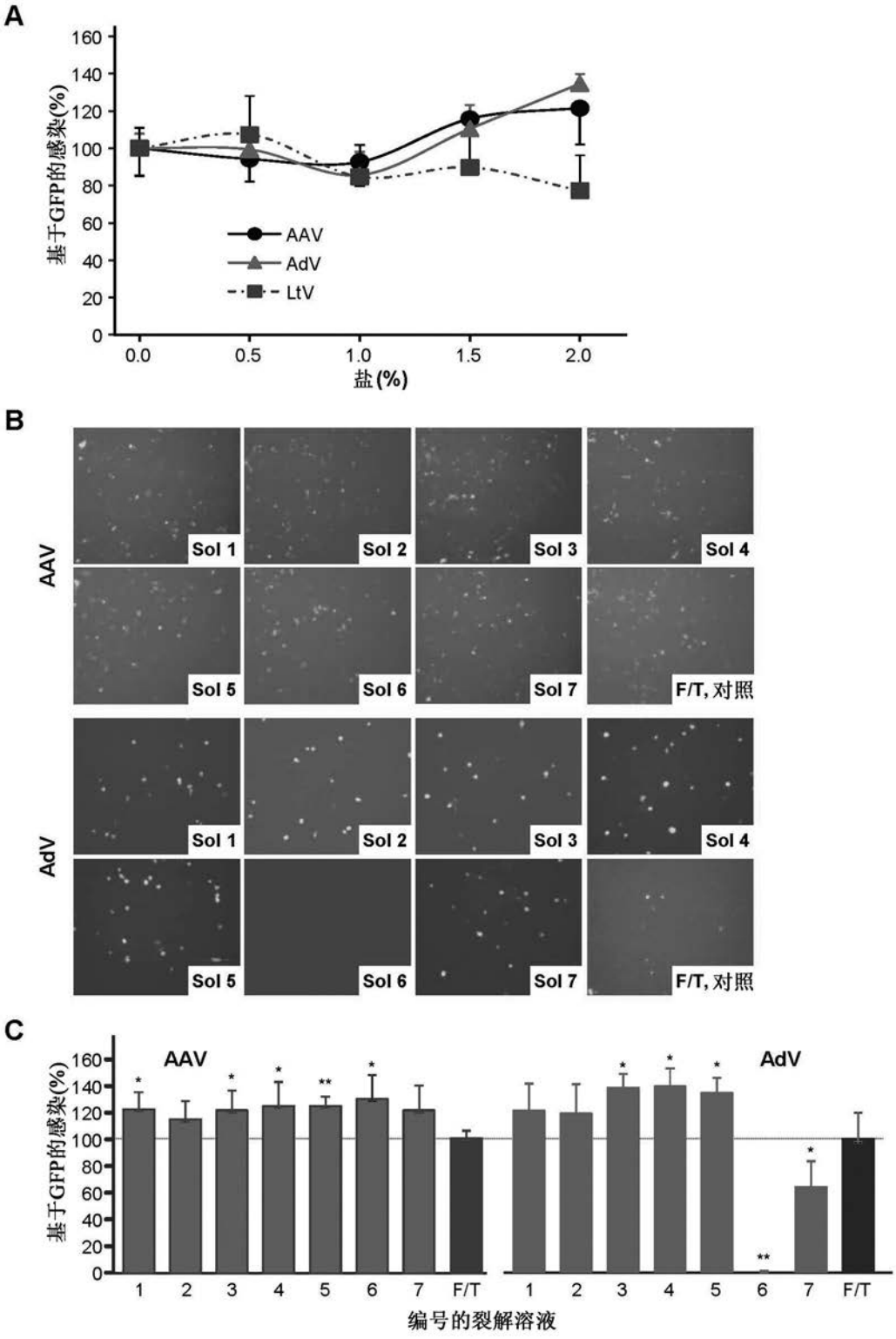

A
基于GFP的感染(%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
AAV
AdV
LtV
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
盐(%)
B
AAV
Sol 1
Sol 2
Sol 3
Sol 4
Sol 5
Sol 6
Sol 7
F/T, 对照
AdV
Sol 1
Sol 2
Sol 3
Sol 4
Sol 5
Sol 6
Sol 7
F/T, 对照
C
基于GFP的感染(%)
AAV
AdV
1 2 3 4 5 6 7 F/T 1 2 3 4 5 6 7 F/T
编号的裂解溶液

图3

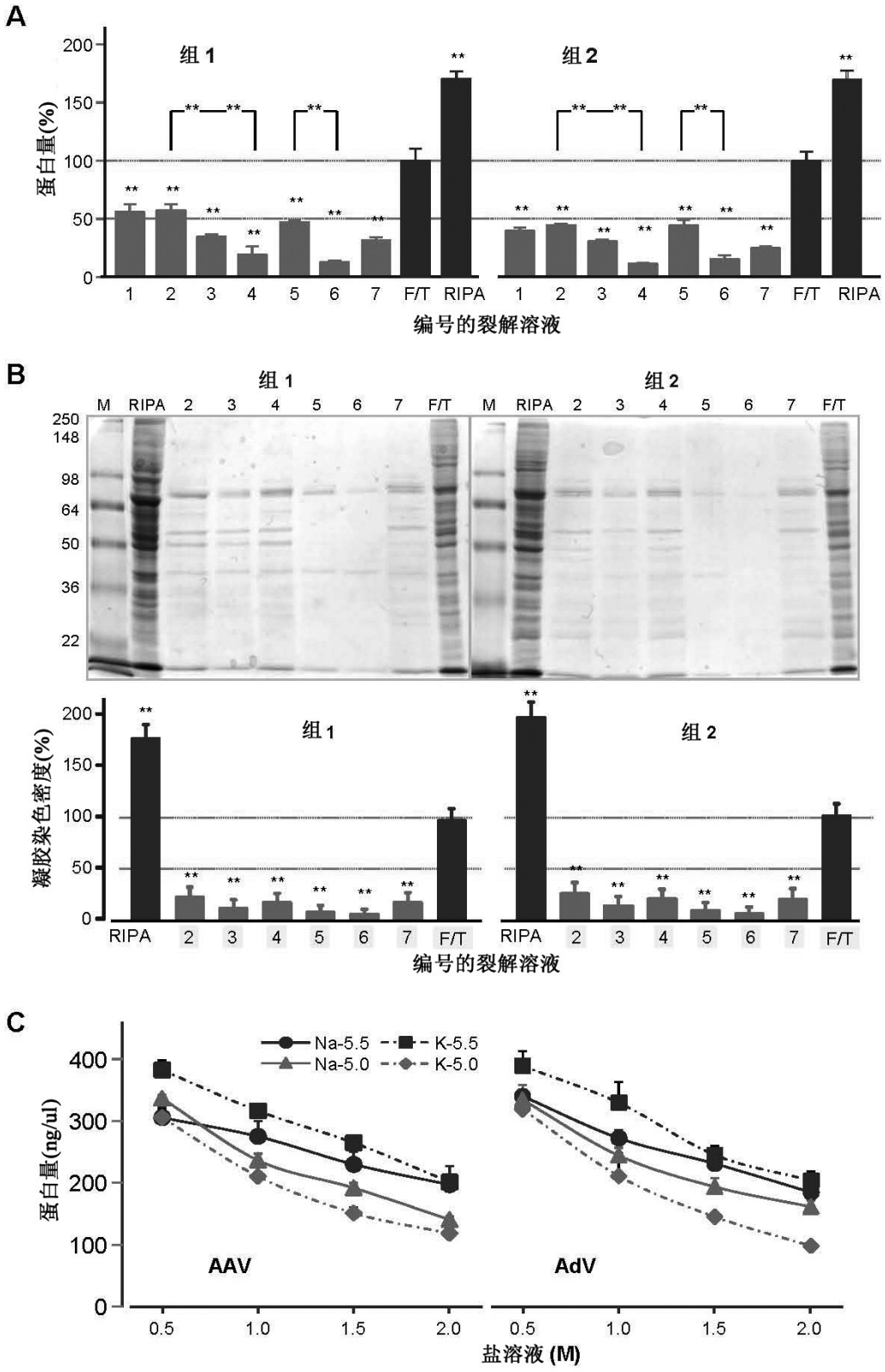

A
组1
组2
蛋白量(%)
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 F/T RIPA 1 2 3 4 5 6 7 F/T RIPA
编号的裂解溶液
B
组1
组2
M RIPA 2 3 4 5 6 7 F/T M RIPA 2 3 4 5 6 7 F/T
250
148
98
64
50
36
22
凝胶染色密度(%)
组1
组2
RIPA 2 3 4 5 6 7 F/T RIPA 2 3 4 5 6 7 F/T
编号的裂解溶液
C
Na-5.5
K-5.5
Na-5.0
K-5.0
蛋白量(ng/ul)
400
300
200
100
0
AAV
AdV
0.5 1.0 1.5 2.0 0.5 1.0 1.5 2.0
盐溶液 (M)

图4

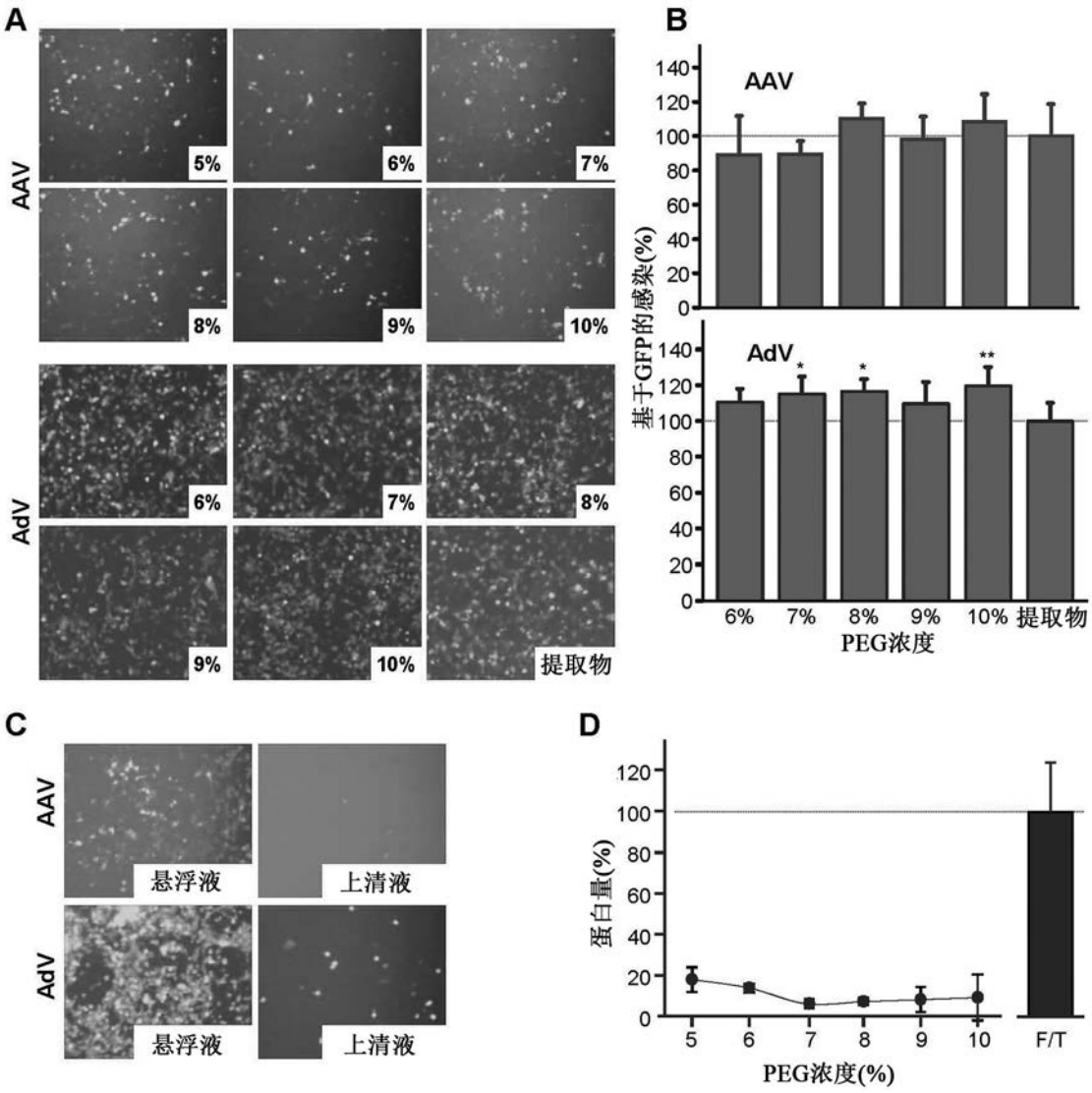

A
AAV
5%
6%
7%
8%
9%
10%
AdV
6%
7%
8%
9%
10%
提取物
B
AAV
AdV
基于GFP的感染(%)
6%
7%
8%
9%
10%
提取物
PEG浓度
C
AAV
悬浮液
上清液
AdV
悬浮液
上清液
D
蛋白量(%)
PEG浓度(%)
F/T

图5

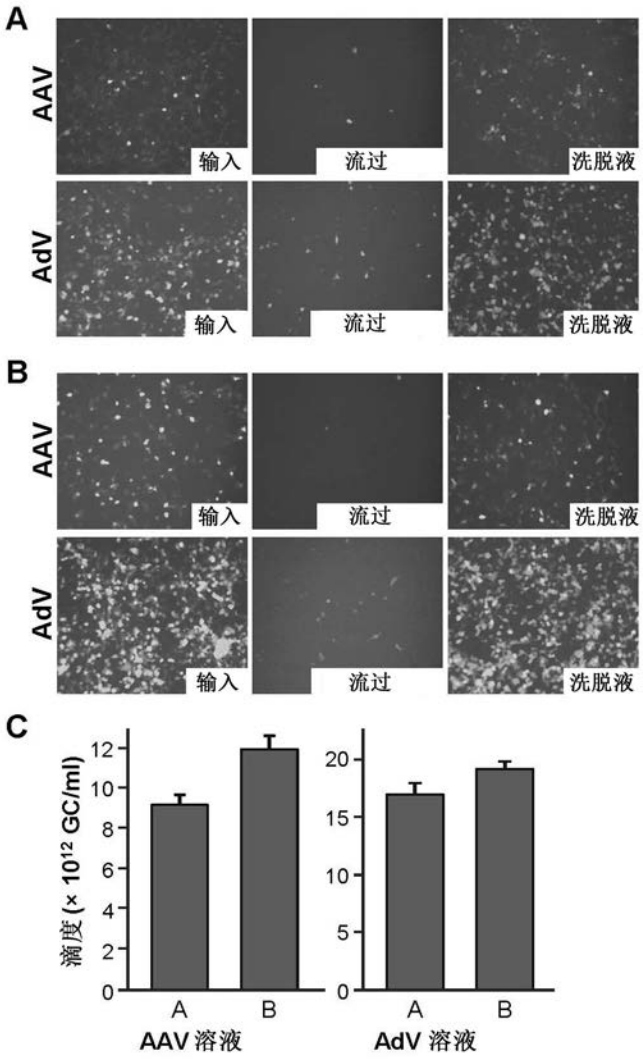

A
AAV
输入
流过
洗脱液
AdV
输入
流过
洗脱液
B
AAV
输入
流过
洗脱液
AdV
输入
流过
洗脱液
C
滴度 (× 10¹² GC/ml)
0
2
4
6
8
10
12
A
B
AAV 溶液
0
5
10
15
20
A
B
AdV 溶液

图6

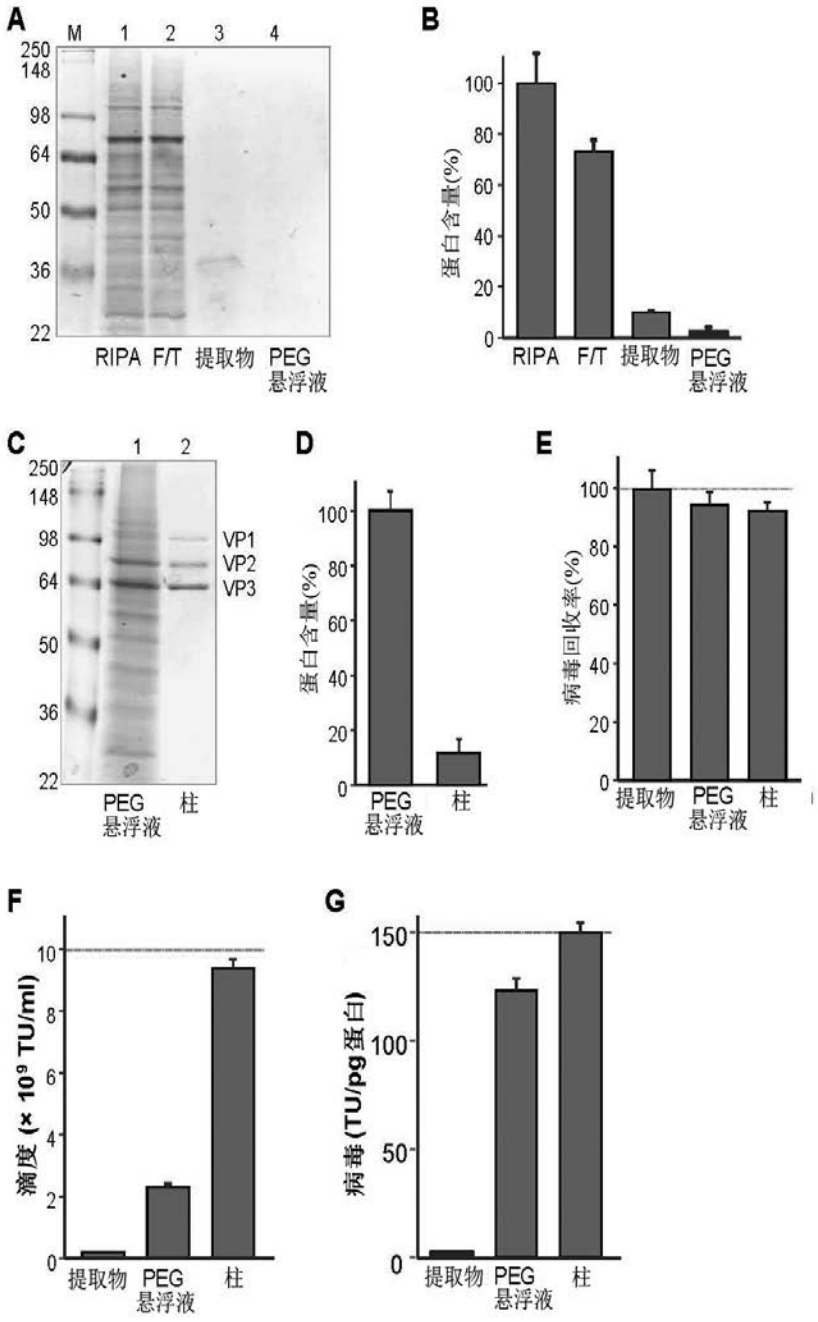

A
M 1 2 3 4
250
148
98
64
50
36
22
RIPA F/T 提取物 PEG 悬浮液
B
蛋白含量(%)
100
80
60
40
20
0
RIPA F/T 提取物 PEG 悬浮液
C
1 2
250
148
98
64
50
36
22
VP1
VP2
VP3
PEG 悬浮液 柱
D
蛋白含量(%)
100
80
60
40
20
0
PEG 悬浮液 柱
E
病毒回收率(%)
100
80
60
40
20
0
提取物 PEG 悬浮液 柱
F
滴度 (× 10⁹ TU/ml)
10
8
6
4
2
0
提取物 PEG 悬浮液 柱
G
病毒(TU/pg蛋白)
150
100
50
0
提取物 PEG 悬浮液 柱

图7

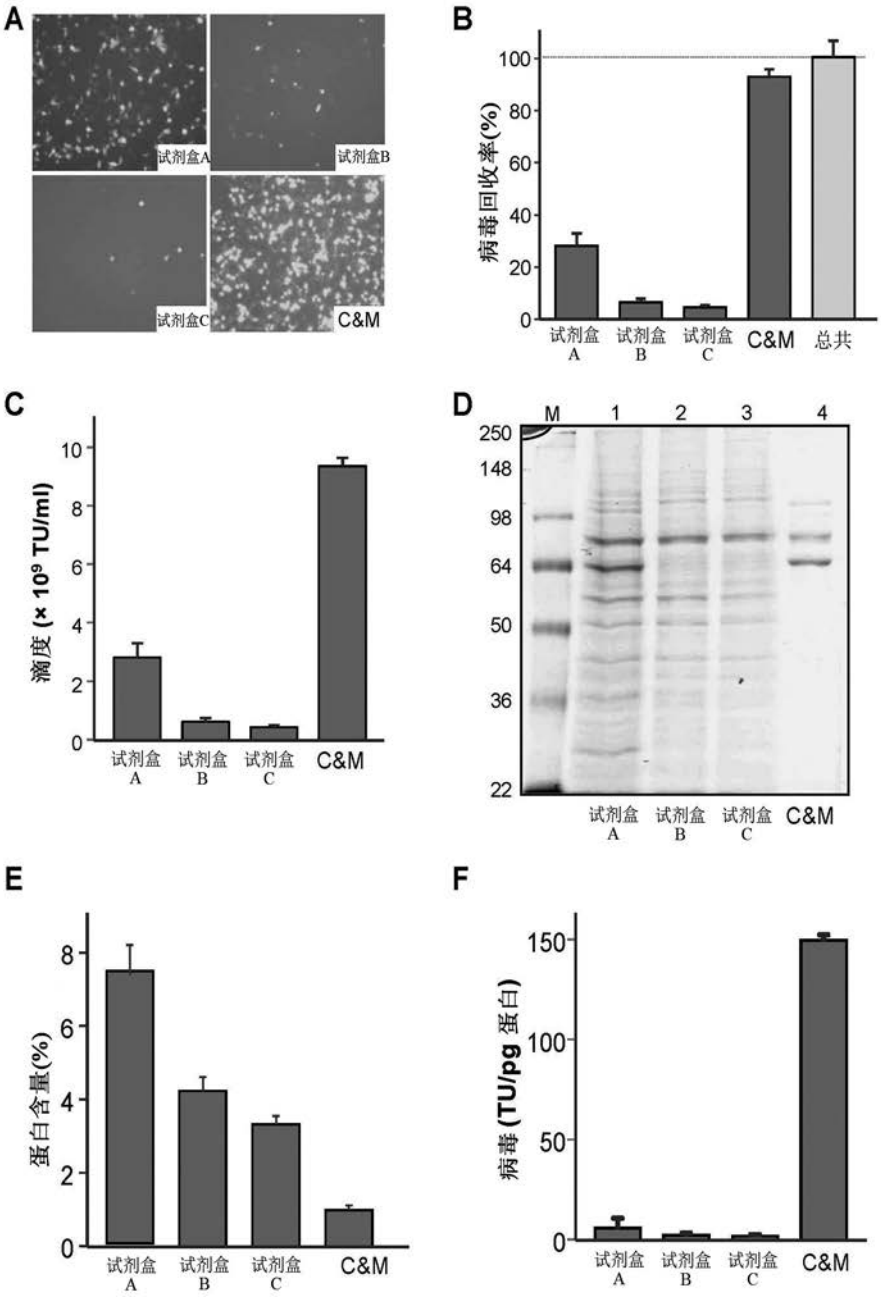

A
试剂盒A
试剂盒B
试剂盒C
C&M
B
病毒回收率(%)
100
80
60
40
20
0
试剂盒A
试剂盒B
试剂盒C
C&M
总共
C
滴度 (× 10⁹ TU/ml)
10
8
6
4
2
0
试剂盒A
试剂盒B
试剂盒C
C&M
D
M
1
2
3
4
250
148
98
64
50
36
22
试剂盒A
试剂盒B
试剂盒C
C&M
E
蛋白含量(%)
8
6
4
2
0
试剂盒A
试剂盒B
试剂盒C
C&M
F
病毒 (TU/pg 蛋白)
150
100
50
0
试剂盒A
试剂盒B
试剂盒C
C&M

图8

新技术的示意图

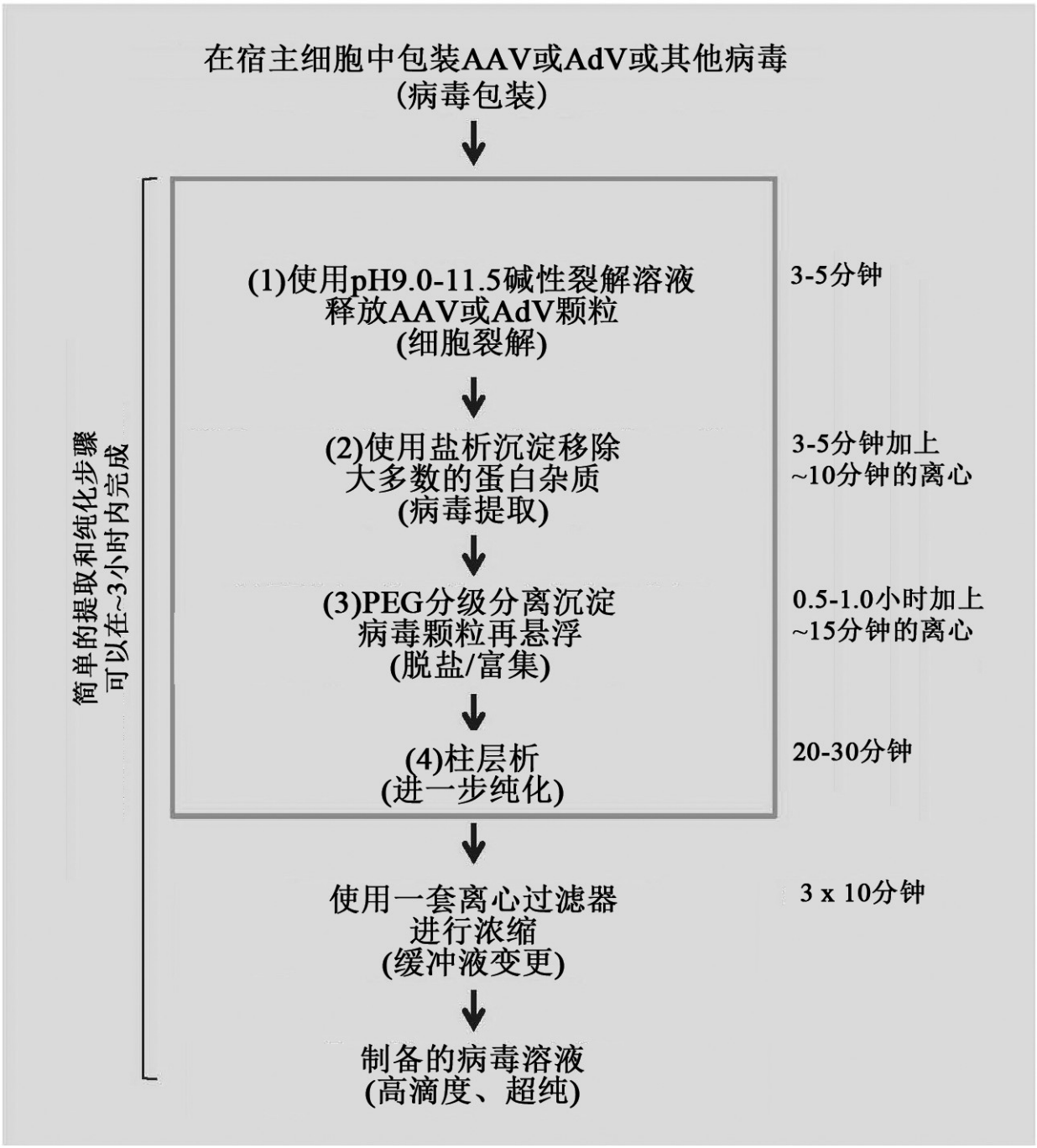

在宿主细胞中包装AAV或AdV或其他病毒
(病毒包装)
(1)使用pH9.0-11.5碱性裂解溶液
释放AAV或AdV颗粒
(细胞裂解)
3-5分钟
(2)使用盐析沉淀移除
大多数的蛋白杂质
(病毒提取)
3-5分钟加上
~10分钟的离心
(3)PEG分级分离沉淀
病毒颗粒再悬浮
(脱盐/富集)
0.5-1.0小时加上
~15分钟的离心
(4)柱层析
(进一步纯化)
20-30分钟
使用一套离心过滤器
进行浓缩
(缓冲液变更)
3 x 10分钟
制备的病毒溶液
(高滴度、超纯)
简单的提取和纯化步骤
可以在~3小时内完成

图9

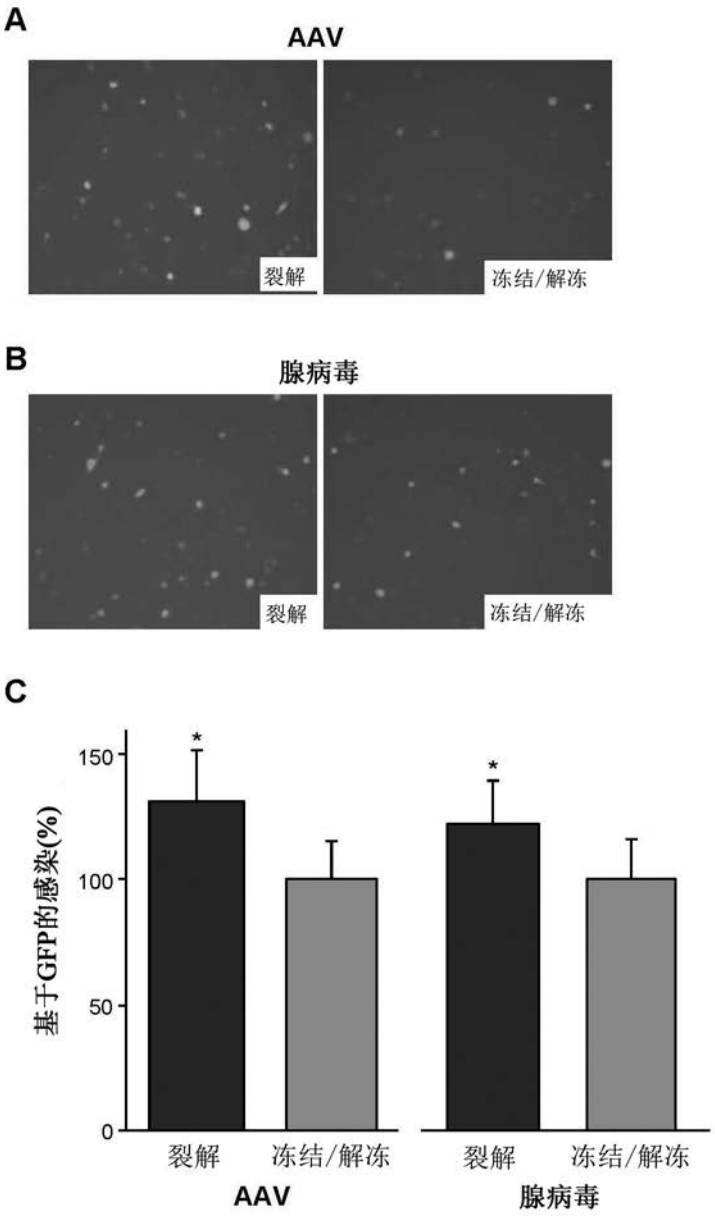

A
AAV
裂解
冻结/解冻
B
腺病毒
裂解
冻结/解冻
C
基于GFP的感染(%)
150
100
50
0
*
*
裂解
冻结/解冻
裂解
冻结/解冻
AAV
腺病毒

图10

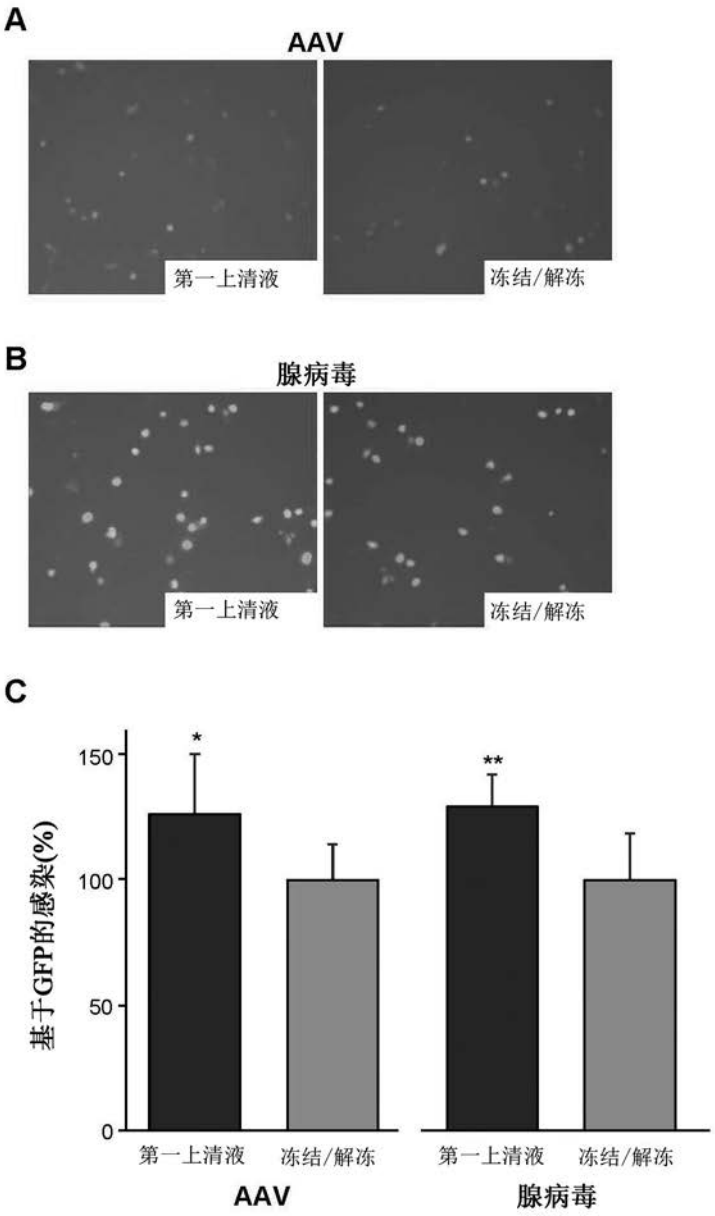

A
AAV
第一上清液
冻结/解冻
B
腺病毒
第一上清液
冻结/解冻
C
基于GFP的感染(%)
150
100
50
0
*
**
第一上清液
冻结/解冻
第一上清液
冻结/解冻
AAV
腺病毒

图11

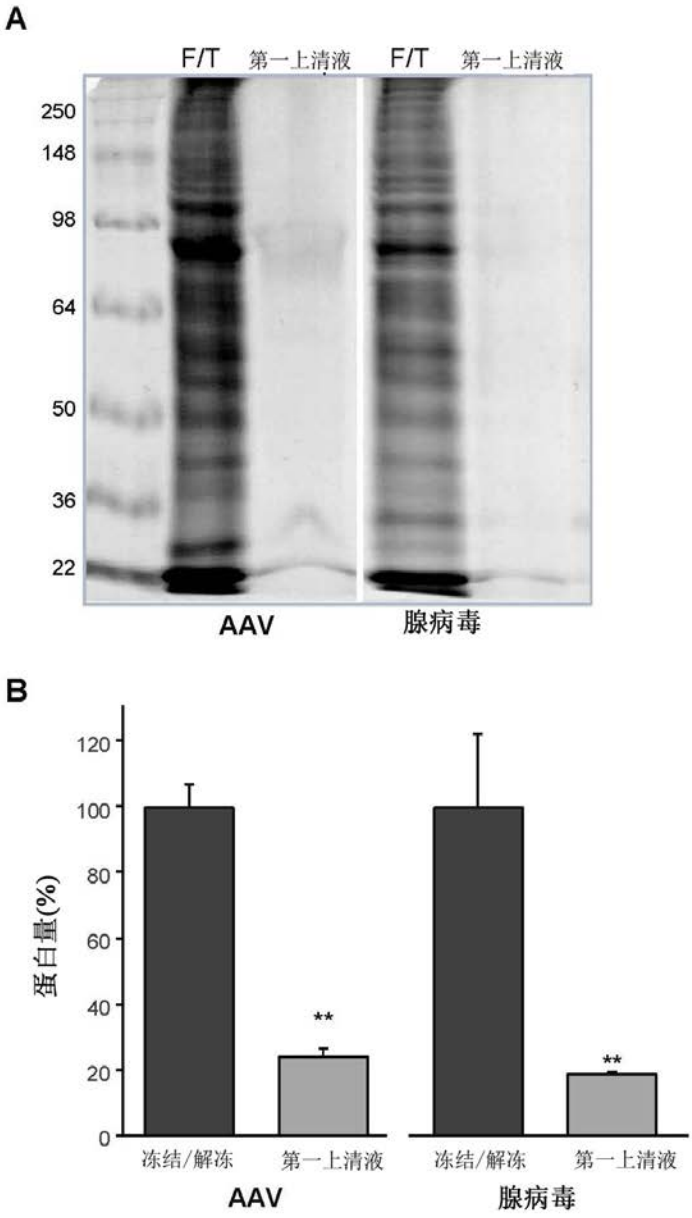

A
F/T
第一上清液
F/T
第一上清液
250
148
98
64
50
36
22
AAV
腺病毒
B
蛋白量(%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
冻结/解冻
第一上清液
冻结/解冻
第一上清液
AAV
腺病毒

图12

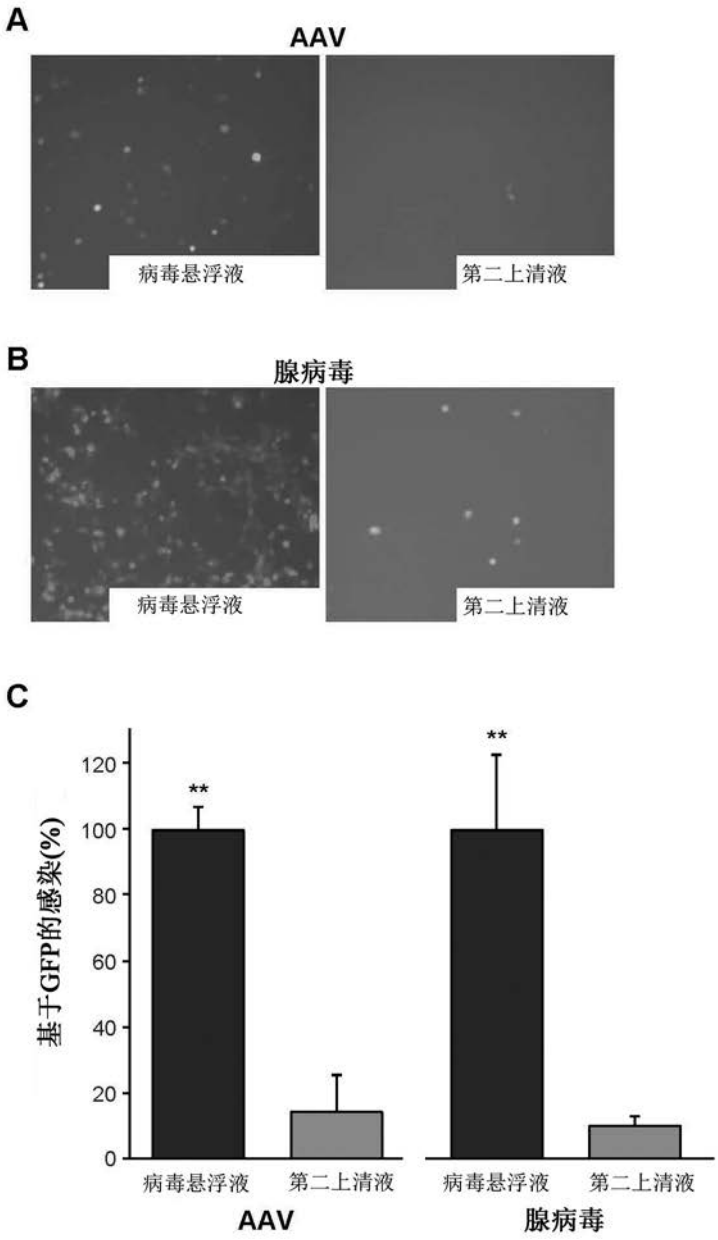

A
AAV
病毒悬浮液
第二上清液
B
腺病毒
病毒悬浮液
第二上清液
C
基于GFP的感染(%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
病毒悬浮液
第二上清液
病毒悬浮液
第二上清液
AAV
腺病毒

图13

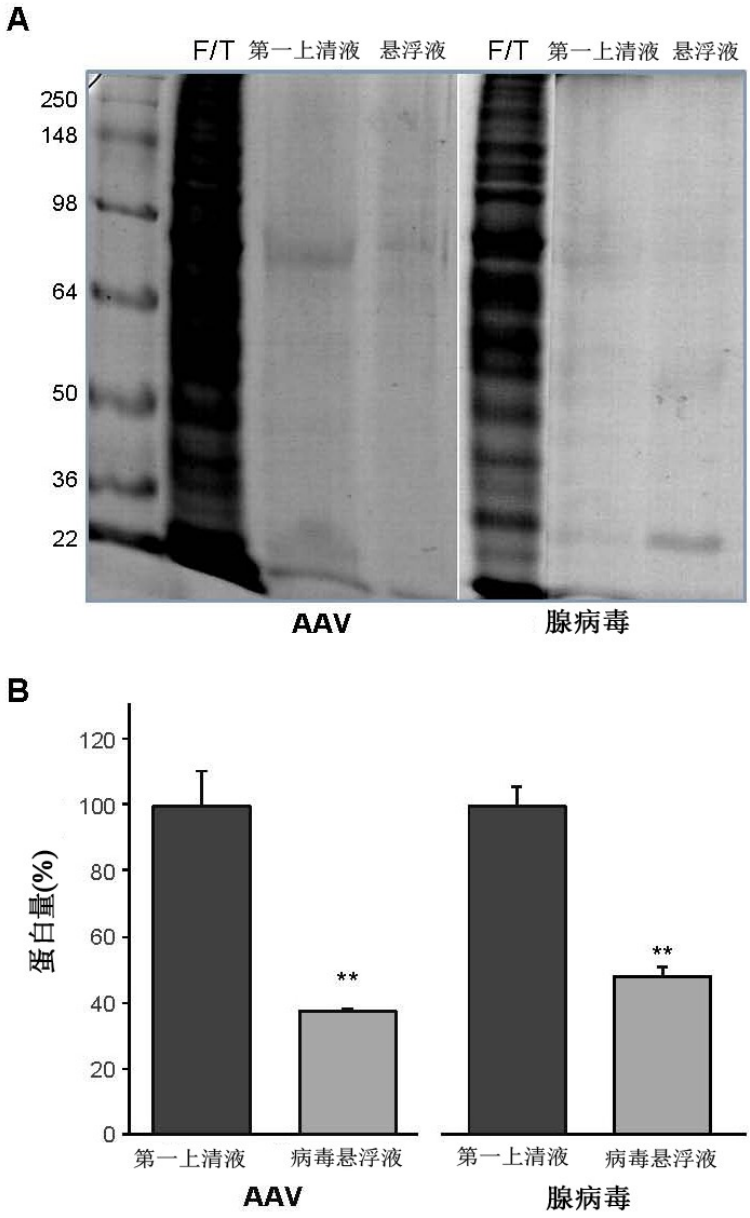

A
F/T 第一上清液 悬浮液 F/T 第一上清液 悬浮液
250
148
98
64
50
36
22
AAV
腺病毒
B
蛋白量(%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
第一上清液
病毒悬浮液
第一上清液
病毒悬浮液
AAV
腺病毒

图14

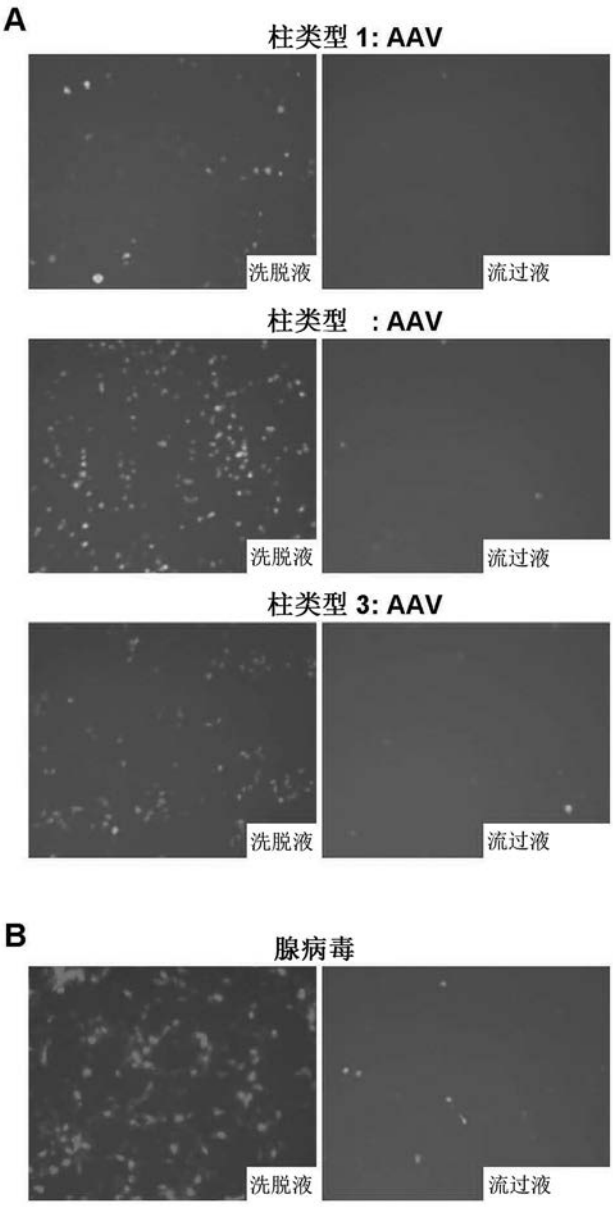
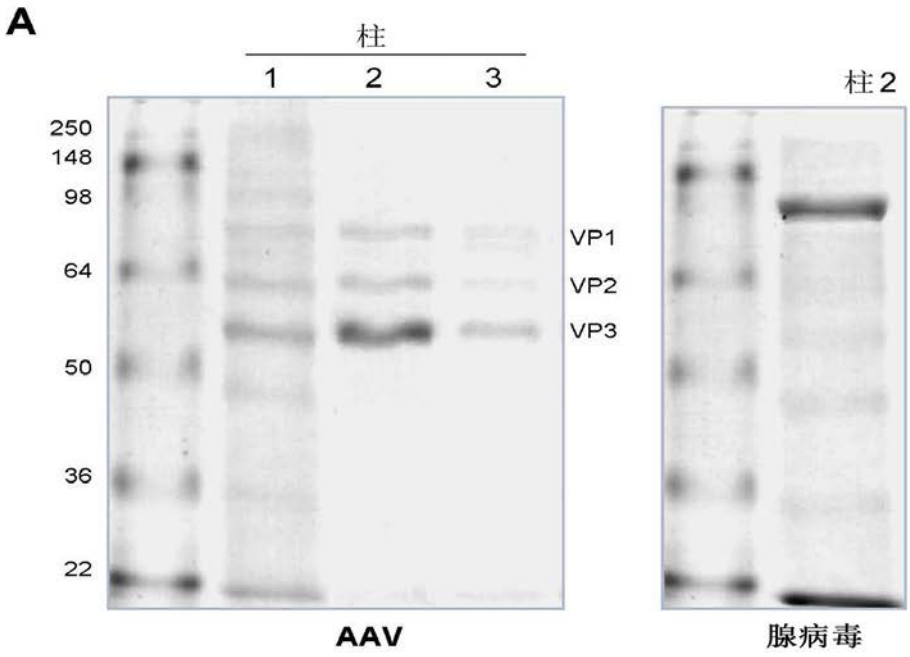


图15


A
柱
1
2
3
柱2
250
148
98
64
50
36
22
VP1
VP2
VP3
AAV
腺病毒

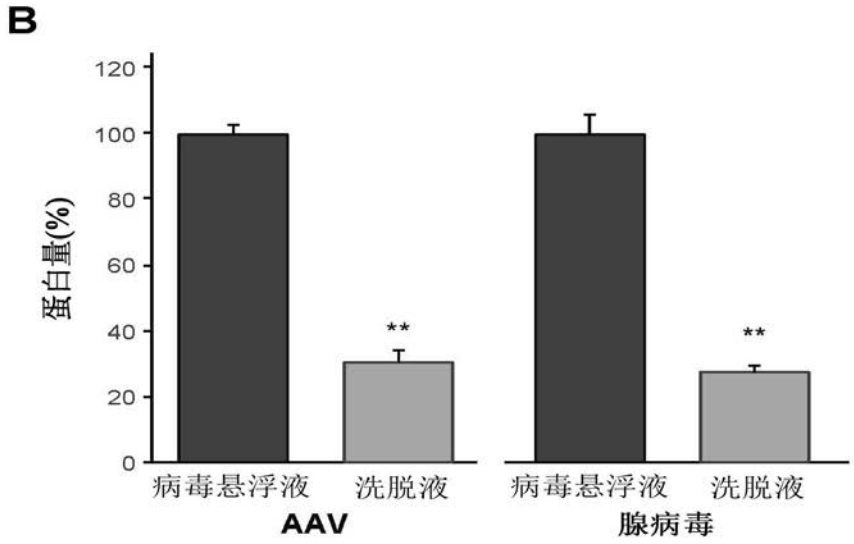

B
蛋白量(%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
病毒悬浮液
洗脱液
病毒悬浮液
洗脱液
AAV
腺病毒

图16

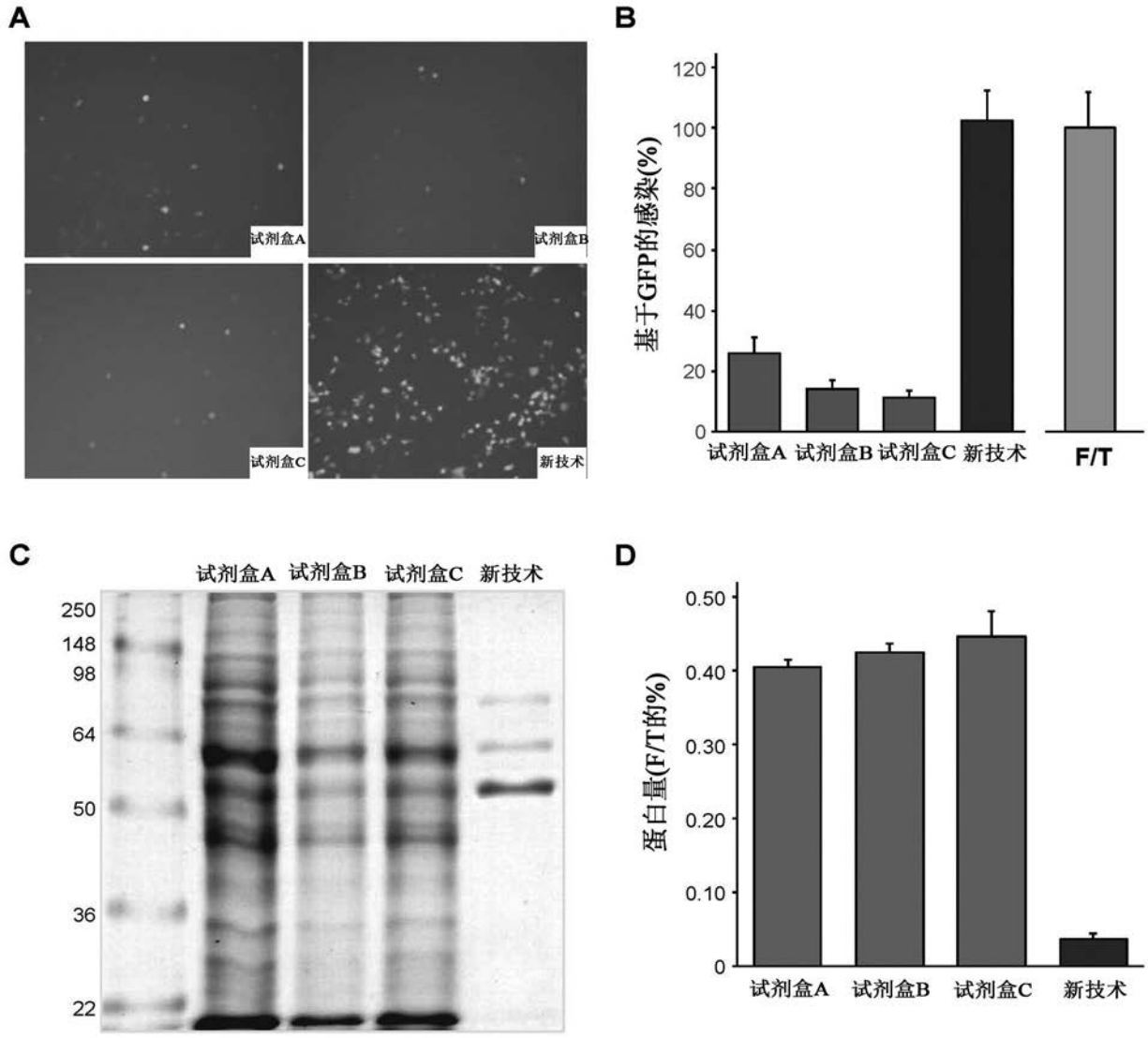

A
试剂盒A
试剂盒B
试剂盒C
新技术
B
基于GFP的感染(%)
120
100
80
60
40
20
0
试剂盒A 试剂盒B 试剂盒C 新技术
F/T
C
试剂盒A 试剂盒B 试剂盒C 新技术
250
148
98
64
50
36
22
D
蛋白量(F/T的%)
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0
试剂盒A 试剂盒B 试剂盒C 新技术

图17

新产品的结构和作用

作为例子的组件 (以下中的一个或多个)	作用
细胞悬浮溶液 细胞裂解溶液	细胞裂解
第一分级分离溶液	移除大多数的杂质
第二分级分离溶液 丸粒悬浮溶液	病毒收集和进一步纯化
固相层析柱 柱支撑性套件或材料 平衡溶液 洗涤溶液 洗脱溶液	最后纯化
离心过滤器或 其他浓缩套件	病毒溶液的浓缩

图18