

AAVにDNAは含んでいますか？

SIMPLE WESTERNで中空/完全粒子のAAVの
高速で高感度な定量分析



ベクターゲノムの入っていない中空粒子のAAVは、遺伝子治療では望ましくない バイオプロセス不純物です

アデノ随伴ウイルス（AAV）はヒトの病気を対処する**遺伝子治療**のウイルスベクターとして頻繁に使われており、世界中で200を超える臨床第1〜3相試験が現在実施中です。遺伝子導入システムとして、AAVはプラスミドDNAにコード化された目的の遺伝子を含んでおり、その長さは最大で5kbに達します。AAVは不均一な混合物になる可能性があり、たとえば30%はベクターゲノムが封入された完全粒子（目的のプラスミドDNAを含む）、70%はゲノムが封入されていない空または部分的に空（目的のプラスミドDNAを含まない）の混合最終サンプルが産生されることがあります。これら中空粒子または不完全粒子は効力と免疫原性に影響を与える可能性があり、AAV製造バイオプロセス上の望ましくない副産物として懸念されています。透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscopy: TEM）、超遠心分析（Analytical Ultracentrifugation: AUC）、イオン交換クロマトグラフィー（Ion-Exchange chromatography: IEX）などの従来の分析ツールでカプシド含有量の評価をすることはできますが、複雑で手間がかかり、データの再現性、スループット、およびスケラビリティに課題があります¹⁻⁴。したがって、遺伝子導入に用いるAAVサンプルの中空/完全粒子（Empty/Full）を効率的かつ高感度で定量するより良い方法とシステムが必要とされています。

製造ワークフローに合わせた拡張性を実現する、AAV中空/完全粒子評価の高感度、高再現性の多機能ツール

このアプリケーションノートでは、キャピラリー電気泳動と、従来の**ウェスタンブロット**抗体を用いた免疫検出をシームレスに組み合わせた次世代生体分子分析ツールであるSimple Western™によるAAV粒子のDNA含有量を定量する新規手法を開発しましたのでここに紹介いたします。ここではSimple WesternでAAVサンプルを**サイズ(分子量)**または**電荷**によって自動で分離し、これらのAAV中心成分をキャピラリー内で、抗DNAおよび抗VP1/2/3抗体を用いて特異的かつ高感度で直接検出し定量的かつ再現性よく測定することが可能です。各抗体について、シグナル強度がサンプル量に対して線形に相関する範囲を特定し、サンプル中の総AAVに対する完全粒子のAAVの割合(%: 別名、DNA比)を正確に定量する迅速で高感度なアッセイを実現します。

AAVは製造が難しくコストがかかります。したがって、AAV分析においての重要なポイントは、Simple Westernでは微量サンプルで分析ができることです - このアッセイに必要なサンプルはわずか3μLで、1ウェルあたり 7.2×10^7 の微量ウイルス粒子（Viral Particles: VP）を検出することができます。Simple Westernを用いると24サンプルをわずか5時間、または96サンプルを一晩で分析するため、AAV製造ワークフローに必要な高いスループットをもたらします。Simple Westernは柔軟なマルチプレックス化学発光と業界をリードする感度を備えたNIR/IR蛍光検出も行います。これにより同一性アッセイと同時に**プロセス関連不純物の多項目特性分析**を行う総タンパク質検出が可能になります。

中空/完全粒子を定量するCE-SDSベースのアッセイを実証に加えて、直交するアッセイとして、等電点電気泳動（Isoelectric Focusing: IEF）後に免疫検出する電荷ベースのSimple WesternでインタクトなAAVを分析し、中空/完全粒子のAAVを特性評価するという概念実証も示します。

Simple Westernは、他のCEベースのアプローチに比べ検出感度と特異性に優れ、結果が出るまでの時間が短い上に優れた再現性と簡易性の点から、AAV製造ワークフローで中空/完全粒子のAAVを正確に、高感度で、迅速に定量するという重要なニーズを解決できる可能性を持っていると考えられます。

AAVカプシドのDNA量評価のための材料と方法

この研究のすべてのサイズ実験はJess™で、すべての電荷実験はPeggy Sue™で行いました。Simple Westernサイズアッセイの材料は表1に、Simple Western電荷アッセイの材料は表2に示します。

SIMPLE WESTERNサイズアッセイのサンプル準備と測定条件

Sample Buffer (1×)とFluorescent master mix (1×)およびイオン交換水を含む48μLの溶液に2μLのAAVサンプルを混ぜ、AAVサンプルを準備しました。次に95°Cで10分間加熱した後、室温まで冷却しました。

試薬	メーカー	P/N
10X Sample Buffer	Bio-Techne	042-195
EZ Standard Pack		PS-ST01EZ-8
Wash Buffer		042-202
Antibody Diluent 2		042-203
Streptavidin-HRP		042-414
Anti-rabbit secondary antibody		042-206
20X anti-mouse secondary antibody NIR		043-821
RePlex™ Module		RP-001
Luminol-S		043-311
Peroxide		043-379
12-230 kDa Pre-filled Plates		PS-PP03
Capillary cartridges, 25 capillaries		PS-CC01
Rabbit anti-dsDNA antibody	Novus Biologicals	NBP3-07302
Mouse anti-VP1/2/3 antibody	PROGEN	65158
Nuclease (Benzonase)	Sigma	E1014
AAV1, 2, 3, 5 6, 9 Full (~2 x 10 ¹² VP/mL) and Empty	Virovek	N/A

表1A. Simple Westernサイズアッセイで用いた材料。

% FULL	AAV # (VP/mL)	ゲノムコピー数 (GC/mL)
5	2.18 x 10 ¹³	9.64 x 10 ¹¹
25	2.41 x 10 ¹³	6.12 x 10 ¹²
34	1.69 x 10 ¹³	5.81 x 10 ¹²
56	1.49 x 10 ¹³	8.41 x 10 ¹²
81	1.26 x 10 ¹³	1.02 x 10 ¹³
92	1.21 x 10 ¹³	1.11 x 10 ¹³

表1B. Simple Westernのサイズ実験で用いたVirovekのAAV9の完全粒子/総AAV、AAV粒子数(VP/mL)、およびゲノムコピー数(GC/mL)。

JessのRePlex™アッセイでサンプルを分析しました。このアッセイは1回目のプロービング後、用いた抗体を除去し、もう一つの抗体で2回目のイムノアッセイを続けて行うアッセイです。抗体間で交差反応が認められたため、マルチプレックスの代わりにRePlexアッセイを選択しました。最初のプロービングではAntibody Diluent 2で50倍希釈したAnti-dsDNA monoclonal antibodyとAnti-rabbit HRP detection antibodyでサンプルをプロービングしました。その後抗体を除去した後、Antibody Diluent 2で50倍希釈したAnti-VP1/2/3 monoclonal antibodyとAntibody Diluent 2で希釈した1×Secondary anti-mouse NIR detection antibodyでプロービングしました。

サンプルをヌクレアーゼで処理するために、Benzonaseをメーカー推奨のバッファーで10倍希釈で使用し、ネガティブコントロールとしてバッファーだけのサンプルを加えました。キャピラリー内で直接30分間インキュベートして各Benzonase処理を行いました。

SIMPLE WESTERN電荷アッセイのサンプル準備と測定条件

AAVサンプルをSimpleSolで段階希釈し、最終的にIEFマスターミックスと混合しました。サンプル溶液には最終的に50% SimpleSol、1% Biolyte 5-8、1% Biolyte 8-10、0.35% Methylcellulose、10 mM Arginine、pI marker ladder 3 (pI 4.9 - 7.3)、pI markers 8.4および9.7が入っていました。フォーカシング条件は21000 mWの一定電力で35分、固定時間は220秒に設定しました。

試薬	VENDOR	パート番号
Amplified Mouse Secondary Antibody Detection Kit	Bio-Techne	041-127
SimpleSol		046-575
500 mM Arginine		042-691
pI Standard Ladder 3		040-646
pI Standard 8.4		041-036
pI Standard 9.7		040-790
Mouse anti-ssDNA antibody		NBP2-29849
1% Methyl cellulose		101876
Mouse anti-VP1/2/3 antibody	PROGEN	61058-647
Nuclease (Benzonase)	Sigma	E1014
Biolyte 5-8	Bio-Rad	1631192
Biolyte 8-10	Bio-Rad	1631182
AAV9-CMV-GFP	Virovek	N/A

表2. Simple Western電荷アッセイで用いた材料。

SIMPLE WESTERNサイズアッセイを用いた中空/完全粒子のAAV検出アッセイの結果

まず、Simple Western SizeアッセイでAAVサンプルのVP1/2/3とDNAを、Anti-VP1/2/3とAnti-DNA抗体で同時に測定し、中空/完全粒子のAAVを検出するイムノアッセイを開発しました。この概念を証明するために、5%~92%が完全粒子のAAV9サンプルをJessのSimple WesternでRePlexアッセイを用いて分析しました。RePlexアッセイはもう一つの抗体で2回目のイムノアッセイを行うために、1回目のプロービングで用いた抗体を除去します。このRePlexアッセイでは、プローブ1でAnti-DNA抗体を用いて化学発光検出し、プローブ2でAnti-VP1/2/3抗体を用いてNIR検出し、1回の測定でAAVタンパク質とDNAの両方を順次免疫検出しました。従来のウェスタンブロットのストリッピングとリプロービング法とは異なりサンプルはキャピラリーの内壁に共有結合しているため、RePlexアッセイではプロービングサイクルの間にサンプルおよびそのシグナルの損失はありません。

この分析により、66~100 kDaの予想分子量 (MW) でVP1/2/3タンパク質に対する3つのシグナルを検出し、300kDaを超えるMWでDNAに対するシグナルをはっきりと検出しました(図1A、B)。一般に、完全粒子のAAV9の割合(%)が増加するにつれて、DNAに対するピーク面積は増加しましたが、VP1/2/3シグナルのピーク面積は比較的一定でした(図1C)。これらの結果はSimple WesternがDNAとVP1/2/3分子をそれぞれ個別に認識す

る抗体を用いて、サンプル内の総AAVに対する完全粒子のAAVの割合(%: 完全粒子/総AAV)を測定できることを示唆しています。

これらの結果から、Simple Westernアッセイを用いて特定のサンプルの完全粒子のAAVの割合を計算するために検量線を作成しました。そのため各VP1/2/3の総ピーク面積を、完全粒子の割合が最も低いAAV9サンプル(%:メーカーの仕様書1に記載)のVP1/2/3の総ピーク面積で割って、完全粒子が5%のAAV9サンプルのVP1/2/3総ピーク面積の相対値が1になるようにしました。次に、各絶対DNAピーク面積をその相対VP1/2/3総ピーク面積で割ってDNAピーク面積をノーマライズし、これらのノーマライズ後のDNA面積を各AAV9サンプルの完全粒子のAAVの割合値(%)でプロットしました。線形回帰分析も行い検量線を作成しました(図1D)。最後に、この検量線を用いて、メーカーの仕様書から25%のAAVが完全粒子と予想されるサンプルで、完全粒子のAAVに対する空または部分的に空の非完全粒子のAAVの比率を計算しました。予想通り、25%は完全粒子のAAVで、75%は中空または部分的にDNAを欠如した非完全粒子のAAVでした(図1E)。これらの結果を総合すると、Simple WesternがAAVサンプル中のDNA含有率もしくは総AAV粒子に対する完全粒子のAAVの比率を正確に定量できることを示しています。

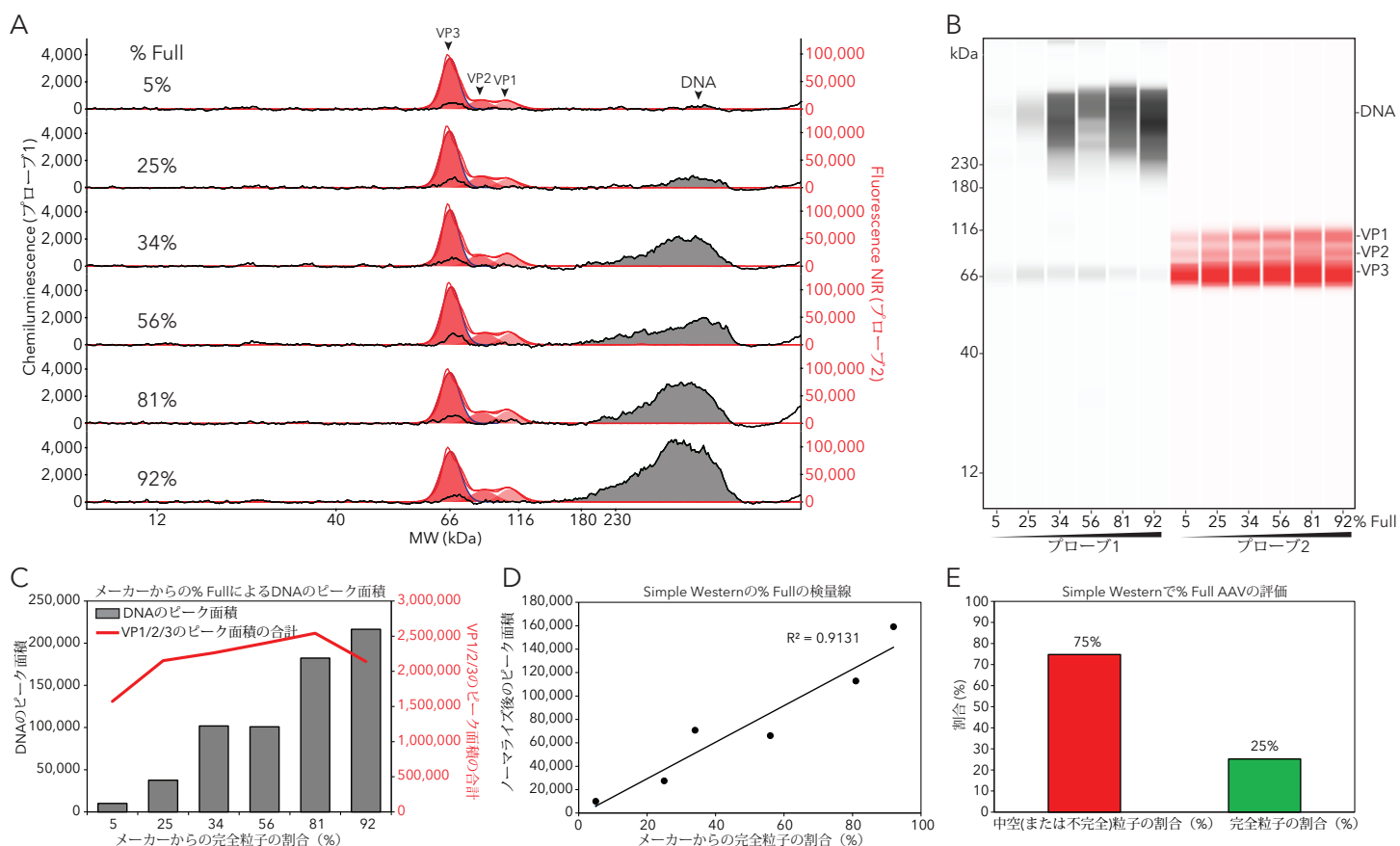


図1. Simple Westernの中空/完全粒子のAAVを評価するアッセイ。RePlexアッセイのプローブ1で抗DNA抗体を用いてプロービングし化学発光検出、プローブ2で抗VP1/2/3抗体を用いてプロービングしNIR検出し完全粒子の割合(%)のわかっているAAV9サンプルの(A)エレクトロフェログラムと(B)レーン表示。各サンプルの完全粒子のAAVの割合は、“%Full”で示した。(C) DNAとVP1/2/3ピークの面積は、AAV9の% fullでプロットした。(D) DNAのピーク面積を相対的なVP1/2/3のピーク面積でノーマライズし、理論上のAAV9サンプルの% fullでプロットして、Simple Westernの% fullの検量線を作成した。(E) Simple Westernの% fullの検量線を用いて、メーカーから購入し25%が完全粒子とされているAAVサンプルで観察した完全粒子と中空(または不完全)粒子のAAVの比率を計算した。

特異性の高いDNA検出

高分子量領域のシグナルは抗DNA抗体によるDNA検出の結果であるということをさらに証明するために、AAVウイルス粒子をヌクレアーゼで処理すると、DNAが減少し、抗DNA抗体によるシグナルが減少するかどうかを検証しました。未処理のAAVウイルス粒子、ヌクレアーゼで処理した粒子、およびヌクレアーゼバッファーでのみ処理したウイルス粒子と比較すると、ヌクレアーゼで処理したサンプルでのみ抗DNA抗体のシグナルはほとんど検出されませんでした(図2、下部パネル)。一方、抗VP1/2/3抗体のシグナルは3つすべてのサンプルにわたって比較的一定でした(図2)。これらの結果は、ヌクレアーゼがAAV粒子の核酸を分解したことを示しており、抗DNAと抗VP1/2/3抗体を用いたSimple Westernで中空粒子と完全粒子のAAVを識別できるという結論と一致しています。

1ウェルあたり 7.2×10^7 VPの検出限界

これまでの結果から、Simple WesternアッセイAAVサンプル中のDNA含有率もしくは総AAV粒子に対する完全粒子のAAVの比率を正確に定量できることがわかりました。この概念実証が確立されたので、DNAとVP1/2/3検出のダイナミック線形範囲を検討しました。そのため上述のように、92%の完全粒子のAAV9サンプルを段階希釈後、RePlexアッセイを用いてJessで各サンプル希釈溶液を分析しました。予想通り、AAV9サンプル濃度が減少するにつれてDNAとVP1/2/3の両方のシグナルが減少しました(図3A)。次に、AAV9サンプル濃度に対してDNAとVP1/2/3のピーク面積をプロットしダイナミックレンジ(図3B)と定量範囲(図3C)を検討したところ、 2.4×10^{10} VP/mL~ 4.8×10^{11} VP/mLでDNAとVP1/2/3のシグナルが線形関係にあることが明らかになりました。1ウェルに必要なサンプル量はわずか $3\mu\text{L}$ のため、必要量は 7.2×10^7 VPと微量でした。

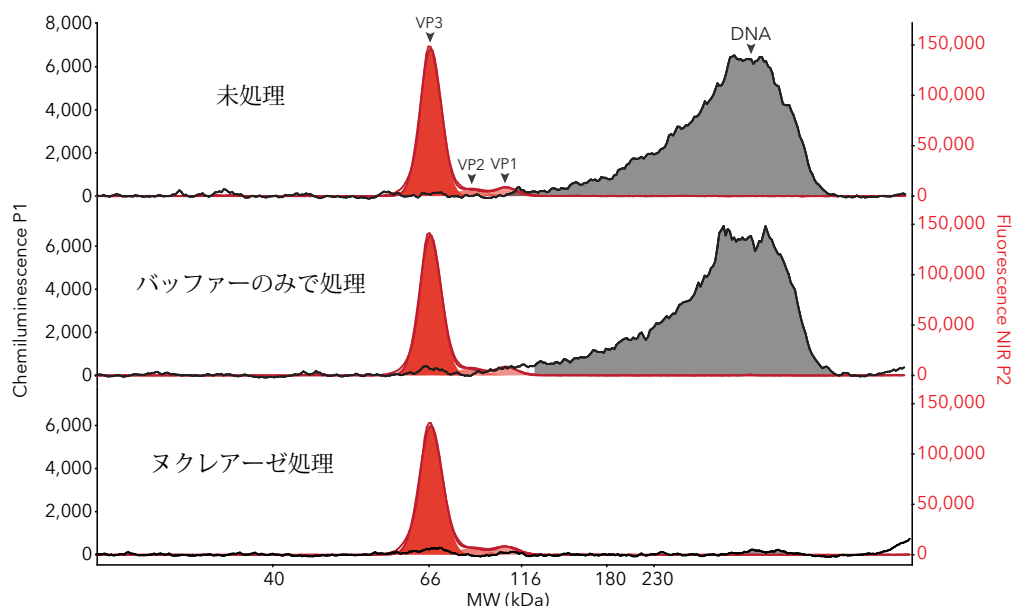


図2. 未処理 (上段)、バッファーのみで処理(中段)、またはヌクレアーゼ入りのバッファーで処理した(下段) 92%が完全粒子のAAV9のSimple Western分析。RePlexアッセイの1回目のプロービングで抗DNA抗体を用いてサンプルをプロービング後、化学発光検出用二次抗体で検出し、2回目のプロービングで抗VP1/2/3抗体を用いてプロービング後、NIR検出用二次抗体で検出したAAV9サンプルのエレクトロフェログラムビュー。

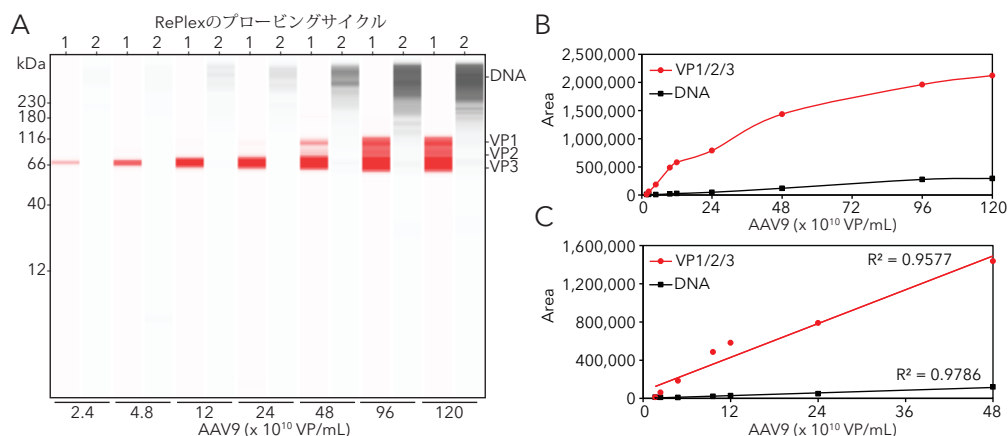


図3. 92%が完全粒子のAAV9を段階希釈しSimple Western分析。(A) RePlexアッセイの1回目のプロービングで抗DNA抗体を用いてサンプルをプロービング後、化学発光検出用二次抗体で検出し、2回目のプロービングで抗VP1/2/3抗体を用いてプロービング後、NIR検出用二次抗体で検出したAAV9サンプルのレーンビュー。DNAとVP1/2/3のピーク面積をAAV9のサンプル濃度に対してプロットし、(B) ダイナミックレンジと (C) 定量範囲を決定した。

様々なAAV血清型への適用性

次にSimple Westernの中空/完全粒子のAAV検出アッセイをAAV9以外の血清型でも用いることができるかどうか検討しました。前述のように、RePlexアッセイを用いてAAV1、2、3、5、および6の中空および完全粒子のサンプルをJessで分析しました。その結果、完全粒子のAAVサンプルでのみDNAを検出したのに対し、中空粒子のAAVサンプルではほとんど、またはまったくDNAが検出されませんでした(図4)。これらの結果は、Simple Westernの中空/完全粒子のAAV検出アッセイをAAV9以外の血清型でも用いることができることを示唆しています。

一貫した結果: 日々の再現性

たとえば従来のウェスタンブロットやELISAなど、AAVワークフローで通常使用される他の免疫分析法は手間もかかり、多くの

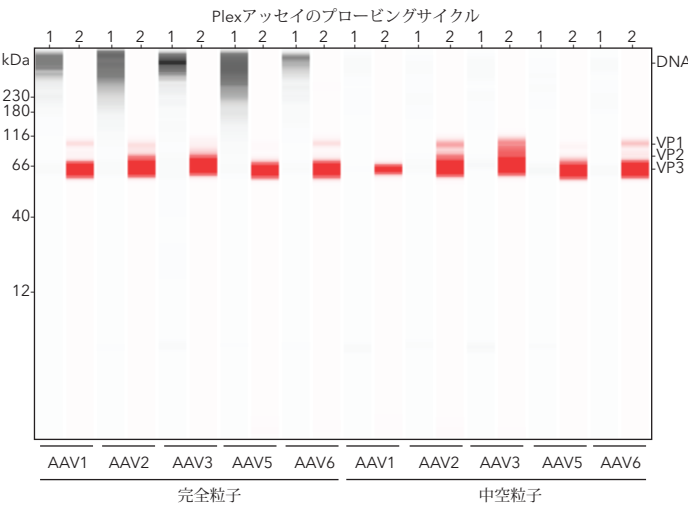


図4. Simple Westernの中空/完全粒子検出アッセイを異なるAAV血清型に適用。RePlexアッセイの1回目のプロービングで抗DNA抗体を用いてサンプルをプロービング後、化学発光検出用二次抗体で検出し、2回目のプロービングで抗VP1/2/3抗体を用いてプロービング後、NIR検出用二次抗体で検出したAAV9サンプルのレーンビュー。

マニュアルステップがあるため再現性に悪影響を与えます。対照に、Simple Westernでは自動で、サンプルの分離、固定、洗浄、および検出などすべての工程をキャピラリー内で行い、異なる日でも優れた再現性で結果を取得します。そこで、Simple Westernの中空/完全粒子のAAV検出アッセイの日間再現性を検討しました。このため、前述のようにRePlexを用いて、JessでAAV1、AAV6、およびAAV9の中空粒子と完全粒子のサンプルを1日1回、3日間分析しました。次に、すべてのデータ(n = 9)においてDNAおよびVP1/2/3のピーク面積の平均(図5)とCV値(表3)を計算しました。製造元の仕様書によると、AAV1/6は少なくとも90%のAAVが完全粒子であり、これは、アッセイの相対的なDNAシグナル強度と一致することに留意することが重要です(図5B)。ここでテストした条件下ではVP3検出での再現性が最も高く、すべてのCVは10.0%以下でした。唯一の例外としてAAV6を使用すると、DNA検出でより高いCVが観察されました。これは、分離範囲が広く高分子量領域のピーク面積が広いためと考えられます。しかしながらこの分析は、同じサンプルを用いて数日間にわたりSimple Westernの中空/完全粒子のAAV検出アッセイを行った場合、一貫した結果を得られると想定することが可能であることを示しています。

サンプル	DNA	VP3	VP2	VP1
AAV1完全粒子	22.8	5.3	11.6	7.7
AAV1中空粒子	38.7	8.5	28.5	27.2
AAV6完全粒子	5.4	2.2	8.0	5.3
AAV6中空粒子	5.6	3.7	11.1	10.5
92%が完全粒子のAAV9	15.5	10.0	18.6	22.0
5%が完全粒子のAAV9	46.5	7.2	19.0	12.7

表3. Simple Westernの中空/完全粒子のAAV検出アッセイの日間再現性分析から得たDNAとVP1/2/3検出のCV (%; n=9)。

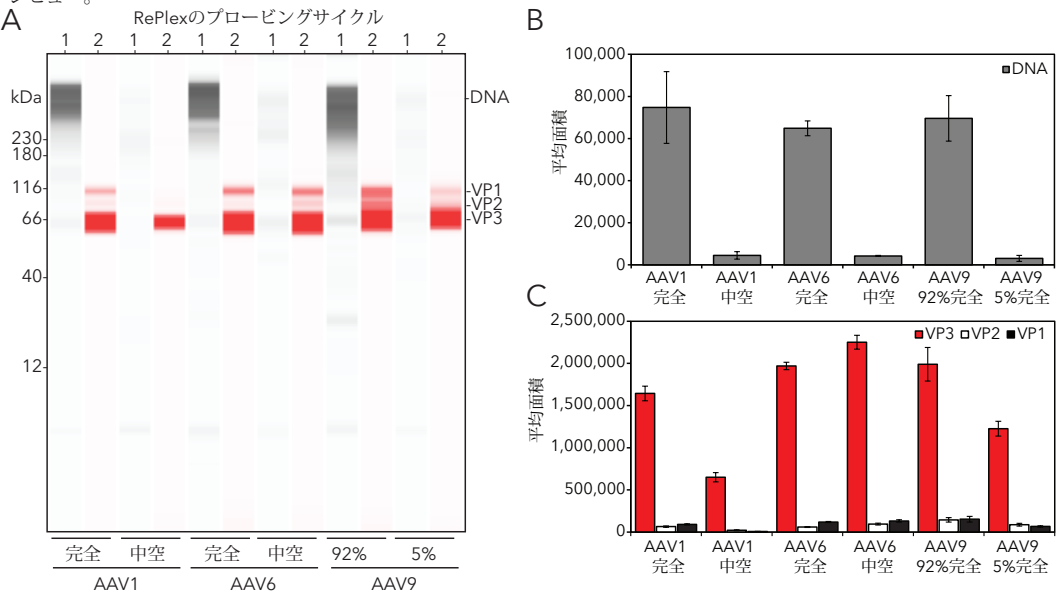


図5. Simple Westernの中空/完全粒子のAAV検出アッセイの日間再現性。(A) RePlexアッセイの1回目のプロービングで抗DNA抗体を用いてサンプルをプロービング後、化学発光検出用二次抗体で検出し、2回目のプロービングで抗VP1/2/3抗体を用いてプロービング後、NIR検出用二次抗体で検出したAAV9サンプルのレーンビュー。各血清型の(B) DNAと(C) VP1/2/3のピーク面積の平均をプロット。エラーバーは平均値からの標準偏差を示す (n=9)。

SIMPLE WESTERNチャージアッセイを用いた中空/完全粒子のAAV検出アッセイの結果

最後に、中空/完全粒子のAAV検出アッセイをSimple Westernサイズアッセイで確立したので、IEFで非変性(インタクト)粒子を分離し、その後従来のウェスタンブロット抗体を用いてシームレスに免疫検出するSimple Westernチャージアッセイを行えるかどうかをテストしました。上記の材料と方法で説明したようにサンプルを調製し、Simple Western Peggy Sueで分析し、抗DNAおよび抗VP1/2/3抗体でプローブしました。

77%が完全粒子のAAV9サンプルを用いた分析でインタクトなAAV9粒子に対する強いシグナルを両方の抗体で観察しました(図6A、上部パネル)。対照に、完全粒子が9%含むAAV9サンプルでは抗VP1/2/3抗体でのみ強いシグナルを検出しましたが、抗DNA抗体ではシグナルはほとんど、もしくはまったく観察されませんでした(図6A、下のパネル)。興味深いことに、抗VP1/2/3抗体で検出された中空粒子のAAV9の電荷分離プロファイルは、より広く酸性領域に分布しており、カプシド内の核酸量がウイルス粒子の安定性に影響を与えることを示しています。これらの結果はSimple Westernサイズアッセイに加えて、Simple Westernの中空/完全粒子のAAVアッセイをSimple Westernチャージアッセイでも行うことができることを示しています。Simple Westernチャージアッセイは別の角度からAAV

を評価する方法として役立つ可能性があり、たとえばカプシド内のDNA量が、ウイルス粒子全体の構造安定性や等電点に与える影響など、AAV分析に新しい知見を得られる可能性があります。

Simple Westernのサイズアッセイと同様に、AAV9ウイルス粒子をヌクレアーゼで処理すると、抗DNA抗体のシグナルが減少するかどうかをテストしました。未処理のAAVウイルス粒子、ヌクレアーゼバッファーでのみ処理したウイルス粒子、またはヌクレアーゼで処理した粒子と比較すると、ヌクレアーゼで処理したサンプルでのみ実質的に抗DNAシグナルは検出できませんでした(図6B、上部パネル)。一方3つのサンプルすべてにわたって、比較的一定の抗VP1/2/3抗体のシグナルを検出しました(図6B、下のパネル)。これらのデータは、ヌクレアーゼがAAV9粒子のDNAを分解したことを示しており、抗DNA抗体のシグナルはウイルスカプシドの中のDNAによるものであることを確認しています。

77%もしくは9%が完全粒子のAAV9サンプルで取得した各エレクトロフェログラムを重ね合わせて、VP1/2/3とDNAのピーク面積を比較しました(図7A)。VP1/2/3とDNAのピーク面積を定量すると、VP1/2/3の倍率変化は1.8倍で、DNAの倍率変化は15.8倍でした(図7B)。したがって、VP1/2/3でノーマライズするとカプシド内のDNA量の倍率変化は8.9倍であり、AAV9サンプル製造元の仕様書(9%もしくは77%のAAV9が完全粒子)とほぼ一致しています。

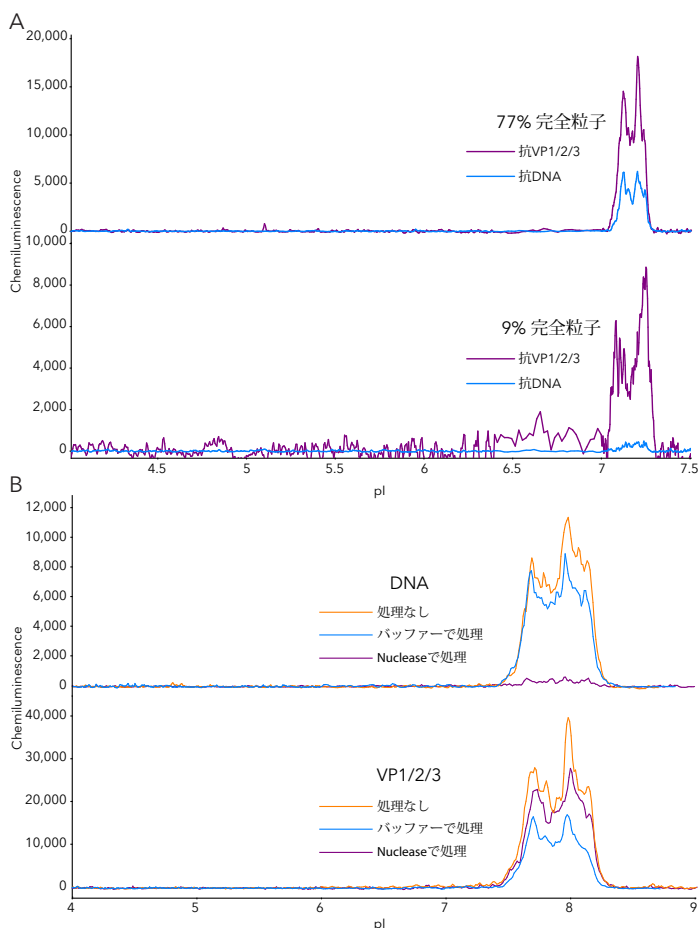


図6. Simple Westernチャージアッセイを用いたAAV9の中空/完全粒子検出アッセイ。(A) 77%と9%が完全粒子のAAV9サンプルで抗DNAと抗VP1/2/3抗体を用いてシグナルを検出した。(B) 抗DNAと抗VP1/2/3抗体でプローブした77%が完全粒子のAAV9のヌクレアーゼ処理。

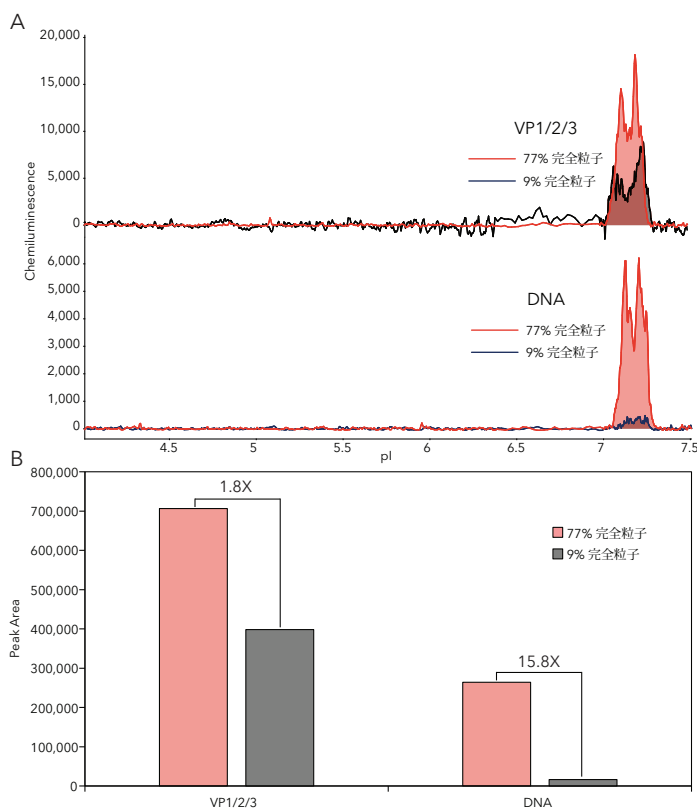


図7. Simple Western チャージアッセイを用いたAAV9の中空/完全粒子検出アッセイから得たVP1/2/3とDNAシグナルの比較。(A) 抗VP1/2/3 (上段) と抗DNA (下段) 抗体を用いて、77%が完全粒子 (赤) および 9%が完全粒子 (黒) のAAV9のサンプルでシグナルを検出。(B) 77%が完全粒子および9%が完全粒子のAAV9サンプルのVP1/2/3とDNAのピーク面積の定量。

優れた感度、優れた再現性、および優れたサンプル処理能力を備えた全自動中空/完全粒子のAAV定量

細胞および遺伝子治療のアプリケーションにおいて、ウイルスベクターの純度は治療の有効性と安全性にとって重要です。バイオプロセス製造過程で生じる中空のウイルス粒子は、効力を低下させ毒性を誘発するだけです。サンプル中の中空ウイルス粒子の割合を迅速に測定する方法は今までありませんでした。ここでは、ウイルスカプシドと核酸を別々に認識する抗体を用いたSimple Westernサイズとチャージアッセイで、サンプル中の完全および空のAAV粒子のウイルスカプシド内DNA量を定量的に特性評価する新しい方法を開発しました。本法で得られた結果は、核酸含有物を標的としたシグナルと各サンプル中の完全粒子AAVの割合との間に線形相関を示し、サンプル中の中空または不完全粒子のAAVの割合の定量的評価が可能であることを示しました。

この方法の主な利点は、Simple Westernが完全自動の免疫検出プラットフォームであり、一晩で最大96サンプルを処理するスループットを備えていることです。この自動化により人件費が削減されるだけでなく、製法開発中の反復操作が高速化されます。同様に、Simple Westernの必要サンプル量がわずか3μLである点も大きな利点であり、最終製品の力価への影響を最小限に抑え、1ウェルあたりわずか7.2 x 10⁷VPでの分析を可能にします。

SIMPLE WESTERNは複雑なサンプルに対応できる多項目同時特性評価メソッドです

Simple Westernは細胞ライセートのような非常に複雑なサンプルでもタンパク質を特異的に検出できるイムノアッセイです。これは、CE-SDS、cIEF、SEC-MALS、HPLCなどのカプシド内のDNA量を評価する他の方法とは対照的です。これらは直接UVまたは蛍光で検出しており、複雑なサンプルタイプでの使用には限界があります⁵⁻⁶。ELISAは細胞ライセート中のAAVを同定することはできませんが、一回のアッセイで同時に純度に関する情報を取得することはできません。この点でELISAはたった一つの事を評価する単一項目特性評価方法です。対照に、SYPRO Rubyのような最も感度の高いSDS-PAGEゲル染色技術の感度に匹敵し、業界をリードする5x Total Protein Detectionを用いると、同じアッセイで同一性、カプシドタンパク質比、中空/完全粒子の評価、ウイルスの力価、タンパク質発現制御能力と純度を同時に取得することから、Simple Westernは多項目同時特性評価メソッドとなります⁷。Simple Westernの5x Total Protein Detectionアッセイは、AAV製造における製造工程関連の不純物を検出できます⁷。したがって、多項目のSimple Westernアッセイは、粗製または精製途中のサンプルを処理する上流ワークフロー、そしてさらに、目的物質由来の残留不純物や中空/完全粒子のDNA含有比を検出する下流ワークフローに統合できることが期待されます。

参考文献

1. Analytical strategies for quantification of adeno-associated virus empty capsids to support process development, X. Fu, W. Chen, C. Argento, et al., *Hum Gene Ther Methods*, 2019; 30:144-152.
2. Analysis of particle content of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vectors by ion-exchange chromatography, M. Lock, M. Alvira, J. Wilson, *Hum Gene Ther Methods*, 2012; 23:56-64.
3. Anion-exchange chromatography for determining empty and full capsid contents in adeno-associated virus, H. Yang, S. Koza, W. Chen, *Waters Applications Note*.
4. Developing an anion exchange chromatography assay for determining empty and full capsid contents in AAV6.2, C. Wang, S. Mulagapati, Z. Chen, et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019; 15:257-263.
5. Quality by design (QbD) for adeno-associated virus (AAV): A framework for a QbD assessment for AAV products within the chemistry manufacturing and controls (CMC), P. Cashen, B. Manser, *White Paper, Pall Corporation*.
6. Assessing your AAV product quality? Get the confidence you need with Maurice, W. McElroy, C. Heger, J. Wei, *Application Note, ProteinSimple - A Bio-Techne Brand*.
7. Concentrating on AAV Impurities with Ultrasensitive Total Protein Detection on Simple Western, *Application Note, ProteinSimple - A Bio-Techne Brand*.

Learn more | bio-techne.com/instruments/simple-western
Learn more | bio-techne.com/p/instruments/simple-western/request-quote

WHERE SCIENCE INTERSECTS INNOVATION™

詳細についてはお問い合わせいただくか、以下のサイトをご覧ください:

プロテインシンプル ジャパン株式会社
東京都日本橋室町 3 丁目4-7
日本橋室町プラザビル 9F
TEL: 03-5542-1436 FAX: 03-5542-1437
Email: info.japan@proteinsimple.com
www.proteinsimple.jp

biotechne®
bio-techne.com

R&D SYSTEMS

**NOVUS
BIOLOGICALS**

TOCRIS

proteinsimple

ACD

exosomedx

Global info@bio-techne.com bio-techne.com/find-us/distributors TEL +1 612 379 2956 North America TEL 800 343 7475
Europe | Middle East | Africa TEL +44 (0)1235 529449 China info.cn@bio-techne.com TEL +86 (21) 52380373

Trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

AN_Simple Western AAV Empty Full_STRY0209051