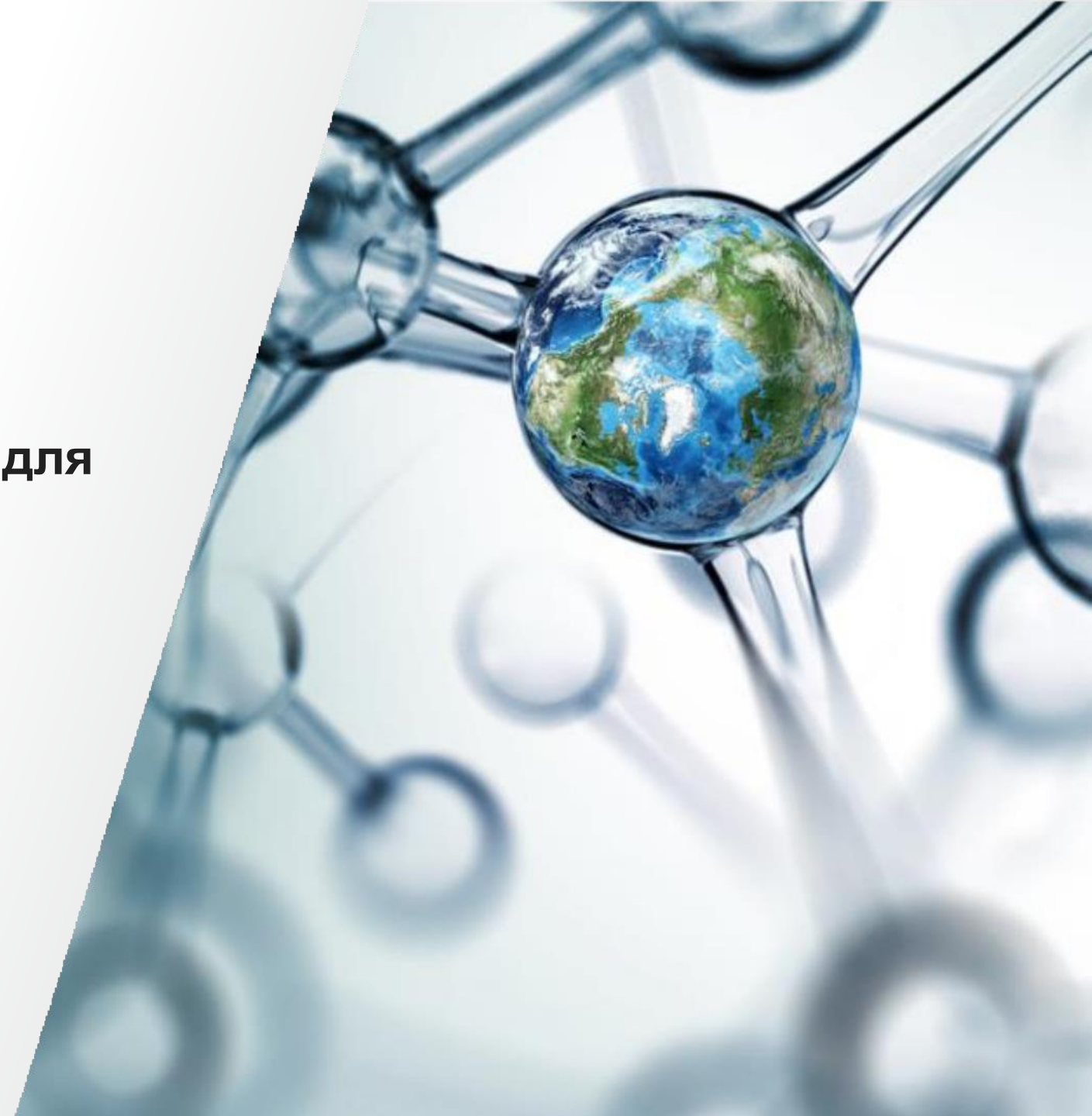


Хроматографические технологии для производства биологических препаратов

Декабрь 2020 г.

 The world leader in serving science



Биотехнологические смолы для аффинной хроматографии

ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ

- КарраXL и КарраXP
- FcXL и FcXP
- CH1-XL
- LambdaXP
- MabCapture™ A Select
- IgE

ПРЕПАРАТЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ И ВАКЦИНЫ

- Heparin
- Вектор на основе аденоассоциированного вируса, серотип 8 (AAV8), AAV9, AAVX
- C-tagXL
- OligoDT(25)

БЕЛКОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ

- FSH
- HSA
- Хорионический гонадотропин человека (hCG)
- tPA
- TSH
- Гормон роста человека (hGH)
- Фактор X

Неафинные биотехнологические смолы

АНИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- XQ
- HQ50
- D50
- PI50

КАТИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- XS
- HS50

ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- Ethyl
- Benzyl
- Benzyl Ultra

ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- OLIGO R3

Решения для клиентов

- Разработка смолы POROS для клиента
- Разработка лиганда и смолы для аффинной хроматографии CaptureSelect

Предварительно наполненные колонки и аналитические инструменты

- Предварительно наполненные биотехнологические колонки EvolveD™
- Средства для ВЭЖХ
- ИФА для определения утечки
- RoboColumns
- Колонки для оценки вместимостью 1 мл и 5 мл
- Лиганды, конъюгированные с биотином

Колонки EvolveD – ключевые характеристики

- Произведенные и наполненные в окружающей среде классифицированной по ISO7
- Готовые к использованию форматы, пригодные для процессов, соответствующих действующим требованиям GMP
- Подходящие для прямого подсоединения к стандартным хроматографическим системам
- Неметаллический материал, с которым контактирует поток, устраняет риск возникновения коррозии и контаминации процесса, что позволяет использовать высокие концентрации солей (при необходимости)
- Для аппаратного обеспечения колонок и наполненных смол имеются документы для поддержки регистрации



Оптимизация рабочего процесса очистки путем исключения стадий подготовки и наполнения колонки

Биотехнологические продукты очистки для аффинной хроматографии захвата



Технология CaptureSelect

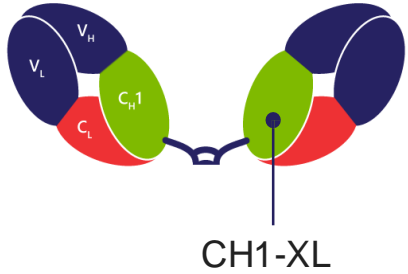
- Высокая степень чистоты в одну стадию захвата
- Уменьшенное количество стадий процесса
- Мягкие условия элюирования
- Эффективная очистка от примесей

Поддержка разработки антител нового поколения

Новый элемент: CaptureSelect™ LambdaXP

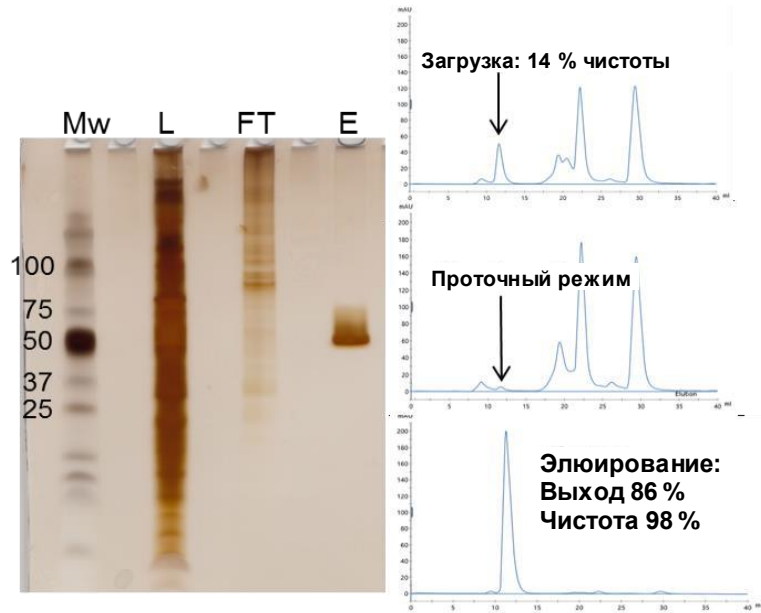
<p>CaptureSelect CH1-XL</p> <p>Fab Fab2</p>	<ul style="list-style-type: none">✓ Платформа очистки Fab✓ Связывание с областью CH1✓ Отсутствие связывания свободных легких цепей
<p>CaptureSelect КаппаXP</p> <p>Fab Би-специфичный IgG, содержащий легкую цепь каппа</p>	<ul style="list-style-type: none">✓ Разработана для фрагментов Fab и би-специфичных продуктов✓ Связывание с областью C_L-каппа (или C_L-лямбда)✓ Высокая способность динамического связывания✓ Мягкое элюирование
<p>CaptureSelect FcXP</p> <p>IgG Fc-гибридный белок</p>	<ul style="list-style-type: none">✓ Разработано для Fc-гибридных белков, а также IgG, которые слабо связываются с белком A✓ Связывание с областью CH3 (Fc)✓ Мягкое элюирование

Платформа для очистки фрагмента Fab – матрица для аффинной хроматографии CaptureSelect™ CH-1XL



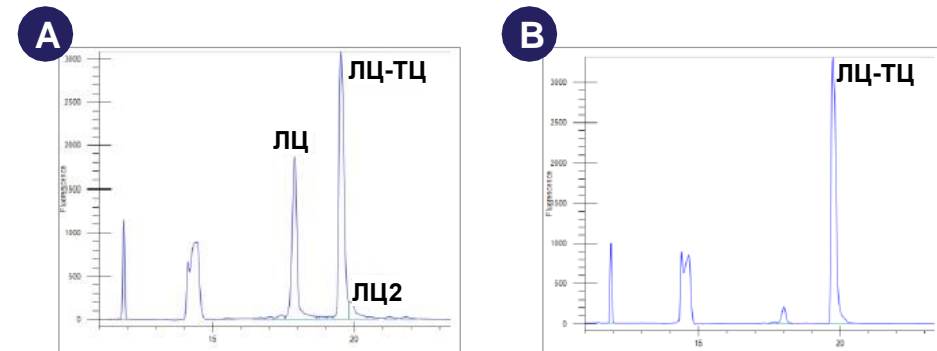
- Связывается с постоянной областью тяжелых цепей (CH1) всех подклассов человеческого IgG
- Отсутствие совместной очистки свободных легких цепей (только правильно собранные фрагменты Fab)
- Способность динамического связывания; ~19 мг/мл для поликлонального Fab
- Эффективное элюирование при мягком pH
- Доступна на агарозе с магнитным слоем для автоматических рабочих процессов

Одностадийная очистка фрагмента Fab



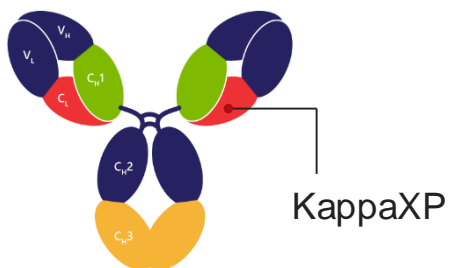
Загрузка ранизумаба, полученного на основе клеток HEK293 (фрагмент Fab). Эксперимент очистки демонстрирует высокий выход и чистоту за всего одну стадию

Отсутствие связывания с легкой цепью



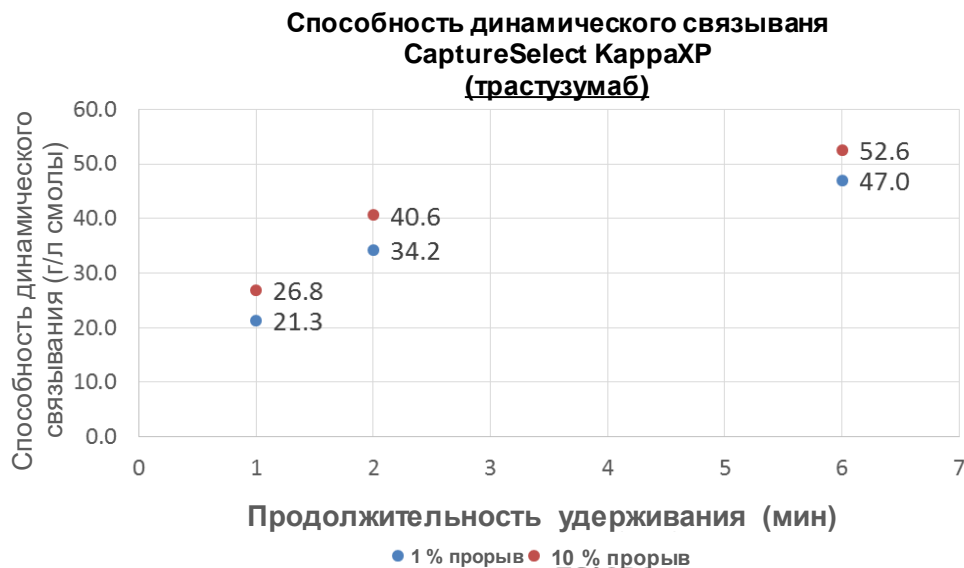
Лабораторный анализ на чипе по очистке фрагмента Fab демонстрирует отсутствие связывания легких цепей (ЛЦ) или димеров легких цепей (ЛЦ2) в элюируемой фракции (B) по сравнению с загрузкой (A)

Матрица для аффинной хроматографии CaptureSelect™ КаппаXP – мягкое элюирование



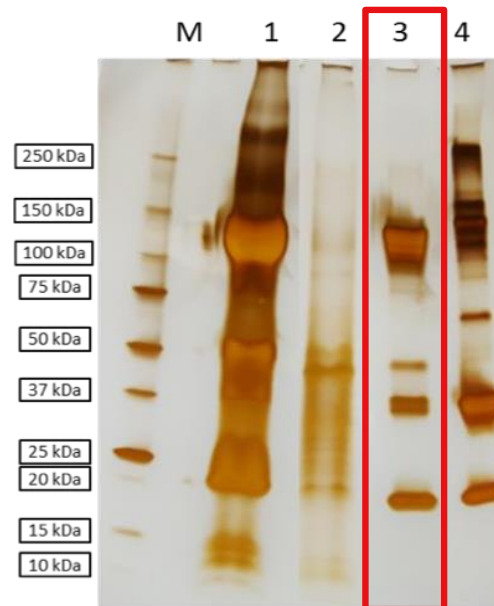
- Общая информация: 100 % охват подтипа каппа для всех иммуноглобулинов, содержащих легкую цепь каппа
- Высокая способность динамического связывания:
 - Fab (каппа) 20-30 г/л
 - IgG 30–45 г/л
- Эффективное элюирование при мягком pH (до pH 6)

Эффективность смолы при элюировании



Высокая производительность при менее продолжительном удерживании: 40 г/л при продолжительности удерживания 2 мин

Одностадийная очистка ритуксимаба



1. Загружаемый материал ритуксимаба (3 г/л)
2. Проточный режим
3. Элюирование 10-кратного разбавления (pH 3,5)
4. Полоска pH 2,0 (без разбавления)

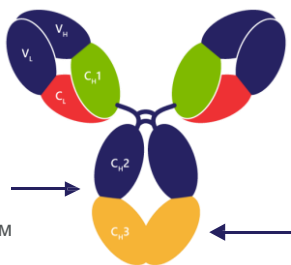
Очистка проведена с использованием колонки вместимостью 400 мкл и продолжительностью удерживания 2 мин; элюирование белка проводили с использованием 20 мМ раствора лимонной кислоты pH 3,5.

Одностадийная очистка, оставляющая в элюате только интактный IgG и легкие цепи

Матрица для аффинной хроматографии CaptureSelect™ FcXP – технология для Fc-гибридных белков и химерных антител

Белок А

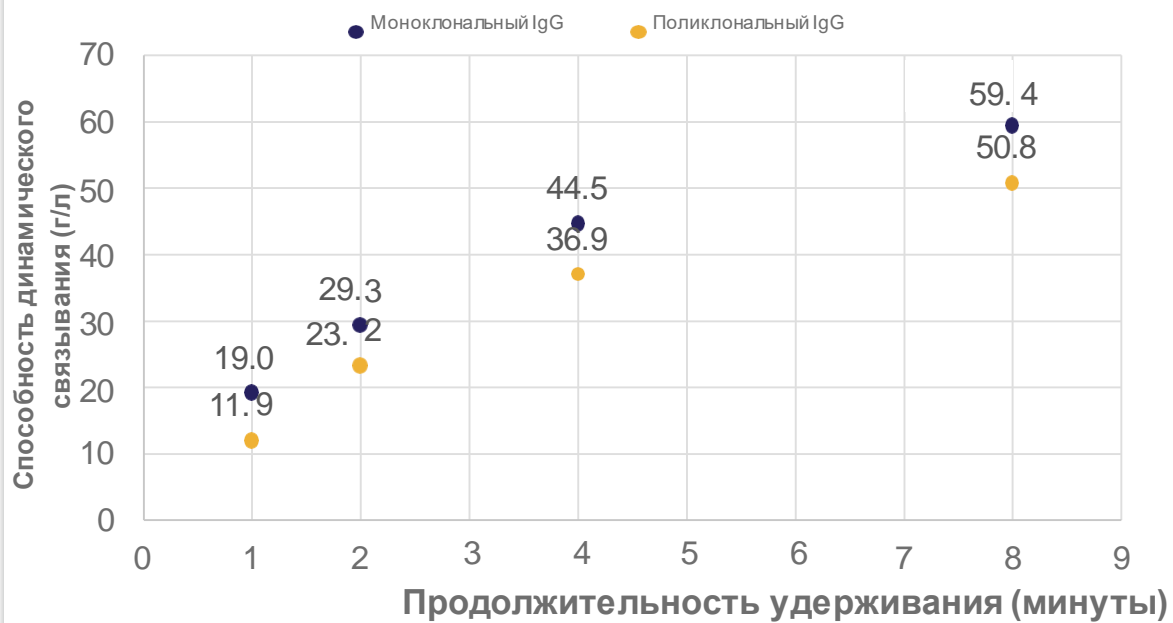
- Поверхность раздела C_H2-C_H3
- Без IgG3
- Элюирование с низким содержанием кислот



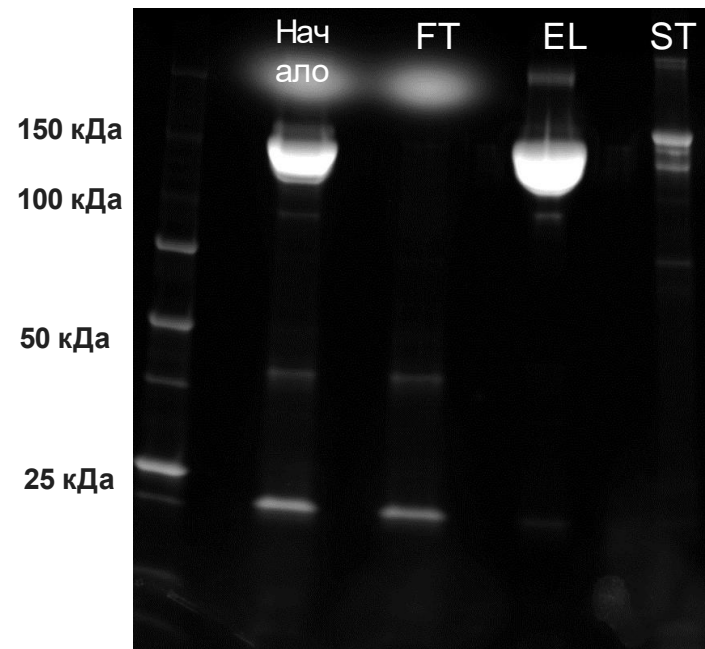
FcXP
C_H3

- Связывается с постоянной областью тяжелых цепей (C_H3) всех подклассов человеческого IgG
- Высокая способность динамического связывания; > 40 г/л (10 % прорыв/продолжительность удерживания 5 мин)
- Эффективное элюирование при мягком pH 4,0–4,5

Способность динамического связывания при 10 % прорыве



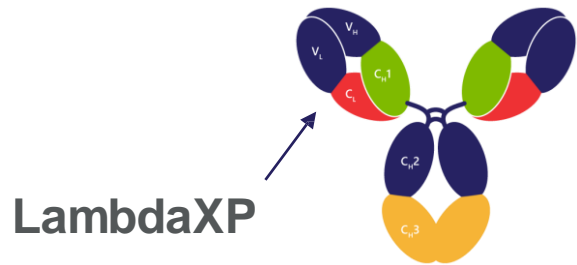
Очистка ритуксимаба



- Начало – ритуксимаб, моноклональное человеческое/мышинное химерное антитело (IgG1) (1,7 г/л)
- FT – проточная фракция, EL – разбавленная в 10 раз элюируемая фракция pH 4,0,
- ST – полоса pH 2,0

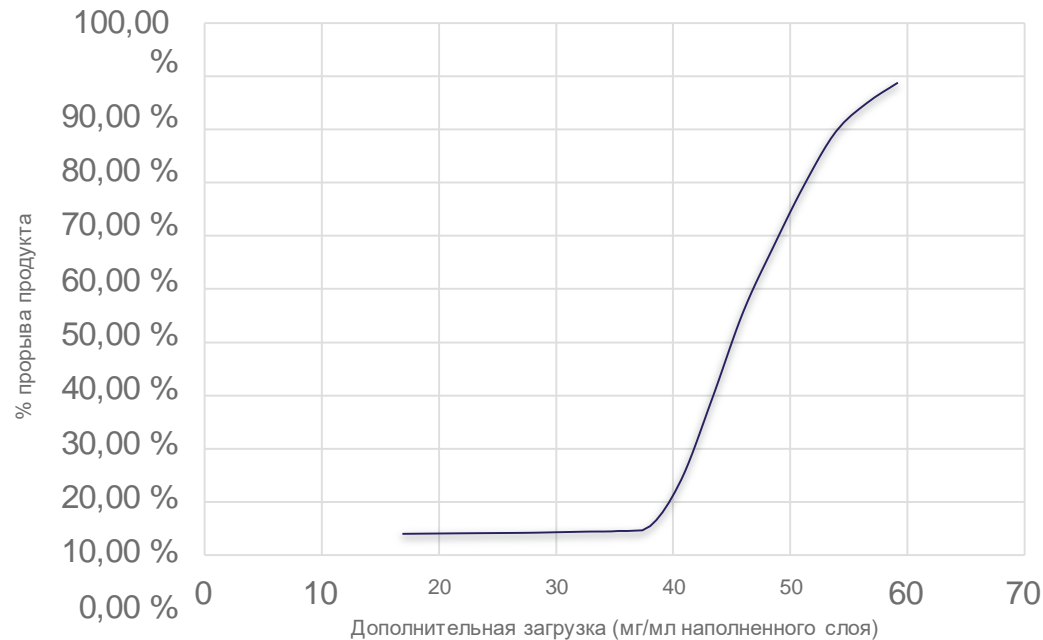
Предоставление платформы для форматов антител с измененными или отсутствующими участками связывания с белком А

Матрица для аффинной хроматографии CaptureSelect™ LambdaXP – технология для очистки би-специфических антител



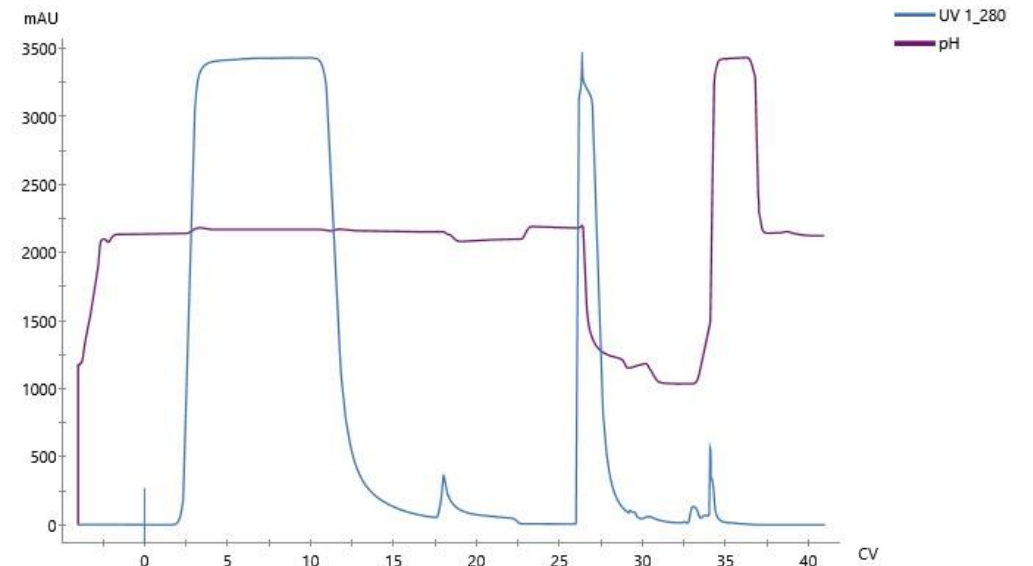
- Общая информация: 100 % охват подтипа лямбда для всех иммуноглобулинов, содержащих легкую цепь лямбда
- Высокая способность динамического связывания: > 35 г/л IgG
- Эффективное элюирование при pH 3,5–4,0

Способность динамического связывания при продолжительности удерживания 4 мин



✓ Способность динамического связывания при 10 % прорыве ~ 40 мг/мл

Эффективность элюирования – 25 мМ натрия ацетат



✓ Эффективное элюирование (3 объема колонки) би-специфического антитела при pH 3,6 с использованием концентрации загрузки 32 мг/мл

Способность динамического связывания CaptureSelect КарраXP

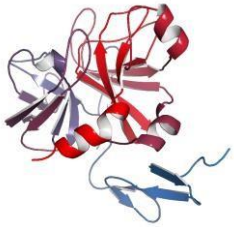
Способность динамического связывания
CaptureSelect КарраXP
(трастузумаб)



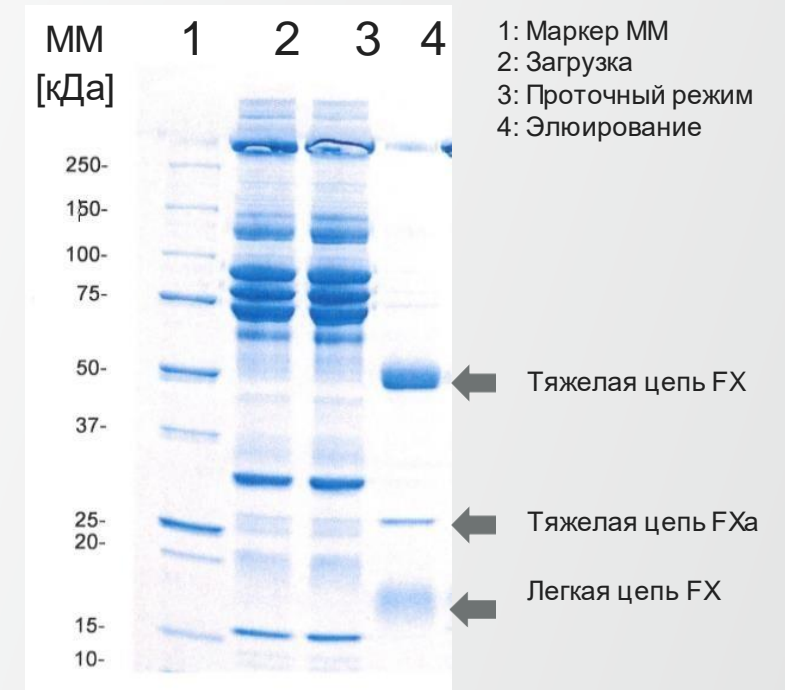
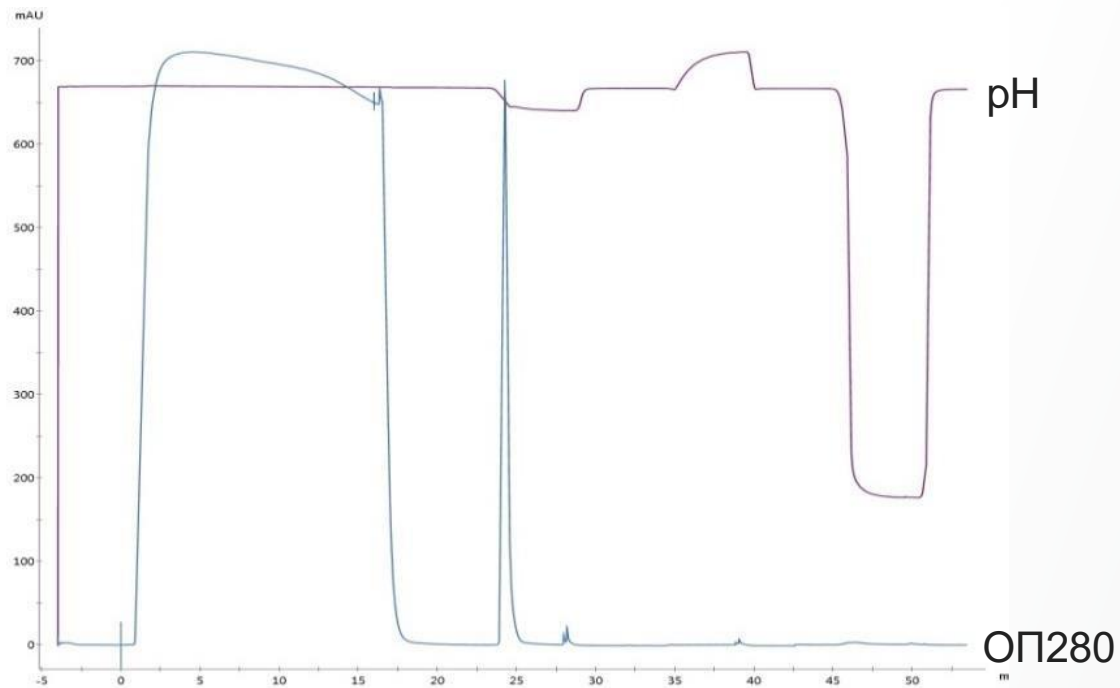
Высокая производительность при менее продолжительном удерживании: 40 г/л при продолжительности удерживания 2 мин

Повышение способности связывания удовлетворяет требования по обработке поступающего материала с высоким титром

Матрица для аффинной хроматографии фактора X – CaptureSelect



- Связывается с фактором X в присутствии кальция
- Высокая селективность, отсутствие связывания с другими белками плазмы крови человека
- Мягкое элюирование при нейтральном pH с использованием ЭДТА
- Высокая степень чистоты в одну стадию захвата

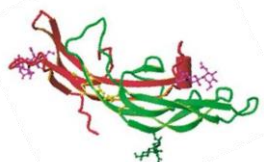


ДСН-ПААГ-электрофорез в восстанавливающих условиях

Мягкое и эффективное элюирование фактора X с использованием 5 mM ЭДТА при нейтральном pH Эффективная очистка фактора X

Матрица для аффинной хроматографии CaptureSelect FSH – селективность в отношении конформационного эпитопа

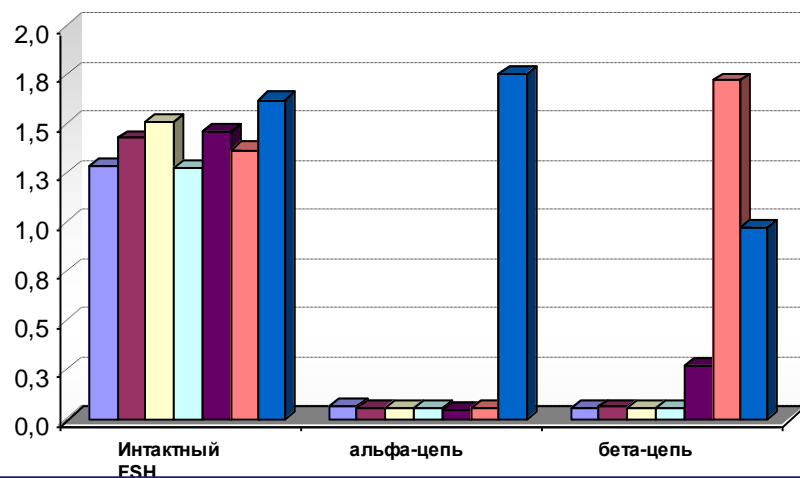
Фолликулостимулирующий гормон (FSH)



- Красный: альфа-субъединица
- Зеленый: бета-субъединица

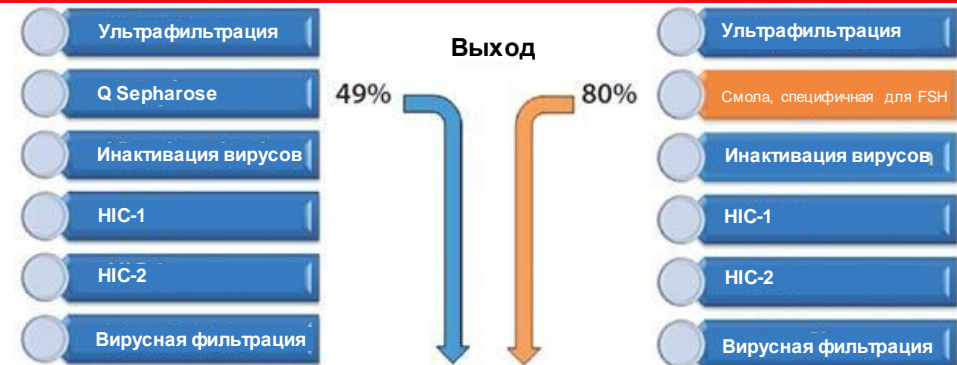
- Высокая селективность в отношении рекомбинантного интактного FSH без перекрестного связывания со свободными альфа- или бета-субъединицами
- Мягкое элюирование, сохранение биологической активности

Скрининг лигандов FSH

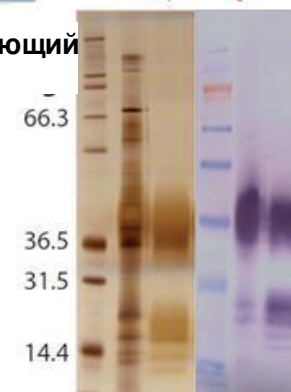


- Лиганд 1
- Лиганд 2
- Лиганд 3
- Лиганд 4
- против интактного FSH
- против бета-FSH
- против hCG (альфа)

Аффинная очистка по сравнению с неаффинной очисткой



Обычный последующий процесс



Последующий процесс с использованием смолы, специфичной для FSH

Разработка технологий для аффинной хроматографии генных препаратов и вакцин

- **Высокая селективность и производительность**
- **Эффективные и масштабируемые растворы**

Смола Thermo Scientific™	Целевая молекула
POROS™ CaptureSelect Adv5*	Adv5 (аденовирус 5)
POROS CaptureSelect AAVX	AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, рекомбинантные и химерные векторы (аденоассоциированный вирус)
POROS CaptureSelect AAV9	AAV9
POROS CaptureSelect AAV8	AAV8
POROS CaptureSelect VacuClear*	Удаление бакуловирусных загрязнителей
POROS Oligo dT(25)	мРНК
CaptureSelect C-tagXL	C-меченные белки и ВПЧ (вирусоподобные частицы)



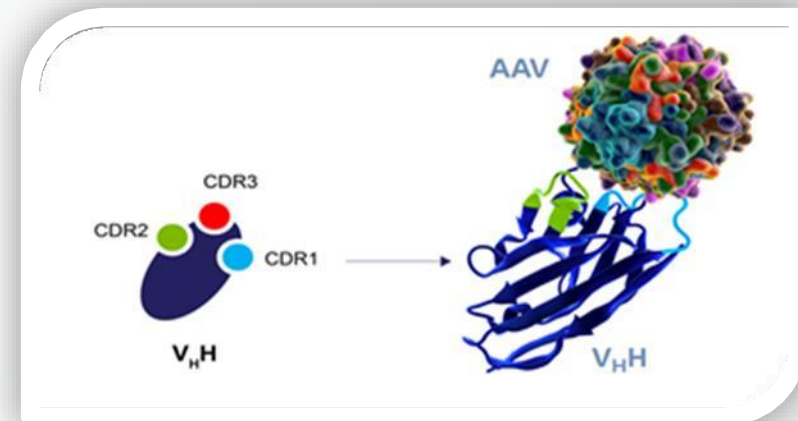
* Смола для использования исключительно в исследовательских целях. Может подвергаться дальнейшей разработке с получением биотехнологической смолы для промышленного производства.

Поддержка разработки вирусных векторов, мРНК и вакцин в крупном масштабе

Целевое применение: для исследований или дальнейшего производства. Не предназначено для диагностических целей. Продукты предоставляются с полной нормативно-правовой поддержкой (RSF), что позволяет использовать их в промышленном производстве.

Решения для аффинной хроматографии с целью очистки AAV

- **Высокая специфичность:** предоставление платформы для очистки AAV
- **Высокая производительность:** подтверждена посредством многократных оценок клиентов
- Продукт разработан на основе сорбента POROS с доказанной высокой эффективностью
- **Превосходная масштабируемость:** извлечение вектора в размере 200 л > 80 %



Смола Thermo Scientific™	Способность связывания (вирусных геномов/мл)*	Аффинность к серотипу
POROS™ CaptureSelect™ AAV8	>10 ¹³	AAV8
POROS™ CaptureSelect™ AAV9	> 10 ¹⁴	AAV9
POROS™ CaptureSelect™ AAVX	>10 ¹⁴ *	AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, Rh10, рекомбинантные и химерные векторы

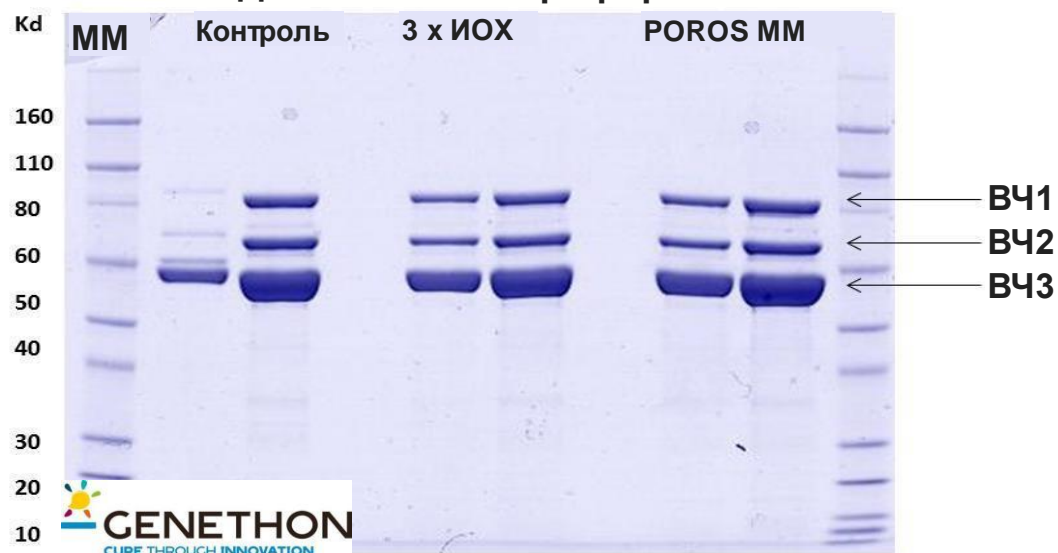
*вирусных геномов на миллилитр (вг)/мл, способность связывания будет зависеть от серотипа, потока поступающего материала, добавок и мутаций относительно родительских серотипов

Продукты предоставляются с полной нормативно-правовой поддержкой (RSF), что позволяет использовать их в промышленном производстве.

Целевое применение: для исследований или дальнейшего производства. Не предназначено для диагностических целей.

Чистота

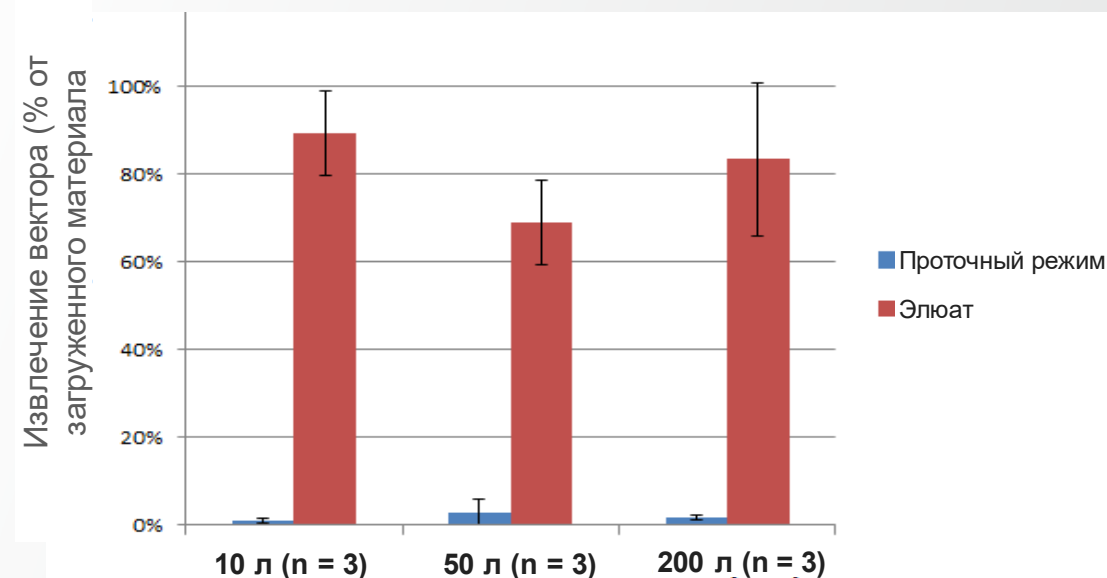
Профиль чистоты для AAV9, полученный с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза



- Профиль чистоты эквивалентен таковому при проведении 3-стадийной ионообменной хроматографии

Выход

Извлечение вектора с использованием POROS CaptureSelect AAV9 в разных масштабах

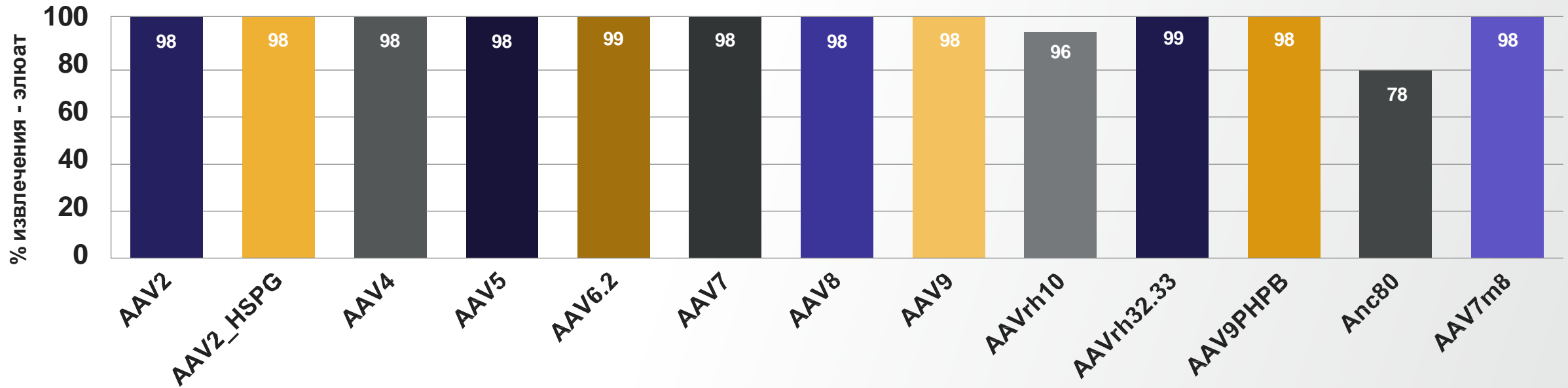


- Повышенный выход: извлечение вектора $\geq 80\%$

Ограниченное число стадий в процессе очистки без нарушения чистоты продукта и изменения его выхода

Эксперимент статического связывания AAVX – связывание с разными серотипами

Смола POROS CaptureSelect AAVX: распределение генома вектора по специфичности серотипа (% в элюате)



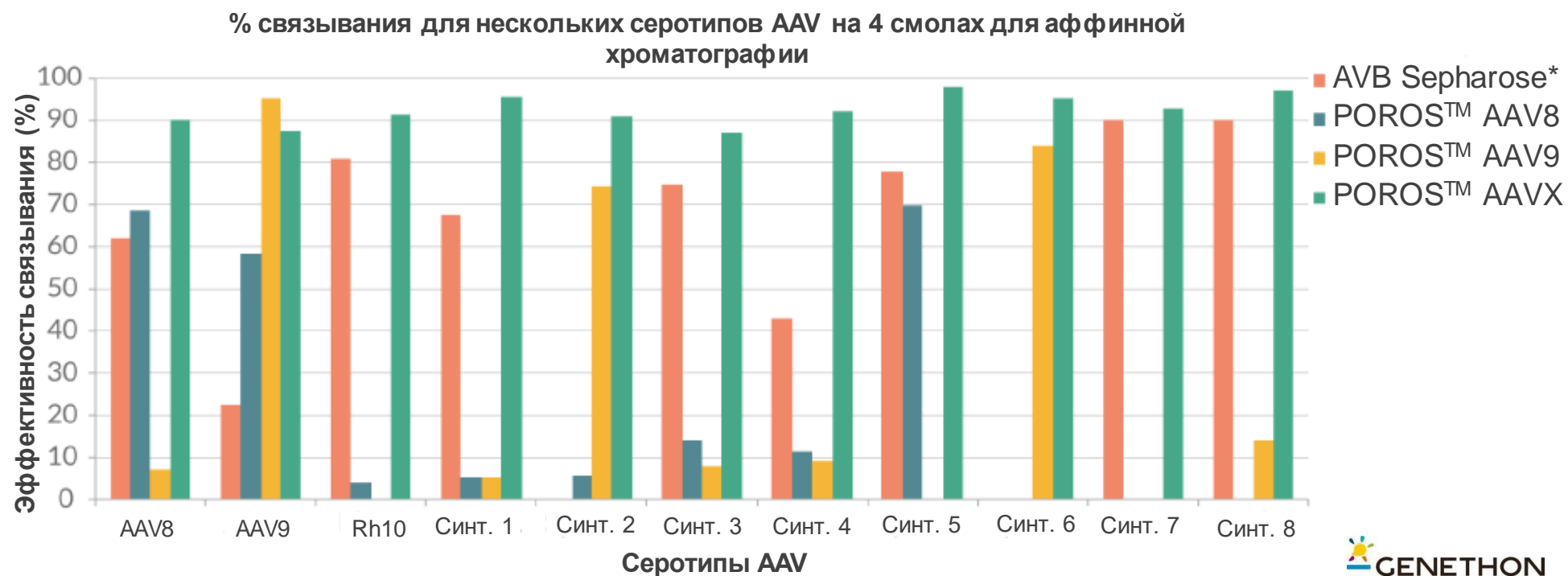
План эксперимента

- Связывание проводили в статическом режиме: смолу смешивали с AAV в пробирке и не применяли никаких проточных свойств
- Геном вектора определяли с помощью кПЦР

Проведенные эксперименты и данные были любезно предоставлены компанией Massachusetts Eye and Ear

До настоящего времени лиганд AAVX продемонстрировал аффинность в направлении всех проанализированных серотипов

Смолы для аффинной хроматографии AAV: сравнительное исследование



План эксперимента

- Сравнение смол Thermo Scientific POROS AAV со смолой компании-конкурента
- В режиме статического связывания было проанализировано 3 нативных вектора AAV (AAV8-10) и 8 синтетических вектора, проанализированных в режиме статического связывания

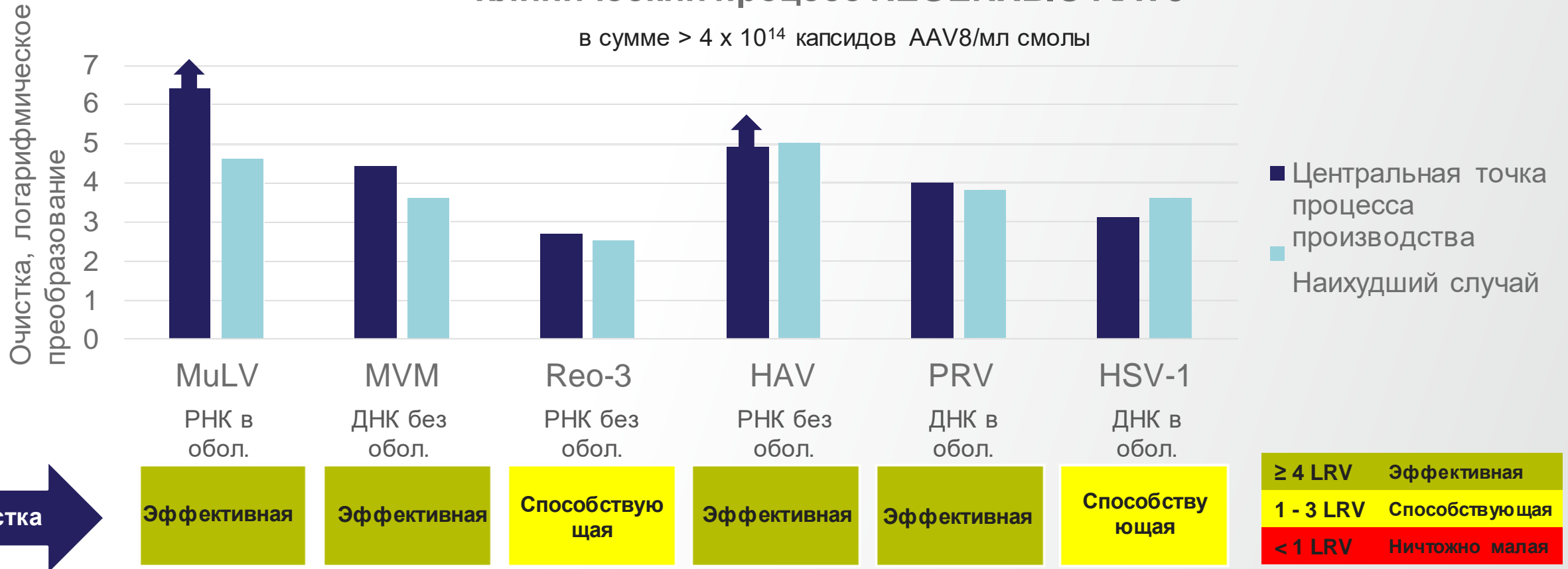
*Высокоэффективная AVB Sepharose (Cytiva Life Sciences)

- Смолы POROS AAV демонстрируют высокую аффинность и эффективность в связывании с целевым продуктом
- POROS AAVX демонстрирует селективность в отношении чрезвычайно широкого ряда натуральных и синтетических капсидов

Робастная модель вирусной очистки с использованием смолы AAVX

Клинический процесс REGENXBIO AAV8

в сумме > 4 x 10¹⁴ капсидов AAV8/мл смолы



При использовании аффинной хроматографии AAVX была достигнута робастная очистка от модельных вирусов

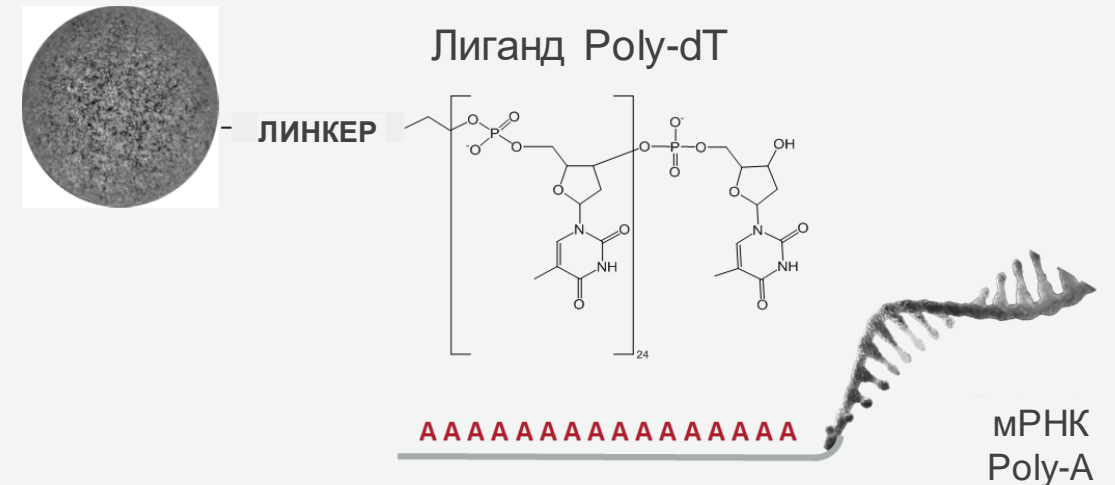
Смола для аффинной хроматографии POROS Oligo (dT)25

Разработка для очистки мРНК от примесей процесса транскрипции *in vitro* (IVT)

Характеристики и преимущества смолы

- Простой захват мРНК с помощью спаривания основ АТ
- Простота использования: загружают в NaCl и элюируют в воде
- Способность динамического связывания – до 5 мг/мл для мРНК с 4000 пар оснований
- Извлечение > 90 %
- Превосходная масштабируемость
- Неживотного происхождения

На основании технологии POROS



- Пористый материал с шарообразными частицами размером 50 мкм
- Лиганд dT-25 (поли-деокситимидин) с запатентованным линкером

Упрощенный рабочий процесс для получения максимальной эффективности и упрощения последующих стадий тонкой очистки

Данные применения POROS Oligo (dT)25: извлечение и чистота

Извлечение мРНК при разных размерах молекулы



Извлечение мРНК с использованием разных типов образцов

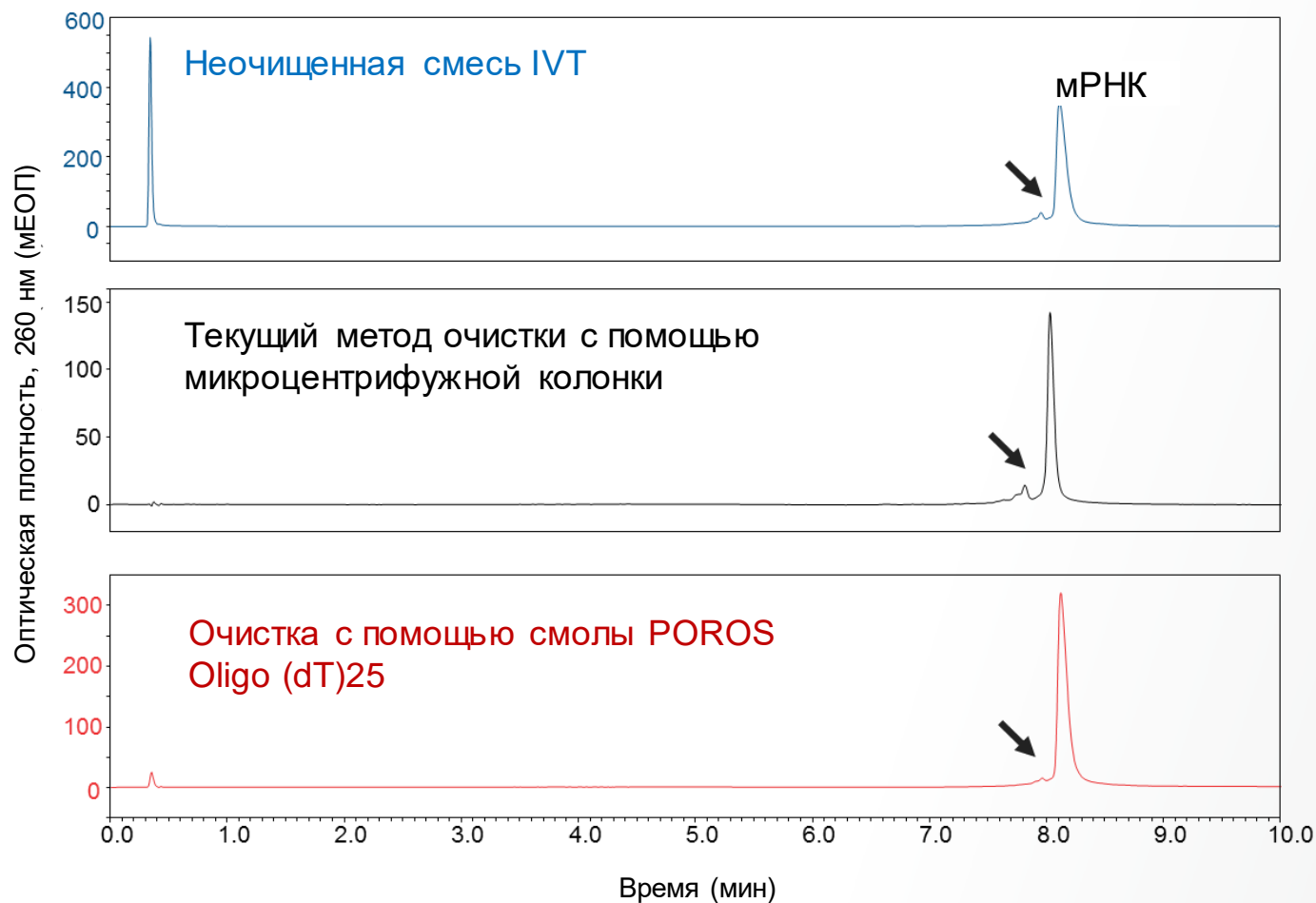


Удаление ферментных примесей

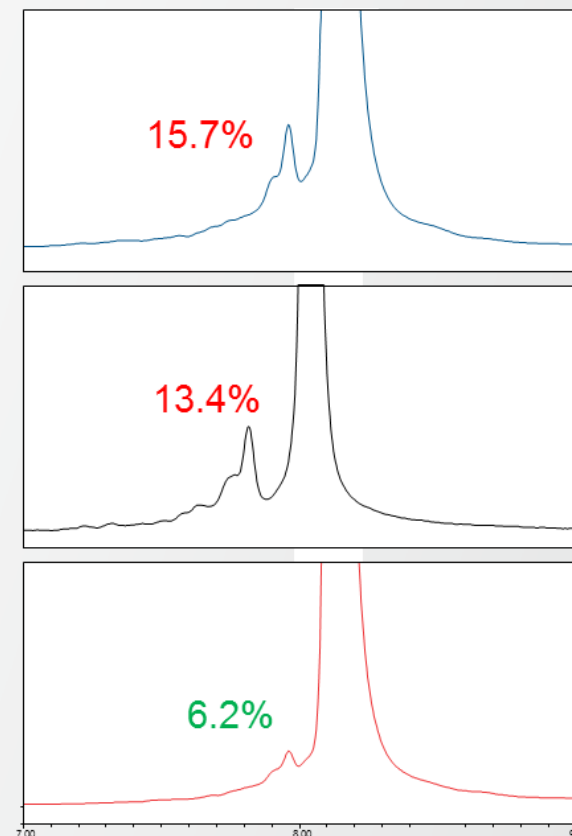


Извлечение мРНК и чистота независимы от размера молекулы мРНК и типа образца

Эффективное удаление примесей по сравнению с использованием метода микроцентрифужных колонок



Улучшенная очистка от примесей



Образцы предоставлены

Очистка с использованием смолы POROS Oligo (dT)25 приводит к существенному уменьшению количества примесей

Удаление примесей бакуловируса с использованием аффинной хроматографии

Система экспрессии вектора бакуловируса (BEVS) –
установленная платформа для производства вирусных вакцин и векторов генных препаратов



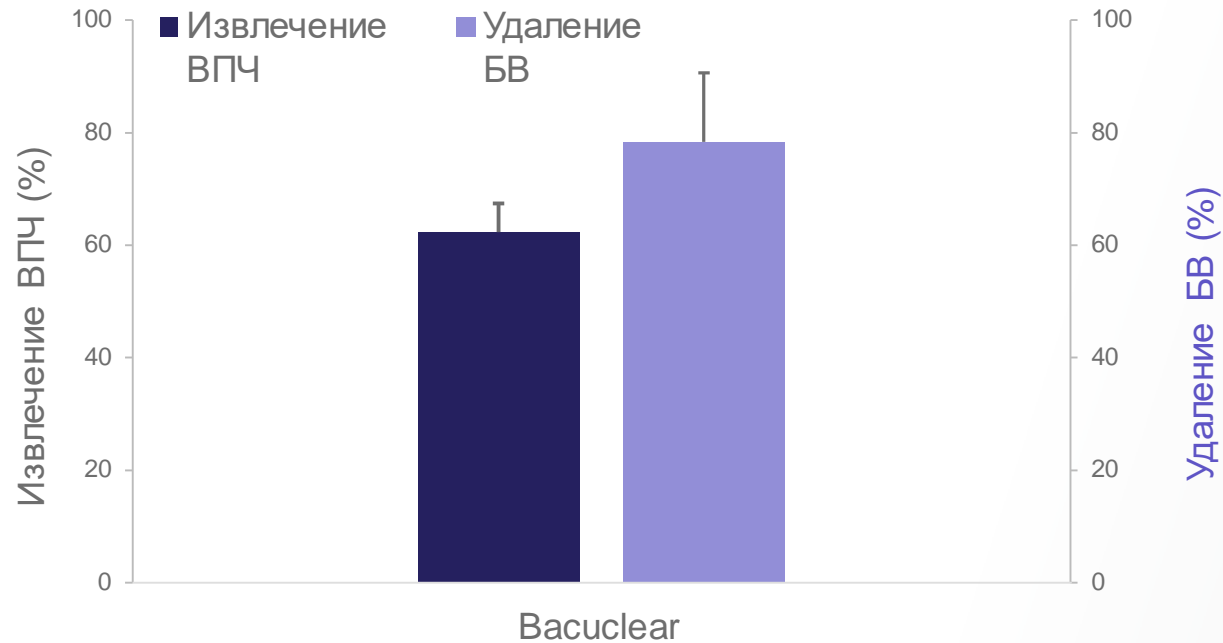
Преимущества

- Профиль безопасности
- Непродолжительное время производства
- Высокие выходы
- Экспрессия нескольких белков одновременно
- Масштабируемость

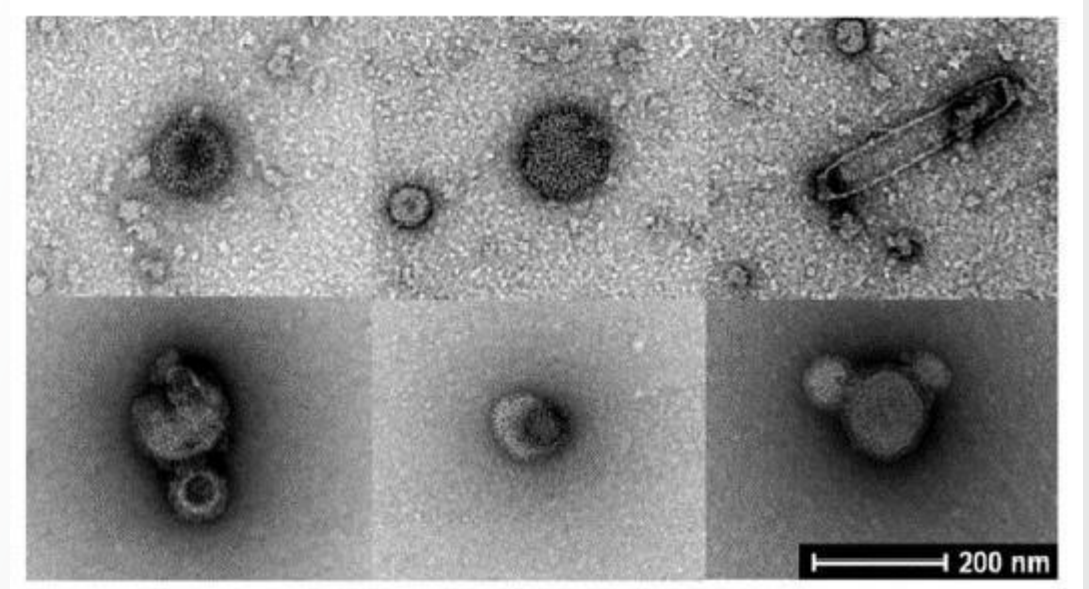
Сложности

- Присутствие бакуловируса, который вырабатывается совместно с мишенью
- Сложность разделения бакуловируса и вирусоподобных частиц в оболочке

Смола для аффинной хроматографии POROS CaptureSelect Vasuclear



Высокая степень удаления примесей бакуловируса из осветленных ВПЧ гриппа с использованием смолы Vasuclear в проточном режиме



Снимки осветленных ВПЧ (верхний ряд), очищенных ВПЧ (нижний ряд), сделанные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, демонстрирующие существенное повышение степени чистоты

Разработана специально для удаления примесей бакуловируса при производстве вакцин и вирусных векторов

Разработка продуктов для аффинной хроматографии CaptureSelect

Продукты

Исследования и разработка лиганда

Стадия продукта	Терапевтические белки	Тип антитела	Вирусы и вакцины
Биотехнологические продукты	Фактор свертывания крови (FX), фолликулостимулирующий гормон (FSH), альбумин сыворотки крови человека (HSA), хорионический гонадотропин человека (hCG), активатор плазминогена ткани человека (tPA), C-tagXL, гормон роста человека (hGH), тиреотропный гормон (TSH)	FcXP agarose, IgE, KappaXP, CH1-XL	вектор на основе аденоассоциированного вируса, серотип 8 (AAV8), AAV9 AAVX (несколько серотипов)
Продукты для использования только в исследовательских целях (RUO)	Антитромбин III (ATIII), фибриноген, трансферрин, аполипопротеин Н (ApoH), C1-ингибитор, уранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF)	POROS FcXP, IgM, IgA, LambdaXP	Adv5, VacuClear
Стадия 4: Выбор прототипа продукта	Протромбин, ДНКаза, AAT-XL, CHO-кластерин, белок С		
Стадия 3: Анализ прототипа смолы			Экзосомы
Стадия 2: Скрининг прототипов продукта	IFN α/β , hIL2, тромбин, EPO, FXI, FXII, FXIII и FH		Лентивирус
Стадия 1: Составление библиотеки	Белки клеток-хозяина – клеток яичника китайского хомячка (CHO)		Неиммунные

Если интересующая Вас мишень отсутствует в списке, мы можем помочь Вам в разработке специальной смолы

Спасибо

