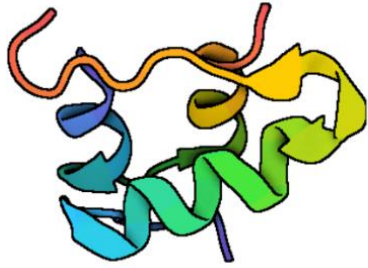




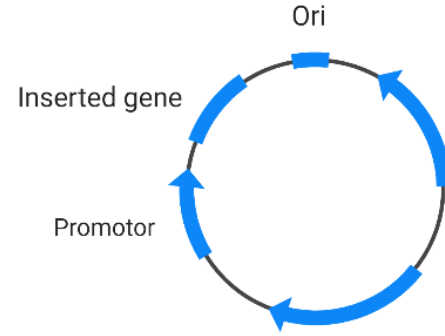
## Использование Design of experiments при оптимизации условий культивирования бактериальных штаммов-продуцентов рекомбинантных белков

Зухра Хасаншина

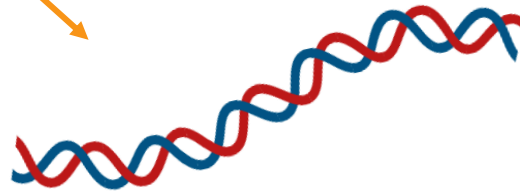
# Получение рекомбинантных белков



Молекула инсулина

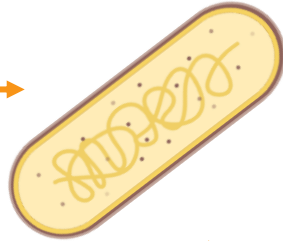
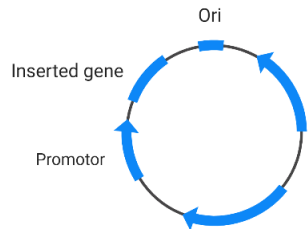


Плазмида, кодирующая инсулин

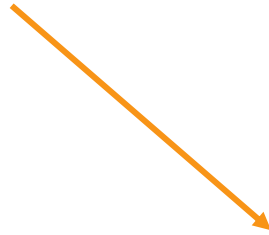


Ген, кодирующий инсулин

# Получение рекомбинантных белков

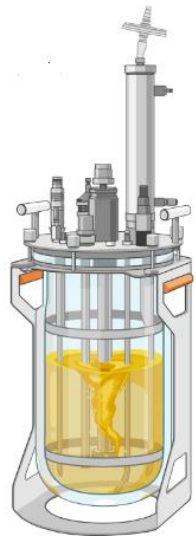


Трансформация *E.coli* полученной  
плазмидой

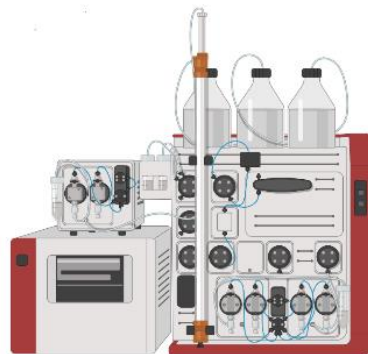


Штамм *E.coli*, способный  
синтезировать инсулин

# Получение рекомбинантных белков



Культивирование  
*E.coli* и синтез  
инсулина

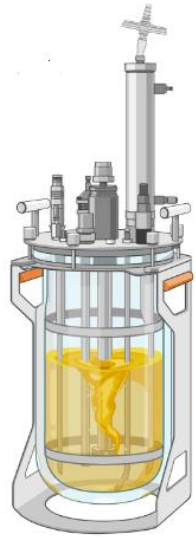


Разрушение клеток и  
последовательная  
очистка инсулина

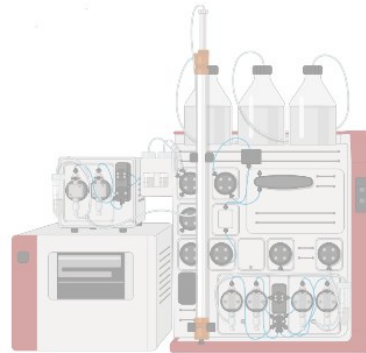


Получение необходимого  
количества инсулина с  
требуемой чистотой

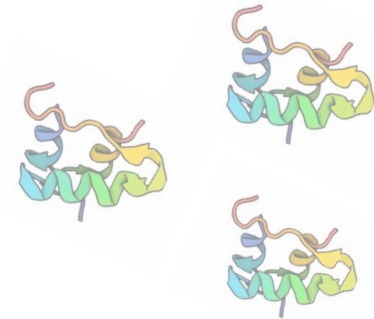
# Получение рекомбинантных белков



Культивирование  
*E.coli* и синтез  
инсулина



Разрушение клеток и  
последовательная  
очистка инсулина



Получение необходимого  
количества инсулина с  
требуемой чистотой

# Что важно?

## Объемная продуктивность

Сколько г белка в 1 л  
культуральной жидкости

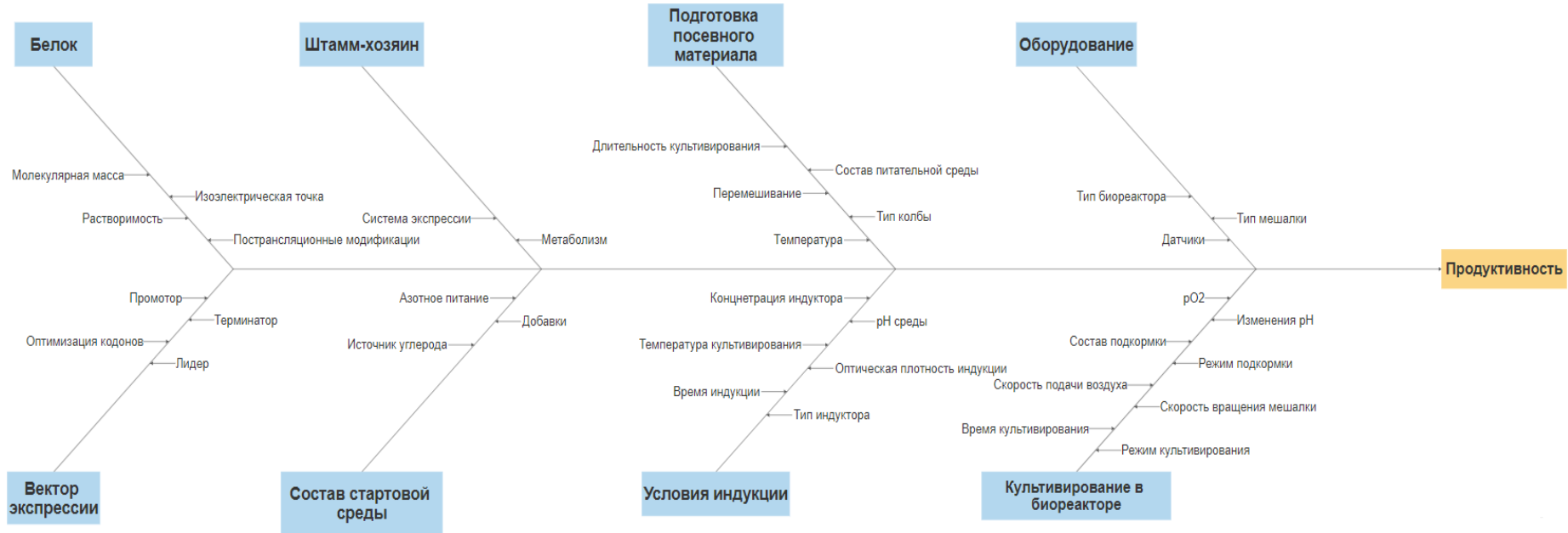
## Удельная продуктивность

Сколько г белка в 1 г биомассы  
клеток?

## Титр клеток

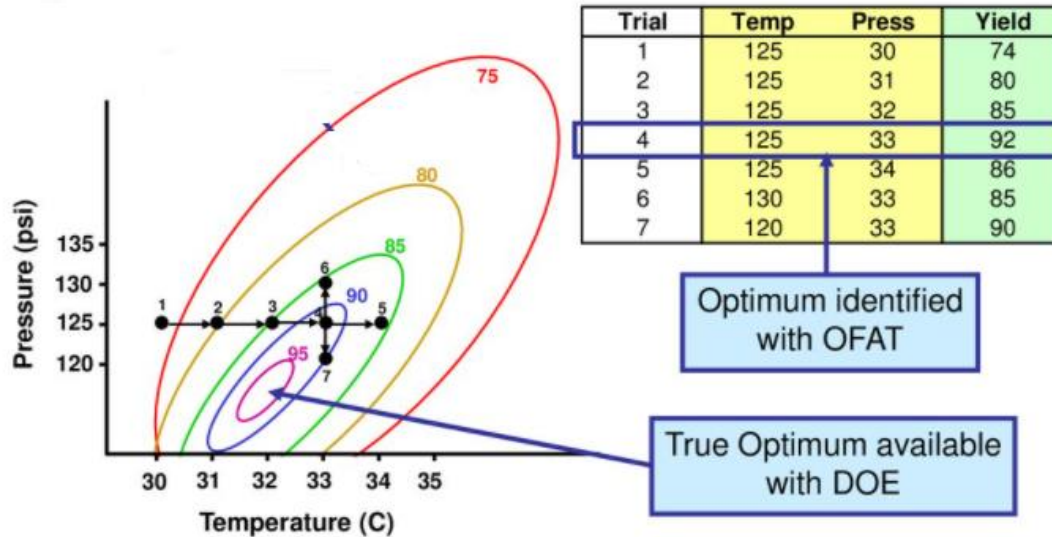
Сколько г биомассы клеток в 1 л  
культуральной жидкости?

# Что влияет?



# One factor at a time vs Design of experiments

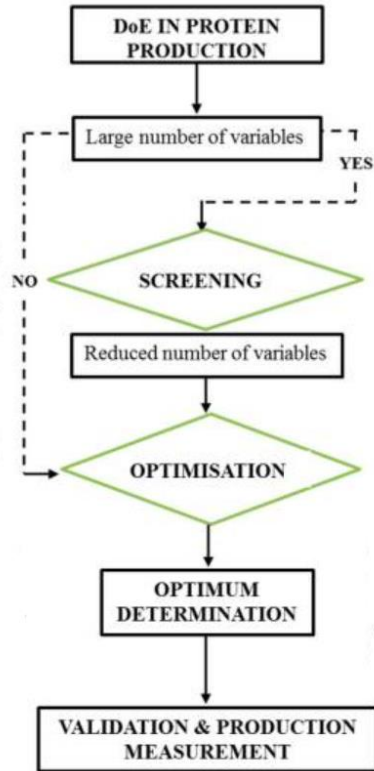
Выход= f (температура; давление)



**DOE превосходит OFAT, поскольку позволяет сэкономить время и не проводить несколько экспериментов.**



# Design of experiments



DoE включает в себя три этапа экспериментов.

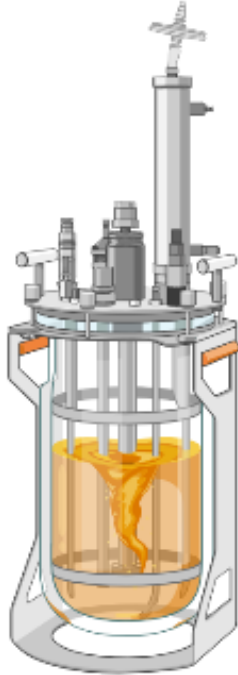
Объем экспериментов зависит от количества исследуемых факторов

doi: [10.3390 / bioengineering5040089](https://doi.org/10.3390/bioengineering5040089)

# Кейс

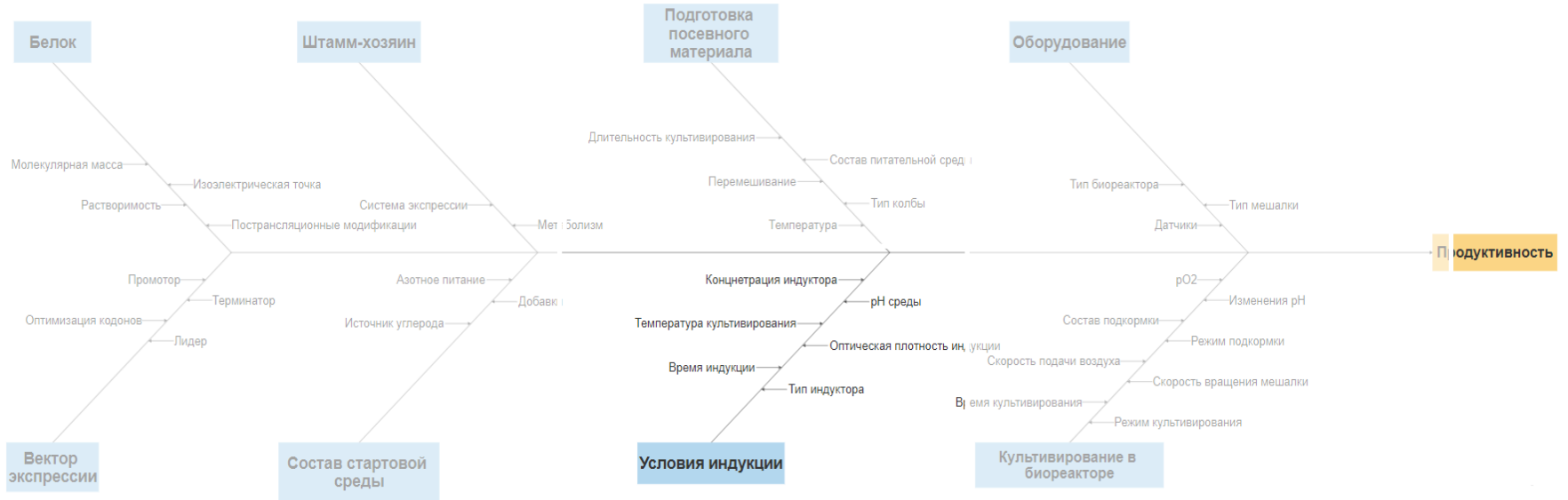
**Разработать условия культивирования трех штаммов-продуцентов белков за три месяца**

## Выбор стратегии оптимизации



Проведение ферментации в стандартных условиях для определения наиболее критичных факторов

# Выбор стратегии оптимизации



# Какую методологию выбрать?

## OFAT

- Последовательная оптимизация выбранных факторов
- Все эксперименты проводить в трех параллелях

**93 эксперимента на каждый белок**

**5,5 недели работы для одного белка**

**НЕ учитывает взаимодействие факторов и их влияние друг на друга**

## DoE

- Оптимизация всех факторов в одном эксперименте
- Повтор только центральных точек согласно дизайну

**30 экспериментов на каждый белок**

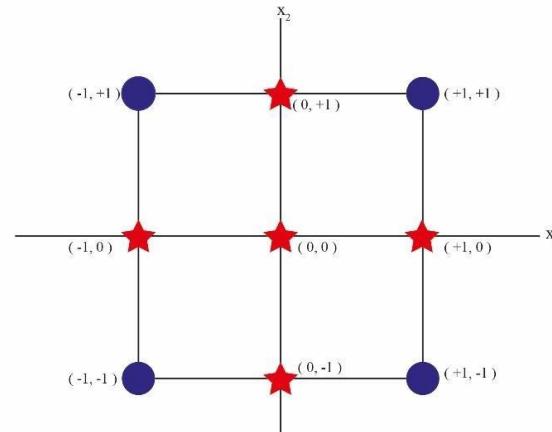
**1,1 недели работы для одного белка**

**Учитывает взаимодействие факторов и их влияние друг на друга**

## Схема DoE

1	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	time ind	OD ind	temperature	pH	IPTG
2	1	N1	10	Incl	4	0,5	25	5	1
3	2	N2	24	Incl	17	0,5	25	5	0,05
4	3	N3	9	Incl	4	3	25	5	0,05
5	4	N4	15	Incl	17	3	25	5	1
6	5	N5	8	Incl	4	0,5	37	5	0,05
7	6	N6	6	Incl	17	0,5	37	5	1
8	7	N7	28	Incl	4	3	37	5	1
9	8	N8	13	Incl	17	3	37	5	0,05
10	9	N9	22	Incl	4	0,5	25	8	0,05
11	10	N10	4	Incl	17	0,5	25	8	1
12	11	N11	7	Incl	4	3	25	8	1
13	12	N12	23	Incl	17	3	25	8	0,05
14	13	N13	16	Incl	4	0,5	37	8	1
15	14	N14	27	Incl	17	0,5	37	8	0,05
16	15	N15	14	Incl	4	3	37	8	0,05
17	16	N16	20	Incl	17	3	37	8	1
18	17	N17	17	Incl	4	1,75	31	6,5	0,525
19	18	N18	21	Incl	17	1,75	31	6,5	0,525
20	19	N19	18	Incl	10,5	0,5	31	6,5	0,525
21	20	N20	2	Incl	10,5	3	31	6,5	0,525
22	21	N21	26	Incl	10,5	1,75	25	6,5	0,525
23	22	N22	25	Incl	10,5	1,75	37	6,5	0,525
24	23	N23	5	Incl	10,5	1,75	31	5	0,525
25	24	N24	12	Incl	10,5	1,75	31	8	0,525
26	25	N25	11	Incl	10,5	1,75	31	6,5	0,05
27	26	N26	3	Incl	10,5	1,75	31	6,5	1
28	27	N27	29	Incl	10,5	1,75	31	6,5	0,525
29	28	N28	19	Incl	10,5	1,75	31	6,5	0,525
30	29	N29	1	Incl	10,5	1,75	31	6,5	0,525

Для оптимизации был рекомендован дизайн Reduced Central Composite Face (CCF), в котором исследуемые точки находятся на гранях куба и имеют три уровня.



## Схема DoE

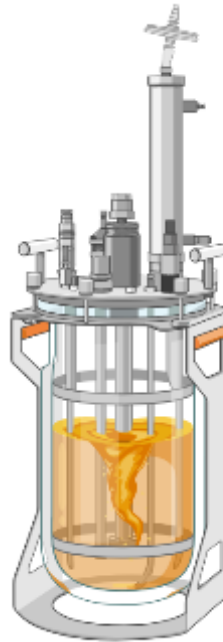
$$Y_{CCF} = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{i < j}^n a_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n a_{ii} X_i^2,$$

где  $Y_{CCF}$  – отклик CCF дизайна,  $n$  – количество исследованных факторов;  $X_i$  и  $X_j$  представляют собой анализируемые факторы,  $a_0$  – константа;  $a_i$ ,  $a_{ij}$  и  $a_{ii}$  – линейные коэффициенты регрессии, коэффициенты взаимодействия и квадратичных коэффициенты регрессии соответственно.

# Схема разработки условий культивирования



Оптимизация условий экспрессии в колбах



Валидация условий в 5-л биореакторе (от 3 серий)

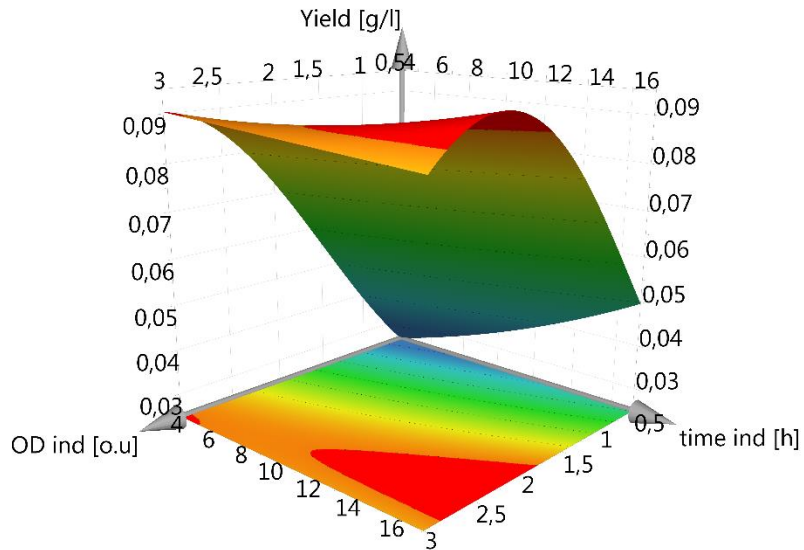


Технология культивирования штамма-производителя



# Результаты для штамма-производителя белка 1

Продуктивность увеличена на 100%

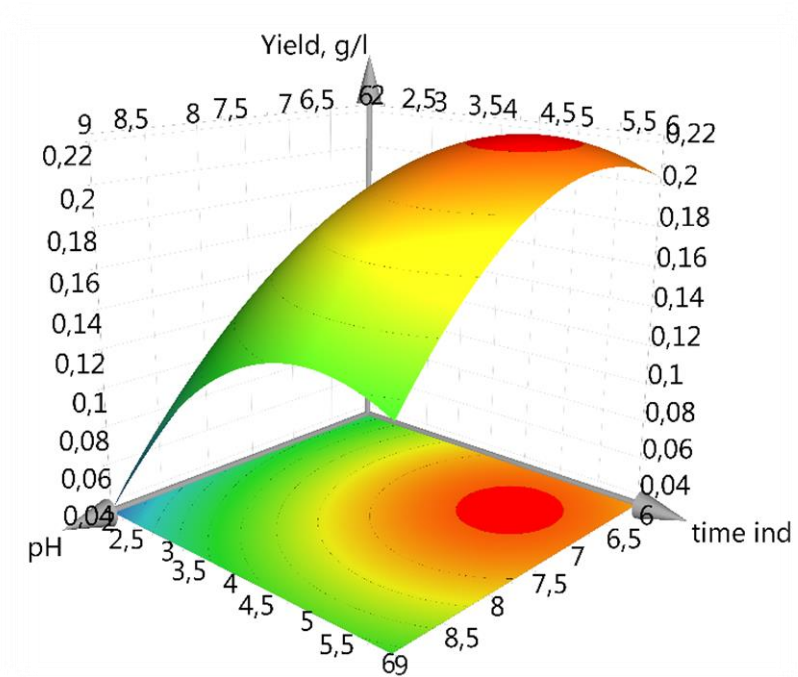


Продуктивность штамма в ферментациях

1.3 г/л → 2.6 г/л КЖ

# Результаты для штамма-продуцента белка 2

Продуктивность увеличена на 96%



Продуктивность штамма в ферментациях

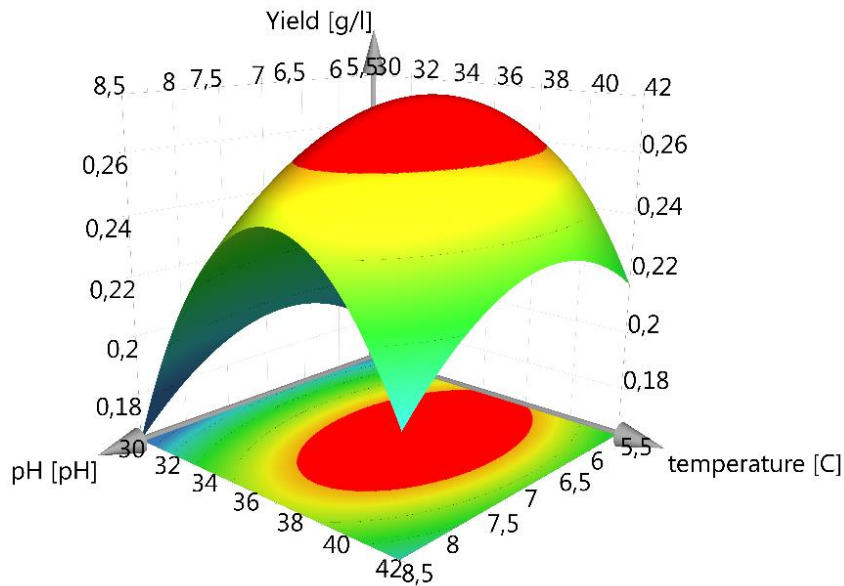
2.3 г/л



4.5 г/л КЖ

# Результат для штамма-продуцента белка 3

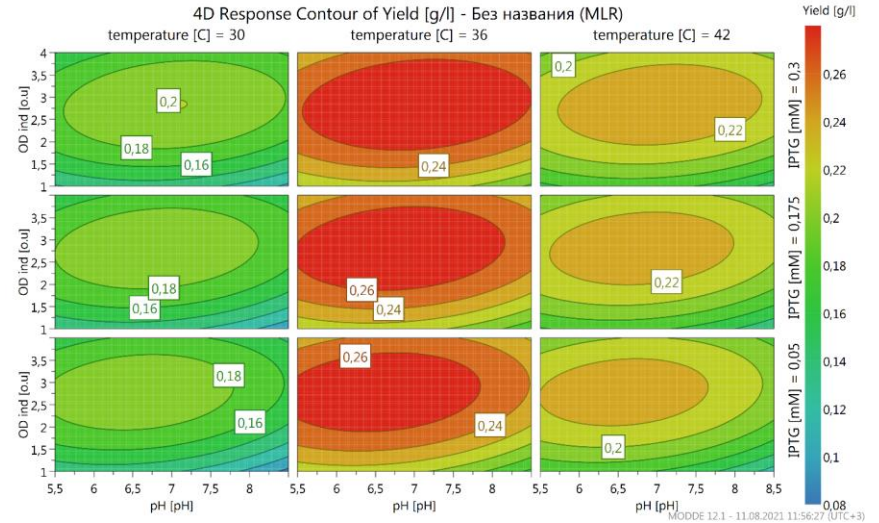
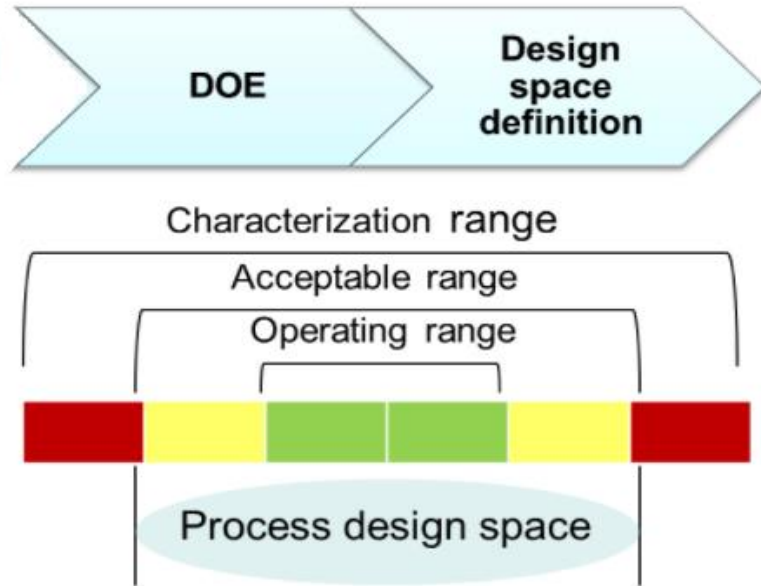
Продуктивность увеличена на 176%



Продуктивность штамма в ферментациях

1.7 г/л → 4.8 г/л КЖ

# Проектные поля




# Резюме

Лаборатория использует DoE 1,5 года

Проведена оптимизация условий культивирования с использованием DoE для более 10 штаммов-продуцентов различных белков.

- DoE требует меньше испытаний.
- DoE позволяет более эффективно подбирать оптимальные параметры для увеличения продуктивности.
- DoE позволяет нам вывести статистическую модель для прогнозирования результатов в зависимости от двух и более факторов и их совокупного воздействия.




 +7(812)703-79-75

+7(912)702-41-60


Хасаншина Зухра

 [geropharm.ru](http://geropharm.ru)

 [inform@geropharm.ru](mailto:inform@geropharm.ru)  
[Zuhra.hasanshina@geropharm.com](mailto:Zuhra.hasanshina@geropharm.com)

 [@geropharm\\_official](https://www.instagram.com/geropharm_official)

 [facebook.com/geropharm](https://facebook.com/geropharm)

 191144, Санкт-Петербург,  
Деловой квартал «Невская  
Ратуша», Дегтярный пер.,  
11Б, эт. 10-й

