

引用本文: 薛瑞雪, 黄永东, 赵岚, 朱凯, 宁欣颖, 程妍, 王结锦, 马光辉, 王启宝. 腺相关病毒通用型亲和介质的制备与吸附性能研究 [J]. 离子交换与吸附, 2025, 41(6): 455-463.

Citation: XUE Rui-xue, HUANG Yong-dong, ZHAO Lan, ZHU Kai, NING Xin-ying, CHENG Yan, WANG Jie-jin, MA Guang-hui, WANG Qi-bao. Preparation and Adsorption Performance Study of Universal Affinity Media for Adeno-Associated Viruses [J]. Ion Exchange and Adsorption, 2025, 41(6): 455-463.

· 研究论文 ·

文章编号: 1001-5493(2025)06-0455-09

DOI: 10.16026/j.cnki.iea.2025060455

腺相关病毒通用型亲和介质的制备与吸附性能研究*

薛瑞雪^{1,2}, 黄永东^{2**}, 赵岚², 朱凯², 宁欣颖^{1,2}, 程妍², 王结锦^{1,2}, 马光辉², 王启宝^{1**}

(¹中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083; ²中国科学院过程工程研究所生物药制备与递送全国重点实验室, 北京 100190)

摘要: 文章利用仿生多肽与腺相关病毒(AAV)的亲相互作用, 将仿生多肽偶联于琼脂糖微球, 制备出一种用于AAV纯化的通用型亲和介质。以不同种类的仿生多肽为配基, 以Sengarose 4FF微球为基质, 通过环氧活化的方式将多肽配基偶联至琼脂糖微球, 制备AAV多肽亲和介质; 通过调控活化基团密度、多肽配基种类及浓度、反应温度等条件, 最终制备出配基密度为2.2~5.6 mg/mL的多种AAV多肽亲和介质。该介质形貌规整, 平均粒径为90 μm。扫描电子显微镜结果表明, 琼脂糖微球在偶联配基前后表面形貌基本未改变。在介质吸附性能研究中, 分别采用高效液相色谱(HPLC)和激光共聚焦显微镜(CLSM)表征介质结合AAV的效果。结果表明, 该仿生多肽介质能有效结合AAV, 在特定吸附与解吸条件下顺利捕获目标病毒。进一步研究该多肽亲和介质的通用结合性能发现, 其对AAV2型和AAV9型均具有结合能力。多肽配基密度对AAV2吸附量的影响结果表明, 介质对AAV的结合量随配基密度增大而增加, 当配基密度为5.6 mg/mL时, AAV结合量达到最大值。文章为AAV亲和层析纯化技术的发展提供了新思路。

关键词: 腺相关病毒, 琼脂糖, 多肽亲和介质, 吸附性能, 仿生多肽

中图分类号: Q503 **文献标志码:** A

1 前言

腺相关病毒(AAV)是一种广泛应用于基因治疗的非致病性病毒载体, 不仅是全球首个获美国食品药品监督管理局(FDA)批准的基因治疗病毒载体, 也是当前临床应用前景最广阔的基因药物载体之一^[1-3]。凭借个性化设计与精准递送的优势, AAV已被应用于血友病^[4]、阿尔兹海默病^[5]等145项疾病的干预性临床试验。AAV的分离纯化生产过程复杂且精细, 超速离心法、聚乙二醇沉淀法、超滤法虽可获得完整的AAV颗粒, 但操作烦琐、耗时较长, 还易导致病毒活性损失^[6]。

近年来, 层析法在AAV纯化中的应用愈发广泛。例如, 离子交换层析可实现完整病毒颗粒与空壳颗粒的区分^[7]; 亲和层析虽可纯化特定血清型AAV, 但亲和介质成本较高, 以纳米抗体为代表的AAV亲和配基价格昂贵, 大幅增加AAV纯化成本^[8-9]。采用仿生多肽作为亲和配基, 不仅能达到与蛋白配基相当的亲和性, 还可显著降低介质成本。朱俐燕等^[10]仿生了蛋白A与IgG Fc片段结合处的氨基酸序列, 将获得的仿生多肽偶联至pGMA-EDMA纳米球, 成功制备出对IgG具有高亲和力的肽配基纳米载体。Chu等^[11]筛选出可用于纯化AAV2的肽配基, 并将选定的肽与

* 收稿日期: 2025-05-03

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(项目号2023YFC2812001, 2023YFC2812002); 国家自然科学基金资助项目(项目号22278411, 32471385)。

作者简介: 薛瑞雪(2000—), 硕士研究生。

**通信作者: 王启宝, E-mail: wqb@cumtb.edu.cn; 黄永东, E-mail: ydhuang@ipe.ac.cn.

Toyopearl 基质结合, 从 HEK 293 细胞裂解液中成功纯化 AAV2, 回收率达到 50%~80%。

本研究以腺相关病毒受体 (AAVR) 结构与 AAV 结合力最强的胞外结构片段 PKD2 为设计依据, 仿生出 PKD2 与 AAV 结合区域的肽段^[12-13]。将该仿生多肽偶联于琼脂糖基球, 制备得到 AAV 多肽亲和层析介质。该介质既具有对多种血清型 AAV 的特异性结合能力, 又具有易于制备、稳定性好、价格低廉等优势, 为 AAV 高效分离纯化提供了新选择。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

试剂: Sengarose 4FF(中科森辉微球技术(苏州)有限公司); 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(麦克林公司); 异硫氰酸荧光素 (FITC, 美国 Sigma 公司); D5 肽、D15 肽、D16 肽(国家生化工程技术研究中心(北京)提供); 其他试剂均为分析纯(国药集团北京化学试剂公司)。

仪器: 激光共聚焦显微镜 (CLSM, Leica TCS SP 5, 德国 Leica 公司); AKTA Purifier 100 层析系统(美国 Cytiva 公司); UNcle 多功能蛋白稳定性分析仪(美国 Unchained Labs 公司); 752 紫外可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 光学显微镜(美国 AMG 公司); LC-20AT 型高效液相层析仪(日本岛津公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 多肽稳定性评价

(1) 酸碱稳定性测试。采用体积排阻层析

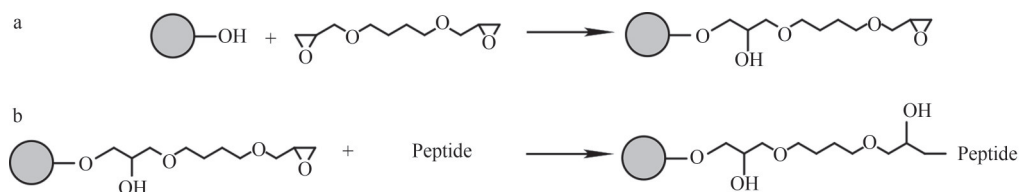


图1 AAV 仿生多肽亲和介质制备流程: (a) 环氧活化; (b) 偶联多肽配基。

Figure 1 Preparation process of AAV biomimetic polypeptide affinity medium: (a) Epoxy activation; (b) Polypeptide ligands coupling.

2.2.3 亲和介质形貌观察

用吸管吸取适量介质置于载玻片, 盖上盖玻片, 通过光学显微镜观察、拍摄并保存图像。

2.2.4 亲和介质粒径分析

采用激光粒度仪测定亲和介质的平均粒径

法研究多肽溶液在不同 pH 环境中的结构稳定性, 分析多肽在极端 pH 环境下的聚集和降解情况。精确配制 pH 2.0~9.0 的多肽缓冲体系(多肽浓度 1 mg/mL), 并置于 4 °C 恒温空气摇床中振荡处理 24 h。随后用 Upsepdex 30 10/300 GL 色谱柱进行体积排阻色谱分析, 流动相为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(含 150 mmol/L NaCl, pH7.4), 流速为 0.5 mL/min, 检测波长为 220 nm, 计算各 pH 条件下多肽的保留时间偏移量及纯度^[14-15]。

(2) 热稳定性测试。采用 UNcle 多功能蛋白稳定性分析仪测定多肽溶液的热稳定性。将多肽溶液以 0.5 °C/min 的速度从 20 °C 升温至 80 °C, 通过内源性荧光检测多肽构象变化, 从而确定多肽变性温度 T_m , 评估蛋白构象的稳定性。

2.2.2 多肽亲和介质的制备

(1) 环氧活化。多肽亲和介质制备流程如图 1 所示, 采用双环氧化合物活化法对 Sengarose 4FF 微球进行活化^[16-18]。准确称取一定量 Sengarose 4FF 微球, 依次加入二甲亚砜、1,4-丁二醇二缩水甘油醚及 NaOH 溶液, 于 30 °C 下反应一定时间, 制备得到环氧活化胶^[19]。

(2) 偶联多肽配基。将多肽偶联至环氧活化胶。准确称取多肽冻干粉, 用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PB, pH 10) 配制多肽溶液。加入等体积环氧活化胶, 反应 24 h。反应结束后, 用去离子水洗涤微球至中性, 得到 AAV 多肽亲和介质。测定反应前后溶液中多肽的含量, 计算得到多肽亲和介质的配基密度。

及分布。操作时先清洗仪器, 设置固定转速, 待仪器自检参数稳定后, 取适量介质与水的混悬液加入样品池, 进行测定和分析。

粒径分布系数 R_{span} 的表达式为式(1)。

$$R_{span} = (d_{0.9} - d_{0.1}) / d_{0.5} \quad (1)$$

式中: $d_{0.9}$ 、 $d_{0.1}$ 和 $d_{0.5}$ 分别为体积占全部微球总体积90%、10%和50%的微球直径, $d_{0.5}$ 左右两侧体积分布曲线下的面积相等, 为体积平均粒径。

2.2.5 亲和介质压力流速曲线测定

将介质与水的混合浆液缓慢倒入层析柱(ϕ 1.0 cm \times 10 cm), 排出柱内气泡。待床层稳定后, 以一定流速向柱内通入10倍柱体积的去离子水, 然后将层析柱连接至层析系统。设置一定流速 v_x 压柱至压力稳定, 记录该流速下层析系统的压力; 逐步增大流速, 记录不同流速与压力的对应关系。

线速度 v 的表达式为式(2)。

$$v = 60v_x/S \quad (2)$$

式中: S 为层析柱截面积, cm^2 。

2.2.6 静态吸附实验

取初始浓度为 1.0×10^{13} GC/mL和 0.8×10^{13} GC/mL的AAV2溶液各50 μL 作为目标蛋白样品, 分别加入精确称量的10 mg亲和层析微球, 于室温下吸附2 h后离心取上清液。采用甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.5)进行洗脱并收集洗脱液, 然后通过TSK G5000PWXL色谱柱对各组分进行高效液相色谱(HPLC)分析。

CLSM观察: 取适量AAV溶液加入离心管, 在避光条件下加入0.01 g FITC, 立即混匀后于4 $^{\circ}\text{C}$ 染色4 h。反应结束后, 用缓冲液反复洗涤以去除未结合的FITC, 得到FITC-AAV。取0.01 g亲和介质进行FITC-AAV吸附实验, 通过CLSM观测FITC-AAV与介质的结合情况。

3 结果与讨论

3.1 仿生多肽稳定性评价

3.1.1 酸碱稳定性测试

利用多孔凝胶固定相的独特特性, 根据分子尺寸差异考察多肽样品的纯度变化(图2)。多肽溶液在pH 2.0~9.0内的色谱峰形无变化, 保留时间稳定在13.40~13.90 min, 纯度均保持在94%以上, 表明其未发生显著聚集或降解(表1)。进一步说明该配基在层析介质制备及纯化过程中具有较强的稳定性, 可耐受更广范围的溶液条件。

3.1.2 热稳定性测试

多肽配基的耐高温特性已被多项研究证实, 例如Pham等^[20]设计了一种基于天然 β -折叠多肽

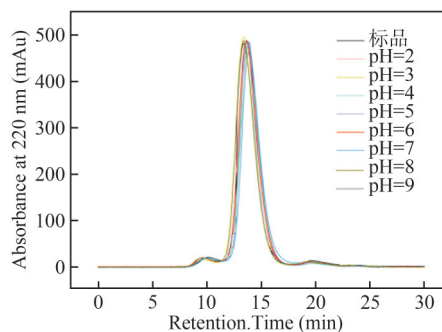


图2 不同pH条件下多肽的HPLC谱图。

Figure 2 HPLC chromatogram of polypeptides under different pH conditions.

表1 HPLC检测多肽在不同pH条件下的稳定性。

Table 1 The stability of peptides detected by HPLC under different pH conditions.

样品pH	保留时间 (min)	纯度 (%)
标品	13.42	97.80
2.0	13.84	94.10
3.0	13.42	94.70
4.0	13.90	95.48
5.0	13.72	96.60
6.0	13.66	97.30
7.0	13.90	97.30
8.0	13.42	96.30
9.0	13.72	94.50

(Trpzip2)的工程化多肽Tz₂H₃, 可耐受80 $^{\circ}\text{C}$ 高温; 通过合理设计或化学修饰, 还可降低多肽配基对温度的敏感性。本研究中多肽配基的温度变性测试曲线见图3, 曲线整体表现为连续平滑的单相过渡, 未出现多相拐点或突跃式变化, 且在20~80 $^{\circ}\text{C}$ 未监测到波长变化, 表明多肽配基未出现聚合或变性现象。

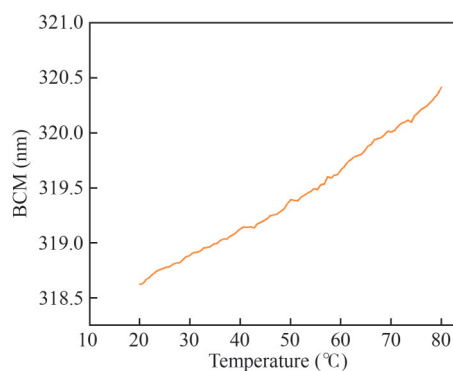


图3 多肽变性曲线。

Figure 3 Polypeptide denaturation curve.

上述酸碱和热稳定性测试结果均表明, D16肽具有良好的稳定性。在AAV纯化工艺中, 低pH洗脱是打破配基与衣壳蛋白结合的常规手段, 传统配基易因酸性条件发生不可逆变性; 而D16肽配基在pH 2.0洗脱条件下仍保持稳定, 且具有优异的热稳定性, 为后续规模化制备和纯化应用奠定了良好基础。

3.2 亲和介质形貌和流通性能

本研究采用五肽、十五肽分别制备D5亲和

介质和D15亲和介质作为对照, 其中五肽为理论计算中PKD2与AAV的关键接触区域肽段, 十五肽为PKD2与AAV结合处的完整肽段。为加强多肽配基与AAV的亲亲和相互作用, 进一步选用十六肽(D16)作为亲和配基。

图4为D5介质、D15介质、D16介质及Sengarose 4FF白球的光学显微镜图像, 可见几种介质均呈规整球形, 表明后续引入环氧基及偶联反应对介质的外观形貌无明显影响。

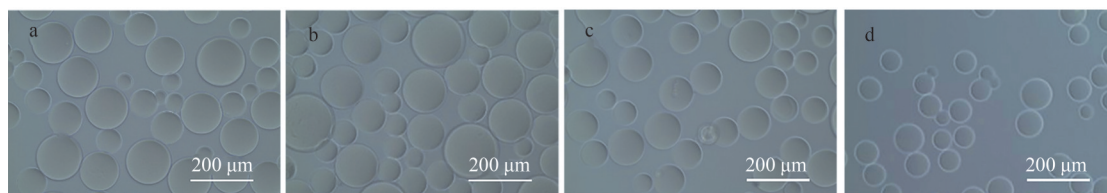


图4 多肽介质光学显微镜图像: (a) D5介质; (b) D15介质; (c) D16介质; (d) 4FF白球。

Figure 4 Optical microscope image of polypeptide medium: (a) D5 medium; (b) D15 medium; (c) D16 medium; (d) 4FF .

采用扫描电子显微镜观察各介质的微观表面结构(图5), 可见不同配基的介质形貌与孔径相似,

说明在吸附过程中, 亲和介质吸附性能的影响因素主要为配基种类及其在介质上的结合情况。

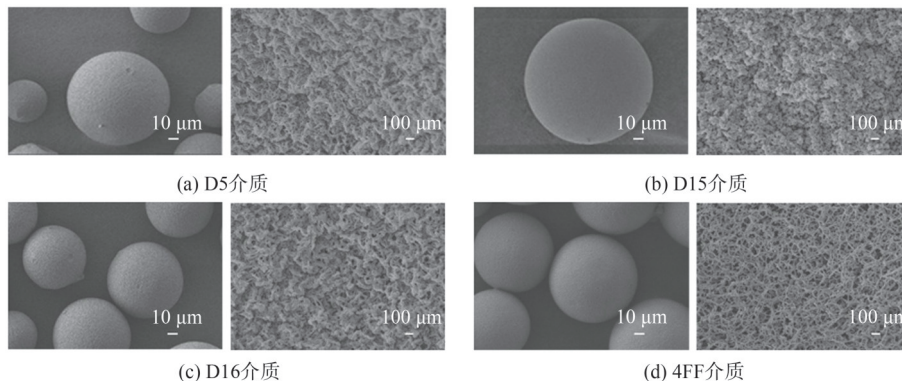


图5 多肽介质扫描电子显微镜图像: (a) D5介质, (b) D15介质, (c) D16介质, (d) 4FF白球。

Figure 5 Scanning electron microscope images of polypeptide medium: (a) D5 medium, (b) D15 medium, (c) D16 medium, (d) 4FF white beads.

图6为仿生多肽亲和介质及基质微球的粒径分布, 可见以Sengarose 4FF为基质制备的D5介质、D15介质、D16介质平均粒径均为90 μm, 粒径分布与空白基质基本一致。

图7为多肽介质及基质微球的流通性能测定结果, 可见在0~800 cm/h流速内, 亲和介质的压力-流速曲线接近线性, 表明介质内部孔道贯通性良好, 可满足AAV捕获步骤中高流速、长周期运行的工业化需求。

3.3 亲和介质吸附动力学研究

样品浓度归一化处理过程如下: 对初始浓度

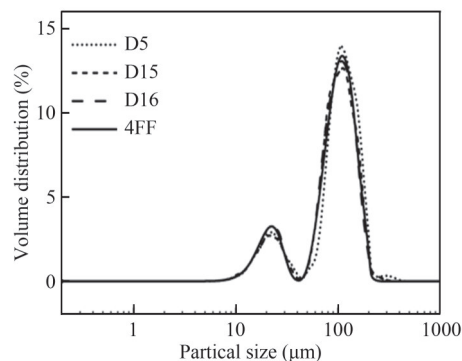


图6 多肽介质粒径分布。

Figure 6 Particle size distribution of polypeptide medium.

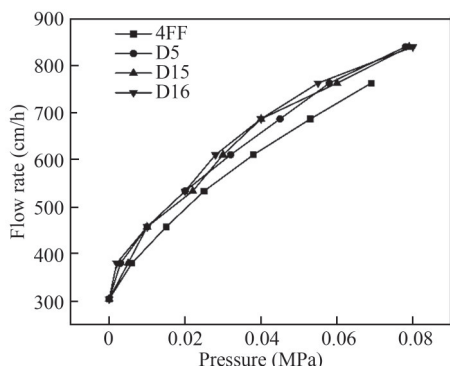


图7 多肽介质压力-流速曲线.

Figure 7 Pressure and flow rate curve of polypeptide medium.

设定为 1×10^{13} GC/mL的标准品 AAV2 进行稀释, 得到不同浓度的 AAV 体系, 再通过 HPLC 分析获得各浓度对应的峰面积值; 以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标, 建立 AAV 标准曲线。根据该曲线, 采用 HPLC 法分析吸附前后 AAV 样品的浓度变化。D16 介质对 AAV2 标品的吸附情况如图 8 所示, AAV 标品的初始浓度为 0.8×10^{13} GC/mL, 吸附后和洗脱后上清液的目标峰均出现在 15 min 左右; 吸附后上清液浓度明显降低, 表明介质对 AAV2 具有吸附作用; 洗脱液中除目标峰外, 21.4 min 时出现另一蛋白峰, 推测洗脱过程中洗脱液 pH 值较低, 可能导致 AAV 衣壳蛋白发生裂解。

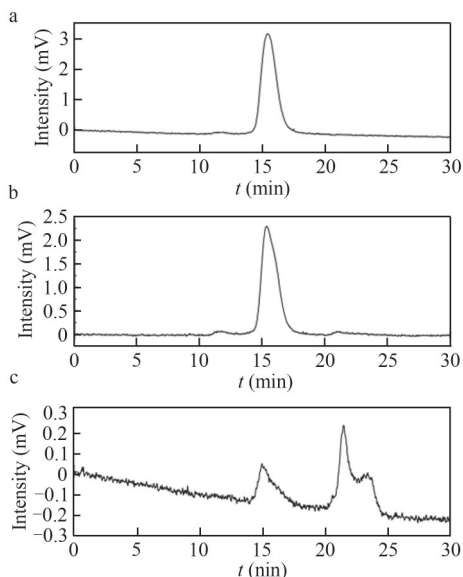


图8 多肽介质吸附 AAV 过程中各阶段收集液的 HPLC 图谱: (a) 吸附前上清液; (b) 吸附平衡上清液; (c) 洗脱液.

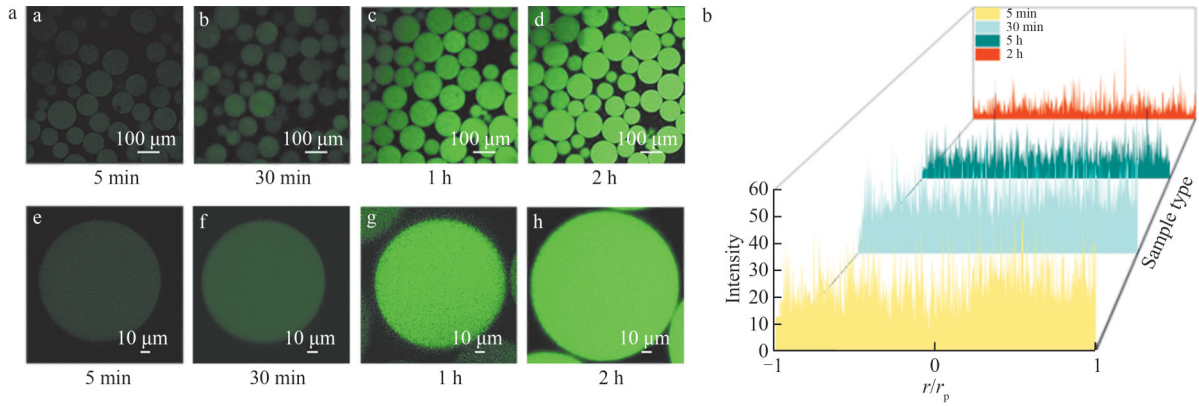
Figure 8 HPLC chromatograms of the collected liquid at each stage during the adsorption of AAV by polypeptide medium: (a) Supernatant before adsorption; (b) Adsorption equilibrium supernatant; (c) Eluent.

通过 CLSM 考察 AAV2 扩散进入 D16 介质内部的过程: 用 D16 介质吸附 FITC-AAV2, 分别在 5 min、30 min、1 h、2 h 时取样观察 (图 9)。结果显示, 当吸附 5 min 时, 亲和介质内部已布满强度较弱的荧光, 说明此时 AAV2 已扩散进入 D16 介质内部, 但吸附量较低; 当吸附 30 min 时, 平均荧光强度较吸附 5 min 提升 61.2%; 当吸附 1 h 时, 平均荧光强度提升 105.0%, 且介质内外层吸附能力无明显差异; 当吸附 2 h 时, 截面平均荧光强度和空间分布特征与吸附 1 h 时基本一致, 说明此时 AAV 在介质内的扩散受孔隙结构限制, 达到吸附平衡状态^[21]。此外, FITC-AAV2 的吸附行为受限于介质内部孔道的传质阻力, 当两者达到平衡状态时, 结合量达到峰值。

图 10(a)~(h) 为 D16 介质从顶部到底部等距层切的剖面图。沿 Z 轴逐层切片成像可见, 荧光标记的 AAV2 病毒颗粒在介质各切面上均匀分布, 这表明 AAV2 已吸附于整个介质内部孔道, 此结果与图 9 中的荧光信号分布一致。上述现象说明, D16 介质的孔隙结构能为 AAV2 提供低阻力的扩散路径, 其均匀分布的配基位点有效避免了病毒在近表面区域过度富集, 从而实现了全孔道空间的高效利用。

3.4 多肽种类对亲和介质吸附行为的影响

通过 CLSM 观察 FITC-AAV2 在不同多肽亲和介质内部的传质情况 (图 11)。D5 亲和介质整体荧光强度较弱, 且荧光主要集中于介质外表面; D15 介质的荧光均匀分布于整个微球, 但强度仍弱于 D16 介质; D16 介质的荧光强度最大且分布均匀。进一步对 3 种介质的最大横截面荧光强度进行定量分析, 可知 D16 介质平均荧光强度为 D5 介质的 3.3 倍、D15 介质的 2.0 倍。推测原因如下: 五肽配基与 AAV 结合位点较少, 多数多肽配基利用率较低, 无法与 AAV 特异位点接触, 导致 AAV 颗粒的捕获效率显著受限; 十五肽配基通过延长分子链形成柔性连接臂, 但氨基在多肽表面分布较广, 偶联可能发生在多个位点, 导致多肽以不同方向固定于琼脂糖微球基质, 部分多肽的活性位点可能被遮挡或朝向基质内部, 无法有效结合 AAV; 十六肽配基能将关键肽链部分进一步向空间延伸, 大幅减小与 AAV 结合的空间位阻, 从而有效提高结合效率。



注: r 为截面半径; r_p 为距离圆心的长度。

图9 (a) FITC-AAV2在D16介质上动态结合不同时间的CLSM图像和(b) 荧光强度分析。

Figure 9 (a) Dynamic combination of CLSM images at different times and (b) fluorescence intensity analysis of FITC-AAV2 on D16 medium.

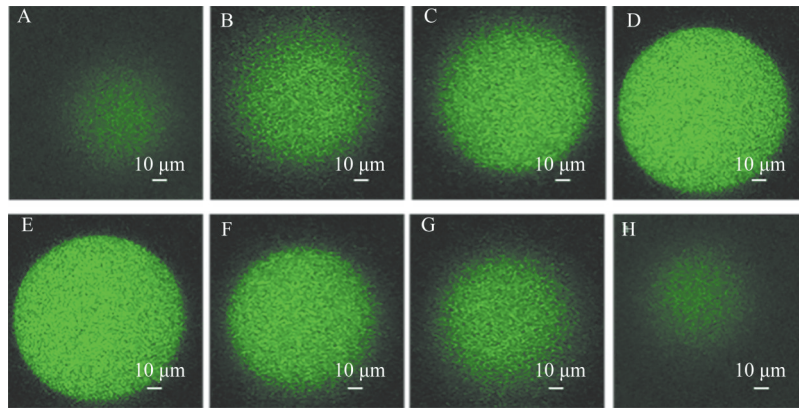


图10 D16介质吸附FITC-AAV 荧光层切图。

Figure 10 Sectional view of the fluorescence layer of FITC-AAV adsorbed D16 medium.

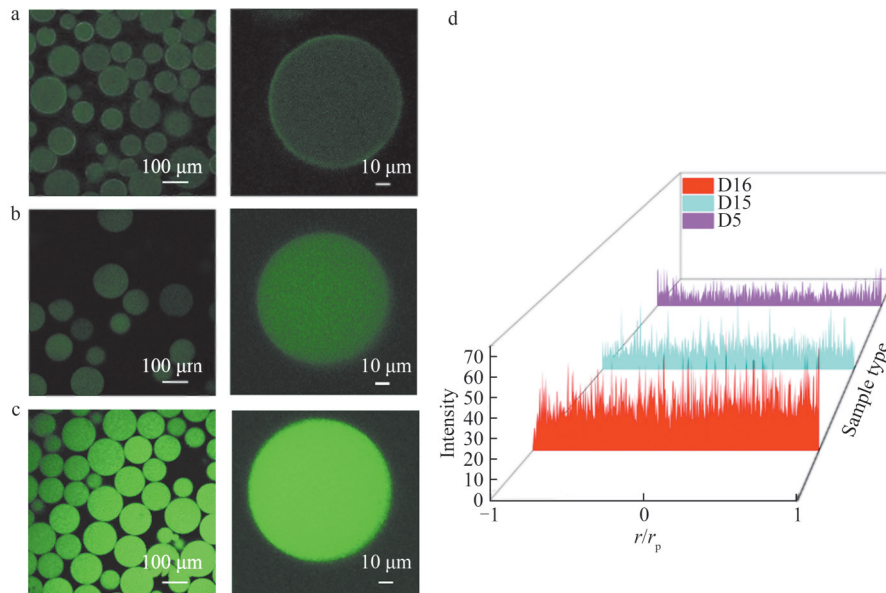


图11 FITC-AAV2在(a) D5介质、(b) D15介质、(c) D16介质达到动态平衡时的CLSM图像和(d) 荧光强度分析。

Figure 11 CLSM images of FITC-AAV2 in (a) D5 medium, (b) D15 medium, and (c) D16 medium and (d) fluorescence intensity analysis at dynamic equilibrium.

3.5 配基密度对亲和介质传质行为的影响

配基密度是影响介质吸附性能的关键因素, 直接决定最终分离纯化效果。研究表明, 当配基密度为2.2~5.6 mg/mL时, D16介质对AAV2的吸附能力与配基密度呈正相关。结合荧光强度分析, 当配基密度从2.2 mg/mL提升至

3.7 mg/mL时, 介质截面的平均荧光强度提升145.2%; 当密度达到4.7 mg/mL时, 平均荧光强度提升346.8%; 当继续增加至5.6 mg/mL时, 平均荧光强度提升550.8% (图12)。这表明适度提升配基密度可增加结合位点, 显著增强介质的吸附能力。

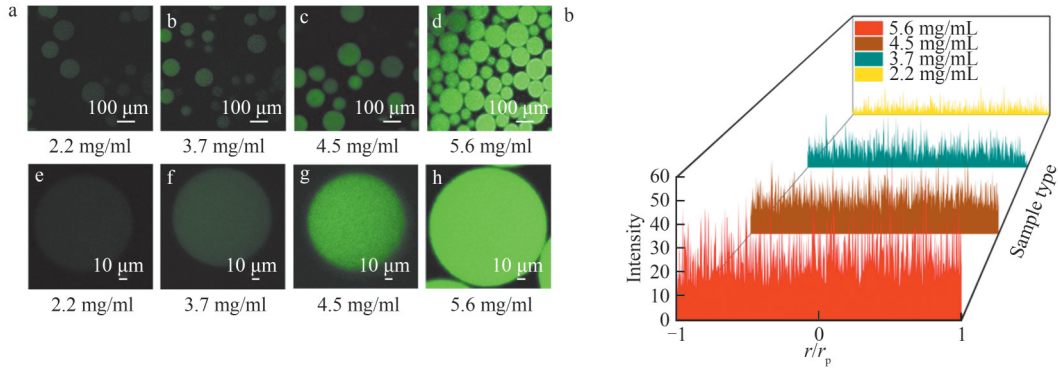


图12 (a) FITC-AAV2在不同配基密度多肽亲和介质上达到动态平衡时的CLSM图像和(b)荧光强度分析。

Figure 12 (a) CLSM images of FITC-AAV2 when it reaches dynamic equilibrium on polypeptide affinity media with different ligand densities and (b) fluorescence intensity analysis.

3.6 亲和介质通用性研究

在AAV家族中, AAV9凭借突破性生物学特性成为新一代明星载体。与AAV2相比, AAV9能高效穿透血脑屏障实现中枢神经系统靶向递送, 其转导能力在心肌病、代谢综合征等疾病模型中展现出独特优势。然而, 现有商品化亲和介质大多针对AAV2优化设计, 对AAV9的结合特异性与载量普遍不足, 工业生产中常采用离子交换结合分子筛的多步纯化策略, 大幅增加AAV的生产成本与工艺复杂性^[22]。本研究采用的亲和配基仿生AAVR是AAV2与AAV9

的共同天然受体, 可实现对AAV2与AAV9的通用性高效捕获。

进一步考察D16介质对AAV9的吸附性能, 采用与AAV2相同的荧光标记策略, 对FITC标记的AAV9与介质进行动态吸附实验, 通过CLSM实时监测AAV9在介质内的吸附行为 (图13)。结果显示: 在吸附初始阶段(5 min), 介质截面仅出现零星分布的微弱荧光信号; 当吸附30 min时, 荧光信号强度显著提升, 拍摄视野内可见大片荧光; 当吸附时间延长至2 h时, 荧光强度与空间分布特征趋于稳定, 表明此时已达到动态吸附平衡

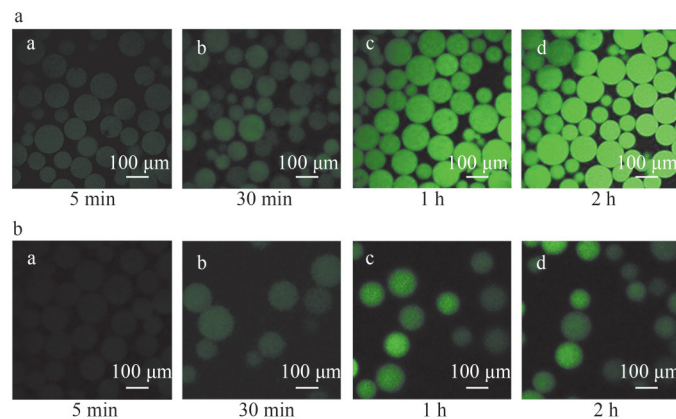


图13 D16介质吸附(a) AAV2和(b) AAV9的CLSM图像。

Figure 13 CLSM images of (a) AAV2 and (b) AAV9 adsorbed by D16 medium.

状态。该现象与AAV2的吸附动力学特征具有相似性,说明亲和介质的孔道结构能有效克服病毒颗粒的空间位阻效应,实现对不同血清型AAV的捕获。

4 结 论

本研究对AAVR与AAV结合区域结合力最强的胞外结构域(PKD2)进行仿生,合成多肽亲和配基;采用1,4-丁二醇缩水甘油醚对Sengarose 4FF琼脂糖微球进行环氧活化,再将仿生多肽作为配基偶联至微球,制备出一系列AAV仿生多肽亲和介质。通过探讨多肽的酸碱与热稳定性,研究AAV与仿生多肽亲和介质的吸附行为,得出以下主要结论:

(1) 所制备的仿生多肽具有良好的酸碱与热稳定性。

(2) 以环氧活化胶偶联多肽的方式,通过控制配基偶联过程中的环氧基密度、多肽浓度和反应温度等条件,成功制备出配基密度为2.2~5.6 mg/mL的AAV仿生多肽亲和介质。在该密度范围内,D16介质对AAV2的吸附能力与配基密度呈正相关,配基密度由2.2 mg/mL提升至5.6 mg/mL,其吸附能力提升约5倍。

(3) 选用十六肽作为亲和介质配基,制备的D16介质有效解决了多肽亲和介质结合AAV2时存在的空间位阻效应。与D5、D15介质相比,D16介质对AAV2的吸附能力最优,分别为D5介质的3.3倍、D15介质的2.0倍。

(4) D16介质对AAV9表现出良好的结合性能,表明该仿生多肽亲和介质在AAV9纯化中具有应用潜力,对AAV的结合作用具有通用性。

参考文献

- 1 Wang D, Tai P W L, Gao G P. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2019**, 18(5): 358-378.
- 2 Delhove J, Osenk I, Prichard I, et al. Public acceptability of gene therapy and gene editing for human use: A systematic review[J]. *Human Gene Therapy*, **2020**, 31(1/2): 20-46.
- 3 Li C W, Samulski R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy[J]. *Nature Reviews Genetics*, **2020**, 21(4): 255-272.
- 4 Pasi K J, Rangarajan S, Mitchell N, et al. Multiyear follow-up of AAV5-hFVIII-SQ gene therapy for hemophilia A [J]. *The New England Journal of Medicine*, **2020**, 382(1): 29-40.
- 5 Castle M J, Baltanás F C, Kovacs I, et al. Postmortem analysis in a clinical trial of AAV2-NGF gene therapy for Alzheimer's disease identifies a need for improved vector delivery[J]. *Human Gene Therapy*, **2020**, 31(7/8): 415-422.
- 6 Qu W H, Wang M X, Wu Y Q, et al. Scalable downstream strategies for purification of recombinant adeno-associated virus vectors in light of the properties[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2015**, 16(8): 684-695.
- 7 Kurth S, Li T Y, Hausker A, et al. Separation of full and empty adeno-associated virus capsids by anion-exchange chromatography using choline-type salts[J]. *Analytical Biochemistry*, **2024**, 686: 115421.
- 8 Lock M, Alvira M, Vandenberghe L H, et al. Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale[J]. *Human Gene Therapy*, **2010**, 21(10): 1259-1271.
- 9 Grieger J C, Soltys S M, Samulski R J. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector[J]. *Molecular Therapy*, **2016**, 24(2): 287-297.
- 10 朱俐燕, 白姝, 孙彦, 等. 肽配基纳米亲和载体定向固定化抗体[J]. *离子交换与吸附*, **2014**, 30(3): 193-202.
- 11 Chu W N, Shastry S, Barbieri E, et al. Peptide ligands for the affinity purification of adeno-associated viruses from HEK 293 cell lysates[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, **2023**, 120(8): 2283-2300.
- 12 Meyer N L, Hu G Q, Davulcu O, et al. Structure of the gene therapy vector, adeno-associated virus with its cell receptor, AAVR[J]. *eLife*, **2019**, 8: e44707.
- 13 Zhang R, Cao L, Cui M T, et al. Adeno-associated virus 2 bound to its cellular receptor AAVR[J]. *Nature Microbiology*, **2019**, 4(4): 675-682.
- 14 Lee Y R, Li X X, Ma W W, et al. Retention of large biological molecules by size-exclusion chromatography[J]. *Analytical Letters*, **2017**, 50(6): 905-915.

- 15 史清洪, 贾立霞. 肽配基仿生亲和介质的制备和抗体纯化性能研究[J]. 天津大学学报(自然科学与工程技术版), 2022, 55(11): 1159-1165.
- 16 史清洪, 彭冠英, 孙舒, 等. 环氧氯丙烷活化琼脂糖凝胶过程强化及性能评价[J]. 过程工程学报, 2007, 7(4): 743-746.
- 17 朱凯, 赵岚, 黄永东, 等. 葡聚糖接枝型 Protein A 介质的层析性能提升[J]. 过程工程学报, 2016, 16(5): 856-861.
- 18 古嘉如, 穆士凯, 武玉哲, 等. 肝素亲和层析介质制备方法及应用研究进展[J]. 离子交换与吸附, 2023, 39(2): 172-188.
- 19 金雄华, 夏海锋, 郑兵兵, 等. 两种谷胱甘肽亲和层析介质的制备及其对谷胱甘肽转移酶融合蛋白的纯化[J]. 离子交换与吸附, 2011, 27(4): 325-333.
- 20 Pham T L, Fazliev S, Baur P, et al. An engineered β -hairpin peptide forming thermostable complexes with Zn^{II} , Ni^{II} , and Cu^{II} through a His_3 site[J]. *ChemBioChem*, 2023, 24(3): e202200588.
- 21 Tao Y Y, Almodovar E X P, Carta G, et al. Adsorption kinetics of deamidated antibody variants on macroporous and dextran-grafted cation exchangers. III. Microscopic studies[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(44): 8027-8035.
- 22 Samaranch L, Salegio E A, Sebastian W S, et al. Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates[J]. *Human Gene Therapy*, 2012, 23(4): 382-389.

Research paper

Preparation and Adsorption Performance Study of Universal Affinity Media for Adeno-Associated Viruses

XUE Rui-xue^{1,2}, HUANG Yong-dong^{2*}, ZHAO Lan², ZHU Kai², NING Xin-ying^{1,2}, CHENG Yan²,
WANG Jie-jin^{1,2}, MA Guang-hui², WANG Qi-bao^{1*}

(¹School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China; ²National Key Laboratory of Biopharmaceutical Preparation and Delivery, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract The article utilized the affinity interaction between biomimetic peptides and adeno-associated virus (AAV) to couple the biomimetic peptides onto agarose microspheres, thereby preparing a universal affinity medium for AAV purification. With different types of biomimetic peptides as ligands and Sengarose 4FF microspheres as the matrix, the biomimetic peptide ligands were coupled to the agarose microspheres through epoxy activation to prepare AAV peptide affinity media. By regulating the density of the activated groups, the type and concentration of the peptide ligands, and the reaction temperature, various AAV peptide affinity media with ligand densities ranging from 2.2 to 5.6 mg/mL were ultimately prepared. The morphology of the medium was regular, with an average particle size of 90 μm . Scanning electron microscopy results indicated that the surface morphology of the agarose microspheres remained largely unchanged before and after coupling the ligands. In the study of the adsorption performance of the medium, high-performance liquid chromatography (HPLC) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were used to characterize the binding effect of the medium on AAV. The results showed that the biomimetic peptide medium could effectively bind AAV and successfully capture the target virus under specific adsorption and desorption conditions. Further research on the universal binding performance of the peptide affinity medium revealed that it had binding capabilities for both AAV2 and AAV9 types. The results of the influence of the peptide ligand density on the adsorption capacity of AAV2 indicated that the binding capacity of the medium to AAV increased with the increase in ligand density, reaching the maximum value when the ligand density was 5.6 mg/mL. The article provided a new idea for the development of AAV affinity chromatography purification technology.

Keywords AAV, Agarose chromatography media, Peptide affinity media, Adsorption performance, Biomimetic peptide

* Corresponding author: WANG Qi-bao, E-mail: wqb@cumt.edu.cn; HUANG Yong-dong, E-mail: ydhuang@ipe.ac.cn.