

# 腺相关病毒载体纯化技术的研究进展

曲伟红<sup>1,2\*</sup> (1. 华侨大学分子药物研究院, 福建泉州 362021; 2. 九江学院药学与生命科学学院, 江西九江 332000)

中图分类号 R945 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4880-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.41

**摘要** 目的: 综述腺相关病毒(AAV)载体的分离纯化方法, 为 AAV 的规模化制备提供参考。方法: 以“AAV”“Purity”“Chromatography”“腺相关病毒”“纯化”等为关键词, 组合检索 2000 年 1 月—2015 年 8 月在 PubMed、Web of Science、Elsevier、中国知网、维普等数据库中有 AAV 分离纯化的文献, 选择有代表性的文献进行归纳、总结, 分别从 AAV 纯化的超速离心法、液相色谱法、化学试剂法和超滤法等 4 个方面进行综述。结果: 共查阅到相关文献 260 余篇, 其中有效文献 48 篇。液相色谱法纯化 AAV 表现优异, 亲和色谱、离子交换色谱等色谱技术已经广泛用于 AAV1、2、4、5、6、8、9 等不同血清型载体的分离纯化, 甚至较难分离的 AAV 的空壳载体也可以实现分离。但是每种血清型载体的理化性质不尽相同, 很难用同一种方法纯化所有载体。结论: 液相色谱法在规模化纯化 AAV 载体具备良好优势, 但是应该根据不同血清型载体理化特征建立对应的纯化工艺。

**关键词** 腺相关病毒; 超速离心; 液相色谱; 纯化工艺

腺相关病毒 (Recombinant adeno-associated virus, AAV) 是含 4.7 kb 的线性单链 DNA 病毒, 属于细小病毒家族。目前, 该载体的临床研究已经有 100 多项, 主要用于治疗 Leber's 先天性黑内障、帕金森病、肌营养不良和 B 型血友病等遗传性疾病<sup>[1-2]</sup>。2012 年 7 月, 欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA) 批准荷兰 UniQure 公司基因药物 Glyber 的上市, 该药就是以 AAV1 为载体, 携带 LPL 基因, 用于治疗脂蛋白脂酶缺乏症引起的严重的或反复发作的胰腺炎<sup>[3-4]</sup>。该药的上市, 更加激发了业界对 AAV 载体药物的研发热情。因此, 不论是药品的商业化供应, 还是临床试验, 都需要大量的病毒载体<sup>[5]</sup>。随着 AAV 载体药物研究的不断深入, 一个重要问题摆在人们面前, 就是根据生产质量管理规范 (Good Manufacturing Practices, GMP) 要求, 规模化生产出能满足临床需要的病毒载体<sup>[6]</sup>。笔者以“AAV”“Purity”“Chromatography”“腺相关病毒”“纯化”等为关键词, 组合检索 2000 年 1 月—2015 年 8 月在 PubMed、Web of Science、Elsevier、中国知网、维普等数据库中有 AAV 分离纯化的文献。结果, 共查阅到相关文献 260 余篇, 其中有效文献 48 篇。选择有代表性的文献进行归纳、总结, 分别从 AAV 纯化的超速离心法、液相色谱法、化学试剂法和超滤法等 4 个方面进行综述, 着重阐述了液相色谱法纯化 AAV, 分别介绍了亲和色谱、离子交换色谱和分子排阻色谱等用于 AAV 的纯化技术, 以期为其规模化制备提供参考。

## 1 超速离心法

超速离心法是最为广泛使用的一种分离方法, 根据杂质与 AAV 载体的形状、大小以及等密度点的不同, 在高速离心作用下实现分离, 适用于很多实验室<sup>[7]</sup>。氯化铯 (CsCl)、蔗糖、碘克沙醇都可用作超速离心的介质。AAV 载体的密度约为 1.40 g/cm<sup>3</sup>, 这与存在的一些蛋白质、核酸类杂质有显著不同而实现分离<sup>[7-8]</sup>。以 CsCl 为例, 含有 AAV 的细胞裂解液经过聚乙二醇 (PEG) 等沉淀之后, 采用 CsCl 进行超速离心, 去除绝大部分杂质, 经过 2 次或者 3 次超速离心, 可以获得纯度更高的载体<sup>[9-11]</sup>, 见图 1。

该方法的优点是: (1) 技术成熟, 一般实验室均可操作; (2) 适合所有的血清型载体; (3) 对于结构非常相似的空壳粒

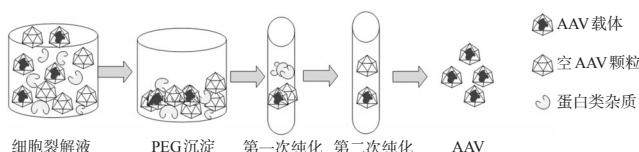


图 1 超速离心法分离纯化 AAV

子, 超速离心法能够有效地分离。不足之处是: (1) 操作时间较长, 完成 2~3 次超速离心, 需要 48~72 h, AAV 载体长期在黏性或者高渗透压 (蔗糖或者 CsCl) 的溶液中及超速离心的强剪切力作用下, 可能会导致载体粒子活力降低; (2) 要求操作人员的技术水平要高, 若操作不当, 则损失严重; (3) 在 AAV 的大规模纯化时, 通常需要处理 10~200 L 的细胞裂解液, 反复的离心处理, 操作烦琐, 不利于载体大规模纯化<sup>[11-12]</sup>。

## 2 液相色谱法

目前, 色谱技术是 AAV 规模化纯化的重要方法, 也是药物分析检测常用方法<sup>[13]</sup>。当澄清的病毒液流经固定相时, 固定相的功能区域与 AAV 衣壳蛋白或者所含有的基因组相互作用, 通过改变流动相的组成或者 pH 值而实现分离。

### 2.1 亲和色谱

2.1.1 肝素亲和层析 在 1998 年, 人们首次发现细胞表面的硫酸乙酰肝素糖胺多糖 (HSGAG) 是一种细胞受体, 能够与 AAV2 病毒载体相结合<sup>[14-15]</sup>。基于肝素亲和层析的结构与硫酸肝素蛋白聚糖相似性, 建立了肝素亲和层析分离纯化方法, 成为 AAV2 最为普遍使用的纯化方法<sup>[16-17]</sup>。但是该方法很难用于以 HSGAG 受体以外的其他血清型载体。相似的原理, 采用黏蛋白结合色谱分离 AAV4 和 AAV5, 见表 1。

表 1 分离纯化 AAV 载体的亲和色谱类型和种类

色谱类型	色谱种类	血清型	参考文献
肝素亲和色谱	Poros HE, Heparin agarose	AAV2	[18-21]
免疫亲和色谱	AVB sepharose HP/A20 Mab coupled to HiTrap-Sepharose	AAV1, AAV2, AAV8	[22-23]
生物素亲和色谱	Monomeric avidin agaros	AAV1	[24]
固定化金属镍亲和色谱	Ni-NTA agarose	AAV2, AAV8	[25]
黏蛋白亲和色谱	Mucin Sepharose	AAV4, AAV5	[26]

2.1.2 免疫亲和层析 AAV 血清型不同, 衣壳蛋白组成结构不同, 衣壳表面抗原与固定相抗体相互作用, 采用这种免疫亲和色谱方法分离 AAV。例如, 对插入生物素受体肽 (Biotin ac-

\* 副教授, 博士。研究方向: 分子药物与基因治疗。电话: 0792-8565939。E-mail: honghong2002-2005@163.com

ceptor peptide, BAP)的AAV1、2、3、4、5的衣壳,可以采用抗生物素蛋白(即亲和素)亲和层析进行纯化<sup>[27]</sup>,获得的AAV的纯度大于96.7%,且转导效率、靶向性与离子交换层析纯化的结果无明显差异。相似的,采用琼脂糖凝胶分离AAV1、AAV2和AAV8,通过简单纯化就可以得到95%以上纯度的载体<sup>[22-23]</sup>。这项技术的优势是适应性好,适用于多种AAV血清型载体,分离效果良好,一般一步纯化即可得到纯度较高的AAV。不足之处是:①以单克隆抗体为载体,从数百升的细胞裂解液或者培养基中分离AAV,成本较高;②由于抗原抗体结合比较牢固,因此该分离和洗脱条件是比较严格的,甚至要求非常低的pH(如AVB色谱分离AAV1和AAV8所采用的pH为2.7)、高盐等;③在规模化纯化过程中,在线消毒剂会影响配体的稳定性<sup>[11]</sup>。

**2.1.3 固定化金属镍亲和层析** 根据AAV2或者AAV8文库选择适宜肽段,在衣壳上插入组氨酸序列(His6),再利用次氨基三乙酸镍(Ni-NTA)与插入了His6标签的AAV2突变型结合进行固定化金属亲和层析。经此单步柱层析纯化所得AAV2、AAV8突变型的感染性病毒颗粒的产量超过90%,且在体内外研究中表现出与野生型AAV相近的基因转移率及滴度。该法的优势是选择性广、成本低、条件温和以及色谱结合能力较高,广泛应用于蛋白质的纯化。不足之处是AAV衣壳蛋白需要进行突变,形成具有特异金属结合位点<sup>[28]</sup>。

## 2.2 离子交换色谱

等电点是一个特殊的pH值,AAV的等电点由衣壳表面暴露的氨基酸侧链,以及包装在载体中的N端或者C端的静电荷总和决定<sup>[29-30]</sup>。

**2.2.1 阴离子交换色谱** 当溶液的pH大于AAV的等电点时,则可以采用阴离子色谱进行分离,如Poros HQ、Poros PI、Source 15Q、Q-Sepharose、HiTrap Q等用于纯化AAV1、2、4、5、6、8。为了提高载体纯度,需要阴离子交换色谱与阳离子色谱、亲和色谱或者超速离心法相结合<sup>[11]</sup>,见图2。本课题组前期研究比较了几种阴离子交换色谱,发现HiTrap ANX FF色谱相比于HiTrap DEAE FF、HiTrap Q<sup>XL</sup>、HiTrap Q FF色谱,都能用于AAV9的分离<sup>[31]</sup>。将含有基因的AAV8载体或者空壳样品,甚至混合载体与空壳标准样品上样在整体阴离子柱(CIM-QA)上,在50~150 mmol/L NaCl梯度洗脱条件下,能得到分离度较好的吸收峰,回收率达到99%,根据标准样品以及样品的峰面积计算,可以进行AAV8的相对定量<sup>[32-33]</sup>。分离纯化AAV载体的离子色谱类型及种类见表2。

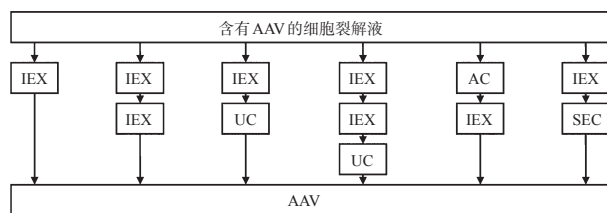


图2 色谱分离纯化AAV的工艺流程图

注:IEX为离子交换色谱;UC为超速离心法;SEC为分子排阻色谱

**2.2.2 阳离子交换色谱** 当溶液的pH小于AAV的等电点时,则可以采用阳离子色谱进行分离。在AAV2纯化时,澄清的细胞裂解液上样于含有100 mmol/L NaCl的20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)平衡的Poros 50HS柱上,平衡液洗涤,接着用含有370 mmol/L NaCl的磷酸盐缓冲液洗脱。再经过一次阳离子

表2 分离纯化AAV载体的离子色谱类型及种类

色谱类型	色谱种类	血清型	参考文献
阴离子交换色谱	Poros HQ	AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8	[8,34-36]
	Poros PI	AAV2、AAV4、AAV5	[36]
	HiTrap Q	AAV1、AAV2、AAV5	
	UnoQ	AAV1	[37]
	Mono Q HR	AAV5	[38]
	DEAE Macrorep	AAV2	
	Q-Sepharose	AAV1、AAV2	[35]
	CIM-QA monolithic disk	AAV8	[32]
阳离子交换色谱	Source 15Q	AAV2、AAV5、AAV8	[18]
	Poros 50HS	AAV2、AAV9	[35,39]
	SP Sepharose HP	AAV2、AAV5	[40]
	UnoS	AAV1	[37]
	Fractogel EMD SO3	AAV1	[37]
阳/阴离子交换膜	Mustang-S, ustang-Q	AAV1、AAV4、AAV6、AAV8	[41]
混合色谱	CHT	AAV9、AAV1	[37,39]

子色谱离子交换色谱,能够有效分离空壳病毒,得到的最终AAV产品的蛋白含量低于1%,空壳/实心比率从17:1降至0.2:1(即终产物中的空心病毒颗粒降低了86倍)。该工艺不仅适用于血清型AAV2载体,也可用于AAV6载体的纯化<sup>[35]</sup>。

**2.2.3 混合色谱** 在AAV9分离纯化时,发现其很难与一些离子交换色谱结合,或者即使结合了也很难建立适宜条件进行洗脱。将陶瓷羟基磷灰石(Ceramic hydroxyapatite chromatography, CHT)色谱洗脱峰收集液稀释2倍上样至Poros 50HS阳离子交换柱进一步纯化,可以得到98%纯度的病毒载体,体内外活性良好<sup>[39]</sup>。

**2.2.4 双离子交换吸收膜** 双离子交换膜通过暴露在膜表面的结合位点,能够在最短时间内与AAV结合,缩短作用时间,能够从细胞培养基以及细胞裂解液中捕获AAV载体<sup>[42-43]</sup>。相对于柱色谱,吸收膜色谱的体积更小,操作比较简便。膜色谱分离AAV载体既可以应用于小规模纯化<sup>[41]</sup>,也可以用于大规模纯化。Okada T等<sup>[41,43]</sup>报道,使用双离子吸收膜,可以分离AAV1、AAV4、AAV6、AAV8,得到的载体的空壳粒子数少于1%,可以用于体内外研究。

离子交换色谱纯化方法的优势:①可以根据实际需要进行调整,能够规模化纯化大体积的细胞裂解液或者AAV粗提物;②纯化工艺涉及的洗涤、洗脱溶液往往是pH适中的磷酸盐、Tris等缓冲溶液,利于保持病毒载体的生物活性;③所有操作可以在一个封闭的管路内完成,污染较小;④适于AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9等多种血清型<sup>[44]</sup>。不足之处在于不同血清型的病毒载体理化性质有所差异,因此需要建立不同血清型载体的纯化方法。

## 2.3 分子排阻色谱

分子排阻色谱依据病毒载体颗粒大小,将残余的蛋白质、DNA片段等杂质逐步分离。在AAV1分离纯化时,Superdex 200用作溶液更换,以备接下来的离子交换色谱<sup>[37]</sup>。此外,也可以用于AAV载体进行精制,提高纯度病毒载体<sup>[38]</sup>。不过,该方法通常很少单独使用,需与其他纯化方式相结合。

## 3 其他方法

### 3.1 化学试剂法

化学试剂法在病毒载体浓缩沉淀的时候经常使用,是采用硫酸盐、磷酸钙、氯化钙等无机试剂,或者非离子型表面活性剂,将AAV沉淀而进行初步分离<sup>[45-46]</sup>;也有报道采用化学试

剂结合简单的台式离心机就可以分离 AAV, 见图 3。但是化学试剂法一般不单独使用, 常常需要配合超速离心、色谱等方法联合使用。考虑到离心机需反复使用, 该方法不利于 AAV 的大规模纯化<sup>[47]</sup>。

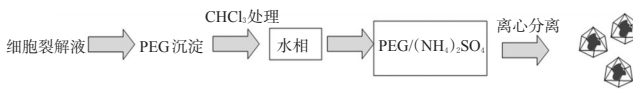


图 3 化学试剂法分离 AAV

### 3.2 超滤法

超滤法是 AAV 浓缩的主要方法, 经常用于降低溶液体积。通常 AAV 载体的分子质量超过 600 kDa, 这样的生物大分子很容易被截留而实现浓缩, 无机盐、水、小分子蛋白等则可以通过膜孔。据报道, 采用分子截留量为 100 kDa MWCO 的超滤膜, 在 10~12 psi 下, 可以将 AAV 样品溶液浓缩 130 倍, 且无载体损失。该法的优势是: 1) 分离过程不发生相变, 最大可能保持载体活性; 2) 适用于 GMP 条件下规模化纯化, 在封闭系统中无菌操作。但是超滤方法一般较少单独使用, 通常需要与色谱、超速离心法等纯化方法相结合。此外, 膜污染也是超滤方法不可回避的问题<sup>[11]</sup>。

### 4 结语

在 AAV 产品中, 残余的宿主细胞蛋白、牛血清蛋白、核酸酶或者核酸等杂质, 不但会影响转染效果, 而且会引起免疫反应<sup>[48]</sup>。为了得到较高纯度产品, 经常需要将超速离心法、液相色谱法、化学试剂法和超滤法联合应用, 如阳离子交换色谱 Poros HS 二次联用纯化 AAV2, Poros HS 结合阴离子色谱 Q-Sepharose 色谱纯化 AAV6, 获得载体纯度大于 90%<sup>[8]</sup>; CHT 色谱联合阴离子色谱纯化 AAV1, 获得载体纯度大于 95%<sup>[37]</sup>; CHT 色谱结合 Poros HS 纯化 AAV9, 获得载体纯度与 2 次超速离心方法纯化的结果相当<sup>[39]</sup>; SP 阳离子色谱联合阴离子色谱, 获得 AAV2、AAV8 载体纯度大于 98%<sup>[40]</sup>; 甚至, 采用 CsCl 或者碘克沙醇超速离心之后, 再用双离子吸收膜<sup>[45]</sup>和 CIM 色谱进一步分离的 AAV 等载体的纯度均达到 99%<sup>[32]</sup>。这样的高纯度, 能够满足 AAV 的临床以及临床前研究所需。载体纯度是液相色谱纯化工艺设计的一个主要指标。然而, 几种纯化方法联合使用时使操作步骤增加, 在每一个纯化步骤中, 回收率一般在 20%~60%<sup>[8, 11, 37]</sup>, 必然会造成载体的损失。目前, 上市销售的 Glybera 注射液, 位于“天价”药(5.3 万欧元/支)之列, 其中一个重要原因, 就是如今 AAV 载体规模化制备成本高、载体纯化的回收率低。因此, 回收率与纯度如何平衡, 一直以来是困扰人们的一个主要问题。随着人们对 AAV 结构和性质了解的不断深入, 液相色谱技术不失为一种有效途径, 可稳定地生产出安全、有效、廉价的 AAV 载体药物, 更好地满足临床试验以及市场需求。

### 参考文献

[1] Lisowski L, Tay SS, Alexander IE. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 17(24): 59.  
 [2] Gardner MR, Kattenhorn LM, Kondur HR, et al. AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges[J]. *Nature*, 2015, doi: 10.1038/nature14264.  
 [3] Scott LJ. Alipogene tiparvecic: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency[J]. *Drugs*, 2015, 75(2): 175.

[4] Watanabe N, Yano K, Tsuyuki K, et al. Re-examination of regulatory opinions in Europe: possible contribution for the approval of the first gene therapy product Glybera [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2015, doi: 10.1038/mtm.2014.66.  
 [5] 刁勇, 王启钊, 肖卫东, 等. 重组腺相关病毒载体相关性杂质[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(5): 717.  
 [6] Xu ZH, Shi CY, Qian QJ. Scalable manufacturing methodologies for improving adeno-associated virus-based phar-maprojects[J]. *Chin Sci Bull*, 2014, 59(16): 1 845.  
 [7] Wang Z, Halbert CL, Lee D, et al. Elimination of contaminating cap genes in AAV vector virions reduces immune responses and improves transgene expression in a canine gene therapy model[J]. *Gene Ther*, 2014, 21(4): 363.  
 [8] Qu G, Bahr-Davidson J, Prado J, et al. Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography[J]. *J Virol Methods*, 2007, 140(1/2): 183.  
 [9] Ayuso E, Mingozi F, Montane J, et al. High AAV vector purity results in serotype and tissue-independent enhancement of transduction efficiency[J]. *Gene Therapy*, 2010, 17(4): 503.  
 [10] Strobel B, Miller FD, Rist W, et al. Comparative analysis of cesium chloride- and iodixanol-based purification of recombinant adeno-associated viral (AAV) vectors for pre-clinical applications[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2015, 26(4): 147.  
 [11] Qu W, Wang M, Wu Y, et al. Scalable downstream strategies for purification of recombinant adeno-associated virus vectors in light of the properties[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2015, 16(8): 684.  
 [12] Segura MM, Kamen AA, Garnier A. Overview of current scalable methods for purification of viral vectors[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, doi: 10.1007/978-1-61779-095-9\_4.  
 [13] 唐思, 夏素霞, 董晓茜, 等. LC-MS/MS 测定人血浆中匹伐他汀代谢物匹伐他汀内酯浓度及其药动学研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(2): 219.  
 [14] Wong FF, Ho ML, Yamagami M, et al. Effective gene delivery to valvular interstitial cells using adeno-associated virus serotypes 2 and 3[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2015, 21(8): 808.  
 [15] Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions[J]. *J Virol*, 1998, 72(2): 1 438.  
 [16] Piedra J, Ontiveros M, Miravet S, et al. Development of a rapid, robust, and universal picogreen-based method to titer adeno-associated vectors[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2015, 26(1): 35.  
 [17] Pechan P, Ardinger J, Ketavarapu J, et al. Aurintricarboxylic acid increases yield of HSV-1 vectors[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2014, doi: 10.1038/mtm.2013.6.  
 [18] Brument N, Morenweiser R, Blouin V, et al. A versatile

- and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5[J]. *Mol Ther*, 2002, 6(5):678.
- [19] Potter M, Lins B, Mietzsch M, *et al*. A simplified purification protocol for recombinant adeno-associated virus vectors[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2014, doi: 10.1038/mtm.2014.34.
- [20] Cronin T, Vandenberghe LH, Hantz P, *et al*. Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter[J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(9):1 175.
- [21] Harbison CE, Weichert WS, Gurda BL, *et al*. Examining the cross-reactivity and neutralization mechanisms of a panel of mAbs against adeno-associated virus serotypes 1 and 5[J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 2):347.
- [22] Smith RH, Levy JR, Kotin RM. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(11):1 888.
- [23] Naumer M, Sonntag F, Schmidt K, *et al*. Properties of the adeno-associated virus assembly-activating protein[J]. *J Virol*, 2012, 86(23):13 038.
- [24] Arnold GS, Sasser AK, Stachler MD, *et al*. Metabolic biotinylation provides a unique platform for the purification and targeting of multiple AAV vector serotypes[J]. *Mol Ther*, 2006, 14(1):97.
- [25] Koerber JT, Jang JH, Yu JH, *et al*. Engineering adeno-associated virus for one-step purification via immobilized metal affinity chromatography[J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(4):367.
- [26] Shen S, Troupes AN, Pulicherla N, *et al*. Multiple roles for sialylated glycans in determining the cardiopulmonary tropism of adeno-associated virus 4[J]. *J Virol*, 2013, 87(24): 13 206.
- [27] Stachler MD, Bartlett JS. Mosaic vectors comprised of modified AAV1 capsid proteins for efficient vector purification and targeting to vascular endothelial cells[J]. *Gene Ther*, 2006, 13(11):926.
- [28] Münch RC, Muth A, Muik A, *et al*. Off-target-free gene delivery by affinity-purified receptor-targeted viral vectors [J]. *Nat Commun*, 2015, doi:10.1038/ncomms7246.
- [29] Wright JF. AAV empty capsids: for better or for worse? [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(1):1.
- [30] Venkatakrisnan B, Yarbrough J, Domsic J, *et al*. Structure and dynamics of adeno-associated virus serotype 1 VP1-unique N-terminal domain and its role in capsid trafficking[J]. *J Virol*, 2013, 87(9):4 974.
- [31] Qu W, Wang M, Wu Y, *et al*. Calcium-ion-modulated ceramic hydroxyapatite resin for the scalable purification of recombinant adeno-associated virus serotype 9[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.03.003.
- [32] Lock M, Alvira MR, Wilson JM. Analysis of particle content of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vectors by ion-exchange chromatography[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2012, 23(1):56.
- [33] Ye GJ, Scotti MM, Thomas DL, *et al*. Herpes simplex virus clearance during purification of a recombinant adeno-associated virus serotype 1 vector[J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2014, doi:10.1089/humc.2014.060.
- [34] Murray S, Nilsson CL, Hare JT, *et al*. Characterization of the capsid protein glycosylation of adeno-associated virus type 2 by high-resolution mass spectrometry[J]. *J Virol*, 2006, 80(12):6 171.
- [35] Wolff MW, Reichl U. Downstream processing of cell culture-derived virus particles[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10(10):1 451.
- [36] Doria M, Ferrara A, Auricchio A. AAV2/8 vectors purified from culture medium with a simple and rapid protocol transduce murine liver, muscle, and retina efficiently [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2013, 24(6):392.
- [37] P·M·Q·谢尔登, P·S·加尼翁, G·尼科尔斯, 等. 用于纯化重组 AAV 载体的改进方法: 中国, 2010800270123 [P]. 2010-06-16.
- [38] Ayuso E, Mingozzi F, Bosch F. Production, purification and characterization of adeno-associated vectors[J]. *Curr Gene Ther*, 2010, 10(6):423.
- [39] Zhou J, Yang X, Wright JF, *et al*. PEG-modulated column chromatography for purification of recombinant adeno-associated virus serotype 9[J]. *J Virol Methods*, 2011, 173(1):99.
- [40] Debelak D, Fisher J, Iuliano S, *et al*. Cation-exchange high-performance liquid chromatography of recombinant adeno-associated virus type 2[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, 740(2):195.
- [41] Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, *et al*. Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes[J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(9): 1 013.
- [42] Duffy AM, O'Doherty AM, O'Brien T, *et al*. Purification of adenovirus and adeno-associated virus: comparison of novel membrane-based technology to conventional techniques[J]. *Gene Ther*, 2005, 12(1):62.
- [43] Orr V, Zhong L, Moo-Young M, *et al*. Recent advances in bioprocessing application of membrane chromatography [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(4):450.
- [44] Burova E, Ioffe E. Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications[J]. *Gene Ther*, 2005, 12(1):5.
- [45] Dreesen IAJ, Lühinger NA, Stark WJ, *et al*. Tricalcium phosphate nanoparticles enable rapid purification, increase transduction kinetics, and modify the tropism of mammalian viruses[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(4): 1 197.
- [46] Ariza L, Giménez-Llort L, Cubizolle A, *et al*. Central nervous system delivery of helper-dependent canine adenovirus corrects neuropathology and behavior in muco-

