Терапевтические олигонуклеотиды

Терапевтические олигонуклеотиды

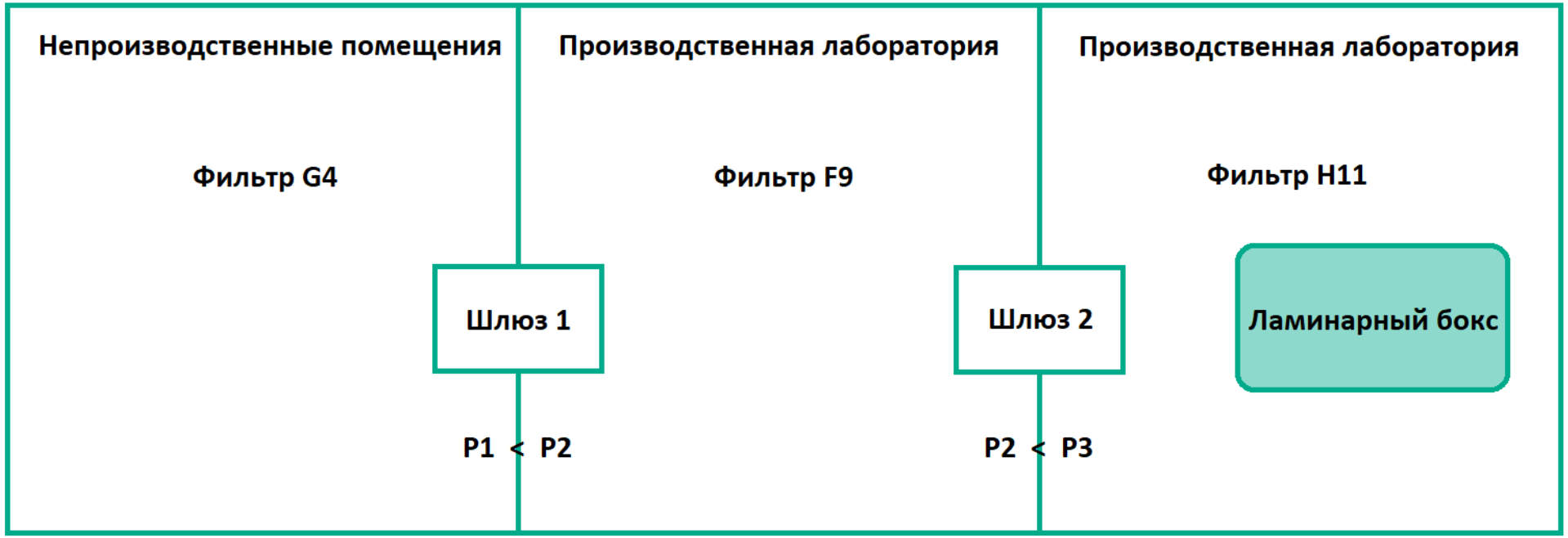
Нами разработаны технологии и условия синтеза, очистки и аналитики терапевтических олигонуклеотидов как малых, так и больших масштабов

- Чистые производственные помещения
- Масштаб одной серии до 5 г готового вещества
- Специально подобранные условия очистки ИО + ОФ хроматографией для больших количеств вещества
- Лиофилизация конечного продукта
- Аналитические методы контроля:
  - ✓ подлинность (ИП-ВЭЖХ-УФ и подтверждение сиквенса с помощью MS/MS)
  - ✓ чистота (ИП-ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС)
  - ✓ термодинамическая стабильность дуплексов (UV-кривая плавления)
  - ✓ остаточное содержание воды (Karl Fischer)
  - ✓ определение коэффициента молярной экстинкции
  - ✓ тест на эндотоксины
  - ✓ тест на остаточные эндонуклеазы

GEN TERRA

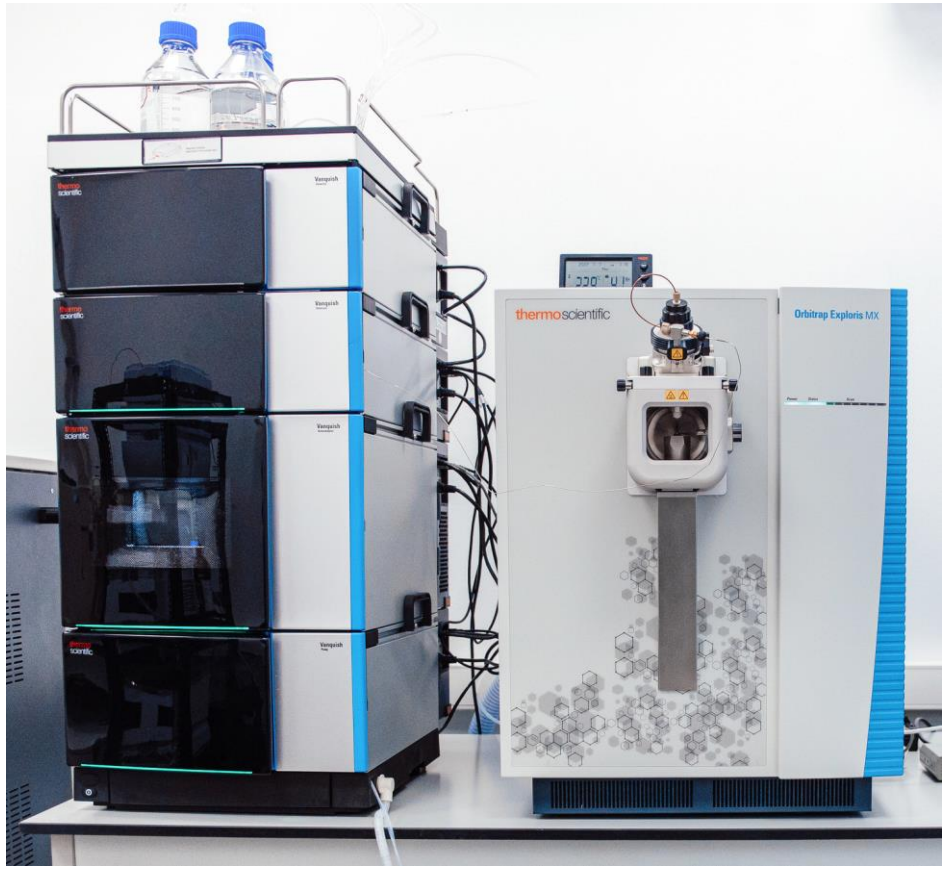
Чистые производственные помещения

- Три степени фильтрации воздуха
- Направленный перепад давления воздуха в помещения «от чистого к грязному»
- Переходные персональные и материальные шлюзы
- Центральная водоподготовка
- Ежедневные уборки
- Контроль остаточной АФС



Масс-спектрометрия олигонуклеотидов

Метод: ион-парная обращенно-фазная хроматография;
детектирование: DAD, MS - ионизация ESI, режим регистрации отрицательных ионов



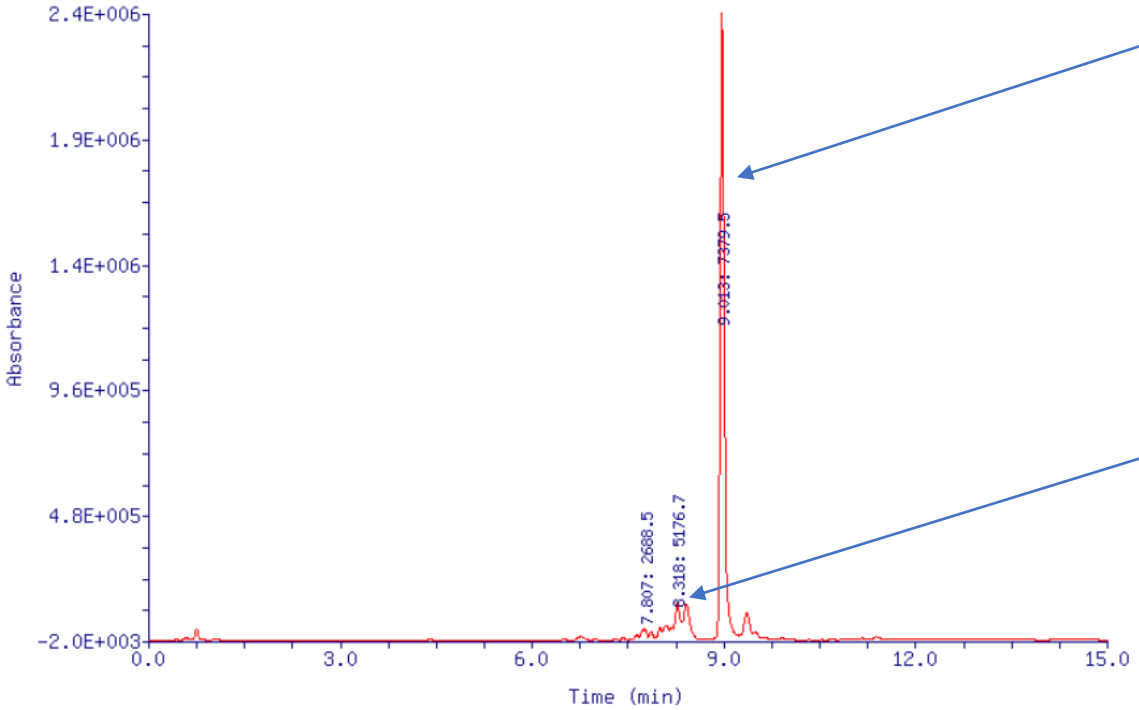
Оборудование:

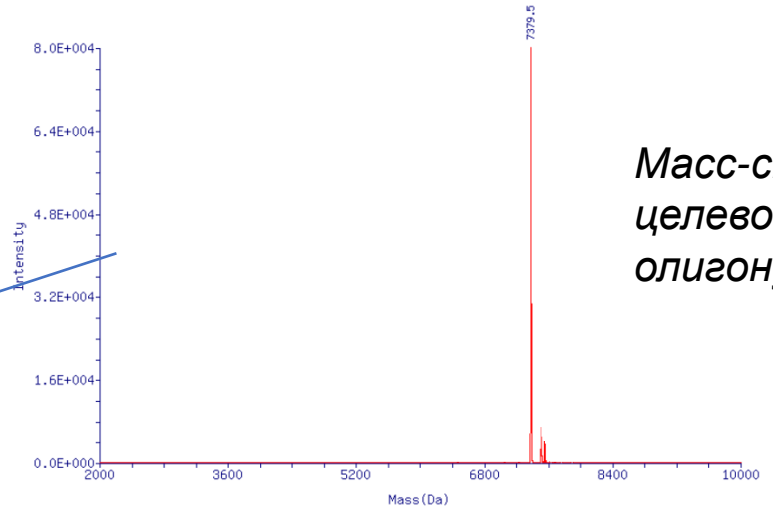
- Thermo Orbitrap Exploris MX с хроматографической системой Thermo Vanquish;
- Thermo LTQ Orbitrap с хроматографической системой Agilent 1200;
- Thermo LTQ с хроматографической системой Agilent 1200

GEN TERRA

Масс-спектрометрия олигонуклеотидов

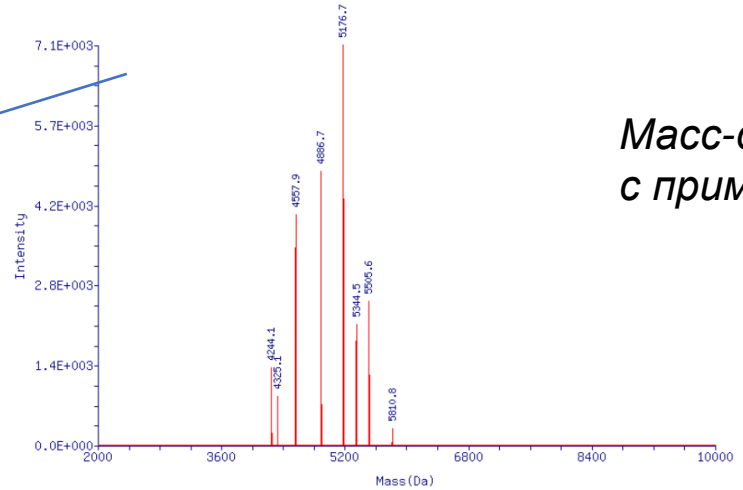
Хроматограмма олигонуклеотида





Mass (Da)	Intensity	Delta Mass	%Relative	%Total	
7379.5	7.95E+004	0.0	100.00	68.13	Target Mass: 7374.4, /GT_R6GAMD/1-T23
7547.2	7.44E+003	167.7	9.36	6.37	7374.4 (*hfipa adduct)
7507.4	6.82E+003	127.9	8.57	5.84	7374.4 (* adduct)

Масс-спектр целевого олигонуклеотида



Mass (Da)	Intensity	Delta Mass	%Relative	%Total	
5176.7	7.07E+003	0.0	100.00	30.50	C7-T23
4886.7	4.83E+003	-290.0	68.42	20.87	G8-T23
4557.9	4.07E+003	-618.8	57.58	17.56	A9-T23
5505.6	2.54E+003	328.9	36.00	10.98	G6-T23
5344.5	2.13E+003	167.8	30.08	9.17	?
4244.1	1.37E+003	-932.6	19.43	5.93	T10-T23
4325.1	8.69E+002	-851.6	12.29	3.75	4244.1 *k2 adduct
5810.8	2.85E+002	634.1	4.04	1.23	T5-T23

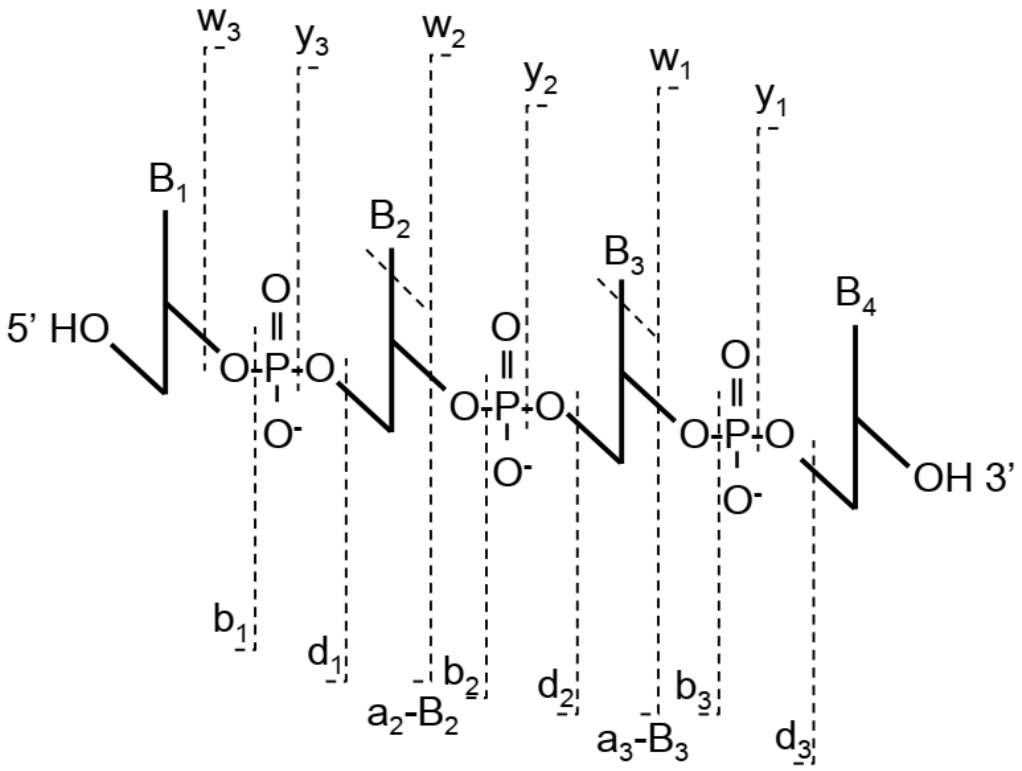
Масс-спектр пика с примесями

GEN TERRA

Определение последовательности олигонуклеотидов с помощью масс-спектрометрии с фрагментацией в ячейке соударения или в источнике

Схема фрагментации олигонуклеотидов

w и y фрагменты находятся с 3’ конца;
a-B, b, d фрагменты находятся с 5’ конца

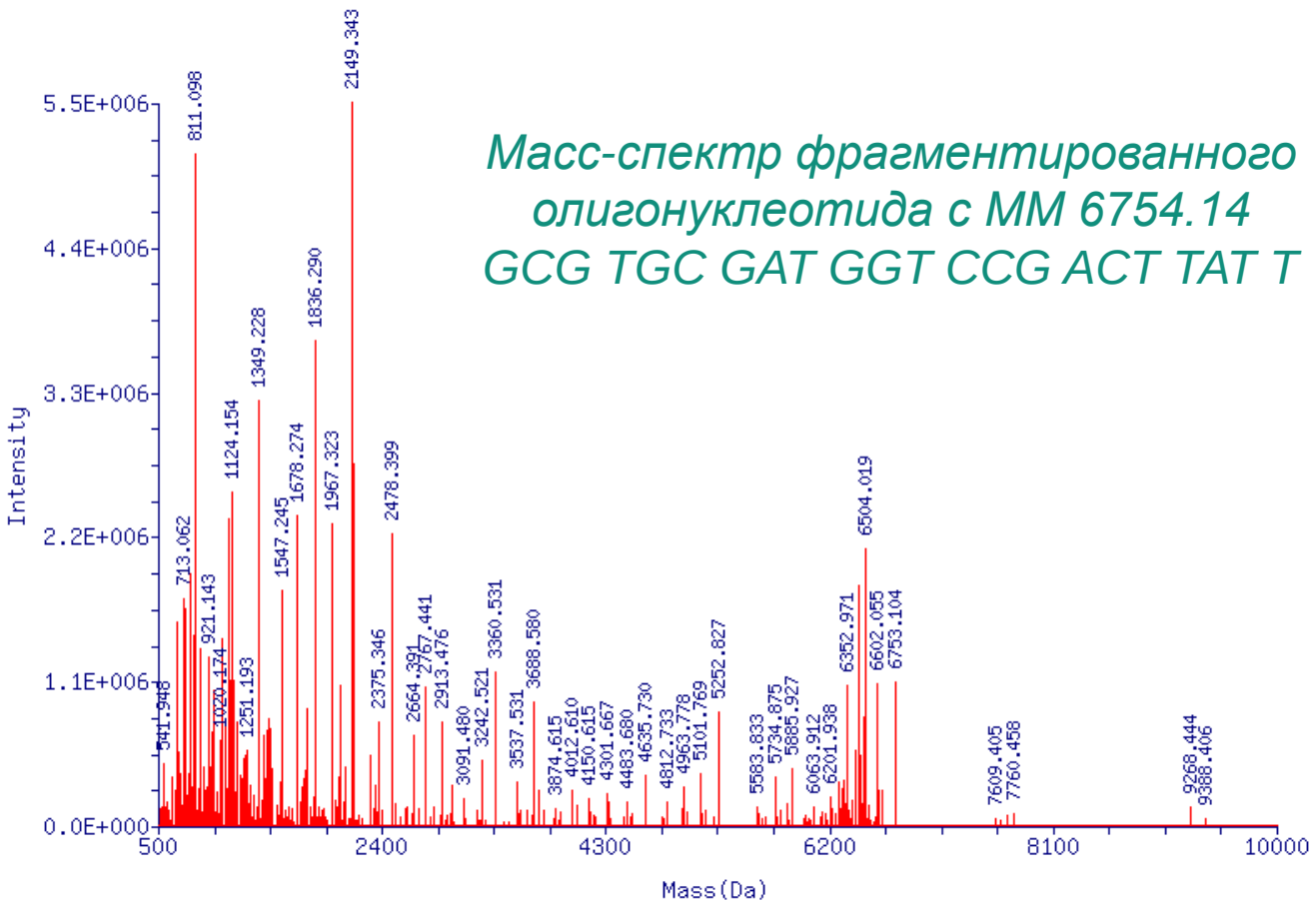


Reference: McLuckey et. al, JASMS, **1992**, *3*, 60-70.

Определение последовательности олигонуклеотидов с помощью масс-спектрометрии с фрагментацией в ячейке соударения или в источнике

Оборудование: Thermo Orbitrap Exploris MX

Условия: ионизация ESI, фрагментация в источнике, режим регистрации отрицательных ионов



Масс-спектр фрагментированного олигонуклеотида с ММ 6754.14
GCG TGC GAT GGT CCG ACT TAT T

Сопоставление найденных пиков с расчетом

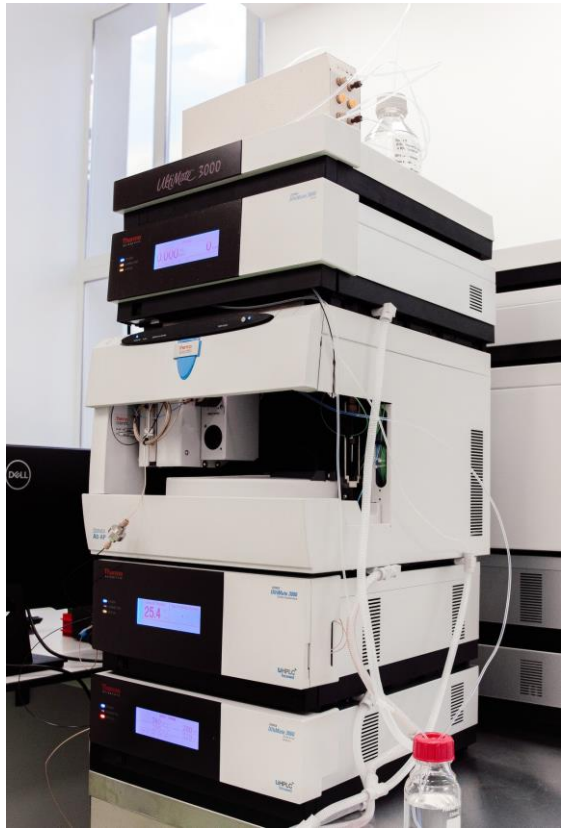
index	5'	a-B	w	3'
1	G	97,9582	322,0566	T
2	C	427,0286	626,1026	T
3	G	716,0571	939,1602	A
4	T	1045,116	1243,206	T
5	G	1349,156	1547,252	T
6	C	1678,226	1836,299	C
7	G	1967,255	2149,356	A
8	A	2296,311	2478,409	G
9	T	2609,371	2767,455	C
10	G	2913,411	3056,502	C
11	G	3242,463	3360,548	T
12	T	3571,522	3689,6	G
13	C	3875,58	4018,653	G
14	C	4164,626	4322,699	T
15	G	4453,655	4635,756	A
16	A	4782,711	4964,809	G
17	C	5095,783	5253,855	C
18	T	5384,818	5582,908	G
19	T	5688,864	5886,954	T
20	A	5992,907	6216,006	G
21	T	6305,967	6505,053	C
22	T			G

GEN TERRA

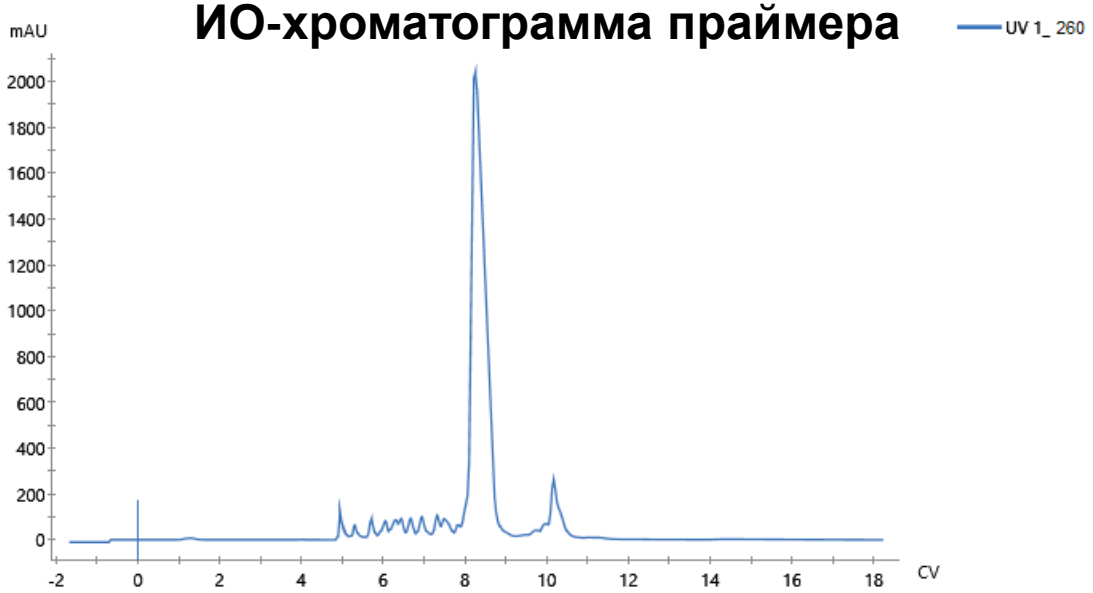
Анионообменная хроматография олигонуклеотидов

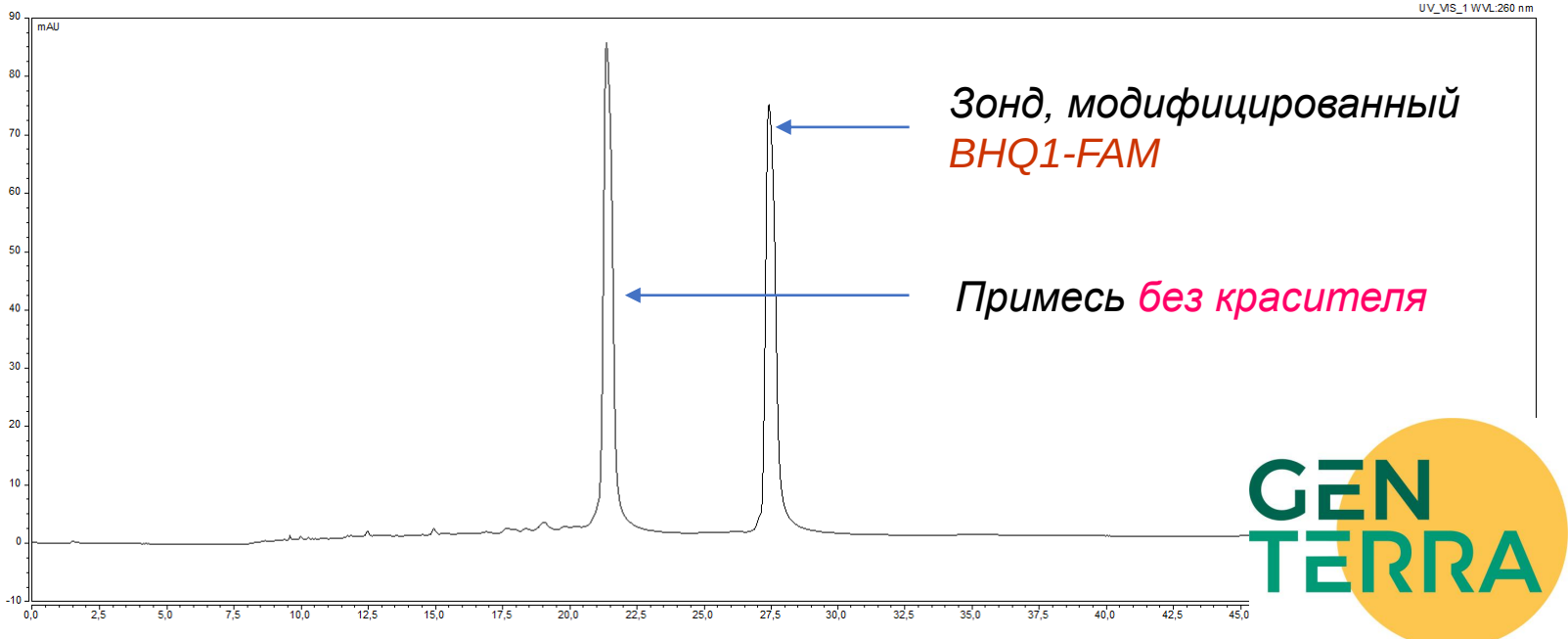
Метод: анионнообменная ВЭЖХ, детектирование по поглощению в УФ и видимой области.

Оборудование: Thermo Ultimate 3000, ионообменные колонки Thermo, Tosoh и др.



ИО-хроматограмма праймера





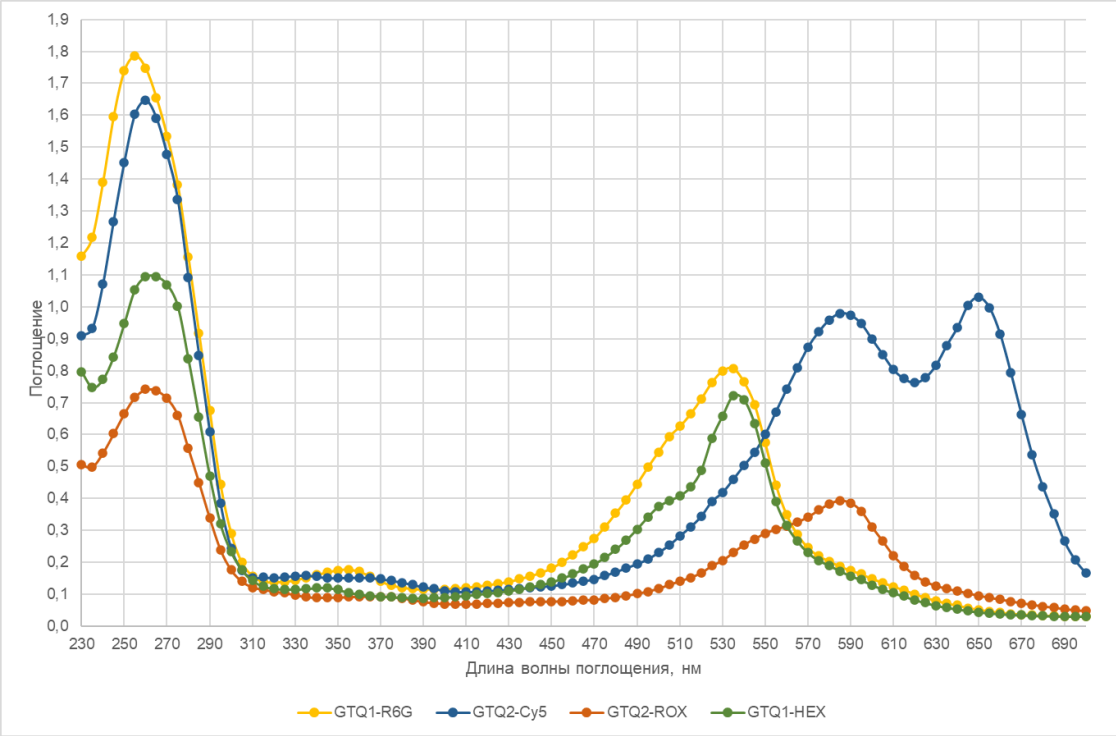
Спектрофотометрия олигонуклеотидов

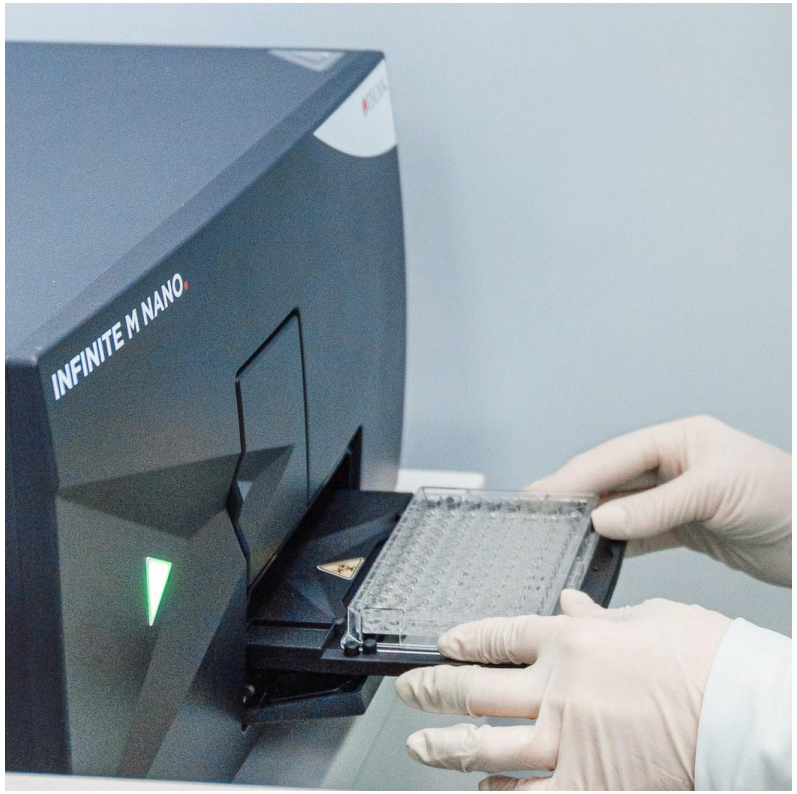
Оборудование:

- многофункциональный планшетный ридер TECAN Infinite 200 PRO M Nano;
- спектрофотометр Thermo NanoDrop OneC

Возможности:

- идентификация модификаций;
- определение коэффициента экстинкции и концентрации.



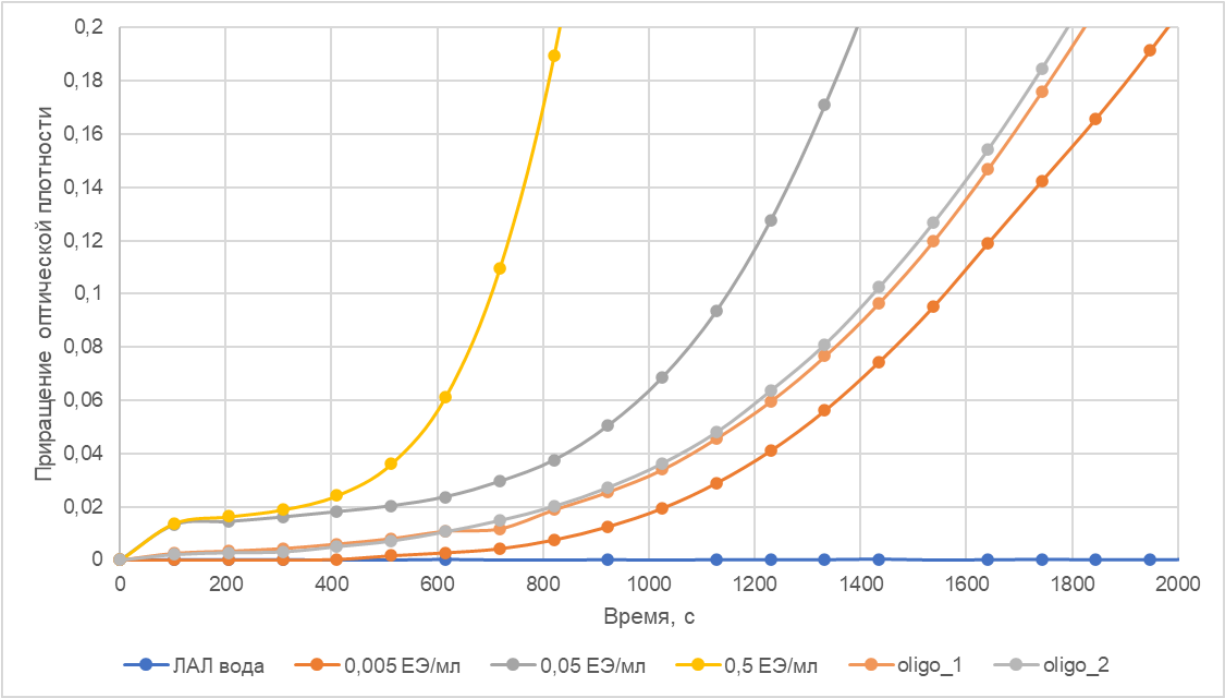


Бактериальные эндотоксины в образцах олигонуклеотидов

Метод: кинетический хромогенный ЛАЛ-тест, метод D.

Наборы реагентов Charles River Endosafe Endochrome K и Bioendo KC Kinetic Chomogenic Assay

Оборудование: многофункциональный планшетный ридер TECAN Infinite 200 PRO M Nano



Мы предоставляем комплекс услуг по разработке терапевтических олигонуклеотидов

Выбор гена-мишени → **Дизайн и синтез АСО/миРНК** → **Определение активности АСО/миРНК in vitro** → **Определение активности АСО/миРНК in vivo**

Дизайн АСО/миРНК к гену-мишени для нокдауна

Трансфекция АСО/миРНК в клетки и валидация нокдауна репортерами/ОТ-ПЦР/Вестерн-блотом

Инъекция АСО/миРНК животным и определение активной дозы и длительности терапии ОТ-ПЦР/Вестерн-блотом

GEN TERRA

Оценка активности терапевтических олигонуклеотидов *in vitro* и *in vivo*

- ✓ Определение активности с использованием репортерных конструкций и/или ОТ-ПЦР/Вестерн-блот
- ✓ МТТ-тест и оценка миграции и апоптоза
- ✓ Определение эффективной дозы и длительности действия *in vivo* (в сотрудничестве)

Другие услуги:

- ✓ Клонирование и сборка контрольных образцов на основе лямбда и MS2 фагов для in vitro диагностики
- ✓ тест на эндотоксины

GEN TERRA

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВАС
И БУДЕМ РАДЫ СОТРУДНИЧЕСТВУ!

По всем вопросам обращайтесь:

E-mail: info@genterra.ru

Тел: +7 929 692-58-64

Адрес: Россия, Москва, ул. Годовикова 9С 1, подъезд 1.4, помещение 1.12