

## AEX层析精纯分离完整AAV与空衣壳

### 客户面临的挑战

- ▶ 需要从AAV制剂中去除空衣壳。
- ▶ 制备型超速离心法耗时且规模受限。

### 东曹的解决方案

SkillPak 1 TOYOPEARL GigaCap® Q-650S

- ▶ 便于工艺开发的便捷式预装柱。

我们做了什么？

- ▶ 使用无毒的氯化胆碱作为洗脱盐，优化了AEX工艺。

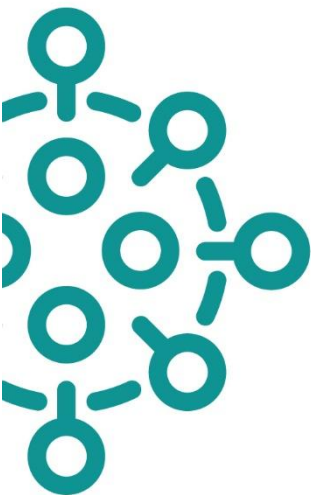
结果如何？

- ▶ 实现了93%的AAV完整衣壳含量，与制备型超速离心法的结果基本相同。

这种快速AEX层析精纯法安全无毒、可规模化放大，且能适配不同血清型和纯度要求。

### 客户获益

可快速去除空衣壳，最终完整衣壳含量达90%以上。



TOSOH BIOSCIENCE

**SEPARATION  
& PURIFICATION**

CONNECTING MINDS.  
TOUCHING LIVES.



## 使用氯化胆碱梯度优化AAV载体的AEX精纯工艺

### 简介

重组腺相关病毒（AAV）是基因治疗中常用的核酸递送载体。近年来，最大限度地提高携带完整基因组的AAV完整衣壳含量以提升产品效力和安全性，已成为行业关注重点。制备型超速离心法是目前广泛使用的非色谱纯化技术，用于富集AAV完整衣壳。然而，该技术存在放大生产局限性，需要大量电力消耗，且耗时较长。

由于空衣壳AAV和完整衣壳AAV所包裹的单链DNA（ssDNA）基因组存在电荷差异，所以这一特性可被用作分离手段。单链DNA的负电荷会降低等电点，使AAV颗粒的等电点从空衣壳时的6.3降至完整衣壳时的5.9。因此，完整衣壳AAV与AEX填料的亲和力更强，需要更高的电导率才能将其洗脱，从而实现分离。此前，AEX曾被用于富集完整衣壳AAV的精纯步骤，通常使用氯化钠洗脱；但这种方法往往会导致明显的峰重叠以及完整衣壳的损失。

氯化胆碱是一种简单季铵盐，据了解，在分析型AEX色谱中，其分离空衣壳与完整衣壳AAV的能力显著优于氯化钠<sup>[1]</sup>。本文研究表明，在SkillPak™ TOYOPEARL GigaCap® Q-650S制备型预装柱上使用氯化胆碱作为洗脱盐，可增强空衣壳与完整衣壳AAV的分离效果，其分离程度与制备型超速离心法基本相同。

### 实验条件

下文所述方法已针对AAV8进行了优化。

由于不同血清型的AAV衣壳蛋白序列一致性可能低至60%，因此针对某一种血清型优化的分步洗脱方法未必适用于其他血清型。建议对其他血清型，先采用0~500 mmol/L氯化胆碱的线性梯度，然后再根据洗脱情况逐步优化必要的洗脱程序进行改进。



### 制备型阴离子交换层析

层析柱： SkillPak 1 TOYOPEARL GigaCap Q-650S，  
7 mm ID×2.5 cm  
流动相： A： 20 mmol/L bis-tris propane / HCl缓冲液，  
pH 9.0, 0.001% 泊洛沙姆188  
B： 20 mmol/L bis-tris propane / HCl缓冲液，  
pH 9.0, 0.5 mol/L 氯化胆碱, 0.001% 泊洛沙姆188  
梯度： 平衡： 5 CV 100% A  
进样量： 通常 ≥1 mL  
淋洗0： 10 CV 0% B  
淋洗20： 20 CV 20% B  
淋洗25： 20 CV 25% B  
洗脱（完整AAV）： 5 CV 40% B  
再生： 10 CV 100% B  
流速： 平衡： 1.9 mL/min  
进样和淋洗0： 0.2 mL/min  
淋洗20、淋洗25： 1.9 mL/min  
洗脱： 0.5 mL/min  
再生： 1 mL/min  
检测： UV @ 280 nm; UV @ 260 nm  
温度： 环温  
样品： 共10<sup>12</sup> - 10<sup>14</sup>个经亲和纯化的AAV8衣壳，用流动相A + 2.5 mmol/L氯化镁（或其他替代稀释缓冲液）稀释至电导率为1.0-1.5 mS/cm、pH≈9.0，经0.2 μm PVDF或PES滤膜过滤

\* 替代稀释缓冲液示例： 20 mmol/L bis-tris propane base, 2.75 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.001%泊洛沙姆188

SkillPak 1 TOYOPEARL GigaCap Q-650S是体积为1 mL的预装柱，适用于低压层析系统上进行制备型AEX层析。其固定相由羟基化甲基丙烯酸聚合物HW-65树脂组成，平均粒径为35 μm，平均孔径为100 nm；该树脂通过季铵基团实现官能化，作为强阴离子交换剂使用。树脂填充在带有标准10-32接口的聚丙烯柱管中。

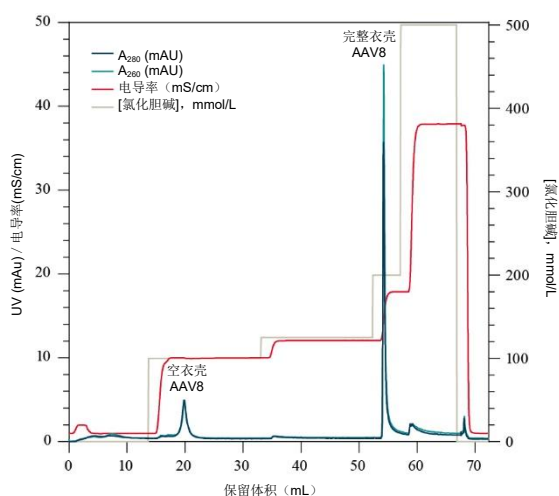
### 分析型阴离子交换色谱

色谱柱： TSKgel® Q-STAT (4.6 mm ID×10 cm, 7 μm)  
流动相： A： 20 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0  
B： 20 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0，  
含1.0 mol/L氯化胆碱  
梯度： 20分钟内10 - 35% B, 100% B 5分钟，  
10% B 5分钟  
流速： 1 mL/min  
检测： UV@260 nm; UV@280 nm，  
荧光检测的激发波长为280 nm，发射波长为350 nm

## 结果和讨论

将亲和纯化后的AAV8进样至SkillPak 1 TOYOPEARL GigaCap Q-650S预装层析柱。图1展示了典型的层析图，其中两个洗脱峰实现了AAV8完整衣壳与空衣壳的分离。通过监测260 nm和280 nm处的吸光度，可识别主要为完整衣壳的峰。A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值为1.3表明该峰主要为完整衣壳；比值为0.6则表明该峰为纯蛋白质而无包裹的DNA，属于空衣壳。比值在0.6~1.3之间则表明存在部分填充的衣壳，或为空衣壳与完整衣壳的混合物。对于AAV8而言，完整衣壳峰在氯化胆碱浓度为200 mmol/L时出现。层析柱通常用流动相B再生并重新平衡。如需更彻底的原位清洗（CIP），可使用0.5 mol/L NaOH溶液，在处理30分钟后进行中和。

图1. 完整AAV8的AEX纯化



在56 mL处出现一个洗脱峰，预测其主要包含完整的AAV8衣壳（A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>峰面积比=1.27）。收集该组分后，使用TSKgel Q-STAT色谱柱进行AEX色谱分析<sup>[1]</sup>。结果如图2所示。与通过制备型超速离心法纯化的商品化的完整AAV8制剂相比，采用TOYOPEARL GigaCap Q-650S填料结合氯化胆碱的纯化方法，能够同样有效去除AAV8空衣壳，最终获得含量为93%的完整AAV8样品（表1）。

图2. 亲和纯化(A)、AEX精纯(B)和商业化完整AAV(C)的分析型AEX色谱图对比

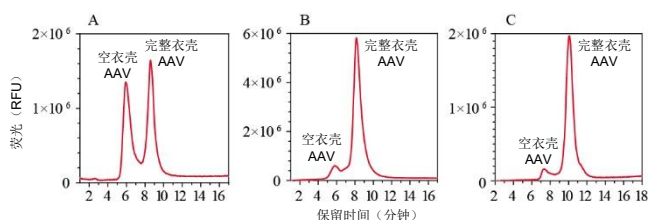


表1 使用分析型AEX色谱柱对空衣壳和完整AAV峰的定量分析

	亲和纯化的AAV8	AEX精纯后	商品化产品
空衣壳占比	48	7	7
完整衣壳占比	52	93	93

## 结论

这种以氯化胆碱作为流动相盐并使用TOYOPEARL GigaCap Q-650S填料的新型AEX精纯方法，为AAV完整衣壳的富集提供了显著有效的解决方案。

其梯度可根据不同的AAV血清型需求和物料规格进行调整。氯化胆碱是制药行业中公认的赋形剂，具有多重应用价值，并且已被纳入美国FDA的“一般认为安全（GRAS）”清单。SkillPak预装柱使工艺开发和放大生产变得更加快速简便。以亲和纯化后的AAV样品为起始物料，1 mL规模的工艺耗时通常低于2小时。与制备型超速离心法相比，这种可标准化且可放大生产的方法在降低了成本的同时，解决了制备型超速离心法存在的劳动强度大、操作员依赖性强以及规模受限等痛点。

## 参考文献

- 1) Kurth, S., Li, T., Hausker, A., Evans, W. E., Dabre, R., Müller, E., Kervinen, J. Separation of Full and Empty Adeno-Associated Virus Capsids by Anion-Exchange Chromatography Using Choline-Type Salts. *Anal Biochem*, 2024, 686, 115421. DOI: 10.1016/j.ab.2023.115421

## 产品信息

货号	产品名称
0045274	SkillPak 1 TOYOPEARL GigaCap Q-650S (1 mL)
0045290	SkillPak 5 TOYOPEARL GigaCap Q-650S (5 mL)
0022881	TOYOPEARL GigaCap Q-650S (25 mL)
0021961	TSKgel Q-STAT, 7 μm, 4.6 mm ID×10 cm 长

Tosoh Bioscience、TOYOPEARL GigaCap和TSKgel是Tosoh Corporation的注册商标。

SkillPak是Tosoh Bioscience LLC的商标。