

Pokročilá agregační analýza lentivirů pomocí SEC-HPLC

SRT-LVL SEC 2000 Å



— **Sepax Technologies, Inc.** —

Yinan Zhang, Linting Li, Xuyang Zhang, Sepax Technologies, Inc.

Kevin McManus, Ismaeel Muhamed a Daniel Mitchell, Matica Biotechnology



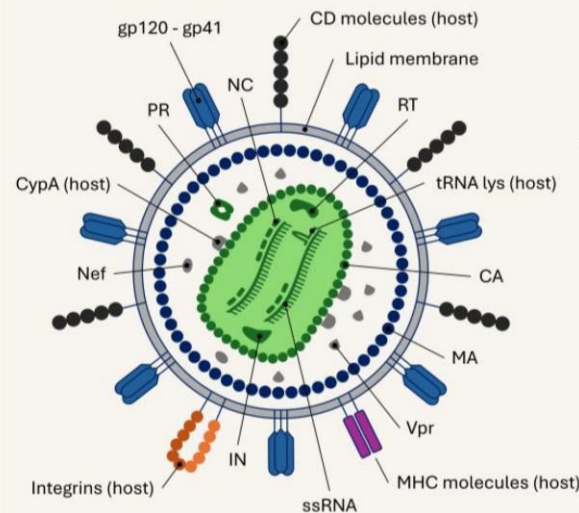
www.sepax-tech.com



Lentivirus

- ❖ Lentiviry (LVV) jsou rod retrovirů charakterizovaný jedinečnou schopností infikovat jak dělicí se, tak nedělicí se buňky. Na rozdíl od mnoha svých virových příbuzných, kteří musí počkat, až se během replikace rozpadne jaderná membrána buňky, mají lentiviry speciální „pasy“ (signály pro lokalizaci v jádře), které umožňují jejich genetickému nákladu vstoupit do neporušených jader.
- ❖ Nejznámějším členem je virus HIV-1. Moderní biotechnologie tyto viry „vyprázdnila“ a zbavila je jejich patogenních genů, aby vytvořila vysoce účinné vektory pro přenos genů. Tyto uměle vytvořené nosiče jsou nyní základem mnoha „jednorázových“ terapií, které poskytují trvalou a stabilní integraci terapeutických genů do DNA pacienta za účelem léčby mnoha stavů od vzácných genetických poruch až po komplexní druhy rakoviny.

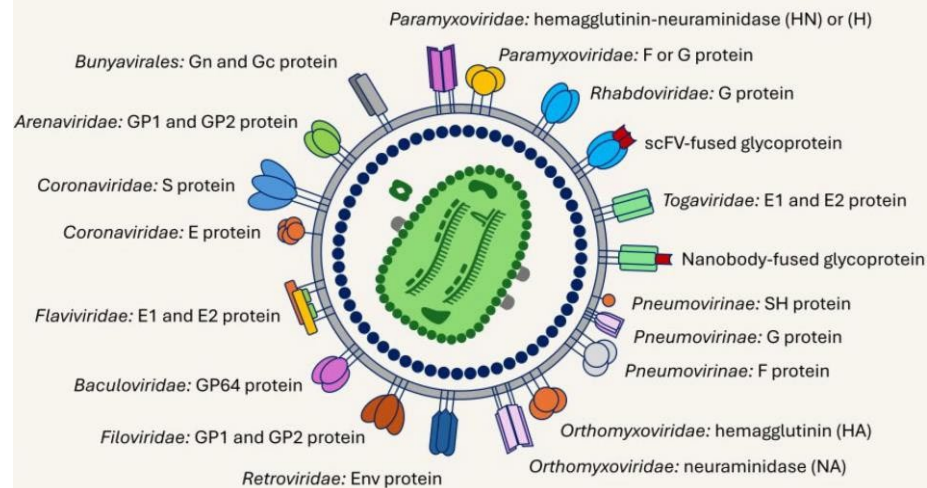
A. Structure of HIV-1 virion



Obrázek 1. Struktura lentivirové částice a její pseudotypizace. (A) Struktura zralého virionu HIV-1, připomínající lentivirovou vektorovou částici. Dvě kopie virové genomové ssRNA jsou zapouzdřeny kapsidou (CA) spolu s nukleokapsidou (NC), reverzní transkriptázou (RT), integrázou (IN) a tRNA lys, které jsou obklopeny lipidovou membránou a matričním proteinem (MA) se začleněnými obalovými a receptorovými proteiny. V částici jsou také proteáza (PR), virové a hostitelské buněčné proteiny.

(B) Řády, čeledi nebo podčeledi virů, které kódují obalové glykoproteiny, které se používají k pseudotypizaci lentivirových vektorů, jakož i k inženýrství obalových proteinů. *Viruses*, 2025, 17(8), 1036; <https://doi.org/10.3390/v17081036>

B. Pseudotyping of lentiviral vectors



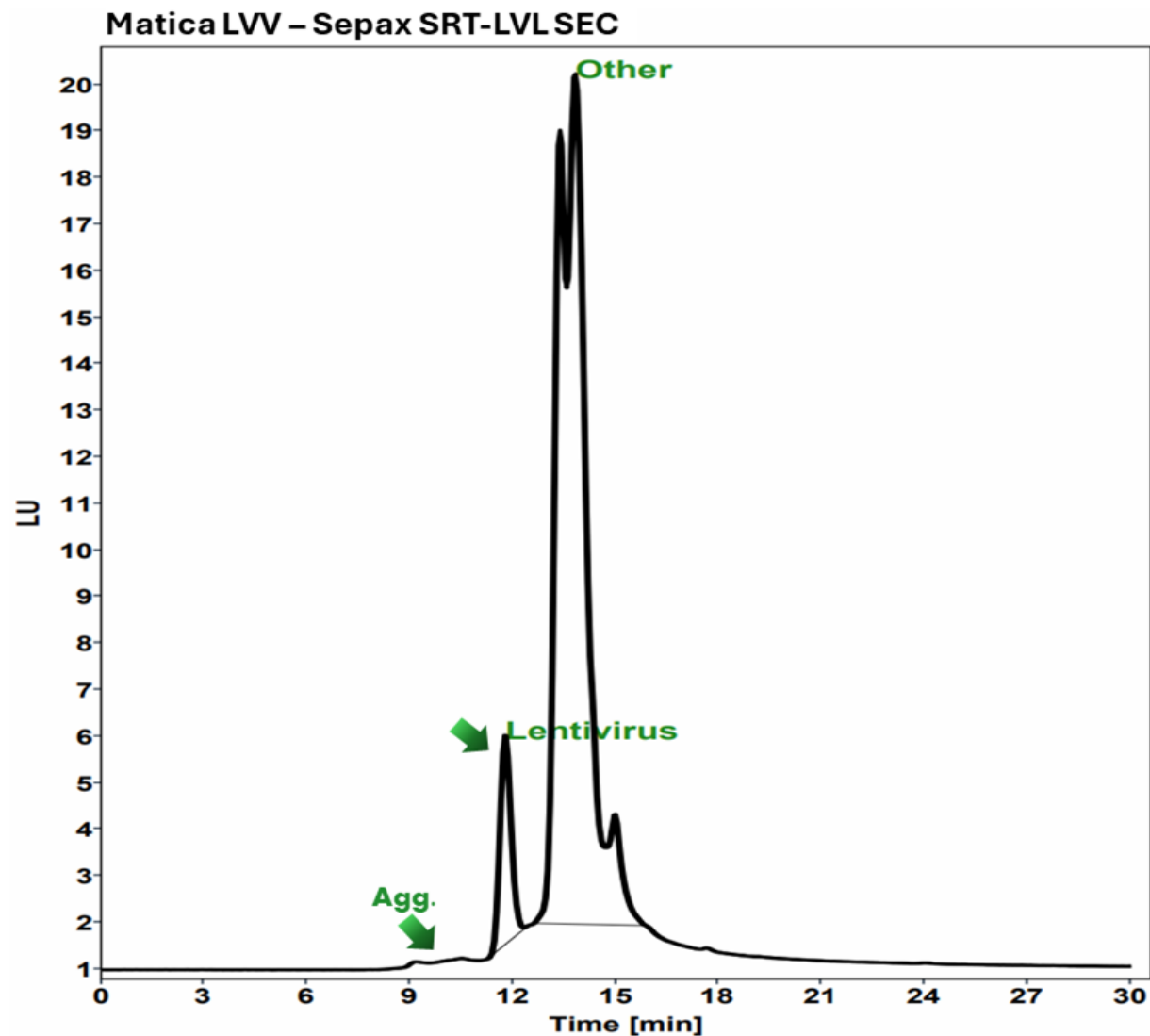


Fáze	SRT-LVL SEC
Velikost částic	5 μm
Velikost pórů	2000 Å
Silika	sférická, vysoká čistota
Struktura povrchu	chemicky vázaná monovrstva
Doporučené typy vzorků	ve vodě rozpustné polymery, virové částice, oligonukleotidy s dlouhým řetězcem a lipidové nanočástice

Metoda HPLC	Podrobnosti
Mobilní fáze	80 mM fosfátový pufr, 50 mM KCl, 250 ppm NaN_3 , pH 6,5
Průtok	0,3 ml/min
Detektor	UV 260 a 280 nm FLD Ex=284 nm a Em=345 nm
Přístroj	Agilent 1260 Infinity II HPLC

Vzorek	Lentivirus
Informace o vzorku	Lentivirus
Dodavatel vzorku	Matica Biotechnology
DLS	Hydrodynamický poloměr: 80 nm PDI: 0,27



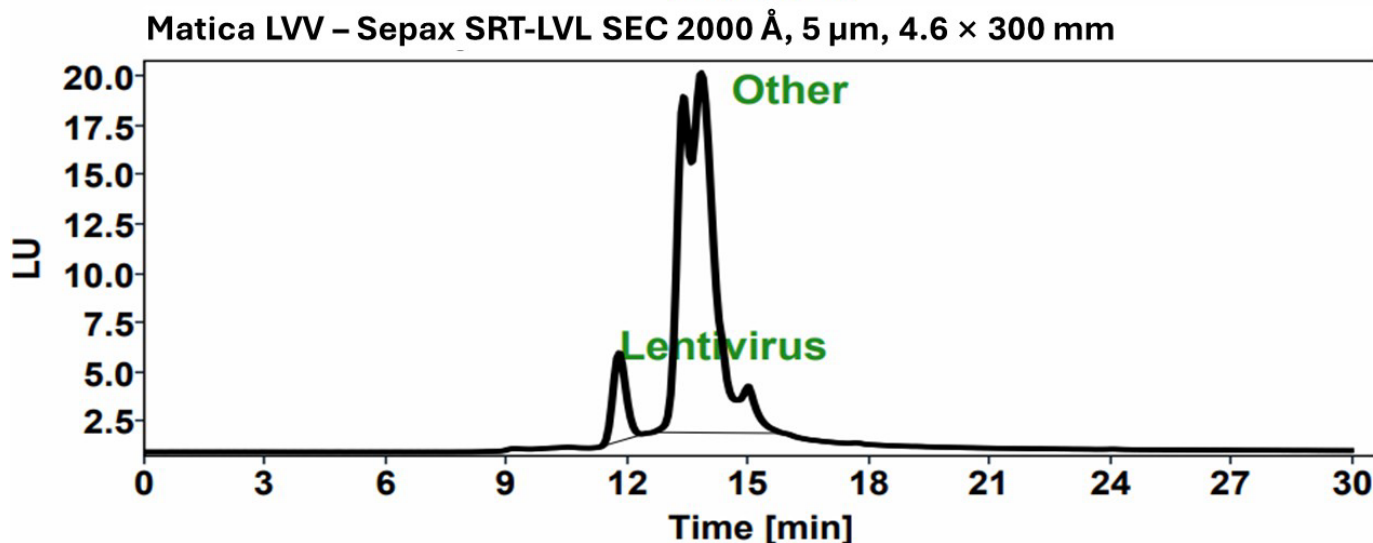
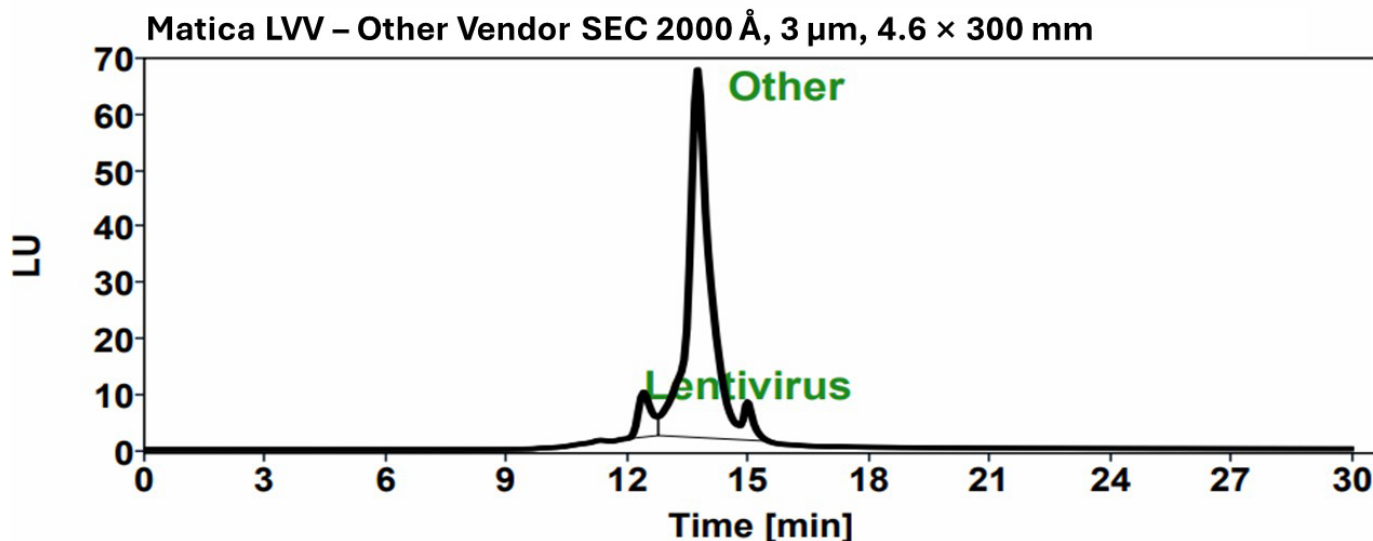


- ❖ **2000 Å póry:** zajišťují, že rozlišení je striktně regulováno velikostí, čímž se zabraňuje nechtěným interakcím, které způsobují prodloužení nebo rozšíření píku.
- ❖ **Neutrální hydrofilní monovrstva:** Speciální povlak, který chrání podkladovou siliku a minimalizuje „lepivost“, která je typická pro virové obaly.
- ❖ **Minimální sekundární interakce:** Účinně potlačuje elektrostatické a hydrofobní vazby s molekulami konjugovanými s lipidy, PEG a polysacharidy.
- ❖ **Vynikající výtěžnost vzorků:** Výrazně zlepšuje výtěžnost neporušených lentivirových částic tím, že zabraňuje jejich ulpívání na koloně.
- ❖ **Spolehlivé profilování agregace:** Poskytuje čistší a spolehlivější data pro lentivirové vektory a další lipidová bioterapeutika.



Altium

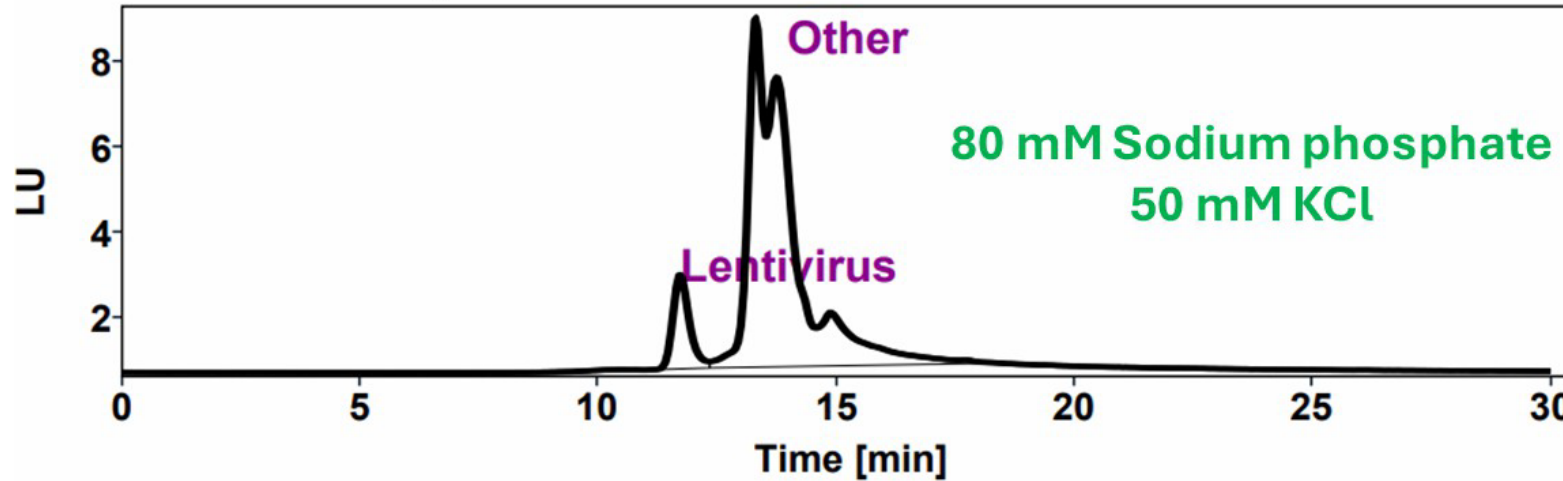
Vynikající rozlišení pro LVV: Sepax vs. konkurence



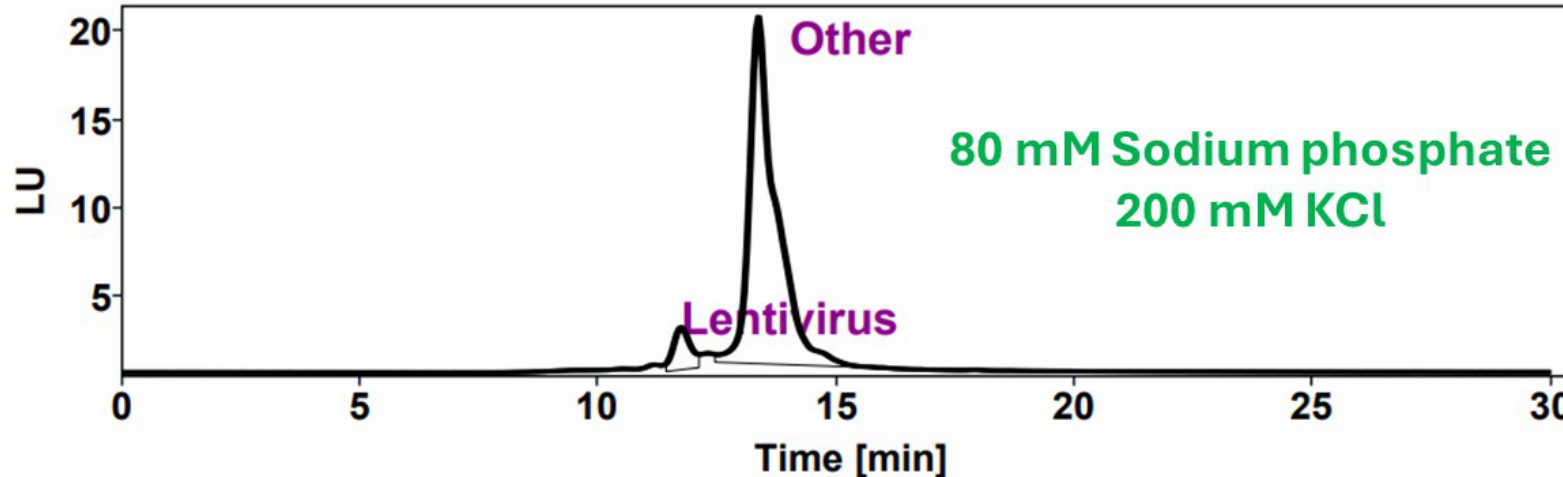
- ❖ **Vynikající rozlišení**
- ❖ **Upravený hydrofilní povrch:**
Potlačuje nežádoucí sekundární interakce mezi „lepkavými“ virovými obaly a křemičitou bází.
- ❖ **Vylepšené analytické výsledky:**
Poskytuje vyšší výtěžnost, lepší symetrii píků a vynikající rozlišení částic a nečistot.
- ❖ **Přesná kvantifikace:**
Zabraňuje rozšiřování píků a nespecifické vazbě, které jsou typické pro méně hydrofilní alternativy, čímž zajišťuje spolehlivou analýzu.
- ❖ **Chemie povrchu nad velikostí částic:**
Menší velikost částic neznamená vždy lepší rozlišení; u velkých, „lepkavých“ vzorků, jako je LVV, je povrchová chemie a přístupnost pórů důležitější než tradiční škálování velikosti částic.



Matica LVV – Sepax SRT-LVL SEC 2000 Å – low salt condition



Matica LVV – Sepax SRT-LVL SEC 2000 Å – high salt condition



❖ **Faktor ovlivňující výkon:**

Úprava koncentrace soli a iontové síly je pro optimalizaci chování kolony klíčová.

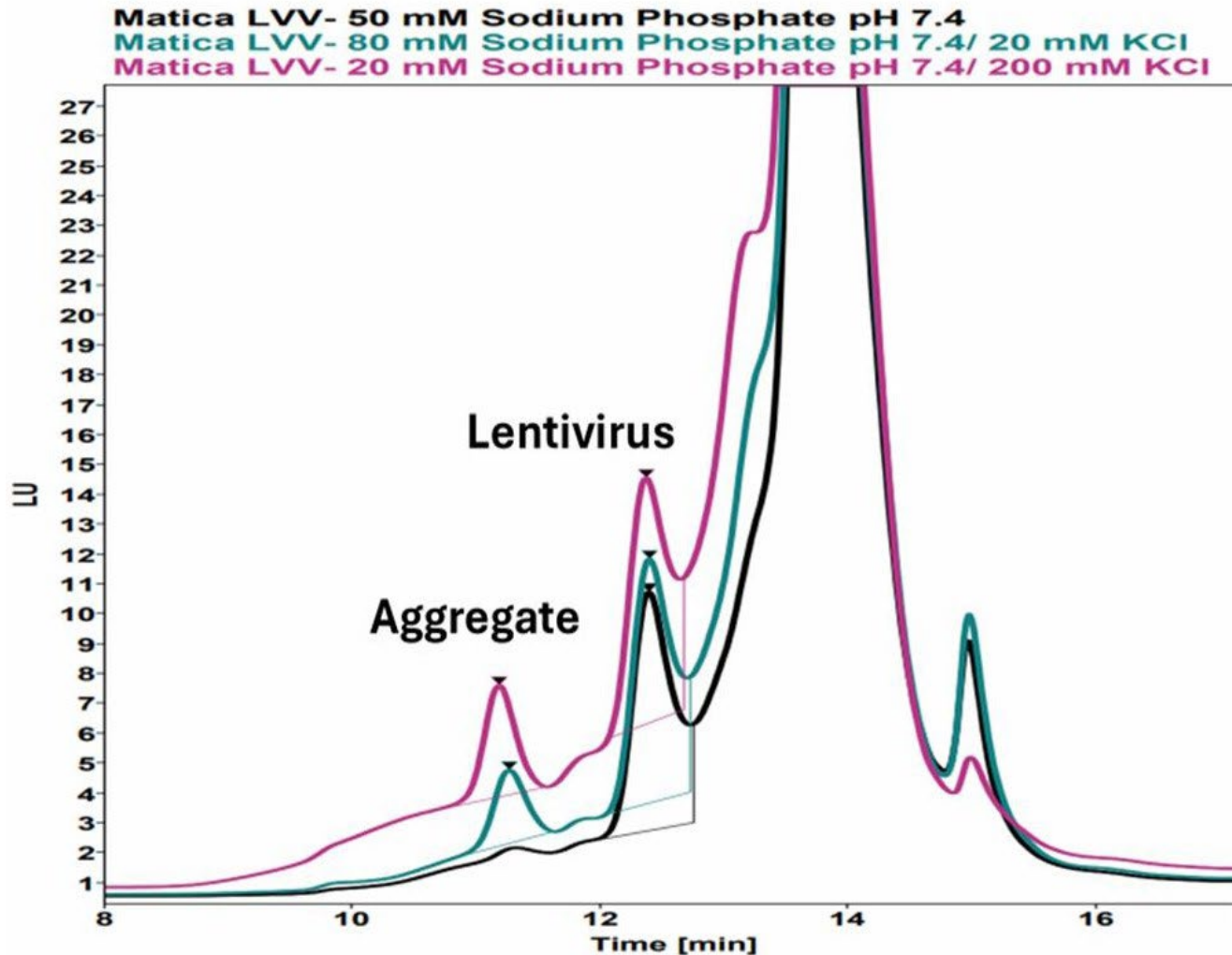
❖ **Snížená elektrostatika:**

Mírná iontová síla potlačuje zbytkové elektrostatické interakce mezi virovými částicemi a stacionární fází.

❖ **Zlepšená kvalita píku:**

Optimalizace podmínek vede k ostřejším tvarům píků a vyšší citlivosti signálu.

❖ **Zlepšené rozlišení:** Usnadňuje lepší rozlišení mezi agregáty, lentivirovým vektorem a nečistotami s nízkou molekulovou hmotností.



Aby bylo možné dosáhnout optimálního analytického výkonu pro lentivirové vektory, musí být iontová síla strategicky vyvážená.

- ❖ **Nízká iontová síla** vede k nízké citlivosti v důsledku nespecifické vazby
- ❖ **Příliš vysoká iontová síla** maximalizuje agregovaný signál, riskem je eluce menších nečistot
- ❖ **Mírná iontová síla** (přibližně 100 mM) obvykle poskytuje nejlepší kompromis.

Tato rovnováha zajišťuje vysokou citlivost signálu pro velké virové částice a zároveň zachovává nezbytné rozlišení pro druhy s nízkou molekulovou hmotností (LMW).



Závěr

- ❖ SRT-LVL SEC: velikost pórů 2000 Å je navržena tak, aby pojala velké biomakromolekuly, což umožňuje separaci cílených virových částic od HMW agregátů a LMW nečistot/fragmentů na základě velikosti.
- ❖ Konstruovaný hydrofilní povrch minimalizuje nespecifickou vazbu: Stacionární fáze využívá hydrofilní povlak, který pomáhá chránit povrch křemíku a omezuje nežádoucí interakce, což je důležité pro „lepkavé“ virové vektory, což podporuje vyšší výtěžnost a čistší agregační profily.
- ❖ Vysoký objem pórů a separační kapacita: SRT-LVL SEC pryskyřice jsou popsány jako pryskyřice se speciálně ultra širokými póry, což se promítá do vyšší nosnosti a lepšího rozlišení velkých biomolekul/částic.
- ❖ Flexibilita detektoru: Fáze SRT-LVL SEC je plně kompatibilní s UV, MALS a dalšími detekcemi, poskytuje nízkou úroveň šumu a stabilní signály bez nutnosti delšího vyrovnavání, čímž umožňuje efektivní a spolehlivou charakterizaci agregace.



SRT-LVL SEC 2000 Å

PN	Kolona	Velikost částic	Velikost pórů	Vnitřní průměr × délka
219980-7830	SRT-LVL SEC	5 µm	2000 Å	7,8 × 300 mm
219980-7805	SRT-LVL SEC	5 µm	2000 Å	7,8 × 50 mm, předkolonka
219980-4630	SRT-LVL SEC	5 µm	2000 Å	4,6 × 300 mm
219980-4605	SRT-LVL SEC	5 µm	2000 Å	4,6 × 50 mm, předkolonka

Výrobce:

Webové stránky: www.sepax-tech.com

Telefon: 1-877-SEPAX-US

E-mail: info@sepax-tech.com

LinkedIn: Sepax Technologies

Facebook: @Sepaxtech

Dodavatel:

Altium International s.r.o.

www.altium.net | www.hpst.cz

e-mail: info.cz@altium.net

LinkedIn: **Altium Czechia**

Facebook: <https://www.facebook.com/hpstsro/>

Technické dotazy a vývoj metod: techsupport@sepax-tech.com