ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Кандидата фармацевтических наук (14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия), руководителя проекта управления научных разработок и стандартизации АО «НПО «Микроген»
Кривых Максима Андреевича
на диссертационную работу Савина Андрея Павловича на тему «Разработка способов экстракции из клеток грамотрицательных бактерий липополисахаридов, их детоксифицированных производных и получение из них детоксифицированных липидов А», представленную в диссертационный совет ДСУ 208.002.03 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по научным специальностям 1.5.6. Биотехнология, 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность темы исследования

Создание компонентов вакцин нового поколения на основе детоксифицированных липополисахаридов (д-ЛПС) и детоксифицированных липидов А (д-ЛА) остаётся актуальной задачей отечественной биотехнологии. Монофосфорилированный липид А (МФЛ) входит в состав ряда зарегистрированных вакцин (Церварикс® (Cervarix®) - вакцина против вируса папилломы человека рекомбинантная, адсорбированная, содержащая адъювант AS04 – зарегистрирована в РФ, Фендрикс (Fendrix®) - вакцина против гепатита В (рДНК) (адъювантная, адсорбированная) – зарегистрирована в ЕС), а д-ЛПС *Shigella flexneri* применяется в производстве российского вакцинного препарата ФЛЕКСВАК (Вакцина дизентерийная против шигелл Флекснера липополисахаридная), что подтверждает высокую практическую ценность данного направления.

Традиционно применяемые методы получения ЛПС — водно-фенольная экстракция и метод Galanos — требуют использования летучих токсичных растворителей, затрудняющих промышленное масштабирование и представляющих опасность для персонала. Разработка технологически безопасных

альтернатив, совместимых с производственными условиями фармацевтических предприятий, является насущной практической потребностью.

Диссертационная работа Савина А.П. решает эту задачу путём систематического изучения водно-спиртовых экстрагентов как безопасной замены фенолсодержащих систем, а также формирует систему стандартизации для субстанции д-ЛПС *S. sonnei*. Тема диссертации полностью соответствует приоритетным направлениям развития отечественного производства иммунобиологических лекарственных препаратов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения диссертации подкреплены обширной экспериментальной базой. Структурная идентичность ЛПС и продуктов его химической модификации верифицирована комплексом независимых методов: MALDI-TOF и ESI-масс-спектрометрией, ЯМР-спектроскопией (600 МГц), эксклюзионной ВЭЖХ, а также колориметрическими методами контроля примесей белков и нуклеиновых кислот.

Эксперименты выполнены в трёх повторностях с надлежащей статистической обработкой; использованное аналитическое оборудование является сертифицированным. Разработанные методики ВЭЖХ валидированы по всем параметрам, предусмотренным ОФС.1.1.0012 ГФ РФ XV издания и монографией 2.3.14.0. ФЕАЭС. Совокупность применённых подходов обеспечивает высокую степень достоверности и обоснованности представленных выводов.

Достоверность и научная новизна исследования, полученных результатов

Достоверность результатов обеспечена воспроизводимостью экспериментов, использованием сертифицированного оборудования и полной валидацией аналитических методик. Числовые данные по выходу ЛПС, содержанию примесей

и показателям масс-спектров согласуются между независимыми методами анализа, что подтверждает их корректность.

Научная новизна работы обусловлена рядом оригинальных результатов: впервые проведено систематическое сравнение водно-спиртовых методов экстракции ЛПС для пяти штаммов грамотрицательных бактерий; разработан совмещённый процесс экстракции и детоксификации в одну стадию; установлены условия направленного получения триацильной и монофосфорилированной форм д-ЛА; для субстанции д-ЛПС *S. sonnei* впервые разработаны и валидированы методики ВЭЖХ и аттестован стандартный образец.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Теоретическая значимость работы состоит в установлении количественных закономерностей между составом водно-спиртового экстрагента, режимом экстракции и показателями выхода и чистоты ЛПС. Полученные данные представляют интерес для понимания физико-химических механизмов экстракции амфифильных биополимеров в системах с ограниченной мицеллообразующей активностью.

Практическая значимость подкреплена двумя актами о внедрении — в учебный процесс Института фармации им. А.П. Нелюбина Сеченовского Университета и в производственный процесс ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России. Разработанные водно-спиртовые методы экстракции могут быть непосредственно использованы при оптимизации производственных регламентов на субстанции д-ЛПС и д-ЛА, а валидированные методики ВЭЖХ – послужили основой для нормативной документации.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертационная работа соответствует пункту 25 паспорта научной специальности 1.5.6. Биотехнология, а также пунктам 2 и 3 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По теме диссертации опубликовано 5 работ: 2 статьи в изданиях, индексируемых в базах Scopus и Chemical Abstracts, 1 иная публикация, 1 патент Российской Федерации, 1 тезисы докладов. Публикации охватывают основные результаты работы. Следует отметить, что наличие патента подчёркивает практическую направленность разработок и их защищённость как объектов интеллектуальной собственности.

Структура и содержание диссертации

Диссертация Савина А.П. изложена на 147 страницах и включает введение, обзор литературы (глава 1), экспериментальную часть (глава 2), главы с результатами и их обсуждением (главы 3–6), заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список литературы из 113 источников (из них 104 зарубежных) и 7 приложений. Работа иллюстрирована 30 таблицами и 32 рисунками.

Во **введении** чётко сформулированы цель и задачи исследования, обоснована актуальность, подтверждена научная новизна.

Глава 1 содержит аналитический обзор методов экстракции, детоксификации и анализа ЛПС.

Экспериментальная часть (**глава 2**) детально описывает объекты, оборудование и все применённые методики, что обеспечивает возможность воспроизведения.

Главы 3–5 последовательно раскрывают результаты по оптимизации экстракции, детоксификации и получению д-ЛА; их структура логически соответствует поставленным задачам.

Глава 6 – ключевая с практической точки зрения – содержит полный комплекс по стандартизации субстанции д-ЛПС *S. sonnei*: разработку спецификации, аттестацию стандартного образца (содержание действующего вещества 96,81%) и валидацию двух методик ВЭЖХ.

В целом работа представляет собой завершённое исследование с чёткой внутренней логикой и практически ориентированными результатами.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата соответствует основному тексту диссертации: все ключевые научные результаты, выводы и практические рекомендации отражены в нём в полном объёме и без искажений.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа Савина А.П. выполнена на высоком научно-методическом уровне. Среди основных достоинств следует отметить: системный подход к сравнению методов экстракции на пяти штаммах бактерий; совмещение стадий экстракции и детоксификации как технологически рациональное решение; завершённость разработки на уровне фармацевтической субстанции с полным комплектом нормативной документации; соответствие системы контроля качества требованиям ГФ РФ XV издания. Текст написан чётким профессиональным языком.

Вместе с тем возникли следующие вопросы и замечания:

1. Сколько серий субстанции д-ЛПС *S. sonnei* было получено разработанным методом?

2. В главе 6 аттестованное значение содержания д-ЛПС в стандартном образце составило 96,81%. Была ли рассчитана неопределённость указанного значения и соответствует ли она требованиям ГФ РФ XV издания?

3. Акты о внедрении свидетельствуют об использовании результатов в производственном процессе ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России. Какой масштаб производства предполагается при практическом применении разработанных методов экстракции – на уровне лабораторного (10 г клеточной массы) или укрупнённого лабораторного/пилотного масштаба? Отличаются ли технологические параметры при изменении масштаба?

4. Несколько вопросов, связанных с условиями хранения и установлением срока годности:

– на с. 50 дано указание для неочищенного ЛПС о хранении в холодильнике при 4-10 °С, срок годности – 5 лет, на чем основаны данные указания?

– на с. 51 указано, что лиофильно высушенную субстанцию очищенного ЛПС хранят при комнатной температуре, при этом не указан срок годности? (аналогично для лиофильно высушенной субстанции д-ЛОС и триацильного дифосфорилированного липида А не указан срок годности);

– для субстанции монофосфорилированного липида А не указаны условия хранения и срок годности?

В представленном в приложении Ж паспорте на СО низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *S. sonnei* указаны условия хранения при температуре от 2 до 8 °С, срок годности 6 мес., на чем основаны данные указания?

5. На с. 65 «Определение родственных примесей и количественного содержания в субстанции низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *S. sonnei*» указано, что объем пробы составляет 100 мкл, однако пробоподготовка испытуемого образца не приведена (субстанция представляет собой лиофилизат).

6. Пояснить отсутствие требований к микробиологическому качеству в предложенной спецификации на субстанцию низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*.

7. В диссертационной работе встречаются отдельные опечатки и редакционные неточности (на с. 45 и 104 некорректно указаны ссылки на ГФ РФ XV изд. (ОФС.1.7.2.0018.15; ОФС.1.1.0012.15), указанные номера ОФС соответствуют ГФ РФ XIV изд.).

8. В качестве рекомендации приложение к диссертационной работе дополнить паспортами на бактериальные штаммы, используемые в исследовании.

Указанные вопросы носят дискуссионный и уточняющий характер и не снижают научной и практической ценности диссертационной работы.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Савина Андрея Павловича на тему: «Разработка способов экстракции из клеток грамотрицательных бактерий липополисахаридов, их детоксифицированных производных и получение из них детоксифицированных липидов А», представленная на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи разработки безопасных и масштабируемых методов получения детоксифицированных производных ЛПС с одновременным формированием системы стандартизации субстанции д-ЛПС, имеющей существенное значение для биотехнологии и фармацевтической химии, что соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора № 0692/Р от 06.06.2022 года (с изменениями, утвержденными: приказом №1179/Р от 29.08.2023г., приказом №0787/Р от 24.05.2024 г., приказом №1085/Р от 10 июля

2025 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Савин Андрей Павлович заслуживает присуждения искомой учёной степени по специальностям 1.5.6. Биотехнология и 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

кандидат фармацевтических наук,
руководитель проекта,
АО «НПО «Микроген»,
управление научных разработок и стандартизации
(14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия)

Кривых Максим Андреевич

«01» сентября 2026 г.

Подпись Кривых Максима Андреевича заверяю:

Начальник управления по работе с персоналом Е.И. Агаркова

Адрес центрального офиса:
127473, г. Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10
Юридический адрес:
115088, г. Москва, 1-я Дубровская ул., д. 15, стр. 2
Телефон/факс: +7 (495) 790-77-73
Эл. почта: info@microgen.ru