

AAV 载体质量鉴定

亲和层析过程中各样品的 SDS-PAGE (还原) 电泳展示 (见下图 3), 从电泳图中可以清晰的看到病毒的 VP1、VP2 和 VP3 三条带。

将纯化后的 AAV8 病毒进行多个梯度的稀释, 并且侵染 293T 细胞 (汇合度 > 50%), 由于病毒质粒中带有 GFP 基因, 侵染细胞后可以表达 GFP 蛋白, 通过荧光显微镜观察可以看到, 稀释 1000 倍后有很高的荧光强度, 随着稀释倍数的增大 AAV 侵染细胞的数量逐渐减少, 但稀释 10^6 倍后仍有少量细胞带有荧光。证明洗脱的病毒具有很高的活性。

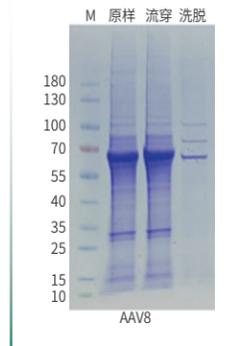


图 3 AAV8 电泳图谱

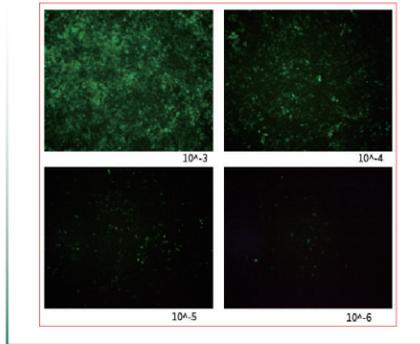


图 4 AAV8 病毒洗脱液稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍, 侵染 293T 细胞荧光结果

产品信息

层析原理	产品名称	货号 (可选规格)	应用
亲和捕获	AAV Affinity Beads 4FF	SA096 (5ml/25ml/100ml/1L)	AAV 病毒亲和介质, 用于复杂样品中的病毒捕获
精纯	Smac Q 40	SI035 (25ml/100ml/500ml/1L/10L)	强阴离子交换, 高刚性琼脂糖基质, 粒径更小, 柱效更高, 适合空壳分离
	Q 70S/M/L Phmac Beads	SI039/SI056/SI060 (25ml/100ml/500ml/1L/10L)	聚合物基质强阴离子交换, 100、500、1000nm 三种孔径可供选择, 均一的粒径, 超高的耐压

天地人和
Smart-Lifesciences

腺相关病毒 (AAV)

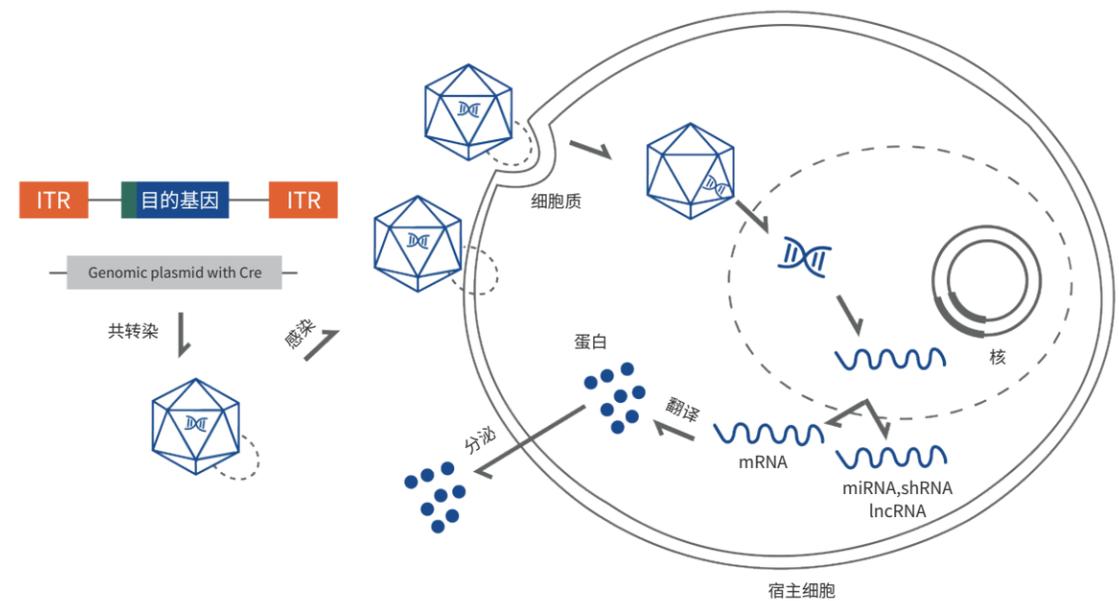


产品介绍

腺相关病毒 (Adeno-Associated Virus, AAV) 属于细小病毒科 (Parvoviridae), 是一类无法自主复制、不具有潜在致病性、无包膜的二十面体结构的病毒。其病毒颗粒直径约为 20-30nm, 含有 4.7kb 左右的线性单链 DNA 基因组。

AAV 病毒载体以其安全性高, 外源基因表达稳定, 免疫原性低, 宿主细胞范围广等特点, 被视为最有前途的基因转移载体之一。

AAV 感染细胞示意图:



官方公众号



Bilibili

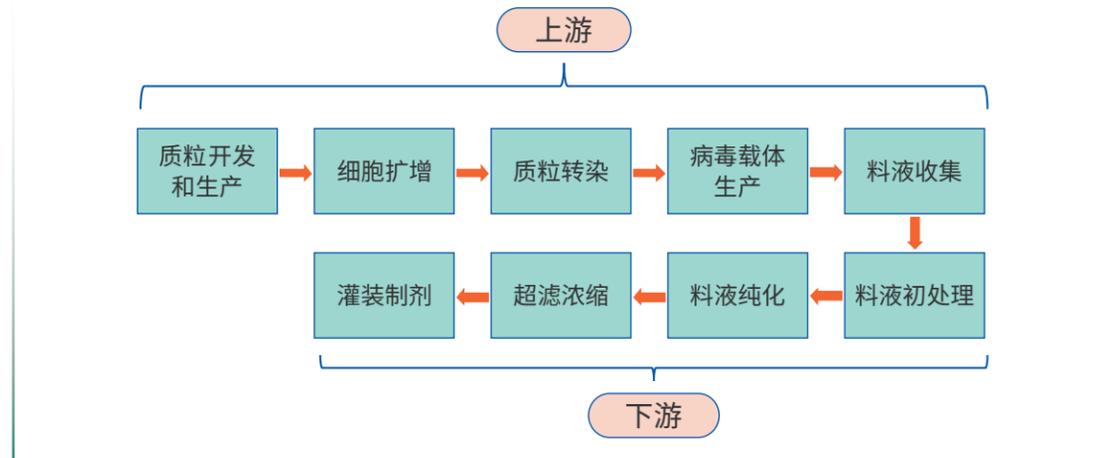


小红书

AAV 病毒生产的工业全流程

如今已经有多个以腺相关病毒为载体的基因治疗药物上市,其工业生产工艺是各大开发公司的必争之地。上游工艺主要涉及质粒的生产、细胞接种和扩大培养、质粒转化、病毒生产和收获。挑战在于贴壁和悬浮培养体系的放大问题,以及如何生产高滴度、高效力的病毒载体等。

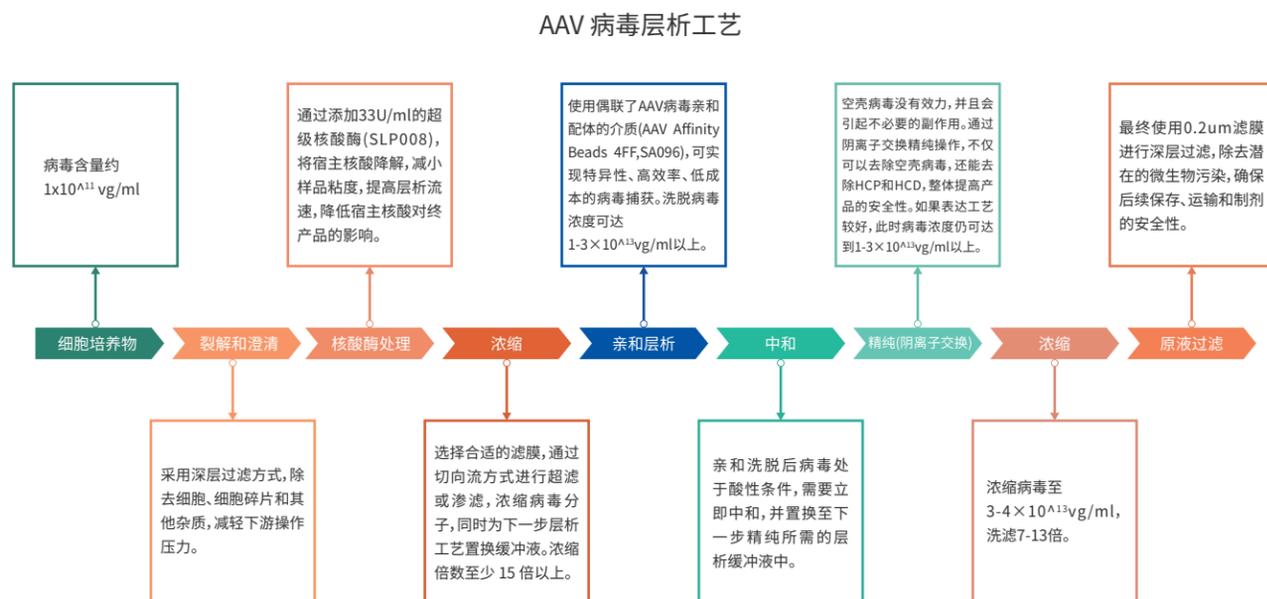
下游使用一个两步的层析工艺,来对病毒进行纯化,并通过死端或切向流过滤等方法,来实现样品的澄清、浓缩、换液和除菌操作,最终获得能足够接种的病毒量。挑战在于空壳实壳病毒颗粒的分离,不同血清型纯化工艺的差异等。



AAV 病毒生产的纯化工艺

在各种 AAV 的纯化工艺中,超速离心是最早也是最常规的纯化方法之一,但这种方法是无法满足大规模工业生产需求的。随着层析工艺的不断发展和完善,目前层析方法无可争议的成为 AAV 工业化生产的首选。

AAV 下游纯化流程图



Capture: AAV Affinity Beads 捕获 AAV 颗粒

使用亲和层析介质 (AAV Affinity Beads 4FF) 进行 AAV 捕获 (见图 1),从滴度为 $1E10-1E11$ vg/ml 的样品上清中,可以纯化获得高纯度的病毒,收率在 80% 以上,总量达到 10^{13} vg。

AAV Affinity Beads 4FF 亲和介质可满足用于基因治疗的腺相关病毒 (AAV) 的大规模纯化需求,对一系列 AAV 血清型均有结合作用,包括 AAV1 至 AAV9 以及合成血清型,一步纯化即可获得出色的纯度和产量。

特点如下:

- ▶ **高通用性:** 适用于 AAV1~AAV9 血清型
- ▶ **高载量:** $1E12 \sim 1E14$ vg/ml
- ▶ **高收率:** $\geq 80\%$
- ▶ **高耐受性:** 可耐受一定浓度的酸液、碱液和有机试剂
- ▶ **高安全性:** 无动物源组分,临床应用安全,符合法规要求
- ▶ **高稳定性:** 自主研发生产,从源头把控质量,确保产品批次的稳定
- ▶ **低成本:** 标准的生产管理,节省成本,增强产品竞争力
- ▶ **易放大:** 可耐受较高的流速,适合大规模纯化。

Polishing: Smac Q40 分离 Empty/Full Capsids

Partial、Empty capsids 的存在不仅会影响治疗效果,还有可能导致免疫反应,因此,将它们去除变得至关重要。亲和层析步骤不能区分完整衣壳、空衣壳、不完整衣壳、聚体等,需要通过带电性差异进行精细分离,尽可能去除空衣壳等杂质,精纯是一个分辨率挑战,利用完整衣壳与空衣壳之间等电点 (PI) 的微小差异,通过高分辨率阴离子 (Sma Q40) 层析来实现空实壳分离 (见图 2)。

通过亲和层析和离子层析后,能够有效去除空衣壳、不完整衣壳、聚体等杂质,得到完整的 AAV particles,完整衣壳率可达 90% 以上,满足 AAV 药物制备的需求。

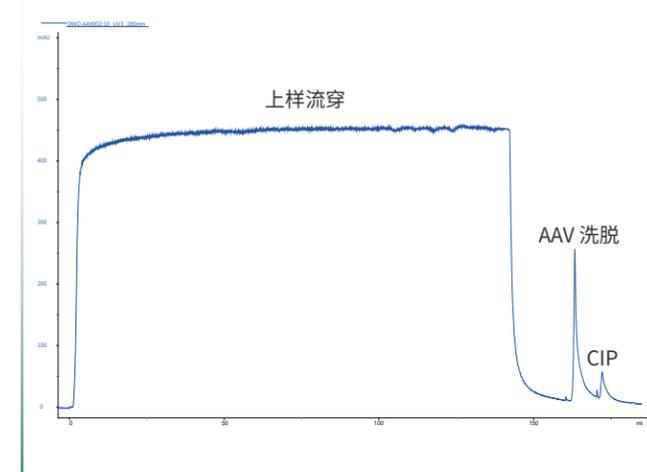


图 1 AAV Affinity Beads 4FF 纯化 AAV8 层析图谱

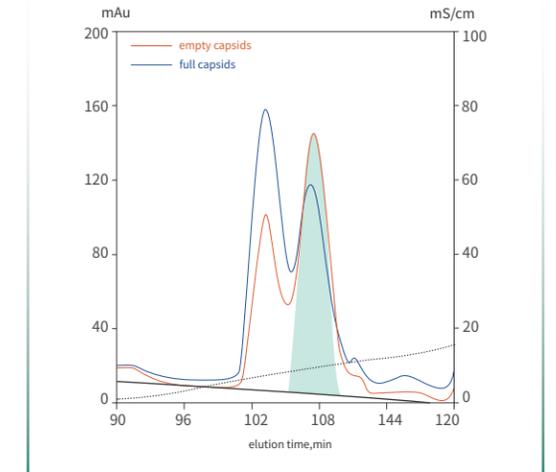


图 2 Smac Q40 分离 AAV8 E/F 层析图谱