

На правах рукописи



Савин Андрей Павлович

**Разработка способов экстракции из клеток грамотрицательных бактерий
липополисахаридов, их детоксифицированных производных и получение из
них детоксифицированных липидов А**

1.5.6. Биотехнология

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, профессор
кандидат химических наук

Смирнов Валерий Валерьевич
Филатов Андрей Викторович

Официальные оппоненты:

Орлова Екатерина Владимировна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Пермская государственная фармацевтическая академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии, заведующий кафедрой

Кривых Максим Андреевич – кандидат фармацевтических наук, акционерное общество «Научно-производственное объединение по иммунобиологическим препаратам «Микроген», управление научных разработок и стандартизации, руководитель проекта

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

Защита состоится «24» сентября 2026 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.03 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, ул. Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации: <http://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 208.002.03
кандидат фармацевтических наук, доцент



В.И. Гегечкори

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время почти половина всех смертельных исходов от инфекционных заболеваний вызвана бактериальными патогенами. При этом наибольшую опасность представляют антибиотикорезистентные бактерии, из-за которых в мире ежегодно погибает 700 000 человек, а к 2050 году ежегодная смертность может достичь 10 миллионов (Church и др., 2021). Одним из направлений снижения антибиотикорезистентности является вакцинация населения. Для профилактики бактериальных инфекций используются различные типы вакцин, в том числе полисахаридные и конъюгированные полисахарид-белковые. Полисахаридные вакцины содержат в своем составе один или несколько бактериальных капсульных полисахаридов (КПС), вызывают выработку протективных антител и обладают высокой биосовместимостью. Однако исследования показали, что полисахаридные вакцины менее иммуногенны при применении у детей и пожилых людей, чем у людей среднего возраста. Вырабатываемые сразу после иммунизации антитела класса IgM быстро исчезают, поскольку КПС вызывает Т-независимый иммунный ответ. Кроме того, повторная иммунизация зачастую не приводит к увеличению титра антител (развивается толерантность) (Rohokale и др., 2023). Для увеличения эффективности полисахаридных вакцин, слабо иммуногенный антиген (КПС) присоединяют ковалентной связью к высоко иммуногенному белку-носителю, получая конъюгированные полисахарид-белковые вакцины. Конъюгация обеспечивает Т-опосредованный иммунный ответ и переключение класса вырабатываемых антител с короткоживущих IgM на долгоживущие IgG. Конъюгированные полисахарид-белковые вакцины обеспечивают выработку высокого титра антител, в том числе при повторной иммунизации (нет толерантности, присущей полисахаридным вакцинам). Эти вакцины также оказались более эффективными при вакцинации детей. Несмотря на достоинства конъюгированных полисахарид-белковых вакцин, их производство и контроль качества сопряжены с высокой стоимостью (Frasch, 2009; Costantino и др., 2011). Для усиления иммуногенности в составе полисахаридных и конъюгированных полисахарид-белковых вакцин используют адъюванты на основе алюминия. При относительно высокой безопасности, адъюванты, содержащие алюминий, зачастую неспособны вызвать достаточный клеточно-опосредованный иммунный ответ (Zhao и др., 2023).

В этой связи становится актуальной разработка новых, более эффективных адъювантов для повышения иммуногенности антибактериальных вакцин. Одним из наиболее перспективных природных иммуностимуляторов, способных выступить в этой роли, является липополисахарид (ЛПС) – компонент клеточной оболочки и фактор вирулентности грамотрицательных бактерий. ЛПС способен активировать толл-подобный рецептор 4 (Toll-like receptor 4, TLR4), который

играет ключевую роль во врожденном иммунитете. Введение ЛПС вызывает выработку высокого титра протективных антител (Rietschel и др., 1996). Однако клиническое применение ЛПС в вакцинных препаратах ограничено его крайне высокой токсичностью. Токсичность ЛПС обусловлена его структурным компонентом, липидом А, который определяет степень активации TLR4 и дальнейший синтез провоспалительных цитокинов. Начиная с прошлого века велись попытки модификации липида А, чтобы снизить токсичность ЛПС, в то же время сохраняя его иммуногенные свойства. Эти попытки привели к получению клинически применимых детоксифицированных липидов А (д-ЛА) и детоксифицированных липополисахаридов (д-ЛПС). Д-ЛА применяются в качестве адъювантов в зарегистрированных вакцинах и активно исследуются при иммунотерапии различных заболеваний, в том числе онкологических. В последнее время все большее внимание уделяется поиску «встроенных адъювантов», которые связаны ковалентной связью с иммунологически слабым антигеном. Это обеспечивает одновременную доставку антигена и адъюванта к антиген-презентирующим клеткам, что усиливает иммунный ответ и повышает эффективность вакцинации (Li и др., 2022). В роли встроенных адъювантов используются химически синтезированные д-ЛА, однако их получение сопряжено с большими затратами. Полученный биотехнологическим путем д-ЛПС (например, ЛПС *Shigella sonnei*) перспективен в качестве альтернативного встроенного адъюванта ввиду наличия в составе углеводной части реакционноспособных аминок групп, которые могут быть использованы для конъюгации с другими антигенами (например, КПС). Кроме того, д-ЛПС обладает оптимальным профилем эффективности и безопасности – он уже применяется в качестве активного компонента в составе зарегистрированных в России вакцин (Флексвак®). Также активно исследуется противоопухолевая активность д-ЛПС (Novikova и др., 2023).

Таким образом, активное применение и изучение д-ЛПС и д-ЛА в качестве компонентов вакцин приводит к необходимости разработки экономичных, безопасных и экологичных методов их выделения. Существующие на данный момент методы сопряжены с высокой длительностью, применением токсичных реактивов, в связи с чем их применение в промышленных масштабах затруднительно. Данная работа направлена на разработку новых, более масштабируемых методов экстракции ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий и получения из них д-ЛПС и д-ЛА.

Степень разработанности темы исследования

В литературе подробно описаны классические подходы к выделению ЛПС, среди которых наиболее распространённым остаётся метод водно-фенольной экстракции и его модификации. Вместе с тем сохраняются ограничения, связанные с применением токсичных реагентов и условий, технологической сложностью методик, а также риском контаминации продуктов

белками и нуклеиновыми кислотами. В мировой и отечественной практике отчётливо прослеживается тенденция к разработке более безопасных методов экстракции, пригодных для рутинного применения и масштабирования, при обязательном подтверждении структуры полученных ЛПС.

Методы детоксификации ЛПС представлены значительным числом работ и, как правило, основаны на направленной модификации липида А химическими, ферментативными и генно-инженерными методами с целью снижения токсичности при сохранении иммуностимулирующих свойств д-ЛПС. Однако практическое применение известных методик требует оптимизации условий, поскольку конечные продукты нередко характеризуются гетерогенностью состава и варибельным профилем эффективности и безопасности. Современные тенденции исследований связаны с поиском более технологически применимых и безопасных схем детоксификации ЛПС. Особое значение приобретает разработка критериев качества детоксифицированного ЛПС на уровне субстанции, включающих показатели подлинности, чистоты (контаминация белками и нуклеиновыми кислотами) и количественного определения.

Получение липида А и его детоксифицированных форм отражено в литературе и имеет методическую основу, однако остаются задачи оптимизации условий направленного получения целевых продуктов. Сложность обусловлена гетерогенностью полученных биотехнологическим путем д-ЛА, что повышает требования к стандартизации условий и контролю качества полученных продуктов. В мировой и отечественной практике усиливается тенденция к использованию современных методов контроля структуры и состава (прежде всего масс-спектрометрии) и к разработке технологически воспроизводимых схем получения конкретных детоксифицированных вариантов липида А как целевых продуктов.

Анализ литературных данных показывает, что наиболее распространенные методы экстракции ЛПС имеют существенные ограничения, включая применение токсичных реагентов, высокий уровень контаминации целевого продукта и трудности масштабирования. Существующие протоколы получения детоксифицированных производных (д-ЛПС) и д-ЛА, перспективных в качестве адъювантов, в основном ориентированы на лабораторный масштаб и не решают задач промышленного получения. В связи с этим, становится актуальной разработка новых, более безопасных и масштабируемых методов выделения ЛПС, его детоксифицированных форм и, в частности, формирование подходов к стандартизации и контролю качества д-ЛПС.

Цель и задачи исследования

Цель – разработка новых и безопасных способов экстракции ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий, методов получения их детоксифицированных производных, детоксифицированных липидов А и методик контроля качества и стандартизации д-ЛПС.

Задачи исследования:

1. Провести анализ современных подходов к выделению ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий, получению их д-ЛПС и д-ЛА, а также методов их физико-химического анализа и контроля качества.
2. Осуществить разработку и выбор наиболее эффективных и безопасных в сравнении с существующими методов экстракции ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий.
3. Разработать способ получения д-ЛПС.
4. Разработать способ получения д-ЛА из ЛПС.
5. Охарактеризовать физико-химические свойства полученных веществ (ЛПС, д-ЛПС, д-ЛА).
6. Сформулировать принципы стандартизации, разработать стандартный образец и установить нормативы качества для субстанции низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*.

Научная новизна

Установлена возможность использования спиртовых смесей для экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий как альтернативы классическим методам выделения. Показано, что применение водно-спиртовых систем позволяет получать ЛПС с меньшей контаминацией белками и нуклеиновыми кислотами при сохранении приемлемого выхода целевого продукта. Определены условия щелочной детоксификации ЛПС, обеспечивающие получение детоксифицированных производных с воспроизводимыми физико-химическими характеристиками. Обоснована возможность совмещения стадий экстракции и щелочной детоксификации ЛПС в рамках единой схемы получения д-ЛПС. Установлены параметры мягкого кислотного гидролиза деацилированного д-ЛПС, обеспечивающие направленное получение детоксифицированного триацильного дифосфорилированного липида А, а также параметры жесткого кислотного гидролиза ЛПС, позволяющие получать детоксифицированный монофосфорилированный липид А. Показана возможность удаления примесей фосфолипидов из высушенных клеток грамотрицательных бактерий и субстанций ЛПС с использованием этанола при получении д-ЛА. Разработаны показатели и нормативы качества низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei* на уровне субстанции.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в установлении влияния технологических факторов (время, температура, состав экстрагирующей смеси) на эффективность экстракции ЛПС водно-спиртовыми смесями из клеток грамотрицательных бактерий и на показатели чистоты получаемого продукта.

Практическая значимость работы состоит в разработке технологически применимых, более безопасных и потенциально масштабируемых схем экстракции ЛПС и получения его детоксифицированных производных (д-ЛПС) и детоксифицированных липидов А. Сформированные подходы к стандартизации и контролю качества д-ЛПС могут быть использованы при разработке и производстве вакцинных препаратов и адъювантов на основе д-ЛПС и д-ЛА, а также при подготовке нормативной документации на соответствующие субстанции.

Методология и методы исследования

Методологическая основа работы включает экспериментальный и сравнительно-аналитический подходы: разработка и оптимизация процедур получения ЛПС, д-ЛПС, д-ЛА сопровождалась оценкой выхода и показателей чистоты, а также подтверждением структуры продуктов независимыми физико-химическими методами.

Технологическая часть исследования включала разработку двух новых методов экстракции ЛПС и их сопоставление с референтным методом (водно-фенольная экстракция) по выходу целевого продукта, содержанию примесей белка и нуклеиновых кислот. Были оптимизированы условия получения д-ЛПС и д-ЛА.

Контроль характеристик и идентификация продуктов выполнялись с применением комплекса физико-химических методов. Контаминацию белками и нуклеиновыми кислотами определяли методами Бредфорда и Спирина; подтверждение состава и структуры полученных продуктов выполняли с использованием масс-спектрометрии, эксклюзионной ВЭЖХ и ЯМР-спектроскопии. В работе сформированы нормативы качества д-ЛПС на уровне субстанции (спецификация), включающие показатели подлинности, чистоты (в том числе содержание белка и нуклеиновых кислот) и количественного определения.

Положения, выносимые на защиту

1. Методы экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий с использованием смеси бутанол–пропанол–вода и 50% водного пропанола как более безопасные альтернативы классической водно-фенольной экстракции.

2. Оптимизированные условия щелочной детоксификации липополисахаридов,

обеспечивающие получение д-ЛПС с воспроизводимыми физико-химическими характеристиками, а также подход к совмещению стадий экстракции и детоксификации в единой технологической схеме.

3. Параметры мягкого кислотного гидролиза деацилированного д-ЛПС, обеспечивающие направленное получение детоксифицированного триацильного дифосфорилированного липида А.

4. Параметры жесткого кислотного гидролиза липополисахаридов, обоснованные для получения детоксифицированного монофосфорилированного липида А.

5. Способ удаления примесей фосфолипидов с использованием 95% этанола при получении детоксифицированных липидов А.

6. Показатели качества, проектные нормативы, стандартный образец и валидированные методики эксклюзионной ВЭЖХ для определения родственных примесей и количественного содержания низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei* при его стандартизации на уровне субстанции.

Внедрение результатов исследования

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации внедрены в учебный процесс Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин «Методы фармакопейного анализа», «Методы исследования биологических макромолекул», читаемых студентам по направлениям подготовки 33.05.01 Фармация, 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика (акт № 822 от 22.12.2025) и внедрены в производственный процесс ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России (акт б/н от 31.03.2026).

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в планировании и выполнении экспериментальных работ по разработке способов экстракции ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий, получению детоксифицированных производных ЛПС и детоксифицированных липидов А. Автором проведен подбор и сравнительная оценка условий экстракции ЛПС водно-спиртовыми смесями, включая смесь бутанол-пропанол-вода и водный пропанол, а также выполнены эксперименты по щелочной детоксификации ЛПС и совмещению стадий экстракции и детоксификации. Автор участвовал в разработке условий кислотного гидролиза ЛПС и д-ЛПС для получения детоксифицированных липидов А, включая монофосфорилированные и дифосфорилированные производные. Автор принимал участие в проведении всех исследований по контролю качества и стандартизации д-ЛПС, получая исходные данные по качественному и количественному анализу д-ЛПС, занимался обработкой результатов, полученных методами

масс-спектрометрии, эксклюзионной ВЭЖХ и др. Автор принимал участие в апробации результатов исследований, а также в написании публикаций, выступал с полученными данными на всероссийских конференциях, представляя результаты в виде устных докладов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют п. 25 паспорта научной специальности 1.5.6. Биотехнология и п. 2 и п. 3 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена использованием независимых физико-химических методов (ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия), а также воспроизводимостью экспериментов, выполненных в трех повторностях. Обработка экспериментальных данных выполнялась с применением стандартных методов математической обработки результатов измерений: по данным повторностей рассчитывали средние значения, стандартные отклонения и относительные стандартные отклонения (RSD). Для количественного определения и подтверждения линейности применяли построение градуировочных зависимостей и линейную регрессию (оценка наклона, свободного члена и R^2); для стандартного образца дополнительно определяли аттестованное значение в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания (ГФ РФ XV изд.) и Фармакопеи Евразийского экономического союза (ФЕАЭС). Статистическая обработка проводилась в программе Microsoft Excel 2019.

Апробация диссертационной работы состоялась «1» апреля 2026 г. на совместном заседании кафедры биотехнологии и кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Протокол № 1 от 1 апреля 2026 года.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 2 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, Chemical Abstracts, 1 иная публикация по результатам исследования, 1 патент, 1 публикация в сборнике материалов всероссийской научной конференции.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 147 страницах компьютерного текста. Включает: введение, обзор литературы (глава 1), экспериментальную часть (глава 2), обсуждение результатов исследования (главы 3-6), общие выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы из 113 источников (104 из которых – зарубежные) и 7 приложений. В качестве иллюстраций диссертация содержит 30 таблиц, 32 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование включало разработку и сравнительную оценку способов экстракции ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий, подбор условий их химической детоксификации и получения д-ЛА, а также физико-химическую характеристику полученных продуктов. В качестве исходного материала использовали инактивированную лиофильно высушенную клеточную массу *E. coli* O157, *E. coli* M-17, *S. sonnei*, *S. boydii* 6 и *S. typhi*, а также полученные на промежуточных стадиях субстанции ЛПС, д-ЛПС и липидов А.

Экстракцию ЛПС проводили двумя новыми водно-спиртовыми методами и сопоставляли их с водно-фенольной экстракцией (ВФ). Для экстракции смесью бутанол-пропанол-вода (БПВ) н-пропанол прибавляли к двухфазной смеси воды и н-бутанола в соотношении 1:1 (об.) до ее полной гомогенизации (соотношение при 25 °С, – 10:10:8,6 – н-бутанол:вода:н-пропанол – об.); в отдельных сериях в смесь вводили трис(гидроксиметил)аминометан (Tris) до pH 8,5-8,6. Сухую клеточную массу обрабатывали экстрагентом при перемешивании, клеточный осадок отделяли центрифугированием, объединенные экстракты разводили водой, очищали от низкомолекулярных примесей диафильтрацией и лиофилизовали.

Экстракцию 50% водным пропанолом выполняли обработкой сухой клеточной массы смесью пропанол-1:вода (1:1, об.) при 60 °С. Для оценки влияния длительности процесса сравнивали однократную 16-часовую обработку и трехкратную экстракцию в течение 1 часа. Водно-фенольную экстракцию проводили при 68–70 °С с последующим удалением фенола диализом. Эффективность способов оценивали по выходу очищенного ЛПС, содержанию примесей белков и нуклеиновых кислот. Оценивали сохранность структуры липида А и углеводной части после мягкого кислотного гидролиза ЛПС 2% водным раствором уксусной кислоты при 100 °С в течение 1 часа.

Очистку ЛПС осуществляли высаживанием примесей белков и нуклеиновых кислот трихлоруксусной кислотой. Содержание белков в продуктах определяли методом Бредфорда, нуклеиновых кислот – методом Спирина – с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000с

(Thermo Scientific, США). Для удаления фосфолипидных примесей при получении д-ЛА применяли обработку ЛПС или клеточной массы 95% этанолом при 50 °С, полноту удаления примесей контролировали методом ТСХ.

Детоксификацию ЛПС проводили в демицеллирующих условиях в буфере (0,2% дезоксихолат натрия, 0,1 М бикарбонат аммония, аммиак до pH 10,2), в качестве альтернативы проводили реакцию в 12,5% растворе аммиака. Отдельно исследовали совмещение стадий экстракции и детоксификации с использованием смеси бутанол-пропанол-водный аммиак (соотношение при 25 °С, – 10:10:5,4 – н-бутанол:водный аммиак (25%):н-пропанол – об.). Для получения д-ЛА использовали мягкий кислотный гидролиз деацилированного д-ЛПС в буфере лимонная кислота/триэтиламин и жесткий кислотный гидролиз ЛПС 0,2 М HCl при 100 °С.

Структурную характеристику продуктов проводили с использованием комплекса физико-химических методов. Липид А и его детоксицированные формы анализировали масс-спектрометрией на приборах Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker, США) и MicrOTOF II (Bruker, США). Углеводные фракции ЛПС исследовали методом ¹H-ЯМР-спектроскопии на спектрометре Bruker Avance II 600 MHz (Bruker, США). Анализ молекулярно-массового распределения ЛПС, определение родственных примесей и количественного содержания д-ЛПС выполняли на жидкостном хроматографе Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014 (Хроматэк, Россия) с использованием колонки TSKgel G3000PWxl (Tosoh Bioscience, Япония).

Для низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei* разработали ВЭЖХ-методики определения родственных примесей и количественного содержания. Анализ проводили на колонке TSKgel G3000PWxl (7 мкм, 7,8 × 300 мм) в изократическом режиме; подвижная фаза — 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор с 0,1% SDS, pH 7,5; температура колонки — 35 °С, скорость потока — 0,5 мл/мин, объем пробы — 100 мкл. Детектирование осуществляли с использованием рефрактометрического и диодно-матричного ($\lambda = 206$ нм) детекторов.

Родственные примеси рассчитывали методом внутренней нормализации, а количественное содержание основного компонента — методом внешнего стандарта с использованием аттестованного СО низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*.

Сравнительная оценка водно-спиртовых смесей для экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий

Разработка водно-спиртовых способов экстракции была направлена на замену водно-фенольного метода, который обеспечивает высокий выход ЛПС, но связан с использованием горячего фенола, длительным диализом и риском контаминации продукта белками и нуклеиновыми кислотами. Апробацию метода проводили на клетках *E. coli* O157 и *S. sonnei*, различающихся строением ОПС и молекулярно-массовым профилем ЛПС. Для *E. coli* O157 характерен нейтральный ОПС, тогда как ОПС *S. sonnei* имеет цвиттер-ионный характер; это

позволяло оценить влияние химической природы углеводного домена на эффективность экстракции. Предполагалось, что смесь БПВ, сочетающая воду и алифатические спирты, должна нарушать гидрофобные взаимодействия между липидом А и компонентами наружной мембраны, сохраняя растворимость амфифильной молекулы ЛПС. Полученные образцы очищали от белков и нуклеиновых кислот, подвергали мягкому кислотному гидролизу, сохранность углеводной части подтверждали ^1H -ЯМР-спектроскопией (Рисунок 1), липида А – масс-спектрометрией (Рисунок 2).

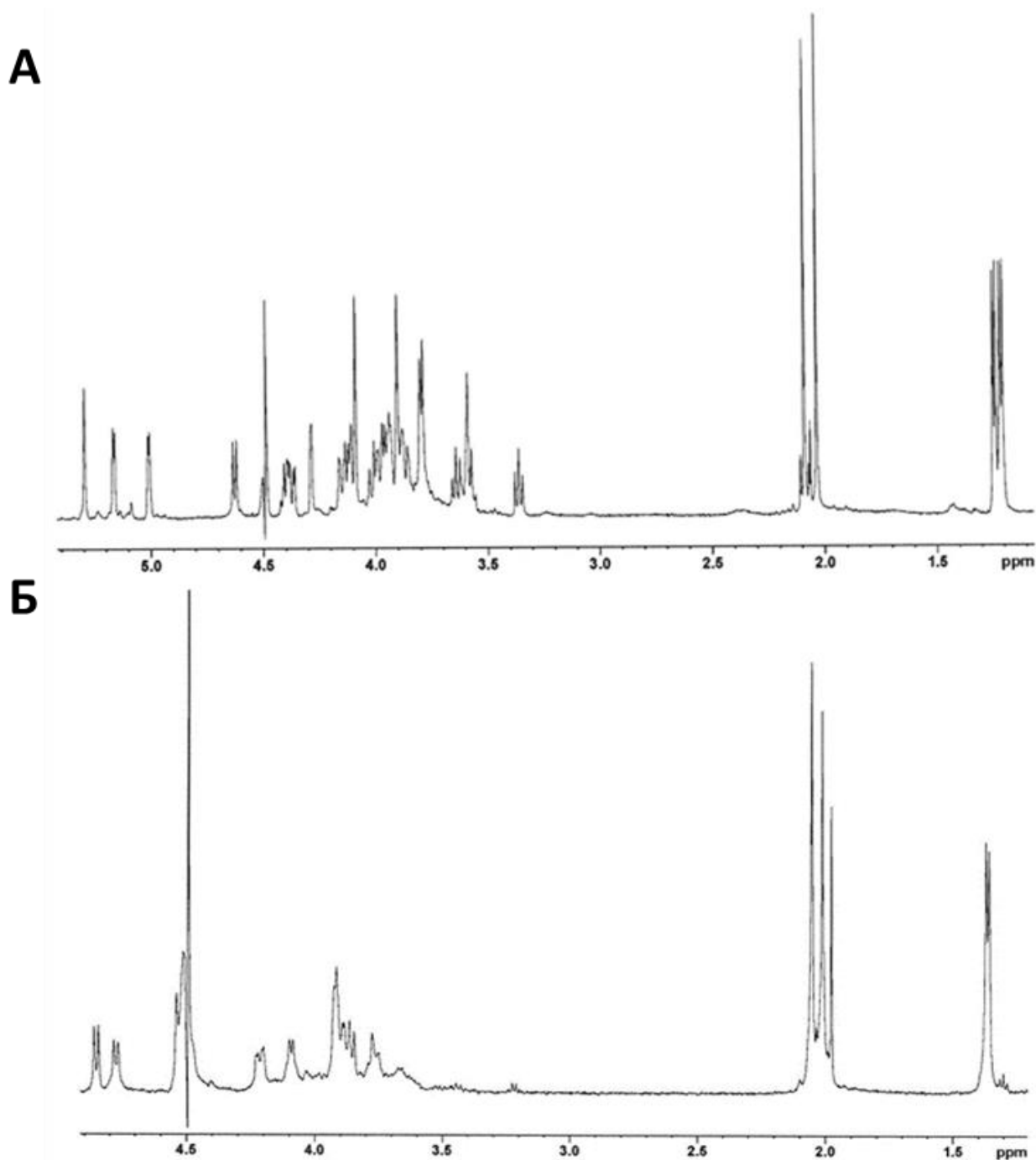


Рисунок 1 – ^1H -ЯМР спектры ОПС, выделенных из ЛПС, проэкстрагированных БПВ.
(А) ^1H ЯМР спектр О-полисахарида *E. coli* O157. (Б) ^1H ЯМР спектр О-полисахарида *S. sonnei*

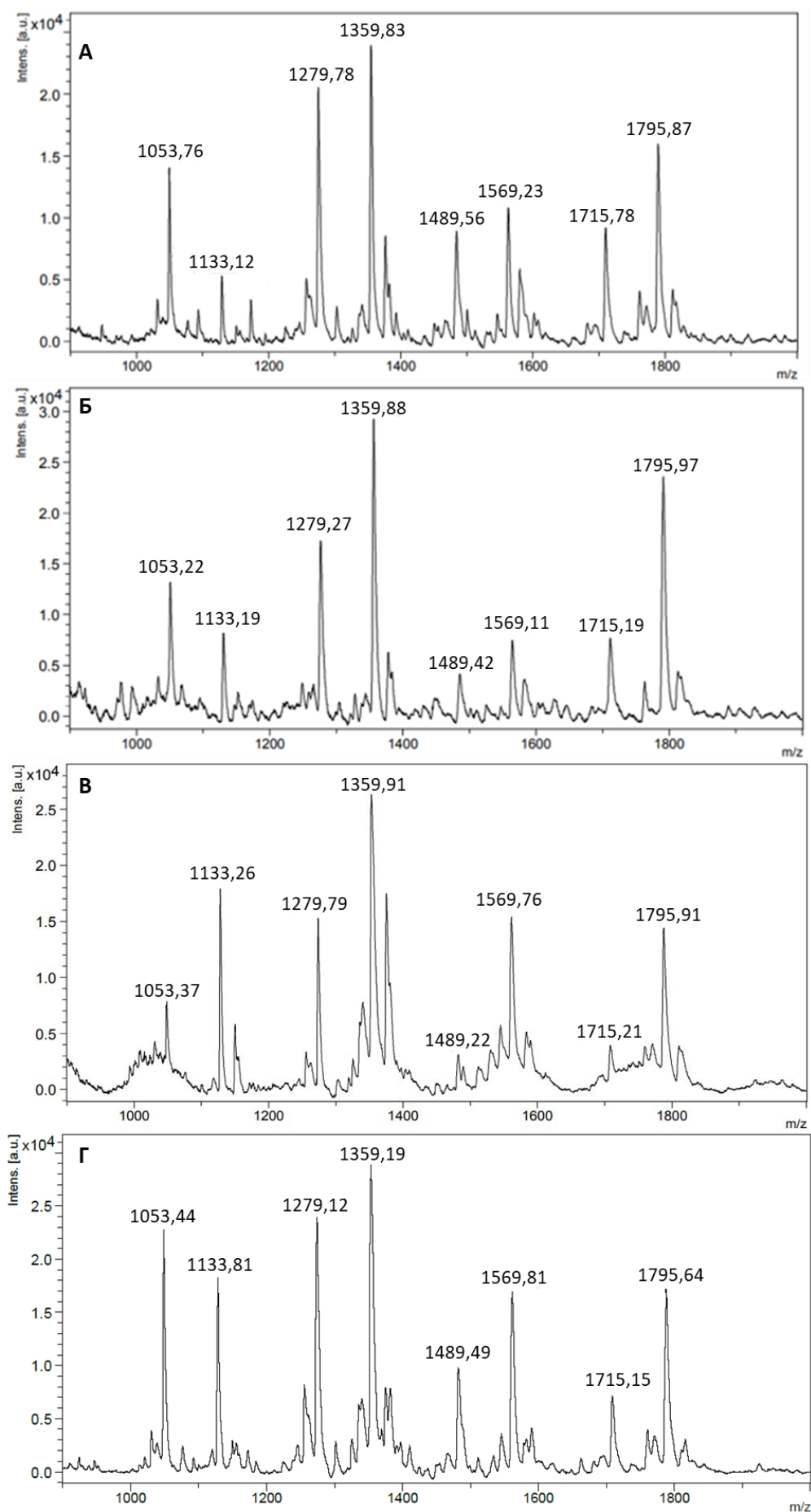


Рисунок 2 – Масс-спектры липидов А, выделенных из ЛПС *E. coli* O157, экстрагированных (А) БПВ, (Б) ВФ и ЛПС *S. sonnei*, экстрагированных (В) БПВ, (Г) ВФ

Соответствие масс-спектров и ^1H -ЯМР-спектров литературным данным подтверждает сохранение структурных признаков целевого продукта при использовании водно-спиртовых экстрагентов.

При экстракции *E. coli* O157 водно-фенольный метод обеспечивал высокий выход очищенного ЛПС, но сопровождался выраженной контаминацией белками и нуклеиновыми кислотами. Повышение температуры экстракции смесью БПВ с 37 до 60 °C увеличивало выход очищенного ЛПС; минимальное суммарное содержание примесей наблюдалось при использовании смеси без добавления Tris при 60 °C. Для *S. sonnei* наибольший выход очищенного ЛПС был получен при использовании смеси БПВ с добавлением Tris. Этот результат согласуется с цвиттер-ионным характером ОПС *S. sonnei* и указывает, что изменение pH может влиять на растворимость и извлечение ЛПС. Следовательно, состав спиртового экстрагента должен подбираться с учетом химической природы ОПС конкретного продуцента.

Для дополнительной оценки влияния Tris на степень экстракции ЛПС *S. sonnei* была проведена последовательная обработка клеточного осадка: после первичной экстракции смесью БПВ без добавления Tris остаточную клеточную массу повторно экстрагировали смесью БПВ с Tris. Выход очищенных ЛПС после первой и второй экстракций составил 105 и 80 мг, соответственно, что подтверждает влияние щелочной добавки на полноту извлечения ЛПС.

В качестве технологически более простой экстрагирующей системы был исследован 50% водный пропанол, который, в отличие от трехкомпонентной смеси БПВ, полностью смешивается с водой, не образует фазового разделения и проще удаляется из экстракта. Дополнительно анализировали молекулярно-массовое распределение углеводсодержащих фракций ЛПС, полученных различными способами экстракции. Для *E. coli* M-17 было показано, что применение 50% водного пропанола и смеси БПВ сопровождается преимущественным извлечением более низкомолекулярных фракций по сравнению с водно-фенольной экстракцией. Этот результат указывает, что состав экстрагента влияет не только на общий выход ЛПС, но и на молекулярно-массовое распределение выделяемого продукта. С учетом амфифильной природы ЛПС такой эффект может быть связан с различной способностью экстрагирующих систем извлекать фракции, отличающиеся длиной углеводной части. Дополнительный масс-спектрометрический анализ липида А показал сохранение основных структурных признаков ЛПС, экстрагированных 50% водным пропанолом, смесью БПВ и водно-фенольным методом.

Для *E. coli* M-17 применение 50% водного пропанола сопровождалось меньшим выходом очищенного ЛПС по сравнению с водно-фенольным методом, тогда как для *S. boydii* 6 этот способ оказался более эффективным, чем водно-фенольная экстракция и смесь БПВ. При оптимизации временных параметров экстракции для *S. boydii* 6 установлено, что трехкратная обработка 50% водным пропанолом по 1 ч повышает суммарный выход очищенного ЛПС до

10,8% по сравнению с 5,8% при однократной 16-часовой экстракции. Относительный вклад первой, второй и третьей экстракции составил соответственно 63%, 23% и 14%.

Сравнение способов экстракции проводили с учетом особенностей штамма, поскольку выход ЛПС определяется не только составом экстрагента, но и строением ОПС и молекулярно-массовым распределением ЛПС. Для количественной оценки эффективности предложенных способов экстракции было проведено сопоставление выхода очищенного ЛПС, полученного при использовании различных экстрагирующих систем и условий процесса (Таблица 1).

Таблица 1 – Выход очищенного ЛПС при различных способах экстракции

Объект	Экстрагент (температура, °С)	Выход очищенного ЛПС, %
<i>E. coli</i> O157	ВФ	5,1
<i>E. coli</i> O157	БПВ (60)	4,2
<i>E. coli</i> O157	БПВ с добавлением Tris (60)	4,4
<i>S. sonnei</i>	ВФ	2,7
<i>S. sonnei</i>	БПВ (60)	3,6
<i>S. sonnei</i>	БПВ с добавлением Tris (60)	7,6
<i>E. coli</i> M-17	ВФ	6,9
<i>E. coli</i> M-17	БПВ (60)	4,3
<i>E. coli</i> M-17	50% водный пропанол (60)	3,5
<i>S. boydii</i> 6	ВФ	4,7
<i>S. boydii</i> 6	БПВ (60)	3,3
<i>S. boydii</i> 6	50% водный пропанол (60)	5,8
<i>S. boydii</i> 6	50% водный пропанол (60), трехкратная экстракция	10,8

Таким образом, разработаны и апробированы два водно-спиртовых способа экстракции ЛПС. Их эффективность зависит от штамма и структурных особенностей ЛПС, однако оба подхода позволяют получать препараты с сохранением основных признаков липида А и углеводной части. Полученные результаты обосновывают возможность оптимизации более безопасных экстракционных смесей без применения горячего фенола.

Экспериментальное обоснование подходов к детоксификации липополисахаридов

Детоксификацию ЛПС осуществляли преимущественно за счет щелочного гидролиза сложноэфирных связей липида А. Такой подход позволяет уменьшить число ацильных цепей при сохранении углеводной части молекулы, поскольку удаление фосфатных групп обычно требует кислотных условий среды и может сопровождаться разрушением связи между липидом А и кором.

Для ЛПС *E. coli* O157 были оптимизированы демицеллирующие условия обработки: 0,2% дезоксихолат натрия, 0,1 М бикарбонат аммония и аммиак до pH 10,2. Дезоксихолат натрия обеспечивал демицеллирование ЛПС и повышал доступность сложноэфирных связей липида А

к гидролизу. Оптимальным режимом являлась обработка при 50 °С в течение 40 ч, при которой уменьшалась доля высокоацилированных форм липида А.

С целью сокращения продолжительности процесса была исследована детоксификация ЛПС *S. boydii* 6 12,5% водным аммиаком. Обработка в течение 3 ч обеспечивала наиболее приемлемый профиль липида А: при меньшей продолжительности сохранялась повышенная доля высокоацилированных форм липида А, а при увеличении времени возрастала доля диацильных производных, менее значимых с точки зрения целевого иммуномодулирующего профиля.

Сопоставление двух вариантов щелочной обработки показало, что демицеллирующие условия обеспечивают более управляемую и воспроизводимую реакцию, тогда как водный аммиак позволяет существенно сократить длительность процесса. В обоих случаях ключевым контролируемым параметром является соотношение форм липида А с различным числом ацильных цепей.

Был разработан подход к совмещению стадий экстракции из клеток *S. sonnei* и детоксификации. Замена воды в смеси БПВ на водный раствор аммиака позволяла одновременно извлекать ЛПС и проводить избирательное щелочное омыление липида А. Оптимальные условия процесса составили 25 °С и 5 ч; масс-спектр полученного продукта представлен на Рисунке 3.

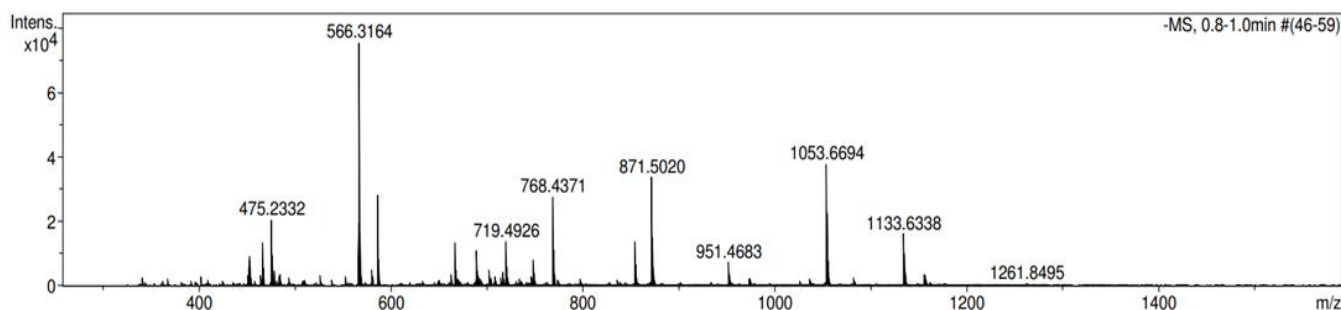


Рисунок 3 – Масс-спектр липида А детоксифицированного ЛПС *S. sonnei*

Масс-спектрометрический анализ липида А показал, что полученный д-ЛПС характеризовался отсутствием гекса- и пентаацильных форм липида А.

Обоснование условий получения детоксифицированных липидов А и удаления примесей фосфолипидов

Одной из технологических проблем при получении д-ЛА является наличие фосфолипидных примесей, которые переходят в целевой продукт на стадиях выделения ЛПС и липида А. Для их удаления на примере ЛПС *E. coli* O157 была разработана обработка 95% этанолом при 50 °С. Контроль спиртовых вытяжек после гидролиза показал отсутствие характерных сигналов липида А, что подтверждает селективность удаления фосфолипидов без

значимой экстракции самого ЛПС. Аналогичный подход был апробирован на уровне клеточной массы *E. coli* M-17.

Для получения д-ЛА различного структурного типа исследовали условия кислотного гидролиза ЛПС и д-ЛПС. Триацильный дифосфорилированный липид А получали по схеме, включающей предварительную щелочную деацилирующую обработку ЛПС и последующий мягкий кислотный гидролиз деацилированного д-ЛПС. В качестве реакционной среды использовали лимоннокислый буфер с триэтиламино; варьируемыми параметрами были концентрация лимонной кислоты и значение pH.

Масс-спектрометрический анализ показал, что гидролиз деацилированного д-ЛПС в 0,01 М лимоннокислом буфере с триэтиламино при pH 4,5 обеспечивает преимущественное образование дифосфорилированного триацильного липида А (Рисунок 4). Эти условия позволяют отделить липид А от углеводной части без выраженного дефосфорилирования и могут рассматриваться как препаративный подход к направленному получению этого типа д-ЛА.

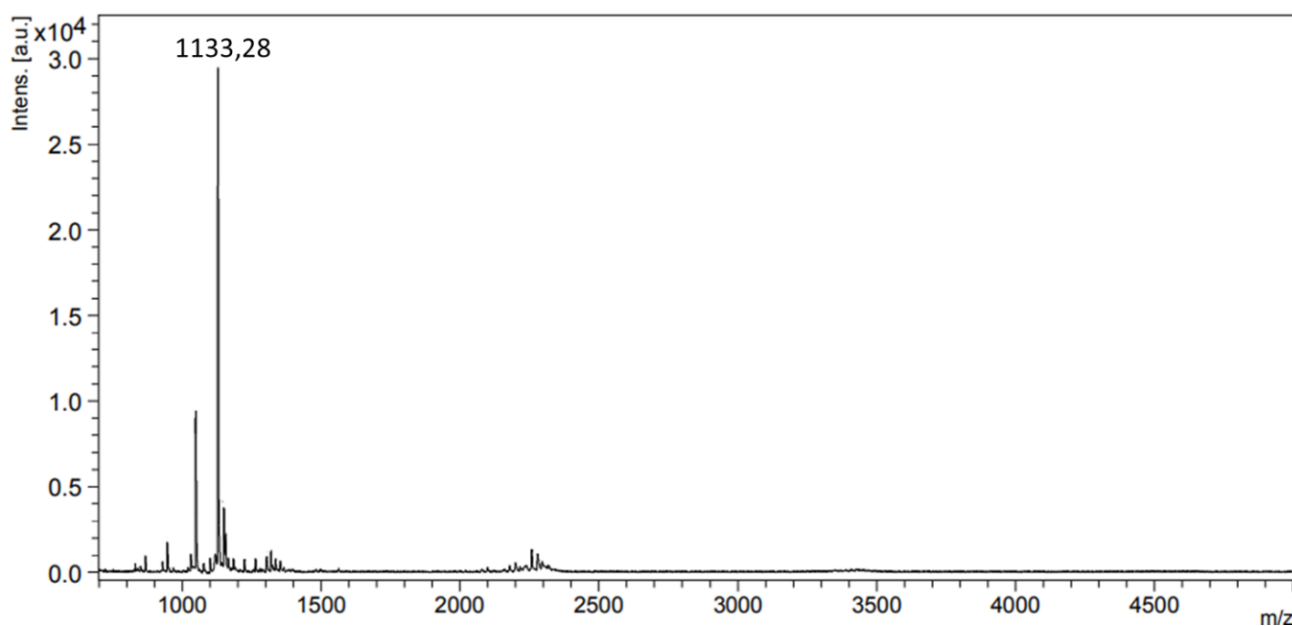


Рисунок 4 – Масс-спектр липида А, полученного при мягком кислотном гидролизе деацилированного д-ЛПС

Для получения монофосфорилированного липида А использовали жесткий кислотный гидролиз ЛПС 0,2 М HCl при 100 °С в течение 30, 60, 90 мин. Уменьшение длительности гидролиза снижало степень дефосфорилирования, тогда как увеличение времени сопровождалось частичным деацилированием продукта. Поэтому оптимизация жесткого кислотного гидролиза должна учитывать одновременно удаление одного остатка фосфорной кислоты и сохранность ацильного профиля липида А. Масс-спектры продуктов кислотного гидролиза ЛПС *S. typhi* представлены на Рисунке 5.

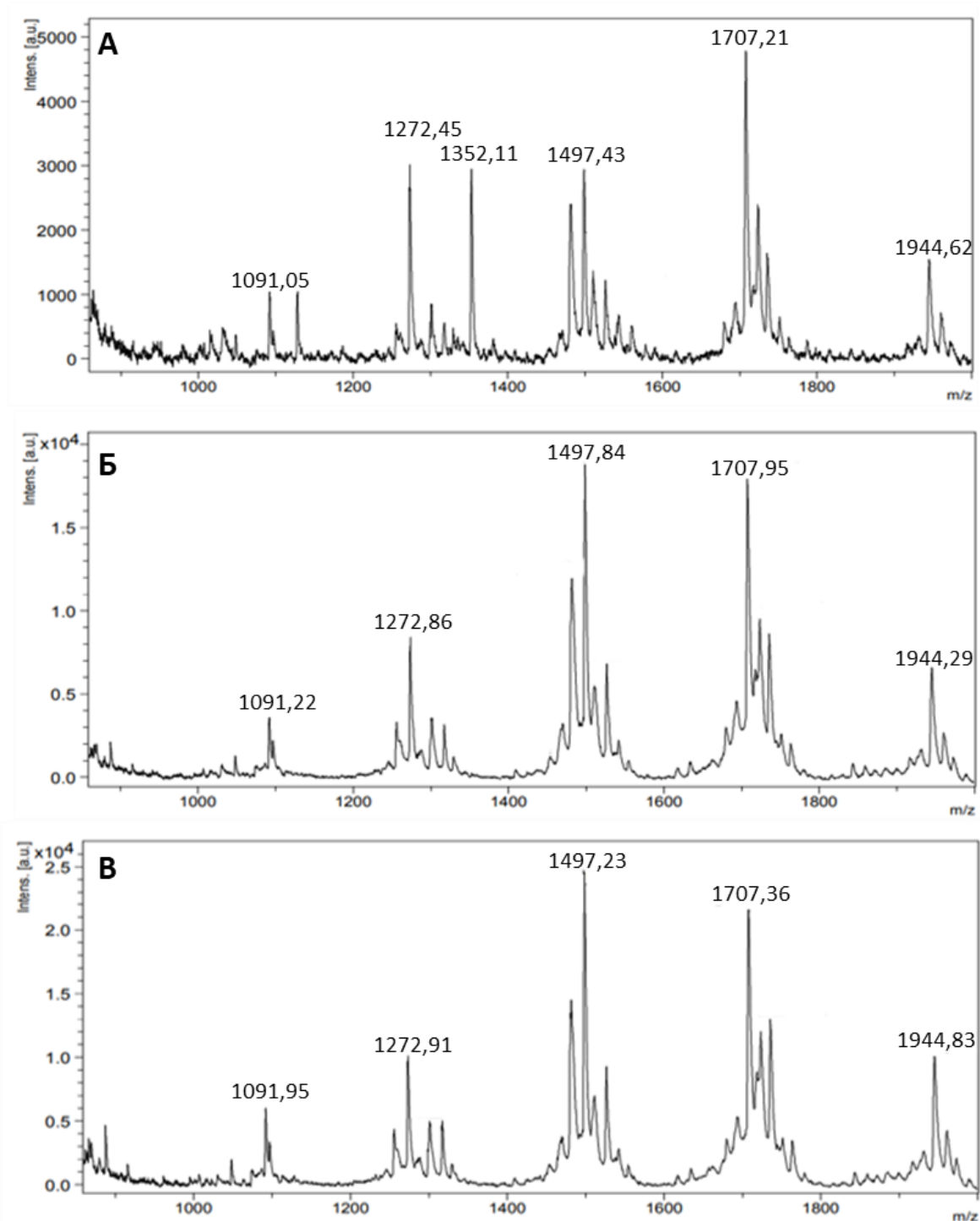


Рисунок 5 – Масс-спектры липидов *A. S. typhi*, полученных в результате обработки ЛПС 0,2 М НСl в течение (А) 30 минут (Б) 60 минут (В) 90 минут

Таким образом, обоснованы условия получения двух целевых типов д-ЛА: триацильного дифосфорилированного липида А при мягком кислотном гидролизе деацилированного д-ЛПС и монофосфорилированного липида А при жестком кислотном гидролизе ЛПС. Дополнительно показана целесообразность включения стадии удаления фосфолипидов 95% этанолом как простой и масштабируемой операции очистки.

Обоснование показателей качества низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei* на этапе разработки субстанции

Для низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei* был сформирован комплекс показателей качества на этапе разработки субстанции. Для такого объекта принципиально важно подтверждать структурную идентичность двух доменов молекулы: углеводной части и липида А. Углеводную часть анализировали методом ^1H -ЯМР-спектроскопии после кислотного гидролиза, а липид А — масс-спектрометрией.

К показателям чистоты отнесены содержание белков, нуклеиновых кислот, воды, сульфатной золы, тяжелых металлов, остаточных органических растворителей и родственных примесей. Под родственными примесями для низкомолекулярного д-ЛПС понимали высоко- и низкомолекулярные фракции, отличающиеся по длине углеводной части и определяемые методом эксклюзионной ВЭЖХ в демицеллирующих условиях. Для проектной спецификации низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei* были установлены следующие нормативы: белки — не более 2%, нуклеиновые кислоты — не более 2%, вода — не более 5%, сульфатная зола — не более 0,5%, остаточные органические растворители — не более 0,5%, родственные примеси — не более 3,0%, количественное содержание д-ЛПС — 95,0–105,0%. Установленные показатели качества были разделены по функциональному назначению. Показатели белков и нуклеиновых кислот характеризуют степень удаления примесей клеточного происхождения после экстракции и очистки ЛПС. Вода, сульфатная зола, остаточные органические растворители и тяжелые металлы отражают общую химическую чистоту и технологическую пригодность субстанции; для тяжелых металлов были приняты предельные значения $\text{Pb} \leq 0,5 \text{ ppm}$, $\text{Cd} \leq 0,5 \text{ ppm}$, $\text{As} \leq 1,0 \text{ ppm}$, $\text{Hg} \leq 0,1 \text{ ppm}$.

Количественное определение д-ЛПС выполняли методом внешнего стандарта с использованием СО низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*, аттестованного методом материального баланса. В расчет аттестованного значения включали показатели, отражающие вклад воды, сульфатной золы, остаточных растворителей и родственных примесей.

По результатам расчета методом материального баланса аттестованное содержание действующего вещества в СО составило 96,81%. Это значение было использовано при количественном определении д-ЛПС методом внешнего стандарта.

Разработанные ВЭЖХ-методики были валидированы для двух аналитических задач: определения родственных примесей и количественного определения основного компонента. Сводные результаты валидации представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Сводные результаты валидации ВЭЖХ-методик контроля низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*

Валидационный параметр	Определение родственных примесей	Количественное определение
Специфичность / пригодность системы	Разделение основного пика и ближайшей примеси: $R_s = 2,1$; $T = 1,2$; $N = 5800$; RSD площади основного пика = 0,6 %	Совпадение времен удерживания СО и испытуемого раствора: $\Delta t_R = 0,4$ %; $R_s = 2,0$; RSD площади основного пика = 0,5 %
Линейность и аналитическая область	0,50–1,50 мг/мл; $R^2 = 0,99$	0,50–1,50 мг/мл; $R^2 = 0,99$
Прецизионность	Сумма родственных примесей: $1,205 \pm 0,019$ %; RSD = 1,55 %	Содержание д-ЛПС: $99,52 \pm 0,15$ %; RSD = 0,15 %
Внутрилабораторная воспроизводимость	Сумма родственных примесей: $1,203 \pm 0,035$ %; RSD = 2,92 %	Содержание д-ЛПС: $99,50 \pm 0,30$ %; RSD = 0,30 %
Правильность	Средняя степень извлечения = 99,6 %; RSD = 1,20 %	Средняя степень извлечения = 99,6 %; RSD = 0,81 %
Предел обнаружения / предел количественного определения	0,02 % / 0,05 %	Не оценивали для данной аналитической задачи
Робастность	При варьировании скорости потока и температуры сумма примесей находилась в диапазоне 1,18–1,23 %	При варьировании скорости потока и температуры содержание д-ЛПС находилось в диапазоне 99,4–99,7 %

При разработке и валидации методик учитывали различие их аналитического назначения. Методика определения родственных примесей была направлена на оценку молекулярно-массовой неоднородности субстанции и включала расчет сопутствующих фракций методом внутренней нормализации. Для этой методики принципиальное значение имели разделение основного пика и ближайшей примеси, воспроизводимость определения суммы примесей, а также оценка предела обнаружения и предела количественного определения. Методика количественного определения, напротив, была ориентирована на установление содержания основного компонента относительно аттестованного СО низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*, поэтому ключевыми параметрами являлись специфичность, линейность, прецизионность, правильность и устойчивость результата при небольшом изменении условий анализа. Использование единой хроматографической системы для двух аналитических задач позволило унифицировать контроль субстанции: родственные примеси характеризовали фракционную неоднородность д-ЛПС, а количественное определение отражало содержание основного компонента в пересчете на аттестованное значение СО.

Результаты валидации показывают, что методика определения родственных примесей пригодна для количественного контроля сопутствующих высоко- и низкомолекулярных фракций д-ЛПС, а методика количественного определения — для оценки содержания основного компонента в субстанции методом внешнего стандарта. Использование эксклюзионной ВЭЖХ в

демицеллирующих условиях позволило перевести характеристику молекулярно-массовой неоднородности д-ЛПС в воспроизводимый количественный показатель контроля качества.

Полученная система контроля качества сочетает структурную идентификацию и количественную оценку. Подлинность подтверждается анализом углеводной части и липида А, чистота — контролем белков, нуклеиновых кислот и родственных примесей, а количественное содержание — методом внешнего стандарта с использованием аттестованного СО. В совокупности эти показатели формируют основу для дальнейшей разработки нормативной документации на субстанцию низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе разработаны и экспериментально обоснованы способы экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий, получения их детоксифицированных производных и детоксифицированных липидов А. Показано, что 50% водный пропанол и смесь бутанол–пропанол–вода могут рассматриваться как технологически более безопасные альтернативы водно-фенольной экстракции ЛПС при сохранении структурных признаков целевого продукта.

Оптимизированы подходы к химической детоксификации ЛПС, включая щелочную обработку в демицеллирующих условиях и в водном аммиаке, а также показана возможность совмещения экстракции и детоксификации в едином процессе. Обоснованы условия получения низкомолекулярных д-ЛПС и детоксифицированных липидов А различного структурного типа, включая монофосфорилированный липид А и триацильный дифосфорилированный липид А.

Сформирован комплекс показателей качества для низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei*, разработан стандартный образец, аттестованный методом материального баланса, и проведена валидация методик эксклюзионной ВЭЖХ для определения родственных примесей и количественного содержания. Полученные результаты создают основу для дальнейшей стандартизации д-ЛПС и разработки воспроизводимых технологий получения д-ЛПС и д-ЛА как перспективных компонентов вакцинных и адъювантных препаратов.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основании анализа современных подходов к выделению ЛПС, получению д-ЛПС и д-ЛА установлено, что существующие методы сохраняют ряд ограничений: применение токсичных реагентов, технологическая сложность, гетерогенность продуктов химической модификации и недостаточная проработанность подходов к стандартизации д-ЛПС на уровне субстанции. Определены основные направления экспериментальной разработки: применение водно-спиртовых систем экстракции, оптимизация условий получения д-ЛПС и д-ЛА, а также

формирование комплекса методов контроля качества, соответствующих современным фармакопейным требованиям.

2. Разработаны и экспериментально обоснованы более безопасные водно-спиртовые способы экстракции ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий, основанные на применении 50% водного пропанола и смеси бутанол–пропанол–вода и позволяющие получать целевые продукты с сохранением структурных признаков ЛПС.

3. Разработаны способы получения д-ЛПС, включающие щелочную обработку в демицеллирующих условиях и в водном аммиаке, а также показана возможность совмещения стадий экстракции из клеток грамотрицательных бактерий и детоксификации в едином технологическом процессе.

4. Разработаны и экспериментально апробированы условия получения д-ЛА из ЛПС и д-ЛПС. Показано, что мягкий кислотный гидролиз деацилированного д-ЛПС позволяет направленно получать триацильный дифосфорилированный д-ЛА, тогда как жесткий кислотный гидролиз ЛПС обеспечивает получение монофосфорилированного д-ЛА. Установлена целесообразность использования обработки 95% этанолом ЛПС и бактериальных клеток для удаления фосфолипидных примесей при получении д-ЛА.

5. Охарактеризованы физико-химические свойства полученных ЛПС, д-ЛПС и д-ЛА. Для ЛПС и д-ЛПС определено содержание примесей белков и нуклеиновых кислот и установлены особенности строения углеводной части и липида А. Для д-ЛА установлен состав основных молекулярных форм, различающихся числом ацильных цепей и степенью фосфорилирования.

6. Для субстанции низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei* установлены показатели качества и проектные нормативы, включающие подлинность, чистоту, родственные примеси и количественное содержание. Разработан и аттестован стандартный образец д-ЛПС *S. sonnei* с содержанием действующего вещества 96,81%; с его применением валидированы методики определения родственных примесей и количественного определения субстанции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанные водно-спиртовые способы экстракции ЛПС, режимы щелочной детоксификации и подходы к получению д-ЛА рекомендуется использовать при лабораторной и опытно-технологической наработке ЛПС, д-ЛПС и д-ЛА как более безопасные альтернативы методикам с применением водного фенола. Сформированные показатели качества и проектные нормативы для низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei* могут быть использованы при разработке нормативной документации на субстанцию, а также при стандартизации опытных серий д-ЛПС на этапе фармацевтической разработки. Разработанный стандартный образец и валидированные методики эксклюзионной ВЭЖХ целесообразно применять для контроля

родственных примесей и количественного определения д-ЛПС в контрольно-аналитических и исследовательских лабораториях.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования целесообразно направить на масштабирование предложенных процессов, расширение набора исследуемых бактериальных продуцентов и оценку воспроизводимости состава д-ЛПС и д-ЛА при переходе к опытно-промышленным сериям. Перспективным является углубленное изучение структуры, стабильности и биологической активности полученных продуктов, включая оценку пирогенности, TLR4-зависимой активности и адъювантных свойств в составе модельных вакцинных и конъюгированных конструкций.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Модельные иммуногенные конъюгированные конструкторы на основе декстрана и детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei* в качестве встроенного адъюванта / В. Л. Львов, А. В. Филатов, **А. П. Савин**, А. А. Шатилов, А. В. Шатилова, О. В. Миславский, И. К. Вернер, В. В. Смирнов, М. Р. Хаитов // **Иммунология**. – 2025. – Т. 46. – № 1. – С. 16–29. [Scopus]

2. Регуляторные подходы к оценке и регистрации вакцинных адъювантов: обзор глобальной практики / **А. П. Савин**, В. В. Смирнов, А. В. Филатов, В. Л. Львов, Т. Н. Муравьев, Н. Б. Фельдман // **Естественные и технические науки**. – 2026. – № 3 (214). – С. 148–156. [Chemical Abstracts]

3. Получение детоксифицированных производных липополисахаридов и их применение в качестве вакцинных и адъювантных препаратов / **А. П. Савин**, В. В. Смирнов, А. В. Филатов, В. Л. Львов, Г. О. Гудима, М. Р. Хаитов // **Иммунология**. – 2025. – Т. 46. – № 2. – С. 243–254. [Scopus]

4. Патент № 2832320С1 Российская Федерация, МПК А61К31/739 (2006.01), В01Д11/04 (2006.01), С08В37/00 (2006.01), С12Р19/04 (2006.01). Масштабируемый способ экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий : № 2023131432 : заявл. 30.11.2023 : **опубл. 23.12.2024** / В. Л. Львов, И. К. Вернер, А. В. Филатов, **А. П. Савин** [и др.]. – 14 с.

5. Разработка нового способа экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий / **А. П. Савин**, В. В. Смирнов, А. В. Филатов, В. Л. Львов, М. Р. Хаитов // Тезисы XIV Всероссийской научной конференции с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, 2024. – С. 320–322.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БПВ	—	экстрагирующая смесь бутанол-пропанол-вода
ВФ	—	водный фенол
ВЭЖХ	—	высокоэффективная жидкостная хроматография
д-ЛА	—	детоксифицированный липид А
д-ЛПС	—	детоксифицированный липополисахарид
КПС	—	капсульный полисахарид
ЛПС	—	липпополисахарид
ОПС	—	О-специфический полисахарид
СО	—	стандартный образец