

SARTORIUS



Simplifying Progress



Uporaba kromatografskih postopkov na monolitnih kolonah za izolacijo proteinov in drugih bioaktivnih molekul v živilski industriji

Sara Drmota Prebil, Aleš Štrancar, februar 2022

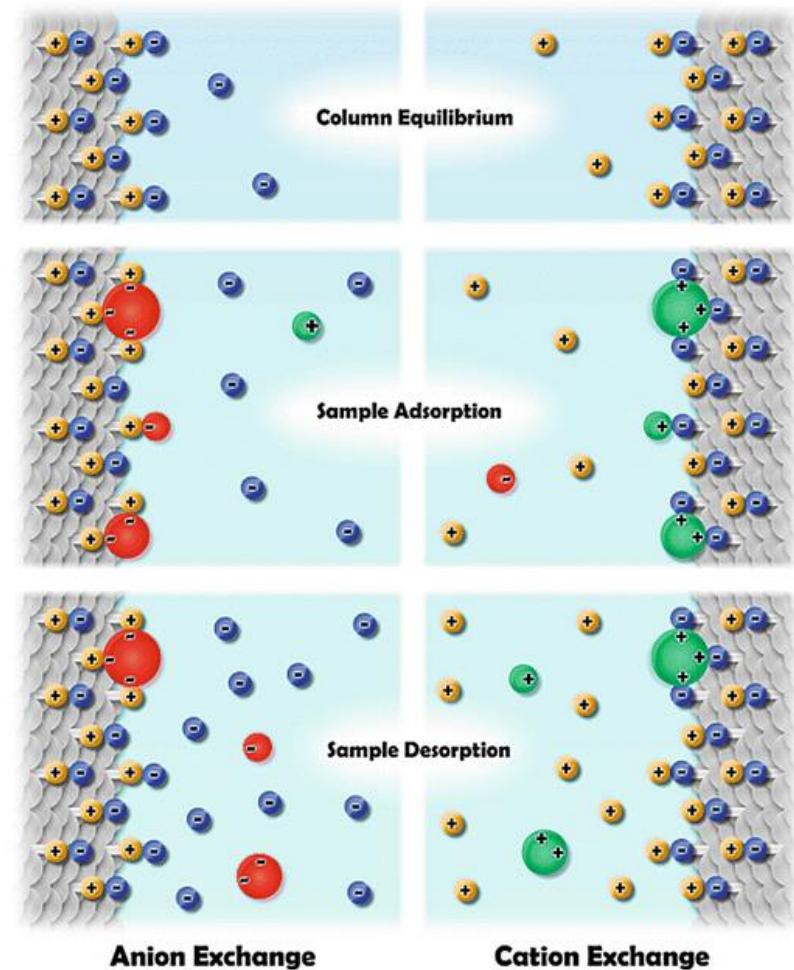
Uvod

- BIA Separations že več kot 20 let **razvija in proizvaja** monolitne kromatografske kolone. Podjetje ustanovljeno leta 1998.
- Od oktobra 2011 je sedež podjetja v Ajdovščini (pred tem v LJ). Novembra 2020 postali del korporacije Sartorius.
- Poleg prodaje kolon ponujamo tudi razvoj procesov čiščenja tarčnih molekul z monolitnimi kolonami. Tarčne molekule so predvsem velike biološke molekule, kot so virusi, pDNA, mRNA,...
- Je v zadnjih letih na trgu pridobila **vodilno vlogo** na področju čiščenja učinkovin za celično in gensko terapijo.
- Z **unikatno tehnologijo** in izkušnjami lahko rešitve **učinkovito vpeljemo v** proizvodne procese pri naših strankah.



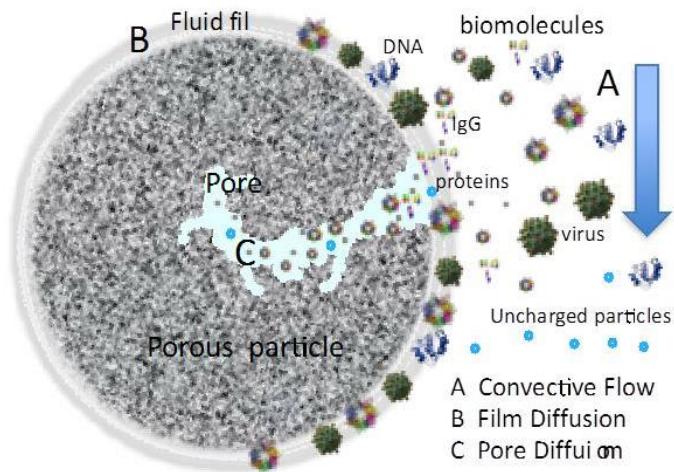
Kromatografija na splošno

- Izraz **kromatografija** ponazarja vrsto postopkov separacije in/ali določitve kemijskih spojin, od najmanjših plinskih molekul do velikih bioloških makromolekul.
- Kromatografska separacija je **posledica razlik v hitrosti potovanja** posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (plin, tekočina), zaradi **selektivnega zadrževanja** (retenzije) komponent na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekočina).
- Kromatografske metode zavzemajo osrednje mesto v analizni kemiji organskih spojin, predvsem na področjih kemije naravnih spojin, farmacije, medicine in okolja.
- Ionska kromatografija (tekočinska kromatografija):** osnova je ionska izmenjava med ionskimi skupinami v izmenjalcu in proti-ioni vzorca.



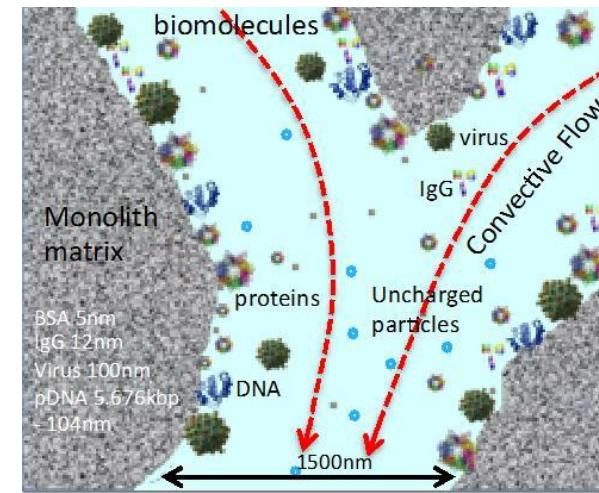
Cummins P.M., Rochfort K.D., O'Connor B.F. (2017) Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. *Protein Chromatography. Methods in Molecular Biology*, vol 1485. Humana Press, New York, NY.

Monolitna kromatografija



Tradicionalni pristop – porozni delci:

- Difuzijski masni transport – počasni procesi, **slabša resolucija**.
- Zelo majhna velikost por – **nizka kapaciteta za velike molekule**.
- Tok delcev v nasprotni smeri (mešanje) – strižne sile – **slabši izkoristki**.

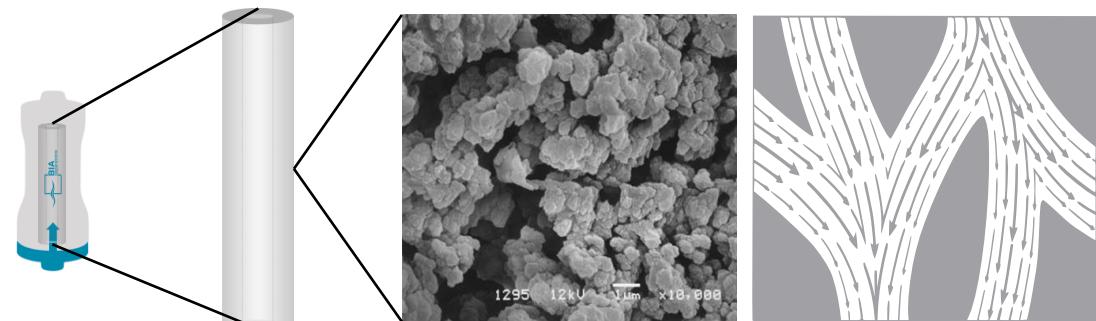


UNIKATEN pristop – monolitne kolone:

- Konvekcijski masni transport – **dinamična vezavna kapaciteta in resolucija neodvisni od pretoka**, zelo hitri procesi.
- Dostopnost vezavne površine za velike molekule – **visoka kapaciteta**.
- Laminarni pretok – NI strižnih sil – **visoki izkoristki** za npr. IgM, Lenti, Adeno, Vaccinia, Flu,...
- Manj difuzije in turbulentnega mešanja – **boljša resolucija**.

Arhitektura monolitnih kolon CIM – „Convective Interaction Media“

- Monolit - stacionarno fazo predstavlja porozen polimer iz enega kosa.
- Metakrilatni monolit ima:
 - Med seboj povezani konvekcijski kanali.
 - Veliki kanali uniformnih velikosti.
 - Poroznost (volumen kanalov v monolitu) je med 60 in 65 % (majhen padec tlaka na koloni).
 - Ni „slepih por“ (ang. dead ends).



Chromatographic column

Monolith chromatographic support

Ključne lastnosti:

- Od pretoka neodvisna resolucija in vezavna kapaciteta.
- Velika dostopnost vezavnih mest.
- Okolje z nizkimi strižnimi silami.
- Ni turbulentnega mešanja (visoka resolucija).

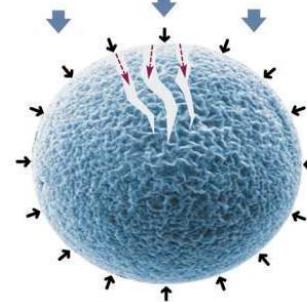
Povečana produktivnost

Povečani izkoristki

Omogočajo aplikacije z visoko resolucijo

Izbira ustrezne tehnologije glede na potrebe

Resins



Average pore size 15 - 40 nm (diffusive)

- Capture and intermediate steps of molecules below 200 kDa – Bind & Elute
- Multi-use
- Packing required
- Key Applications: proteins (mAbs, hemagglutinin...)

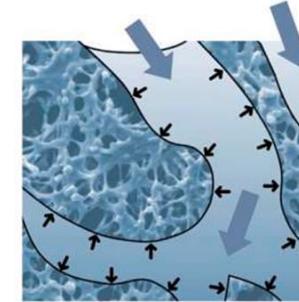
Monoliths



Channel size 1.3 to 6 µm (convective)

- Capture and polishing of large biomolecules – Bind & Elute
- Single-use or multi-use
- Ready to use (no packing)
- Key applications: viruses (AAV, lenti, adeno, flu), nucleic acids (mRNA, pDNA), exosomes

Membranes



Average pore size 3 - 5 µm (convective)

- Polishing in flow-through mode
- Ready to use (no packing)
- Key Applications: DNA, HCP, endotoxin removal, virus clearance

Naš portfolio

Analitska kromatografija

CIMac™

Analitske kolone



Analytical chromatography columns, bed volume 100 µL.
Optimised for best resolution.

PATfix™ HPLC Sistem



For process control analysis.
Work with CIMac™ analytical columns.

CIMmultus™ Preparativne kolone



Scalable formats from 1 mL to 40 L.
Wide range of ligands.
Purification packs available.
Housing from epoxy thermoset materials and reinforced with carbon fibres.

Preparativna kromatografija

CIMmic™ Diski



Activated discs for immobilisation screening.
Existing ligands & custom ligands testing.
Bed volume 100 µL to use minimal valuable sample.

Storitve

Razvoj procesov Storitev imobilizacije



Downstream process development.
Analytical method development.
Custom affinity columns.

CIMac™ analitske kolone za med-procesno analitiko

Različne kemije kolon:

- CIMac™ QA
- CIMac™ DEAE
- CIMac™ SO₃
- CIMac™ COOH
- CIMac™ OH
- CIMac™ C4
- ...



Glavne lastnosti:

- Odlično orodje za analizo in kontrolo proizvodnega procesa.
- Idealne za delo s PATfix™ HPLC analitskimi sistemi.
- Narejene za hiter in ponovljiv HPLC monitoring in kvantifikacijo proteinov, virusov, pDNA in ostalih velikih bioloških makromolekul.
- Omogočajo hitro ločevanje makromolekul z visoko ločljivostjo.

CIMmultus™ preparativne kolone

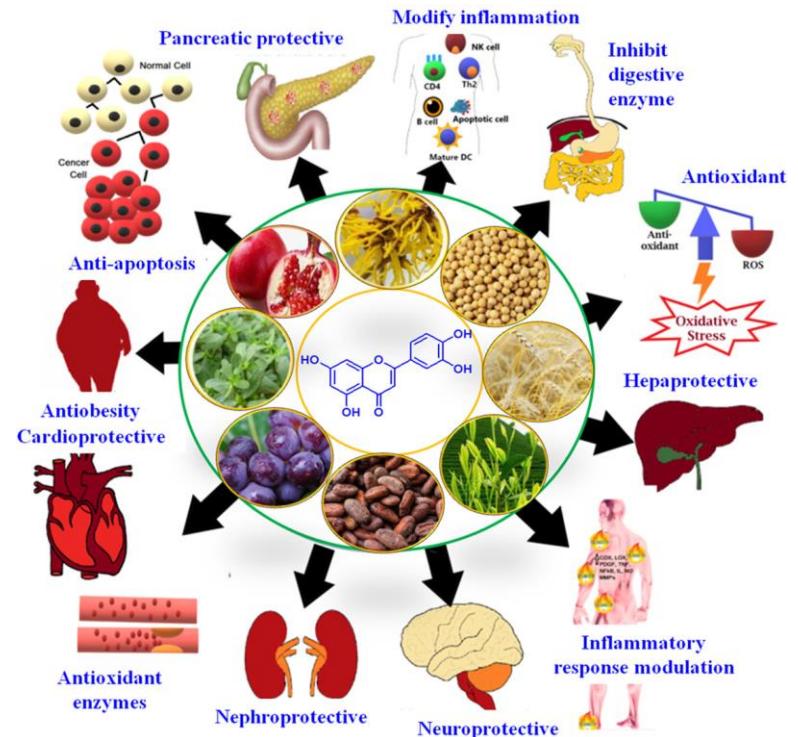
- „Ready-to-use“ preparativne kromatografske monolitne kolone narejene za čiščenje velikih molekul.
- Širok spekter različnih kolon za potrebe mnogih aplikacij:
 - velikostni razred od 1 mL do 40 L kolon,
 - cGMP in non-GMP kolone,
 - tri različne velikosti kanalov (1.3 µm, 2 µm ali 6 µm),
 - različne kemije kolon.
- Lahko so uporabljene kot „single-use“ ali „multi-use“ kolone.
- CIMmic disk – različne kemije, volumen 0,1 mL, velikost kanalov 2 µm – primerno za „screening“.



Kromatografija v živilski industriji

Tarčne molekule:

- Nutricevtiki in druge bioaktivne spojine, ki so naravno prisotne v hrani:
 - fenoli, polifenoli (antioksidanti, zmanjšujejo tveganje za nastanek kroničnih bolezni, vključno s sladkorno boleznijo tipa 2, inzulinsko rezistenco, srčno-žilnih bolezni in številnih vrst raka),
 - karotenoidi in
 - različni peptidi oz. proteini (encimi) – **laktoferin**.
- Karakterizacija, pripis specifičnega delovanje.
- Kemična raznolikost in prisotnost v kompleksnih mešanicah - velik izv takoz za izolacijo kot tudi za karakterizacijo.
- Uporaba **monolitnih kolon** je prevladujoča predvsem na področju **izolacije večjih proteinov**, kjer se običajno izkorišča načela ionsko-izmenjevalne kromatografije.

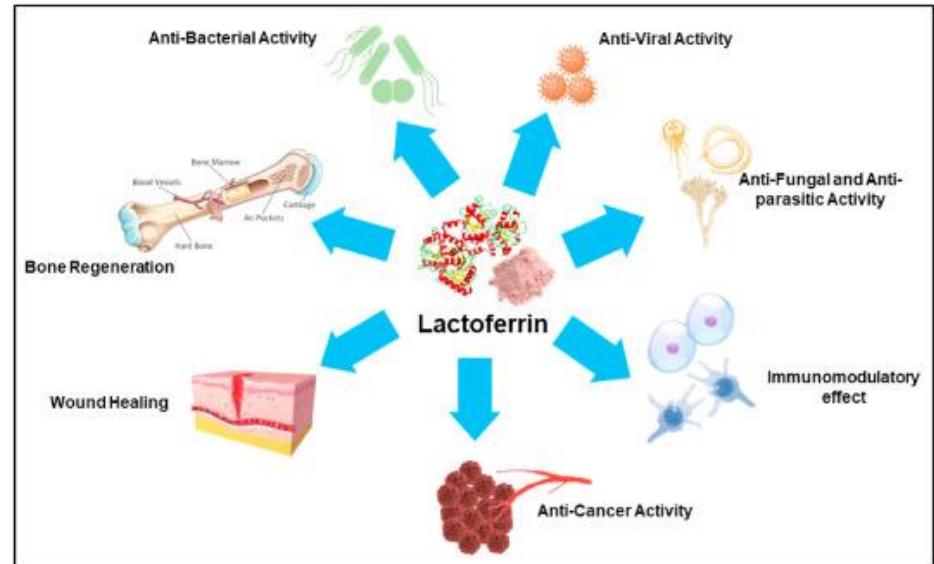


Vir: Chongde Sun et al. (2020) Dietary polyphenols as antidiabetic agents: Advances and opportunities. *Food Frontiers*. 1:18–44.

Monolitne kolone in kisla sirotka

Zakaj kisla sirotka?

- Vse bolj iskani posamezni proteini iz sirotke (stranski produkt mlekarske industrije).
- Posamezni proteini sirotke (npr. laktoperoksidaza in imunoglobulini) ne predstavljajo samo vira aminokislin, temveč so pomembni regulatorni dejavniki s široko biološko vlogo.
- Iz kisle sirotke lahko s pomočjo kationske-izmenjevalne kromatografije izoliramo več različnih proteinov.
- Uporaba **monolitnih kolon – CIMmultus™ 8000 mL**, večkratna uporaba (čiščenje z 1 M NaOH)!



Vir: Ahmed O.Elzoghby et al. (2020) Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand. *Biomaterials*. 263: 120355.

Hvala za vašo pozornost!

Kontakt:
sara.d.prebil@biaseparations.com



SARTORIUS