

Industrializzazione e regolamentazione



di prodotti biotecnologici

❖ **Obiettivi formativi**

Prospettiva industriale relativa ai requisiti di sviluppo e produzione di prodotti biotecnologici per la cura e la prevenzione di malattie, sia dal punto di vista tecnico che normativo.

❖ **Docente**

PhD Gabriele Meli

❖ **FOCUS**

Industrializzazione di processo

❖ **Orario lezioni**

Martedì e Mercoledì 17-19

❖ **Modalità di esame**

Teams

❖ **Contatto preferenziale**

gabriele.meli78@gmail.com

Questo corso contiene informazioni a scopo didattico, non correlate in alcun modo a dati rilevanti per Bracco Imaging S.p.A. e fa riferimento alla formazione personale ed all'esperienza professionale secondo il mio punto di vista.

GABRIELE MELI

Design of Experiments (DoE)

Concetti chiave

- Descrivere una serie di esperimenti che vengono condotti allo scopo di mettere a punto un modello matematico/ statistico (ad es. di regressione);
- Ottimizzazione di prodotti o di processi: si applica per determinare in maniera efficiente l'insieme di condizioni necessarie per ottenere un prodotto o un processo con caratteristiche desiderabili, spesso ottimali.
- Dal momento che la modellizzazione è uno degli strumenti principali per la fase di ottimizzazione, può essere applicato anche alla messa a punto di modelli ottimali.
- Si vuole determinare un insieme di condizioni ottimali, ovvero i valori numerici di una serie di fattori definiti anche parametri operativi.

Design of Experiments (DoE)

Concetti chiave

- I fattori sono variabili che vengono cambiate in maniera controllata per studiare il loro effetto sul processo o sul prodotto e che hanno (possono avere) influenza sulle caratteristiche studiate;
- Le caratteristiche del prodotto o del processo che si vuole ottimizzare vengono chiamate risposte e possono essere definite come variabili dipendenti che descrivono la performance;
- Tipicamente, il DoE offre un approccio multivariato;
- Esistono 2 tipi di variabili: indipendenti (fattori, X_i) e dipendenti (risposte, Y_i);
- Il modello che collega le risposte all'effetto dei fattori è chiamato funzione di risposta o, sulla base del suo carattere multivariato, superficie di risposta.

Design of Experiments (DoE)

Concetti chiave

- Questi modelli sono ottenuti a partire dagli esperimenti e dai loro risultati;
- Il termine “disegno” indica che questi esperimenti sono scelti ed eseguiti in maniera accuratamente pianificata e ponderata;
- Il DoE è utilizzato per ottenere un prodotto o un processo con caratteristiche desiderabili e questo significa che si vuole:
 - Comprendere l'effetto dei fattori e/o;
 - Modellare la relazione tra y e x effettuando il minimo numero di esperimenti possibile.

Design of Experiments (DoE)



Organizzazione del DoE

- Si inizia determinando quali possibili fattori possono influenzare la risposta e fino a che punto.
- Il passo successivo è spesso quello di ottenere un modello che descriva in maniera quantitativa l'effetto dei fattori sulla risposta.
- Infine, sulla base del modello si cerca di trovare le condizioni ottimali, ovvero i valori dei fattori che risultano nelle migliori caratteristiche del prodotto, processo o procedura studiati.
- I valori ottimali possono essere i più alti o i più bassi possibile, ma ci possono essere casi in cui uno sia interessato a determinare una regione in cui i risultati siano sufficientemente buoni.

Design of Experiments (DoE)

Organizzazione del DoE

- Si inizia determinando quali possibili fattori possono influenzare la risposta e fino a che punto.
- Il passo successivo è spesso quello di ottenere un modello che descriva in maniera quantitativa l'effetto dei fattori sulla risposta.
- Infine, sulla base del modello si cerca di trovare le condizioni ottimali, ovvero i valori dei fattori che risultano nelle migliori caratteristiche del prodotto, processo o procedura studiati.
- I valori ottimali possono essere i più alti o i più bassi possibile, ma ci possono essere casi in cui uno sia interessato a determinare una regione in cui i risultati siano sufficientemente buoni.

Design of Experiments (DoE)

Organizzazione del DoE

- Nel DoE i fattori possono essere qualitativi e quantitativi.
 - Qualitativi: tipo di catalizzatore; solvente; operatore; packaging;
 - Quantitativi: pH, temperatura, umidità, pressione, agitazione, concentrazione;
- I differenti valori a cui vengono controllati i fattori sono chiamati livelli.
- La selezione dei fattori è in genere il primo step nella definizione di un disegno sperimentale: se non si conosce il processo non si sa quali fattori abbiano un effetto sulla risposta;
- In questo caso, si parte annotando tutti i possibili fattori che potrebbero avere un qualche effetto sulla risposta e si fa uno screening
- Una volta scelti i fattori è necessario fissare i limiti del dominio sperimentale, ovvero i livelli estremi a cui i fattori verranno studiati.

Design of Experiments (DoE)

Organizzazione del DoE

- Molto spesso si sceglie un dominio simmetrico, anche se in alcuni casi questo può non essere possibile o addirittura desiderabile.
- Un passaggio fondamentale nell'organizzazione del DoE è la scelta delle risposte da studiare;
- Normalmente si vuole studiare più di una risposta contemporaneamente e può succedere che le condizioni ottimali per una siano in conflitto con quelle per le altre ed in questo caso è necessario mediare.

Design of Experiments (DoE)

Organizzazione del DoE

- Nella sua accezione più classica, ottimizzazione significa trovare il valore per ciascun fattore studiato che corrisponda alla risposta più alta (es. massima resa di un prodotto desiderato) o più bassa (minima resa di una impurezza).
- Non sempre, tuttavia, questa è la scelta migliore: può capitare che il massimo della superficie di risposta si trovi in una zona particolarmente ripida, per cui piccole variazioni dei fattori possono provocare brusche diminuzioni della y ; in questo caso, può essere opportuno scegliere un valore più basso di risposta, ma in una regione in cui la superficie sia più piatta (maggiore robustezza).
- Esistono disegni che ottimizzano allo stesso tempo la risposta e la robustezza (Taguchi).

Design of Experiments (DoE)

Organizzazione del DoE

Ci sono due tipi di strategie multivariate per l'ottimizzazione:

1. Sequenziale
 2. Simultanee
- Le strategie **simultanee** consistono nell'effettuare un numero relativamente alto di esperimenti secondo uno schema prestabilito (disegni fattoriali). In queste strategie, i dati sperimentali sono utilizzati per mettere a punto dei modelli e, a loro volta, questi modelli per stimare le condizioni sperimentali ottimali (corrispondenti alla massima o minima risposta).
 - Una strategia **sequenziale** consiste nel condurre pochi esperimenti alla volta e utilizzare i risultati di questi esperimenti per decidere quali esperimenti fare in seguito. Il più famoso è il metodo Simplex in cui si parte da 3 esperimenti organizzati a triangolo e di volta in volta ci si muove in direzione opposta all'esperimento che ha dato i risultati peggiori.

Design of Experiments (DoE)

Organizzazione del DoE

- In genere, i modelli che si utilizzano sono di secondo ordine e contengono termini quadratici e interazioni binarie;
- In principio si potrebbero utilizzare anche polinomi di ordine superiore, ma nella pratica questo è raramente necessario per descrivere un prodotto o un processo;

- Un esempio di modelli nel caso di due variabili potrebbe essere:

$$y = b_0 + b_1 x + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2$$

- Un termine noto b_0
- Termini di primo e secondo ordine per x_1 e x_2
- Un termine di interazione $x_1 x_2$

Spesso si lavora con fattori codificati, ovvero scalati affinché la loro variabilità sia compresa, ad esempio, tra -1 e $+1$; in questo caso, lo zero coincide con il valore medio dell'intervallo; b_0 quindi rappresenta il valore della risposta in corrispondenza del centro del campo (0).

Design of Experiments (DoE)

Modelli di regressione

L'utilizzo di metodi di regressione per il calcolo dei coefficienti permette di:

- Verificare se tutti i termini del modello sono necessari;
- Validare il modello;
- Stimare il valore dei coefficienti del modello in maniera più precisa possibile;
- Cercare di ottenere il più piccolo errore di previsione possibile attorno al valore ottimale;

In genere si usa la regressione lineare multipla (MLR) ma si può usare anche la regressione PLS che consiste in una nuova tecnica che generalizza e combina alcune caratteristiche della regressione multipla e dell'analisi delle componenti principali (PCA).

Design of Experiments (DoE)

Disegni simultanei (fattoriali)

Si possono distinguere diverse classi di disegni sperimentali

1. **Disegni in cui l'enfasi viene posta sulla possibilità di determinare quali fattori influenzino la risposta e di stimare l'entità di questa influenza;**
2. Disegni in cui l'enfasi si pone sulla fase di modellamento;
3. Disegni di miscele;
4. Disegni in cui non sia possibile controllare esattamente i livelli dei fattori in studio. In questo caso, si cercherà di selezionare il migliore sottoset di esperimenti tra quelli possibili, attraverso un disegno D-ottimale.

Design of Experiments (DoE)

Disegni simultanei (fattoriali)

- Il DoE utilizzato principalmente a questo scopo (caso 1) è il disegno fattoriale completo a due livelli;
- In questo tipo di disegni, ogni fattore viene controllato su due livelli e gli esperimenti sono condotti sfruttando tutte le possibili combinazioni di questi due livelli
- Questi DoE permettono di valutare l'effetto dei fattori e delle interazioni;
- Il è un modello di primo ordine che includa le interazioni binarie:
$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2$$
- I due livelli rappresentano i confini del dominio sperimentale.

Design of Experiments (DoE)

Disegni Fattoriali completi e frazionari

- Il numero degli esperimenti sarà legato a tutte le combinazioni possibili dei fattori presi in considerazione;
- Quindi considerando 2 livelli (+ e -) tale numero sarà uguale a 2^n ($n = \text{n}^\circ$ fattori);
Fattori: 1) temperatura 2) concentrazione 3) catalizzatore
 $2^3 = 8$ esperimenti da condurre
- Quando il numero dei fattori aumenta, aumenta allo stesso tempo il numero di esperimenti da fare: $2^{10} = 1024$ esperimenti per 10 fattori;
- In questi casi, si svolge solo una parte degli esperimenti e il disegno che si ricava si chiama fattoriale frazionato;
- Il fatto di eseguire solo una parte degli esperimenti fa sì che si perdano informazioni su alcune o tutte le interazioni: questo accade quando lo scopo principale è identificare quali fattori abbiano effetto sulla risposta.

Design of Experiments (DoE)

Concetti chiave

- I fattori sono variabili che vengono cambiate in maniera controllata per studiare il loro effetto sul processo o sul prodotto e che hanno (possono avere) influenza sulle caratteristiche studiate;
- La selezione dei fattori è in genere il primo step nella definizione di un disegno sperimentale: se non si conosce il processo non si sa quali fattori abbiano un effetto sulla risposta;
- Nel DoE i fattori possono essere qualitativi e quantitativi.
 - Qualitativi: tipo di catalizzatore; solvente; operatore; packaging;
 - Quantitativi: pH, temperatura, umidità, pressione, agitazione, concentrazione;
- I differenti valori a cui vengono controllati i fattori sono chiamati livelli.

Design of Experiments (DoE)

Organizzazione del DoE

- Una volta scelti i fattori è necessario fissare i limiti del dominio sperimentale, ovvero i livelli estremi a cui i fattori verranno studiati;
- Molto spesso si sceglie un dominio simmetrico;
- Normalmente si vuole studiare più di una risposta contemporaneamente e può succedere che le condizioni ottimali per una siano in conflitto con quelle per le altre ed in questo caso è necessario mediare.

Design of Experiments (DoE)

Organizzazione del DoE

- La selezione dei fattori è in genere il primo step nella definizione di un disegno sperimentale;
- In questo caso, si parte annotando tutti i possibili fattori che potrebbero avere un qualche effetto sulla risposta e si fa uno screening;
- Per far ciò, si utilizza la massima frazione possibile di un disegno fattoriale (disegno saturato) o i corrispondenti disegni di Plackett-Burman che permettono di studiare sino a 48 fattori;
- Questi DoE sono utilizzati anche per determinare l'effetto collettivo di un insieme di fattori sulla varianza di una procedura, senza analizzare in dettaglio i contributi individuali, ad esempio per la verifica della robustezza di un metodo.

Design of Experiments (DoE)

Organizzazione del DoE

- I disegni completi a due livelli sono utilizzati per determinare se alcuni fattori e/o le interazioni tra due o più fattori abbiano effetto sulla risposta, e per stimare l'entità di questo effetto
- Si richiede che gli esperimenti vengano condotti a tutte le possibili combinazioni dei due livelli dei k fattori studiati; il numero di questi esperimenti è 2^k ;
- I livelli possono essere rappresentati in diverse maniere ma la modalità più utilizzata è quella di codificarli come -1 (livello più basso) ed 1 (livello più alto), o semplicemente come $-$ e $+$;
- La stessa notazione si può applicare ai fattori qualitativi, solo che in questo caso -1 non è più piccolo di $+1$ ma solo differente.

Design of Experiments (DoE)

Esempio 1: cottura di una torta

Fattori:

- X1= Temp; Livelli= 325 °C (-) 375 °C (+)
- X2= Time; Livelli= 30 min (-) 50 min (+)

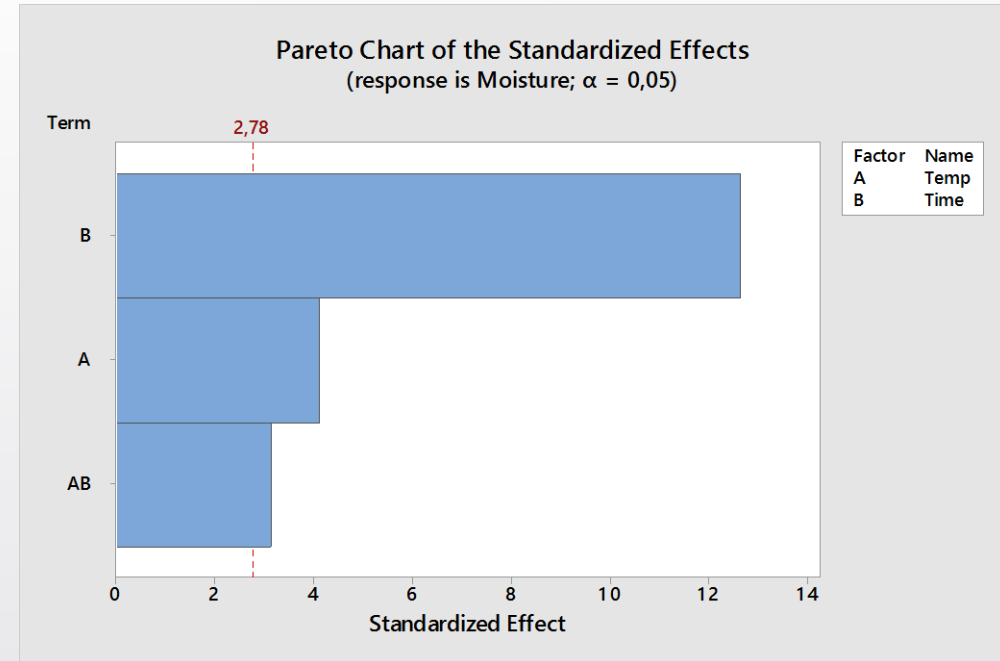
Risposta

- Y1= Moisture

Design Summary

Factors: 2 Base Design: 2, 4
Runs: 8 Replicates: 2
Blocks: 1 Center pts (total): 0

| StdOrder | RunOrder | CenterPt | Blocks | Temp | Time | Moisture |
|----------|----------|----------|--------|------|------|----------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 325 | 30 | 34,8 |
| 2 | 2 | 1 | 1 | 375 | 30 | 28,7 |
| 6 | 3 | 1 | 1 | 375 | 30 | 27,5 |
| 5 | 4 | 1 | 1 | 325 | 30 | 39,2 |
| 8 | 5 | 1 | 1 | 375 | 50 | 16,6 |
| 7 | 6 | 1 | 1 | 325 | 50 | 18,5 |
| 3 | 7 | 1 | 1 | 325 | 50 | 16,7 |
| 4 | 8 | 1 | 1 | 375 | 50 | 16,2 |



- Tutti i fattori hanno impatto sulla risposta;
- L'interazione ha impatto sulla risposta.

Design of Experiments (DoE)

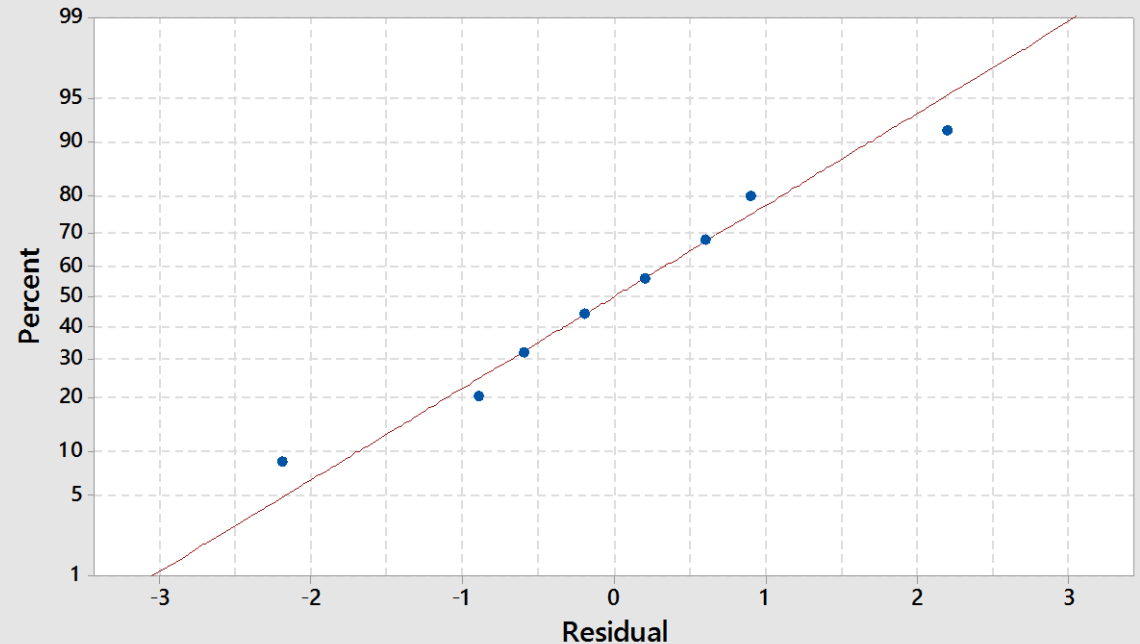
Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|--------------------|----|--------|---------|---------|---------|
| Model | 3 | 564,25 | 188,085 | 62,18 | 0,001 |
| Linear | 2 | 534,61 | 267,305 | 88,37 | 0,000 |
| Temp | 1 | 51,00 | 51,005 | 16,86 | 0,015 |
| Time | 1 | 483,60 | 483,605 | 159,87 | 0,000 |
| 2-Way Interactions | 1 | 29,65 | 29,645 | 9,80 | 0,035 |
| Temp*Time | 1 | 29,65 | 29,645 | 9,80 | 0,035 |
| Error | 4 | 12,10 | 3,025 | | |
| Total | 7 | 576,35 | | | |

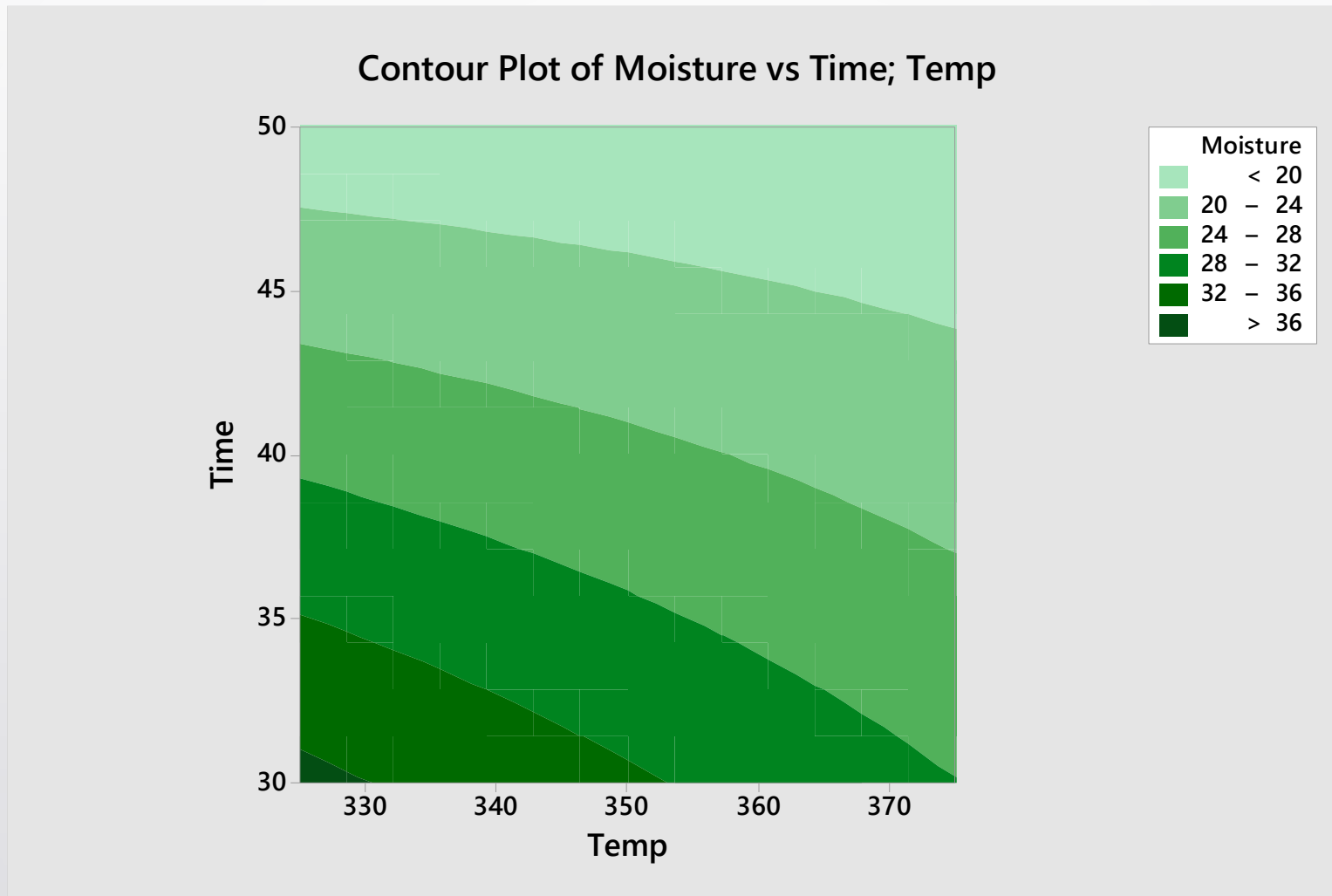
Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|---------|--------|-----------|------------|
| 1,73925 | 97,90% | 96,33% | 91,60% |

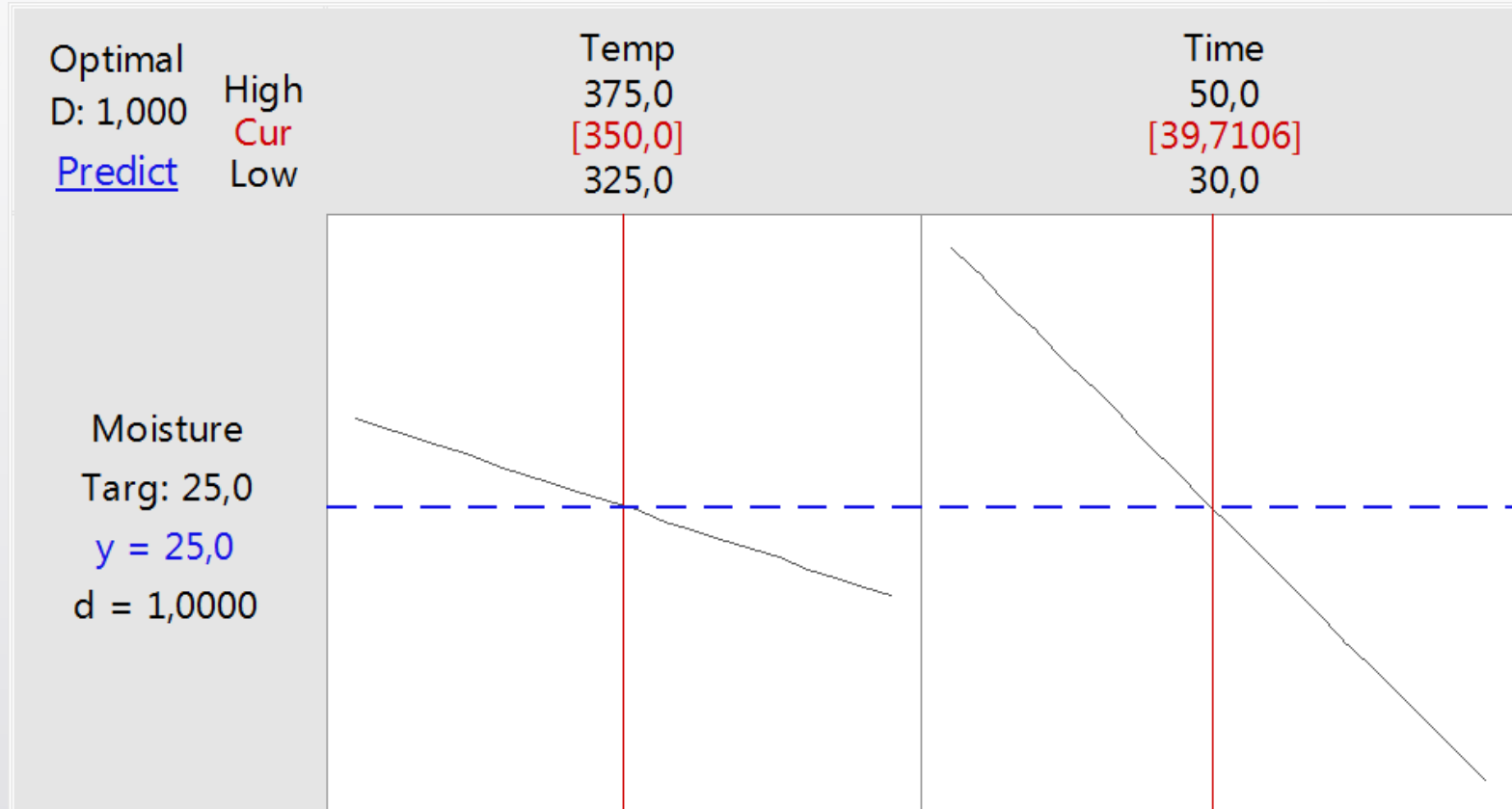
Normal Probability Plot
(response is Moisture)



Design of Experiments (DoE)



Design of Experiments (DoE)



Design of Experiments (DoE)

Esempio3: reazione catalitica

Fattori:

- X1= Feedrate (ml/min);
- X2= catalyst (A; B);
- X3= Agitation (rpm)
- X4= temp (°C)
- X5= conc (%)

Risposta

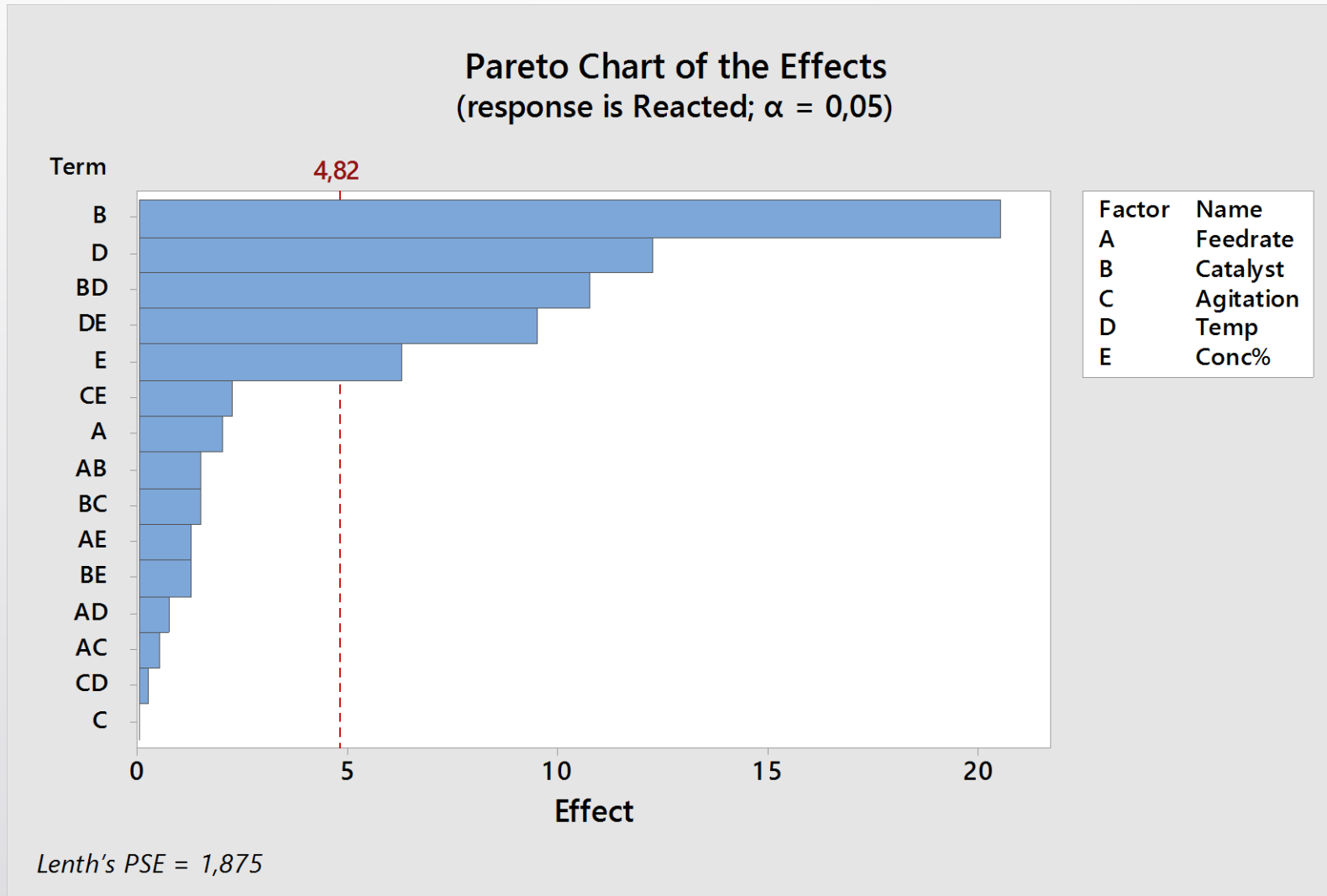
- Y1= Reacted

Design Summary

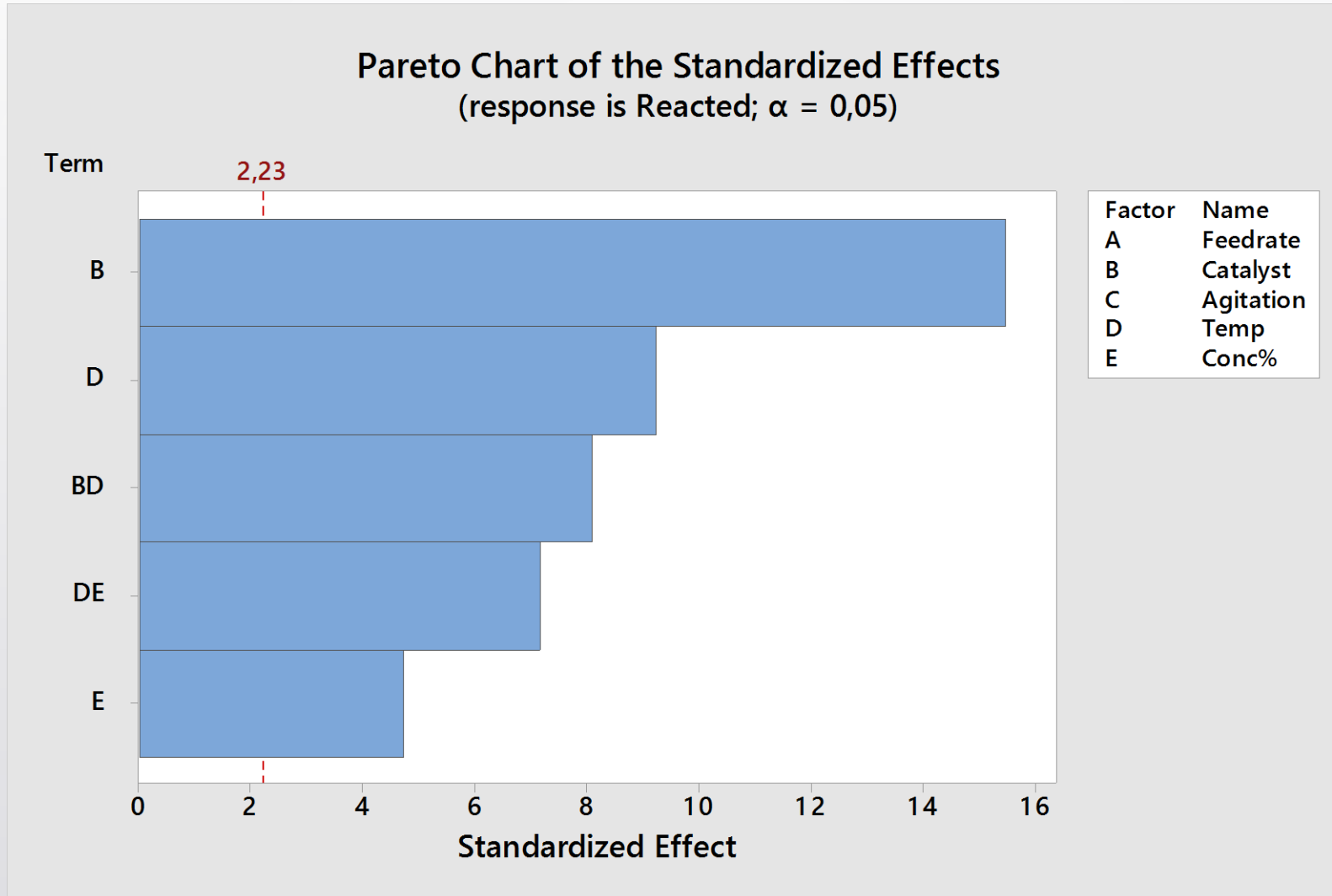
Factors: 5 Base Design: 5, 16 Resolution: V
Runs: 16 Replicates: 1 Fraction: 1/2
Blocks: 1 Center pts (total): 0

| StdOrder | RunOrder | CenterPt | Blocks | Feedrate | Catalyst | Agitation | Temp | Conc% | Reacted |
|----------|----------|----------|--------|----------|----------|-----------|------|-------|---------|
| 5 | 1 | 1 | 1 | 10 | A | 120 | 140 | 3 | 53 |
| 13 | 2 | 1 | 1 | 10 | A | 120 | 180 | 6 | 49 |
| 1 | 3 | 1 | 1 | 10 | A | 100 | 140 | 6 | 56 |
| 15 | 4 | 1 | 1 | 10 | B | 120 | 180 | 3 | 95 |
| 4 | 5 | 1 | 1 | 15 | B | 100 | 140 | 6 | 65 |
| 14 | 6 | 1 | 1 | 15 | A | 120 | 180 | 3 | 60 |
| 6 | 7 | 1 | 1 | 15 | A | 120 | 140 | 6 | 55 |
| 11 | 8 | 1 | 1 | 10 | B | 100 | 180 | 6 | 78 |
| 9 | 9 | 1 | 1 | 10 | A | 100 | 180 | 3 | 69 |
| 8 | 10 | 1 | 1 | 15 | B | 120 | 140 | 3 | 61 |
| 12 | 11 | 1 | 1 | 15 | B | 100 | 180 | 3 | 93 |
| 16 | 12 | 1 | 1 | 15 | B | 120 | 180 | 6 | 82 |
| 3 | 13 | 1 | 1 | 10 | B | 100 | 140 | 3 | 63 |
| 7 | 14 | 1 | 1 | 10 | B | 120 | 140 | 6 | 67 |
| 10 | 15 | 1 | 1 | 15 | A | 100 | 180 | 6 | 45 |
| 2 | 16 | 1 | 1 | 15 | A | 100 | 140 | 3 | 53 |

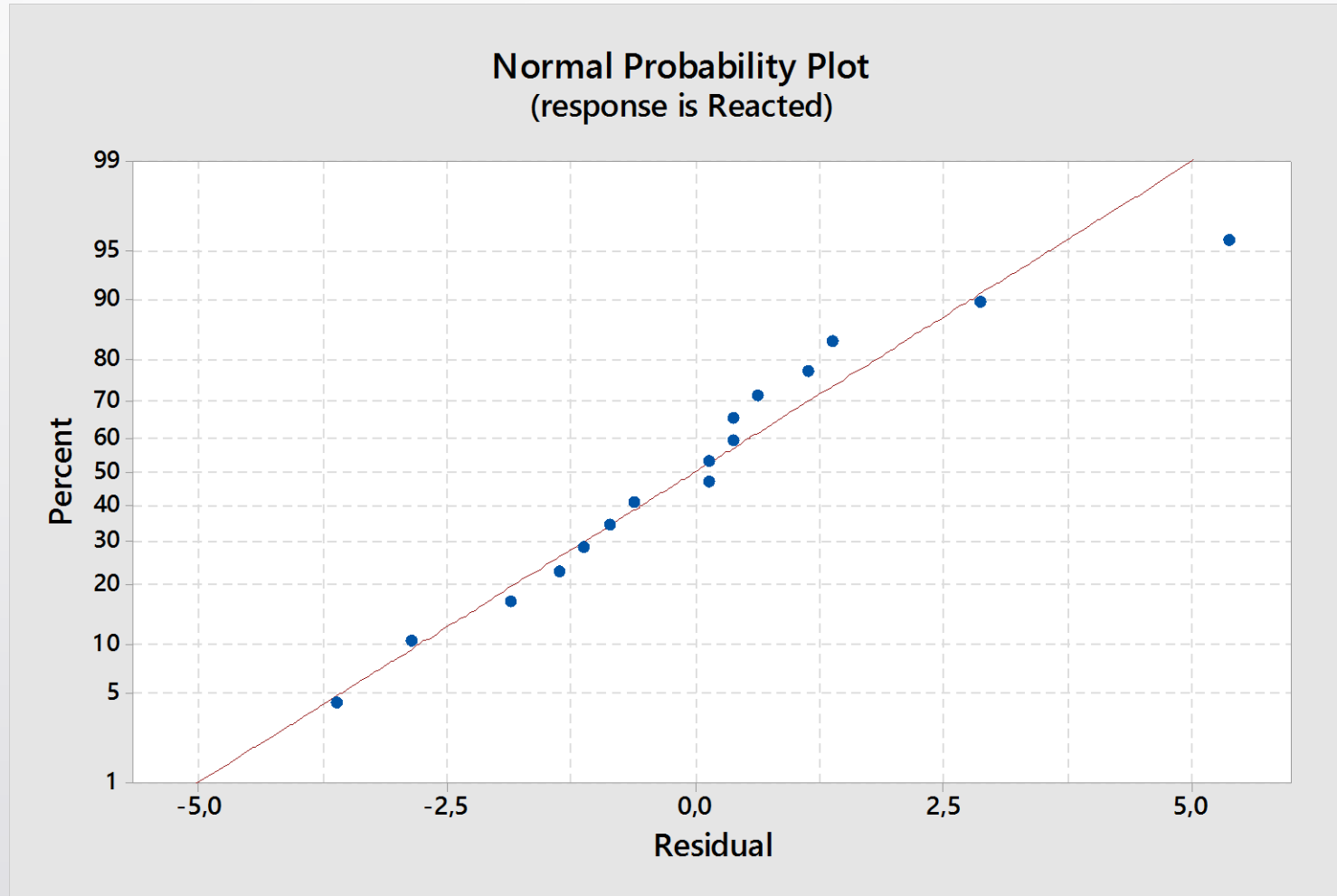
Design of Experiments (DoE)



Design of Experiments (DoE)



Design of Experiments (DoE)



Design of Experiments (DoE)

Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|--------------------|----|---------|---------|---------|---------|
| Model | 5 | 3260,75 | 652,15 | 92,83 | 0,000 |
| Linear | 3 | 2437,50 | 812,50 | 115,66 | 0,000 |
| Catalyst | 1 | 1681,00 | 1681,00 | 239,29 | 0,000 |
| Temp | 1 | 600,25 | 600,25 | 85,44 | 0,000 |
| Conc% | 1 | 156,25 | 156,25 | 22,24 | 0,001 |
| 2-Way Interactions | 2 | 823,25 | 411,63 | 58,59 | 0,000 |
| Catalyst*Temp | 1 | 462,25 | 462,25 | 65,80 | 0,000 |
| Temp*Conc% | 1 | 361,00 | 361,00 | 51,39 | 0,000 |
| Error | 10 | 70,25 | 7,02 | | |
| Total | 15 | 3331,00 | | | |

Model Summary

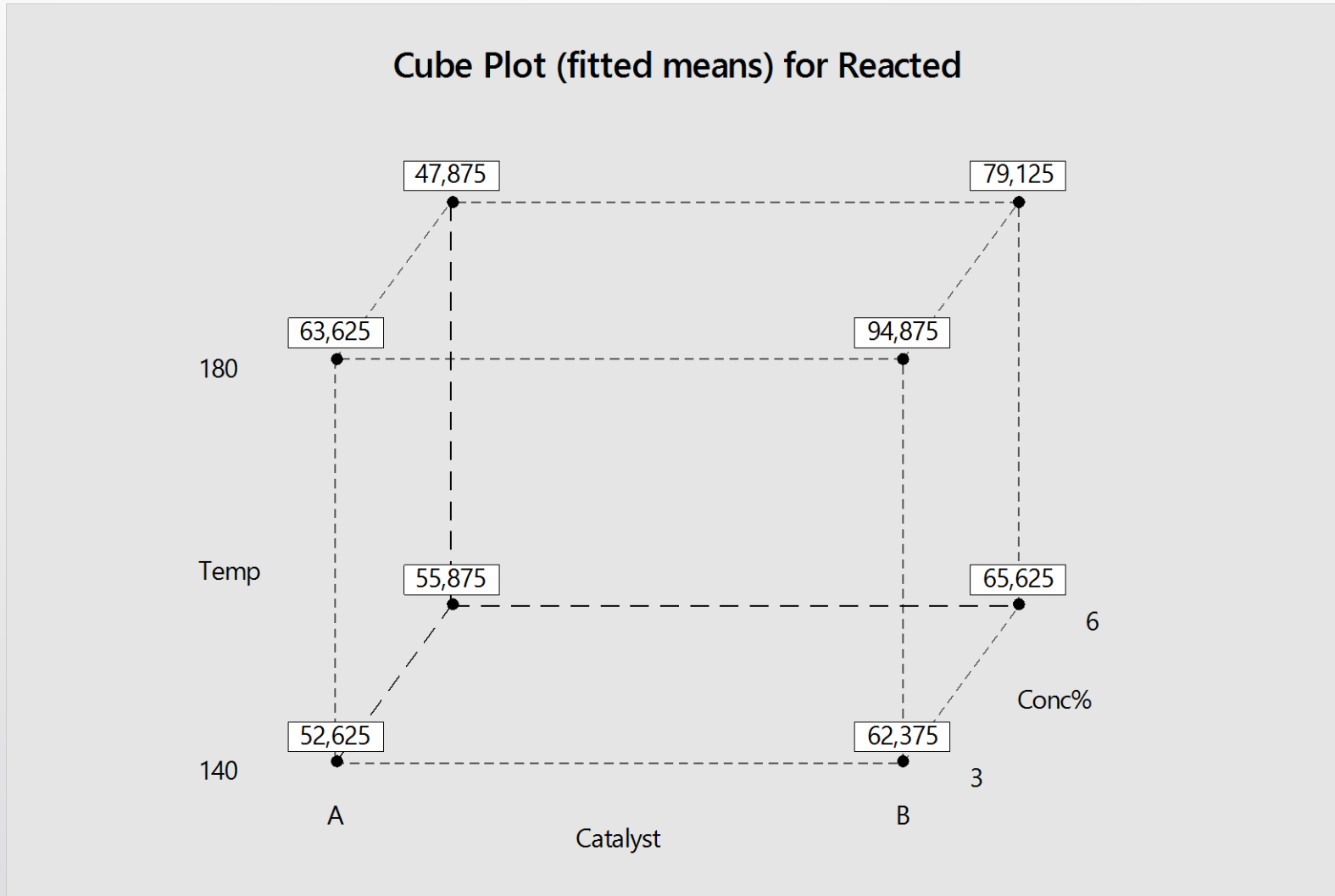
| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|---------|--------|-----------|------------|
| 2,65047 | 97,89% | 96,84% | 94,60% |

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

| Obs | Reacted | Fit | Resid | Std Resid |
|-----|---------|-------|-------|-----------|
| 9 | 69,00 | 63,63 | 5,38 | 2,57 R |

R Large residual

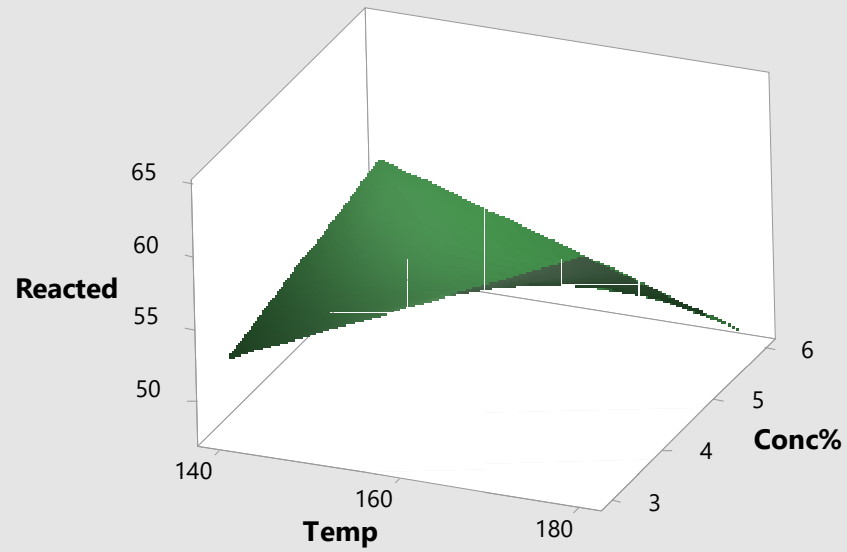
Design of Experiments (DoE)



Design of Experiments (DoE)

Surface Plot of Reacted vs Conc%; Temp

Hold Values
CatalystA



Design of Experiments (DoE)

