



Разработка продуцентов терапевтических пептидов на основе *Escherichia coli* BL21 и технологии их культивирования

З. Р. Хасаншина^{1,2}✉, И. А. Корнаков¹, Е. А. Буслаева¹, А. В. Казакова¹,
С. А. Ищук¹, В. И. Шмурак¹, В. Б. Сапарова¹, В. Ф. Латыпов¹, Р. В. Драй¹

¹ Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34, литера А

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО». 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д. 49, литера А

✉ Контактное лицо: Хасаншина Зухра Рамилевна. E-mail: zuhra.hasanshina@geropharm.com

ORCID: З. Р. Хасаншина – <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>;
И. А. Корнаков – <https://orcid.org/0000-0003-0207-5244>;
Е. А. Буслаева – <https://orcid.org/0009-0000-4389-8605>;
А. В. Казакова – <https://orcid.org/0009-0000-3314-2310>;
С. А. Ищук – <https://orcid.org/0000-0002-5754-7491>;
В. И. Шмурак – <https://orcid.org/0000-0003-0282-9843>;
В. Б. Сапарова – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>;
В. Ф. Латыпов – <https://orcid.org/0009-0009-0487-4227>;
Р. В. Драй – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

Статья поступила: 16.05.2024

Статья принята в печать: 24.01.2025

Статья опубликована: 27.01.2025

Резюме

Введение. В последнее десятилетие пептиды с молекулярной массой менее 5 кДа используются в медицине и биотехнологии для лечения различных заболеваний. Химический синтез пептидов имеет ограничения, такие как низкий выход и эффективность синтеза, сложность масштабирования. Альтернативой является использование *Escherichia coli*. Разработка эффективной технологии синтеза пептидов остается актуальной задачей в связи с низкой продуктивностью штаммов-продуцентов.

Цель. Разработка высокоэффективных штаммов *Escherichia coli* BL21, экспрессирующих терапевтические пептиды молекулярной массой менее 5 кДа, и технологии их культивирования.

Материалы и методы. Генетические конструкции получили с использованием рестриктазно-лигазного метода, подлинность подтвердили секвенированием по Сенгеру. Технологию культивирования разработали с использованием подхода Design of experiments. Валидацию условий культивирования проводили в биореакторе Biostat В. Гибридные белки очищали методом металл-хелатной хроматографии, целевые пептиды получали гидролизом с помощью ULP-протеазы. Количественное содержание целевого белка определяли капиллярным электрофорезом, подлинность белка – ВЭЖХ-МС и косвенным неконкурентным ИФА.

Результаты и обсуждение. В ходе исследований разработаны высокоэффективные штаммы-продуценты пептидов и оптимальные условия культивирования: pH – $7,5 \pm 0,5$, температура культивирования – 37°C , оптическая плотность индукции – $2,7 \pm 0,3$, концентрация ИПТГ – $0,05$ mM. Продуктивность штаммов-продуцентов достигла $4,82 \pm 0,05$ г/л. Получены образцы очищенных пептидов.

Заключение. Разработанная технология позволяет получить пептиды с высоким выходом, не описанным ранее исследователями. Практическая значимость данной работы заключается в возможности применения данной технологии для получения пептидов с различными физико-химическими свойствами.

Ключевые слова: пептиды, *Escherichia coli*, культивирование, Design of experiments, ULP, ВЭЖХ-МС

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. З. Р. Хасаншина – разработка методологии, проведение исследований, анализ результатов, написание статьи. И. А. Корнаков – проведение исследований, участие в написании статьи. Е. А. Буслаева – проведение исследований. А. В. Казакова – проведение исследований. С. А. Ищук – разработка методологии, проведение исследований.

© Хасаншина З. Р., Корнаков И. А., Буслаева Е. А., Казакова А. В., Ищук С. А., Шмурак В. И., Сапарова В. Б., Латыпов В. Ф., Драй Р. В., 2025

© Khasanshina Z. R., Kornakov I. A., Buslaeva E. A., Kazakova A. V., Ishchuk S. A., Shmurak V. I., Saparova V. B., Latypov V. F., Drai R. V., 2025

В. И. Шмурак – проведение исследований, анализ данных. В. Б. Сапарова – проведение иммуноферментного анализа, анализ данных. В. Ф. Латыпов – разработка методологии, участие в написании статьи. Р. В. Драй – руководство работой.

Для цитирования: Хасаншина З. Р., Корнаков И. А., Буслаева Е. А., Казакова А. В., Ищук С. А., Шмурак В. И., Сапарова В. Б., Латыпов В. Ф., Драй Р. В. Разработка продуцентов терапевтических пептидов на основе *Escherichia coli* BL21 и технологии их культивирования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):54–66. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1825>

Development of therapeutic peptide producers based on *Escherichia coli* BL21 and their cultivation technology

Zukhra R. Khasanshina^{1,2}✉, Igor A. Kornakov¹, Evgeniya A. Buslaeva¹, Angelina V. Kazakova¹, Sergey A. Ishchuk¹, Vladimir I. Shmurak¹, Valeriya B. Saparova¹, Vitaly F. Latypov¹, Roman V. Drai¹

¹ JSC "FARM-KHOLDING". 34A, Svyazi str., Strelna village, Saint-Petersburg, 198515, Russia

² ITMO University. 49A, Kronverksky prospekt, Saint-Petersburg, 197101, Russia

✉ **Corresponding author:** Zukhra R. Khasanshina. **E-mail:** zukhra.hasanshina@geropharm.com

ORCID: Zukhra R. Khasanshina – <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>;

Igor A. Kornakov – <https://orcid.org/0000-0003-0207-5244>;

Evgeniya A. Buslaeva – <https://orcid.org/0009-0000-4389-8605>;

Angelina V. Kazakova – <https://orcid.org/0009-0000-3314-2310>;

Sergey A. Ishchuk – <https://orcid.org/0000-0002-5754-7491>;

Vladimir I. Shmurak – <https://orcid.org/0000-0003-0282-9843>;

Valeriya B. Saparova – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>;

Vitaly F. Latypov – <https://orcid.org/0009-0009-0487-4227>;

Roman V. Drai – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

Received: 16.05.2024

Accepted: 24.01.2025

Published: 27.01.2025

Abstract

Introduction. Peptides with a molecular weight of less than 5 kDa have been used in medicine and biotechnology over the past decade for the treatment of various diseases. However, chemical synthesis peptide has several disadvantages, including low yield, reduced efficiency, and high costs. An alternative approach to peptide production is the use of the *Escherichia coli* expression system. The development of effective peptide synthesis technology remains a critical task because of the low productivity of recombinant strains.

Aim. Developing highly efficient strains of *Escherichia coli* BL21 expressing therapeutic peptides with a molecular weight of less than 5 kDa in *E. coli* and their cultivation technology.

Materials and methods. Genetic constructs were obtained using the restriction-ligase method, and their authenticity was confirmed by Sanger sequencing. Cultivation technology was developed using the Design of Experiments approach. The cultivation condition was validated in the Biostat B bioreactor. Hybrid proteins were purified by metal-chelate chromatography, followed by hydrolysis ULP proteas to obtain the target peptides. The quantitative content of the target protein was determined by capillary electrophoresis, and the authenticity of the protein was confirmed by HPLC-MS and ELISA.

Results and discussion. Highly efficient peptide-producing strains were developed. Cultivation conditions were optimized: pH 7.5 ± 0.5 , cultivation temperature 37°C , induction optical density 28 ± 2 , IPTG concentration 0.05 mM . The productivity of the producer strains was up to $4.82 \pm 0.05\text{ g/L}$. Furthermore, samples of the target peptides were isolated and purified.

Conclusion. The productivity of peptides in this study were significantly higher than in previous research. The presented strategy for strain development, cultivation and purification technology can be used production of therapeutic peptides with diverse physical chemicals characteristics in the future.

Keywords: peptides, *Escherichia coli*, design of experiments, cultivation, ULP, HPLC-MS

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Zukhra R. Khasanshina – methodology, Investigation, Formal analysis, writing – original draft. Igor A. Kornakov – investigation, writing – review & editing. Evgeniya A. Buslaeva, Angelina V. Kazakova – investigation. Sergey A. Ishchuk – methodology, investigation. Vladimir I. Shmurak – investigation, formal analysis. Valeriya B. Saparova – investigation, formal analysis. Vitaly F. Latypov – conceptualization, writing – review & editing. Roman V. Drai – supervision, conceptualization.

For citation: Khasanshina Z. R., Kornakov I. A., Buslaeva E. A., Kazakova A. V., Ishchuk S. A., Shmurak V. I., Saparova V. B., Latypov V. F., Drai R. V. Development of therapeutic peptide producers based on *Escherichia coli* BL21 and their cultivation technology. *Drug development & registration*. 2025;14(1):54–66. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1825>

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие пептиды нашли широкое применение в медицине и биотехнологии. Эра пептидных препаратов началась в 1921 году с открытия инсулина [1–3]. В настоящее время пептиды используются в терапии метаболических, инфекционных, кардиоваскулярных и онкологических заболеваний. На мировом рынке представлено около 80 пептидных препаратов, одобренных регуляторными органами. Кроме того, более 150 пептидов находятся в стадии клинической разработки, 400–600 пептидов – доклинических исследований [1, 3].

Классическая технология получения пептидов – химический синтез – имеет ряд ограничений: низкий выход пептидов из-за проблем с растворимостью, использование дорогостоящих, взрывоопасных реагентов, сложность масштабирования и наработки материала надлежащего качества не только для обеспечения потребностей рынка, необходимого для доклинических и клинических исследований [4, 5]. Стратегия прямого последовательного синтеза заключается в поэтапном добавлении аминокислот до получения желаемой последовательности. Эффективность каждого этапа не достигает 100 %, что приводит к образованию смеси пептидов разной длины и усложнению процесса очистки [6]. Дополнительные сложности возникают при синтезе последовательностей с высоким содержанием гидрофобных аминокислот, склонных к агрегации, и свободных цистеинов из-за окисления или образования нежелательных дисульфидных связей [6, 7]. Альтернативным способом получения пептидов является технология рекомбинантной ДНК, которая лишена вышеперечисленных недостатков. Для получения пептидов, не содержащих посттрансляционные модификации, неабиогенные аминокислоты, может быть использована бактериальная система экспрессии. Быстрая кинетика роста, хорошая охарактеризованная генетика, широкий выбор инструментов для экспрессии генов, возможность высокоплотного культивирования сделали *Escherichia coli* ключевым представителем бактериальной системы экспрессии для сверхэкспрессии рекомбинантных белков [8]. В литературе описаны десятки штаммов-продуцентов, каждый из которых обладает своими достоинствами и недостатками. Стоит отметить, что большинство из них являются специализированными штаммами, которые используются в определенных случаях. В промышленных масштабах используются несколько штаммов *E. coli*: BL21 и производные линии K12 [9]. Несмотря на то, что штаммы K12 наиболее изучены, *E. coli* BL21 считается более предпочтительным для производства рекомбинантных белков, так как он обеспечивает более высокий выход биомассы и снижает образование ацетата даже при избытке глюкозы в среде [9–11]. Использование BL21 предпочтительно для получения пептидов, склонных к протеолитической деградации. При этом BL21 является дефицитным по протеазам

Lon и OmpT, способствующим гидролизу чужеродных белков и расщеплению внеклеточных белков соответственно, и обеспечивает стабильность плазмидной ДНК [8, 9].

Однако экспрессия коротких пептидов молекулярной массой менее 5 кДа ограничена цитотоксичностью и низкими выходами целевого продукта [12]. Поэтому задача разработки стратегии получения пептидов с сохранением всех преимуществ *E. coli* остается актуальной. Одним из решений является экспрессия пептида в виде tandemных повторов или в виде гибридных белков, слитых крупными белками, например SUMO [12–15]. Однако tandemные повторы усложняют рефолдинг белков [15], что делает использование белка SUMO более перспективным направлением [16]. В настоящее время технология SUMO используется для получения рекомбинантных пептидов в академических целях, но ее продуктивность недостаточна для промышленного использования [17–21].

На экспрессию рекомбинантного белка влияет не только экспрессионный штамм-хозяин, но и условия индукции [9, 22, 23]. Выход экспрессируемых белков можно увеличить с помощью оптимизации этих параметров. Традиционно изменение одной переменной за раз используется для оптимизации [24]. Однако этот метод требует проведения большого количества экспериментов и приводит к неправильной интерпретации данных при взаимодействии различных факторов [25]. Напротив, Design of experiments (DoE) позволяет варьировать несколько факторов одновременно и исследовать их взаимодействие, что делает его более предпочтительным методом для получения проектных полей процесса [25–28].

Таким образом, в данной работе предложена стратегия разработки высокоэффективных штаммов-продуцентов терапевтических пептидов молекулярной массой менее 5 кДа в *E. coli* BL21, а также культивирования для применения в промышленной биотехнологии. Предложенная стратегия получения штаммов-продуцентов и технология культивирования могут быть использованы для биосинтеза пептидов с различными физико-химическими свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и плазмиды

Штаммы *Escherichia coli* DH5 α (NEB, США) и BL21 (NEB, США) были использованы в качестве штаммов для клонирования и экспрессии соответственно. Для нуклеотидных последовательностей SUMO и пептидов была проведена оптимизация кодонов для их экспрессии *Escherichia coli* с использованием алгоритма ATUM (США), синтез последовательностей был осуществлен ATUM (США). Фрагмент SUMO был фланкирован сайтами рестрикции эндонуклеаз EcoRI и BseRI, фрагменты пептидов – BseRI и HindIII. В качестве вектора была использована плаزمид

ЗАО «Фарм-Холдинг», содержащая ген устойчивости к канамицину, Tac-промотор, rrnB-терминатор, точку инициации репликации pBR322 и ген ROP для контроля копийности (рисунок 1) [29]. Рекомбинантные плазмиды были получены рестриктазно-лигазным методом клонирования [30]. Подлинность была подтверждена секвенированием по Сэнгеру компанией ЗАО «Евроген» (Россия).

Трансформация и отбор клонов с высокой экспрессией

Плазмиды после подтверждения подлинности конструкций ввели в *E. coli* BL21 методом электропорации. 0,5 мкл плазмиды (400 нг/мкл) смешивали с 100 мкл компетентных клеток *E. coli* BL21 к ювете для электропорации 1 мм и подвергали действию электрического тока 1700 V с помощью электропоратора Eppendorf Eporator (Германия) [30]. Далее к клеткам добавили 1 мл среды SOC [31] и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и 180 об/мин в термошейкере Ecotron (Infors, Швейцария). Суспензию клеток центрифугировали при 3000 об/мин в течение 2 мин с помощью центрифуги 5810R (Eppendorf, Германия), супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 100 мкл среды и рассеивали на агаризованную среду LB [31], содержащую канамицин (50 мг/л). Чашки инкубировали в течение ночи при температуре 37 °C. Были получены штаммы-продуценты BL21\rpF1220 и BL21\rpF1223, экспрессирующие SUMO-пептид 1 и SUMO-пептид 2 соответственно. Данные пептиды являются антигенными компонентами вакцины.

По 10 колоний с каждой чашки пересеивали в колбы (300 мл), содержащие 30 мл среды LB [31] и

50 мг/л канамицина. Клетки инкубировали при 37 °C и 180 об/мин в термошейкере Ecotron (Infors, Швейцария) до достижения оптической плотности при длине волны 600 нм 0,6–0,8 о.е., внесли изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ. Индукцию проводили в течение 4 ч, затем отбирали 200 мкл суспензии клеток, центрифугировали при 15 000 об/мин в течение 5 мин с помощью центрифуги 5810R (Eppendorf, Германия). Экспрессию белка оценивали методом электрофореза в денатурирующих условиях в 15%-м трицин-полиакриламидном геле [32]. Клоны с наилучшей экспрессией были выбраны для дальнейших исследований.

Подготовка посевного материала

Подготовка посевного материала для культивирования в колбах и в биореакторе идентична. Культуру растили в среде для посевного материала (СМ), содержащей пептоны растительного происхождения 30 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, 50 мг/л канамицина. Инкубировали в термошейкере Ecotron (INFORS HT, Швейцария) при 180 об/мин 37 °C в течение 16 ± 2 ч.

Оптимизация условий индукции в колбах

На основании литературных данных и предыдущего опыта для оптимизации условий индукции были выбраны пять факторов: pH (5–8), температура (25–37 °C), длительность индукции (4–17 ч), концентрация индуктора ИПТГ (0,05–1,0 мМ), оптическая плотность индукции (0,5–3,0 о.е.) [9, 22, 23].

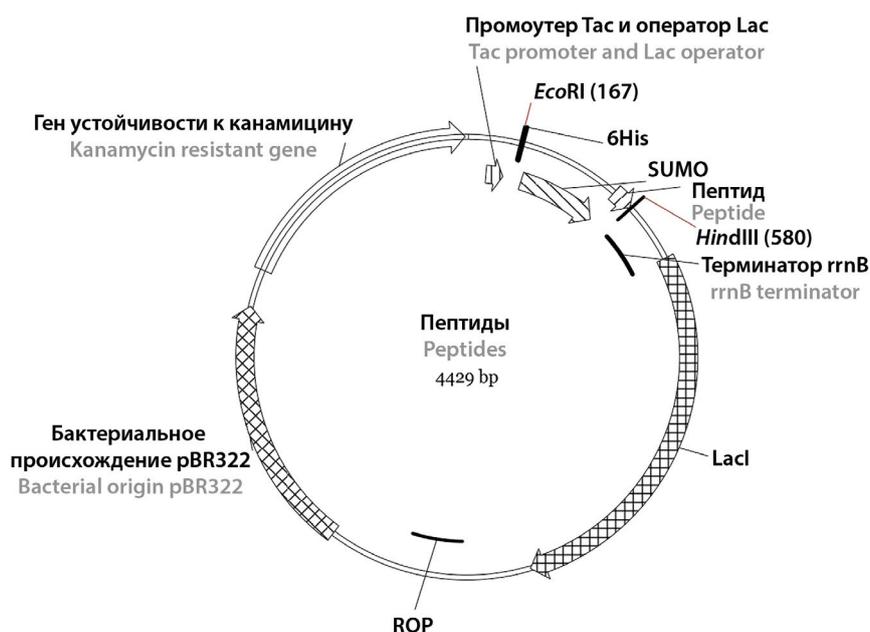


Рисунок 1. Общая карта плазмиды

Figure 1. Schematic plasmid map

В качестве откликов использовали удельную продуктивность и концентрацию влажной биомассы. Влияние факторов оценивали с помощью дизайна Reduced Central Composite Face (CCF). Модели считались приемлемыми при удовлетворительных значениях коэффициента детерминации R^2 и высокой предсказательной способности модели Q^2 [25, 33, 34]. Множественный линейный регрессионный анализ использовали для надстройки модели (формула 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} – отклик CCF-дизайна; X_i и X_j – анализируемые факторы; α_0 – константа; α_i , α_{ij} и α_{ii} – линейные коэффициенты регрессии, коэффициенты взаимодействия и квадратичные коэффициенты регрессии соответственно.

Валидация условий культивирования в биореакторе

Оптимальные условия, определенные в экспериментах в колбах, валидировали в 5-литровом биореакторе Biostat B (Sartorius AG, Германия). Проводили периодическое культивирование на среде CM с добавлением пеногасителя Antifoam 204 0,03 % об./об. и 50%-го раствора глюкозы 0,06 % об./об. Объем посева составлял 1:10 объема питательной среды. Уровень растворенного кислорода поддерживали на уровне 30 % насыщения воздухом. pH среды регулировали в пределах, установленных проектным полем, с использованием 50%-го раствора глюкозы (режим pH-стат).

В качестве контроля использовали технологию культивирования в стандартных для *E. coli* условиях: pH среды – $6,8 \pm 0,2$, температура культивирования – 37°C , оптическая плотность индукции – 13 ± 2 о.е., время индукции – 4 ч, концентрация ИПТГ – 0,5 мМ. Все ферментации проводили в трех повторностях.

Измерение оптической плотности культуры

Оптическую плотность культуры измеряли при длине волны 600 нм (OD_{600}) на спектрофотометре NanoPhotometer P300 (Implen GmbH, Германия) [35].

Количественное определение содержания белка

Для определения концентрации гибридных белков использовали метод капиллярного гель-электрофореза в денатурирующих условиях с помощью системы для капиллярного электрофореза PA 800 Plus (SCIEX LLC, США) [36]. Использовали фотометрическое прямое детектирование в ультрафиолетовой области спектра. В качестве стандарта использовали раствор целевых белков с концентрацией 1 мг/мл.

Выделение и гидролиз целевых пептидов

Культуральную жидкость после ферментации центрифугировали в течение 20 мин при 8000 об/мин на центрифуге Avanti J-HC (Beckman Coulter, Inc., США). Клеточную биомассу гомогенизировали в соотношении 1:15 в буферном растворе (0,15 М NaCl, 0,02 М NaH_2PO_4 , pH 7,4) с помощью гомогенизатора высокого давления PandaPLUS 1000 (GEA NIRO SOAVI, Италия) при 900 бар. Для удаления белков штамм-хозяина использовали металл-хелатную хроматографию на Ni Seplife® 6FF (Sunresin, Китай). Элюцию проводили 0,02 М фосфатным буфером, содержащим 0,15 М NaCl и 0,5 М имидазола. Элюат концентрировали на кассете Vivaflow 200 (Sartorius AG, Германия) с молекулярной массой отсечения 5 кДа. К полученному концентрату добавляли Ulp-протеазу. Гидролиз проводили при температуре 20–25 °C в течение 1 ч. Раствор после гидролиза анализировали с помощью ВЭЖХ-МС для подтверждения подлинности продукта. Эффективность стадий очистки оценивали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 15%-м трицин-полиакриламидном геле [32].

Определение подлинности методом ВЭЖХ-МС

Для анализа образцов после металл-хелатной хроматографии и гидролиза использовали ВЭЖХ-систему Aquity с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором SQ Detector 2 (Waters Corporation, США). Хроматографию проводили на колонке SunFire C18, 150 × 4,6 мм, с зернением 3,5 мкм (Waters Corporation, США). Объем вводимой пробы составил 5 мкл. Фаза А представляла собой смесь «вода – 0,1%-я муравьиная кислота», фаза Б – смесь «ацетонитрил – 0,1%-я муравьиная кислота». Разделение осуществляли при потоке элюента 900 мкл/мин в системе «фаза А – фаза Б» в градиентном режиме: 0–1 мин – 5 %, 1,0–15,0 мин – 5–50 %, 15,0–15,2 мин – 5–100 %, 15,2–18,0 мин – 100 %, 18,0–18,2 мин – 100–5 %, 18,2–22,0 мин – 5 %. Температура колонки составила 40 °C. Тип ионизации масс-детектора – распыление в электрическом поле, диапазон сканирования – 200–2000 m/z в режиме положительно заряженных ионов. Дополнительно на длинах волн 220 и 280 нм записывали ВЭЖХ-УФ-хроматограммы, полученные с помощью диодно-матричного детектора.

Определение подлинности методом ИФА

В качестве ортогонального метода подтверждения подлинности продуктов использовали иммуноферментный анализ «ЭпиВак-ЭВК-подлинность» (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия). Образцы разводили в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буферном растворе до концентрации 1 мг/мл. В лунки стрипа вносили 20 мкл образца, икубировали в течение 30 мин при 37 °C и 700 об/мин в термощейкере PST-60HL (Biosan,

Латвия). Затем раствор сливали, тщательно встряхивали. Добавляли 400 мкл фосфатного буферного раствора, удаляли его по той же схеме. Процедуру повторяли три раза. После этого вносили 100 мкл первичных антител, инкубировали в течение 30 мин при 37 °С и 700 об/мин в термошейкере PST-60HL (Biosan, Латвия). Лунки три раза промывали фосфатным буферным раствором, добавляли 100 мкл антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, инкубировали в течение 30 мин при 37 °С и 700 об/мин в термошейкере PST-60HL (BioSan, Латвия). Далее лунки три раза промывали фосфатным буферным раствором, добавляли 100 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, добавляли 50 мкл стоп-буфера, аккуратно перемешивали до появления желтого окрашивания. Оптическую плотность определяли на планшетном спектрофотометре CLARIOstar (BMG LAB-TECH, Германия) при длине волны 450 нм. Если отношение оптической плотности образца к отрицательному контролю больше или равно 1, продукт считался подлинным.

Программное обеспечение и статистическая обработка данных

Для разработки дизайна генетических конструкций использовали программу Vector NTI 11.5 (Invitrogen, США). Дизайн экспериментов, проверка моделей и определение значимости параметров в рамках DoE проводили с применением программы MODDE (Sartorius AG, Германия). Для построения моделей использовали метод поверхностей отклика, для анализа полученных данных использовали анализ вариаций (ANOVA) и описательную статистику [33]. Для статистической обработки результатов ферментации использовали программу GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Осуществили расчет среднего значения и стандартного отклонения, для сравнения результатов ферментации в стандартных и оптимизированных условиях использовали Т-тест. ВЭЖХ-МС-хроматограммы анализировали с помощью программы UNIDEC 4.4.1 [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Доступно множество стратегий экспрессии для производства пептидов. Стоит отметить, что разработка рекомбинантных производственных процессов является сложной задачей. Микробная ферментация с использованием генно-инженерных бактерий используется для производства пептидов размером менее 5 кДа, однако уровень экспрессии не позволяет достичь высоких промышленных титров из-за протеолитической деградации, цитотоксичности и агрегации, что ограничивает применение данного подхода. В данном исследовании был предложен подход с использованием разработки штаммов и технологии культивирования пептидов с различными физико-хи-

мическими свойствами, которые могут быть применимы для разработки других пептидов.

В результате данных исследований были получены штаммы-продуценты BL21\pF1220, BL21\pF1223. Первичный скрининг продуктивности в колбах показал, что они обеспечивают выход гибридного белка в растворимой фракции в концентрации не менее 2 % от массы влажной биомассы в течение 4 и 20 ч после индукции. При этом до индукции биосинтеза целевого продукта не наблюдалось, что свидетельствует об эффективности системы запуска экспрессии. С течением времени не наблюдается деградации гибридного белка. Было обнаружено, что после индукции штамм-продуцент BL21\pF1220 прекращает рост, что может быть связано с токсичностью продукта для клетки.

Дополнительно были проведены эксперименты по оптимизации условий индукции, которые являются критическим этапом при максимизации выхода [38, 39]. После проведения экспериментов и анализа данных были получены модели для определения оптимальных условий индукции штаммов-продуцентов пептидов. Для удельной продуктивности значения R^2 и Q^2 составили 0,93 и 0,81; 0,98 и 0,94 для штаммов-продуцентов BL21\pF1220, BL21\pF1223 соответственно. Модели являются приемлемыми. Для отклика «концентрация влажной биомассы» значения R^2 и Q^2 составили 0,78 и 0,39; 0,90 и 0,73 для штаммов-продуцентов пептидов 1, 2 соответственно. Данные для BL21\pF1223 показывают, что полученная модель является приемлемой, и ее рекомендуется использовать для дальнейшей работы. Значение Q^2 для BL21\pF1220 ниже порогового значения при приемлемом уровне R^2 . Данная модель не рекомендована для дальнейшего использования.

На основе результатов исследования были предложены квадратичные модели, описывающие влияние изменения факторов на рост клеток и продуктивность (формулы 2–5).

$$P_1 = 1,16 - 0,05 \cdot X_1 + 0,05 \cdot X_2 + 0,07 \cdot X_3 - 0,06 \cdot X_4 + 0,02 \cdot X_5 - 0,15 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,04 \cdot X_1 \cdot X_4 + 0,03 \cdot X_2 \cdot X_4 + 0,03 \cdot X_3 \cdot X_4 - 0,03 \cdot X_3 \cdot X_5, \quad (2)$$

$$P_2 = 1,9,50 + 4,38 \cdot X_1 + 1,37 \cdot X_2 + 9,87 \cdot X_3 - 3,48 \cdot X_4 - 0,92 \cdot X_5 - 4,31 \cdot X_1^2 + 1,56 \cdot X_2 \cdot X_3 + 2,47 \cdot X_1 \cdot X_3 + 1,39 \cdot X_1 \cdot X_4 + 3,35 \cdot X_2 \cdot X_5, \quad (3)$$

$$Y_1 = 65,94 + 13,29 \cdot X_1 + 15,11 \cdot X_2 + 7,50 \cdot X_3 + 1,39 \cdot X_4 + 0,02 \cdot X_5 + 9,34 \cdot X_1 \cdot X_3 - 8,19 \cdot X_4 \cdot X_5, \quad (4)$$

$$Y_2 = 101,727 + 12,61 \cdot X_1 + 14,72 \cdot X_2 + 5,44 \cdot X_3 - 21,55 \cdot X_4 - 4,44 \cdot X_5 - 34,17 \cdot X_4^2 + 15,62 \cdot X_3 \cdot X_4 - 7,125 \cdot X_2 \cdot X_4 + 9,625 \cdot X_2 \cdot X_5, \quad (5)$$

где P_1, P_2 – удельная продуктивность штаммов-продуцентов 1, 2 пептидов; Y_1, Y_2 – концентрации влажной биомассы штаммов-продуцентов 1, 2 пептидов; X_1 –

коэффициент для фактора «время индукции»; X_2 – коэффициент для фактора «оптическая плотность индукции»; X_3 – коэффициент для фактора «температура культивирования»; X_4 – коэффициент для фактора «рН питательной среды»; X_5 – коэффициент для фактора «концентрация ИПТГ».

Влияние исследуемых параметров на продуктивность и рост клеток

Показано, что на продуктивность штаммов-продуцентов оказывают влияние все исследованные факторы, кроме концентрации индуктора. В ранних исследованиях было установлено, что максимальная концентрация ИПТГ увеличивает продуктивность [40]. Однако ряд более поздних исследований показал, что высокая концентрация индуктора может негативно повлиять на продуктивность [41]. В нашем исследовании показано, что взаимодействие факторов «температура», «рН среды» и «концентрация индуктора» отрицательно влияет на продуктивность. Это может быть связано с тем, что при снижении температуры оптимальная точка индукции смещается из-за увеличения метаболической нагрузки, так как скорость роста клеток уменьшается. Данное явление также подтверждает взаимодействие отклика «время индукции» и «оптическая плотность» с «температурой». Показано, что чем ниже температура, тем меньший диапазон концентраций ИПТГ может быть использован. Мы обнаружили, что при 37 °С все исследуемые диапазоны концентраций ИПТГ (0,05–0,1 мМ) приводят к максимальному выходу продукта. При этом было показано, что культивирование при высоких температурах не приводит к агрегации гибридного белка, что противоречит предыдущим исследованиям [42, 43]. Это может быть связано с тем, что SUMO увеличивает растворимость рекомбинантного белка и вклад пептида в агрегацию нивелируется.

Фактор «рН среды» взаимодействовал с такими факторами, как «температура», «концентрация индуктора», «время индукции». Было показано, что чем ниже рН среды, тем ниже удельная скорость роста. При культивировании *E. coli* наиболее часто используемый диапазон рН среды – 6,5–7,5. Наши исследования показали, что наиболее оптимальным для роста и биосинтеза является рН $7,5 \pm 0,5$. Мы предполагаем, что это связано с ослаблением ингибирования роста и биосинтеза, вызванного ацетатом, путем щелочного сдвига. Известно, что ацетат отрицательно влияет на рост и биосинтез рекомбинантных белков *E. coli* [44]. Незначительный щелочной сдвиг может уменьшить ацетатный стресс, клетки способны снизить концентрацию внутриклеточного ацетата и, таким образом, снизить токсичность для клетки [45, 46].

Концентрация биомассы должна достигать определенного значения, чтобы выдерживать метаболическую нагрузку, вызванную высокими концентрациями индуктора. Однако индукция в поздних фазах экспоненциального роста может оказывать нега-

тивное влияние на накопление целевого продукта, поскольку большая часть ресурсов уже ушла на рост. Однако следует отметить, что низкая концентрация ИПТГ может привести к низкой продуктивности из-за неравномерного распределения ИПТГ в популяции клеток [41, 47]. Было показано, что оптимальной является индукция в начале экспоненциальной фазы роста ($2,7 \pm 0,3$ о.е.).

В этом исследовании параметры «концентрация индуктора», «оптическая плотность индукции», «время индукции» варьировались, чтобы определить уровень метаболической нагрузки, которая может быть возложена на клетки. Для факторов «концентрация индуктора» и «оптическая плотность» были показаны влияния, описанные выше. Было показано, что время индукции влияет на удельную продуктивность и рост клеток. Чем длительнее время культивирования, тем выше выход рекомбинантного белка и биомасса. Однако сравнение моделей, полученных на момент 4 и 17 ч после индукции, показало незначительное отличие. Возможно, это связано с тем, что лимитирующим фактором является доступность растворенного кислорода и источника углерода. Было принято решение снять кинетику накопления продукта во время валидации модели в биореакторах.

Стоит отметить, что все наблюдаемые эффекты имеют низкие коэффициенты для штамма-продуцента 1 пептида (менее 0,2). Вероятно, данное явление связано с тем, что исследуемый продукт является токсичным для *E. coli* и после запуска индукции рост клеток останавливается.

На основании анализа проектных полей для штаммов-продуцентов определены следующие условия индукции: рН – $7,5 \pm 0,5$, температура культивирования – 37 °С, оптическая плотность индукции – $2,7 \pm 0,3$ о.е., концентрация ИПТГ – 0,05–0,1 мМ. Концентрация индуктора не влияет на удельную продуктивность во всех исследуемых диапазонах концентраций и оказывает отрицательное влияние на рост клеток, поэтому выбрана низкая концентрация индуктора. Уменьшение концентрации ИПТГ также привлекательно с промышленной точки зрения, поскольку это дорогостоящее соединение [48, 49], а его высокие концентрации могут привести к резкому снижению скорости роста или к экспрессии некоторых протеаз, что снижает выход рекомбинантных белков [49].

Валидация условий культивирования в биореакторе

Концепция Quality by Design (QbD) в разработке лекарственных препаратов была одобрена и описана FDA в 2004 г. В руководствах Международного совета по гармонизации (ICH) Q8 «Фармацевтическая разработка», Q9 «Управление рисками для качества», Q10 «Фармацевтическая система качества» подробно описаны способы достижения качества лекарственного препарата и связь между QbD и DoE.

В настоящее время DoE является лучшей практикой для определения критических параметров процессов и их интенсификации. Одним из ключевых этапов DoE является валидация полученных моделей и оптимальных точек процесса. Валидация моделей считается успешной, когда предсказанные значения отклика соответствуют экспериментальным данным при предложенных оптимальных значениях факторов [33, 50, 51].

Культивирование *E. coli* в колбах используется при первоначальном скрининге условий культивирования и оптимизации среды. Преимущества данного подхода заключаются в возможности параллельного культивирования, высокой производительности и простоте обращения [52]. Однако рост в колбах связан с ограничениями, такими как истощение питательных веществ, низкая аэрация и отсутствие контроля pH, что ограничивает выход белка и биомассы [53]. Таким образом, важной задачей при валидации модели является определение начала экспоненциальной фазы роста в биореакторе и возможность масштабирования условий по отклику «удельная продуктивность». С учетом кривой роста *E. coli* в биореакторе были предложены три оптические плотности индукции, которые могут соответствовать экспоненциальной фазе роста. Показано, что оптимальной является точка индукции 30 о.е. (рисунок 2), соответствующая переходной фазе роста культуры, аналогичной точке индукции в колбах.

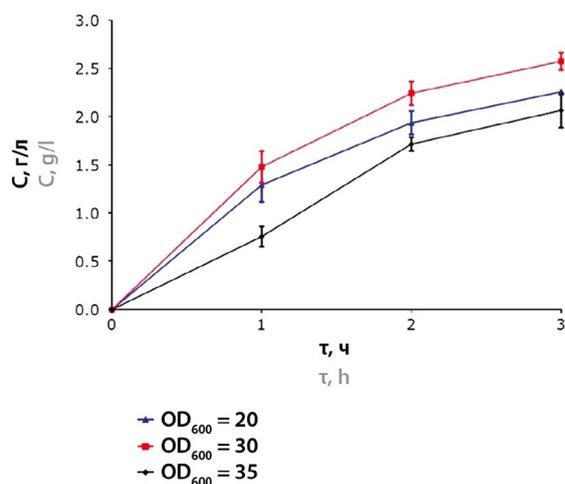


Рисунок 2. Влияние оптической плотности индукции на удельную продуктивность штамма-продуцента BL21\pF1220. Данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение (SD)», $n = 3$

Figure 2. The influence of induction optical density on the specific productivity of the BL21\pF1220 producer strain. The data are presented as the mean ± SD, $n = 3$

Экспериментально полученная продуктивность штаммов-продуцентов входит в диапазон предсказанной моделями продуктивности (таблица 1). Следова-

тельно, валидация прошла успешно. Таким образом, отклик «удельная продуктивность» воспроизводится при проведении культивирования как в колбах, так и в биореакторах при прочих равных условиях. Это позволяет использовать ее в качестве критерия успешности валидации и масштабирования от колб до биореактора. Данный факт открывает возможности не только для оптимизации условий культивирования и состава сред, но и для оптимизации условий индукции в колбах.

Таблица 1. Предсказанная и экспериментальная удельная продуктивность

Table 1. Experimental and prediction specific productivity

Продукт Product	Предсказанная продуктивность, мг/г Predicted productivity, mg/g	Экспериментальная продуктивность, мг/г Experimental productivity, mg/g
Пептид 1 Peptide 1	25–30	28,0 ± 3,0
Пептид 2 Peptide 2	25–30	25,0 ± 3,0

В процессе валидации оптимальных условий культивирования штаммов-продуцентов оценивали кинетику роста и накопления целевого продукта в процессе индукции в стандартных и оптимизированных условиях (рисунки 3 и 4). Исследованные штаммы-продуценты достигали точки индукции на третий час культивирования (рисунок 3). После внесения индуктора штамм-продуцент BL21\pF1220 демонстрирует замедление скорости роста и выход в стационарную фазу роста на 6-й час культивирования. Максимальная продуктивность 2,57 ± 0,09 г/л у штамма-продуцента BL21\pF1220 наблюдается на 3-й час индукции, что соответствует 6-му часу культивирования (рисунок 4, А). После индукции у штамма-продуцента BL21\pF1223 продолжается экспоненциальная фаза роста (рисунок 3, Б). Культура выходит в стационарную фазу роста на 7-й час культивирования. Объемная продуктивность BL21\pF1223 достигает максимума 4,27 ± 0,36 г/л на 4-й час индукции, что соответствует 7-му часу культивирования (рисунок 4, Б).

Выделение и очистка пептидов

После культивирования биомассу центрифугировали и дезинтегрировали. Исследовали надосадочную жидкость и осадок, полученные после дезинтеграции (рисунок 5). Показано, что 100 % экспрессированного белка локализовано в растворимой фракции. Далее надосадочную жидкость подвергли метал-хелатной хроматографии. Гибридный белок с N-конца содержит 6-His, что позволяет эффективно очистить его от белков штамма-хозяина. Фракции элюата обогащены гибридным белком пептида, что подтверждает возможность использования металл-хелатной хроматографии на сорбенте Ni SepLife® 6FF для выделения целевого продукта из клеточного ли-

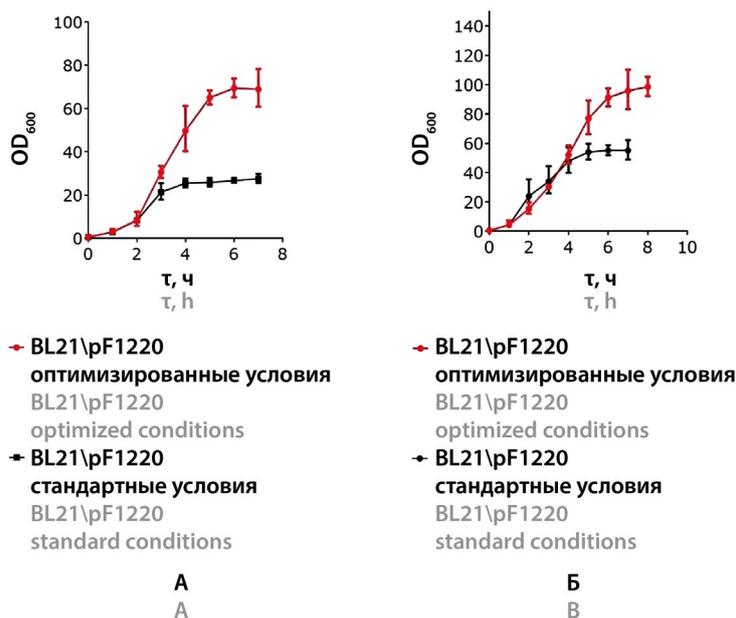


Рисунок 3. Кинетика роста штаммов-продуцентов BL21\pF1220 (А) и BL21\pF1223 (Б) в стандартных и оптимизированных условиях. Данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение (SD)», $n = 3$

Figure 3. The growth kinetics of BL21\pF1220 (A) and BL21\pF1223 (B) producer strains under standard and optimized conditions. The data are presented as the mean ± SD, $n = 3$

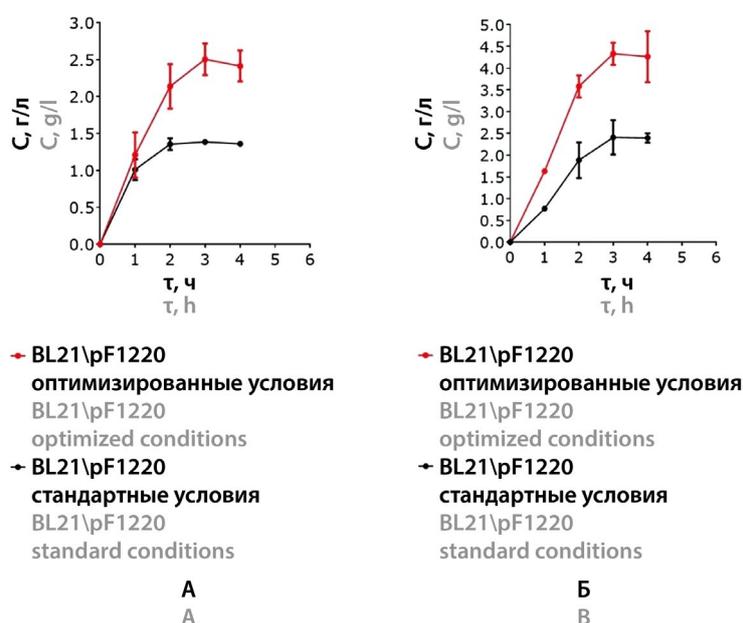


Рисунок 4. Объемная продуктивность штаммов-продуцентов BL21\pF1220 (А) и BL21\pF1223 (Б) в стандартных и оптимизированных условиях. Данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение (SD)», $n = 3$

Figure 4. Volumetric productivity of producer strains BL21\pF1220 (A) and BL21\pF1223 (B) under standard and optimized conditions. The data are presented as the mean ± SD, $n = 3$

зата. Во фракции проскока отсутствует целевой продукт, следовательно, предложенные условия обеспечивают эффективное связывание белка с сорбентом (рисунок 5).

Далее проводили ферментативный гидролиз гибридных белков ULP-протеазой. Через 1 ч после добавления ULP-протеазы наблюдается исчезновение бендов, соответствующих гибриднему белку, и появле-

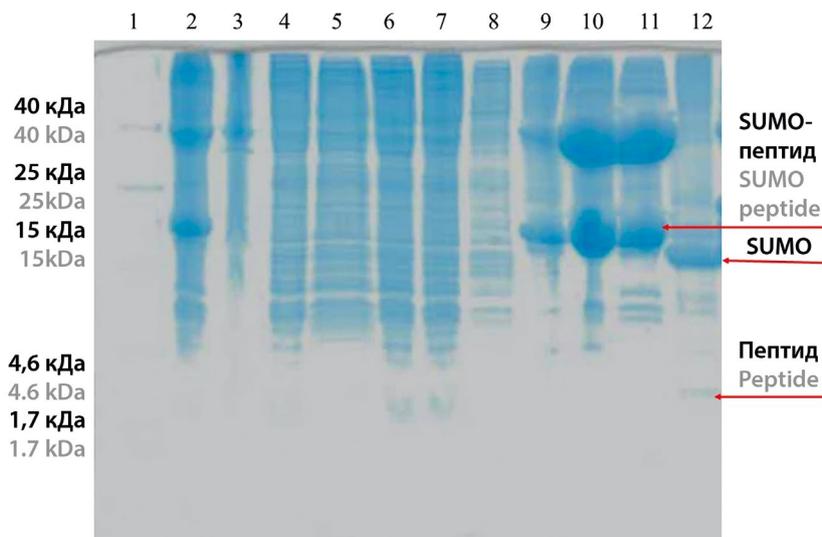


Рисунок 5. Электрофоретическое разделение в 15%-м трицин-полиакриламидном геле белковых фракций:

1 – маркер молекулярных масс; 2 – надосадочная жидкость после дезинтеграции; 3 – осадок после дезинтеграции; 4–8 – фракции проскока после металл-хелатной хроматографии; 9–11 – фракции элюата металл-хелатной хроматографии; 12 – элюат после обработки ULP-протеазой. Красной стрелкой выделен целевой пептид, появляющийся после гидролиза

Figure 5. Electrophoretic separation of protein fractions in 15 % tricine-polyacrylamide gel:

1 – molecular weight marker; 2 – supernatant liquid after biomass disintegration; 3 – precipitate after biomass disintegration; 4–8 – slip fractions after metal chelate chromatography; 9–11 – metal chelate chromatography eluate fractions; 12 – eluate after treatment with ULP protease. The red arrow highlights the target peptide that appears after hydrolysis

ние бендов, соответствующих по молекулярной массе пептиду и SUMO (см. рисунок 5).

По сравнению с очисткой тандемных повторов, предложенной в других исследованиях для получения пептидов [54, 55], данный подход обеспечивает простое, быстрое и масштабируемое разделение пептидов.

Таким образом, сочетание SUMO с пептидом не только увеличивает растворимость белка, но и обеспечивает специфическое расщепление белка слияния.

Подтверждение подлинности целевых пептидов

Показано соответствие экспериментальной молекулярной массы, полученной после гидролиза, теоретической (таблица 2).

Дополнительно был проанализирован диапазон молекулярных масс, соответствующих молекулярным массам гибридного белка, пептида и SUMO, в образцах после гидролиза. Молекулярные массы, соответствующие массам гибридных белков, не были обнаружены после гидролиза и очистки на металл-хелатных хроматограммах (рисунок 6).

Подлинность пептидов была подтверждена косвенным неконкурентным методом ИФА, использованным в качестве ортогонального метода.

Таблица 2. Результаты подтверждения подлинности пептидов

Table 2. Results of peptide identification

Продукт Product	Теоретическая ММ, Да Theoretical MM, Da	Экспериментальная ММ, Да Experimental MM, Da
Пептид 1 Peptide 1	2959	2960 ± 1
Пептид 2 Peptide 2	2687	2687 ± 1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе предложена альтернативная и эффективная стратегия получения терапевтических пептидов с молекулярной массой менее 5 кДа. В результате были получены высокоэффективные штаммы-продуценты гибридных пептидов BL21\pF1220, BL21\pF1223. Проведена оптимизация условий индукции, получены и валидированы модели, описывающие условия индукции. Предложены оптимальные условия индукции: pH – 7,5 ± 0,5, температура культивирования – 37 °C, оптическая плотность индукции – 2,7 ± 0,3, концентрация ИПТГ – 0,05 мМ. Про-

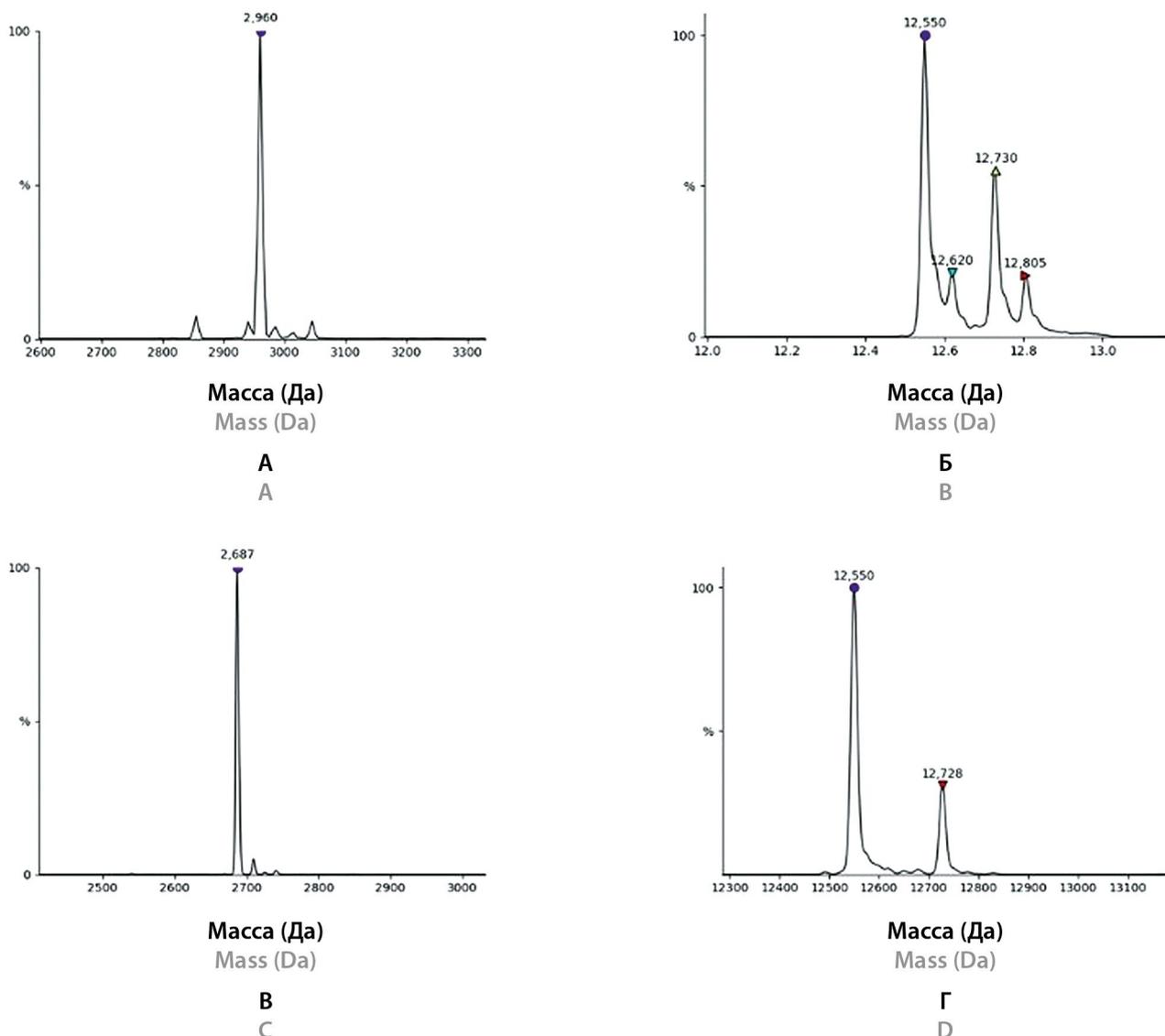


Рисунок 6. Спектры образцов после гидролиза ULP-протеазой.

А, Б – для пептида, полученного из штамма-продуцента BL21\rpF1220; В, Г – для пептида, полученного из штамма-продуцента BL21\rpF1223

Figure 6. Spectra of samples after ULP hydrolysis.

А, В – peptide expressed by BL21\rpF1220; D, C – peptide expressed by BL21\rpF1223

дуктивность штаммов составила $2,57 \pm 0,09$ г/л, $4,27 \pm 0,36$ г/л для BL21\rpF1220, BL21\rpF1223 соответственно. Эффективность технологии, разработанной в данном исследовании, выше, чем сообщалось в других исследованиях [17–21]. Проведена предварительная очистка пептидов и подтверждена их подлинность после гидролиза с помощью ВЭЖХ-МС и ИФА.

Практическая значимость исследования заключается в том, что данный подход может быть использован для получения пептидов с различными физико-химическими свойствами в промышленных масштабах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Fosgerau K., Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*. 2015;20(1):122–128. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.10.003.
2. Gerstein H. C., Ruttly. C. J. Insulin Therapy: The Discovery That Shaped a Century. *Canadian Journal of Diabetes*. 2021;45(8):798–803. DOI: 10.1016/j.jcjd.2021.03.002.
3. Lau J.L., Dunn M.K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(10):2700–2707. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.

4. Chandrudu S., Simerska P., Toth I. Chemical methods for peptide and protein production. *Molecules*. 2013;18(4):4373–4388. DOI: 10.3390/molecules18044373.
5. Mason J.M. Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention. *Future Medicinal Chemistry*. 2010;2(12):1813–1822. DOI: 10.4155/fmc.10.259.
6. Guzmán F., Barberis S., Illanes A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2007;10(2):279–314. DOI: 10.2225/vol10-issue2-fulltext-13.
7. Mueller L.K., Baumruck A.C., Zhdanova H., Tietze A.A. Challenges and perspectives in chemical synthesis of highly hydrophobic peptides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:162. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00162.
8. Ratelade J., Miot M.-C., Johnson E., Betton J.-M., Mazodier P., Benaroudj N. Production of recombinant proteins in the absence of the DnaK chaperone. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(11). DOI: 10.1128/AEM.00255-09.
9. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
10. Fathi-Roudsari M., Akhavian-Tehrani A., Maghsoudi N. Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2016;8(1):16–22.
11. Studier F.W., Daegelen P., Lenski R.E., Maslov S., Kim J.F. Understanding the differences between genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3) and comparison of the *E. coli* B and K-12 genomes. *Journal of Molecular Biology*. 2009;394(4):653–680. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.09.021.
12. Rodríguez V., Asenjo J.A., Andrews B.A. Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides. *Microbial Cell Factories*. 2014;13:65. DOI: 10.1186/1475-2859-13-65.
13. Lv G.S., Huo G.C., Fu X.Y. Expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*. 2003;86(6):1927–1931. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73779-5.
14. Li Y., Li X., Wang G. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Expression and Purification*. 2006;47(2):498–505. DOI: 10.1016/j.pep.2005.10.022.
15. Rao X., Hu J., Li S., Jin X., Zhang C., Cong Y., Hu X., Tan Y., Huang J., Chen Z., Zhu J., Hu F. Design and expression of peptide antibiotic hPAB- β as tandem multimers in *Escherichia coli*. *Peptides*. 2005;26(5):721–729. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.12.016.
16. Hay R.T. SUMO: a history of modification. *Molecular Cell*. 2005;18(1):1–12. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.03.012.
17. Mirzadeh K., Shilling P.J., Elfageih R., Cumming A.J., Cui H.L., Rennig M., Nørholm M.H.H., Daley D.O. Increased production of periplasmic proteins in *Escherichia coli* by directed evolution of the translation initiation region. *Microbial Cell Factories*. 2020;19(1):85. DOI: 10.1186/s12934-020-01339-8.
18. Nguyen B.-N., Tieves F., Rohr T., Wobst H., Schöpf F.S., Montoya Solano J.D., Schneider J., Stock J., Uhde A., Kalthoff T., Jaeger K.E., Schmitt L., Schwarz C. Numaswitch: an efficient high-titer expression platform to produce peptides and small proteins. *AMB Express*. 2021;11(1):48. DOI: 10.1186/s13568-021-01204-w.
19. Wu C.-L., Chih Y.-H., Hsieh H.-Y., Peng K.-L., Lee Y.-Z., Yip B.-S., Sue S.-C., Cheng J.-W. High Level Expression and Purification of Cecropin-like Antimicrobial Peptides in *Escherichia coli*. *Biomedicines*. 2022;10(6):1351. DOI: 10.3390/biomedicines10061351.
20. Zhou L., Lian K., Wang M., Jing X., Zhang Y., Cao J. The antimicrobial effect of a novel peptide LL-1 on *Escherichia coli* by increasing membrane permeability. *BMC Microbiology*. 2022;22(1):220. DOI: 10.1186/s12866-022-02621-y.
21. Ojima-Kato T., Nishikawa Y., Furukawa Y., Kojima T., Nakano H. Nascent MSKIK peptide cancels ribosomal stalling by arrest peptides in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 2023;299(5):104676. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.104676.
22. Shafiee F., Rabbani M., Jahanian-Najafabadi A. Optimization of the Expression of DT386-BR2 Fusion Protein in *Escherichia coli* using Response Surface Methodology. *Advanced Biomedical Research*. 2017;6(1):22. DOI: 10.4103/2277-9175.201334.
23. Shahzadi I., Al-Ghamdi M.A., Nadeem M.S., Sajjad M., Ali A., Khan J.A., Kazmi I. Scale-up fermentation of *Escherichia coli* for the production of recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Scientific Reports*. 2021;11(1):7145. DOI: 10.1038/s41598-021-86000-z.
24. Singh S.K., Singh S.K., Tripathi V.R., Khare S.K., Garg S.K. Comparative one-factor-at-a-time, response surface (statistical) and bench-scale bioreactor level optimization of thermoalkaline protease production from a psychrotrophic *Pseudomonas putida* SKG-1 isolate. *Microbial Cell Factories*. 2011;10:114. DOI: 10.1186/1475-2859-10-114.
25. Uhoraningoga A., Kinsella G.K., Henahan G.T., Ryan B.J. The Goldilocks Approach: A Review of Employing Design of Experiments in Prokaryotic Recombinant Protein Production. *Bioengineering*. 2018;5(4):89. DOI: 10.3390/bioengineering5040089.
26. Larentis A.L., de Cássia Cunha Sampaio H., Martins O.B., Rodrigues M.L., Moitinho Alves T.L. Influence of induction conditions on the expression of carbazole dioxygenase components (CarAa, CarAc, and CarAd) from *Pseudomonas stutzeri* in recombinant *Escherichia coli* using experimental design. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011;38(8):1045–1054. DOI: 10.1007/s10295-010-0879-2.
27. Lessa-Aquino C., Borges Rodrigues C., Pablo J., Sasaki R., Jasinskas A., Liang L., Wunder E.A., Ribeiro G.S., Vigil A., Galler R., Molina D., Liang X., Reis M.G., Ko A.I., Medeiros M.A., Felgner P.L. Identification of seroreactive proteins of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni using a high-density protein microarray approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(10):e2499. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002499.
28. Lin Y.-P., McDonough S.P., Sharma Y., Chang Y.-F. *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen α C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. *Molecular Microbiology*. 2011;79(4):1063–1076. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07510.x.
29. Latypov V.F., Kornakov I.A., Robustova S.E., Khomutova O.S., Rodionov P.P. Recombinant plasmid DNA pF646, encoding a hybrid polypeptide containing proinsulin

- asprate, and a strain of *Escherichia coli* bacteria – a producer of the hybrid polypeptide containing proinsulin aspart. Patent RUS № RU2729353. 2019. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2729353C1/ru>. Accessed: 16.05.2024. (In Russ.)
30. Casali N., Preston A. *E. coli* plasmid vectors: methods and applications. Totowa: Humana Press; 2008. 316 p.
 31. Ronald M. A. Handbook of Microbiological Media. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 1997.
 32. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*. 2006;1(1):16–22. DOI: 10.1038/nprot.2006.4.
 33. Umetrics M. User guide to MODDE. 2014.
 34. Mandenius C.-F., Brundin A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress*. 2008;24(6):1191–1203. DOI: 10.1002/btpr.67.
 35. Beal J., Farny N. G., Haddock-Angelli T., Selvarajah V., Baldwin G. S., Buckley-Taylor R., Gershater M., Kiga D., Marken J., Sanchania V., Sison A., Workman C. T. Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications Biology*. 2020;3(1):512. DOI: 10.1038/s42003-020-01127-5.
 36. Dolnik V. Capillary electrophoresis of proteins 2005–2007. *Electrophoresis*. 2008;29(1):143–156. DOI: 10.1002/elps.200700584.
 37. Marty M. T., Baldwin A. J., Marklund E. G., Hochberg G. K. A., Benesch J. L., Robinson C. V. Bayesian deconvolution of mass and ion mobility spectra: from binary interactions to polydisperse ensembles. *Analytical Chemistry*. 2015;87(8):4370–4376. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00140.
 38. Aucoin M. G., McMurray-Beaulieu V., Poulin F., Boivin E. B., Chen J., Ardelean F. M., Cloutier M., Choi Y. J., Miguez C. B., Jolicœur M. Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. *Microbial Cell Factories*. 2006;5:27. DOI: 10.1186/1475-2859-5-27.
 39. Kumar J., Bhat S. U., Rathore A. S. Slow post-induction specific growth rate enhances recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Pramlintide multimer and ranibizumab production as case studies. *Process Biochemistry*. 2022;114:21–27. DOI: 10.1016/j.procbio.2022.01.009.
 40. Donovan R. S., Robinson C. W., Glick B. R. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *Journal of Industrial Microbiology*. 1996;16(3):145–154. DOI: 10.1007/BF01569997.
 41. Mühlmann M., Forsten E., Noack S., Büchs J. Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. *Microbial Cell Factories*. 2017;16(1):220. DOI: 10.1186/s12934-017-0832-4.
 42. Song J. M., An Y. J., Kang M. H., Lee Y.-H., Cha S.-S. Cultivation at 6–10 °C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2012;82(2):297–301. DOI: 10.1016/j.pep.2012.01.020.
 43. Soleymani B., Mostafaie A. Analysis of Methods to Improve the Solubility of Recombinant Bovine Sex Determining Region Y Protein. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*. 2019;8(3):227–235.
 44. De Mey M., De Maeseneire S., Soetaert W., Vandamme E. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2007;34(11):689–700. DOI: 10.1007/s10295-007-0244-2.
 45. Warnecke T., Gill R. T. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*. 2005;4:25. DOI: 10.1186/1475-2859-4-25.
 46. Wang H., Wang F., Wang W., Yao X., Wei D., Cheng H., Deng Z. Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e112777. DOI: 10.1371/journal.pone.0112777.
 47. Einsfeldt K., Severo Junior J. B., Corrêa Argondizzo A. P., Medeiros M. A., Moitinho Alves T. L., Almeida R. V., Larentis A. L. 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):7136–7143. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.073.
 48. Larentis A. L., Monteiro Quintal Nicolau J. F., dos Santos Esteves G., Vareschini D. T., de Almeida F. V. R., Galvão dos Reis M., Galler R., Medeiros M. A. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Research Notes*. 2014;7:671. DOI: 10.1186/1756-0500-7-671.
 49. Urban A., Ansmant I., Motorin Y. Optimisation of expression and purification of the recombinant Yol066 (Rib2) protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chromatography B*. 2003;786(1–2):187–195. DOI: 10.1016/s1570-0232(02)00742-0.
 50. Martins Fukuda I., Fidelis Pinto C. F., dos Santos Moreira C., Morais Saviano A., Rebello Lourenço F. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54: e01006. DOI: 10.1590/s2175-97902018000001006.
 51. Kiss B., Gottschalk U., Pohlscheidt M., editors. *New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins*. New York: Springer; 2018.
 52. Ladner T., Flitsch D., Lukacs M., Sieben M., Büchs J. Combined dissolved oxygen tension and online viscosity measurements in shake flask cultivations via infrared fluorescent oxygen-sensitive nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019;116(12):3215–3227. DOI: 10.1002/bit.27145.
 53. Rosano G. L., Ceccarelli E. A. Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:341. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00341.
 54. Jiang D.-L., Yao C.-L., Hu N.-J., Liu Y.-C. Construction of a Tandem Repeat Peptide Sequence with Pepsin Cutting Sites to Produce Recombinant α -Melanocyte-Stimulating Hormone. *Molecules*. 2021;26(20):6207. DOI: 10.3390/molecules26206207.
 55. Zhao Z.-H., Zhang C.-X., Li J., Zhang A.-Z., Zhao F.-F., Yu G.-P., Jiang N. Effect of tandem repeats of antimicrobial peptide CC34 on production of target proteins and activity of *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 2023;212:106342. DOI: 10.1016/j.pep.2023.106342.