BIOCAD

Biopharmaceutical Company

Expanding life horizons

Карабельский Александр
к.б.н., зав. лаб. молекулярной генетики
доц. каф. ТРБ СПХФА

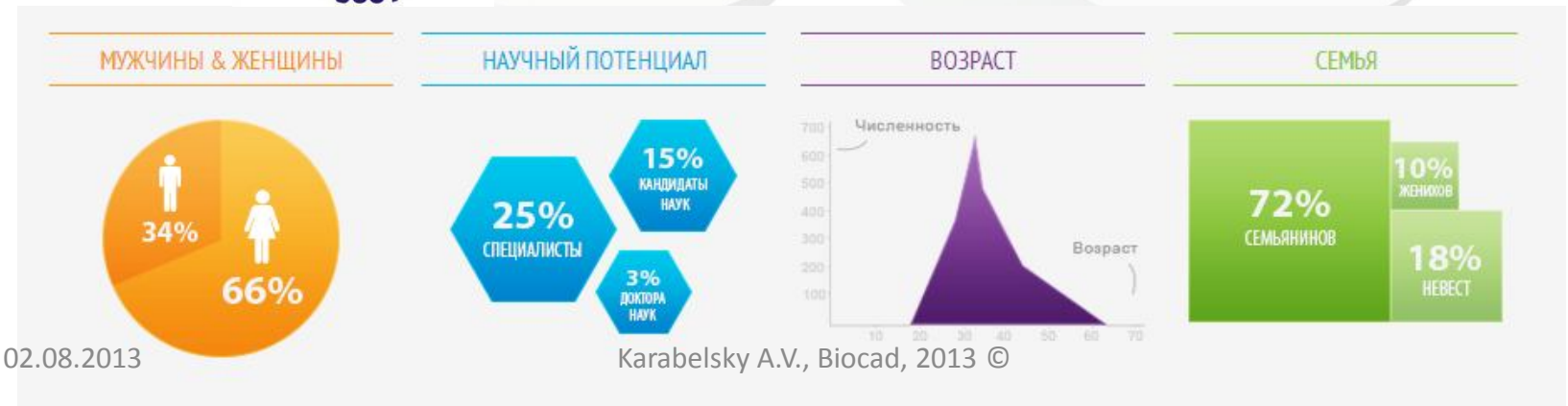
02.08.2013

Agenda

- Basic information
- Uniqueness
- Portfolio. Drug types
- Structure
- R&D
- MABs production summary
- Bioinformatics

Uniqueness

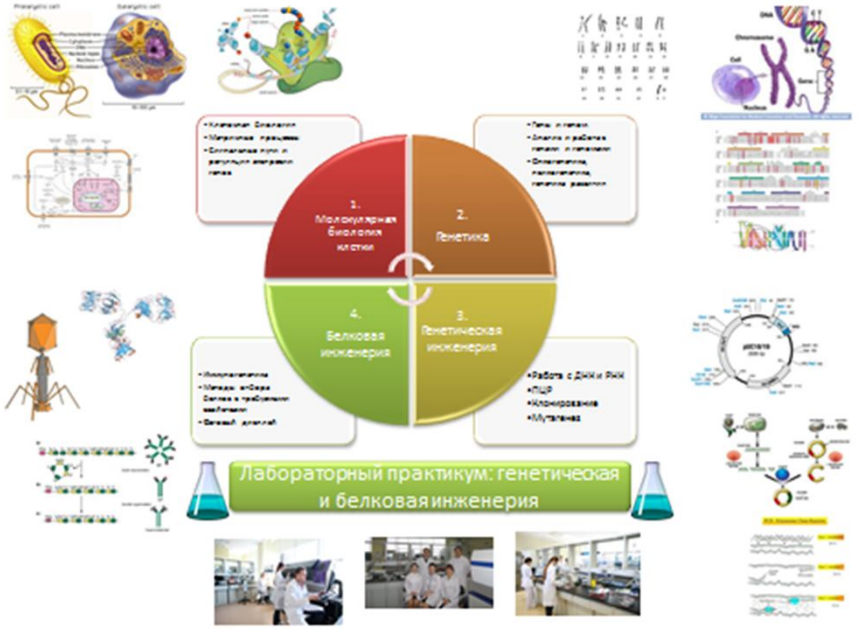
- Fully integrated biopharmaceutical company
- Break through: development, clinical trials
- HR
- Technical providing
- Education
- Cooperation
- Social activity
- Quality



Uniqueness. Education: BIOCAD + Pfizer + SPCPA

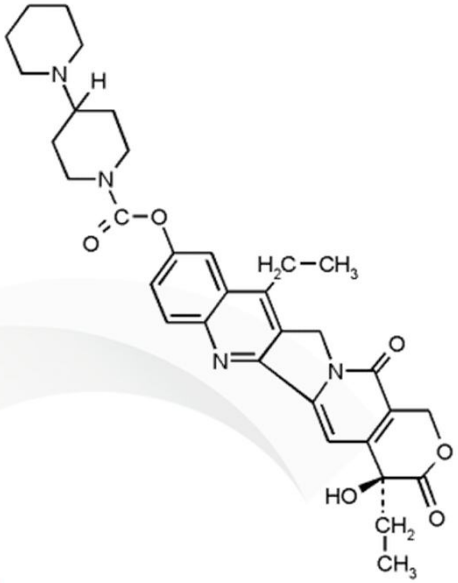
- Educational program: “Больше чем образование”

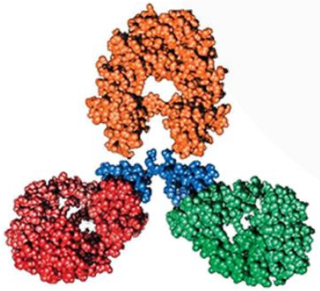
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ



- Molecular genetics basics
- Molecular biotechnology
- Gene and protein engineering (practice)
- Individual grants
- Graduates

Portfolio. Drug chemistry





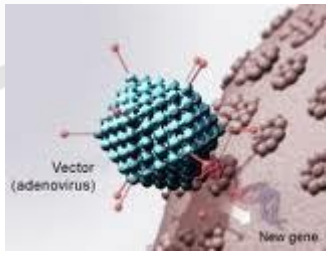
Small molecules

BIOCAD

Proteins (human recombinant, Antibodies)

Gene therapy,

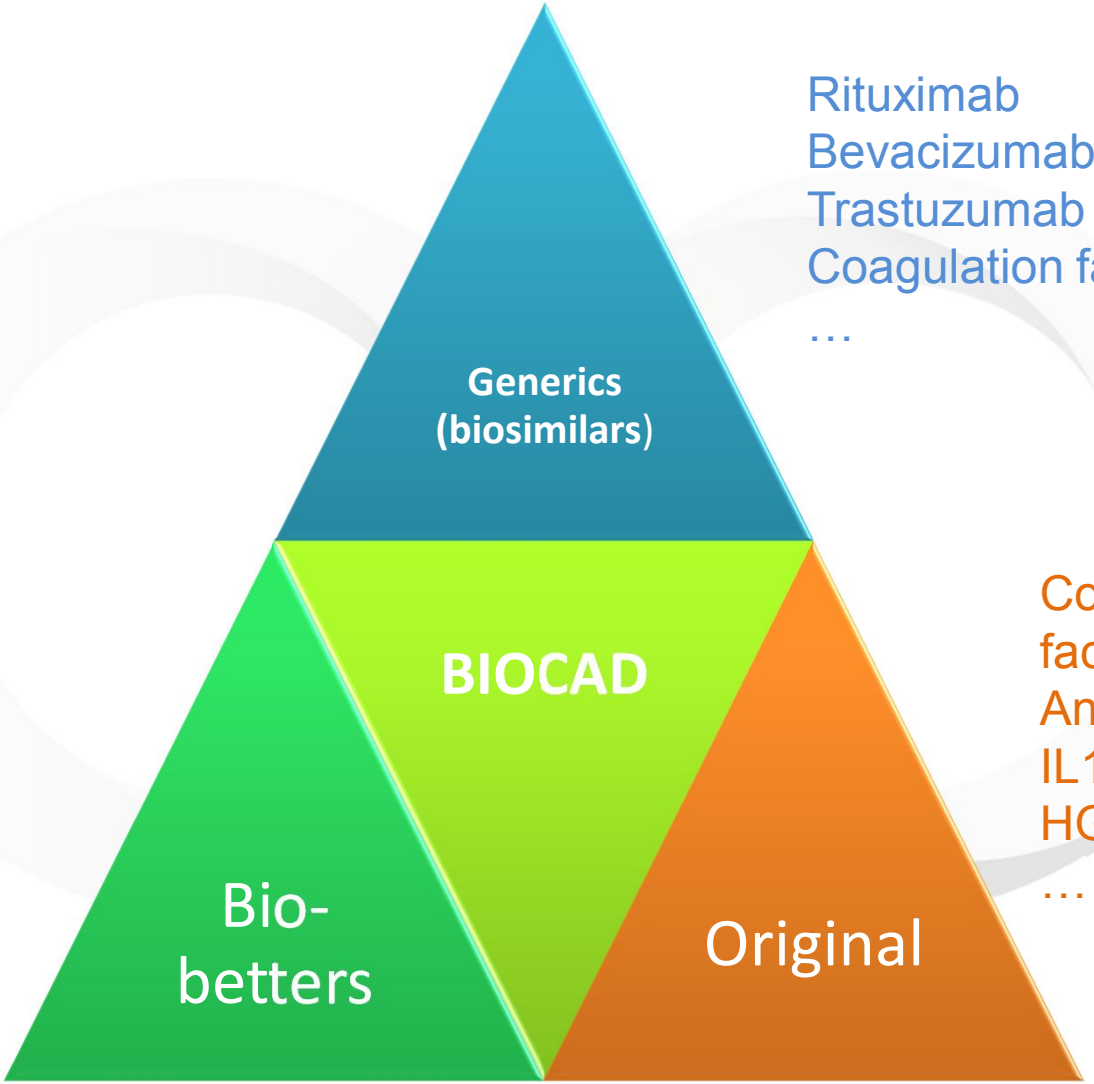
Personal



Today

Future

Portfolio. Drug “market” types

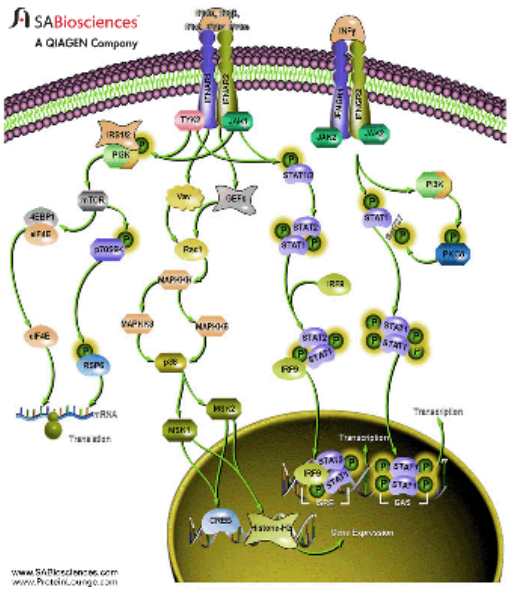


Rituximab
Bevacizumab
Trastuzumab
Coagulation factors
…

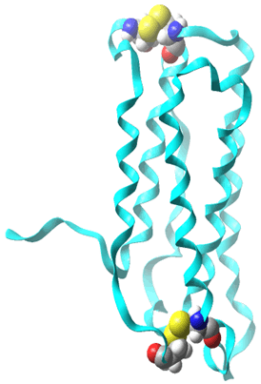
Cetuximab
Natalizumab
Alemtuzumab
…

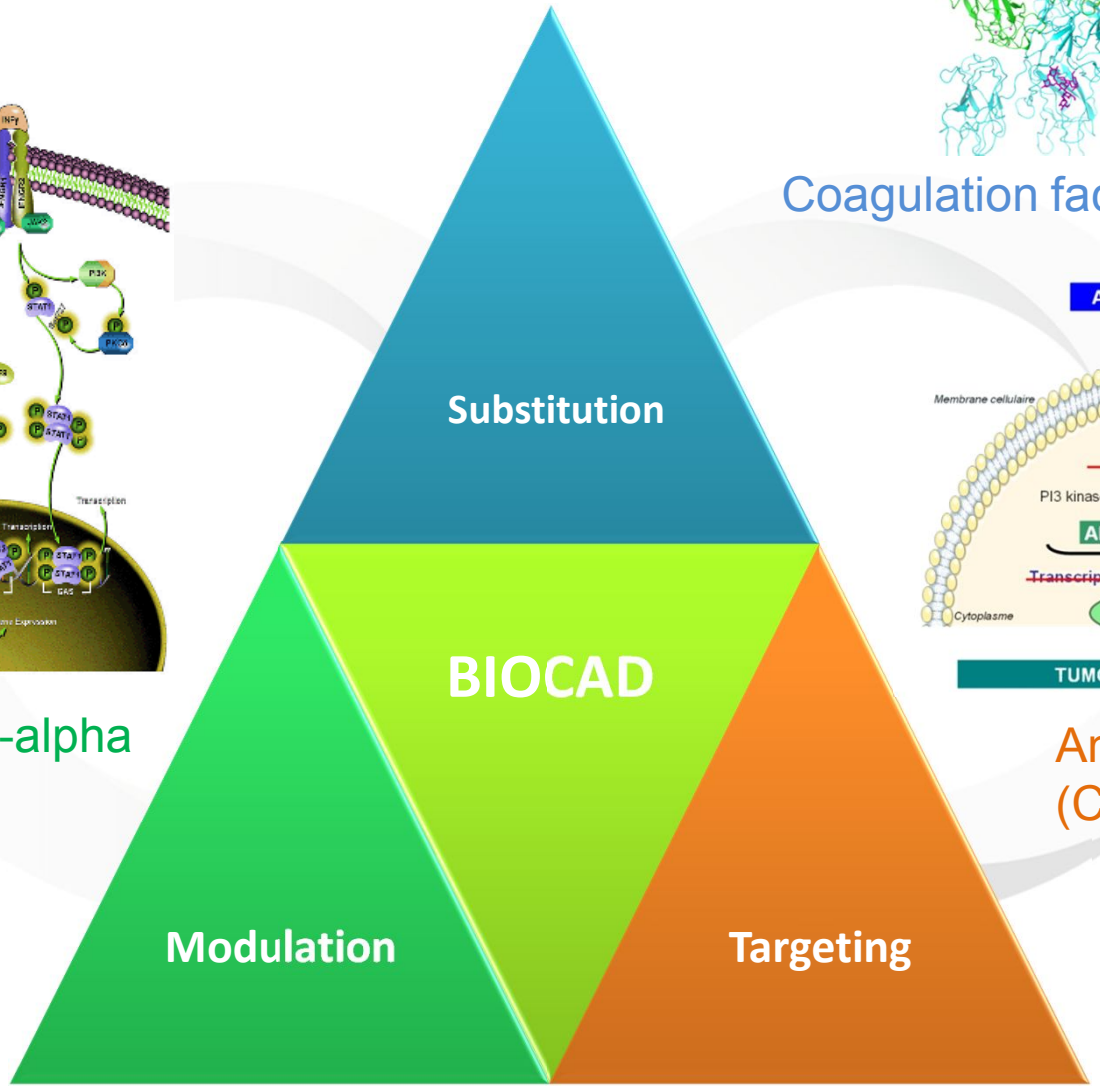
Coagulation
factors
Anti:
IL17, IL12, EGFR,
HGFR (>17)
…

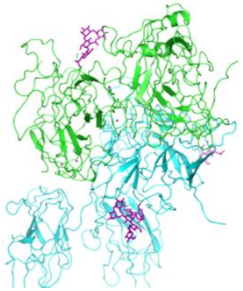
Portfolio. Drug “action mechanism” types



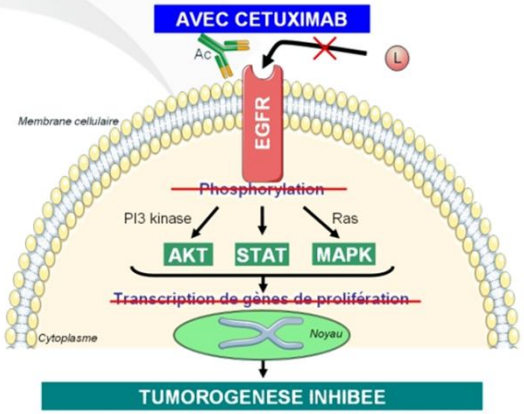
Cytokines: IFN-alpha





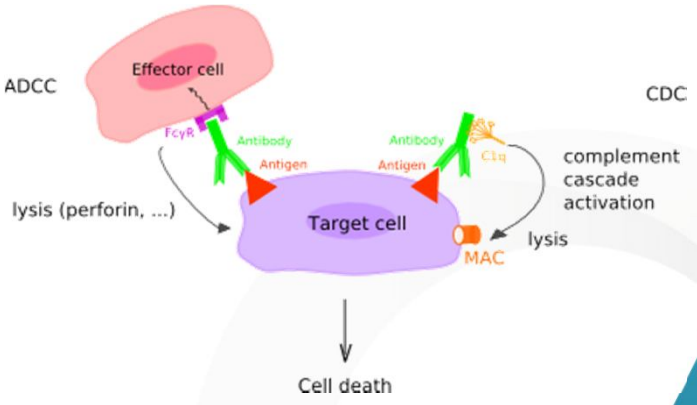


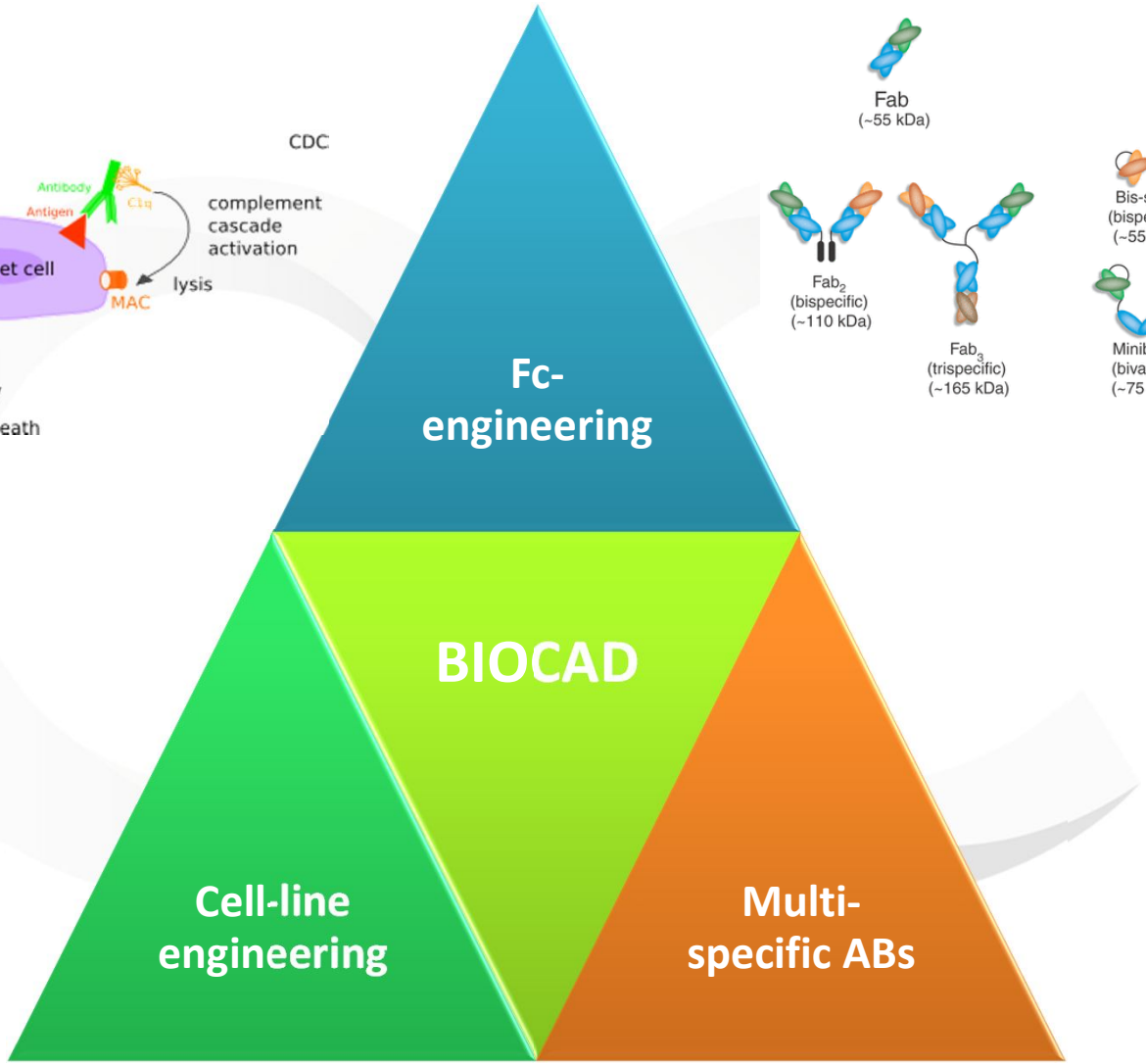
Coagulation factor VIII

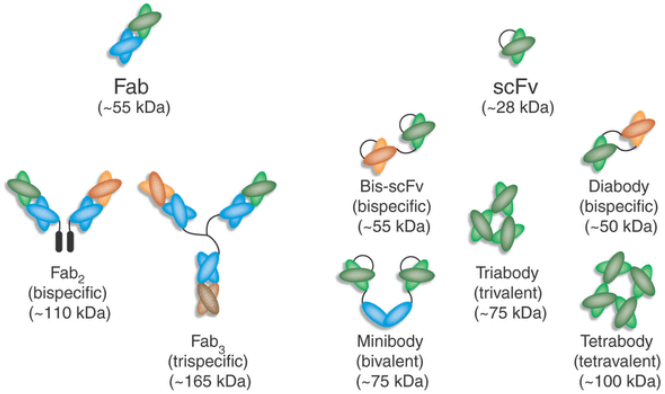


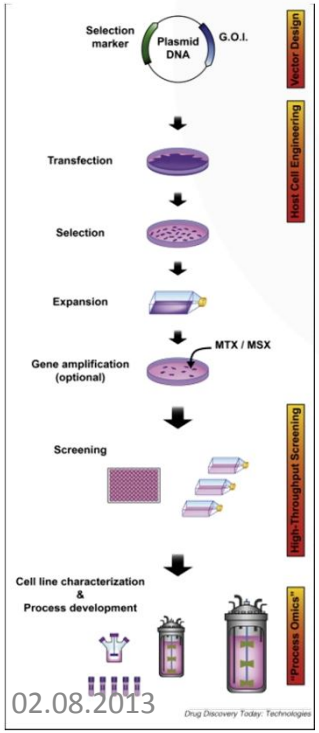
Anti-EGFR
(Cetuximab)

Portfolio. Drug modifications projects (MABs)

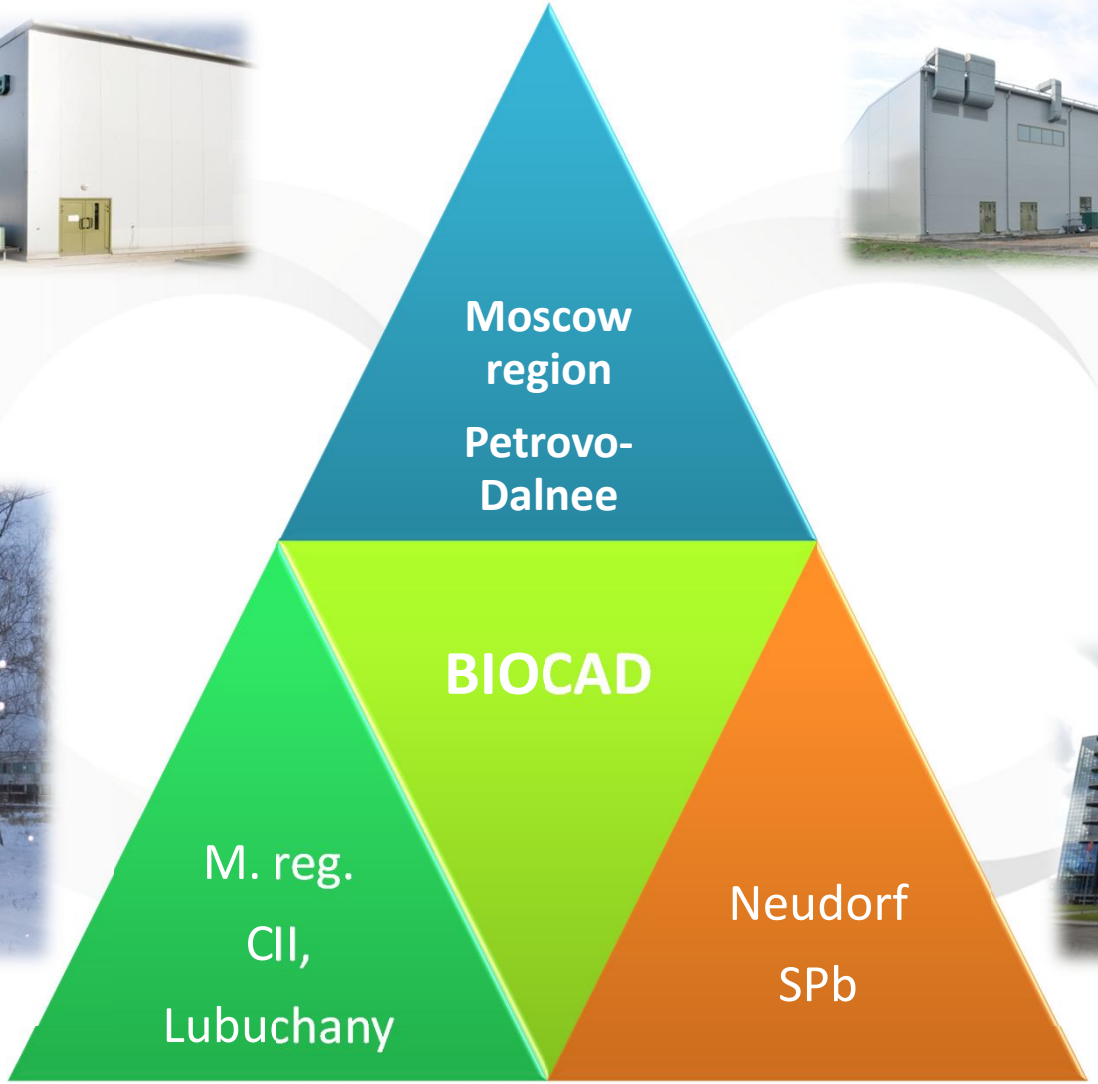




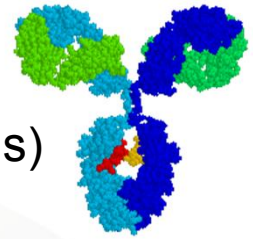




Structure. Geo



3rd manufacturing facility (St. Petersburg)

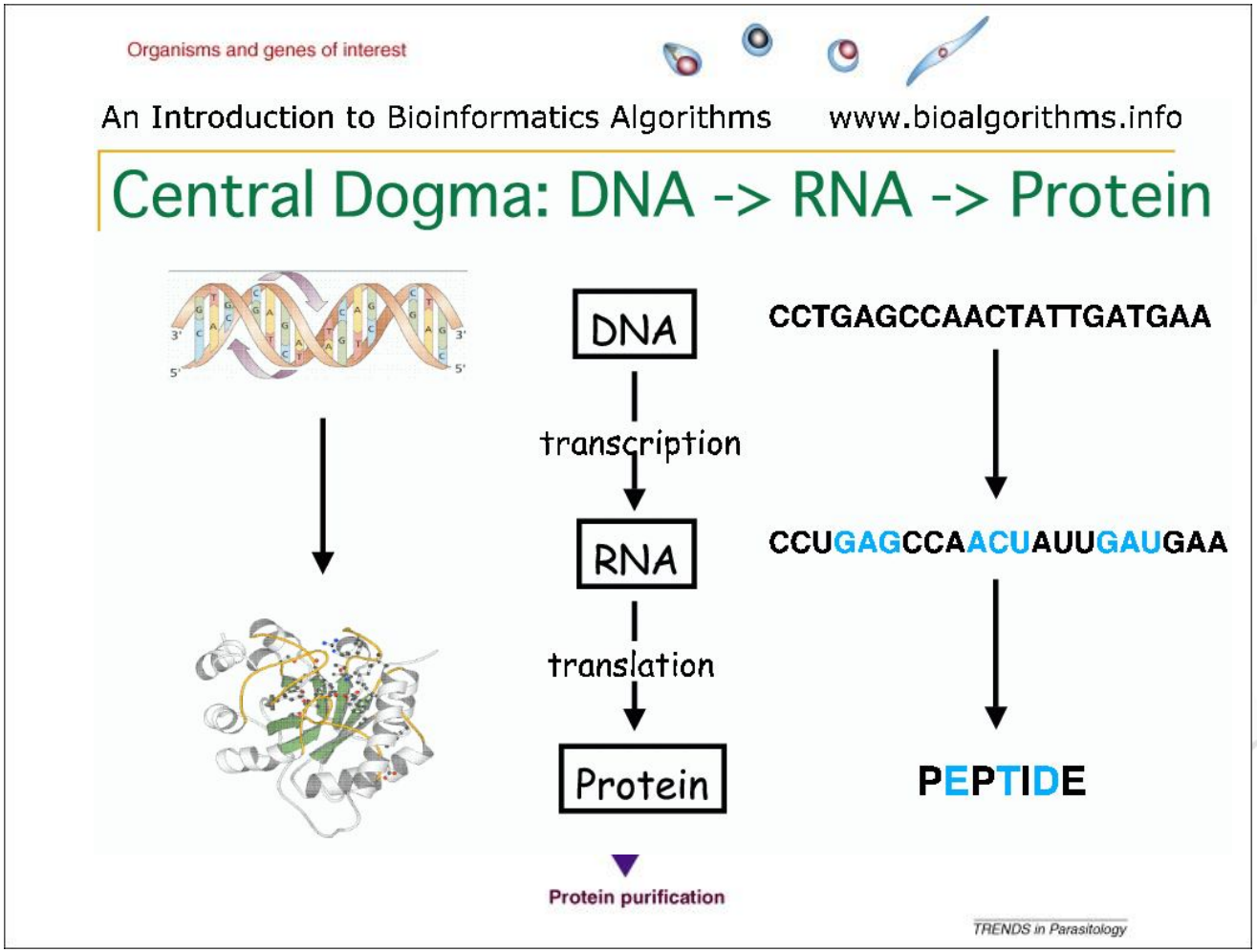


- Biological API (mammalian cells)

Ready for Commercial Production of MAB biosimilars in Q2 2013

- Conceptual designed made by a US consulting company.
- Projected capacity – 160 kg of protein per year. Projected capability, technological processes, necessary infrastructure are modeled using Super ProDesigner (USA)
- Technological equipment HyClone (USA), Finesse (USA)
- Single-use (disposable) technology

Recombinant proteins technology



New development start-up. Biologist view

Исходные данные: белок **N** участвует в процессе **M** и лечит болезнь **X**

Задача: получить методами биотехнологии белок **N**, проверить на взаимодействие с **M** и оценить эффективность на **X**

Возможные варианты действия

New development start-up. Biologist view

Исходные данные: белок **N** участвует в процессе **M** и лечит болезнь **X**

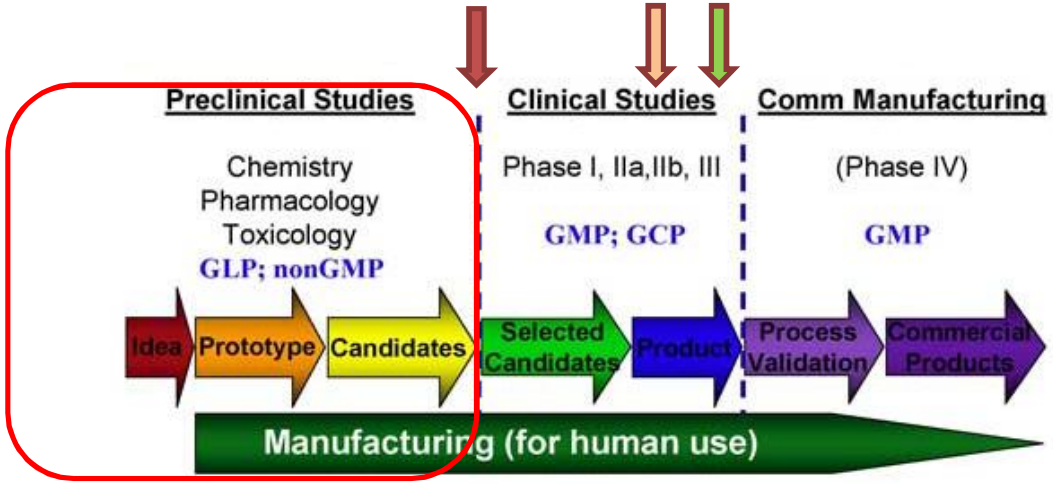
Задача: получить методами биотехнологии белок **N**, проверить на взаимодействие с **M** и оценить эффективность на **X**

- Что такое N? Что такое белок вообще?
- В каких процессах он участвует? Как с этими процессами связан процесс M?
- Что ведет к развитию болезни X? Какие есть на рынке препараты?
- Как получить ген N? Что вообще такое ген?
- Как его поместить в клетку и какую клетку взять? Что такое клетки?
- Что делать с клеткой? Как они должны расти? Как из них выделить белок?
- Как белок очистить? Как его проверить? Какие свойства у него должны быть?
- Как определить, что он влияет на процесс M?
- Как сделать так, чтобы клетки синтезировали много белка?
- Как масштабировать процессы культивирования, чтобы предприятие было рентабельным?
- Как проверить, что белок будет лечить болезнь X и не вызывать побочных эффектов?
- Что делать, если

- клетки не растут
- клетки растут, но не синтезируют белок
- клетки синтезируют белок, но он какой-то кривой…
- клетки синтезируют белок, он вроде нормальный, но по сравнению с аналогами – все равно кривой….
- клетки синтезируют белок, но он дает странные результаты в нескольких тестах
- белок в тестах показал отличные результаты, но все животные почему-то умерли после начала доклиники
- животные выжили, но препарат быстро выводится из крови и не успевает действовать
- животные выжили, свойства препарата отличные, но людям почему то плохо…
- людям хорошо, животным хорошо, препарат по свойствам нормальный, но стоит как новая машина…..

Karabelsky A.V., Biocad, 2013 ©

Drugs development flow



Checkpoints -

PoM

- **Proof of Mechanism**
- Исследования свойств молекулы (тесты in vitro на взаимодействие в мишенью, клеточные тесты, доклинические исследования)

PoC

- **Proof of concept**
- Фаза I и фаза II клинических исследований (оценка ADME, оценка оптимальной дозы, оценка “работоспособности“ белка для лечения целевого заболевания)

PoP

- **Proof of principle**
- Фаза III клинических испытаний (сравнение с плацебо, другими препаратами, перерасчет дозы, оценка эффективности и безопасности препарата для подачи документов на регистрацию)

PoM. From theory to practice

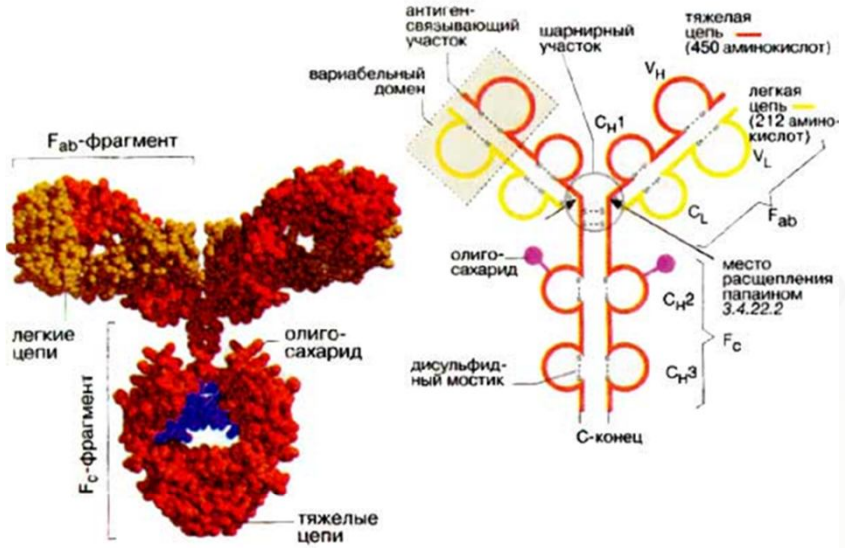
• Мишень	строение и функции биомолекул (ДНК, белки)
• Системы экспрессии	строение и функции клеток
• Регуляция синтеза	экспрессия генов, контроль синтеза белка
• Свойства мишени in vivo	внутриклеточный сигналинг, нарушения, контроль
• Работа с генами	методы генетической инженерии
• Работа с белками	методы белковой инженерии
• Работа с клетками	оценка функций рекомбинантного белка в различных тестах in vitro. Доклинические исследования
• Планирование производственного процесса	возможные проблемы и их решения

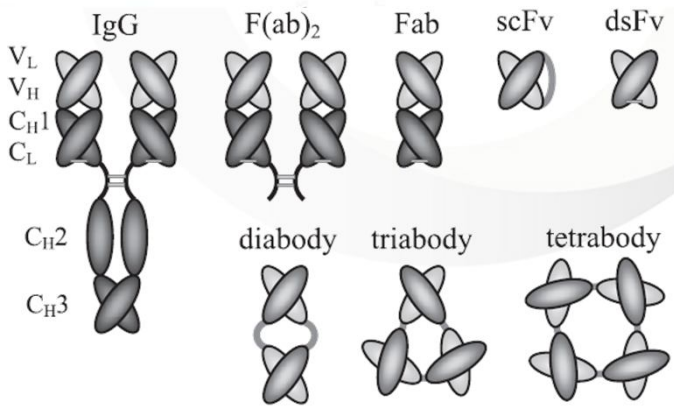
Antibodies guideline

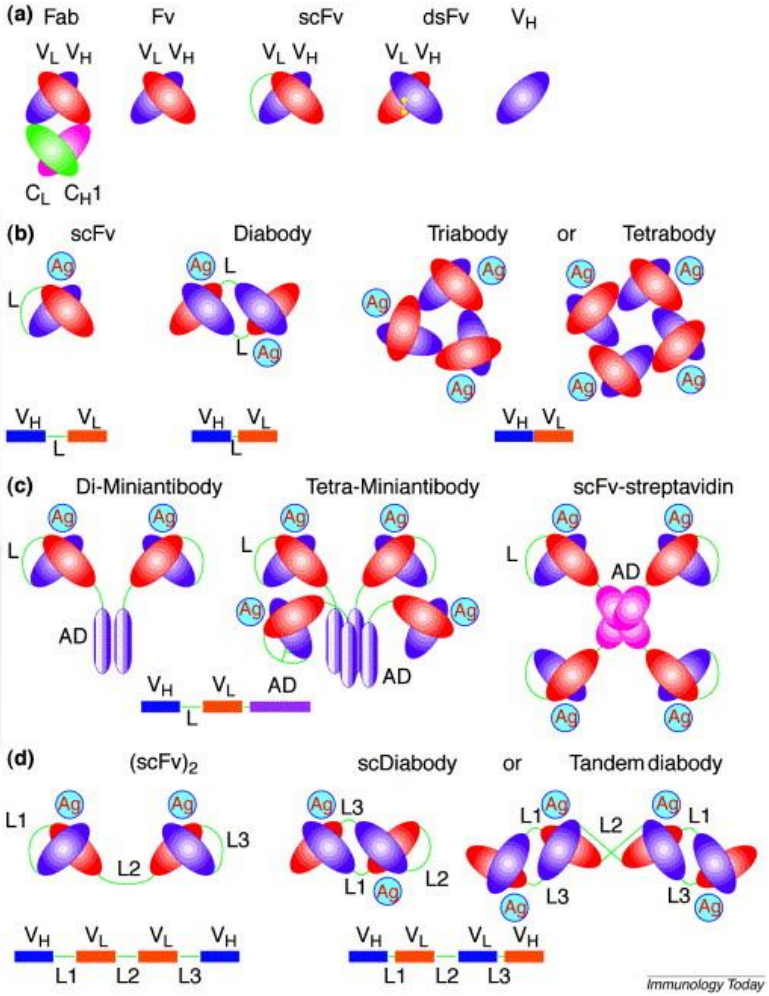
- Antibodies types and functions
- Therapeutic AB
- AB diversity
- Fc-modifications: prolonged *in-vivo* half-life, FcRN binding
- Fc-modifications: AB-screening: ADCC, FcGR binding
- Fc-modifications: heterodimer formation/ bispecific AB

BIOCAD Biopharmaceutical Company

Imunoglobulin structure





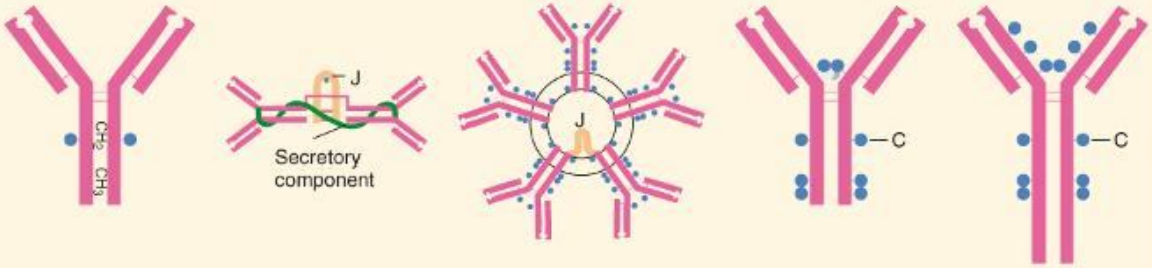


BIOCAD Biopharmaceutical Company

Imunoglobulins

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

TABLE 15.2 Characteristics of the Immunoglobulin (Ig) Classes



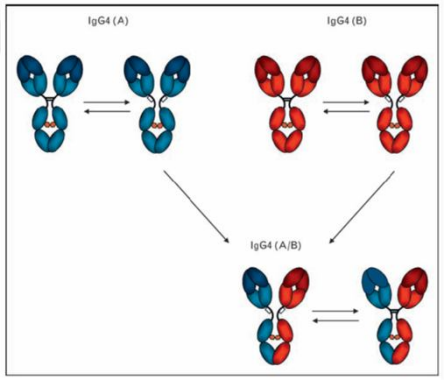
	Monomer	Dimer, Monomer	Pentamer	Monomer	Monomer
Number of Antigen Binding Sites	2	4 2	10	2	2
Molecular Weight	150,000	170,000–385,000	900,000	180,000	200,000
Percentage of Total Antibody in Serum	80%	13%	6%	1%	0.002%
Average Half-Life in Serum (Days)	23	6	5	3	2.5
Crosses Placenta?	Yes	No	No	No	No
Fixes Complement?	Yes	No	Yes	No	No
Fc Binds To	Phagocytes				Mast cells and basophils
Biological Function	Long-term immunity; memory antibodies; neutralizes toxins, opsonizes, fixes complement	Secretory antibody; on mucous membranes	Produced at first response to antigen; can serve as B-cell receptor	Receptor on B cells	Antibody of allergy; worm infections

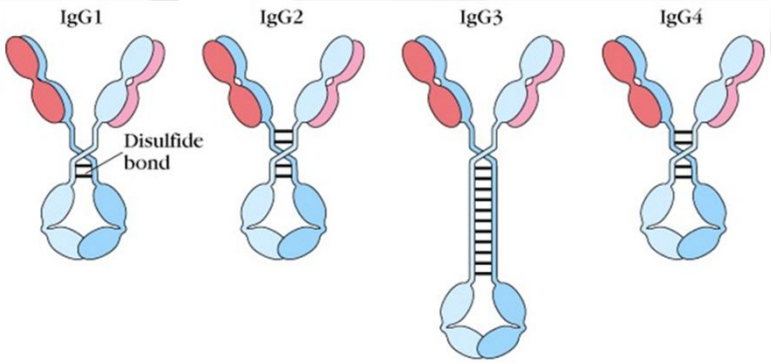
C = carbohydrate. J = J chain.

BIOCAD Biopharmaceutical Company

IgGs

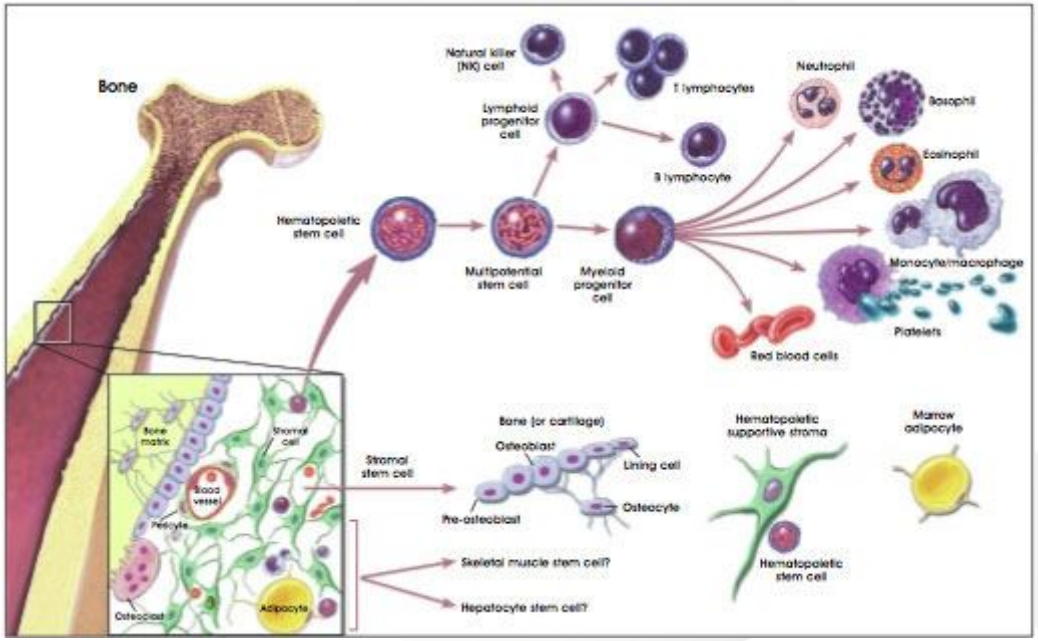
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Adult serum level range (g/l) (mean, g/l)	4.9-11.4 (6.98)	1.5-6.4 (3.8)	0.20-1.10 (0.51)	0.08-1.40 (0.56)
Proportion of total IgG (%)	43-75	16-48	1.7-7.5	0.8-11.7
Half-life (days)	21	21	7	21
Placental transfer	+	+	+	+
Antibody response to:				
proteins	++	+/-	++	+/-
polysaccharides	+	++	(-)	(-)
allergens	+	(-)	(-)	++
Complement activation				
C1q binding	++	+	+++	-
C1q binding, high epitope density enhancement alternative pathway	-	+	-	+/-
Binding to Fcγ receptors:				
FcγRI (CD64:monocytes, macrophages, neutrophils, dendritic cells)	++	-	+++	+
FcγRII (CD32):monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, platelets, B cells, dendritic cells, endothelial cells)	++	(a)	+++	-
FcγRIIa-H131	++	+++	+++	-
FcγRIIa-R131	++	-	++	-
FcγRIII (CD16:neutrophils, eosinophils, macrophages, NK cells, subsets of T cells)	++	-	++	-
FcγRIIIb-NA1	+++	-	+++	-
FcγRIIIb-NA2	++	-	++	-
Binding to Staphylococcal protein A	++	++	(b)	+
Binding to Streptococcal protein G	++	++	++	++
(a):FcγRII allotype dependent ; (b): IgG3 allotype dependent				

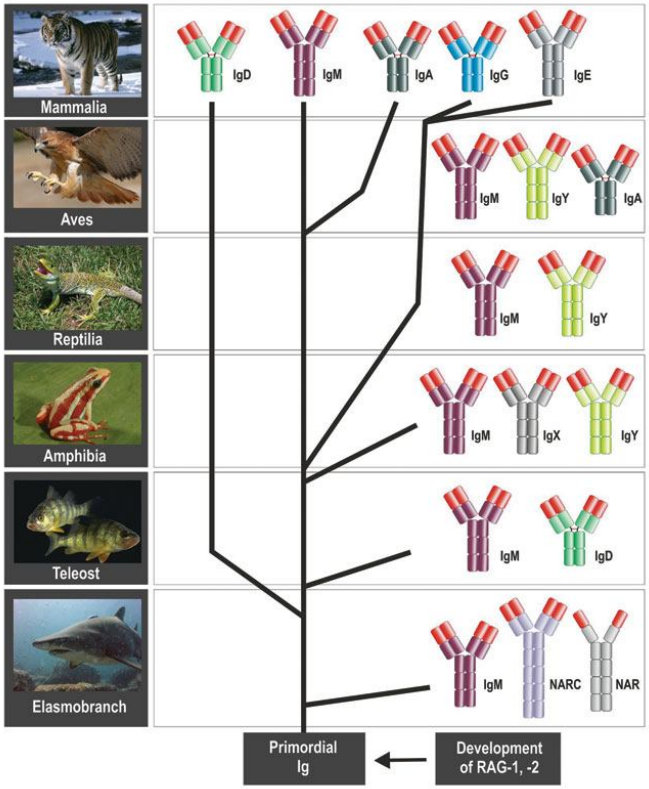




BIOCAD Biopharmaceutical Company

Immune diversity

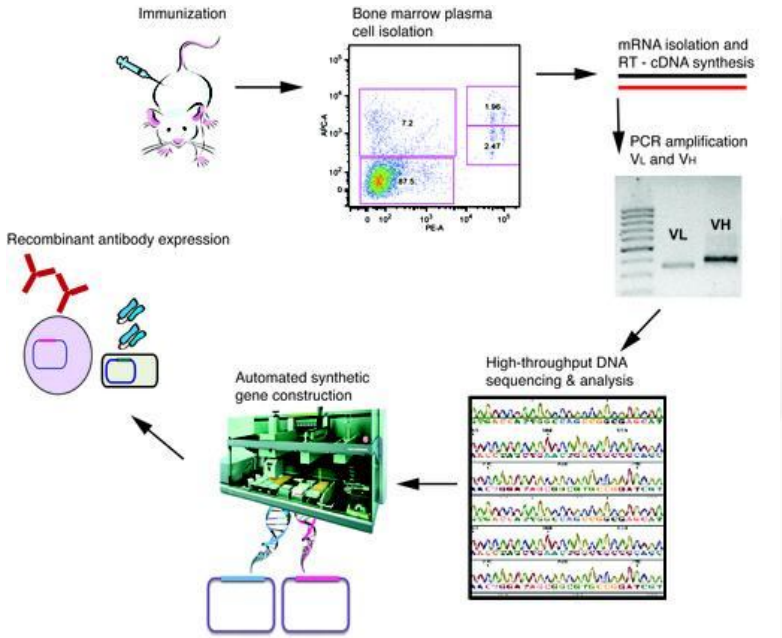




Karabelsky A.V., Biocad, 2013 ©

BIOCAD
Biopharmaceutical Company

Immune diversity. Practical use



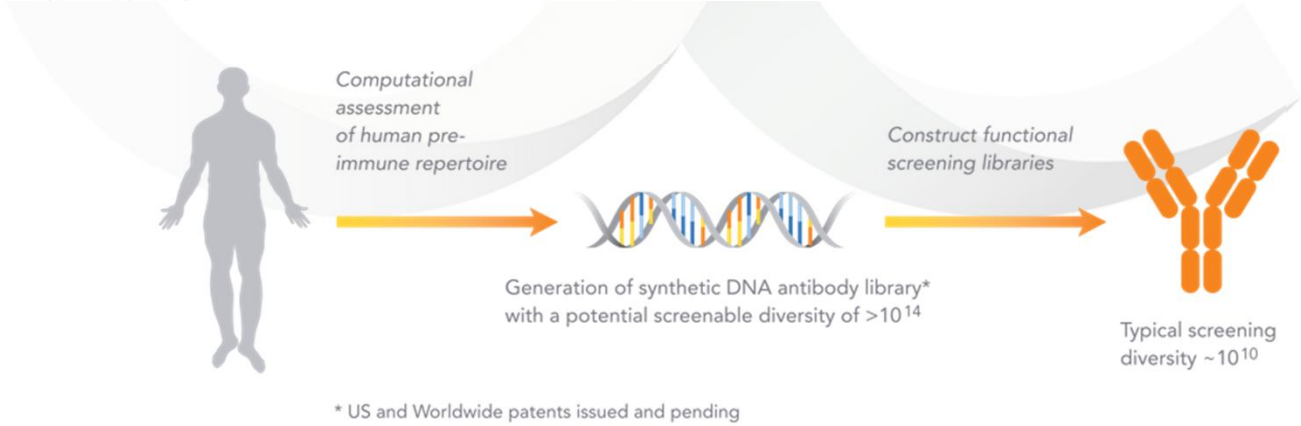
Anti-CEA 2 different AB

```
                1                                CDR1                                CDR2
VH H10  EVQLVSGGGLVQ-GGSLRLSCAASGFTLSSYSMNWVRQSPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVK
VH A6   --LQESGAEVGRPGSSVKLSCKTSGYTFASYGLNWVKQRPGQGLEWIGYIFPANGYTTYNDKFQ

                64                                CDR3
VH H10  GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGKYSSSWYLDLWGRGTLVT-SSGGGGSGGG
VH A6   GEATLTSDTSSSTAYMQLRSLTSEDSAIYFCVRLGDYDGRDVLDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG

                126                               CDR1                                CDR2
VL H10  GSGGGGSQSVLTQ-PPSVSGAPGQRVTISCTGSGSNIGANYGVHWYQHLP-TAPKLLIYANTNR
VL A6   GSGGGGSDIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRAS-SSVSSSY-LHWYQQKSGASPKLWIYSTSNL

                188                               CDR3                243
VL H10  PSGVPDRFSASKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLRSSVFGGGTKVTVLG
VL A6   ASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQY-SGYPLITFGAGTKLEI--
```



BIOCAD Biopharmaceutical Company

Polyclonal B cells can generate more than 10^{10} antibodies with different specificities

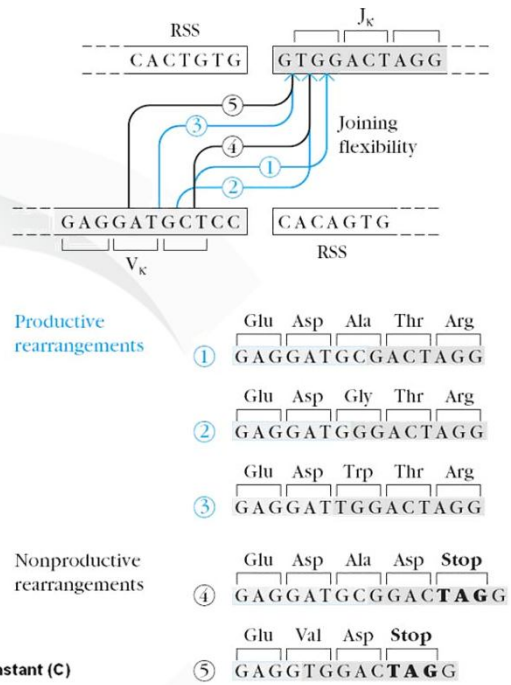
Each B cell clone produces Igs with single specificities

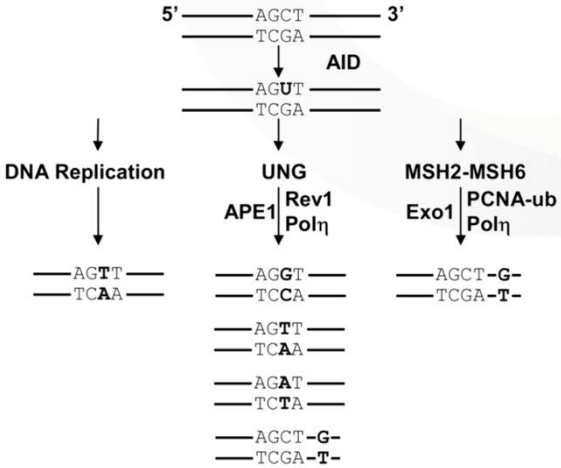
Karabelsky A.V., Biocad, 2013 ©

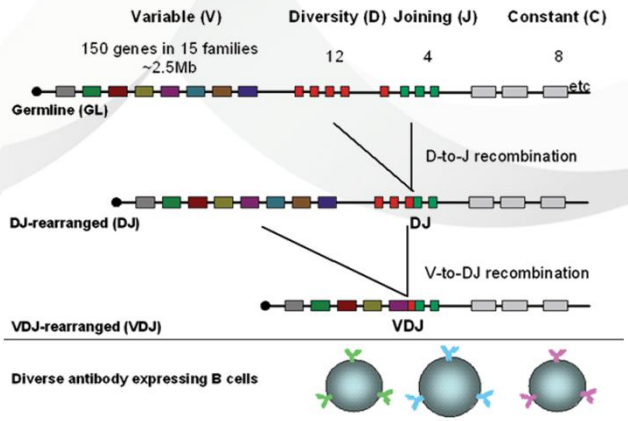
B cell diversity or antibody diversity

B-cell diversity

- Multiple germ gene segments
- Combinatorial VDJ joining
- Junctional flexibility
- P-region nucleotide addition
- N-region nucleotide addition
- Somatic hypermutation
- Combinatorial association of heavy and light chains







Karabelsky A.V., Biocad, 2013 ©

BIOCAD Biopharmaceutical Company

Combinatorial association of heavy and light chains

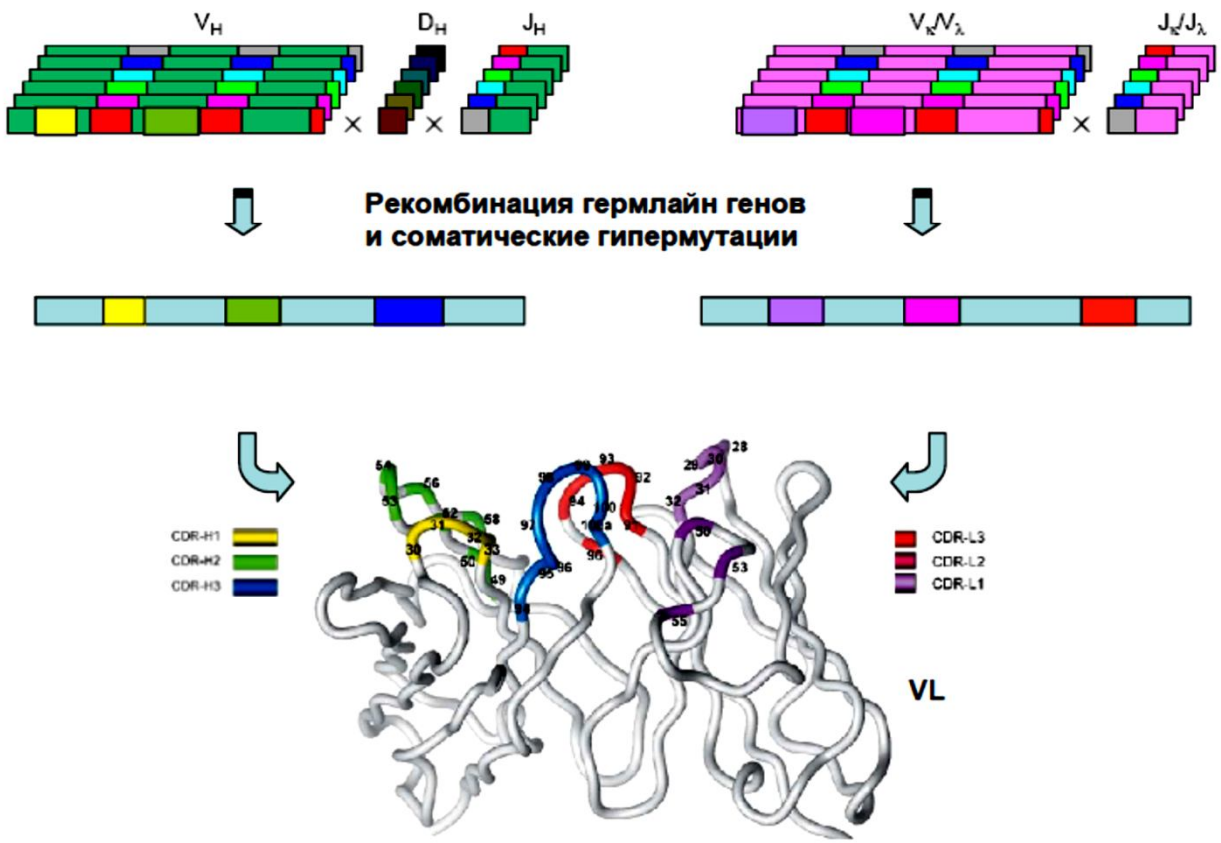
B-cell diversity

- The specificity of an antigen binding site of an antibody is determined by the variable region of both light and heavy chain
- Combinatorial association of heavy and light chains can generate diversity
- Human: potential to generate 8262 heavy chain genes and 320 light-chain genes as a result of variable region gene rearrangements - 2,644,240 possible combinations

BIOCAD Biopharmaceutical Company

Antibodies variation number

Образование разнообразия структур антител в природе

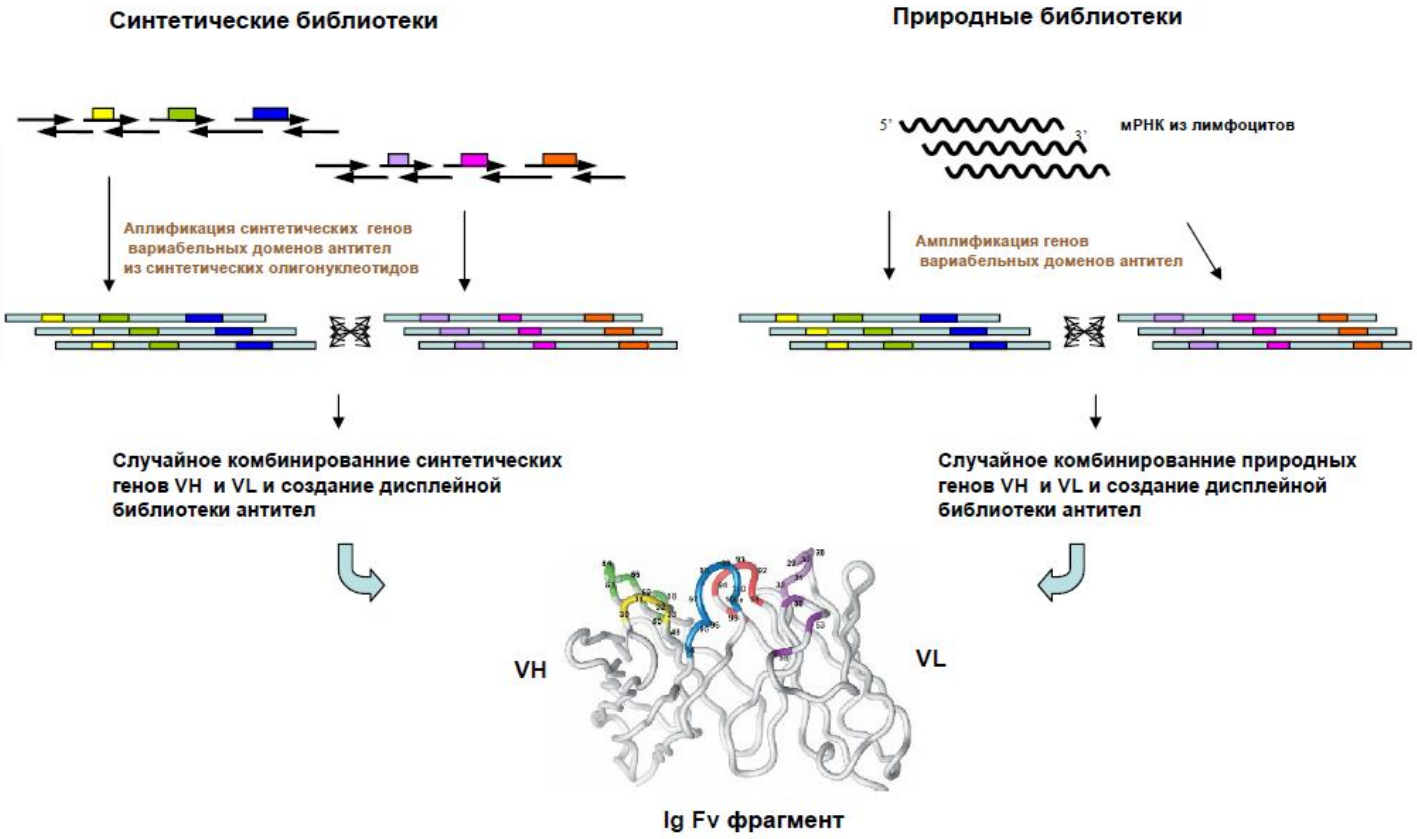


Ig Fv фрагмент

BIOCAD Biopharmaceutical Company

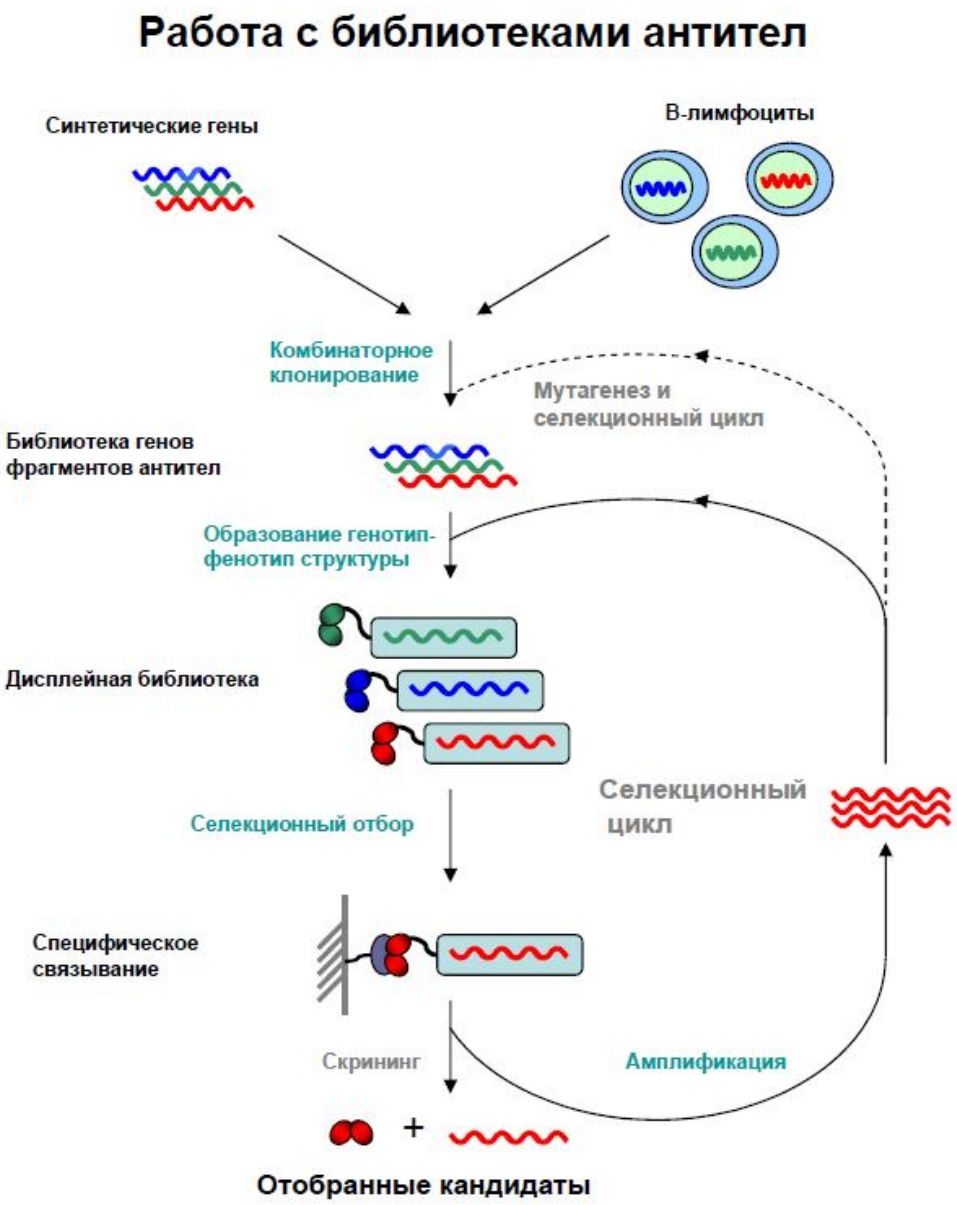
Antibodies libraries

Создание синтетических и природных библиотек антител



BIOCAD Biopharmaceutical Company

Antibodies libraries. Panning

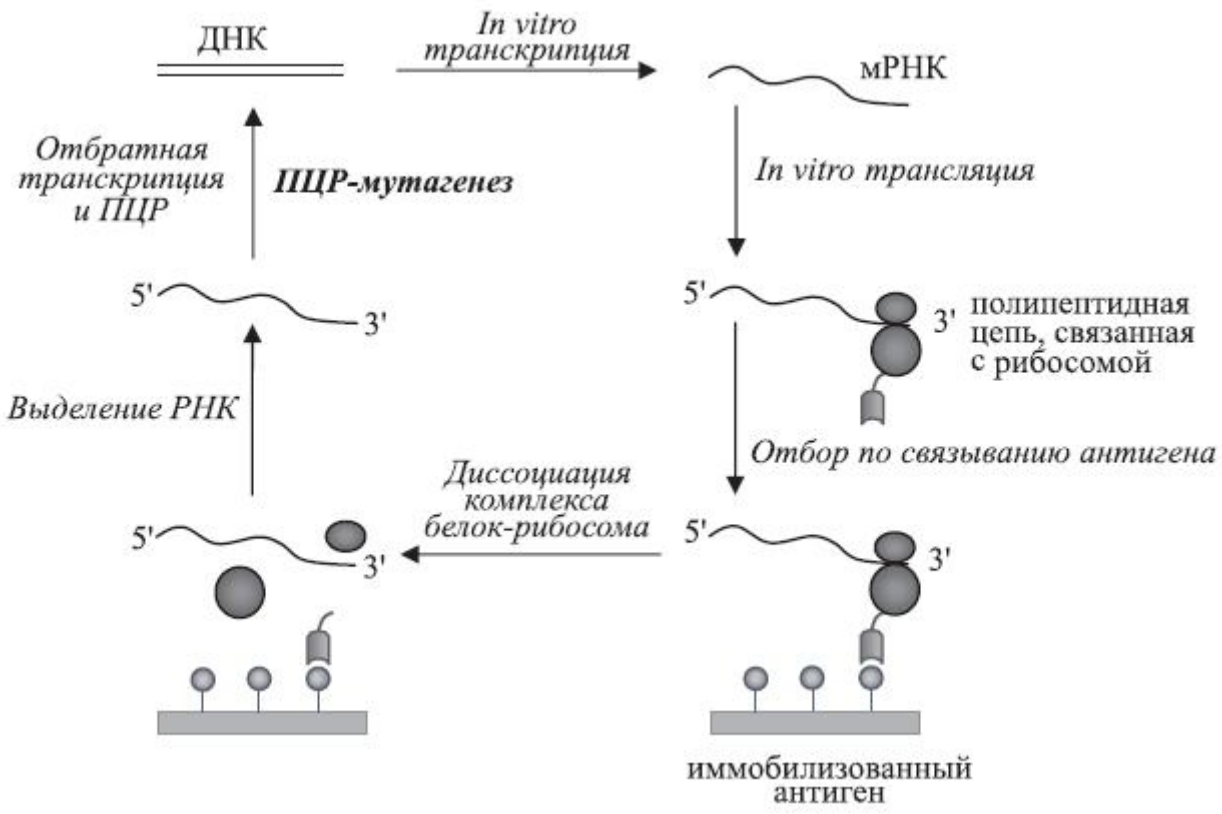


Karabelsky A.V., Biocad, 2013 ©

BIOCAD Biopharmaceutical Company

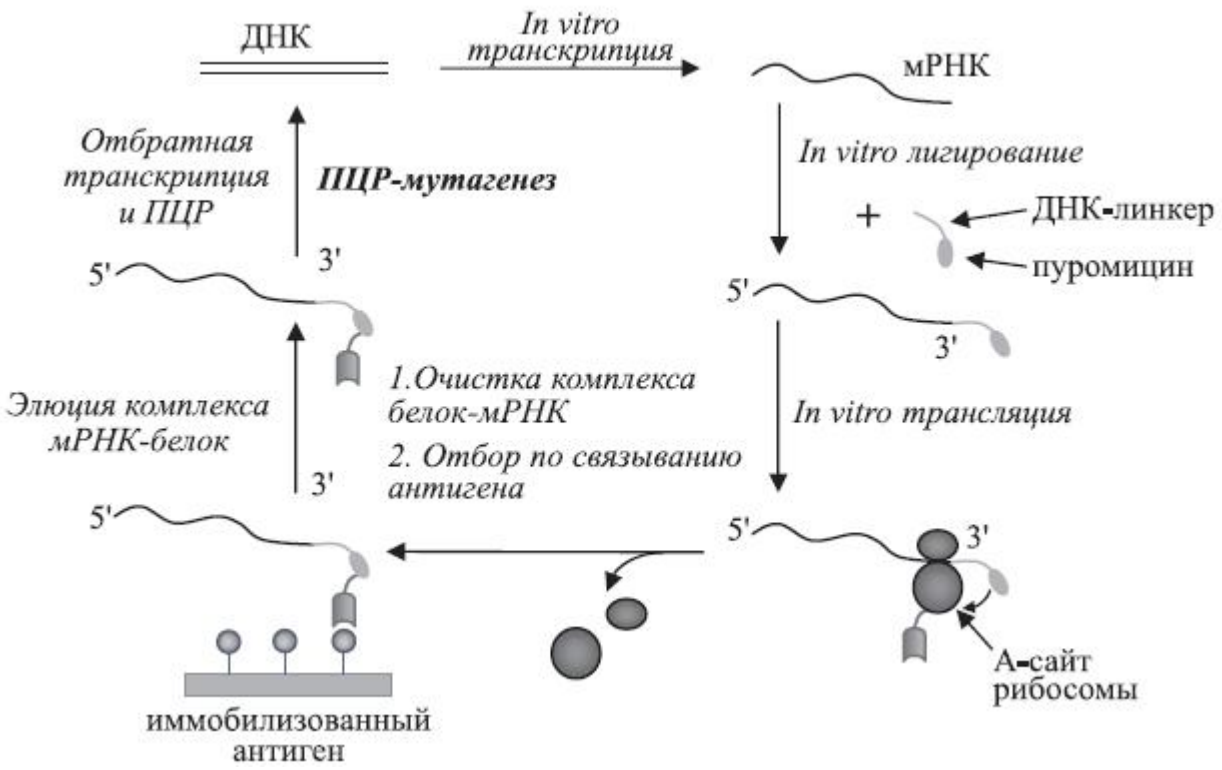
Рекомбинантные антитела. Рибосомный дисплей

- **Бесклеточная система синтеза белка на матрице мРНК**
- **Без стоп-кодона на мРНК**

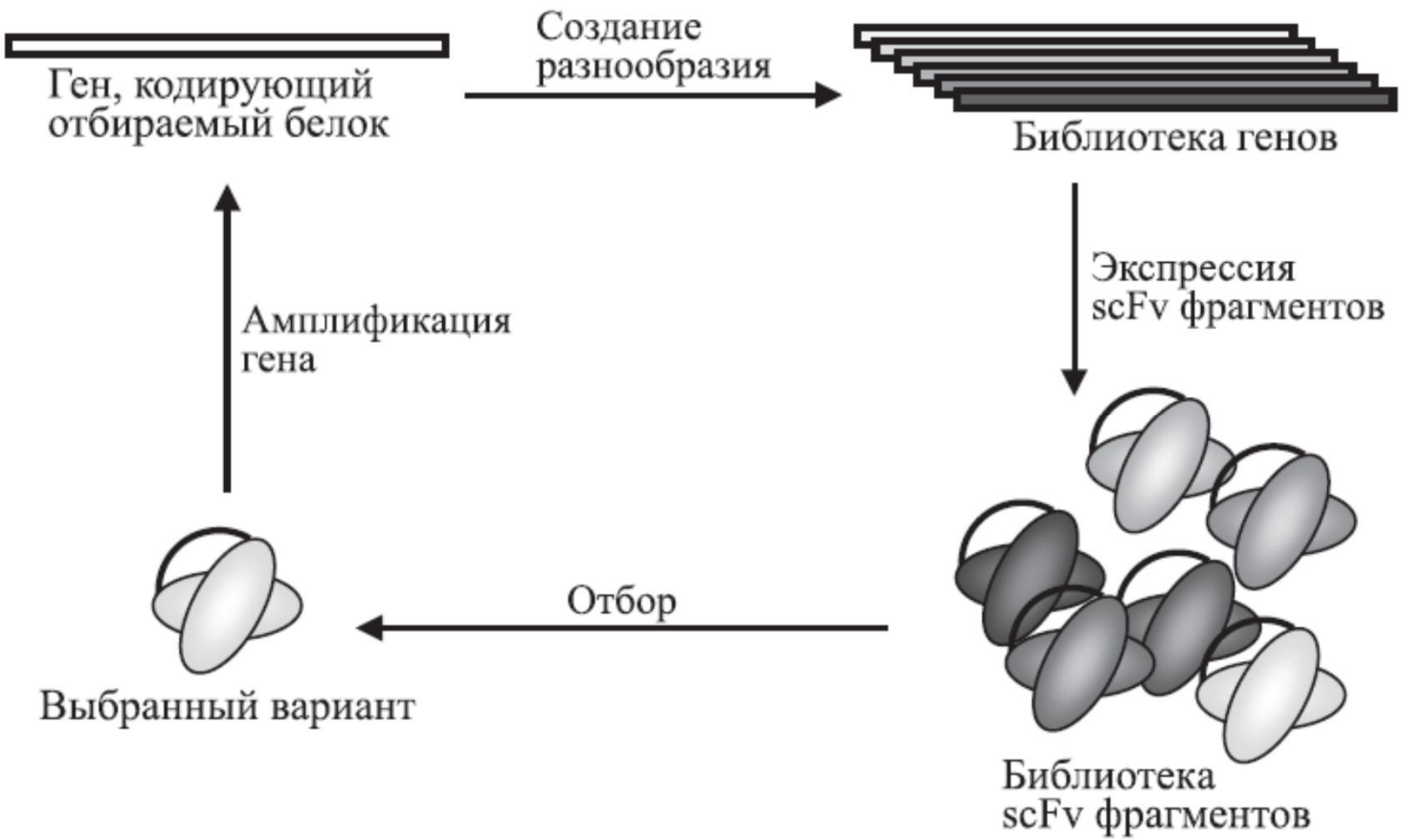


Рекомбинантные антитела. мРНК-дисплей

- **Бесклеточная система синтеза белка на матрице мРНК**
- **Возможность анализа большого числа вариантов**

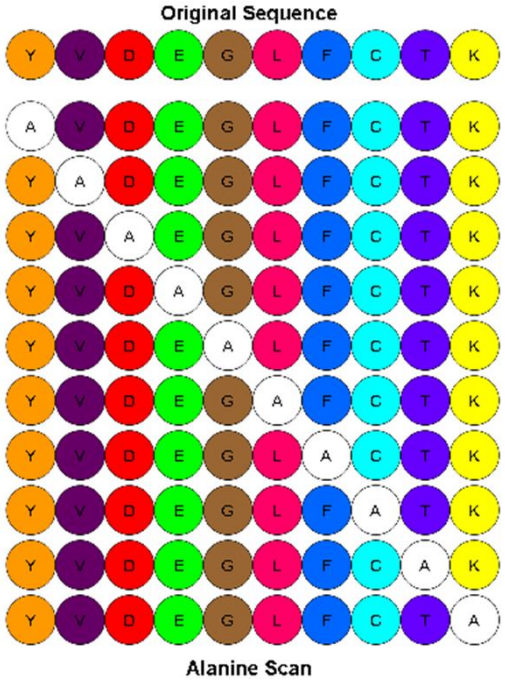


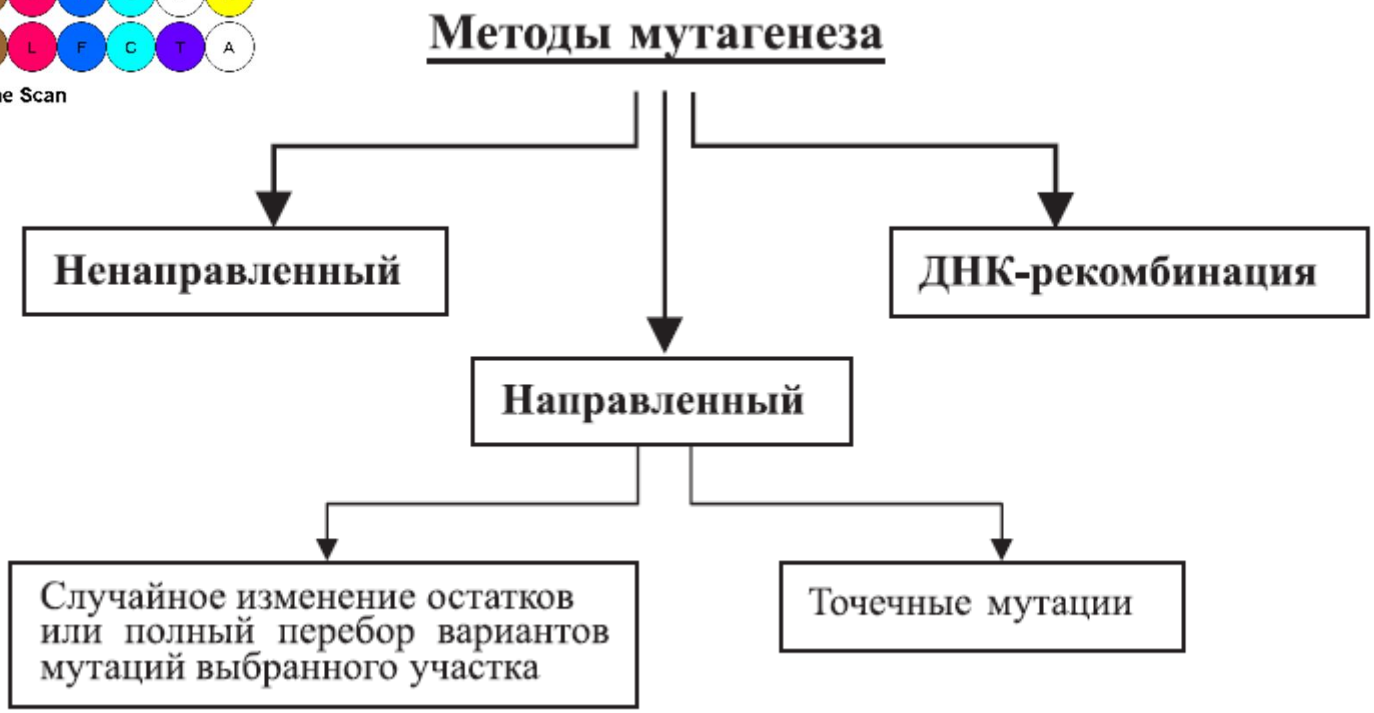
Antibodies libraries. Cycling



BIOCAD Biopharmaceutical Company

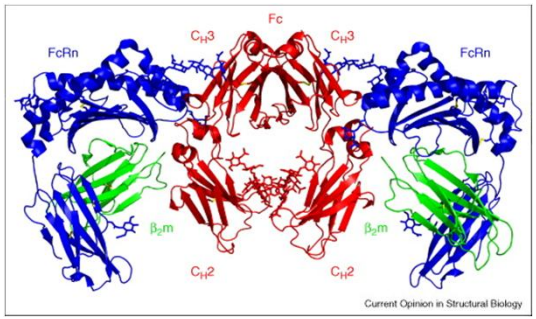
Antibodies libraries. Mutagenesis

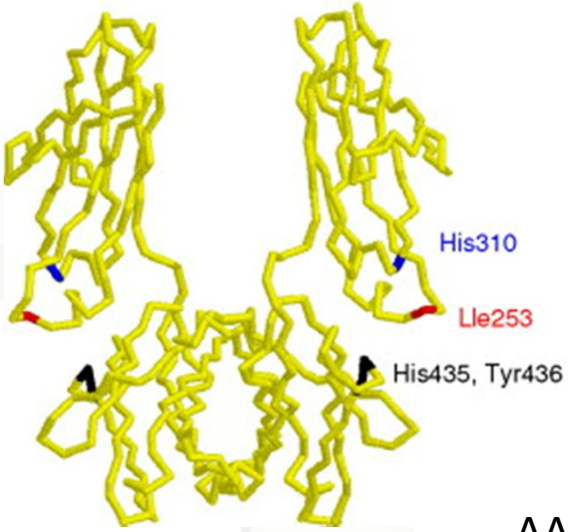




BIOCAD Biopharmaceutical Company

FcRN binding



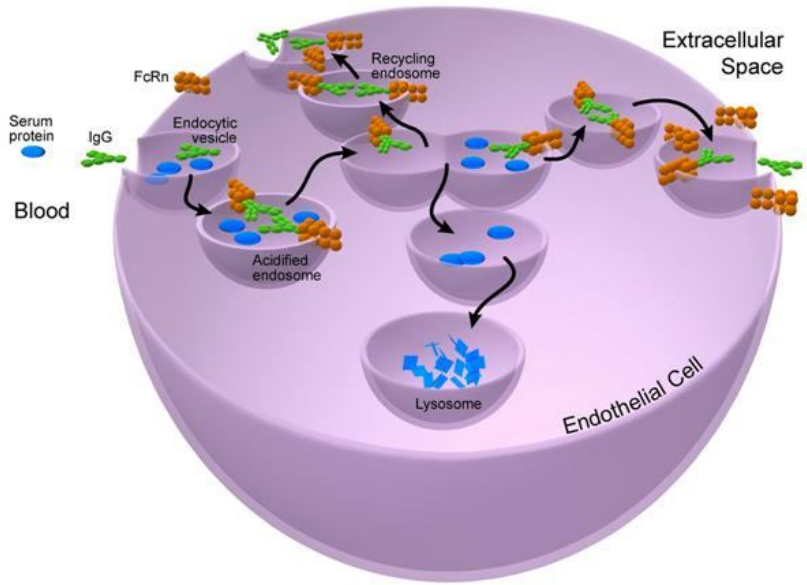


Fc-FcRN interaction: key AA positions

AA-substitutions close to the binding region can cause the FcRN affinity changes

Xencor

High affinity at pH 6.0, low affinity at pH 7.4 → increased in vivo half-life



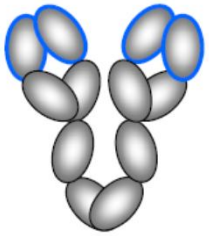
BIOCAD Biopharmaceutical Company

E.g.: Xtend-technology

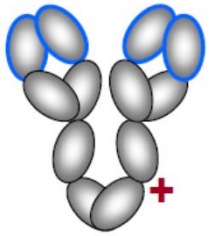
Xencor

VEGF: Avastin (bevacizumab) biosuperior

Avastin



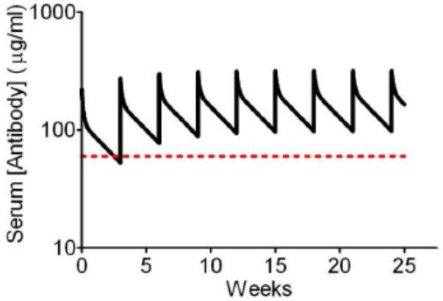
Xtend-VEGF



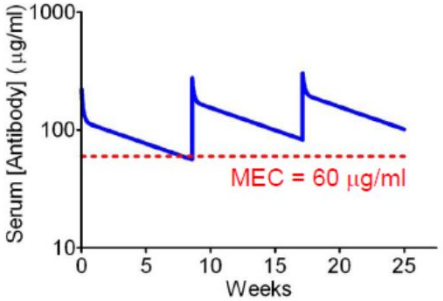
- Fv identical to Avastin for identical potency
- Fc 2 substitutions in IgG for enhanced PK

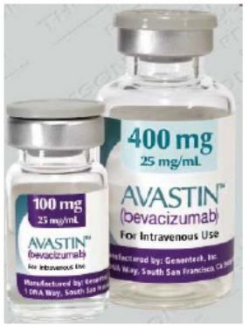
= Superior dosing regimen, reduced drug requirement

Dosed every 1-3 weeks, 10-15 mg/kg



Dosed every 2 months, 10-15 mg/kg

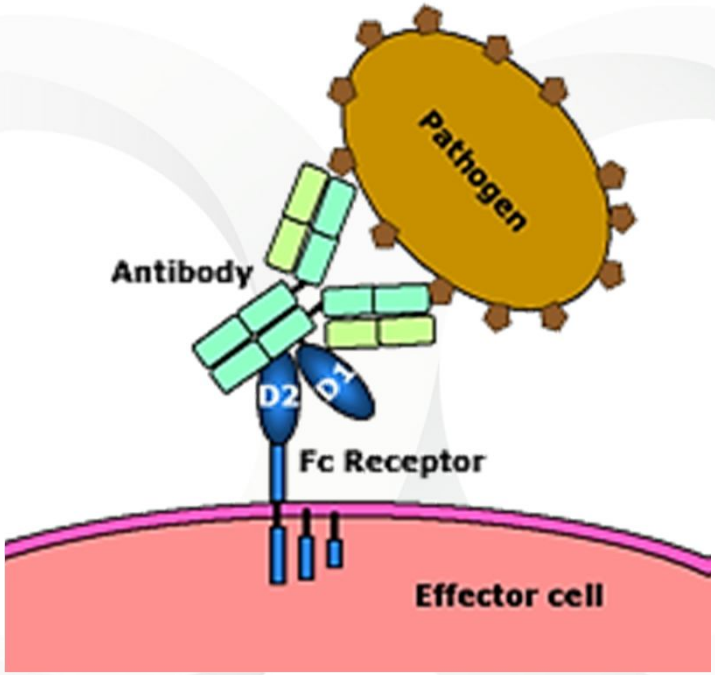




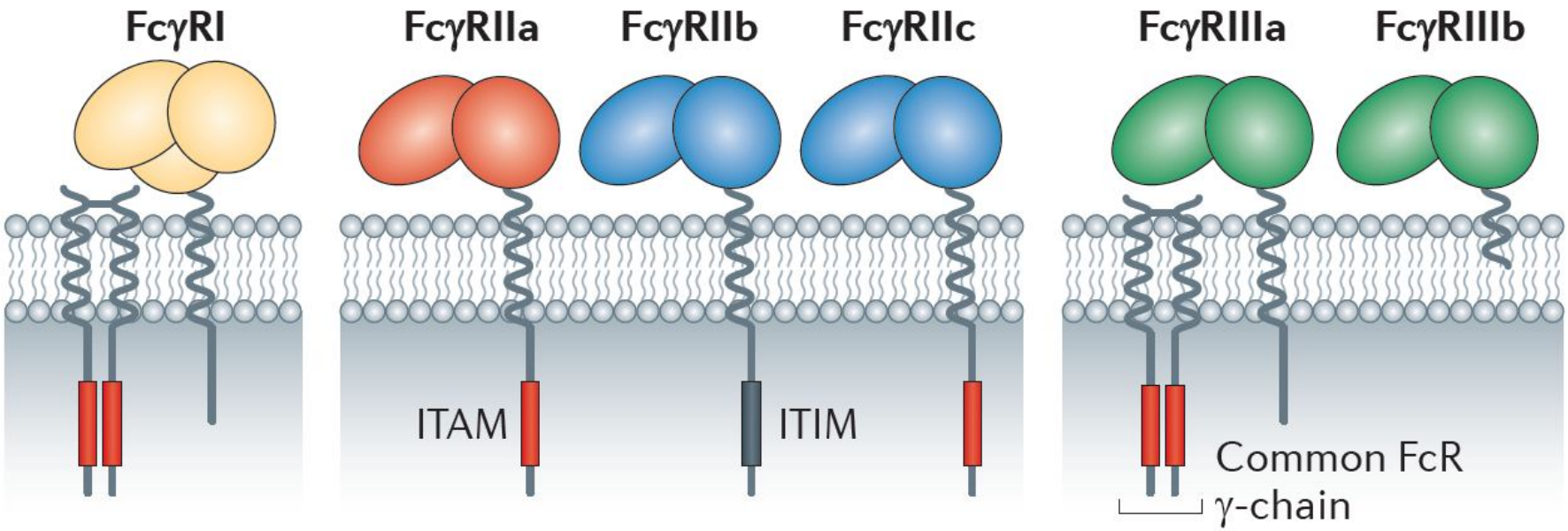
Theoretical human PK estimated from monkey PK data

BIOCAD Biopharmaceutical Company

Fc-gamma receptors (FcγRs)



Fc-gamma receptors (hFcγR) types and structure



- Экстраклеточный участок: 2 Ig-подобных ECD (у FcγRI - 3)
- Сигналинг: **ITAM** (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)

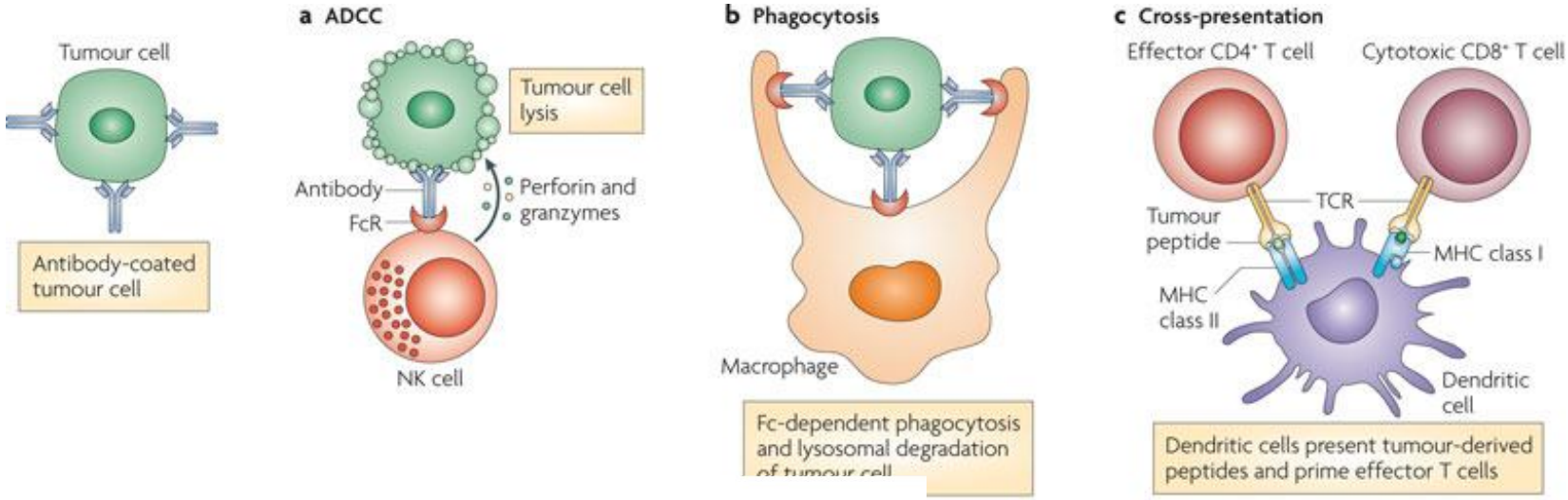
  ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)

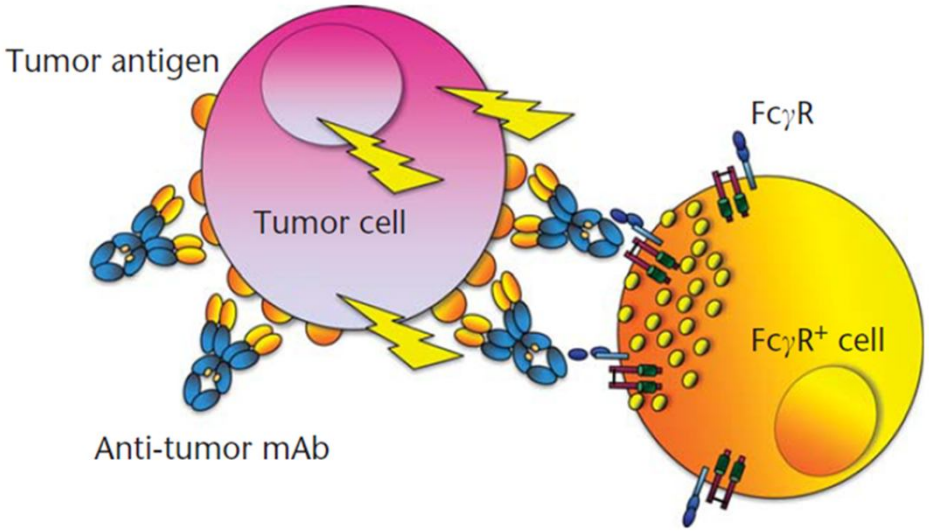
BIOCAD Biopharmaceutical Company

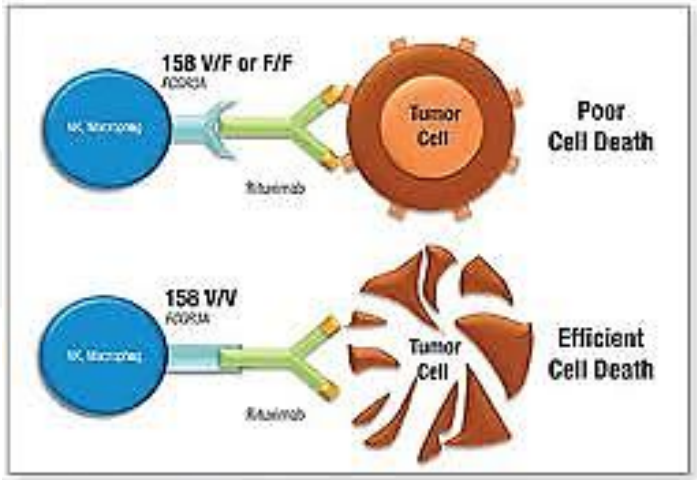
FcγR expression pattern

Receptor	Distribution	Main immunologic response	Activity
FcγRI	Macrophages, neutrophils, monocytes, eosinophils, mastcells	Antigen presentation, phagocytosis, endocytosis, ADCC	Activating
FcγRIIa	Macrophages, monocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, mastcells, platelets	Phagocytosis, ADCC, endocytosis, antigen presentation, cytokine release	Activating
FcγRIIb	B-cells, macrophages, monocytes, mastcells, neutrophils, basophils	Down regulation of activating signals, down regulation of B - cell receptor, endocytosis	Inhibiting
FcγRIIc	NK cells	Unknown	Activating
FcγRIIIa	NK cells, macrophages, monocytes	ADCC, endocytosis, cytokine release	Activating
FcγRIIIb	eosinophils, neutrophils, basophils	Degranulation, superoxide production	Activating (?)

FcGRs functions. ADCC/ADCP



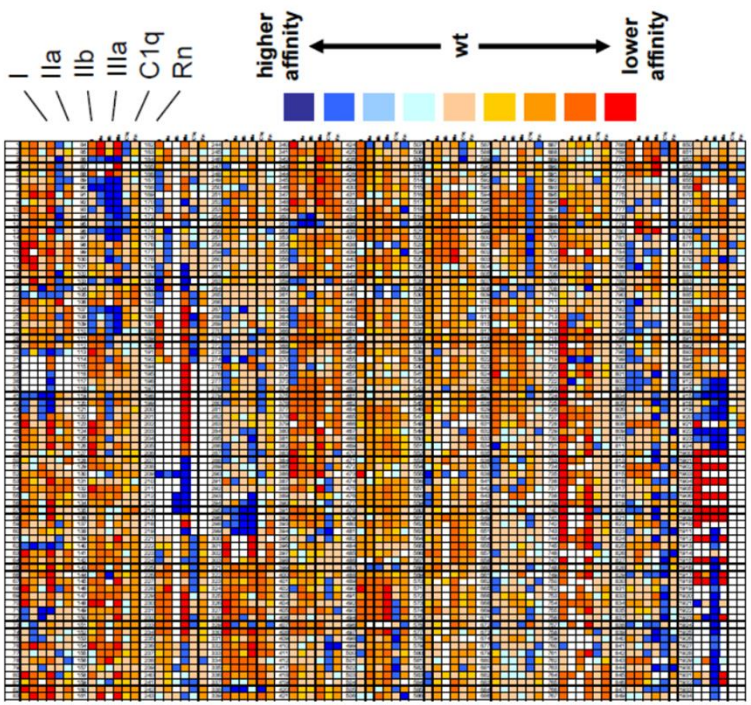




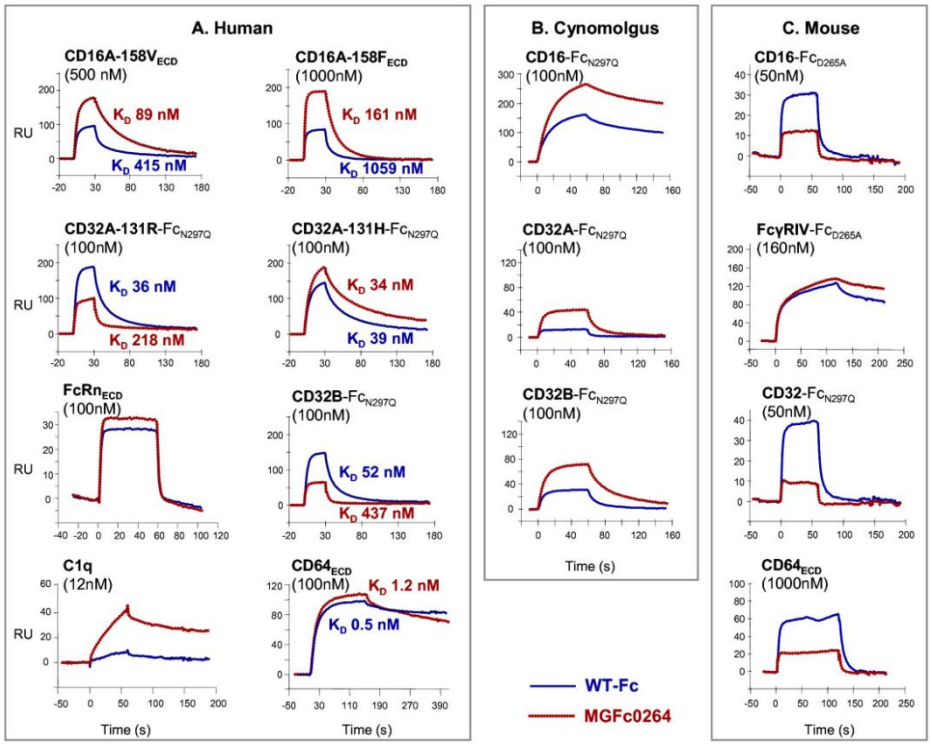
Dall'Zuna S, et al. Cancer Research, 2004; 64:4664-4669.

BIOCAD Biopharmaceutical Company

FcγR affinity modulation: Fc-engineering



Xencor Fc database allows rapid "plug & play" of desired effector functionality into any antibody



In silico

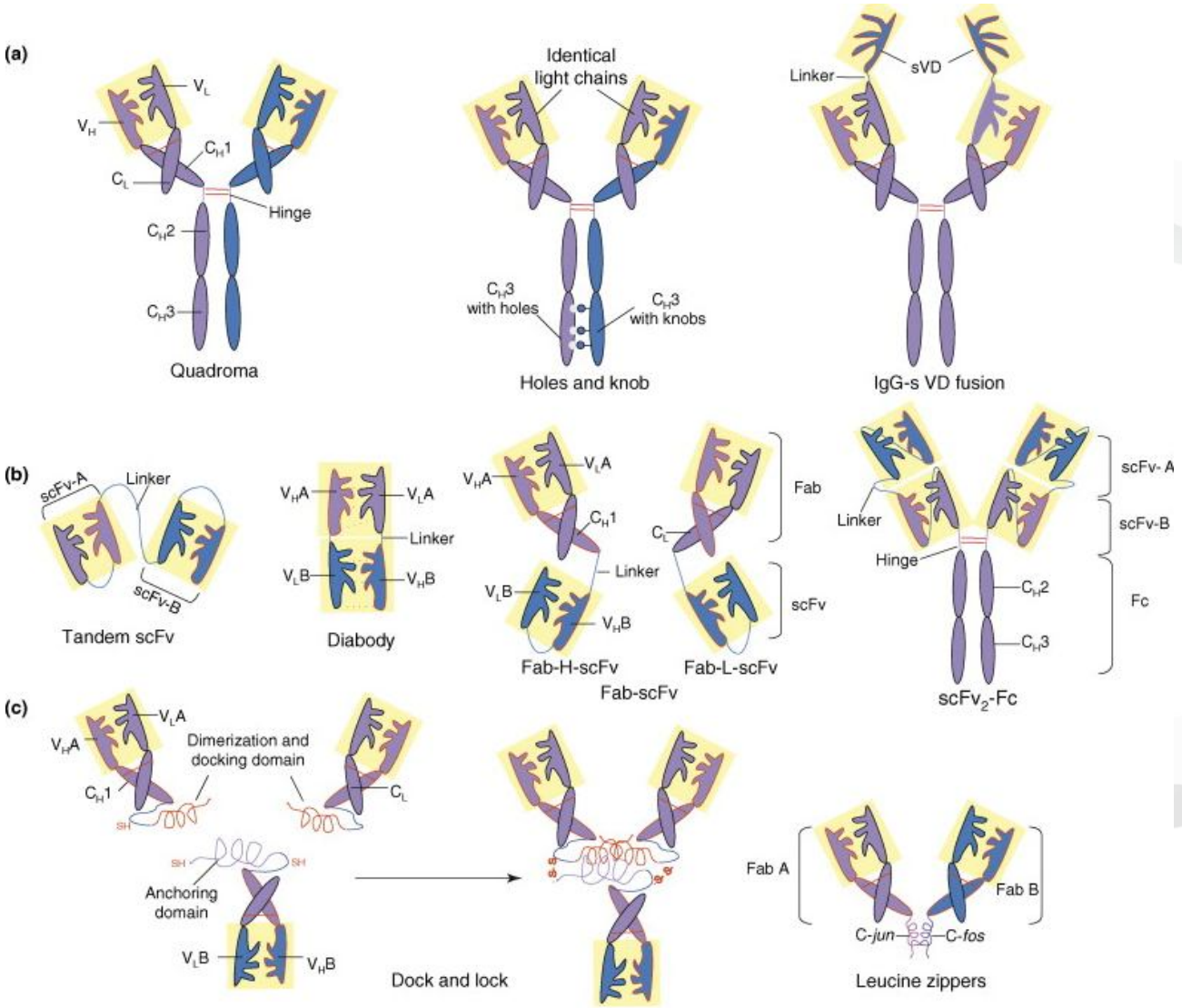
In vitro

ProBioGen
Intelligent Biopharmaceutical Solutions

Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity Assays

BIOCAD Biopharmaceutical Company

Heterodimer formation. Bispecific antibodies



IgG

scFv

Fab

BIOCAD Biopharmaceutical Company

Исходные данные: белок **N** участвует в процессе **M** и лечит болезнь **X**

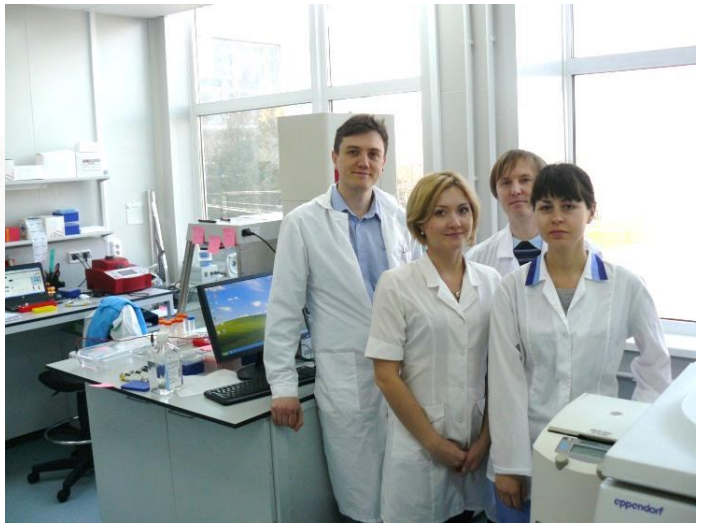
Задача: получить методами биотехнологии белок **N**, проверить на взаимодействие с **M** и оценить эффективность на **X**

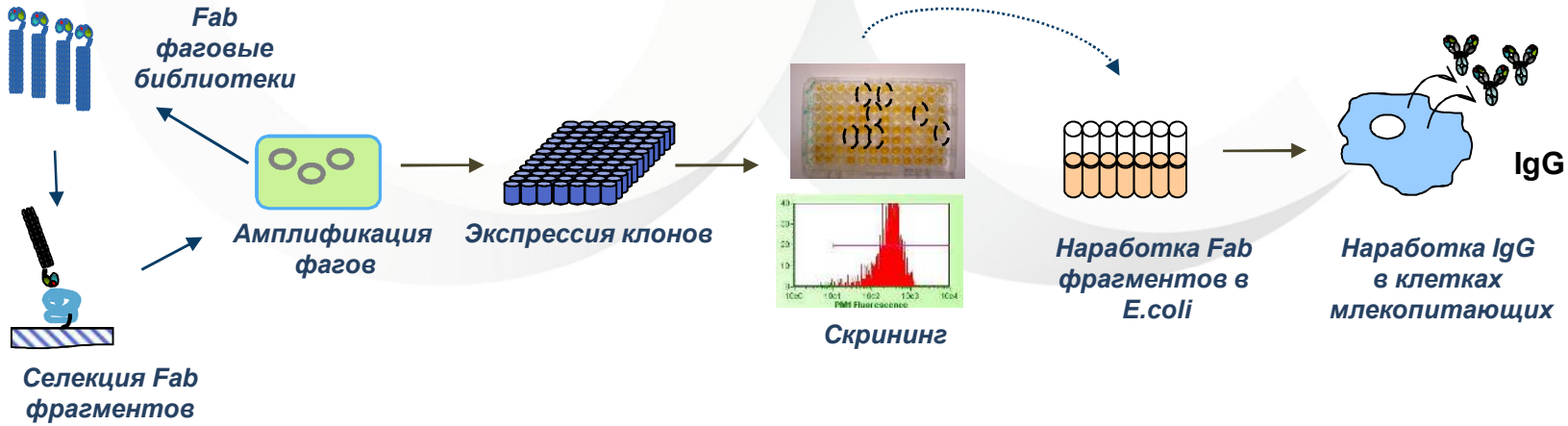
To do list:

- Increase affinity
- Convert antibody species e.g. humanize murine antibody
- Remove post-translational modification sites
- Engineer solubility
- Engineer pI value
- Optimize expression
- Optimize codon usage
- Remove T-cell epitopes, reduce immunogenicity
- Engineer species cross-reactivity
- Germlining

ЛАБОРАТОРИЯ ИНЖЕНЕРИИ АНТИТЕЛ

- Фаговый дисплей антител человека и животных
- Создание библиотек
- Гуманизация и матурация
- Белковый дизайн, биспецифические антитела

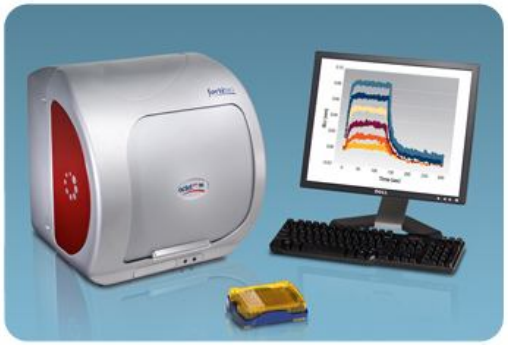




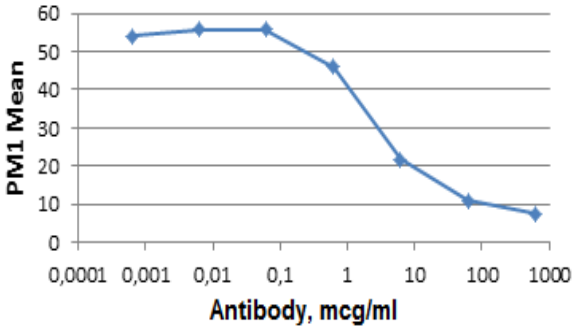
Фаговый дисплей → Скрининг и анализ → Наработка антител

ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

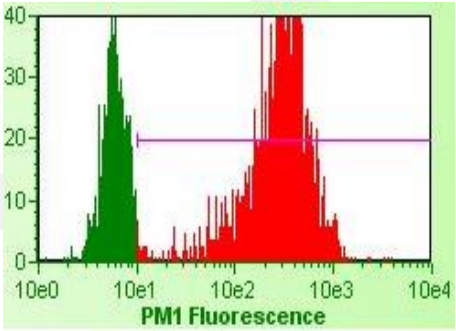
- Разработка клеточных тестов
- Транзиентная экспрессия антигенов и антител
- Поддержка проектов по разработке новых препаратов



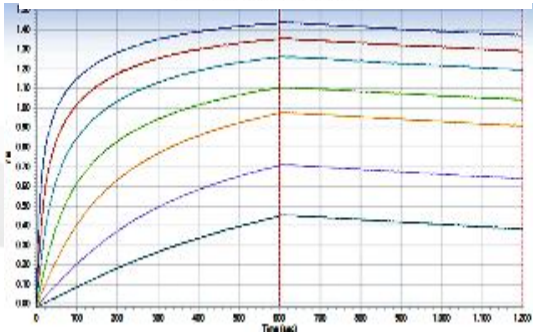
The Octet RED96 System



Клеточные тесты



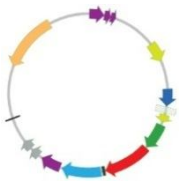
Проточная цитометрия



Анализ кинетики связывания

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В ТРАНЗИЕНТНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

I. Клонирование
(10 дней)



II. Культивирование
(6-12 дней)

III. Очистка
(3 дня)

IV. Анализ
(4 дня)

Ключевые особенности:

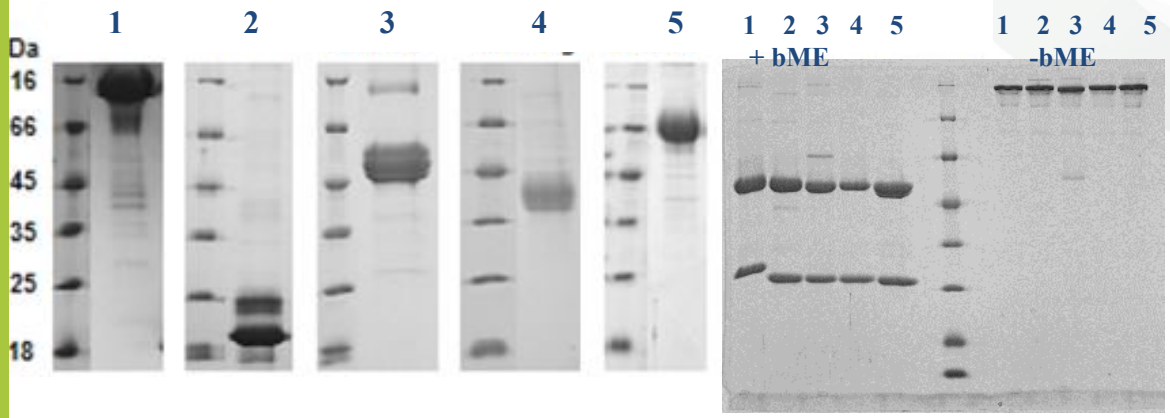
- Оригинальные вектора
- Транзиентная экспрессия
- Суспензионная культура
- Многократный фидинг
- Безбелковые среды, аффинная очистка

Преимущества:

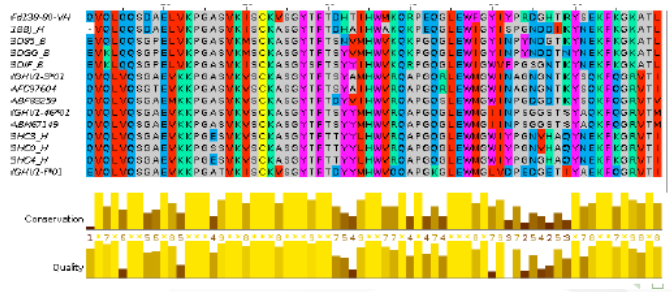
→ Высокий уровень экспрессии
→ Быстрота получения
→ Легкость масштабирования
→ Высокая продуктивность
→ Высокая чистота продукта

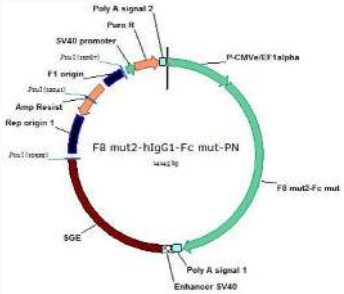
- **собственная высокоэффективная система получения антигенов и IgG антител.**
- **быстрота процесса, корректные фолдинг и гликозилирование.**
- **выход продукта – до десятков миллиграммов на литр культуры**
- **произведено более 70 белков различной природы (лиганды, антитела, рецепторы)**

SDS-электрофореграммы отдельных белков:

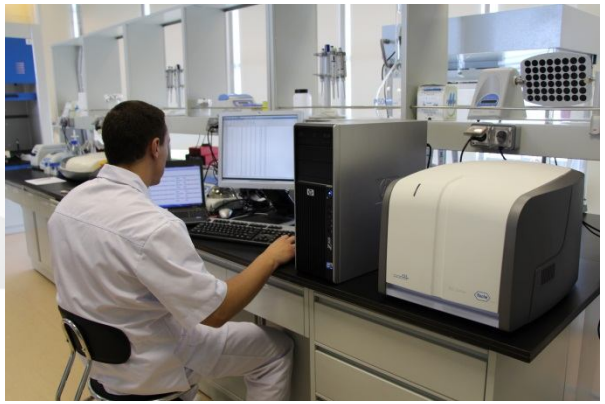


ЛАБОРАТОРИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

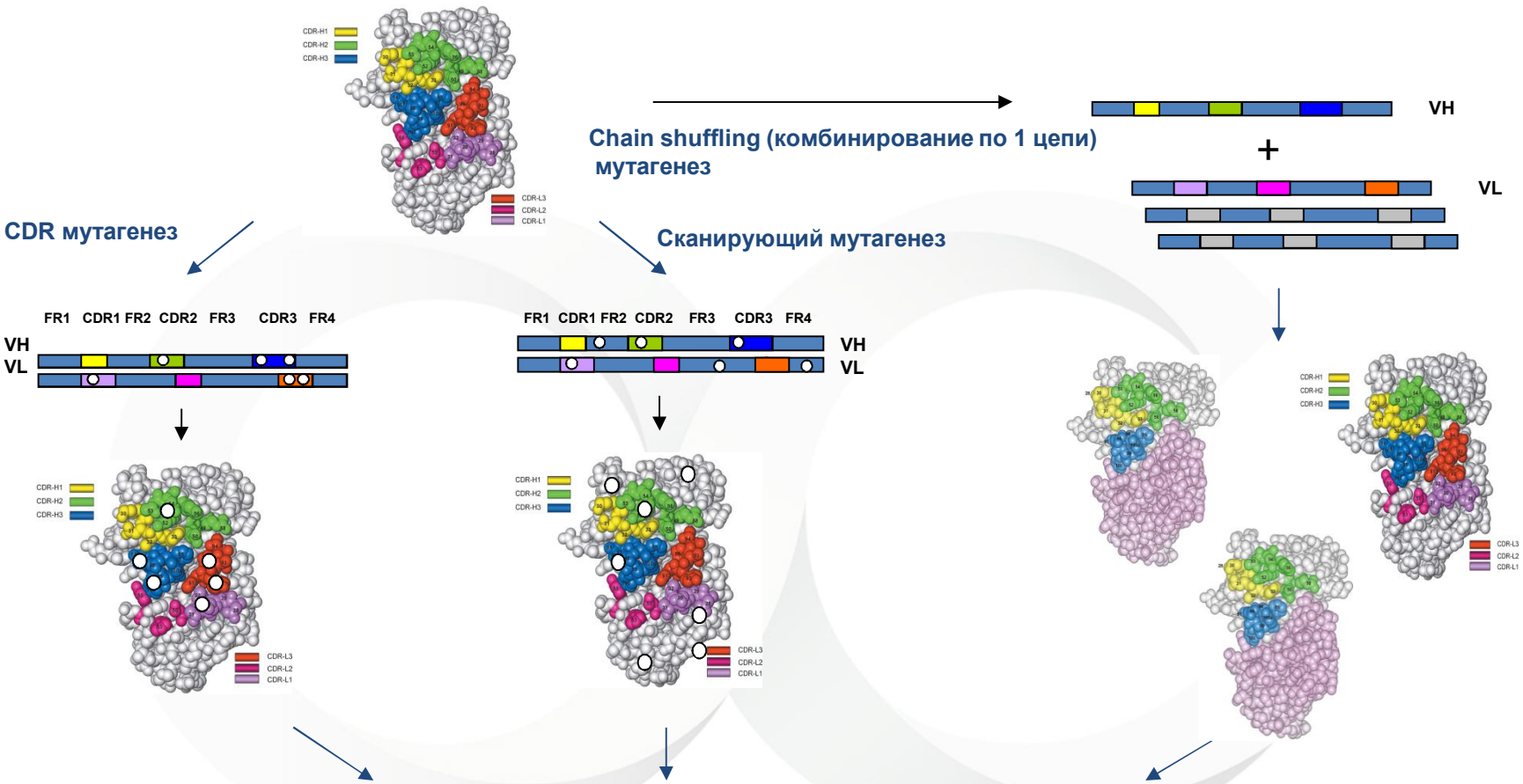




- Создание векторов для экспрессии генов в транзиентных культурах и для получения клеточных линий (антигены, антитела, химерные гены)
- Создание иммунных, комбинаторных, рандомных библиотек генов
- Внедрение методов биоинформатического анализа данных
- Библиотека Fc-фрагментов антител: время полужизни, ADCC, CDC



IN VITRO МАТУРАЦИЯ АНТИТЕЛ



Дисплейные библиотеки и селекции в жестких условиях (низкие концентрации антигена, длительные отмывки, инкубация с конкурентами, повышенная температура и пр.)

Высокоаффинные, высокоспецифичные, термодинамически стабильные фрагменты антител

ЛАБОРАТОРИЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

- максимальная автоматизация процессов
- высокая производительность
- создание новых технологических платформ

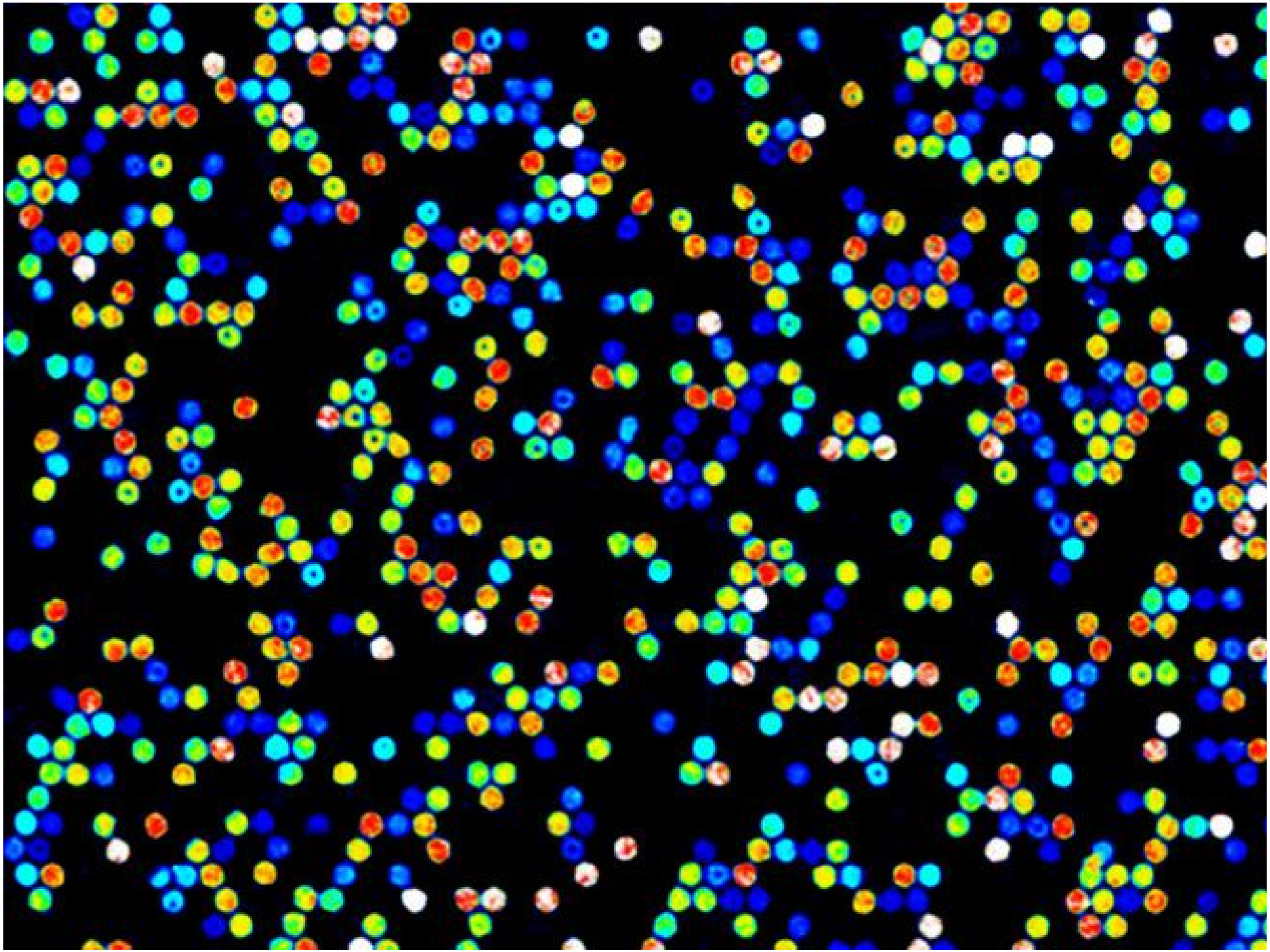
Qpix2 (Genetix)

Freedom Evo 150 (Tecan)

Sequencer ABI3130 (Applied Biosystems)

BIOCAD
Biopharmaceutical Company

MABNEXT
ОРИГИНАЛЬНЫЕ И ИННОВАЦИОННЫЕ ПРЕПАРАТЫ МКА

Антигены, иммунизация	Поиск лидерных кандидатов	Оптимизация кандидатов
➢Онкология – 5 мишеней	➢Онкология – 2 мишени	➢Онкология – 1 мишень
➢Аутоиммунные заболевания – 2 мишени	➢Аутоиммунные заболевания – 1 мишень	➢Аутоиммунные заболевания – 2 мишени

+ Биоаналоги (5)
+ bio-superior (3)