



Оптимизация условий индукции синтеза проинсулина аспарт в клетках бактериального штамма-продуцента

И.А. Корнаков[✉], З.Р. Хасаншина, Д.А. Сеничкина, А.А. Филипенко, И.С. Лунев, Р.В. Драй

Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг», ул. Связи, д. 34, лит. А, пос. Стрельна, Санкт-Петербург, 198515, Российская Федерация

✉ Корнаков Игорь Александрович; Igor.Kornakov@geropharm.com

Резюме

Сахарный диабет несет серьезную угрозу здоровью людей во всем мире, в связи с чем в 2021 г. Всемирная организация здравоохранения учредила Глобальный пакт по борьбе с диабетом — инициативу, направленную на обеспечение улучшений в области лечения и профилактики диабета. Быстрый рост числа больных диабетом увеличивает потребность в инсулине. Применение аналогов инсулина человека ультракороткого действия, в том числе инсулина аспарт, способствует повышению эффективности инсулинотерапии. Одним из способов получения инсулина аспарт является его биосинтез в виде проинсулина в клетках *Escherichia coli*, однако выход рекомбинантного белка в значительной степени определяется оптимизацией процесса производства.

Цель работы: оптимизация условий индукции синтеза рекомбинантного проинсулина аспарт в клетках штамма-продуцента *E. coli* с помощью подхода математического планирования эксперимента (Design of Experiment, DoE) для повышения продуктивности.

Материалы и методы: использовали штамм-продуцент проинсулина аспарт на основе клеток *E. coli*. Эксперимент планировали с помощью программного обеспечения MODDE с использованием дизайна, который позволяет оценить взаимодействие факторов и в дальнейшем построить проектные поля (reduced central composite design, face-centred, CCF). Культивирование штамма-продуцента проводили в биореакторе Biostat® объемом 5,0 л. Определение концентрации проинсулина аспарт осуществляли методом капиллярного гель-электрофореза. Обработку результатов выполняли с помощью программы GraphPad Prism 6.

Результаты: проведена оптимизация условий роста штамма-продуцента и биосинтеза проинсулина аспарт с применением подхода DoE. На основании данных графиков поверхности отклика (для параметров — концентрация влажной биомассы, удельная продуктивность и объемная продуктивность) и построенных моделей были определены проектные поля процесса индукции проинсулина аспарт в клетках штамма-продуцента *E. coli*. Показано, что построенные модели характеризуются высокой прогностической способностью и высокой воспроизводимостью полученных результатов. Проведена успешная валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт в оптимизированных условиях в биореакторе. Значение показателя объемной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт увеличено с $3,06 \pm 0,16$ г/л (стандартные условия) до $4,93 \pm 0,80$ г/л (оптимизированные условия).

Выводы: достигнуто увеличение объемной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт на 60%. Полученные результаты исследования могут быть использованы для интенсификации промышленного производства инсулина аспарт.

Ключевые слова: диабет; проинсулин; инсулин аспарт; условия индукции; *Escherichia coli*; планирование эксперимента

Для цитирования: Корнаков И.А., Хасаншина З.Р., Сеничкина Д.А., Филипенко А.А., Лунев И.С., Драй Р.В. Оптимизация условий индукции синтеза проинсулина аспарт в клетках бактериального штамма-продуцента. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):219–230. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-219-230>

© И.А. Корнаков, З.Р. Хасаншина, Д.А. Сеничкина, А.А. Филипенко, И.С. Лунев, Р.В. Драй, 2023

Optimisation of induction conditions for a bacterial strain producing proinsulin aspart

I.A. Kornakov✉, Z.R. Khasanshina, D.A. Senichkina, A.A. Filipenko, I.S. Lunev, R.V. Drai

Pharmholding CJSC, Svyazi St., 34, Strel'na, St Petersburg 198515, Russian Federation

✉ Igor A. Kornakov; Igor.Kornakov@geropharm.com

Abstract

Diabetes poses a serious threat to the health of people around the world. Therefore, in 2021, the World Health Organisation launched the Global Diabetes Compact, an initiative aimed at improving the management and prevention of diabetes. The rapid growth in the number of diabetic patients has increased the need for insulin. Rapid-acting human insulin analogues, including insulin aspart, improve the efficacy of insulin therapy. Methods for insulin aspart production include its biosynthesis in the proinsulin form in *Escherichia coli*. However, the yield of the recombinant protein largely depends on the optimisation of the production process.

The aim of the study was to optimise the induction conditions for an *E. coli* strain expressing recombinant proinsulin aspart through applying the Design of Experiment (DoE) approach to enhance bacterial cell productivity.

Materials and methods. The study focused on a strain of *E. coli* producing proinsulin aspart. The authors planned the experiment using MODDE software and the reduced face-centred central composite design (CCF) enabling the assessment of factor interactions and the creation of design spaces. The authors carried out fermentations of the producing strain in a 5 L Biostat® B bioreactor and measured proinsulin aspart concentrations by capillary gel electrophoresis. The results were analysed using GraphPad Prism 6.

Results. Using the DoE approach, the authors optimised the conditions for the growth of the producer strain and the biosynthesis of proinsulin aspart. Based on data from response surface plots for wet biomass concentration, specific productivity, and volumetric productivity, as well as plotted models, the authors established design spaces for the induction of proinsulin aspart expression in *E. coli*. The plotted models demonstrated high predictive power and high reproducibility of the results. The authors successfully validated the induction process for the synthesis of proinsulin aspart in a bioreactor under optimised conditions. The volumetric productivity of the strain producing proinsulin aspart increased from 3.06 ± 0.16 g/L (conventional conditions) to 4.93 ± 0.80 g/L (optimised conditions).

Conclusions. The authors achieved a 60% increase in the volumetric yield of proinsulin aspart. The study results may be used to intensify the industrial production of insulin aspart.

Key words: diabetes; proinsulin; insulin aspart; induction conditions; *Escherichia coli*; design of experiments

For citation: Kornakov I.A., Khasanshina Z.R., Senichkina D.A., Filipenko A.A., Lunev I.S., Drai R.V. Optimisation of induction conditions for a bacterial strain producing proinsulin aspart. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):219–230. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-219-230>

Введение

В 2021 г. Всемирная организация здравоохранения учредила инициативу, направленную на обеспечение улучшений в области лечения и профилактики диабета (Глобальный пакт по борьбе с диабетом, WHO Global Diabetes Compact)¹. К 2020 г. около 420 млн человек имели диагноз диабета, по прогнозам к 2045 г. их число вырастет до 783 млн². Рост числа пациентов с диабетом приведет к последующему увеличению потребности в инсулине и его аналогах. В связи с этим важным направлением развития

фармацевтической биотехнологии является разработка и производство препаратов рекомбинантного инсулина. Следует отметить необходимость обеспечения пациентов как аналогами инсулина человека ультракороткого действия, так и препаратами длительного действия. Известно, что совместное применение указанных аналогов позволяет имитировать двухфазную физиологическую секрецию инсулина, характерную для здоровых лиц [1]. Кроме этого, совместное применение препаратов инсулина с различной скоростью действия способствует снижению

¹ <https://www.who.int/initiatives/the-who-global-diabetes-compact>

² <https://www.diabetesatlas.org>

частоты развития гипогликемии. Разработка эффективных аналогов инсулина является стратегической задачей для развития фармацевтической отрасли в Российской Федерации.

Инсулин аспарт — рекомбинантный аналог инсулина человека ультракороткого действия. Он идентичен человеческому инсулину, за исключением замены пролина в положении 28 В-цепи на аспарагиновую кислоту. В результате замены инсулин аспарт приобретает меньшую склонность к самоассоциации и, как следствие, быстрее всасывается после подкожной инъекции по сравнению с человеческим инсулином [1]. Инсулин аспарт вызывает снижение риска развития стойкой постпрандиальной гипогликемии за счет соответствия его действия физиологически раннему пику секреции инсулина [1, 2].

В настоящее время одним из способов получения инсулина аспарт является его биосинтез в виде проинсулина в клетках *Escherichia coli* [3]. Использование *E. coli* в качестве экспрессионной системы для крупномасштабного производства рекомбинантного инсулина имеет ряд преимуществ: высокая скорость роста клеток, изученные подходы к получению рекомбинантных штаммов-продуцентов, возможность использования простых сред, высокая продуктивность и экономическая эффективность [3–5]. Для разработки штаммов-продуцентов инсулинов применяют традиционные подходы к постановке экспериментов, основанные на методах однофакторного анализа [6]. Данная методология не учитывает взаимодействие факторов и требует проведения большого количества экспериментов для выявления истинного оптимума [6, 7]. Эффекты взаимодействия отдельных параметров, влияющих на экспрессию рекомбинантного белка, могут оказывать воздействие на продукцию целевой молекулы [6, 8]. Для оценки процесса важным представляется использование подхода математического планирования эксперимента (Design of Experiment, DoE), основанного на контролируемой статистике [6]. Подход базируется на полнофакторном анализе, позволяющем изменять несколько параметров одновременно, систематизировать обнаружение взаимодействий, что имеет важное значение для фармацевтической разработки [6, 8]. В основе подхода лежит построение поверхности отклика (response surface), представляющей собой математическую модель, которая описывает зависимость выходных параметров от входных.

Известно, что в наибольшей степени на показатель выхода рекомбинантного белка влияют условия индукции синтеза: температура культивирования, концентрация индуктора, pH,

значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм (OD_{600}). Достижение оптимального значения данных параметров способствует повышению продуктивности на 20% и более [7–12].

Цель работы — оптимизация условий индукции синтеза рекомбинантного проинсулина аспарт в клетках штамма-продуцента *E. coli* с помощью подхода математического планирования эксперимента (DoE) для повышения продуктивности. Для выполнения цели были поставлены следующие задачи: определение оптимальных параметров для роста клеток штамма-продуцента и биосинтеза проинсулина аспарт в условиях культивирования в колбах с применением подхода DoE; построение проектных полей процесса ферментации; проведение ферментации в условиях биореактора объемом 5,0 л в стандартных и оптимизированных условиях для валидации процесса индукции синтеза проинсулина аспарт.

Материалы и методы

Материалы

В работе использовали штамм-продуцент *E. coli* BL21/pF644 (ЗАО «Фарм-Холдинг», Россия), продуцирующий гибридный белок, в котором лидерная последовательность связана через линкер с аминокислотной последовательностью проинсулина аспарт. Синтез белка находится под контролем гибридного *tac*-промотора.

В качестве компонентов питательной среды использовали пептоны растительного происхождения (ЗАО «Фарм-Холдинг», Россия), дрожжевой экстракт (ООО «Диаэм», Россия), гидроортофосфат калия трехводный (ООО «Диаэм», Россия), глюкозу (АО «Ленреактив», Россия), в качестве селективного маркера — канамицин (PanReas AppliChem, Германия), индуктор — изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (PanReas AppliChem, Германия), соляную кислоту и гидроксид натрия (АО «Ленреактив», Россия).

Методы

Подготовка посевного материала. Схема подготовки посевного материала была идентична для культивирования в колбах и в ферментере. Клеточную культуру растили в стерильной питательной среде, содержащей пептоны растительного происхождения и дрожжевой экстракт в концентрации 7 и 1% соответственно, 6,0 г/л гидроортофосфата калия трехводного, 50 мг/л канамицина. Инкубацию проводили в термошейкере (Ecotron, Швейцария) при скорости перемешивания 180 об/мин при 37°C в течение 16±2 ч.

Оптимизация условий культивирования в колбах. Математическое планирование экспери-

мента проведено с помощью программного обеспечения MODDE (v12.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Германия)³ и методологии поверхности отклика с использованием дизайна, который позволяет оценить взаимодействие факторов и в дальнейшем построить проектные поля (reduced central composite design, face-centred, CCF⁴) [6, 13]. Центральная точка оценивалась в трех повторностях.

Для оптимизации условий культивирования были выбраны пять параметров: pH, температура, длительность индукции синтеза, концентрация индуктора, значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм (OD_{600}), диапазоны значений которых представлены в таблице 1.

В качестве откликов (выходная переменная – результат изменения параметров) использовали удельную и объемную продуктивность, а также концентрацию влажной биомассы. Культивирование клеток проводили в питательной среде, аналогичной по составу среде для посевного материала. pH доводили до требуемых значений с использованием растворов соляной кислоты и гидроксида натрия.

Оценку воспроизводимости и прогностической способности модели проводили с помощью множественного линейного регрессионного анализа согласно формуле (1):

$$Y_{CCF} = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i X_i + \sum_{i < j}^3 \alpha_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} X_i^2, \quad (1)$$

где Y_{CCF} – значение отклика, определяемое с помощью CCF дизайна; X_i и X_j – анализируемые параметры (факторы); α_0 – константа; α_i , α_{ij} , и α_{ii} – линейные коэффициенты регрессии, коэффициенты взаимодействия и квадратичные коэффициенты регрессии соответственно.

Качество модели оценивали с помощью двух критериев: коэффициента детерминации (R^2), показывающего воспроизводимость полученных результатов в построенной модели, и коэффициента точности прогнозирования (Q^2), показывающего способность модели предсказывать результат при проведении новых экспериментов [13]. Качество модели считается удовлетворительным, если значения $R^2 > 0,75$ и $Q^2 > 0,50$. Разница между значениями R^2 и Q^2 должна быть менее 0,3. Модель не рекомендуется использовать, если R^2 и Q^2 менее 0,5.

Валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт в биореакторе. Культивирование штамма-продуцента проводили в трех повторностях в биореакторе Biostat B (Sartorius Stedim,

Германия) объемом 5,0 л в стандартных условиях, подобранных с помощью традиционной методологии однофакторного анализа, и в оптимизированных условиях, подобранных с помощью полнофакторного анализа с использованием подхода DoE, в рамках валидации процесса индукции синтеза проинсулина аспарт.

Состав питательной среды был идентичен для стандартных и оптимизированных условий и содержал пептоны растительного происхождения, дрожжевой экстракт и гидроортофосфат калия трехводный в количестве 7, 1 и 0,01% соответственно. Дополнительно в среду добавляли глюкозу до конечной концентрации 0,1% и канамицин до 50 мг/л. Стартовый объем питательной среды в биореакторе составлял 2,7 л. Посевной материал вносили в ферментер в соотношении 1:10. Исходные условия культивирования были следующими: скорость перемешивания 400 об/мин, аэрация – 3 л/мин, температура культивирования – 37°C, pH среды от 6,0 до 7,2. Ферментацию проводили в периодическом режиме до истощения глюкозы в среде (начало роста значений pH) и затем подключили подачу раствора 55% глюкозы в режиме pH-стат. Данный режим предполагает подачу источника углерода по потребностям микробной культуры. pH культуральной жидкости поддерживается без корректоров pH за счет равновесия метаболических процессов, в ходе которых образуются соединения с кислотными и основными свойствами. Ферментацию продолжали в течение 8 ч после внесения индуктора. В ходе ферментации отбирали пробы для измерения показателя OD_{600} (начиная с 0 ч культивирования), массы влажного осадка и концентрации проинсулина аспарт (начиная с 0 ч после индукции). Параметры процесса культивирования, различающиеся для стандартных и оптимизированных условий, представлены в таблице 2.

Измерение оптической плотности культуральной суспензии. Концентрацию клеточной биомассы в процессе эксперимента оценивали по показателю оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм (OD_{600}). Измерение оптической плотности проводили с использованием спектрофотометра P300 (Implen, Германия). Для измерения показателя OD_{600} суспензию клеток разбавляли водой очищенной до получения значений 0,1–0,8. Измерение оптической плотности проводили в трех повторностях против воды очищенной. Среднее значение OD_{600} рассчитывали по произведению среднего арифметического значения трех разведений на фактор разведения.

³ <https://www.sartorius.com/download/544636/modde-12-user-guide-en-b-00090-sartorius-data.pdf>

⁴ User guide to MODDE. User Guides and Tutorials. Umetrics; 2014.

Таблица 1. Схема эксперимента по оптимизации условий культивирования
Table 1. Experimental design for optimising culture conditions

№	pH	Температура, °C <i>Temperature, °C</i>	Время индукции, ч <i>Induction time, h</i>	Концентрация ИПТГ, мМ <i>IPTG concentration, mM</i>	OD ₆₀₀	Удельная продуктивность, мг/г <i>Specific productivity, mg/g</i>
1	5,0	32	2,0	0,050	3,00	21,12
2	8,0	32	2,0	0,050	0,50	1,18
3	5,0	42	2,0	0,050	0,50	25,64
4	8,0	42	2,0	0,050	3,00	17,12
5	5,0	32	6,0	0,050	0,50	28,19
6	8,0	32	6,0	0,050	3,00	28,22
7	5,0	42	6,0	0,050	3,00	21,41
8	8,0	42	6,0	0,050	0,50	24,18
9	5,0	32	2,0	1,000	0,50	15,31
10	8,0	32	2,0	1,000	3,00	12,97
11	5,0	42	2,0	1,000	3,00	24,57
12	8,0	42	2,0	1,000	0,50	13,24
13	5,0	32	6,0	1,000	3,00	42,74
14	8,0	32	6,0	1,000	0,50	22,80
15	5,0	42	6,0	1,000	0,50	35,79
16	8,0	42	6,0	1,000	3,00	49,14
17	5,0	37	4,0	0,525	1,75	46,06
18	8,0	37	4,0	0,525	1,75	43,15
19	6,5	32	4,0	0,525	1,75	41,44
20	6,5	42	4,0	0,525	1,75	41,32
21	6,5	37	2,0	0,525	1,75	38,80
22	6,5	37	6,0	0,525	1,75	53,62
23	6,5	37	4,0	0,050	1,75	44,50
24	6,5	37	4,0	1,000	1,75	44,20
25	6,5	37	4,0	0,525	0,50	42,72
26	6,5	37	4,0	0,525	3,00	33,42
27	6,5	37	4,0	0,525	1,75	45,77
28	6,5	37	4,0	0,525	1,75	35,93
29	6,5	37	4,0	0,525	1,75	39,11

Примечание. OD₆₀₀ — значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм; ИПТГ — изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

Note. OD₆₀₀, culture broth optical density at 600 nm; IPTG, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside.

Определение концентрации влажной биомассы. Для определения массы влажного осадка 2 мл пробы культуральной жидкости помещали в предварительно взвешенные микропробирки, центрифугировали два раза в течение 5 мин при 15000 об/мин (21000 g) при 4°C при использовании центрифуги Eppendorf 5424 (Eppendorf, Германия). Супернатант удаляли при помощи аспиратора.

Количественное определение содержания проинсулина аспарт. Определение концентрации проинсулина аспарт осуществляли методом капиллярного гель-электрофореза в денатурирующих условиях с помощью системы для капиллярного электрофореза SCIEX PA 800 plus (SCIEX, США) [14].

Статистическая обработка результатов. Проверка моделей и определение значимости параметров в рамках подхода математического планирования эксперимента DoE выполняли с использованием программы MODDE с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), таблицы соответствия данных модели и диаграммы Парето. Для статистического анализа результатов использовали программу GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Применяли одно-

факторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Результаты и обсуждение

Оптимизация условий индукции биосинтеза проинсулина аспарт в колбах с использованием подхода математического планирования эксперимента DoE

После проведения экспериментов по культивированию штамма-продуцента в колбах и анализа полученных данных были разработаны модели для определения оптимальных условий индукции биосинтеза проинсулина аспарт в штамме-продуценте с использованием методологии поверхности отклика. Значения критериев R^2 и Q^2 для параметров отклика составили: для удельной продуктивности — 0,83 и 0,58; для концентрации влажной биомассы — 0,97 и 0,86; для объемной продуктивности — 0,87 и 0,73 соответственно. Разница между значениями R^2 и Q^2 была менее 0,3 для каждой модели. Полученные данные указывают на приемлемое соответствие моделей экспериментальным данным и их прогностическую способность, следовательно, их можно использовать в дальнейшей работе.

Таблица 2. Параметры процесса культивирования в стандартных и оптимизированных условиях индукции синтеза проинсулина аспарт**Table 2.** Cultivation process parameters for proinsulin aspart production under conventional and optimised induction conditions

Параметр <i>Parameter</i>	Стандартные условия <i>Conventional conditions</i>	Оптимизированные условия <i>Optimised conditions</i>
Время начала индукции <i>Induction start</i>	Переходная фаза роста культуры <i>Transition to the exponential phase of culture growth</i>	Начало экспоненциальной фазы роста культуры <i>Beginning of the exponential phase of culture growth</i>
Концентрация индуктора ИПТГ, мМ <i>IPTG inducer concentration, mM</i>	0,1	0,05

Таким образом, по итогам анализа были предложены квадратичные модели для каждого из исследованных откликов согласно формулам (2–4):

$$Y_1 = 44,6 - 2,71 \times X_1 + 7,56 \times X_3 + 2,73 \times X_4 + 2,31 \times X_5 - 8,34 \times X_2^2 - 11,65 \times X_3^2 + 2,97 \times X_3 \times X_4, \quad (2)$$

$$Y_2 = 7,12 + 0,89 \times X_1 - 0,83 \times X_2 + 0,86 \times X_3 - 0,25 \times X_4 + 1,55 \times X_5 - 0,84 \times X_1^2 - 0,69 \times X_3^2 + 0,56 \times X_4^2 - 0,44 \times X_2 \times X_3 - 0,38 \times X_2 \times X_5 - 0,25 \times X_3 \times X_4 - 0,36 \times X_3 \times X_5, \quad (3)$$

$$Y_3 = 0,32 + 0,01 \times X_1 - 0,02 \times X_2 + 0,07 \times X_3 - 0,05 \times X_5 - 0,07 \times X_5^2 + 0,02 \times X_1 \times X_2 - 0,02 \times X_1 \times X_3, \quad (4)$$

где Y_1 — удельная продуктивность, мг/г; Y_2 — концентрация влажной биомассы, г/л; Y_3 — объемная продуктивность, г/л; X_1 — pH среды; X_2 — температура, °C; X_3 — время индукции, ч; X_4 — концентрация ИПТГ, мМ; X_5 — значение показателя OD_{600} .

С использованием программного обеспечения MODDE получены уравнения для прогнозирования оптимальных значений исследованных параметров для каждого отклика.

Валидация оптимизированного процесса индукции проинсулина аспарт проводилась в биореакторе. Валидация считалась успешно проведенной при воспроизведении прогнозируемой удельной продуктивности культуры. Ранее было определено, что удельная продуктивность является критерием эффективности масштабирования при переходе от культивирования в колбах в биореактор.

Влияние параметров процесса на исследованные отклики считалось статистически значимым при $p < 0,05$. На основании полученных квадратичных моделей были построены трехмерные графики поверхности для каждого из откликов — удельная и объемная продуктивность, концентрация влажной биомассы (рис. 1–3).

Было показано, что на удельную продуктивность влияют такие параметры, как pH среды, длительность индукции и концентрация индуктора ИПТГ (рис. 1А). При этом на удельную продуктивность оказывало влияние взаимодействие таких параметров, как длительность индукции и концентрация ИПТГ. Такие параме-

тры, как температура культивирования и показатель OD_{600} , являлись незначимыми факторами ($p < 0,05$). Однако данные параметры не могут быть исключены из эксперимента, так как наблюдается статистически значимое квадратичное взаимодействие ($p < 0,01$) (формулы 2 и 4).

В случае значений параметра pH среды, равных 6,0 и ниже, влияние на удельную продуктивность было отрицательным, то есть наблюдалось более низкое значение отклика при увеличении значений параметра (рис. 1А). Известно, что pH питательной среды влияет на качество телец включения, которое определяется титром продукта и размером телец [15, 16].

Было определено, что для достижения максимальной удельной продуктивности оптимальным временем начала индукции является середина экспоненциальной фазы роста — значение OD_{600} составляло 1,5–2,5 (рис. 1D). Температура культивирования в диапазоне 35–39 °C, который является оптимальным для роста клеток *E. coli*, способствует накоплению проинсулина в тельцах включения (рис. 1C). Максимальная удельная продуктивность штамма-продуцента в отношении проинсулина аспарт достигается при высоких концентрациях ИПТГ в среде — 0,8 мМ и выше (рис. 1C, 1E).

Было продемонстрировано, что на концентрацию влажной биомассы влияют все исследованные параметры, также наблюдается квадратичное влияние pH, времени индукции и концентрации ИПТГ (рис. 2А). На концентрацию влажной биомассы отрицательно влияют взаимодействие температуры и длительность индукции, температуры и показателя оптической плотности индукции, длительности индукции и концентрации ИПТГ, длительности индукции и показателя OD_{600} . Показано, что концентрация ИПТГ отрицательно влияет на рост клеток. Этот эффект можно объяснить токсичностью ИПТГ для клеток *E. coli*, о чем имеются данные в литературе [17, 18]. Также выявлено негативное влияние на рост клеток температуры 34 °C и ниже (рис. 2). При низких температурах культивирования биосинтез замедляется, что способствует накоплению биомассы (рис. 2B).

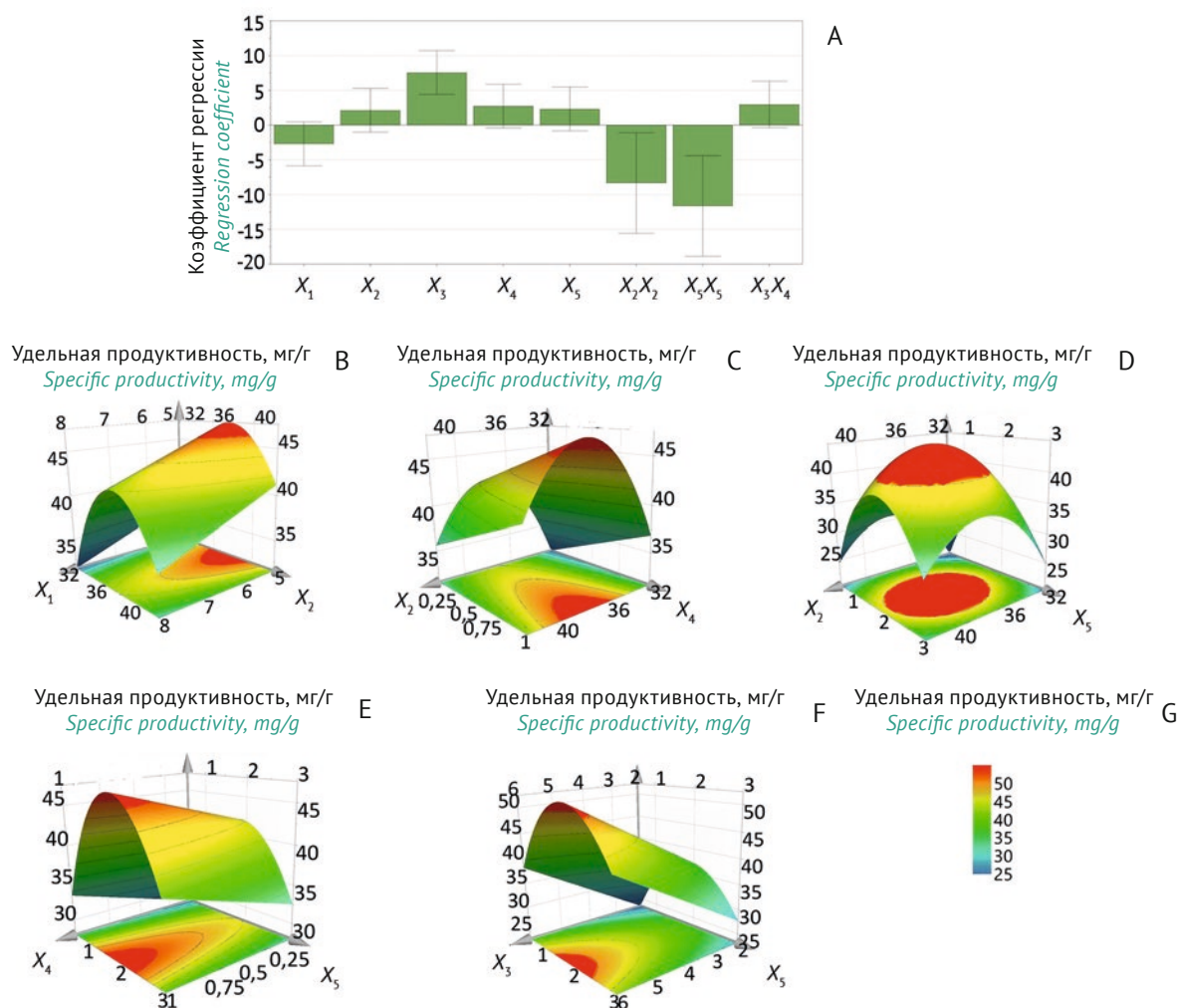


Рис. 1. Коэффициенты регрессии и трехмерные графики поверхностей отклика для удельной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт. А – коэффициенты регрессии, рассчитанные по результатам ССФ дизайна для отклика – удельная продуктивность, где X_1 – pH среды, X_2 – температура, X_3 – длительность индукции, X_4 – концентрация ИПТГ, X_5 – значение показателя OD_{600} (значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм). В – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты pH среды и температуры ($^{\circ}C$) при постоянном значении показателя OD_{600} – 1,75, концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, длительности индукции – 4 ч. С – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты концентрации ИПТГ (мМ) и температуры ($^{\circ}C$) при постоянном значении показателя OD_{600} – 1,75, pH среды – 6,5, длительности индукции – 4 ч. D – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD_{600} и температуры ($^{\circ}C$) при постоянном значении концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, pH среды – 6,5, длительности индукции – 4 ч. E – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD_{600} и концентрации ИПТГ (мМ) при постоянном значении температуры – 37 $^{\circ}C$, pH среды – 6,5, длительности индукции – 4 ч. F – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD_{600} и времени индукции (ч) при постоянном значении температуры – 37 $^{\circ}C$, pH среды – 6,5, концентрации ИПТГ – 0,525 мМ. G – цветовая шкала значений удельной продуктивности.

Fig. 1. Regression coefficients and 3D response surface plots for the specific productivity of the strain producing proinsulin aspart. A, regression coefficients calculated from the results obtained using the CCF design for the specific productivity as a response variable, where X_1 is the medium pH, X_2 is the temperature, X_3 is the induction time, X_4 is the IPTG concentration (mM), and X_5 is the OD_{600} value (culture broth optical density at 600 nm). B, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the medium pH and the temperature ($^{\circ}C$) at a constant OD_{600} value (1.75), IPTG concentration (0.525 mM), and induction time (4 h). C, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the IPTG concentration (mM) and the temperature ($^{\circ}C$) at a constant OD_{600} value (1.75), medium pH (6.5), and induction time (4 h). D, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the OD_{600} value and the temperature ($^{\circ}C$) at a constant IPTG concentration (0.525 mM), medium pH (6.5), and induction time (4 h). E, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the OD_{600} value and the IPTG concentration (mM) at a constant temperature (37 $^{\circ}C$), medium pH (6.5), and induction time (4 h). F, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the OD_{600} value and the induction time (h) at a constant temperature (37 $^{\circ}C$), medium pH (6.5), and IPTG concentration (0.525 mM). G, colour range of specific productivity values.

Было определено, что для достижения максимальной концентрации влажной биомассы оптимальным временем начала индукции является окончание экспоненциальной фазы роста (значение OD_{600} составляло 2,75 и выше), а концентрация ИПТГ – 0,25 мМ и ниже (рис. 2С, 2D). Известно, что низкая концентрация ИПТГ и позднее время начала индукции способствуют накоплению биомассы, а не рекомбинантного белка [19].

Значение параметра объемной продуктивности рассчитывается из значений удельной продуктивности и концентрации влажной биомассы. Выявлено, что на объемную продуктивность положительно влияют такие параметры, как длительность индукции и оптическая плотность индукции (рис. 3А). При этом pH среды и температура культивирования не влияют на данный отклик, однако наблюдается статистически зна-

чимое влияние взаимодействия друг с другом ($p < 0,02$) и взаимодействия температуры с временем индукции ($p < 0,02$). Также обнаружено отрицательное квадратичное влияние оптической плотности индукции (рис. 3А).

Было показано, что концентрация ИПТГ не влияет на удельную продуктивность, также не наблюдается взаимодействие данного параметра с другими исследованными параметрами. Возможно, отрицательное влияние концентрации ИПТГ на рост клеток и положительное влияние на удельную продуктивность нивелируют друг друга при расчете объемной продуктивности. В связи с этим было принято решение исключить концентрацию индуктора ИПТГ из данной модели. Кроме того, было показано, что ИПТГ является незначимым параметром во всем исследованном диапазоне concentra-

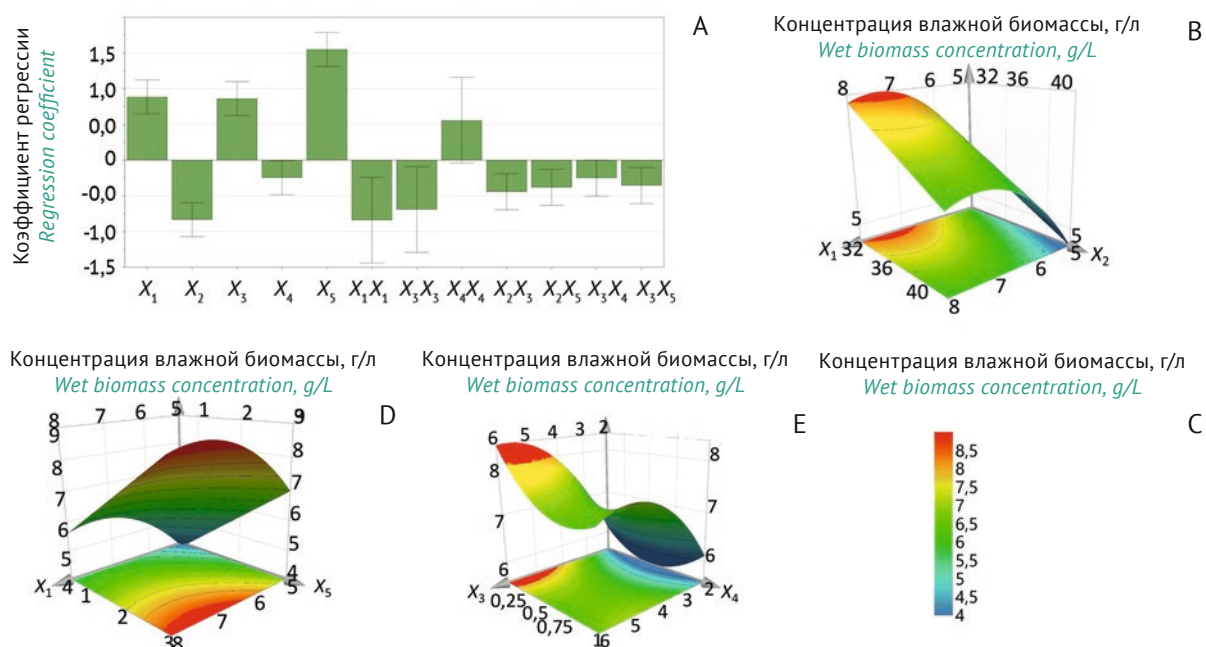


Рис. 2. Коэффициенты регрессии и трехмерные графики поверхностей отклика для концентрации влажной биомассы. А – коэффициенты регрессии, рассчитанные по результатам CCF для отклика – концентрация влажной биомассы, где X_1 – pH среды, X_2 – температура, X_3 – длительность индукции, X_4 – концентрация ИПТГ, X_5 – значение показателя OD_{600} (значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм). В – трехмерный график поверхности отклика для концентрации влажной биомассы, показывающий взаимодействующие эффекты pH среды и температуры ($^{\circ}C$) при постоянном значении показателя OD_{600} – 1,75, концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, длительности индукции – 4 ч. С – трехмерный график поверхности отклика для концентрации влажной биомассы, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD_{600} и pH среды при постоянном значении концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, температуры – $37^{\circ}C$, длительности индукции – 4 ч. D – трехмерный график поверхности отклика для концентрации влажной биомассы, показывающий взаимодействующие эффекты концентрации ИПТГ (мМ) и времени индукции (ч) при постоянном значении показателя OD_{600} – 1,75, pH среды – 6,5, температуры – $37^{\circ}C$. Е – цветовая шкала значений концентрации влажной биомассы.

Fig. 2. Regression coefficients and 3D response surface plots for the wet biomass concentration. A, regression coefficients calculated from the results obtained using the CCF design for the wet biomass concentration as a response variable, where X_1 is the medium pH, X_2 is the temperature, X_3 is the induction time, X_4 is the IPTG concentration (mM), and X_5 is the OD_{600} value (culture broth optical density at 600 nm). B, 3D response surface plot for the wet biomass concentration depicting interaction effects of the medium pH and the temperature ($^{\circ}C$) at a constant OD_{600} value (1.75), IPTG concentration (0.525 mM), and induction time (4 h). C, 3D response surface plot for the wet biomass concentration depicting interaction effects of the OD_{600} value and the medium pH at a constant IPTG concentration (0.525 mM), temperature ($37^{\circ}C$), and induction time (4 h). D, 3D response surface plot for the wet biomass concentration depicting interaction effects of the IPTG concentration (mM) and the induction time (h) at a constant OD_{600} value (1.75), medium pH (6.5), and temperature ($37^{\circ}C$). E, colour range of wet biomass concentrations.

ций (рис. 3С). Незначительный эффект влияния изменения концентрации ИПТГ дополнительно подчеркивает значимость длительности индукции на объемную продуктивность, так как необходимо достижение максимальных значений удельной продуктивности и концентрации массы влажного осадка.

Для достижения максимальной объемной продуктивности оптимальным являются следующие значения параметров: температура 39°C и ниже, pH в диапазоне 6,0–8,0 и время начала индукции, соответствующее значению OD_{600} , равному 1,75–2,25 (рис. 3В, С, D).

Таким образом, на основании данных графиков поверхности отклика и построенных моделей были рассчитаны проектные поля процесса индукции проинсулина аспарт в клетках штамма-продуцента *E. coli*: температура куль-

тивирования 35–39°C; pH среды 6,0–7,2; значение показателя OD_{600} – 1,8–2,25; концентрация ИПТГ – 0,05–1,0 мМ; время индукции – 5,5–6,0 ч.

На следующем этапе работы проводилась валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт. Критическим параметром валидации процесса индукции являлась удельная продуктивность. Ее расчетное значение составило 50 мг/г.

Ранее было определено, что для штамма-продуцента BL21 при росте клеток при культивировании в колбах интервал значений показателя OD_{600} от 2,0 до 3,0 соответствовал началу экспоненциальной фазы роста культуры. Данный интервал значений при масштабировании процесса культивирования в условиях биореактора Biostat В соответствует значению показателя OD_{600} от 18,0 до 30,0, что является началом экспоненциальной фазы роста культуры.

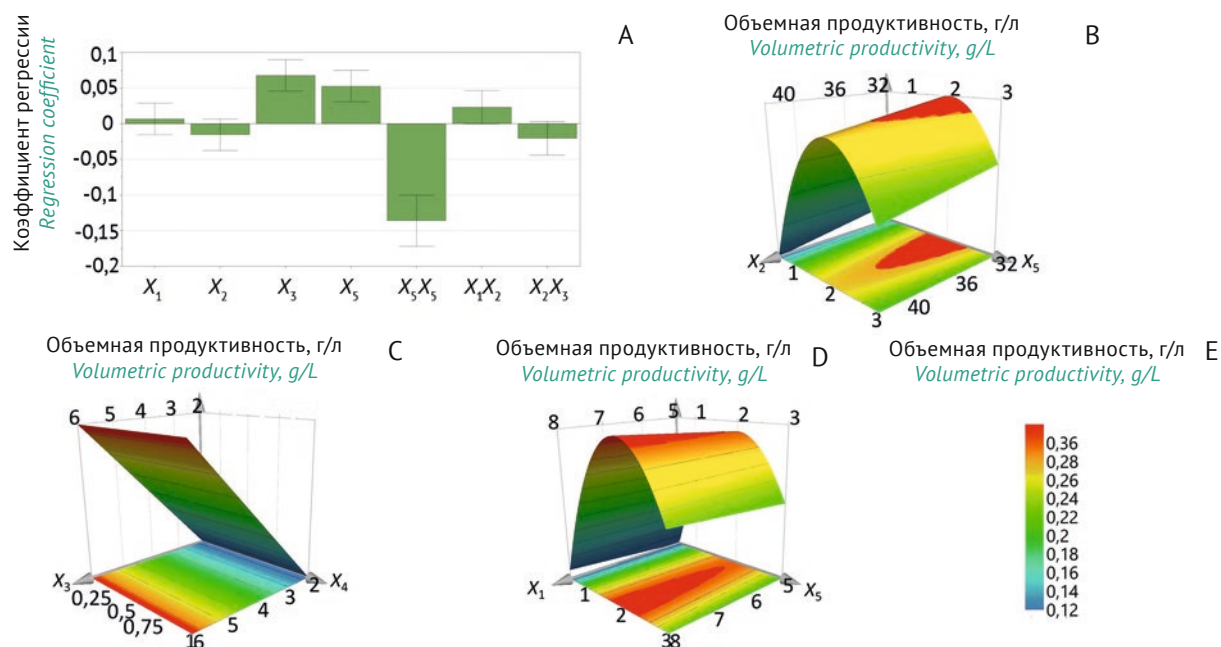


Рис. 3. Коэффициенты регрессии и трехмерные графики поверхностей отклика для объемной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт. А – коэффициенты регрессии, рассчитанные по результатам CCF для отклика – объемная продуктивность, где X_1 – pH среды, X_2 – температура, X_3 – длительность индукции, X_4 – концентрация ИПТГ, мМ, X_5 – значение показателя OD_{600} (значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм). В – трехмерный график поверхности отклика для объемной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD_{600} и температуры (°C) при постоянном значении pH среды – 6,5, концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, длительности индукции – 4 ч. С – трехмерный график поверхности отклика для объемной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты длительности индукции (ч) и концентрации ИПТГ (мМ) при постоянном значении pH среды – 6,5, температуры – 37°C, показателя OD_{600} – 1,75. D – трехмерный график поверхности отклика для объемной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты pH среды и показателя OD_{600} при постоянном значении длительности индукции – 4 ч, концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, температуры – 37°C. Е – цветовая шкала значений объемной продуктивности.

Fig. 3. Regression coefficients and 3D response surface plots for the volumetric productivity of the strain producing proinsulin aspart. A, regression coefficients calculated from the results obtained using the CCF design for the volumetric productivity as a response variable, where X_1 is the medium pH, X_2 is the temperature, X_3 is the induction time, X_4 is the IPTG concentration (mM), and X_5 is the OD_{600} value (culture broth optical density at 600 nm). B, 3D response surface plot for the volumetric productivity depicting interaction effects of the OD_{600} value and the temperature (°C) at a constant medium pH (6.5), IPTG concentration (0.525 mM), and induction time (4 h). C, 3D response surface plot for the volumetric productivity depicting interaction effects of the induction time (h) and the IPTG concentration (mM) at a constant medium pH (6.5), temperature (37°C), and OD_{600} value (1.75). D, 3D response surface plot for the volumetric productivity depicting interaction effects of the medium pH and the OD_{600} value (h) at a constant induction time (4 h), IPTG concentration (0.525 mM), and temperature (37°C). E, colour range of volumetric productivity values.

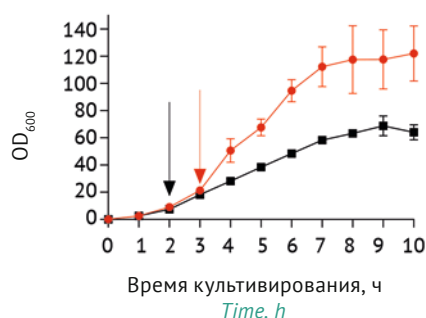


Рис. 4. Кинетика роста клеток *E. coli* в стандартных (черная линия) и в оптимизированных условиях (красная линия) процесса культивирования. OD₆₀₀ — значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм. Стрелками показано время начала индукции. Разбросы на кривых обозначают стандартное отклонение.

Fig. 4. Time course of *E. coli* culture growth under conventional (black line) and optimised (red line) conditions. OD₆₀₀ — culture broth optical density at 600 nm. Arrows indicate the start of induction; error bars show the standard deviation.

Валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт в ферментере

В рамках проведения валидации проводили по три ферментации в стандартных и оптимизированных условиях. Культивирование штамма-продуцента описывалось классическими кривыми роста в обоих исследованных процессах (рис. 4). В период лаг-фазы графики зависимости показателя OD₆₀₀ от времени не отличались.

В стандартных условиях индуктор вносили в переходную фазу роста культуры клеток, в оптимизированных условиях — в начале экспоненциальной фазы роста. Внесение ИПТГ не повлияло на переход культуры в экспоненциальную фазу роста, которая длилась с 3 по 7 ч культивирования. Снижение скорости роста клеток в экспоненциальной фазе в стандартных условиях культивирования обусловлено ранним внесением индуктора в период переходной фазы роста от лаг-фазы к экспоненциальной. При культивировании в оп-

тимизированных условиях снижения скорости роста не наблюдается, вероятно, из-за индукции в начале экспоненциальной фазы роста. Известно, что индукция оказывает метаболическую нагрузку на клетки [17, 18]. Чем выше концентрация клеток, тем ниже отношение ИПТГ к количеству клеток. Стоит отметить, что поздняя индукция, начиная от середины экспоненциальной фазы роста, может негативно влиять на продуктивность из-за превращения большинства ресурсов в биомассу [20]. Кроме того, снижение концентрации индуктора ИПТГ в оптимизированных условиях (0,05 мМ против 0,1 мМ в стандартных условиях), вероятно, уменьшает его токсическое действие на клетки, способствуя достижению большего значения показателя OD₆₀₀ и снижает себестоимость процесса культивирования.

После 7 ч культивирования и в стандартных, и оптимизированных условиях было продемонстрировано замедление скорости роста клеток и выход в стационарную фазу с достижением значений OD₆₀₀ 68,8±7,1 и 122,0±20,3 опт. ед. соответственно (рис. 4).

Кинетику накопления проинсулина аспарт оценивали по изменению удельной и объемной продуктивности в течение периода индукции (рис. 5А, В). Длительность индукции составила 7 ч. С момента внесения индуктора наблюдался рост величины удельной продуктивности с последующим выходом на плато. Максимальные значения удельной продуктивности составили 55,95±4,54 и 49,13±8,67 мг/г для стандартных и оптимизированных условий культивирования соответственно. Статистически значимого отличия между значениями удельной продуктивности в стандартных и в оптимизированных условиях не наблюдалось. Также не выявлены статистически значимые различия между значениями удельной продуктивности при культивировании в колбах и в ферментере. Таким образом, учи-

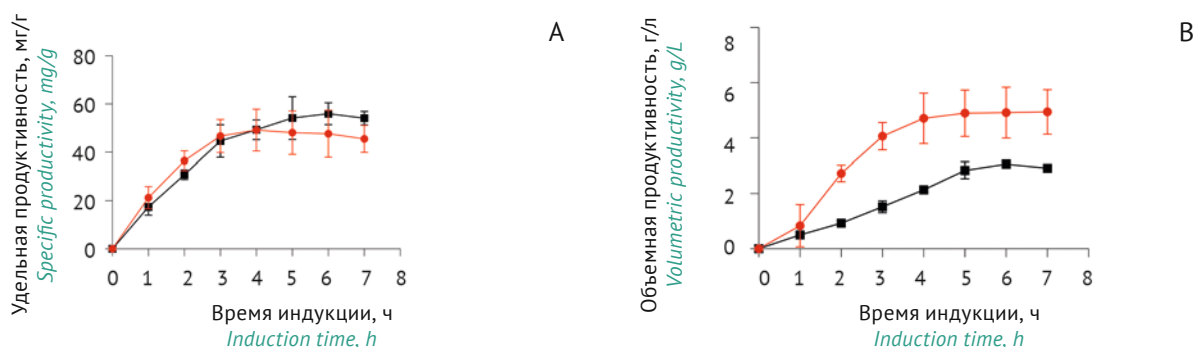


Рис. 5. Удельная (А) и объемная (В) продуктивность культуры в отношении проинсулина аспарт для стандартных (черная линия) и оптимизированных (красная линия) условий.

Fig. 5. Specific (A) and volumetric (B) productivity of the cell culture producing proinsulin aspart under conventional (black line) and optimised (red line) conditions

тая отсутствие различий между значениями удельной продуктивности в стандартных и в оптимизированных условиях, можно сделать вывод о том, что валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт прошла успешно.

В стандартных условиях максимальное значение объемной продуктивности составляло $3,06 \pm 0,16$ г/л на 6 ч индукции, в то время в оптимизированных условиях этот показатель составлял $4,94 \pm 0,80$ г/л на 7 ч индукции. Графики, описывающие биосинтез проинсулина аспарт, коррелируют с соответствующими кривыми роста.

Таким образом, проведенные исследования позволили подобрать оптимальные условия культивирования штамма-продуцента проинсулина аспарт, которые увеличивают его продуктивность на 60%. Повышение продуктивности обусловлено определением оптимальных параметров для роста клеток. Можно предположить, что наибольшее влияние на выход рекомбинантного проинсулина аспарт оказывает снижение метаболической нагрузки на клетки за счет установления оптимального соотношения концентрации ИПТГ и количества клеток в момент индукции.

Выводы

1. Применение подхода математического планирования эксперимента (DoE) позволило

определить оптимальные условия для роста штамма-продуцента *E. coli* и биосинтеза проинсулина аспарт.

2. Показано, что построенные модели для следующих откликов: концентрация влажной биомассы, удельная продуктивность и объемная продуктивность — характеризуются высокой прогностической способностью и соответствуют экспериментальным данным (разница между значениями R^2 и Q^2 менее 0,3 для каждой модели).
3. Составлены проектные поля процесса индукции биосинтеза проинсулина аспарт клетками штамма-продуцента.
4. Продемонстрирована успешная валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт в ферментере объемом 5,0 л.
5. Показано, что снижение концентрации индуктора ИПТГ в два раза не влияет на удельную продуктивность штамма-продуцента.
6. Достигнуто увеличение значений объемной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт на 60%: с $3,06 \pm 0,16$ до $4,94 \pm 0,80$ г/л.
7. Полученные результаты исследования могут быть использованы для повышения эффективности производства инсулина аспарт в промышленных условиях.

Литература/References

1. Chapman TM, Noble S, Goa KL. Insulin aspart: a review of its use in the management of type 1 and 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2002;62(13):1945–81. <https://doi.org/10.2165/00003495-200262130-00014>
2. Valerio LG, Jr. Tenth anniversary of Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(6):767–8. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.920007>
3. Siew YY, Zhang W. Downstream processing of recombinant human insulin and its analogues production from *E. coli* inclusion bodies. *Bioresour Bioprocess*. 2021;8(1):65. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00419-w>
4. Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, et al. Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact*. 2014;13:141. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
5. Mikiewicz D, Bierzynska-Krzesik A, Sobolewska A, Stadnik D, Bogiel M, Pawłowska M, et al. Soluble insulin analogs combining rapid- and long-acting hypoglycemic properties — from an efficient *E. coli* expression system to a pharmaceutical formulation. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172600>
6. Uhoraningoga A, Kinsella GK, Henehan GT, Ryan BJ. The Goldilocks approach: a review of employing design of experiments in prokaryotic recombinant protein production. *Bioengineering (Basel)*. 2018;5(4):89. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5040089>
7. Haider MA, Pakshirajan K. Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by a soil microorganism using statistically designed experiments. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007;141(2–3):377–90. <https://doi.org/10.1007/BF02729074>
8. Gutiérrez-González M, Fariás C, Tello S, Pérez-Etcheverry D, Romero A, Zúñiga R, et al. Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2019;9(1):16850. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53200-7>
9. Ashayeri-Panah M, Eftekhari F, Kazemi B, Joseph J. Cloning, optimization of induction conditions and purification of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1733c protein expressed in *Escherichia coli*. *Iran J Microbiol*. 2017;9(2):64–73.
10. Azaman SN, Ramakrishnan NR, Tan JS, Rahim RA, Abdullah MP, Ariff AB. Optimization of an induction strategy for improving interferon- α 2b production in the periplasm of *Escherichia coli* using response surface methodology. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010;56(4):141–50. <https://doi.org/10.1042/BA20100104>
11. Huang Y, Lu X, Wang J, Jin X, Zhu J. Optimization of expression conditions of an induction strategy for improving liver targeted interferon (IFN-CSP) production in *E. coli*. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2014;31(2):432–8.
12. Larentis AL, Corrêa Argondizzo AP, dos Santos Esteves G, Jessouron E, Galler R, Medeiros MA. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expr Purif*. 2011;78(1):38–47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.02.013>
13. Mandenius CF, Brundin A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnol Prog*. 2008;24(6):1191–203. <https://doi.org/10.1002/btpr.67>
14. Dolnik V. Capillary electrophoresis of proteins 2005–2007. *Electrophoresis*. 2008;29(1):143–56. <https://doi.org/10.1002/elps.200700584>
15. Castellanos-Mendoza A, Castro-Acosta RM, Olvera A, Zavala G, Mendoza-Vera M, García-Hernández E, et al. Influence of pH control in the formation of inclusion bodies

- during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2014;13:137. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0137-9>
16. Slouka C, Kopp J, Hutwimmer S, Strahammer M, Strohm D, Eitenberger E, et al. Custom made inclusion bodies: impact of classical process parameters and physiological parameters on inclusion body quality attributes. *Microb Cell Fact*. 2018;17(1):148. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0997-5>
 17. Chen H, Jiang P, Li F, Wu H. Improving production of thermostable and fluorescent holo- β -allophycocyanin by metabolically engineered *Escherichia coli* using response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*. 2015;45(7):730–41. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.943374>
 18. Einsfeldt K, Severo Júnior JB, Corrêa Argondizzo AP, Medeiros MA, Alves TL, Almeida RV, Larentis AL. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*. 2011;29(41):7136–43. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.073>
 19. Marini G, Luchese MD, Corrêa Argondizzo AP, Magalhães Andrade de Góes AC, Galler R, Moitinho Alves TL, et al. Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and preliminary purification process. *BMC Biotechnol*. 2014;14:1. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-1>
 20. Mühlmann M, Forsten E, Noack S, Büchs J. Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. *Microb Cell Fact*. 2017;16(1):220. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0832-4>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.А. Корнаков** — идея исследования, планирование и проведение экспериментов, анализ данных, написание текста рукописи; **З.Р. Хасаншина** — планирование и анализ данных экспериментов, написание текста рукописи; **Д.А. Сеничкина** — проведение экспериментов по культивированию; **А.А. Филипенко** — проведение капиллярного электрофореза; **И.С. Лунев** — интерпретация и анализ данных; **Р.В. Драй** — определение основного направления исследования, утверждение окончательной версии статьи.

Благодарности. Исследование проводилось при спонсорской поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Авторы выражают признательность коллегам, которые оказывали помощь в выполнении исследования, сотрудникам лаборатории генной инженерии и ферментации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.A. Kornakov** suggested the study idea, planned and carried out experiments; analysed data; and drafted the manuscript. **Z.R. Khasanshina** planned experiments, analysed experimental data, and drafted the manuscript. **D.A. Senichkina** carried out cultivation experiments. **A.A. Filipenko** performed capillary electrophoresis. **I.S. Lunev** interpreted and analysed data. **R.V. Drai** set the main research direction and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study was supported by GEROPHARM. The authors are grateful to their colleagues who helped them with this study and to the staff of the Laboratory for genetic engineering and fermentation.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Корнаков Игорь Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0207-5244>

Igor.Kornakov@geropharm.com

Хасаншина Зухра Рамиевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>

Zuhra.hasanshina@geropharm.com

Сеничкина Дина Александровна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2220-0591>

Dina.Senichkina@geropharm.com

Филипенко Антон Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9985-9573>

Anton.Filipenko@geropharm.com

Лунев Иван Сергеевич

inav.lunev96@gmail.com

Драй Роман Васильевич, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

roman.drai@geropharm.com

Igor A. Kornakov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0207-5244>

Igor.Kornakov@geropharm.com

Zukhra R. Khasanshina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>

Zuhra.hasanshina@geropharm.com

Dina A. Senichkina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2220-0591>

Dina.Senichkina@geropharm.com

Anton A. Filipenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9985-9573>

Anton.Filipenko@geropharm.com

Ivan S. Lunev

inav.lunev96@gmail.com

Roman V. Drai, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

roman.drai@geropharm.com

Поступила 22.06.2022

После доработки 05.05.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Received 22 June 2022

Revised 5 May 2023

Accepted 7 June 2023