ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Смирнов Валерий Валерьевич

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Филатов Андрей Викторович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 16
1.1. Строение и биологическая активность липополисахаридов грамотрицательных бактерий 16
1.2. Способы экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий 21
1.3. Методы получения детоксифицированных производных липополисахаридов 25
1.4. Методы получения детоксифицированных липидов А 27
1.5. Методы анализа липополисахаридов, детоксифицированных производных липополисахаридов и липидов А 30
1.6. Выводы по главе 1 34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 36
2.1. Объекты исследования 36
2.2. Оборудование и реактивы 37
2.3. Экстракция липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий 39
2.4. Очистка липополисахаридов 40
2.5. Экстракция примесей фосфолипидов 95% этанолом 41
2.6. Кислотный гидролиз липополисахаридов 42
2.7. Детоксификация липополисахаридов и липида А 43
2.8. Метод Бредфорда для измерения концентрации общего белка 45
2.9. Метод Спирина для измерения концентрации нуклеиновых кислот 45
2.10. Методы анализа структуры липида А 46
2.11. Методы анализа углеводной фракции липополисахаридов 47
2.12. Технология получения детоксифицированных липополисахаридов и липидов А 47

2.13. Определение родственных примесей и количественного содержания в субстанции низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *S. sonnei* 65
2.14. Статистический анализ 67
ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВОДНО-СПИРТОВЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ КЛЕТОК ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ 68
3.1. Оптимизация извлечения липополисахаридов водно-спиртовыми смесями 68
3.2. Выводы по главе 3 82
ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ДЕТОКСИФИКАЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ 83
4.1. Оптимизация условий щелочной обработки 83
4.2. Анализ совмещения стадий экстракции из бактериальных клеток и детоксификации для получения низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei* 86
4.3. Выводы по главе 4 87
ГЛАВА 5. ОБОСНОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕТОКСИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПИДОВ А И УДАЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ ФОСФОЛИПИДОВ 89
5.1. Подбор условий получения триацильного дифосфорилированного липида А 89
5.2. Оптимизация условий кислотного гидролиза при получении монофосфорилированного липида А 92
5.3. Разработка подхода к удалению примесей фосфолипидов из липополисахаридов и клеток грамотрицательных бактерий с применением 95% этанола 94
5.4. Выводы по главе 5 97

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТОКСИФИЦИРОВАННОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA SONNEI* НА ЭТАПЕ РАЗРАБОТКИ СУБСТАНЦИИ 98
6.1. Разработка спецификации на низкомолекулярный детоксифицированный липополисахарид *Shigella sonnei* 98
6.2. Аттестация стандартного образца низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei* 101
6.3. Валидация методики определения родственных примесей 104
6.4. Валидация методики количественного определения 108
6.5. Выводы по главе 6 112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 113
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ 114
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 116
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ 117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 120
Приложение А. Акт внедрения в учебный процесс Института фармации им. А.П. Нелюбина 135
Приложение Б. Акт внедрения в производственный процесс ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России 136
Приложение В. Материальный баланс процесса получения детоксифицированного липоолигосахарида *S. sonnei* 137
Приложение Г. Материальный баланс процесса получения монофосфорилированного липида А 139
Приложение Д. Материальный баланс процесса получения триацильного дифосфорилированного липида А 141
Приложение Е. Аннотации структур липидов А по данным масс-спектрометрии 143

Приложение Ж. Паспорт стандартного образца низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei* 146

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время почти половина всех смертельных исходов от инфекционных заболеваний вызвана бактериальными патогенами; все большую опасность представляют антибиотикорезистентные бактерии, из-за которых ежегодно погибает 700 000 человек, к 2050 году ежегодная смертность может достичь 10 миллионов. 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 отличной биосовместимостью. Однако исследования показали, что полисахаридные вакцины менее иммуногенны для детей и пожилых в сравнении с подростками и взрослыми. Выработанные 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). Чтобы увеличить эффективность полисахаридных вакцин, слабо иммуногенный антиген (КПС) был присоединен ковалентной связью к высоко иммуногенному белку-носителю – так появились конъюгированные полисахарид-белковые вакцины. Конъюгация обеспечивает Т-опосредованный иммунный ответ и переключение класса вырабатываемых антител с 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. Для усиления

иммуногенности в составе полисахаридных и конъюгированных полисахарид-белковых вакцин используют адъюванты на основе алюминия. Обладая относительно высокой безопасностью, адъюванты, содержащие алюминий, зачастую неспособны вызвать сильный клеточно-опосредованный иммунный ответ.

В этой связи становится актуальной разработка новых, более эффективных бактериальных вакцин и адъювантов. Одним из наиболее мощных природных иммуностимуляторов, способных выступить в этой роли, является липополисахарид (ЛПС) – компонент клеточной оболочки и фактор вирулентности грамотрицательных бактерий. ЛПС способен активировать рецептор TLR4 (Toll-like receptor 4), который играет ключевую роль во врожденном иммунитете. Введение ЛПС вызывает выработку высокого титра протективных антител. Однако клиническое применение ЛПС в вакцинных препаратах ограничено ввиду его крайне высокой токсичности. 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 так называемых «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. В роли встроенных адъювантов исследуются химически синтезированные д-ЛА, однако их получение сопряжено с большими затратами. Полученный биотехнологическим путем д-ЛПС (например, ЛПС *Shigella sonnei*) привлекателен в качестве альтернативного встроенного адъюванта

ввиду наличия в составе углеводной части реакционноспособных аминогрупп, 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.

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 крайне 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 вариабельным 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 сопровождались 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, Приложение А) и внедрены в производственный процесс ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России (акт б/н от 31.03.2026, Приложение Б).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Строение и биологическая активность липополисахаридов грамотрицательных бактерий

ЛПС является основным компонентом наружной мембраны клеточной оболочки грамотрицательных бактерий, обеспечивает структурную целостность и выполняет барьерную функцию. ЛПС распознается иммунной системой человека и обладает высокой токсичностью – попадание даже нескольких нанограмм ЛПС в системный кровоток вызывает воспаление, лихорадку, лейкопению и повреждение кровеносных сосудов, в результате чего возможно развитие септического шока [1–3]. ЛПС включает три функционально и структурно различных фрагмента: О-специфический полисахарид (ОПС), связующий олигосахарид кора и липид А (Рисунок 1.1).

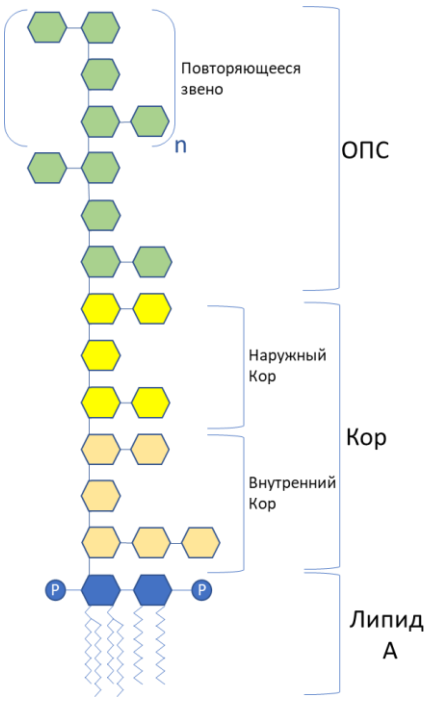


Рисунок 1.1 – Схематичная структура ЛПС грамотрицательных бактерий, где P – остаток фосфорной кислоты, n – число повторяющихся звеньев (моносахариды схематично представлены шестиугольниками)

О-специфические полисахариды

О-специфические полисахариды (ОПС, О-антигены) – наиболее вариабельные компоненты ЛПС, которые построены из олигосахаридных повторяющихся звеньев (ПЗ). Специфические моносахариды и связи между ними в О-антигенах создают уникальные эпитопы, к которым присоединяются антитела. ОПС могут быть линейными или разветвленными, их длина варьируется от 1 до 50 повторяющихся звеньев. ОПС являются важными факторами вирулентности, обеспечивая бактерии защиту против иммунной системы хозяина. Так, ОПС *Klebsiella pneumoniae* нейтрализует комплемент-опосредованный лизис бактериальных клеток [4]. Другая патогенная бактерия, *Helicobacter pylori,* продуцирует ОПС с остатками фукозы, схожий по структуре с антигенами, которые продуцирует желудочный эпителий у человека [5]. Таким образом, бактерия избегает уничтожения иммунной системой хозяина путем мимикрии поверхностных антигенов. О-антигены обеспечивают серологическую специфичность каждого штамма; разнообразие структур ОПС – основа схем серотипирования многих грамотрицательных бактерий и эпидемиологического надзора за вспышками заболеваний. Например, насчитывается не менее 181 структур ОПС для *E. coli* [6].

Изолированный из ЛПС ОПС, как и бактериальные капсульные полисахариды (КПС), является иммунологически слабым (Т-независимым) антигеном, его введение приводит к выработке IgM антител, которые быстро исчезают [7,8]. Чтобы повысить их иммуногенность, ОПС и КПС были химически конъюгированы с белками, которые обеспечивают Т-клеточный иммунный ответ, выработку IgG антител и более длительный иммунный ответ [9,10]. Это позволило разработать высокоэффективные вакцины против *Haemophilus influenzae* тип b (Hib), пневмококка, и менингококка [11,12].

Олигосахариды кора

Вторым структурным компонентом ЛПС являются олигосахариды кора, которые связывают ОПС и липид А. В составе олигосахаридов кора выделяют внутренний кор и внешний кор. Внутренний кор обычно содержит от одного до трех остатков 3-дезокси-D-манно-окт-2-улозоновой кислоты (Kdo) и от двух до трех остатков гептоз. Внутренний кор связан кислотолабильной кетозидной связью с остатком глюкозамина липида А. Внешний кор содержит гексозы (глюкозу, галактозу, маннозу) и связан с ОПС. Олигосахарид обеспечивает стабильность и низкую проницаемость бактериальной мембраны, придавая защитные функции. Кор, как и ОПС, может содержать антигенные детерминанты и распознаваться иммунной системой человека [13].

ЛПС, который включает в себя липид А, кор и два или более повторяющихся звена, носит название S-ЛПС (smooth-LPS – по характерной гладкой форме колоний, которые образуют бактерии, продуцирующие S-ЛПС). Существуют мутантные штаммы грамотрицательных бактерий, которые синтезируют ЛПС, лишенный ОПС – это так называемый R-ЛПС (rough-LPS или ЛОС, липоолигосахарид, – по характерной шероховатой форме колоний таких мутантов); ЛПС с только одним повторяющимся звеном – SR-ЛПС. R-LPS с максимально коротким кором (липид А, соединенный с 2-3 остатками Kdo, продуцируемый глубокими мутантами) называется Re-ЛПС, завершенным кором – Ra-ЛПС. Существуют и другие мутантные формы ЛПС с незавершенным кором – Rd2, Rd1, Rc, Rb (Рисунок 1.2) [14].

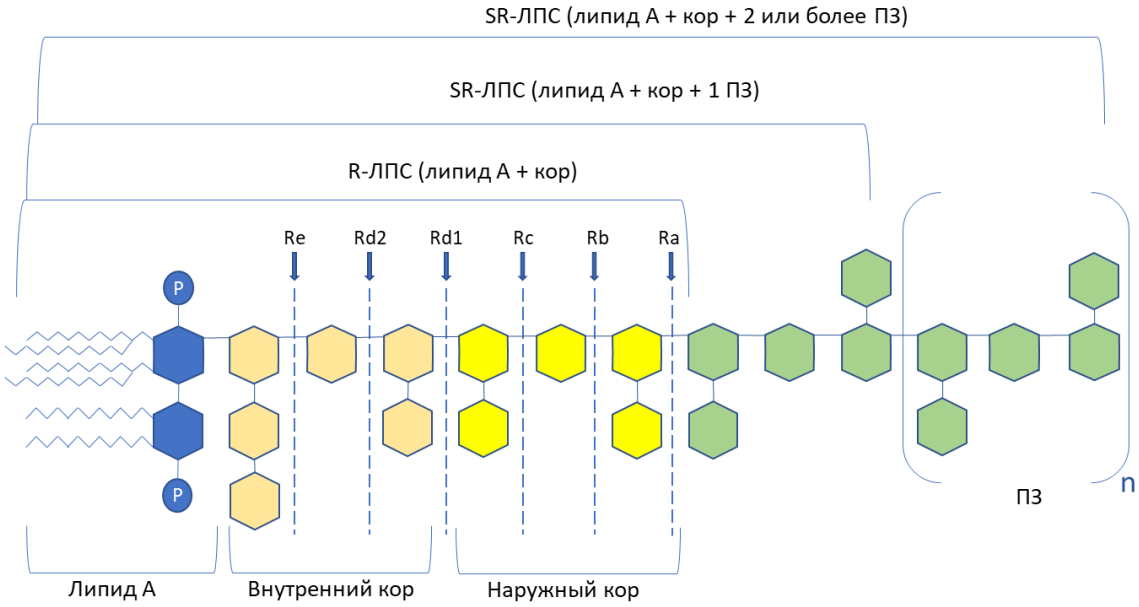


Рисунок 1.2 – Разнообразие ЛПС, различающихся по длине углеводной части, где ПЗ – повторяющееся звено

Строение липидов А

Основу липидов А составляют 2 молекулы глюкозамина (GlcN), связанных β(1→6)-связью. Восстанавливающий (проксимальный) глюкозамин (GlcN I) фосфорилирован в положении 1, дистальный (GlcN II) – в положении 4′. Вместо остатков фосфорной кислоты могут присутствовать другие заместители (амино-4-дезокси-β-L-арабиноза, 2-аминоэтилфосфат), которые влияют на иммунологические свойства ЛПС и повышают устойчивость бактериальных клеток к негативным факторам окружающей среды (например, к антимикробным пептидам) [15]. К обоим остаткам глюкозамина присоединены высшие жирные кислоты (ВЖК): в положениях 2 и 2′ – амидной связью; 3 и 3′ – сложноэфирной связью. Первичные ВЖК обычно 3-гидроксилированные с (*R*)-конфигурацией; к первичным гидроксилированным ВЖК сложноэфирной связью присоединены вторичные (ацилоксиацильные) ВЖК. Жирные кислоты в составе липидов А обычно насыщены и имеют четное (от 10 до 22) число атомов углерода. Общее число ВЖК в составе липидов А может быть различным – от 2 до 7 [16].

Именно липиды А обусловливают токсичность ЛПС [17]. Липид А активирует рецепторный комплекс TLR4/MD-2, состоящий из TLR4 и фактора

миелоидной дифференцировки 2 (MD-2 – myeloid differentiation factor). Активация этого комплекса приводит к индукции экспрессии провоспалительных цитокинов и интерферонов. Активация TLR4/MD-2 зависит от структуры липидов А: состава ВЖК, их количества, наличия заместителей при С-1 и С-4′, количества остатков фосфорной кислоты. Классический агонист TLR4/MD2 – гексаацильный дифосфатный липид А *E. coli*, имеющий в составе 6 ВЖК (4 ВЖК у GlcN II +2 ВЖК у GlcN I) и 2 остатка фосфорной кислоты. С уменьшением количества ВЖК и остатков фосфорной кислоты в липидах А снижается их токсичность для человека. Например, липид IVa – предшественник липида А, образующийся в процессе биосинтеза, содержит 4 ВЖК и 2 остатка фосфорной кислоты и не активирует комплекс TLR4/MD-2. Однако у мышей липид IVa является агонистом, поскольку структура комплекса TLR4/MD-2 мыши отличается от таковой у человека (Рисунок 1.3) [18].

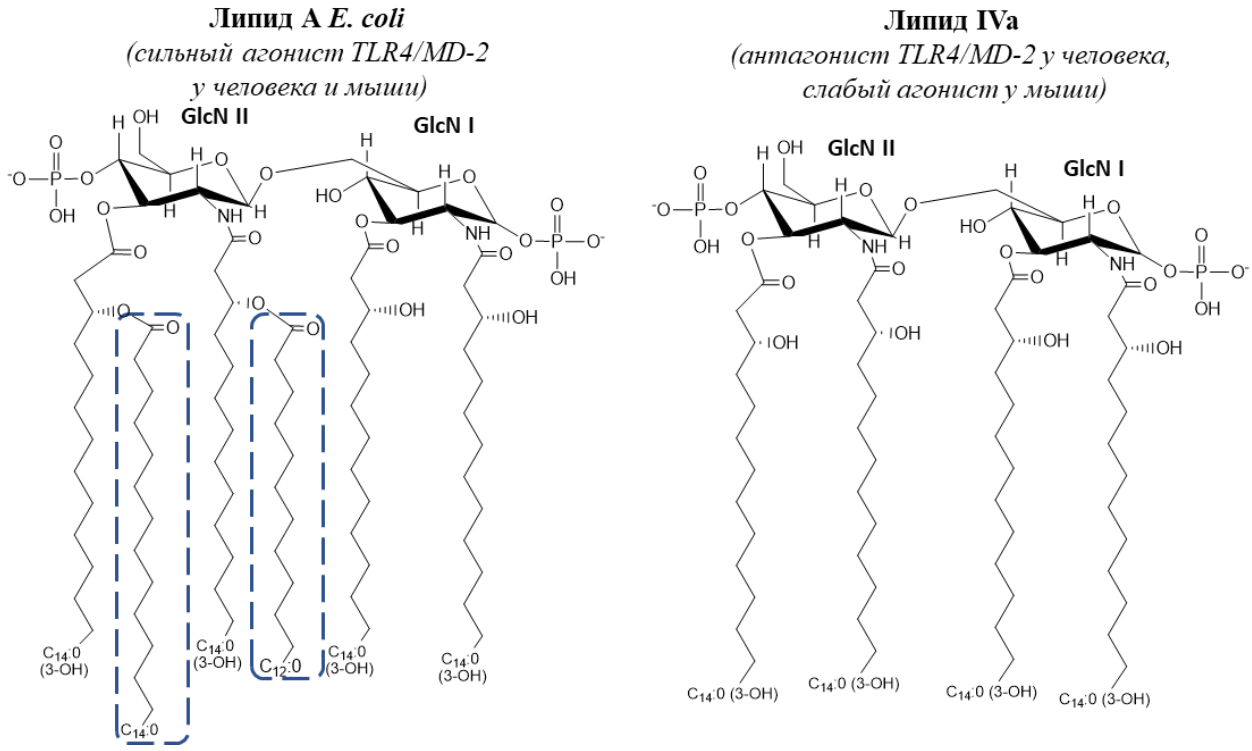


Рисунок 1.3 – Зависимость биологической активности от структуры липидов А

Иммуномодулирующая активность ЛПС и его детоксифицированных производных рассматривается не только в контексте вакцинных адъювантов, но и

в экспериментальных исследованиях противоопухолевого действия, в том числе для детоксифицированного ЛПС *Shigella sonnei* [19,20].

1.2. Способы экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий

ЛПС широко применяются как в фундаментальной, так и прикладной науке. Выделенные из грамотрицательных клеток ЛПС необходимы для установления их химического строения, биологической активности и механизмов патогенеза воспалительных заболеваний [21]. Полученные из ЛПС д-ЛПС и д-ЛА используются при разработке и производстве новых вакцин и адъювантов [22–26]. Все это обуславливает необходимость в разработке эффективных методов экстракции ЛПС высокой чистоты из клеток грамотрицательных бактерий [27].

В настоящее время для экстракции ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий используется множество методов. Они включают классический способ экстракции горячим водным фенолом (ВФ, метод Westphal) [28]; экстракцию трихлоруксусной кислотой [29,30]; водой [31,32]; пиридином [33]; раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) [34]; раствором натрия додецилсульфата (SDS) [35]; смесью петролейного эфира-фенола-хлороформа (метод Galanos) [36]; водным бутанолом [37]; tri-реагентом [38]; тритоном X-100 [39]; холодным этиловым спиртом [40]; метанолом [41], смесью аммония тиоцианата и гуанидина гидрохлорида [42].

Выбор способа экстракции ЛПС из грамотрицательных бактерий зависит от их химической структуры и физико-химических свойств. Так, S-ЛПС, ввиду более длинного углеводного фрагмента, обладает большей гидрофильностью, чем R-ЛПС, лишенный ОПС. Вследствие этого, для экстракции R-ЛПС следует использовать более гидрофобную экстрагирующую смесь (ЭС), например, фенол-хлороформ-петролейный эфир (метод Galanos). Кроме того, следует учитывать амфифильную природу ЛПС, который в водных растворах, как правило,

существует не в виде отдельных молекул, а в составе надмолекулярных агрегатов, включая мицеллы [14].

Метод Westphal

Несмотря на изобилие методов для выделения ЛПС, наиболее часто используемым остается метод водно-фенольной экстракции (ВФ), который был предложен в 1965 году [28]. Метод экстракции ВФ основан на амфифильной природе ЛПС и растворимости большинства бактериальных белков в феноле. Полисахариды, ЛПС и нуклеиновые кислоты (НК) обычно растворимы в воде и нерастворимы в феноле. Экстракция включает в себя прибавление к клеткам равных объемов воды и 90% водного фенола и перемешивание при 65-70 ºС в течение 15 минут. При такой температуре происходит гомогенизация смеси; после перемешивания клеточную суспензию охлаждают и центрифугируют – в результате бактериальные клетки оседают, а супернатант расслаивается на две фазы – водную и фенольную – между которыми находится интерфаза. Затем водный слой отбирают, диализуют против воды дистиллированной до отсутствия запаха фенола и лиофилизуют. Необходима повторная экстракция фенольной фракции водой при тех же условиях (65-70 °С в течение 15 минут), чтобы обеспечить более высокий выход ЛПС. Достоинством данного метода является достаточно высокий выход ЛПС и низкая контаминация конечного продукта белками. Было замечено, что более гидрофобные формы ЛПС (например, ЛОС) переходят в фенольную фазу [43]. В таких случаях для получения суммы S- и R-ЛПС подвергают диализу также фенольную фазу [44,45]. Выход классического варианта экстракции ВФ составляет не более 4,5% в пересчете на высушенные клетки [46]. Возможна обработка ЛПС, полученного методом ВФ, ферментами - ДНКазой, РНКазой и протеиназой К (или проназой) для уменьшения контаминации конечного продукта НК и белками, соответственно [47,48]. Недостатком метода является применение при нагревании фенола – летучего канцерогенного яда – и длительный диализ для его удаления.

Метод Galanos

Экстракция смесью петролейного эфира-фенола-хлороформа (метод Galanos) используется для выделения R-ЛПС. Предпосылкой создания такой экстрагирующей смеси было то, что при методе ВФ более гидрофильный S-ЛПС (как более гидрофильный) переходит в водную фазу, а R-ЛПС (более гидрофобный) более склонен находиться в фенольном слое/интерфазе [36]. Авторы показали успешность данного метода для выделения R-форм ЛПС; экстракция проводится при низких температурах (5-20 °С), не требуется длительный диализ и несколько циклов центрифугирования, в то же время метод нельзя отнести к промышленному ввиду использования большого объема токсичных растворителей и необходимости их упаривания.

Прочие способы экстракции

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) часто используется в качестве хелатирующего агента для дестабилизации внешней мембраны грамотрицательных бактерий. За счет связывания двухвалентных катионов (Mg^{2+}, Ca^{2+}), которые стабилизируют клеточную оболочку, ЭДТА способствует разрушению наружной мембраны и облегчает высвобождение ЛПС [34].

Экстракция ЛПС натрия додецилсульфатом (метод Darveau и Hancock) позволяет получать как S-, так и R-ЛПС [35]. Метод включает солюбилизацию бактериальных клеток в растворе, содержащем 2% натрий додецилсульфат (SDS), 0,1 М ЭДТА, 10 мМ Tris-HCI (pH 9,5); применение ферментов для очистки ЛПС и высаживание раствора ЛПС в 95% этанол, при этом происходит осаждение ЛПС. Несмотря на то, что эта процедура позволяет получить высокоочищенный ЛПС с хорошим выходом, она достаточно трудоемка. Кроме того, крайне сложно избавиться от примеси детергента (SDS), который влияет на биологические свойства ЛПС. Метод экстракции водой включает в себя нагревание клеток с водой при 100 °С в течение 15 мин, обработку экстракта протеиназой К, последующий

диализ и лиофилизацию [31,32]. Выход ЛПС и их структура при экстракции водой сильно различались для разных штаммов грамотрицательных бактерий, авторы не приводят данные о контаминации продукта нуклеиновыми кислотами.

Метод экстракции Тритоном X-100 включает инкубацию клеток в течение 10 минут в кипящей воде, содержащей тритон X-100, Tris-HCI (pH 8,0), $MgCl_2$ и последующее центрифугирование [39]. После чего осадок был растворен в воде, содержащей ЭДТА и тритон X-100; к полученной смеси был прибавлен избыток $MgCl_2$, в результате чего ЛПС выпадал в осадок. Таким образом, нагревание клеток в присутствии поверхностно-активного вещества (тритон X-100) нарушает связь ЛПС с мембранными белками; ЭДТА также способствует извлечению ЛПС из мембраны. Избыток дивалентных катионов (Mg^{2+}) приводит к агрегации ЛПС и его осаждению.

Для экстракции ЛПС была предложена ЭС, содержащая ЭДТА, триэтиламин (ТЭА), 5% фенол [49]. ЭДТА легче удалить диализом, чем другие детергенты - натрия додецилсульфат или Triton-X-100. Фенол нарушает связь ЛПС с мембранными белками, ТЭА образует с ЛПС хорошо растворимые соли [50,51].

Раствор, содержащий фенол и гуанидина изотиоцианат, который обычно используется для выделения РНК, ДНК и белков, был также применен и для выделения ЛПС из небольшого количества (порядка 10 мг) клеток [38]. Гидрофобный R-ЛПС, продуцируемый некоторыми мутантными штаммами *E. coli, S. enterica*, был успешно проэкстрагирован метанолом [41]. Также для экстракции ЛПС была использована смесь метанол:хлороформ:петролейный эфир (3-5):(1-2):(5-7) при комнатной температуре, после чего ЛПС был осажден из смеси прибавлением метанола. Перед началом экстракции ЛПС бактериальные клетки были промыты 95% этанолом для удаления фосфолипидов [52].

Экстракция ЛПС с применением раствора T-sol (содержит тиоцианат аммония и гидрохлорид гуанидина), служащем в качестве хаотропного агента, приводит к более высокому выходу S-ЛПС. Процедура включает перемешивание клеток с ЭС, центрифугирование, высаживание ЛПС в этанол и дальнейшую обработку ЛПС ДНКазой, РНКазой и протеиназой К (в присутствии 1% SDS) [42].

1.3. Методы получения детоксифицированных производных липополисахаридов

При изучении иммунологических свойств липидов А различных грамотрицательных бактерий было установлено, что при уменьшении числа ВЖК и фосфатных групп в липиде А снижается его токсичность для человека [53]. Детоксификация ЛПС достигается путем удаления остатков ВЖК или фосфорной кислоты в липиде А (Рисунок 1.4).

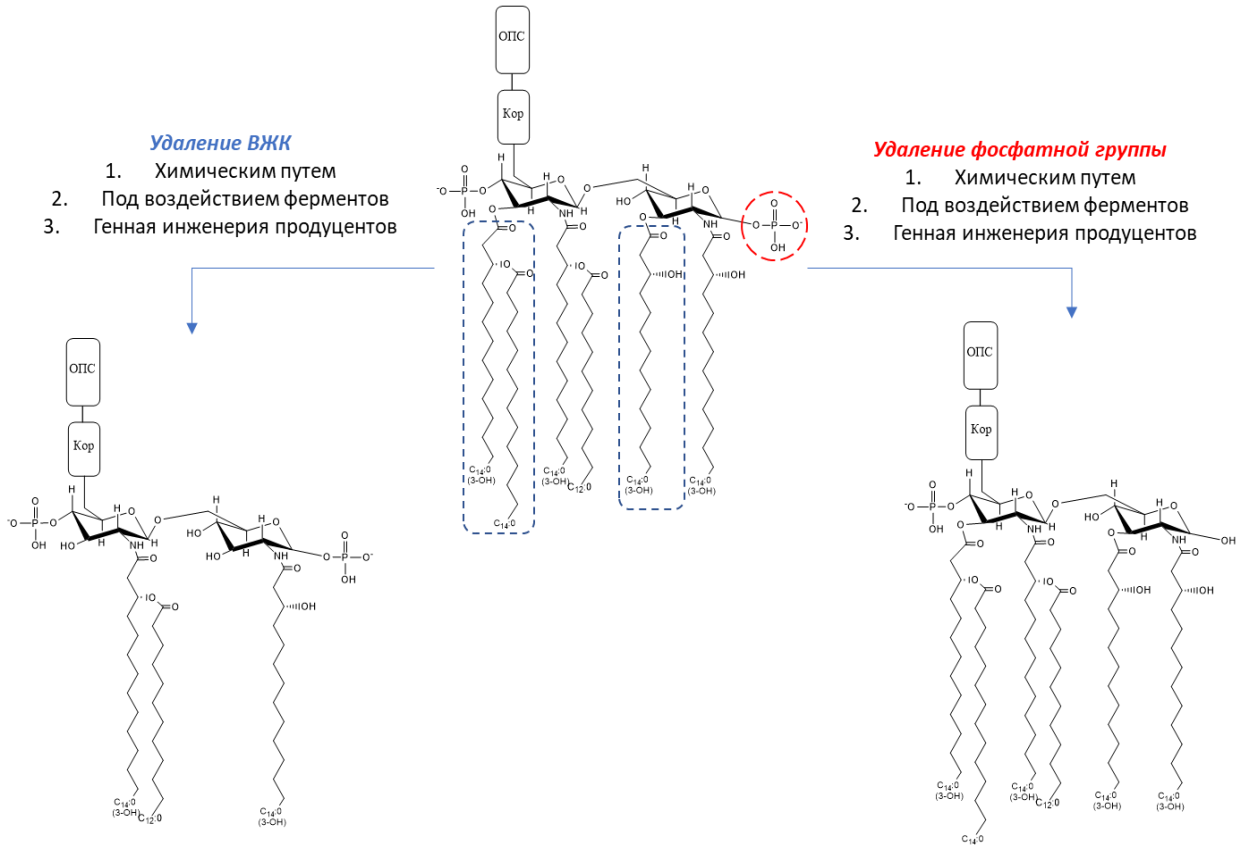


Рисунок 1.4 – Способы детоксификации ЛПС

Начиная с середины XX века предпринимались попытки детоксификации ЛПС различными способами: с помощью химической модификации, обработки ферментами или генной инженерии продуцентов. Однако полученные детоксифицированные ЛПС обладали либо слишком высокой токсичностью, либо неприемлемо низкой иммуногенностью [54,55].

Путем генетической модификации штаммов *H. influenzae, B. Pertussis* и *N. meningitidis* была получена смесь пента- и тетраацильных производных R-ЛПС и S-ЛПС, которые сохраняют высокий уровень токсичности и, таким образом, не могут быть применены в качестве вакцинных препаратов [54,56,57]. Другой подход к удалению остатков ВЖК включает применение ферментативного гидролиза с использованием ацилоксиацилгидролаз, которые удаляют вторичные ВЖК из ЛПС. Однако выделенная из клеточной линии промиелоцитов HL-60 ацилоксигидролаза удаляет лишь 80–90% вторичных ВЖК. Конечный препарат представляет собой пирогенную смесь тетра-, пента- и гексаацильных производных ЛПС [55].

Возможно удаление остатков ВЖК из ЛПС путем щелочного гидролиза сложноэфирных связей, которыми связаны первичные и вторичные ВЖК в липиде А. Эта реакция проводится в воде или в органических растворителях при щелочной реакции среды (достигается различными агентами – аммиаком, щелочами, гидразином и т.д.). При щелочной обработке сохраняется углеводная часть ЛПС (кетозидная связь не разрушается), остатки фосфорной кислоты у GlcN I и GlcN II (необходимые для активации комплекса TLR4/MD-2) и антигенные детерминанты в составе углеводной части. Недавно был описан удобный метод детоксификации ЛПС в присутствии детергентов (дезоксихолата или додецилсульфата натрия), что позволяет проводить реакцию щелочного омыления при полном демицеллировании ЛПС. Проведение реакции в демицеллирующих условиях при повышенной температуре позволяет достичь высокой степени избирательности и воспроизводимости процесса.

Удаление остатков фосфорной кислоты из липида А в составе ЛПС возможно генно-инженерным методом за счет введения гена фосфатазы lpxE в клетки *E. coli* [58]. ЛПС, выделенные из клеток *E. coli* O111:B4, были детоксифицированы щелочной фосфатазой, полученной из слизистой оболочки кишечника быка, при 37 °C в течение 4 ч, после чего фермент был инактивирован нагреванием до 80 °C в течение 10 мин [59].

Для удаления остатка фосфорной кислоты из липида А химическим путем ЛПС подвергают обработке 47% водной HF при 4 °C в течение 24 ч [60]. Очевидно, что условия этой реакции трудно назвать масштабируемыми. Кроме того, кислотный гидролиз фосфодиэфирной связи в липиде А затруднен ввиду наличия кислотолабильной кетозидной связи между липидом А и кором.

Разработка и внедрение в производство новых штаммов-продуцентов методами генетической инженерии требует значительных затрат; применение ферментов в производстве также сопряжено с рядом трудностей: их высокой ценой, низкой стабильностью, необходимостью создания строгих условий катализируемых ими реакций и затруднительностью их регенерации и повторного использования [61,62]. Щелочная детоксификация ЛПС с удалением остатков ВЖК в липиде А отличается простотой и не приводит к разрушению эпитопов в углеводной части.

1.4. Методы получения детоксифицированных липидов А

Поскольку в составе ЛПС именно липид А является активатором иммунной системы, множество усилий было направлено на его выделение и детоксификацию. Первый д-ЛА был получен группой E. Ribi в 1970-х годах. Он представляет собой монофосфорилированный гептаацильный липид А, полученный жестким кислотным гидролизом ЛПС дикого серовара *Minnesota Re595 Salmonella enterica*. Такая обработка приводит к удалению одного остатка фосфорной кислоты у GlcN I и разрушению кетозидной связи между липидом А и углеводной частью ЛПС. В дальнейшем полученный монофосфорилированный гептаацильный липид А для дополнительного снижения токсичности был подвергнут мягкой щелочной обработке, чтобы удалить гидроксимиристиновую кислоту в 3-м положении GlcN I. Конечный продукт – гексаацильный монофосфорилированный липид А (МФЛ) – стал первым адъювантом, который был одобрен для клинического применения впервые после солей алюминия (Рисунок 1.5).

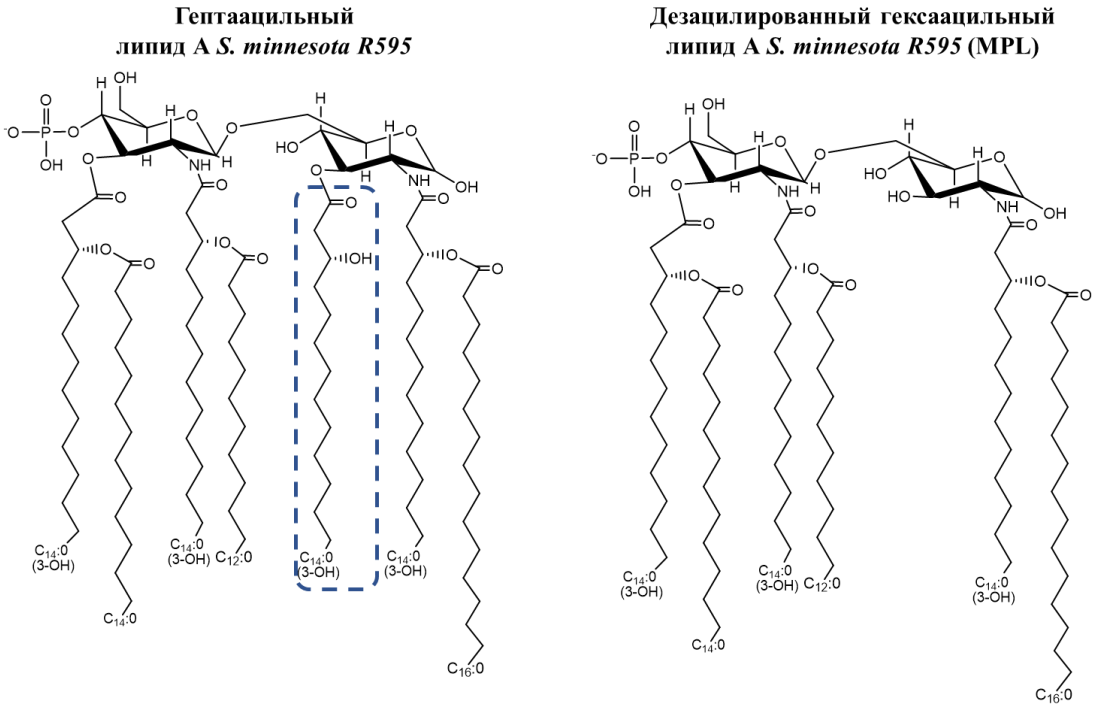


Рисунок 1.5 – Структура липидов А, полученных из *Minnesota Re595 Salmonella enterica*

Ввиду своей высокой гидрофобности МФЛ чаще всего используется в составе адъювантных систем – эмульсий или липосом [63]. Промышленное получение МФЛ из *S. minnesota Re595* включает промывание бактериальных клеток этанолом и метанолом (для удаления примеси фосфолипидов) и последующую экстракцию высоко гидрофобного ЛПС смесью хлороформ/метанол/вода (78 : 22 : 1, о/о). Полученный ЛПС гидролизуют 0,1 М HCl при 100 °С в течение 30 мин. Мягкий щелочной гидролиз полученного MLA проводится в смеси хлороформ/метанол (2 : 1, о/о, pH 10,5) при 50 °С в течение 20 мин [64,65]. МФЛ был получен из содержащей ЛПС культуральной жидкости бактерии *E. coli* K*4/EcK4r3* путем гидролиза при 90 °С в течение 2 ч после подкисления HCl до pH 2,75 ± 0,05. Полученный в результате такого гидролиза препарат содержал смесь липидов А, содержащих от 3 до 6 остатков ВЖК и от 1 до 2 остатков фосфорной кислоты. Эта смесь была в дальнейшем детоксифицирована путем перемешивания с 48% раствором HF при 5 °С в течение 48 ч, что привело к удалению остатка фосфорной кислоты у GlcN I [66].

Представляет интерес выделение МФЛ из клеток мутантного штамма *E. coli,* который продуцирует преимущественно монофосфорилированный гексаацильный липид А за счет введения гена фосфатазы lpxE, удаляющей остаток фосфорной кислоты у GlcN I в процессе биосинтеза ЛПС. Получение МФЛ из мутантного штамма включает в себя использование смеси хлороформ/метанол/вода (1 : 2 : 0,8, о/о) для экстракции ЛПС с дальнейшим мягким кислотным гидролизом ЛПС при 100 °С в 12,5 мМ растворе натрия ацетата (pH 4,5) [67]. В работе других авторов МФЛ продуцировался в мутантных штаммах без углеводной части и сразу был экстрагирован аналогичной смесью (хлороформ/метанол/вода – 1 : 2 : 0,8, о/о) без последующего гидролиза [68].

Полученный биотехнологическим путем МФЛ обычно представляет собой смесь монофосфорилированных липидов А, которые содержат от 3 до 6 остатков ВЖК, их количественное соотношение определяет иммунологическую активность препарата [69]. Согласно Европейской Фармакопее, содержание тетраацильного липида А должно составлять 15–35%; пентаацильного липида А – 35–60%, гексаацильного липида А – 20–40%, гептаацильного липида А – менее 0,5% [70]. Синтетические аналоги МФЛ содержат лишь один активный компонент и могут быть конъюгированы с другими антигенами, выполняя роль встроенного адъюванта [71–73].

Другое направление получения д-ЛА включает удаление остатков ВЖК из липида А с сохранением обоих остатков фосфорной кислоты. Такой триацильный дифосфорилированный липид А был выделен из *E. coli* и получил название ОМ-174 (Рисунок 1.6) [74].

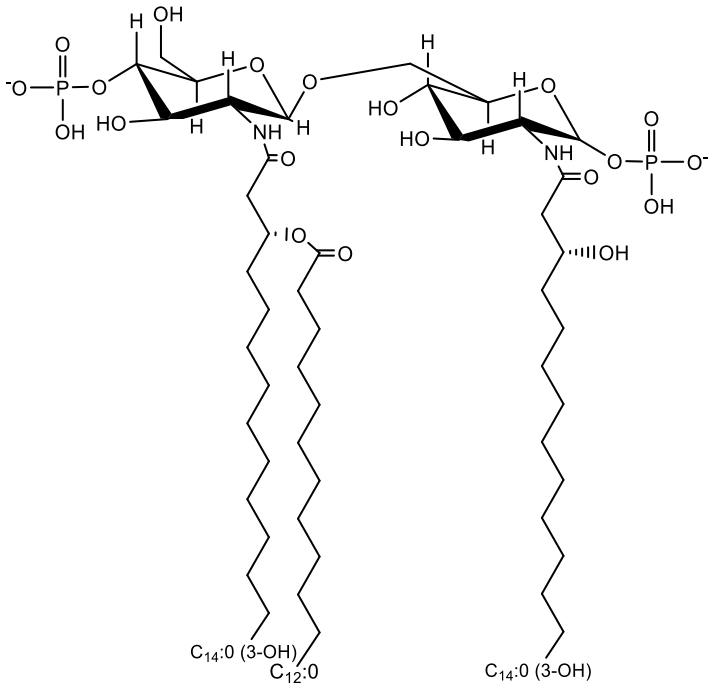


Рисунок 1.6 – Структура ОМ-174

ОМ-174 получают в результате мягкой щелочной (pH 12,2) обработки ЛПС, липидов А или бактериальных клеток. После обработки клеток и ЛПС необходима стадия кислотного гидролиза (pH 3,5) для отделения липида А от углеводной части. Щелочной гидролиз липида А применяется также при изучении распределения ВЖК. Было установлено, что удаление ВЖК в ходе щелочного гидролиза липида А происходит в следующем порядке: первичные ВЖК, связанные сложноэфирной связью > вторичные ВЖК у первичной ВЖК, связанной с GlcN сложноэфирной связью > вторичные ВЖК у первичной ВЖК, связанной с GlcN амидной связью > первичные ВЖК, связанные амидной связью [75]. ОМ-174 также был получен синтетическим путем [76,77].

1.5. Методы анализа липополисахаридов, детоксифицированных производных липополисахаридов и липидов А

Таким образом, как ЛПС, так и д-ЛПС, д-ЛА, полученные биотехнологическим путем, представляют собой смесь молекул, характеризующихся структурной неоднородностью. Именно поэтому необходим

правильный подбор методов для установления структуры продуктов при разработке новых методов экстракции ЛПС и получения д-ЛПС и д-ЛА. Анализ структуры ЛПС и д-ЛПС сводится к двум стратегиям – анализ целого ЛПС или его разделение путем кислотного гидролиза на интересующие участки (липид А и углеводную фракцию, включающую кор и ОПС) и их последующий анализ (Рисунок 1.7).

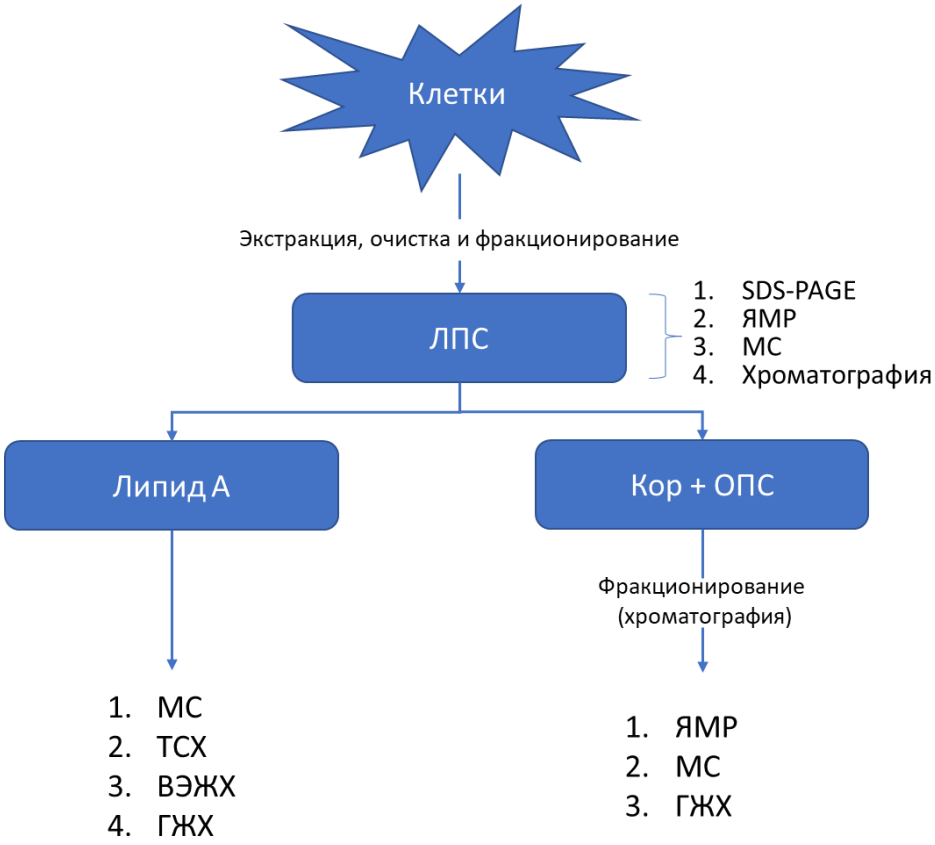


Рисунок 1.7 – Общая схема анализа структуры ЛПС

Отделение липида А от углеводной части возможно с помощью мягкого кислотного гидролиза, при котором разрушается кетозидная связь между GlcN II липида А и остатком Kdo кора [38]. Наиболее часто используют мягкий кислотный гидролиз ЛПС 1-2% уксусной кислотой (AcOH) в течение 1-2 часов при нагревании до 100 °C. Жесткий гидролиз, например, 0,1 М соляной кислотой при 100 °C может привести к частичному дефосфорилированию и *O*-деацилированию липида А [78,79]. Кислотный гидролиз ЛПС в более мягких условиях при pH 4,5 и наличии

солюбилизирующего (демицеллирующего) агента (додецилсульфата натрия) позволяет сохранить фосфатные группы (а также другие заместители в положениях 1 и 4´) в составе липида А [80]. Эта же методика была реализована и для гидролиза не изолированного ЛПС, а для бактериальных клеток, содержащих ЛПС. После гидролиза липид А был извлечен из клеток двухфазной системой Bligh-Dyer хлороформ-метанол-вода (3:2:0,25, о/о), после чего нижняя (органическая, содержащая липид А) фаза была упарена, а сухой остаток повторно экстрагирован двухфазной смесью Bligh-Dyer. Перед гидролизом для извлечения примеси глицерофосфолипидов клетки были обработаны однофазной смесью Bligh-Dyer (хлороформ:метанол:вода - 1:2:0.8, о/о) [81].

Для получения липида А был предложен и метод непосредственно гидролиза ЛПС в составе бактериальных клеток смесью изомасляной кислоты с 1 М аммония гидроксидом (5:3, о/о, в течение 2 ч при 100 °С) [79]. Другой пример мягкого кислотного гидролиза – обработка ЛПС смесью 0,01 М триэтиламин-уксусная кислота (1:1 - молярное соотношение, pH 3,6) при 100 °С в течение 1 часа [82].

Выделившийся липид А анализируют методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и масс-спектрометрией (МС). В качестве неподвижной фазы выступает силикагель, состав подвижной фазы различен, обычно используют системы хлороформ/метанол/вода/аммиак (40:25:4:2, о/о) или хлороформ/пиридин/88% муравьиная кислота/метанол/вода (60:35:10:5:2, о/о). Для детектирования используют 10% раствор серной кислоты в этаноле и нагревание пластины до 145 °С [83]. Масс-спектрометрия позволяет получить информацию о составе ВЖК и заместителей при С-1 и С-4´ в липиде А [18].

Для определения структуры липида А все большее значение приобретает тандемная масс-спектрометрия (МС/МС). Фрагментация ионов-предшественников позволяет сделать выводы о составе ВЖК и заместителей [84]. Поскольку эффекты подавления ионов могут влиять на относительную интенсивность сигналов, соответствующим различным липидам А, некоторые формы липидов А могут не детектироваться. Поэтому перед масс-спектрометрическим детектированием желательно предварительное разделение смеси липидов А с помощью

хроматографических методов, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или сверхкритическая флюидная хроматография [85,86]. Применение ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) позволяет оценить качественный и количественный состав различных вариантов липидов А в анализируемой смеси.

Возможно также проведение анализа липида А методом ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием, однако это затруднительно, поскольку липид А не обладает значительным поглощением в данной области. После предварительной дериватизации липида А путем метилирования диазометаном при комнатной температуре возможно детектирование полученных метилированных производных с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ-УФ при длине волны 210 нм и линейным градиентом: 20-80% пропанол-2 в ацетонитриле в течение 60 минут [87]. Однако данная методика отличается довольно низкой чувствительностью; добиться более высокой чувствительности помогает дериватизация липида А динитробензилоксиамином и добавление в подвижную фазу (ПФ) ион-парного реагента (например, дигидрофосфата тетрабутиламмония) [88]. Липид А также возможно дериватизировать флюоресцентной меткой (гидразидом дансила) с последующим разделением обращенно-фазовой ВЭЖХ и детектированием флюоресцентным детектором (длина волны возбуждения 345 нм и эмиссии 515 нм) [89]. Липид А также был количественно определен обращенно-фазовой ВЭЖХ с детектором испарительного рассеяния света (ELSD) – этот метод характеризуется большой чувствительностью и отсутствием дериватизации [90].

Углеводную часть (ОПС и кор), полученную после гидролиза, обычно разделяют с помощью эксклюзионной хроматографии и полученные фракции анализируют с помощью одномерной и двумерной ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, а также масс-спектрометрии [18].

Альтернативным подходом к изучению структуры углеводной части ЛПС является последовательная обработка ЛПС гидразином (37 °C, 30 мин) для *O*-деацилирования, затем щелочью (4 М KOH, 120 °C, 16 часов) – для *N*-деацилирования. Это приводит к удалению всех ВЖК из липида А и получению

только углеводной части ЛПС (включающую углеводные остатки глюкозамина из липида А) для последующего анализа методом спектроскопии ^{1}H-ЯМР [91]. Тем не менее, следует соблюдать осторожность, поскольку некоторые связи (фосфодиэфирные, сложноэфирные) могут разрушаться при жесткой щелочной обработке. Для решения этой проблемы получают и анализируют только *О*-деацилированный продукт [92].

Помимо ЯМР и МС, используется также и газожидкостная хроматография (ГЖХ) для установления моносахаридного и жирнокислотного состава ЛПС. Углеводные фрагменты ЛПС после дериватизации исследуют в виде *О*-метилгликозидов, бутил- или октил-гликозидов и ацетатов альдитола [93–95]. Состав ВЖК устанавливают по изучению метиловых эфиров ВЖК [96]. Все эти методы полезны в случаях, если интерпретация масс-спектров и ^{1}H-ЯМР-спектров затруднительна.

Для фракционирования экстрагированного ЛПС по молекулярной массе применяют гель-проникающую хроматографию в присутствии детергента (который разрушает мицеллы ЛПС), что позволяет фракционировать ЛПС по размеру. В качестве демицеллирующих агентов могут выступать SDS, Triton X-100 и дезоксихолат натрия [37,97]. Целый, не деградированный ЛПС возможно анализировать несколькими методами, включая масс-спектрометрию, хроматографию, спектроскопию ЯМР и электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) [98–101].

1.6. Выводы по главе 1

1. Рассмотрены особенности строения и биологической активности липополисахаридов грамотрицательных бактерий как амфифильных биополимеров, включающих липид А, кор и О-специфический полисахарид, где углеводная часть определяет серологическую специфичность, а липид А является основным структурным фрагментом, определяющим распознавание ЛПС рецепторным комплексом TLR4/MD-2.

2. Показана связь структуры липида А с токсическими и иммуномодулирующими свойствами ЛПС: уменьшение числа остатков высших жирных кислот и фосфорной кислоты снижает токсичность, однако требует подбора условий детоксификации для сохранения биологической активности продукта.

3. Проанализированы основные методы экстракции ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий и отмечены ограничения классических подходов, включая токсичность применяемых реагентов, длительность процесса и трудности масштабирования.

4. Обоснована практическая значимость химического способа детоксификации как технологически перспективного подхода к получению д-ЛПС и д-ЛА, основанного на направленной модификации липида А.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В качестве исходного биологического материала использовали инактивированную лиофильно высушенную клеточную массу грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* M-17, *Shigella sonnei*, фаза I, *Shigella boydii* 6 и *Salmonella typhi*, предоставленную биобанком ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России.

Клеточная масса *Escherichia coli* O157 представляла собой сухой мелкодисперсный порошок светло-бежевого цвета, без видимых посторонних включений. Объект использовали как модельный источник ЛПС для сравнительной оценки методов экстракции.

Клеточная масса *Escherichia coli* M-17 представляла собой сухой порошкообразный материал желтовато-бежевого цвета с отдельными рыхлыми агрегатами. Объект использовали как источник ЛПС для оценки эффективности экстракции 50% водным пропанолом и смесью бутанол–пропанол–вода, а также для анализа молекулярно-массового распределения выделенных фракций.

Клеточная масса *Shigella sonnei*, фаза I, представляла собой сухой рыхлый порошкообразный материал желтовато-бежевого цвета, состоящий из мелких частиц и фрагментов лиофилизата. Объект использовали как основной источник ЛПС для получения низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида и последующей разработки подходов к стандартизации субстанции.

Клеточная масса *Shigella boydii* 6 представляла собой сухой порошкообразный материал бежево-коричневого цвета, склонный к образованию рыхлых агрегатов при хранении. Объект использовали для дополнительной оценки водно-спиртовых методов экстракции ЛПС и для оптимизации условий щелочной детоксификации водным аммиаком.

Клеточная масса *Salmonella typhi* представляла собой сухой порошкообразный материал желтовато-коричневого цвета, содержащий отдельные более плотные фрагменты лиофилизата. Объект использовали как источник ЛПС для отработки условий жесткого кислотного гидролиза и получения монофосфорилированного липида А.

В отдельных сериях опытов использовали выделенные ранее субстанции ЛПС, детоксифицированных ЛПС и липидов А, полученные на промежуточных стадиях исследования и применявшиеся как объекты для дальнейшей химической модификации, анализа и стандартизации.

2.2. Оборудование и реактивы

При проведении исследований использовали следующие материалы:

1. Реактивы:

вода очищенная (соответствует требованиям ФС.2.2.0020 «Вода очищенная» ГФ РФ XV издания);

фенол кристаллический (ч.д.а., Компонент-Реактив, Россия);

этанол 95% (АО «САМАРАМЕДПРОМ», Россия);

н-пропанол (х.ч., Компонент-Реактив, Россия);

н-бутанол (х.ч., Компонент-Реактив, Россия);

метанол (х.ч., Химмед, Россия);

хлороформ (х.ч., Ленреактив, Россия);

уксусная кислота ледяная (х.ч., Ленреактив, Россия);

соляная кислота концентрированная (хч, Симга Тек, Россия);

трихлоруксусная кислота (х.ч., Ленреактив, Россия);

хлорная кислота (х.ч., Ленреактив, Россия);

гидроксид натрия (х.ч., Ленреактив, Россия);

аммиак водный 25% (ч.д.а., Симга Тек, Россия);

дезоксихолат натрия (98,5%, neoFroxx, Индия);

бикарбонат аммония (аммоний углекислый кислый) (ч., Ленреактив, Россия);

трис(гидроксиметил)аминометан (Tris) (≥99%, Servicebio, Китай);

ЭДТА (99%, AppliChem, Германия);

ацетат натрия тригидрат (USP pure, pharma grade, Acros Organics, США);

лимонная кислота безводная (99%, Acros Organics, США);

триэтиламин (х.ч., Ленреактив, Россия);

додецилсульфат натрия (99%, Panreac, Германия);

таблетки фосфатно-солевого буфера – 1 таблетка для приготовления 0,01 М фосфатного буфера с pH 7,4–7,6, содержащего 0,137 М хлорида натрия и 0,0027 М хлорида калия (ЭКО-Сервис, Россия);

РНКаза I-a (R4875, Sigma-Aldrich, США);

ДНКаза I бычья панкреатическая (DN25, Sigma-Aldrich, США);

Протеиназа К, 30 ед/мг белка (P2308, Sigma-Aldrich, США);

готовый реагент Бредфорда для определения белка в диапазоне 1–1400 мкг/мл (B6916, Sigma-Aldrich, США);

бычий сывороточный альбумин (99%, Диаэм, Россия);

2,5-дигидроксибензойная кислота (99%, Acros Organics, США);

дейтерированная вода D_2O (99,8%, Кемикал Лайн, Россия).

2. Расходные материалы:

стекловолоконные фильтры Whatman Grade GF/A, размер удерживаемых частиц 1,6 мкм (Whatman, США);

мембрана для диализа с пределом отсечения 14 кДа (Roth, Германия);

пластины ТСХ, силикагель 60, на стекле (Merck, США);

хроматографический сорбент Sephadex G-50 Medium (GE Healthcare, США);

мембранные кассетные модули для ультрафильтрации с пределом отсечения 5, 10, 100 кДа (Владисарт, Россия);

колонка хроматографическая TSKgel G3000PWxl (Tosoh Bioscience, Япония).

3. Оборудование:

спектрофотометр NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США);

масс-спектрометр Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker, США);

масс-спектрометр MicrOTOF II (Bruker Daltonics, США);

ЯМР-спектрометр Bruker Avance II 600 MHz (Bruker, США);

центрифуга высокоскоростная с охлаждением (Avanti J-30I, Beckman Coulter, США);

жидкостный хроматограф Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014 (Хроматэк, Россия);

лиофильная сушилка FreeZone 2.5 (Labconco, США);

роторный испаритель Rotavapor R-200 (Buchi, Германия);

pH-метр F20-Standard, FiveEasy (Mettler Toledo, США);

ультразвуковая ванна Elmasonic Select 60 (Elma, Германия).

2.3. Экстракция липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий

Экстракция смесью бутанол-пропанол-вода

Готовили экстрагент добавлением н-пропанола к двухфазной смеси воды и н-бутанола в соотношении 1:1 (об.) до ее полной гомогенизации (соотношение при 25 °С, комнатной температуре, – 10:10:8,6 – н-бутанол:вода:н-пропанол – о/о). К 10 г сухих измельченных бактериальных клеток добавляли 300 мл экстрагента и проводили экстракцию перемешиванием на магнитной мешалке при температуре 37 °С или 60 °С в закрытой реакционной емкости в течение 16 часов. Охлажденную до комнатной температуры смесь подвергали центрифугированию (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С), осадок перемешивали с 300 мл воды в течение 30 минут, центрифугировали (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С), объединенные супернатанты разводили в 10 раз и очищали от низкомолекулярных примесей с помощью диафильтрации на мембране с пределом отсечения 100 кДа, концентрат лиофилизовали.

Экстракция 50% водным пропанолом

К 10 г сухих измельченных бактериальных клеток добавляли 300 мл смеси пропанол-1:вода 1:1 (об.), реакционную смесь интенсивно перемешивали при 60 °С в течение 1 или 16 часов в закрытой реакционной емкости. По окончании экстракции клетки отделяли центрифугированием (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С). Полученный супернатант упаривали досуха, перерастворяли в 50 мл воды и лиофилизовали.

Водно-фенольная экстракция

Готовили 90% водный фенол непосредственно перед экстракцией смешиванием кристаллического фенола и воды очищенной в массовом соотношении 9:1 при нагревании до получения однородной жидкости. Затем 10 г высушенных бактериальных клеток суспензировали в 150 мл воды очищенной, полученную суспензию при перемешивании нагревали в закрытой реакционной емкости на магнитной мешалке с подогревом до 68 °С, после чего добавляли равный объем 90% водного фенола, доводили температуру до 68 °С и продолжали экстракцию при 68 °С в течение 20 минут. После окончания экстракции реакционную смесь охлаждали и диализовали против воды очищенной в течение 3 суток, меняя воду два раза в день. Ретентат был профильтрован через стеклянный фильтр, чтобы удалить клеточные стенки, и лиофилизован.

2.4. Очистка липополисахаридов

Высаживание трихлоруксусной кислотой

Неочищенный ЛПС растворяли в воде в концентрации 10 мг/мл. К полученному раствору неочищенного ЛПС по каплям при перемешивании добавляли 50% раствор CCl_3COOH до pH 2,0, осадок, содержащий примеси белков

и нуклеиновых кислот, отделяли центрифугированием (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С), супернатант диализовали против воды и лиофилизовали.

Ферментативная обработка

Неочищенный ЛПС растворяли в буфере PBS в концентрации 5 мг/мл, при необходимости корректируя pH до 7,2-7,4. В полученный раствор прибавляли ферменты РНКазу (1,0 мг на 100 мл смеси) и ДНКазу (1,0 мг на 100 мл смеси). Колбу с раствором помещали в термостат и инкубировали, при перемешивании на магнитной мешалке, в течение 10-16 часов при 36-38 °С. По окончании реакции к полученному раствору добавляли Трилон Б до конечной концентрации 0,01 моль/л. Доводили pH до 7,2 – 7,4 10% раствором NaOH. Затем в смесь вносили протеиназу К (1,0 мг на 100 мл смеси). Полученный раствор термостатировали, перемешивая на магнитной мешалке при 56-58 °С в течение 3-4 часов, после чего реакционную смесь охлаждали, диализовали и лиофилизовали.

2.5. Экстракция примесей фосфолипидов 95% этанолом

Из клеток грамотрицательных бактерий

Высушенные бактериальные клетки суспензировали в 95% этаноле в соотношении 400 мл экстрагента на 20 г клеток. Проводили экстракцию перемешиванием на магнитной мешалке при температуре 50 °С в закупоренном сосуде в течение 1 часа. Клетки отделяли центрифугированием (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С) и экстракцию повторяли дважды. От каждого спиртового супернатанта отбирали аликвоту, упаривали досуха, и анализировали методом ТСХ. Клетки после экстракции суспензировали в воде и лиофилизовали. Выход составил 85%.

Из липополисахаридов

Высушенный лиофильно ЛПС суспензировали в 95% этаноле в соотношении 200 мл экстрагента на 500 мг ЛПС. Проводили экстракцию перемешиванием на магнитной мешалке при температуре 50 °С в закупоренном сосуде в течение 1 часа. ЛПС отделяли центрифугированием (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С). Экстракцию повторяли трехкратно. От каждого спиртового супернатанта отбирали аликвоту, упаривали досуха и анализировали методом ТСХ. Осадок ЛПС растворяли в воде и лиофилизовали. Выход составил 78%.

2.6. Кислотный гидролиз липополисахаридов

Гидролиз 2% уксусной кислотой

ЛПС растворяли в 2% уксусной кислоте (AcOH) в концентрации 5 мг/мл. Полученный раствор инкубировали в закупоренном сосуде при температуре 100 °С в течение 60 минут. По окончании гидролиза реакционную смесь охлаждали и центрифугировали (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С). Супернатант, содержащий углеводную фракцию ЛПС, лиофилизовали. Осадок, содержащий липид А, промывали водой для удаления остаточного количества водорастворимых компонентов и снова центрифугировали (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С), после чего осадок лиофилизовали.

Гидролиз соляной кислотой

ЛПС растворяли в 0,2 М соляной кислоте (HCl) в концентрации 10 мг/мл. Полученный раствор инкубировали в закупоренном сосуде при температуре 100 °С в течение 30-60 минут. По окончании гидролиза реакционную смесь охлаждали и центрифугировали (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С), удаляли супернатант. Осадок, содержащий липид А, промывали водой для удаления остаточного

количества водорастворимых компонентов и снова центрифугировали (22 000 g в течение 20 минут при 4 °C), после чего осадок лиофилизовали.

Гидролиз в буфере лимонная кислота/триэтиламин

Буфер приготовляли путем растворения безводной лимонной кислоты (в концентрации 0,01 М или 0,1 М) и последующего титрования триэтиламином до заданных значений pH. ЛПС растворяли в полученном буфере в концентрации 10 мг/мл. Полученный раствор инкубировали в закупоренном сосуде при температуре 100 °C в течение 60 минут. По окончании гидролиза реакционную смесь охлаждали и лиофилизовали. Лиофилизат экстрагировали метанолом для удаления цитрата триэтиламмония, после чего центрифугировали (22 000 g в течение 20 минут при 4 °C). Осадок, содержащий липид А, лиофилизовали.

2.7. Детоксификация липополисахаридов и липида А

Липополисахаридов в демицеллирующих условиях

ЛПС растворяли в буфере (0,2% дезоксихолат натрия, 0,1 М бикарбонат аммония, аммиак до pH 10,2) в концентрации 10 мг/мл. Проводили реакцию при перемешивании на магнитной мешалке при температуре 50 °C в закупоренном сосуде в течение 24 - 40 часов. По окончании реакции охлажденную до комнатной температуры реакционную смесь лиофилизовали. Лиофилизат экстрагировали 95% этанолом в соотношении 4:1 (объем экстрагента, мл : масса исходного ЛПС, мг). Осадок отделяли центрифугированием (22 000 g в течение 20 минут при 4 °C), перерастворяли в концентрации 10 мг/мл (по отношению к исходной массе ЛПС) и высаживали в восьмикратный объем 95% этанола, подкисленного уксусной кислотой (1 мл на 100 мл). Осадок отделяли центрифугированием (22 000 g в течение 20 минут при 4 °C), перерастворяли в воде, диализовали против воды и лиофилизовали.

Липополисахаридов водным раствором аммиака

ЛПС растворяли в 12,5% растворе аммиака (приготовляли смешиванием равных объемов 25% водного аммиака, ч.д.а. и воды) в концентрации 10 мг/мл. Реакцию проводили в герметично запаянных ампулах при покачивании при 50 °С в течение 1, 2, 3, 4 часов. По окончании реакции смесь высаживали в восьмикратный объем 95% спирта этилового, отделяли супернатант центрифугированием (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С), осадок перерастворяли в воде и лиофилизовали.

Липополисахаридов смесью бутанол-пропанол-вода-аммиак одновременно с экстракцией из клеток грамотрицательных бактерий

Готовили экстракционную смесь добавлением н-пропанола к двухфазной смеси водного аммиака (25%) и н-бутанола в соотношении 1:1 (об.) до ее полной гомогенизации (соотношение при 25 °С, комнатной температуре, – 10:10:5,4 – н-бутанол:водный аммиак (25%):н-пропанол – о/о). Полученную смесь добавляли к сухим измельченным бактериальным клеткам в соотношении 300 мл экстрагента на 10 г клеток. Экстракцию проводили перемешиванием на магнитной мешалке при температуре 25 °С в закупоренном сосуде в течение 5 и 16 часов. По окончании экстракции нейтрализовали смесь добавлением концентрированной соляной кислоты и отделяли центрифугированием (22 000 g в течение 20 минут при 4 °С). Полученный супернатант содержал 2 фазы – верхнюю (бутанол) и нижнюю (воду). Отбирали нижнюю фазу, разводили в 10 раз в буфере (30% н-пропанол, 0,1 М аммония бикарбонат, аммиак до pH 8,5) и подвергали диафильтрации с использованием мембраны с порогом отсечения по молекулярной массе (MWCO) 5 кДа. Далее концентрат и фильтрат раздельно разводили в 10 раз водой и подвергали диафильтрации для удаления аммония бикарбоната и н-пропанола с использованием мембраны с порогом отсечения по молекулярной массе (MWCO)

5 кДа. Получившиеся концентраты, содержащие раздельно высоко- и низкомолекулярные фракции ЛПС, лиофилизовали.

Липида А в смеси хлороформ:метанол:аммиак

Липид А растворяли в смеси хлороформ:метанол:аммиак (25%) (40:25:6) в концентрации 2 мг/мл. Полученный раствор инкубировали в закупоренном сосуде при температуре 50 °С в течение 20 часов. По окончании реакции реакционную смесь охлаждали и лиофилизовали.

2.8. Метод Бредфорда для измерения концентрации общего белка

В качестве стандарта был использован бычий сывороточный альбумин (БСА). Готовили не менее 5 стандартных растворов БСА с концентрациями в диапазоне 1-100 мкг/мл с использованием воды очищенной. Готовили раствор исследуемого образца в концентрации 1 мг/мл. Растворы стандартов и исследуемых образцов смешивали с реактивом Брэдфорда в соотношении 1:1 (о:о) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Измеряли поглощение при 595 нм на спектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000c (США).

2.9. Метод Спирина для измерения концентрации нуклеиновых кислот

Определение нуклеиновых кислот в соответствии с ГФ РФ XV изд. ОФС.1.7.2.0018.15 «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах». Измерение производили на спектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000c (США).

2.10. Методы анализа структуры липида А

Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

Образцы, растворенные в смеси хлороформ:метанол (4:1 – о:о), анализировали с использованием прибора Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, США) в режиме регистрации отрицательных ионов; в качестве матрицы применяли 2,5-дигидроксибензойную кислоту (10 мг/мл в 0,01 М растворе лимонной кислоты).

Времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением

Образцы, растворенные в смеси хлороформ:метанол (4:1 – о:о), анализировали с использованием прибора MicrOTOF II (Bruker Daltonics, США) в режиме регистрации отрицательных ионов; напряжение смещения концевой пластины 0,5 кВ, напряжение капилляра 4,5 кВ, температура газа 180 °С. Диапазон анализируемых масс – от 50 до 3000 Да.

Тонкослойная хроматография

Анализ проводили с использованием в качестве неподвижной фазы силикагеля 60 (Merck, США), в качестве подвижной фазы – смесь хлороформ:метанол:вода:25% водный аммиак (40:25:4:2 – о:о). Образцы анализируемого липида А, растворенного в смеси хлороформ:метанол (4:1 – о:о), наносили в объеме 10 мкл. Детектирование осуществляли обработкой пластины 10% раствором серной кислоты в 95% этаноле и последующим прокаливанием при 180 °С. Хроматографическая зона липида А окрашивалась в темно-коричневый цвет. Rf монофосфорилированного трехацильного липида А = 0,35, Rf дифосфорилированного триацильного липида А = 0,19.

2.11. Методы анализа углеводной фракции липополисахаридов

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Анализ углеводных фракций ЛПС проводили с использованием высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ, хроматограф Beckman 126 с рефрактометрическим детектором Agilent G1362A, колонка TSKgel G3000PWxl (7.8 mm I.D. x 30 cm), элюент 0,2 M NaCl, скорость потока 0,5 мл/мин, объем пробы 50 мкл).

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Углеводные фракции ЛПС перед анализом были фракционированы с помощью препаративной гель-хроматографии с использованием колонки с гелем TSK-50 (G-50). Полученные в результате гель-хроматографии фракции лиофилизовали, перерастворяли в дейтерированной воде и анализировали с помощью ^{1}H-ЯМР-спектроскопии. ЯМР-спектры регистрировались с использованием спектрометра Bruker Avance II 600 MHz (Bruker Daltonics, США) при 30 °C.

2.12. Технология получения детоксифицированных липополисахаридов и липидов А

Низкомолекулярный детоксифицированный липополисахарид *S. sonnei*

Процесс получения детоксифицированного липоолигосахарида (д-ЛОС) *S. sonnei* представлен на Рисунке 2.1. Материальный баланс приведен в Приложении В.

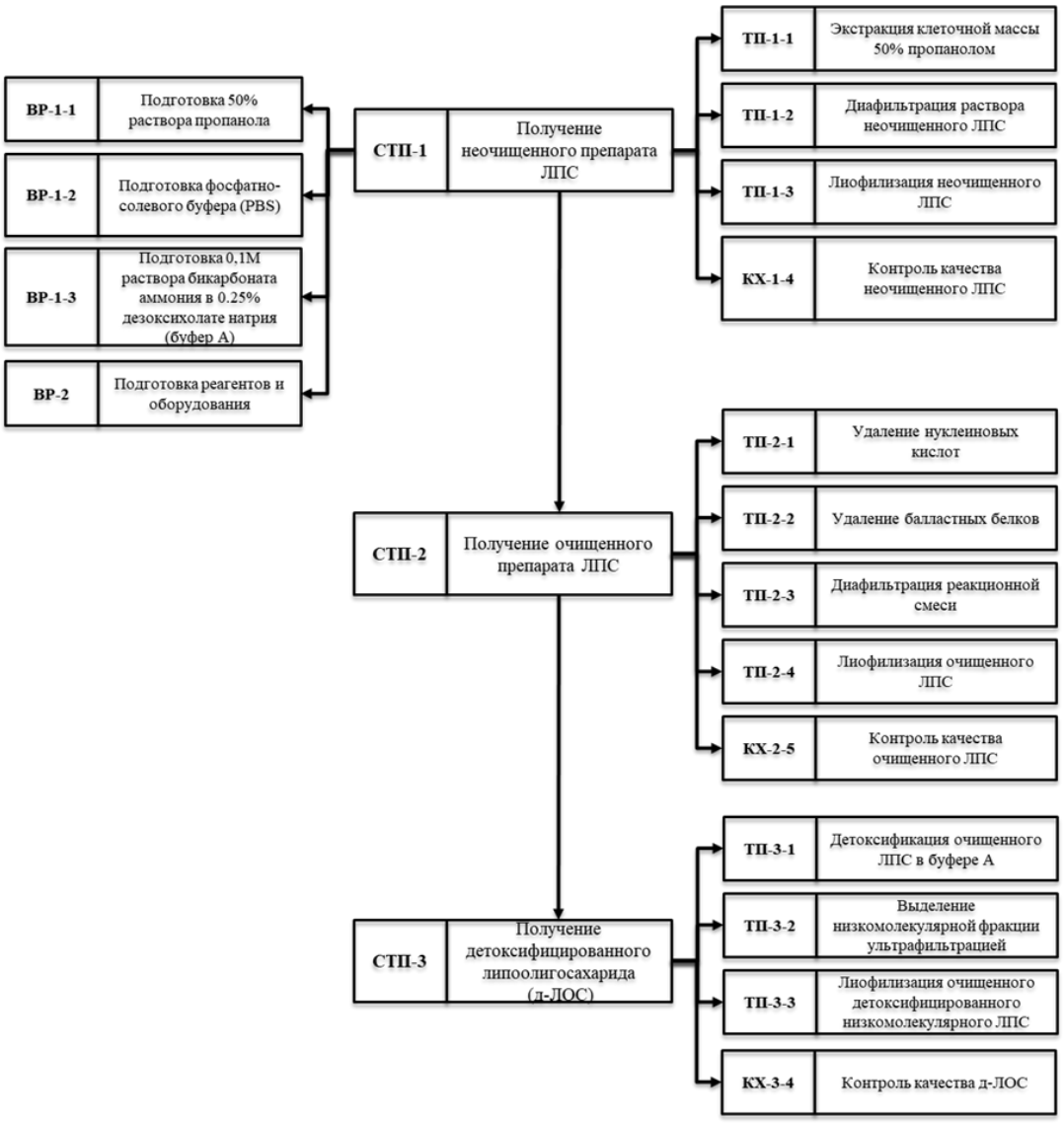


Рисунок 2.1 – Технологическая схема получения детоксифицированного липоолигосахарида *S. sonnei*

ВР-1. Приготовление растворов

ВР-1-1. Подготовка 50% водного раствора пропанола

Приготовление 50% водного раствора н-пропанола проводят в химическом вытяжном шкафу, используя индивидуальные средства защиты. Для приготовления 1 литра 50% водного пропанола смешивают 500 мл пропанола с 500 мл воды при перемешивании на магнитной мешалке.

ВР-1-2. Подготовка фосфатно-солевого буфера (PBS)

Фосфатно-солевой буфер (PBS) готовят путем растворения 1 таблетки в 100 мл воды очищенной.

ВР-1-3. Подготовка 0,1 М раствора бикарбоната аммония в 0,25% дезоксихолате натрия (буфер А)

В 1 литре воды очищенной растворяют при перемешивании на магнитной мешалке 11,7 г NaCl, 0,34 г ЭДТА, 1,21 г Tris, 0,1 г азида натрия и 2,5 г дезоксихолата натрия, добавляют 7,9 г бикарбоната аммония, доводят значение pH раствором аммиака 25% до 10,2.

ВР-2. Подготовка реагентов и оборудования

Подготовку оборудования, посуды, расходных материалов и средств измерения проводят в соответствии с действующими инструкциями по эксплуатации и внутренними процедурами лаборатории.

Проверяют исправность центрифуги, термостатов, магнитных мешалок, ультрафильтрационной установки, лиофильной сушилки и вспомогательного оборудования.

СТП-1. Получение неочищенной субстанции ЛПС

ТП-1-1. Экстракция клеточной массы 50% водным пропанолом (60 °С)

Сухие бактериальные клетки массой 20 г суспензируют в 50% водном пропаноле. Экстракцию проводят при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1-18 часов в закрытой таре при 60 °С. По окончании экстракции смесь охлаждают в проточной воде до температуры 10-15 °С и центрифугируют при 3500±500 об/мин и температуре 10±1 °С в течение 40±5 мин. Осадок после центрифугирования суспензируют в равном объеме воды очищенной и центрифугируют при 3500±500 об/мин и температуре 10±1 °С в течение 40±5 мин. Объединенные супернатанты передают на следующую стадию.

ТП-1-2. Диафильтрация раствора неочищенного ЛПС

500 мл раствора неочищенного ЛПС разбавляют водой очищенной до объема 5 л и концентрируют с помощью установки для ультрафильтрации (диаметр пор 10 кДа) до 500 мл. Затем 10 раз промывают равным объемом (500 мл) водой очищенной. По окончании процесса диафильтрации раствор неочищенного ЛПС концентрируют с помощью роторного испарителя до объема 200-300 мл и передают на следующую стадию.

ТП-1-3. Лиофилизация неочищенного ЛПС

Раствор неочищенного ЛПС (концентрат) замораживают в низкотемпературной камере при -35±5ºС, 2±0,5 часов. Проводят лиофилизацию.

КХ-1-4. Контроль качества неочищенного ЛПС

Полученную после лиофилизации субстанцию неочищенного ЛПС взвешивают в плоскодонной колбе, закрывают пробкой. Хранят в холодильнике при 4-10 °С. Срок годности – 5 лет. Для полученной субстанции неочищенного ЛПС контролируют выход (по массе высушенной субстанции) и содержание белков и нуклеиновых кислот.

Выход высушенного неочищенного ЛПС должен составлять не менее 50 мг с 1 грамма сухих клеток.

Содержание белков и нуклеиновых кислот должно составлять не более 10%.

СТП-2. Получение очищенной субстанции ЛПС

ТП-2-1. Удаление нуклеиновых кислот

Полученный на ТП-1-3 неочищенный ЛПС растворяют в буфере PBS в концентрации 5 мг/мл, при необходимости корректируют pH до 7,2-7,4. В полученный раствор прибавляют ферменты РНКазу (1,0 мг на 100 мл смеси) и ДНКазу (1,0 мг на 100 мл смеси). Колбу с раствором помещают в термостат и инкубируют, при перемешивании на магнитной мешалке, в течение 10-16 часов при 36-38 °С. По окончании обработки раствор переносят на следующую стадию.

ТП-2-2. Удаление балластных белков

К полученному раствору добавляют Трилон Б до конечной концентрации 0,01 М. Доводят pH до 7,2 – 7,4 10% раствором NaOH. Затем в смесь вносят протеиназу К (1,0 мг на 100 мл смеси). Полученный раствор термостатируют, перемешивая на магнитной мешалке при 56-58 °С в течение 3-4 часов.

ТП-2-3. Диафильтрация реакционной смеси

Реакционную смесь с помощью установки для ультрафильтрации (диаметр пор 10 кДа) очищают от компонентов буфера промыванием водой очищенной до отсутствия реакции на хлорид-ион. Далее передают на следующую стадию.

ТП-2-4. Лиофилизация очищенного ЛПС

Раствор очищенного ЛПС (концентрат) замораживают в низкотемпературной камере при температуре минус 35±5 ºС, 2±0,5 часов. Проводят лиофилизацию.

КХ-2-5. Контроль качества очищенного ЛПС

Лиофильно высушенную субстанцию очищенного ЛПС взвешивают в стеклянной пробирке, плотно закрывают парафильмом и хранят при комнатной температуре.

Субстанцию очищенного ЛПС контролируют по следующим параметрам:

- по содержанию белка,
- нуклеиновых кислот;
- по молекулярным параметрам;
- определяют подлинность.

Выход лиофильно высушенной субстанции составляет не менее 50 мг с 1 грамма сухих клеток.

Очищенный ЛПС должен содержать не более 2% белка.

Очищенный ЛПС должен содержать не более 2% нуклеиновых кислот.

Молекулярные параметры очищенного ЛПС определяют с помощью гель фильтрации (TSK-50, элюент - вода). Не менее 90% субстанции ЛПС должно иметь K_d до 0,1.

Подлинность определяют, анализируя образовавшиеся после кислотного гидролиза ЛПС углеводную часть (методом ЯМР-спектроскопии) и липид А (методом масс-спектрометрии). ^{1}Н-ЯМР и масс-спектры исследуемого образца должны совпадать с приведенным в литературе.

СТП-3. Получение д-ЛОС

ТП-3-1. Детоксификация очищенного ЛПС в буфере А

Навеску очищенного ЛПС растворяют в буфере А в концентрации 5 мг/мл и перемешивают при температуре 50 °С в течение 40 часов.

ТП-3-2. Выделение низкомолекулярной фракции ультрафильтрацией

Реакционную смесь разводят минимум в 5 раз буфером А. Затем промывают с использованием установки «Владисарт» (диаметр пор 10 кДа) пятикратным объемом буфера А. Далее концентрат промывают пятикратным объемом буфера А

без добавления дезоксихолата натрия и далее водой, до отсутствия реакции на хлорид-ион. Концентрируют с использованием установки «Владисарт» и передают на следующую стадию.

ТП-3-3. Лиофилизация очищенного детоксифицированного низкомолекулярного ЛПС

Раствор д-ЛОС замораживают в низкотемпературной камере при температуре минус 35±5 ºС, 2±0,5 часов. Проводят лиофилизацию.

КХ-3-4. Контроль качества д-ЛОС

Лиофильно высушенную субстанцию д-ЛОС взвешивают в стеклянной пробирке, плотно закрывают парафильмом и хранят при комнатной температуре.

Субстанцию д-ЛОС контролируют по следующим параметрам:

- содержание белка,
- содержание нуклеиновых кислот;
- молекулярные параметры;
- подлинность.

Выход лиофильно высушенной субстанции составляет не менее 50 мг с 1 грамма сухих клеток.

Д-ЛОС должен содержать не более 2% белка.

Д-ЛОС должен содержать не более 2% нуклеиновых кислот.

Молекулярные параметры д-ЛОС определяют с помощью гель фильтрации (TSK-50, элюент – 0,01 М фосфатно-солевой буфер, 0,1% SDS, pH 7,5). Не менее 90% субстанции ЛПС должно иметь Kd до 0,2.

Подлинность определяют, анализируя образовавшиеся после кислотного гидролиза д-ЛОС углеводную часть (методом ЯМР-спектроскопии) и липид А (методом масс-спектрометрии). ^{1}H-ЯМР спектр исследуемого образца должен совпадать с приведенным в литературе. Масс-спектр липида А должен содержать преимущественно триацильный липид А.

Монофосфорилированный липид А

Процесс получения монофосфорилированного липида А представлен на Рисунке 2.2. Материальный баланс приведен в Приложении Г.

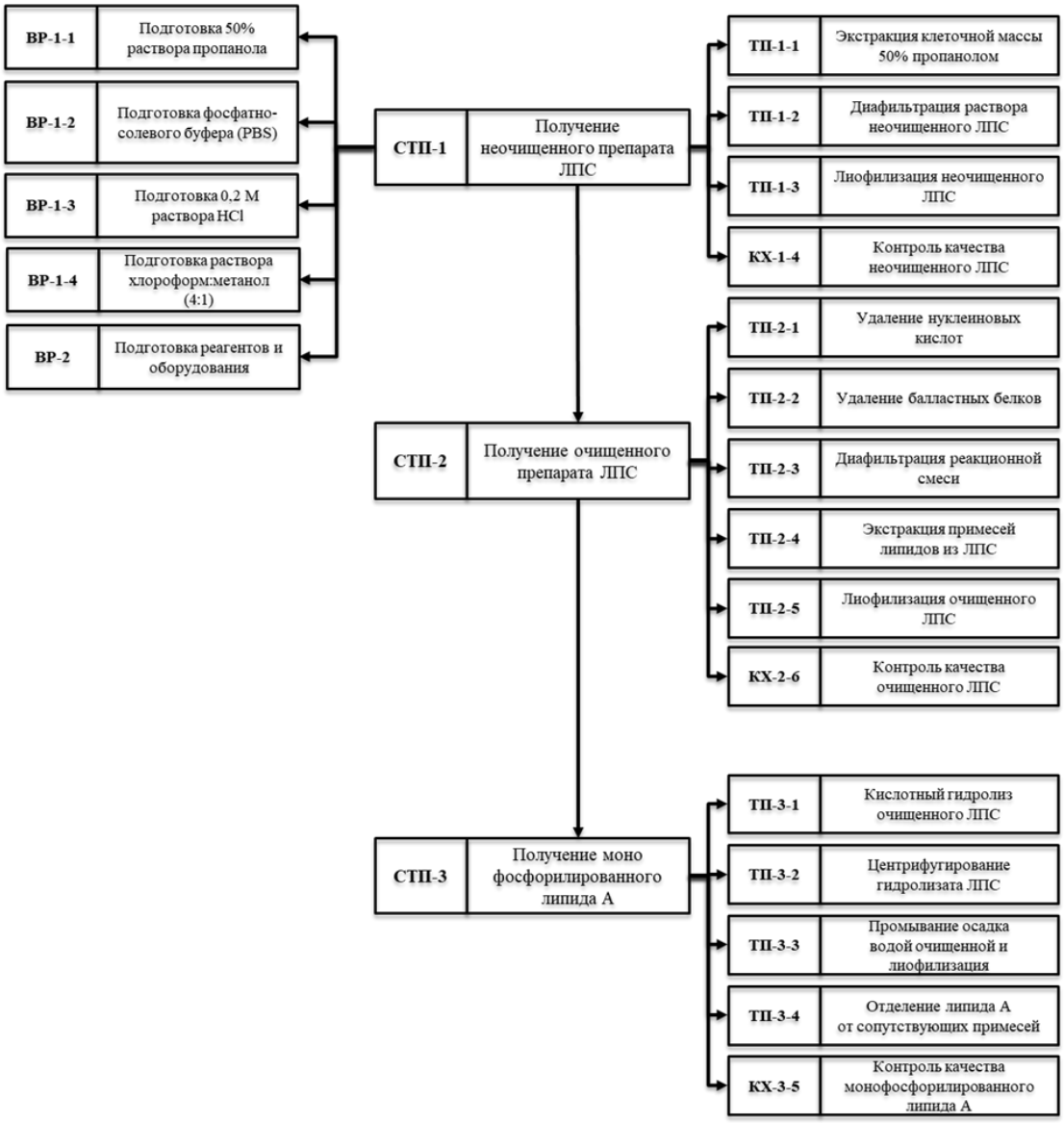


Рисунок 2.2 – Технологическая схема получения монофосфорилированного липида А

ВР-1. Приготовление растворов

ВР-1-1. Подготовка 50% водного раствора пропанола

Приготовление 50% водного раствора н-пропанола проводят в химическом вытяжном шкафу, используя индивидуальные средства защиты. Для

приготовления 1 литра 50% водного пропанола смешивают 500 мл пропанола с 500 мл воды при перемешивании на магнитной мешалке.

ВР-1-2. Подготовка фосфатно-солевого буфера (PBS)

Фосфатно-солевой буфер (PBS) готовят путем растворения 1 таблетки в 100 мл воды очищенной.

ВР-1-3. Подготовка 0,2 М раствора HCl

Раствор готовят, прибавляя к 200 мл воды очищенной 4 мл 32% соляной кислоты.

ВР-1-4. Подготовка раствора хлороформ:метанол (4:1)

Смесь хлороформ:метанол готовят в вытяжном шкафу, смешивая компоненты в заданном объёмном соотношении (хлороформ-метанол, 4:1). Смесь переносят в плотно закрываемую ёмкость и перемешивают до однородности.

ВР-2. Подготовка реагентов и оборудования

Подготовку оборудования, посуды, расходных материалов и средств измерения проводят в соответствии с действующими инструкциями по эксплуатации и внутренними процедурами лаборатории.

Проверяют исправность центрифуги, термостатов, магнитных мешалок, ультрафильтрационной установки, лиофильной сушилки и вспомогательного оборудования.

СТП-1. Получение неочищенной субстанции ЛПС

ТП-1-1. Экстракция клеточной массы 50% водным пропанолом (60 °C)

Сухие бактериальные клетки массой 20 г суспензируют в 50% водном пропаноле. Экстракцию проводят при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1-18 часов в закрытой таре при 60 °C. По окончании экстракции смесь охлаждают в проточной воде до температуры 10-15 °C и центрифугируют при 3500±500 об/мин и температуре 10±1 °C в течение 40±5 мин. Осадок после центрифугирования суспензируют в равном объеме воды очищенной и центрифугируют при 3500±500 об/мин и температуре 10±1 °C в течение 40±5 мин. Объединенные супернатанты передают на следующую стадию.

ТП-1-2. Диафильтрация раствора неочищенного ЛПС

1600-1800 мл раствора неочищенного ЛПС разбавляют водой очищенной до объема 5 л и концентрируют с помощью установки для ультрафильтрации (диаметр пор 10 кДа) до 500 мл. Затем 10 раз промывают равным объемом (500 мл) водой очищенной. По окончании процесса диафильтрации раствор неочищенного ЛПС концентрируют с помощью роторного испарителя до объема 200-300 мл и передают на следующую стадию.

ТП-1-3. Лиофилизация неочищенного ЛПС

Раствор неочищенного ЛПС (концентрат) разливают в стеклянные колбы вместимостью 1000 мл по 300±50 мл, замораживают в низкотемпературной камере при температуре минус 35±5 ºС, 2±0,5 часов. Проводят лиофилизацию.

КХ-1-4. Контроль качества неочищенного ЛПС

Полученную после лиофилизации субстанцию неочищенного ЛПС взвешивают в плоскодонной колбе, закрывают пробкой. Хранят в холодильнике при 4-10 °С. Срок годности – 5 лет. В полученной субстанции неочищенного ЛПС контролируют выход (по массе высушенной субстанции) и содержание белков и нуклеиновых кислот.

Выход высушенного неочищенного ЛПС должен составлять не менее 50 мг с 1 грамма сухих клеток.

Содержание белков и нуклеиновых кислот должно составлять не более 10%.

СТП-2. Получение очищенной субстанции ЛПС

ТП-2-1. Удаление нуклеиновых кислот

Полученный на ТП-1-3 неочищенный ЛПС растворяют в буфере PBS в концентрации 5 мг/мл, при необходимости корректируют pH до 7,2-7,4. В полученный раствор прибавляют ферменты РНКазу (1,0 мг на 100 мл смеси) и ДНКазу (1,0 мг на 100 мл смеси). Колбу с раствором помещают в термостат и инкубируют, при перемешивании на магнитной мешалке, в течение 10-16 часов при 36-38 °С. Полученный раствор передают на следующую стадию.

ТП-2-2. Удаление балластных белков

К полученному раствору добавляют Трилон Б до конечной концентрации

0,01 моль/л. Доводят pH до 7,2 – 7,4 10% раствором NaOH. Затем в смесь вносят протеиназу К (1,0 мг на 100 мл смеси). Полученный раствор термостатируют, перемешивая на магнитной мешалке при 56-58 °С в течение 3-4 часов.

ТП-2-3. Диафильтрация реакционной смеси

Реакционную смесь с помощью установки для ультрафильтрации (диаметр пор 10 кДа) очищают от компонентов буфера промыванием водой очищенной до отсутствия реакции на хлорид-ион. Концентрат лиофилизуют.

ТП-2-4. Экстракция примесей липидов из ЛПС

Лиофилизат экстрагируют 95% этанолом в соотношении 200 мл на 500 мг лиофилизата при 50 °С в термостате при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1 часа. Далее центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 минут. Осадок суспензируют в том же объеме спирта и повторяют экстракцию дважды. По окончании процедуры осадок растворяют в воде и передают на следующую стадию.

ТП-2-5. Лиофилизация очищенного ЛПС

Раствор очищенного ЛПС замораживают в низкотемпературной камере при температуре минус 35±5 ºС, 2±0,5 часов. Проводят лиофилизацию.

КХ-2-6. Контроль качества очищенного ЛПС

Лиофильно высушенную субстанцию очищенного ЛПС взвешивают в стеклянной пробирке, плотно закрывают парафильмом и хранят при комнатной температуре.

Субстанцию очищенного ЛПС контролируют по следующим параметрам:

- по содержанию белка,

- нуклеиновых кислот;

- определяют подлинность.

Выход лиофильно высушенной субстанции составляет не менее 50 мг с 1 грамма сухих клеток.

Очищенный ЛПС должен содержать не более 2% белка.

Очищенный ЛПС должен содержать не более 2% нуклеиновых кислот.

Подлинность определяют, анализируя образовавшиеся после кислотного

гидролиза ЛПС углеводную часть (методом ЯМР-спектроскопии) или липид А (методом масс-спектрометрии). ^{1}Н-ЯМР и масс-спектры исследуемого образца должны совпадать с приведенным в литературе.

СТП-3. Получение монофосфорилированного липида А

ТП-3-1. Кислотный гидролиз очищенного ЛПС

Навеску очищенного ЛПС растворяют в концентрации 5 мг/мл в 0,2 М HCl и перемешивают при температуре 100 °С в течение 30 минут.

ТП-3-2. Центрифугирование гидролизата ЛПС

Раствор со стадии ТП-3-1 центрифугируют в течение 30 минут при 13500 об/мин.

ТП-3-3. Промывание осадка водой очищенной и лиофильное высушивание осадка

К осадку в центрифужных стаканах добавляют воду очищенную и проводят механическое суспензирование осадка с помощью шпателя и пипетки автоматической. Полученную суспензию центрифугируют в течение 30 мин при 13500 об/мин. Осадок суспензируют в воде очищенной, замораживают в низкотемпературной камере при температуре минус 40±0,5 в течение 1±0,5 часов и лиофилизуют.

ТП-3-4. Отделение липида А от сопутствующих примесей

Лиофилизат со стадии ТП-3-3 растворяют в 100 мл смеси хлороформ-метанол 4:1 и фильтруют через стекловолоконный фильтр (Whatman Grade GF/A) в предварительно взвешенную круглодонную колбу на шлифе объемом 500 мл. По окончании фильтрования фильтр тщательно промывают еще 50 мл смеси хлороформ-метанол 4:1. Полученный раствор упаривают досуха на роторном испарителе. По окончании процесса упаривания колбу взвешивают и по разности весов находят вес полученного монофосфорилированного липида А.

КХ-3-5. Контроль качества монофосфорилированного липида А

Субстанцию монофосфорилированного липида А контролируют по следующим параметрам:

- подлинность.

Выход монофосфорилированного липида А составляет не менее 2 мг с 1 грамма сухих клеток.

Подлинность субстанции монофосфорилированного липида А определяют методом масс-спектрометрии.

Триацильный дифосфорилированный липид А

Процесс получения триацильного дифосфорилированного липида А представлен на Рисунке 2.3. Материальный баланс приведен в Приложении Д.

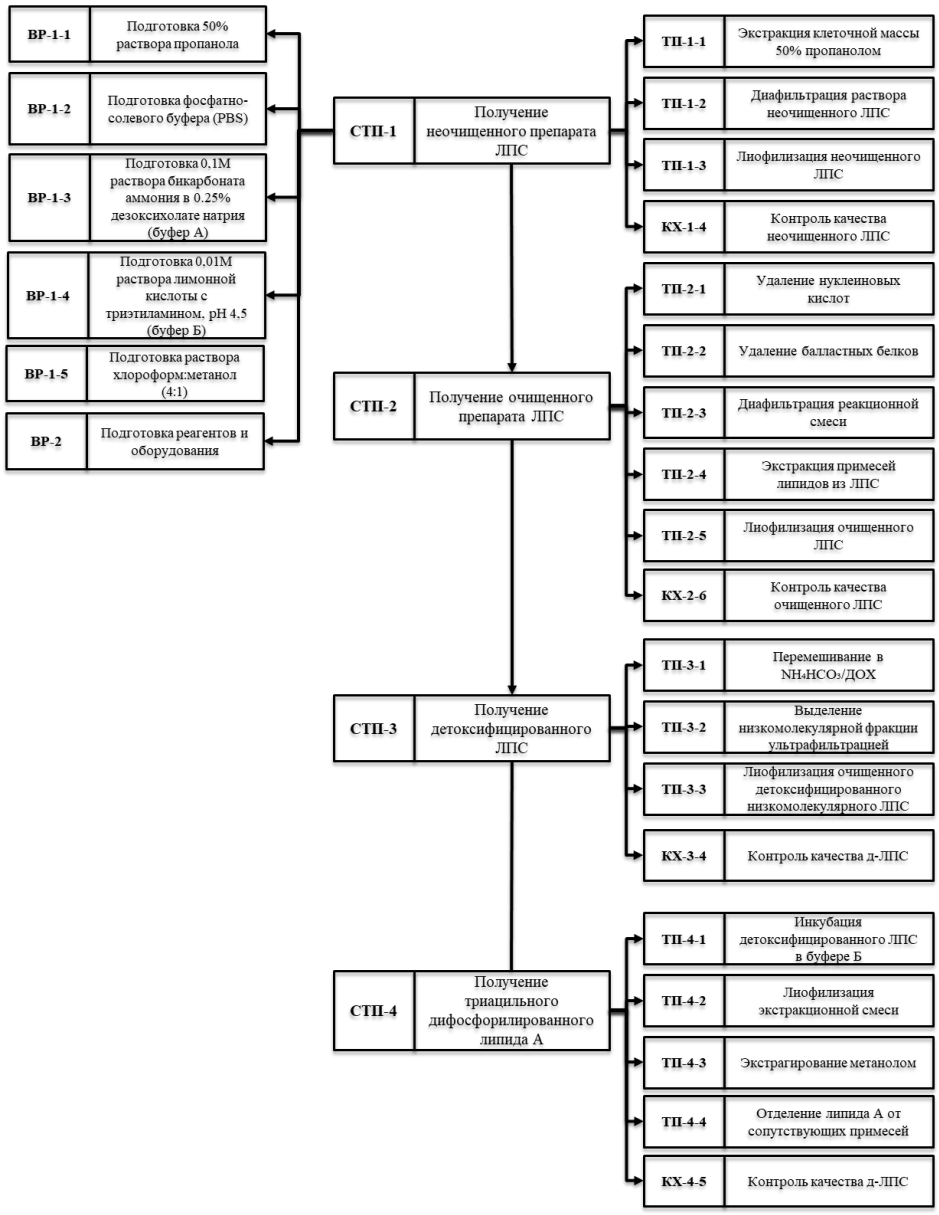


Рисунок 2.3 – Технологическая схема получения триацильного дифосфорилированного липида А

ВР-1. Приготовление растворов

ВР-1-1. Подготовка 50% водного раствора пропанола

Приготовление 50% водного раствора н-пропанола проводят в химическом вытяжном шкафу, используя индивидуальные средства защиты. Для приготовления 1 литра 50% водного пропанола смешивают 500 мл пропанола с 500 мл воды при перемешивании на магнитной мешалке.

ВР-1-2. Подготовка фосфатно-солевого буфера (PBS)

Фосфатно-солевой буфер (PBS) готовят путем растворения 1 таблетки в воде очищенной.

ВР-1-3. Подготовка 0,1 М раствора бикарбоната аммония в 0,25% дезоксихолате натрия (буфер А)

В 1 литре воды очищенной растворяют при перемешивании на магнитной мешалке 11,7 г NaCl, 0,34 г ЭДТА, 1,21 г Tris, 0,1 г азида натрия и 2,5 г дезоксихолата натрия, добавляют 7,9 г бикарбоната аммония, pH доводят раствором аммиака 25% до 10,2.

ВР-1-4. Подготовка 0,01 М раствора лимонной кислоты с триэтиламином, pH 4,5 (буфер Б)

В 1 литре воды очищенной растворяют при перемешивании на магнитной мешалке 1,92 г лимонной кислоты безводной, pH доводят триэтиламином до 4,5.

ВР-1-5. Подготовка раствора хлороформ:метанол (4:1)

Смесь хлороформ:метанол готовят в вытяжном шкафу, смешивая компоненты в заданном объёмном соотношении (хлороформ-метанол, 4:1). Смесь переносят в плотно закрываемую ёмкость и перемешивают до однородности.

ВР-2. Подготовка реагентов и оборудования

Подготовку оборудования, посуды, расходных материалов и средств измерения проводят в соответствии с действующими инструкциями по эксплуатации и внутренними процедурами лаборатории.

Проверяют исправность центрифуги, термостатов, магнитных мешалок, ультрафильтрационной установки, лиофильной сушилки и вспомогательного оборудования.

СТП-1. Получение неочищенной субстанции ЛПС

ТП-1-1. Экстракция клеточной массы 50% водным пропанолом (60 °C)

Сухие бактериальные клетки массой 20 г суспензируют в 50% водном пропаноле. Экстракцию проводят при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1-18 часов в закрытой таре при 60 °C. По окончании экстракции смесь охлаждают в проточной воде до температуры 10-15 °C и центрифугируют при 3500±500 об/мин и температуре 10±1 °C в течение 40±5 мин. Осадок после центрифугирования суспензируют в равном объеме воды очищенной и

центрифугируют при 3500±500 об/мин и температуре 10±1 °С в течение 40±5 мин. Объединенные супернатанты передают на следующую стадию.

ТП-1-2. Диафильтрация раствора неочищенного ЛПС

1600-1800 мл раствора неочищенного ЛПС разбавляют водой очищенной до объема 5 л и концентрируют с помощью установки для ультрафильтрации (диаметр пор 10 кДа) до 500 мл. Затем 10 раз промывают равным объемом (500 мл) водой очищенной. По окончании процесса диафильтрации раствор неочищенного ЛПС концентрируют с помощью роторного испарителя до объема 200-300 мл и передают на следующую стадию.

ТП-1-3. Лиофилизация неочищенного ЛПС

Раствор неочищенного ЛПС (концентрат) разливают в стеклянные колбы вместимостью 1000 мл по 300±50 мл, замораживают в низкотемпературной камере при температуре минус 35±5 ºС, 2±0,5 часов. Проводят лиофилизацию.

КХ-1-4. Контроль качества неочищенного ЛПС

Полученную после лиофилизации субстанцию неочищенного ЛПС взвешивают в плоскодонной колбе, закрывают пробкой. Хранят в холодильнике при 4-10 °С. Срок годности – 5 лет. В полученной субстанции неочищенного ЛПС контролируют выход (по массе высушенной субстанции) и содержание белков и нуклеиновых кислот.

Выход высушенного неочищенного ЛПС должен составлять не менее 50 мг с 1 грамма сухих клеток.

Содержание белков и нуклеиновых кислот должно составлять не более 10%.

СТП-2. Получение очищенной субстанции ЛПС

ТП-2-1. Удаление нуклеиновых кислот

Полученный на ТП-1-3 неочищенный ЛПС растворяют в 150 мл буфера PBS, при необходимости корректируют pH до 7,2-7,4. В полученный раствор прибавляют ферменты РНКазу (1,0 мг) и ДНКазу (1,0 мг). Колбу с раствором помещают в термостат и инкубируют, при перемешивании на магнитной мешалке, в течение 10-16 часов при 36-38 °С. Полученный раствор передают на следующую стадию.

ТП-2-2. Удаление балластных белков

К полученному раствору добавляют Трилон Б до конечной концентрации 0,01 моль/л. Доводят pH до 7,2 – 7,4 10% раствором NaOH. Затем в смесь вносят 1,0 мг протеиназы К. Полученный раствор термостатируют, перемешивая на магнитной мешалке при 56-58 °С в течение 3-4 часов.

ТП-2-3. Диафильтрация реакционной смеси

Реакционную смесь с помощью установки для ультрафильтрации (диаметр пор 10 кДа) отмывают водой до отсутствия реакции на хлорид-ион. Концентрат лиофилизуют.

ТП-2-4. Экстракция примесей липидов из ЛПС

Лиофилизат экстрагируют спиртом в соотношении 200 мл на 500 мг лиофилизата при 50 °С в термостате при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1 часа. Далее центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 минут. Осадок суспензируют в том же объеме спирта и повторяют экстракцию дважды. По окончании процедуры осадок растворяют в воде и передают на следующую стадию.

ТП-2-5. Лиофилизация очищенного ЛПС

Раствор очищенного ЛПС разливают в стеклянную колбу вместимостью 1000 мл, замораживают в низкотемпературной камере при температуре минус 35±5 ºС, 2±0,5 часов. Проводят лиофилизацию.

КХ-2-6. Контроль качества очищенного ЛПС

Лиофильно высушенную субстанцию очищенного ЛПС взвешивают в стеклянной пробирке, плотно закрывают парафильмом и хранят при комнатной температуре.

Субстанцию очищенного ЛПС контролируют по следующим параметрам:

- по содержанию белка,
- нуклеиновых кислот;
- определяют подлинность.

Выход лиофильно высушенной субстанции составляет не менее 50 мг с 1 грамма сухих клеток.

Очищенный ЛПС должен содержать не более 2% белка.

Очищенный ЛПС должен содержать не более 2% нуклеиновых кислот.

Подлинность определяют, анализируя образовавшиеся после кислотного гидролиза ЛПС углеводную часть (методом ЯМР-спектроскопии) и липид А (методом масс-спектрометрии). ^{1}Н-ЯМР и масс-спектры исследуемого образца должны совпадать с приведенным в литературе.

СТП-3. Получение детоксифицированного ЛПС

ТП-3-1. Перемешивание в буфере А (16 ч, 50 °С)

Навеску очищенного ЛПС помещают в колбу вместимостью 250 мл, добавляют 100±5 мл раствора буфера А и перемешивают при температуре 50 °С в течение 15 часов.

ТП-3-2. Выделение низкомолекулярной фракции ультрафильтрацией

Реакционную смесь разводят до 1 л буфером А. Затем промывают с использованием установки «Владисарт» (диаметр пор 10 кДа) 5 л буфера А. Далее концентрат промывают 5 литрами буфера А без добавления дезоксихолата натрия и далее водой, до отсутствия реакции на хлорид-ион. Концентрируют с использованием установки «Владисарт» до объема 200-300 мл и передают на следующую стадию.

ТП-3-3. Лиофилизация очищенного детоксифицированного ЛПС

Раствор детоксифицированного ЛПС разливают в стеклянную колбу вместимостью 1000 мл, замораживают в низкотемпературной камере при температуре минус 35±5 ºС, 2±0,5 часов. Проводят лиофилизацию.

КХ-3-4. Контроль качества д-ЛПС

Лиофильно высушенную субстанцию детоксифицированного липополисахарида взвешивают в стеклянной пробирке, плотно закрывают парафильмом и хранят при комнатной температуре.

Субстанцию д-ЛПС контролируют по следующим параметрам:

- содержание белка,
- содержание нуклеиновых кислот;
- подлинность.

Выход лиофильно высушенной субстанции составляет не менее 50 мг с 1 грамма сухих клеток.

Д-ЛПС должен содержать не более 2% белка.

Д-ЛПС должен содержать не более 2% нуклеиновых кислот.

Подлинность определяют, анализируя образовавшиеся после кислотного гидролиза д-ЛПС углеводную часть (методом ЯМР-спектроскопии) и липид А (методом масс-спектрометрии). ^{1}H-ЯМР спектр исследуемого образца должен совпадать с приведенным в литературе. Масс-спектр липида А должен содержать преимущественно триацильный липид А.

СТП-4. Получение триацильного дифосфорилированного липида А

ТП-4-1. Инкубация детоксифицированного ЛПС в буфере Б

300 мг д-ЛПС со стадии СТП-3 помещают в круглодонную колбу со шлифом, прибавляют 50 мл буфера Б, присоединяют обратный холодильник и нагревают 1 час в кипящей водяной бане.

ТП-4-2. Лиофилизация экстракционной смеси

Реакционную смесь замораживают в низкотемпературной камере при температуре минус 35±5 ºС, 2±0,5 часов. Проводят лиофилизацию.

ТП-4-3. Экстрагирование метанолом

Лиофилизат экстрагируют при комнатной температуре метанолом в соотношении 10 мл метанола на 100 мг лиофилизата. Смесь центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 минут. Осадок передают на следующую стадию.

ТП-4-4. Отделение липида А от сопутствующих примесей

Осадок, полученный со стадии ТП-4-3, экстрагируют смесью хлороформ-метанол (4:1) при комнатной температуре, фильтруют через фильтр Whatman GF/A в предварительно взвешенную круглодонную колбу на шлифе объемом 500 мл. По окончании фильтрования фильтр тщательно промывают еще 50 мл смеси хлороформ-метанол 4:1. Полученный раствор упаривают досуха на роторном испарителе. По окончании процесса упаривания колбу взвешивают и по разности весов находят вес полученного триацильного дифосфорилированного липида А.

КХ-4. Контроль качества триацильного дифосфорилированного липида А

Колбу плотно закрывают парафильмом и хранят при комнатной температуре.

Субстанцию триацильного дифосфорилированного липида А контролируют по следующим параметрам:

- подлинность.

Выход триацильного дифосфорилированного липида А составляет не менее 2 мг с 1 грамма сухих клеток.

На контроль расходуется 1 мг субстанции.

Подлинность триацильного дифосфорилированного липида А определяют методом масс-спектрометрии.

2.13. Определение родственных примесей и количественного содержания в субстанции низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *S. sonnei*

Для определения родственных примесей и количественного содержания низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида (д-ЛПС) *Shigella sonnei* использовали одну хроматографическую методику, основанную на разделении компонентов субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в демицеллирующих условиях (Таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Условия хроматографирования при определении родственных примесей и количественного содержания в субстанции низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*

Параметр	Условия
Колонка	TSKgel G3000PWxl, 7 мкм, 7,8 мм I.D. × 30 см
Детектор	Рефрактометрический; Диодно-матричный, λ = 206 нм
Температура колонки	35 °C
Скорость потока	0,5 мл/мин
Режим элюирования	Изократический

Продолжение Таблицы 2.1

Состав подвижной фазы	0,01 М фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,137 М хлорида натрия (NaCl) и 0,0027 М хлорида калия (KCl), 0,1% SDS, pH 7,5
Объем пробы	100 мкл

Под родственными примесями в данной работе понимали высокомолекулярные компоненты, низкомолекулярные фрагменты и минорные соединения, регистрируемые на хроматограмме помимо основного пика д-ЛПС. Количественное определение проводили методом внешнего стандарта по площади пика основного компонента относительно стандартного образца (СО) низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*, аттестованного методом материального баланса.

Расчет содержания родственных примесей проводили методом внутренней нормализации. Содержание отдельной примеси X_i, %, вычисляли по формуле:

$$X_i = \left(\frac{S_i}{\Sigma S}\right) \times 100, \qquad (2.1)$$

где S_i — площадь пика i-й примеси; ΣS — сумма площадей всех учитываемых пиков на хроматограмме, включая основной пик. Сумму родственных примесей рассчитывали как сумму площадей всех пиков, за исключением основного пика, выраженную в процентах от ΣS.

Количественное содержание низкомолекулярного д-ЛПС в испытуемом образце определяли методом внешнего стандарта по площади основного пика. Расчет содержания X, %, проводили по формуле:

$$X = (S / S_0) \times (m_0 / m) \times (P_0 / 100) \times (K_0 / K) \times 100, \qquad (2.2)$$

где S — площадь пика основного компонента на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 — средняя площадь пика основного компонента на хроматограммах стандартного раствора; m — навеска испытуемого образца, г; m_0 — навеска СО, г; P_0 — аттестованное содержание действующего вещества в СО, %; K и K_0 — суммарные коэффициенты разбавления для испытуемого и стандартного растворов

соответственно. При одинаковых концентрациях и схемах приготовления растворов расчет допускается упрощать с учетом фактически используемой аналитической процедуры.

2.14. Статистический анализ

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием стандартных методов описательной статистики. Для результатов, полученных в повторных определениях, рассчитывали среднее арифметическое значение, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение (RSD, %). Табличную и графическую обработку данных осуществляли с использованием программы Microsoft Excel.

При построении градуировочных зависимостей в ходе разработки методик количественного определения применяли линейный регрессионный анализ с оценкой коэффициента корреляции (r), углового коэффициента и свободного члена уравнения регрессии. Оценку пригодности аналитических методик и обработку результатов, полученных при стандартизации низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei*, проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания и Фармакопеи Евразийского экономического союза.

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВОДНО-СПИРТОВЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ КЛЕТОК ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

3.1. Оптимизация извлечения липополисахаридов водно-спиртовыми смесями

Метод экстракции горячим водным фенолом (ВФ) остается наиболее распространенным способом выделения ЛПС, обеспечивающим высокий выход целевого продукта. Ключевым преимуществом метода является образование гомогенной однофазной системы при температуре 68-70 °С, где одновременное присутствие гидрофильного и гидрофобного компонентов создает оптимальные условия для экстракции амфифильных молекул ЛПС. Гидрофобный липид А эффективно переходит в фенольную фазу, тогда как гидрофильный полисахаридный домен взаимодействует с водной средой. Однако экстракция сухих бактериальных клеток 45% водным фенолом при температуре 68-70 °С — метод небезопасный, требующий при проведении процесса много времени, причем выделенный таким образом ЛПС содержит до 70% примеси белков и нуклеиновых кислот.

В связи с очевидной небезопасностью этого традиционного метода выделения ЛПС и токсичностью отходов разработка гораздо более безопасного и экономичного метода экстракции ЛПС, применимого не только для лабораторного, но и промышленного использования, не теряет актуальности. При этом должно быть обеспечено сохранение основных характеристик ЭС: гомогенность, наличие в ней воды и гидрофобного смешивающегося с водой полярного компонента, растворимость в ней ЛПС и слабая растворимость примесных белков и нуклеиновых кислот.

В качестве модельных объектов исследования были выбраны микробные клетки *Escherichia coli* O157 и *Shigella sonnei*, фаза 1 (по последней классификации входит в состав рода *Escherichia*). Из недавних литературных данных об

электрофоретической подвижности ЛПС *E. coli* O157 следует, что мажорной фракцией является длинно цепной S-ЛПС [102]. Напротив, ЛПС *S. sonnei*, фаза 1 представлен в основном низко молекулярной фракцией S-ЛПС с короткими цепями ОПС [103]. Эти особенности обоих биополимеров позволяют оценить возможность применения предлагаемого метода к ЛПС с различной длиной ОПС.

Повторяющееся звено нейтрального ОПС *E. coli* O157 построено из моносахаридных остатков с гидрофобными фрагментами (метильные группы остатков фукозы и перозамина, а также N-ацетильные группы остатков галактозамина и перозамина) и не содержит заряженных группировок (Рисунок 3.1).

-3)-α-D-GalNAc*p*-(1-2)-α-D-PerNAc*p*-(1-3)-α-L-Fuc*p*-(1-4)-β-D-Glc*p*(1-

Рисунок 3.1 – Структура повторяющегося звена ОПС *E. coli* O157, где D-PerNAcp = 4-*N*-ацетиламино-4,6-дидезокси-D-маннопираноза (перозамин)

ОПС *S. sonnei* построен из повторяющихся дисахаридных звеньев, в которых остаток *N*-ацетил-L-альтрозаминуроновой кислоты несет отрицательный заряд, а остаток 4-амино-2-*N*-ацетиламино-4,6-дидезокси-D-фукозы заряжен положительно, то есть ОПС *S. sonnei* имеет цвиттер-ионный характер (Рисунок 3.2) [103].

-4)-α-L-Alt*p*NAcA-(1-3)-β-D-Fuc*p*NAc4N-(1-

Рисунок 3.2 – Структура повторяющегося звена ОПС *S. sonnei*

Липид А, входящий в состав ЛПС этих микроорганизмов, имеет сходное для микроорганизмов рода *Escherichia* строение [53].

В качестве экстрагента использовалась тройная ЭС-1, которая включает воду, н-бутанол и н-пропанол и которая приготовляется прибавлением н-пропанола к двухфазной смеси воды и н-бутанола в соотношении 1:1 об. до ее полной гомогенизации (ЭС-1). Ожидалось, что водная однофазная высоко полярная ЭС,

имея в своем составе гидрофобные алифатические спирты, будет обладать способностью извлекать амфифильные молекулы ЛПС, содержащие остатки ВЖК, из липид-содержащей мембраны внешней поверхности бактериальной клетки, то есть разрушать гидрофобные взаимодействия между липидом А и мембраной. Было изучено также влияние щелочных добавок на выход ЛПС и содержание примесей белков и нуклеиновых кислот. С этой целью при экстракции к суспензии бактериальных клеток в смеси бутанол-пропанол-вода прибавляли трисгидроксиметиламинометан до pH 8,5-8,6 (ЭС-2).

Для сравнения образцы ЛПС были также выделены из обоих микроорганизмов с помощью традиционного метода экстракции ВФ при 68-70 °С. При этом, чтобы извлечь как S-, так и R-формы ЛПС, диализу подвергали не только водный слой, но всю реакционную смесь. Для доказательства того, что основным продуктом обработки бактериальных клеток ЭС-1 и ЭС-2 является ЛПС, каждый из полученных продуктов был очищен от примесей белков и нуклеиновых кислот осаждением ТХУ. Полученный очищенный ЛПС был гидролизован 2% AcOH при 100 °С в течение 1 часа.

Образовавшийся осадок липида А отделяли центрифугированием и анализировали с помощью масс-спектрометрии (ESI-TOF). Сравнительный масс-спектрометрический анализ липидных фракций, полученных при мягком кислотном гидролизе ЛПС для *S. sonnei* и *E. coli* O157, выделенных экстракцией ВФ, а также ЭС-1, показал отсутствие структурных изменений в липиде А в процессе экстракции с использованием ЭС-1 или ЭС-2 (Рисунок 3.3) [104].

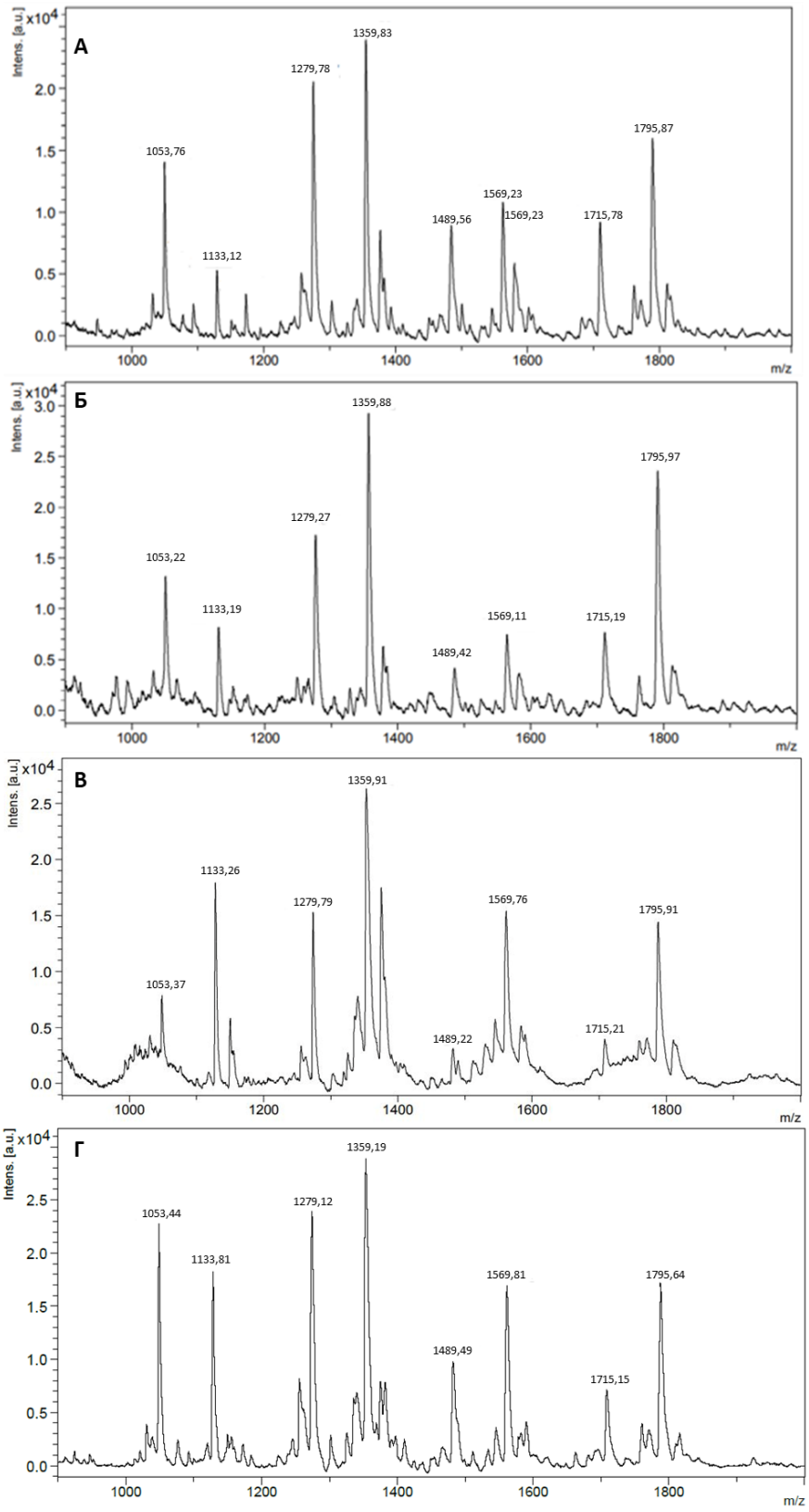


Рисунок 3.3 – Масс-спектры липидов А, выделенных из ЛПС *E. coli* O157, экстрагированных (А) ЭС-1, Б) ВФ и ЛПС *S. sonnei*, экстрагированных (В) ЭС-1, (Г) ВФ

Аннотация пиков в масс-спектре и соответствующих им структур липидов А представлена в приложении Е.

Субстанции углевод-содержащих фракций (после отделения липида А), выделенные из ЛПС *E. coli* O157 и *S. sonnei* с помощью ЭС-2 при температуре 60 °С, подвергнуты препаративной гель-хроматографии с использованием колонки с гелем TSK50, и полученные в результате гель-хроматографии ОПС *E. coli* O157 и *S. sonnei* были проанализированы с помощью ^{1}H-ЯМР-спектроскопии. Сравнительный анализ экспериментальных и литературных спектральных данных показал их полное совпадение (Рисунок 3.4) [103,105].

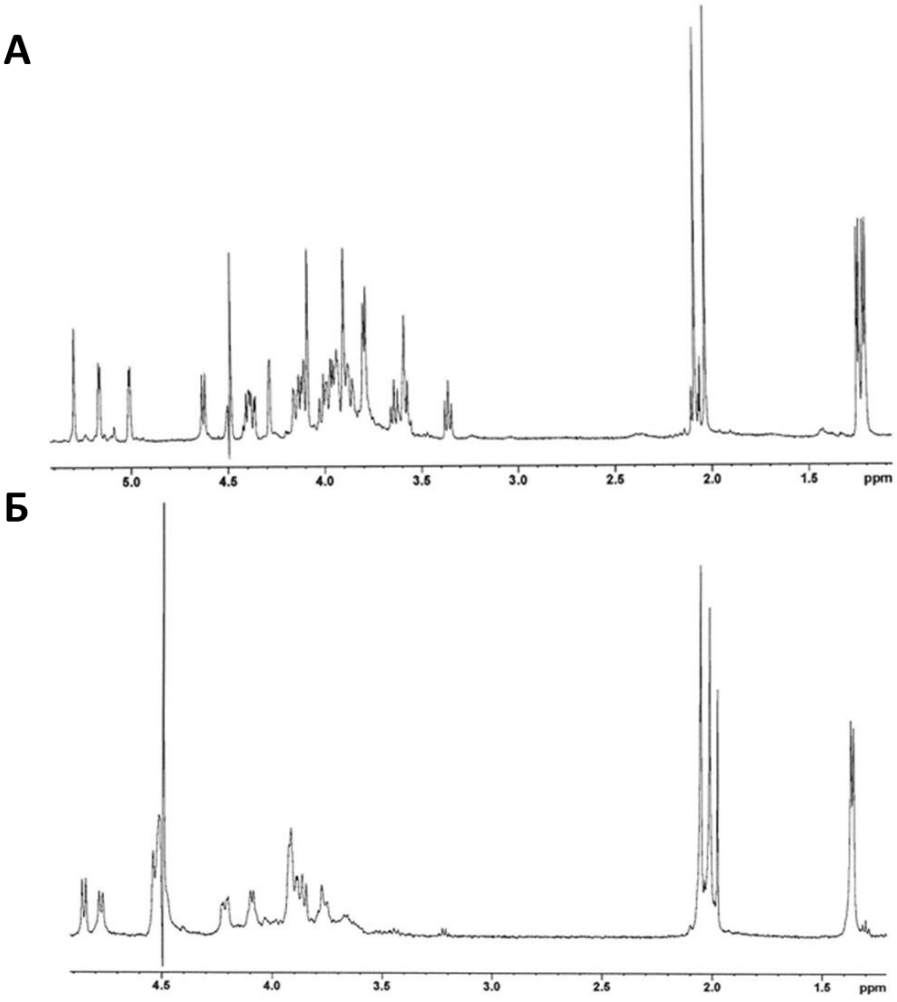


Рисунок 3.4 – ^{1}H-ЯМР спектры ОПС, выделенных из ЛПС, проэкстрагированных ЭС-1. (А) ^{1}H ЯМР спектр О-полисахарида *E. coli* O157. (Б) ^{1}H ЯМР спектр О-полисахарида *S. sonnei*

В качестве одного из критериев сопоставления эффективности традиционного (водно-фенольного) и предлагаемых вариантов нового метода экстракции было выбрано содержание примесей белков и нуклеиновых кислот в неочищенных образцах ЛПС, определенных методами Бредфорда и Спирина, соответственно. Другим критерием являлся количественный выход очищенного ЛПС, рассчитанный, исходя из выхода неочищенного ЛПС и процентного содержания в нем примеси белков и нуклеиновых кислот, определение которых проводилось с помощью колориметрических методов (белки - по Бредфорду, нуклеиновые кислоты - по Спирину.

Из данных, представленных в Таблице 3.1, следует, что при использовании обеих спиртовых экстрагирующих систем повышение температуры экстракции с 37 до 60°С сопровождалось увеличением выхода очищенного ЛПС *E. coli* O157. При использовании ЭС-1 суммарное содержание примесей было ниже, чем при использовании ЭС-2; минимальное суммарное содержание примесей наблюдалось для ЭС-1 при 60°С. Метод горячего водного фенола обеспечивал более высокий выход очищенного ЛПС, однако сопровождался значительно большей контаминацией нуклеиновыми кислотами и белками.

Таблица 3.1 – Выход ЛПС из клеток *E. coli* O157 и степень его контаминации (нуклеиновыми кислотами и белками) при различных методах экстрагирования

Микроорганизм	Экстрагент (температура, °С)	Выход неочищенного ЛПС (%)	Содержание нуклеиновых кислот (%)	Содержание белка (%)	Суммарное содержание примесей (%)	Выход в расчете на очищенный ЛПС (%)
E. coli O157	ВФ	14,4	44,8	20,1	64,9	5,1
	ЭС-1 (60)	5,3	1,5	18,5	19,9	4,2
	ЭС-1 (37)	5,2	3,5	20,6	24,1	3,9

Продолжение Таблицы 3.1

	ЭС-2 (60)	5,9	2,8	23,2	26,0	4,4
	ЭС-2 (37)	3,5	2,2	27,2	29,4	2,4

Результаты экстракции клеток *S. sonnei* перечислены ниже (Таблица 3.2):

1. Выход ЛПС при экстракции ЭС-1 и ЭС-2 существенно выше, чем при экстракции ВФ;

2. Выход ЛПС при экстракции ЭС-2 заметно выше, чем при экстракции ЭС-1;

3. Повышение температуры экстракции лишь незначительно повышает выход ЛПС.

Таблица 3.2 – Выход ЛПС из клеток *S. sonnei* и степень его контаминации (нуклеиновыми кислотами и белками) при различных методах экстрагирования

Микроорганизм	Экстрагент (температура, °С)	Выход неочищенного ЛПС (%)	Содержание нуклеиновых кислот (%)	Содержание белка (%)	Суммарное содержание примесей (%)	Выход в расчете на очищенный ЛПС (%)
S. sonnei	ВФ	6,1	40,3	15,0	55,3	2,7
	ЭС-1 (60)	6,0	5,6	33,7	39,3	3,6
	ЭС-1 (37)	5,0	7,7	18,9	26,6	3,7
	ЭС-2 (60)	11,2	5,7	26,5	32,2	7,6
	ЭС-2 (37)	9,9	8,3	23,5	31,8	6,7

Таким образом, введение щелочных добавок в экстракционную смесь наиболее эффективно при экстракции ЛПС, О-специфический полисахарид которых имеет кислый характер, то есть, включает остатки кислот, в частности остатки уроновых и аминокислот, а также фосфат-содержащие группировки.

Для того чтобы получить дополнительные данные о ЛПС, полученных при экстракции клеток *S. sonnei* в присутствии Tris и без него, осадок, полученный после экстракции клеток ЭС-1 при 60 °С (16 часов) и центрифугирования, был затем подвергнут обработке ЭС-2 в тех же условиях. Выход на первой и второй стадии составил 153 мг и 166 мг, соответственно. После ферментативной обработки (РНК-аза + ДНК-аза, затем протеиназа К) ЛПС, полученные на 1- и 2-ой стадии, были подвергнуты диафильтрации против воды и лиофилизации, выход ЛПС после удаления примесей составил 105 мг и 80 мг, соответственно. Сравнительный анализ выделенных таким образом ЛПС, проведенный по описанной выше схеме, показал, что продукты практически идентичны и что в отсутствие Tris в ЭС заметно снижает выход целевого ЛПС.

Из полученных данных о выходе, степени чистоты и структуре ЛПС в процессе экстракции следует, что предлагаемый метод выделения ЛПС более эффективен, чем экстракция ВФ, при том, что процедура выделения ЛПС существенно проще, безопаснее и занимает гораздо меньше времени [106,107].

При дальнейшей оптимизации методики в качестве экстрагента нами был выбран 50% водный пропанол. Пропанол полностью смешивается с водой, таким образом, после экстракции не наблюдается расслоения, что упрощает дальнейшую обработку реакционной смеси. Согласно нашим предположениям, такая смесь, за счет наличия воды и относительно гидрофобного (пропанол) компонента будет эффективно извлекать амфифильный ЛПС из бактериальных клеток. В качестве объекта исследования были выбраны клетки *E. coli* М-17, продуцирующие преимущественно S-форму ЛПС. Для сравнения ЛПС были также выделены с помощью метода экстракции ВФ и смесью бутанол-пропанол-вода. Экстракция 50% водным пропанолом и БПВ происходила при 60 °С – ранее мы проводили экстракцию БПВ при 37 °С, однако снижение температуры экстракции приводило к снижению выхода ЛПС. При экстракции 50% водным пропанолом или смесью бутанол-пропанол-вода не требуется длительный диализ, эти органические растворители можно легко удалить из экстракта путем упаривания. Пропанол и бутанол, в отличие от фенола, относятся к «зеленым», менее токсичным

растворителям, применение которых в промышленности наиболее предпочтительно [108]. Также возможно удаление органических растворителей и низкомолекулярных примесей с помощью ультрафильтрации/диализа, при этом необходимо кратное разведение экстракта водой, поскольку пропанол обладает демицеллирующими свойствами, что может ограничить применение этих методов для очистки.

Для доказательства того, что основным продуктом обработки бактериальных клеток является ЛПС, каждый из полученных образцов был очищен от примесей белков и нуклеиновых кислот осаждением ТХУ. Полученный очищенный ЛПС был гидролизован 2% AcOH при 100 °C в течение 1 часа.

Выделенный липид А анализировали с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF). Анализ полученных масс-спектров подтвердил идентичность структуры липидов А в ЛПС, выделенных с помощью 50% водного пропанола, смесью бутанол-пропанол-вода и ВФ (Рисунок 3.5).

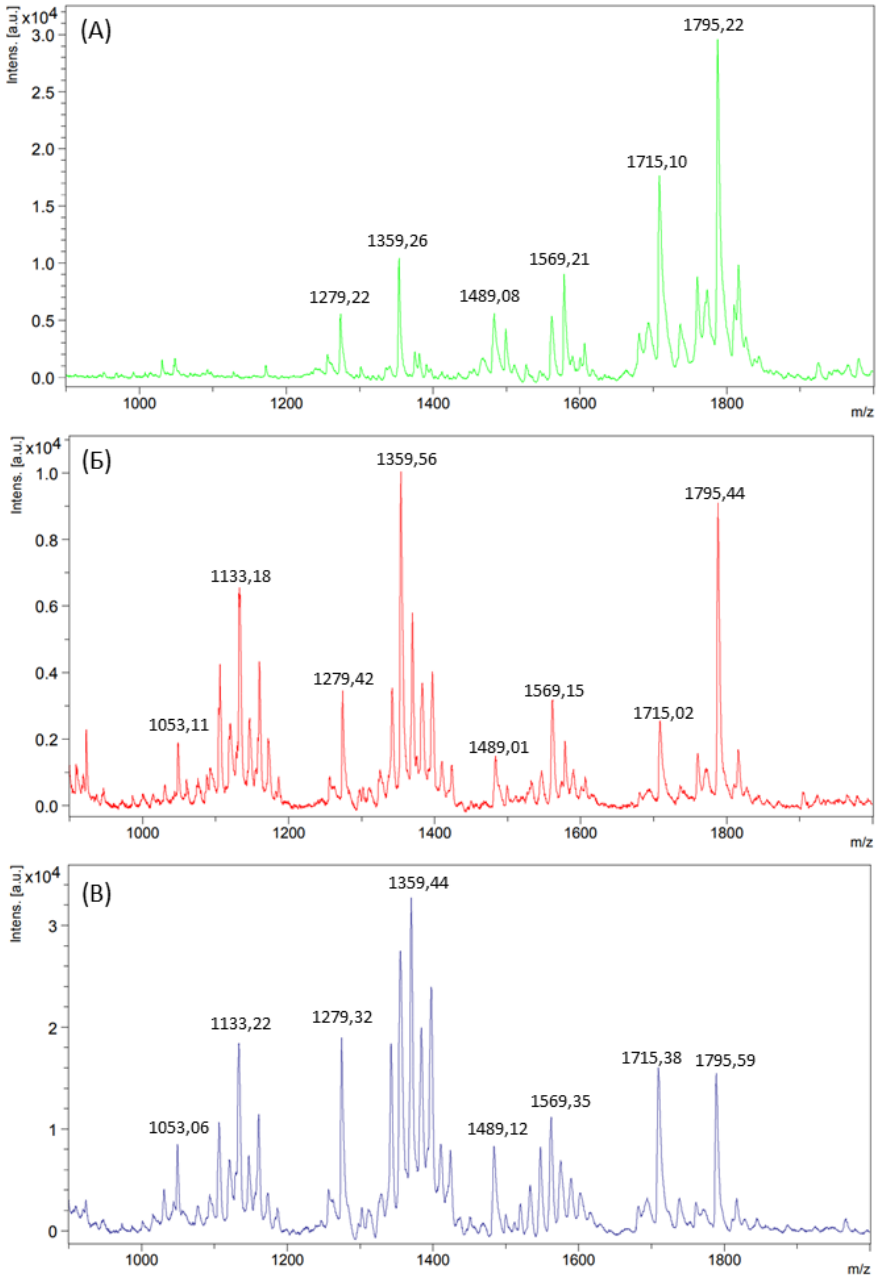


Рисунок 3.5 – Масс-спектры липида А *E. coli* М-17 из ЛПС, экстрагированного (А) 50% водным пропанолом, (Б) смесью БПВ, (В) ВФ

Углевод-содержащие фракции анализировали эксклюзионной ВЭЖХ с применением колонки G3000 (Рисунок 3.6).

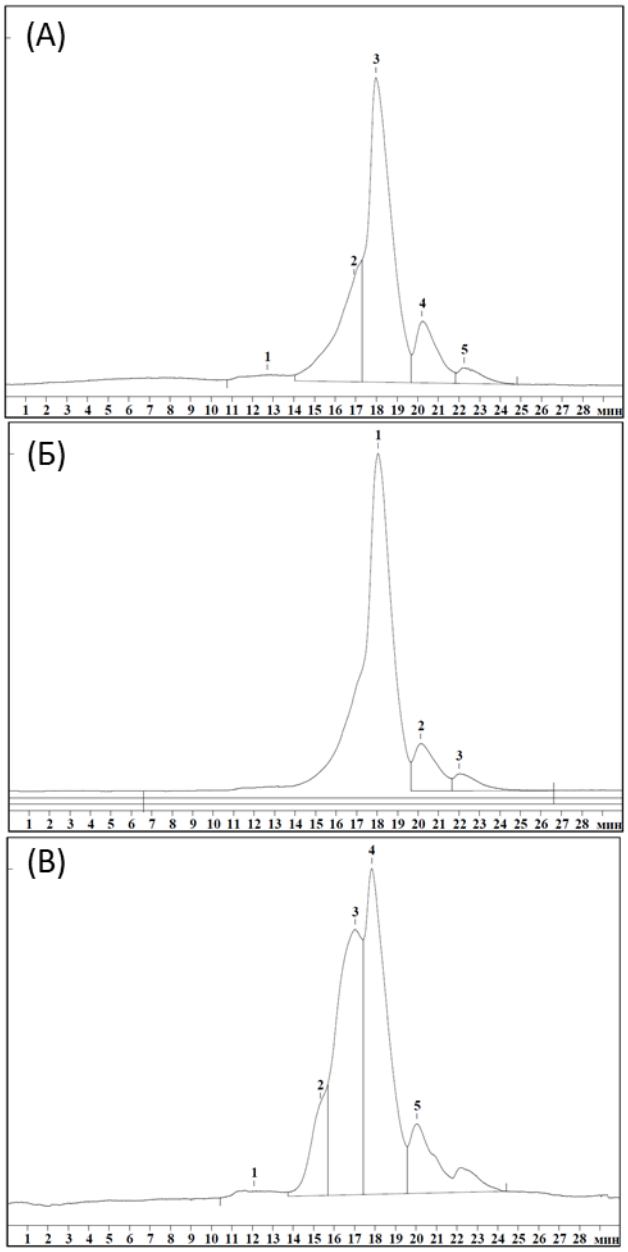


Рисунок 3.6 – Молекулярно-массовое распределение углеводных фракций ЛПС *E. coli* М-17, экстрагированного (А) 50% водным пропанолом, (Б) смесью БПВ, (В) ВФ

Экстракция 50% водным пропанолом и смесью бутанол-пропанол-вода позволяет извлекать более низкомолекулярные фракции ЛПС, в то время как при экстракции фенолом извлекается более высокомолекулярная фракция ЛПС. Это может быть связано с более высокой гидрофобностью анализируемых смесей в сравнении с водным фенолом.

Углевод-содержащая фракция ЛПС, выделенного с помощью 50% водного пропанола, была подвергнута препаративной гель-хроматографии с

использованием колонки с гелем G-50, и полученный в результате гель-хроматографии ОПС анализировали с помощью ^{1}H-ЯМР-спектроскопии. Сравнительный анализ экспериментальных и литературных спектральных данных показал их полное совпадение (Рисунок 3.7) [109].

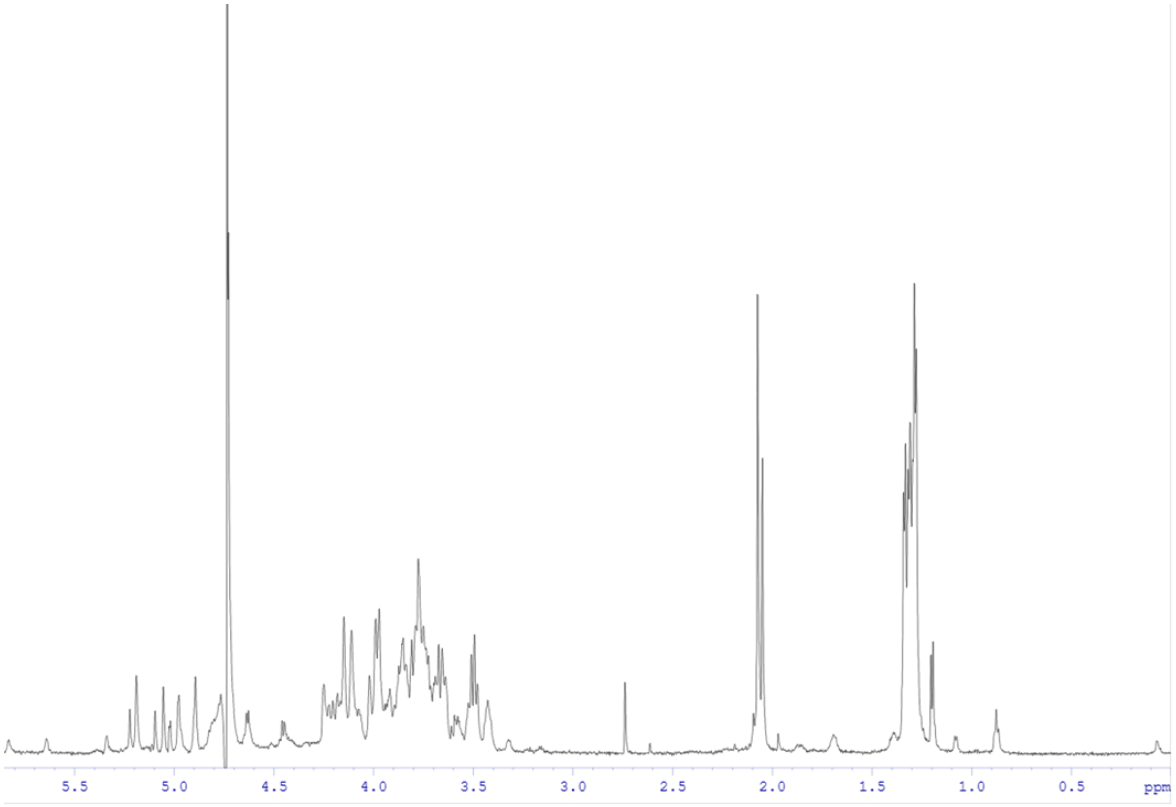


Рисунок 3.7 – ^{1}H ЯМР спектр О-полисахарида *E. coli* М-17 из ЛПС, экстрагированного 50% водным пропанолом

Помимо *E. coli* М-17, новые методы были исследованы при экстракции ЛПС из клеток *S. boydii* 6. Оценивали содержание примесей белков и нуклеиновых кислот в полученных очищенных ЛПС методами Бредфорда и Спирина (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Выход ЛПС из клеток *E. coli* М-17 и *S. boydii* 6 и степень его контаминации (нуклеиновыми кислотами и белками) при различных методах экстрагирования

Микроорганизм	Экстрагент, температура °С, длительность, ч	Выход неочищенного ЛПС (%)	Содержание нуклеиновых кислот (%)	Содержание белка (%)	Суммарное содержание примесей (%)	Выход в расчете на очищенный ЛПС (%)
E. coli М-17	ВФ	7,2	1,3	2,9	4,2	6,9
	БПВ, 60, 16	4,4	0,4	1,0	1,4	4,3
	50% водный пропанол, 60, 16	3,6	0,4	2,3	2,7	3,5
S. boydii 6	ВФ	4,8	1,3	0,6	1,9	4,7
	БПВ, 60, 16	3,4	0,3	2,4	2,7	3,3
	50% водный пропанол, 60, 16	5,9	0,5	1,4	1,9	5,8

Исходя из приведенных данных, использование 50% водного пропанола в качестве экстрагента приводило к снижению выхода при экстракции клеток *E. coli* М-17 и увеличению выхода при экстракции клеток *S. boydii* 6, в сравнении с экстракцией ВФ и БПВ.

При оптимизации временных параметров экстракции клеток было замечено, что повторная трехкратная экстракция при меньшем времени каждого цикла

экстракции (1 час) приводит к существенному увеличению выхода ЛПС (Рисунок 3.8).

Рисунок 3.8 – Выход ЛПС (мг, %) при многократной экстракции клеток *S. boydii 6* 50% водным пропанолом

Так, при трехкратной обработке клеток *S. boydii* 6 50% водным пропанолом суммарный выход ЛПС составил 10,8%, что существенно выше, чем при однократной экстракции (16 часов) – 5,9%. Относительный выход ЛПС при первой экстракции составил 63%, второй – 23%, третьей – 14%. Таким образом, возможно сократить временные затраты путем многократной экстракции клеток при меньшем времени одного цикла экстракции.

С технологической точки зрения переход к 50% водному пропанолу является более удобным по сравнению с трехкомпонентной системой бутанол–пропанол–вода, поскольку исключает риск фазового разделения и упрощает дальнейшее удаление растворителя. Полученные данные показывают, что увеличение числа коротких циклов экстракции может быть предпочтительнее одной длительной обработки, поскольку позволяет повысить суммарный выход ЛПС при сокращении продолжительности отдельной стадии.

3.2. Выводы по главе 3

1. Разработаны и апробированы две альтернативные методики экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий с использованием 50% водного пропанола и смеси бутанол:пропанол:вода.

2. Установлено, что эффективность спиртовых методов экстракции зависит от штамма бактерии: при экстракции клеток *S. boydii* 6 50% водный пропанол обеспечивал более высокий выход очищенного ЛПС, чем горячий водный фенол и смесь бутанол:пропанол:вода, тогда как для *E. coli* M-17 выход был ниже, чем при экстракции горячим водным фенолом.

3. Показано, что экстракция ЛПС 50% водным пропанолом и смесью бутанол:пропанол:вода не сопровождается существенными структурными изменениями, что подтверждено масс-спектрометрией липида А и ^{1}H-ЯМР-спектроскопией ОПС.

4. Установлено, что трехкратная экстракция клеток *S. boydii* 6 50% водным пропанолом по 1 часу повышает суммарный выход ЛПС с 5,9 до 10,8% по сравнению с однократной 16-часовой экстракцией.

ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ДЕТОКСИФИКАЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

4.1. Оптимизация условий щелочной обработки

Химическая детоксификация ЛПС включает в себя удаление остатков ВЖК или фосфорной кислоты в липиде А. Однако для удаления остатков фосфорной кислоты необходим кислотный гидролиз, который ведет к разрушению кетозидной связи и отделению липида А от кора. В этой связи наши усилия были направлены на оптимизацию параметров щелочного гидролиза, который приводит к удалению остатков ВЖК. Критичным является подбор параметров, при которых будет достигаться оптимальный состав ВЖК в липиде А, а именно – наличие в д-ЛПС преимущественно триацильного липида А, который сохраняет иммуностимулирующую активность, но лишен выраженной токсичности.

При оптимизации условий реакции был использован буфер, содержащий 0,2% дезоксихолат натрия, 0,1 М бикарбонат аммония, аммиак до pH 10,2. Дезоксихолат натрия способствует демицеллированию молекул ЛПС, буферная система бикарбонат аммония/аммиак обеспечивает поддержание оптимального pH в ходе проведения реакции. Использование дезоксихолата натрия в данной системе принципиально важно не только для солюбилизации ЛПС, но и для повышения доступности сложноэфирных связей липида А к щелочному гидролизу. Демицеллирование ЛПС снижает влияние агрегатного состояния молекул на течение реакции и тем самым способствует более равномерному деацилированию липида А [110]. В качестве объекта исследования был выбран ЛПС *E. coli* O157, у которого липид А содержит полный набор ВЖК – включая тетра-, пента- и гексаацильные производные. При подборе параметров были определены оптимальные условия щелочного гидролиза – 50 °C, 40 часов. В составе липида А полученного д-ЛПС по данным масс-спектрометрии (MALDI-TOF) отсутствуют примеси высоко пирогенных пента- и гексаацильных производных (Рисунок 4.1,

Б). При меньшем времени обработки (15 часов) в составе липида А сохраняются пирогенные тетра и пента-ацилированные производные (Рисунок 4.1, А).

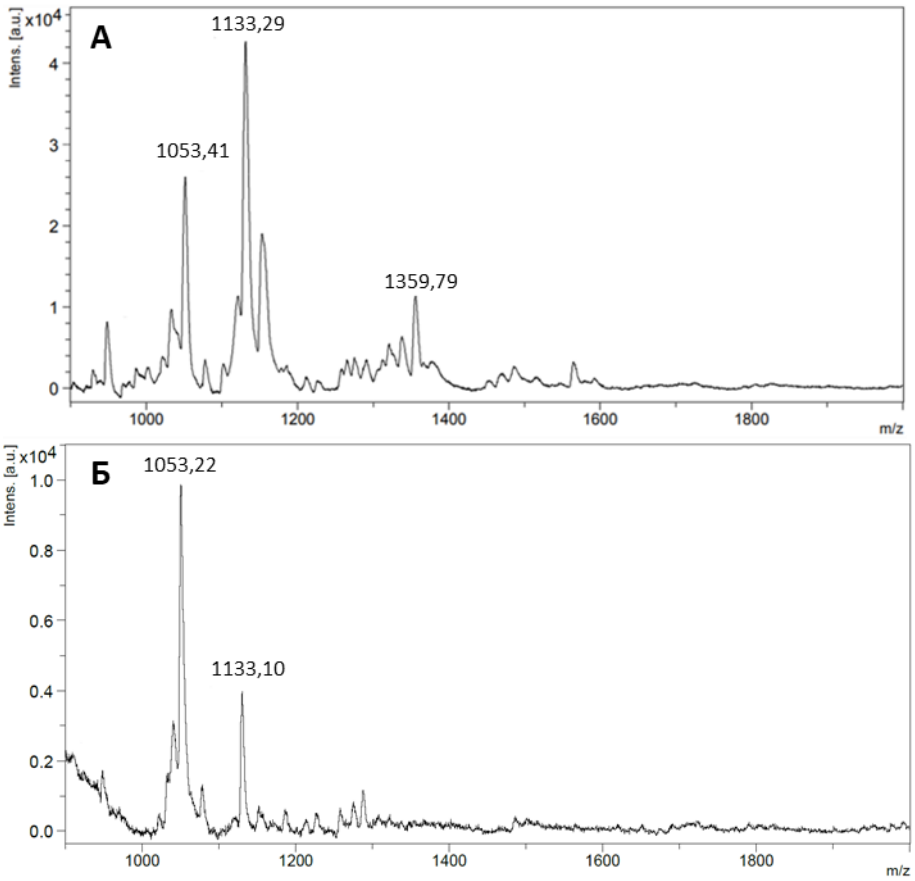


Рисунок 4.1 – Масс-спектр липида А *E. coli* O157 детоксифицированного ЛПС в течение (А) 15 часов (Б) 40 часов

В качестве альтернативы довольно длительной реакции в среде демицеллирующего буфера нами также был оптимизирован способ детоксификации ЛПС в среде водного аммиака. Более жесткие условия реакции привели к сокращению времени для деацилирования. Изучалась кинетика реакции – для этого анализировали структуру липида А посредством масс-спектрометрии (MALDI-TOF) у исходного материала (ЛПС *S. boydii* 6) и получившихся в результате реакции деацилированных ЛПС (Рисунок 4.2).

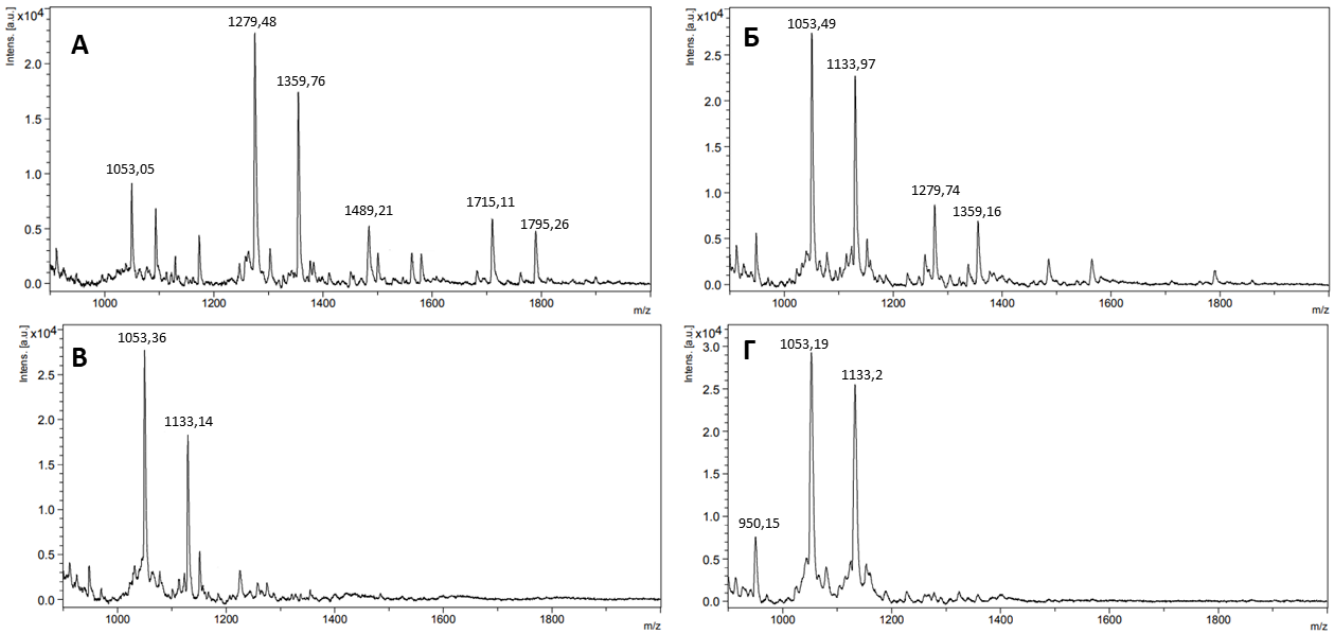


Рисунок 4.2 – Масс-спектры липидов А при изучении кинетики детоксификации 12,5% водным аммиаком ЛПС *S. boydii* 6. (А) Масс-спектр липида А исходного ЛПС. (Б-Г) Масс-спектр липида А ЛПС, детоксифицированного в течение 1,3,4 часов, соответственно

Наиболее оптимальной оказалась обработка в течение 3 часов. При большем времени обработки (4 часа) наблюдается образование примеси диацильного липида А, которое не обладает выраженной иммунологической активностью, при меньшем – сохраняются пирогенные примеси тетра- и пентаацильных липидов А. Следовательно, глубина деацилирования не может рассматриваться как самостоятельный критерий оптимальности процесса. Критическим параметром является соотношение различных ацилированных форм липида А: сохранение высокоацилированных компонентов может быть связано с повышенной пирогенностью, тогда как избыточное накопление диацильных производных может приводить к снижению целевой иммуномодулирующей активности. Поэтому оптимизацию щелочной детоксификации следует проводить с учетом баланса между снижением токсического потенциала и сохранением биологически значимой активности липида А.

4.2. Анализ совмещения стадий экстракции из бактериальных клеток и детоксификации для получения низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei*

В процессе поиска щелочных добавок к ЭС бутанол:пропанол:вода для повышения эффективности процесса экстракции клеток грамотрицательных бактерий было обнаружено, что при замене в ЭС воды на водный раствор аммиака уже при комнатной температуре протекает не только эффективная экстракция ЛПС, но избирательное щелочное омыление освобождающегося ЛПС. Установлено, что, варьируя концентрацию основания и время омыления, возможно получать субстанции д-ЛПС с различной степенью О-деацилирования липида А. Также была продемонстрирована возможность непосредственно после реакции разделить д-ЛПС на низко- и высокомолекулярную фракции посредством ультрафильтрации с использованием в качестве демицеллирующего агента 30% пропанола. Данные о выходе ЛПС, экстрагированных в течение 5 и 16 часов, приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Выход ЛПС из клеток *S. sonnei* и степень его контаминации нуклеиновыми кислотами и белками при экстракции смесью бутанол:н-пропанол:водный аммиак

Микроорганизм	Молекулярная масса фракции, кДа	Длительность, ч	Выход н/о ЛПС, %	НК, %	Белок, %	Σ примесей, %	Выход очищ. ЛПС, %
S. sonnei	Менее 5	5	*3,5*	2,4	1,9	4,3	3,3
	Более 5	5	7,4	3,7	2,0	5,7	7,0
	Менее 5	16	3,2	2,5	2,2	4,7	3,0
	Более 5	16	6,7	4,1	1,7	5,8	6,3
Примечание: н/о ЛПС – неочищенный ЛПС, НК – нуклеиновые кислоты, Σ примесей – суммарное содержание примесей, очищ. ЛПС – очищенный ЛПС							

Полученная низкомолекулярная фракция д-ЛПС *S. sonnei* в дальнейшем может быть применена в качестве встроенного адъюванта при конъюгации со слабоиммуногенными антигенами [111].

При оптимизации условий экстрагирования были выбраны оптимальные условия экстракции – 25 °С, 5 часов. Масс-спектрометрический (ESI-TOF) анализ липида А, полученного из детоксифицированного в таких условиях ЛПС, показал отсутствие в полученном продукте примеси пирогенных гекса- и пентаацильных производных (Рисунок 4.3).

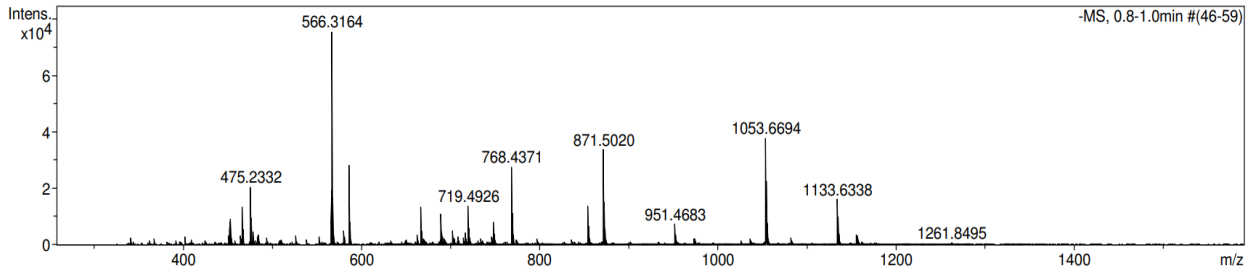


Рисунок 4.3 – Масс-спектр липида А детоксифицированного ЛПС *S. sonnei*

4.3. Выводы по главе 4

1. Оптимизированы условия щелочной детоксификации ЛПС *E. coli* O157 в демицеллирующем буфере: обработка при 50 °С в течение 40 часов приводит к получению д-ЛПС, в липиде А которого отсутствуют высокопирогенные пента- и гексаацильные производные.

2. Оптимизирован способ щелочной детоксификации ЛПС *S. boydii* 6 12,5% водным аммиаком: показано, что обработка при 50 °С в течение 3 часов обеспечивает наиболее благоприятный состав липида А, тогда как при меньшем времени сохраняются более высокоацилированные примеси, а при 4 часах появляется примесь диацильного липида А.

3. Разработан способ одновременной экстракции и детоксификации ЛПС из клеток *S. sonnei* смесью бутанол:н-пропанол:водный аммиак; установлены оптимальные условия процесса — 25 °С и 5 часов, при которых полученный д-ЛПС

характеризуется отсутствием примесей пирогенных гекса- и пентаацильных производных липида А.

ГЛАВА 5. ОБОСНОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕТОКСИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПИДОВ А И УДАЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ ФОСФОЛИПИДОВ

5.1. Подбор условий получения триацильного дифосфорилированного липида А

Для получения детоксифицированного дифосфорилированного триацильного липида А возможно несколько путей. Первый подход включает щелочную обработку ЛПС для удаления части остатков ВЖК из липида А и последующий мягкий кислотный гидролиз, который приводит к разрушению кетозидной связи между липидом А и кором, в то же время сохраняются оба остатка фосфорной кислоты у GlcN I и GlcN II. Второй подход заключается в мягком кислотном гидролизе нативного ЛПС, что приводит к образованию липида А с двумя остатками фосфорной кислоты и полным набором ВЖК. Затем следует щелочная детоксификация полученного липида А. Как первое, так и второе направление требуют применение и оптимизацию условий мягкого кислотного гидролиза. В качестве основы для дальнейшей оптимизации получения липида А был выбран буфер, содержащий лимонную кислоту и ТЭА (Таблица 5.1) [82].

Таблица 5.1 – Условия гидролиза для получения детоксифицированного дифосфорилированного липида А.

Концентрация лимонной кислоты, моль/л	Значение pH				
0,01 М	-	-	3,5	4,0	4,5
0,1 М	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5

Варьируемыми параметрами выступили ионная сила буфера (количество лимонной кислоты) и pH (титрование буфера ТЭА). Сравнительный анализ полученных липидов А методом ТСХ показал, что при гидролизе с использованием 0,01 М буфера (pH 4,5) наблюдается наименьшее образование примеси монофосфорилированного трехацильного липида А (Rf = 0,35) в сравнении с целевым дифосфорилированным триацильным липидом А (Rf = 0,19) (Рисунок 5.1).

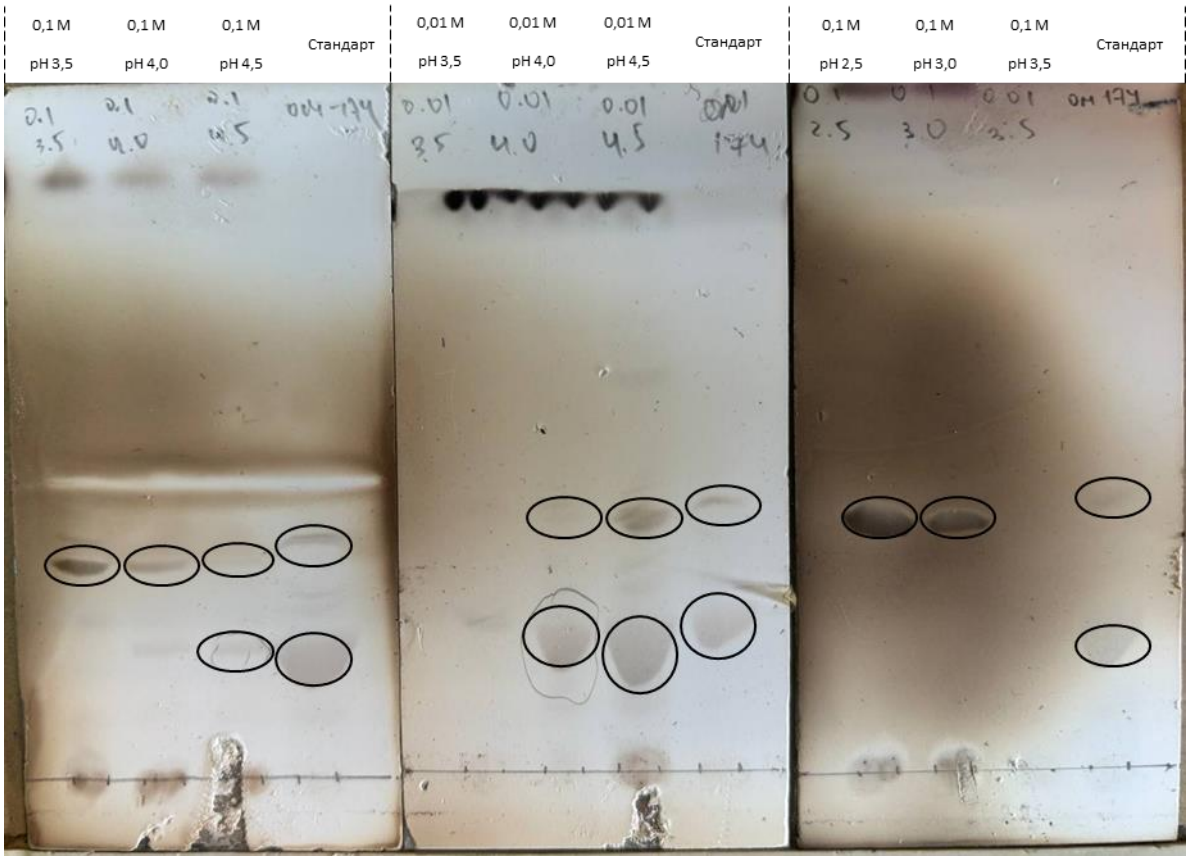


Рисунок 5.1 – ТСХ-анализ липидов А, полученных в результате мягкого кислотного гидролиза. В качестве стандарта использовалась смесь моно- и дифосфорилированного триацильного липида А *E. coli*

Дальнейший масс-спектрометрический анализ липида А, полученного в результате гидролиза с использованием 0,01 М буфера (pH 4,5) подтвердил, что преимущественным продуктом является дифосфорилированный трехацильный липид А (Рисунок 5.2).

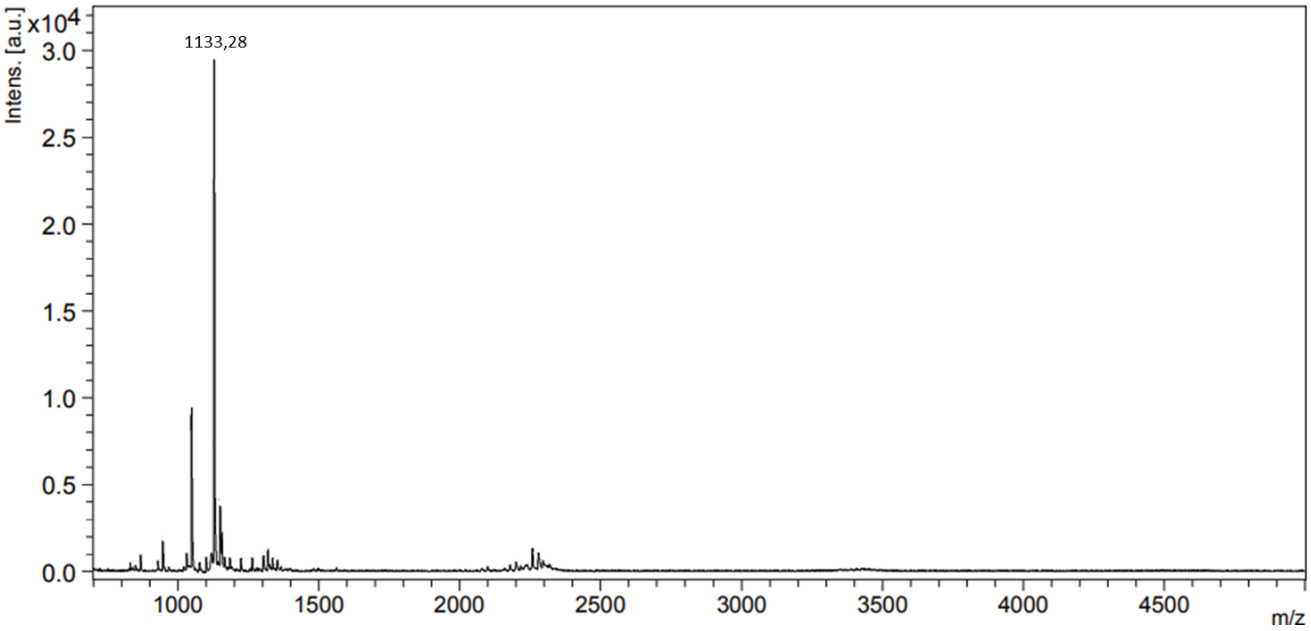


Рисунок 5.2 – Масс-спектр липида А, полученного в результате обработки д-ЛПС 0,01 М лимоннокислым буфером (pH 4,5)

Полученные данные показывают, что использование лимоннокислого буфера с триэтиламином при pH 4,5 может рассматриваться не только как аналитический прием для характеристики липида А, но и как препаративный подход к получению дифосфорилированного триацильного липида А. Мягкие кислотные условия позволяют минимизировать дефосфорилирование продукта при сохранении достаточной эффективности расщепления кетозидной связи между липидом А и углеводной частью ЛПС.

Помимо детоксификации ЛПС с последующим мягким кислотным гидролизом, нами был разработан способ мягкой щелочной детоксификации липида А в смеси хлороформ:метанол:аммиак при 50 °С в течение 24 часов, в результате которого происходит удаление остатков ВЖК (Рисунок 5.3).

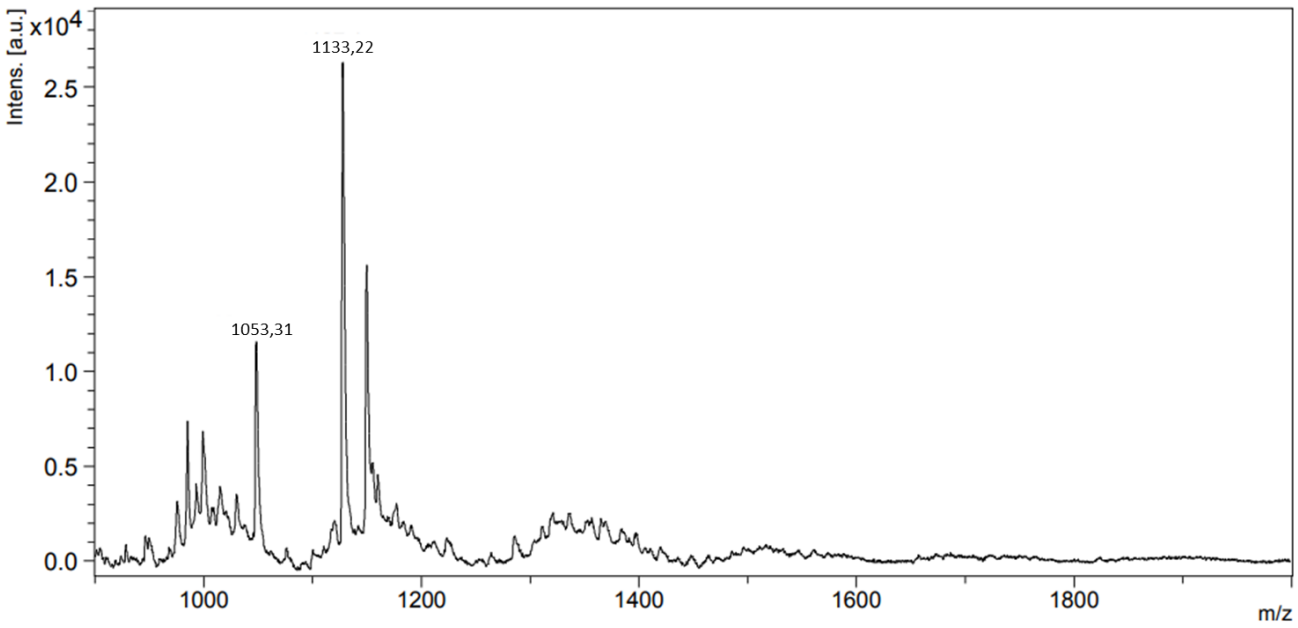


Рисунок 5.3 – Масс-спектр липида А, обработанного смесью хлороформ:метанол:аммиак

5.2. Оптимизация условий кислотного гидролиза при получении монофосфорилированного липида А

Получение монофосфорилированного липида А требует условий жесткого кислотного гидролиза, при котором происходит разрушение кетозидной связи и удаление одного из остатков фосфорной кислоты в липиде А. В качестве реакционной среды использовали 0,2 М соляную кислоту и различное время гидролиза (30 минут, 60 минут, 90 минут) при 100 °С. Замечено, что при уменьшении времени гидролиза наблюдалось снижение степени дефосфорилирования. Увеличение длительности гидролиза сопровождалось полным дефосфорилированием, однако наблюдается частичное деацилирование липида А (Рисунок 5.4).

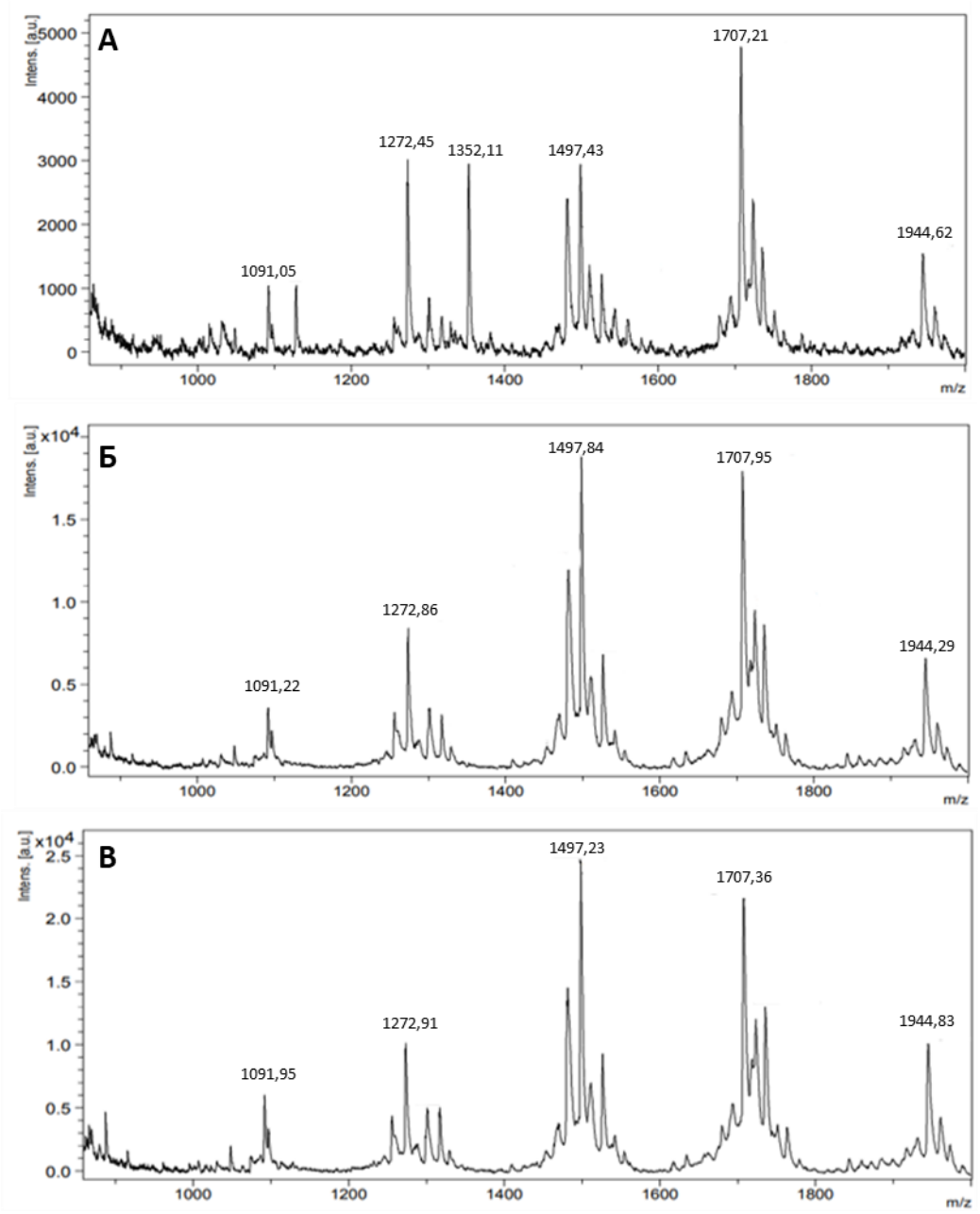


Рисунок 5.4 – Масс-спектр липида А *S. typhi*, полученного в результате обработки ЛПС 0,2 М HCl в течение (А) 30 минут (Б) 60 минут (В) 90 минут

Следовательно, при жестком кислотном гидролизе оптимизация условий должна учитывать не только степень дефосфорилирования, но и сохранность ацильного профиля липида А. Это согласуется с классическими данными по получению монофосфорилированного липида А из *Salmonella minnesota* R595, где конечный продукт представлял собой гетерогенную смесь монофосфорилированных липидов А с различной степенью ацилирования [87].

5.3. Разработка подхода к удалению примесей фосфолипидов из липополисахаридов и клеток грамотрицательных бактерий с применением 95% этанола

Одной из проблем, идентифицированных при получении детоксифицированных липидов А, является наличие примесей фосфолипидов, которые могут вместе экстрагироваться с ЛПС, липидом А и сохраняться в конечном продукте [79,81]. Наличие таких примесей не только снижает химическую однородность образца, но и способно искажать результаты биологических испытаний, поскольку сопутствующие бактериальные липиды могут обладать собственной иммуномодулирующей активностью [112]. Одним из способов удаления этих примесей является обработка клеток/ЛПС гидрофобными растворителями и их смесями. В результате оптимизации условий нами была разработана экономная методика экстракции примесей фосфолипидов 95% этанолом при повышенной температуре (50 °C). В результате трехкратной экстракции ЛПС *E. coli* O157 удалось добиться практически полного отсутствия фосфолипидов в конечной субстанции, по результатам ТСХ-анализа упаренных аликвот, отобранных из спиртовых экстрактов (Rf = 0,78) (Рисунок 5.5).

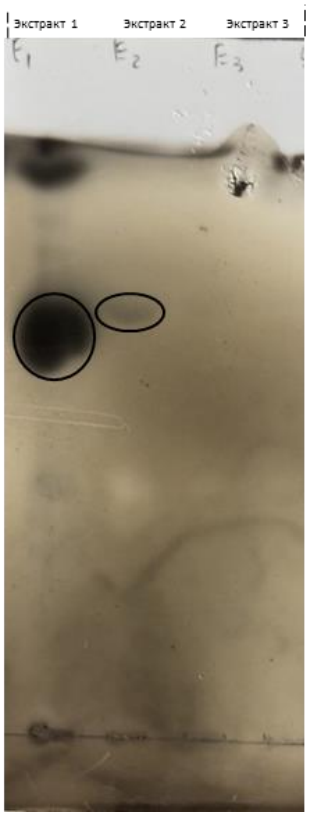


Рисунок 5.5 – ТСХ-анализ спиртовых экстрактов из ЛПС *E. coli* O157

Чтобы проверить, что ЛПС не экстрагируется спиртом, полученные спиртовые вытяжки упарили, сухой остаток был очищен осаждением ТХУ и затем гидролизован 2% AcOH при 100 °C в течение 1 часа. Масс-спектрометрический анализ полученного в результате реакции осадка показал отсутствие характерных для липида А сигналов (Рисунок 5.6).

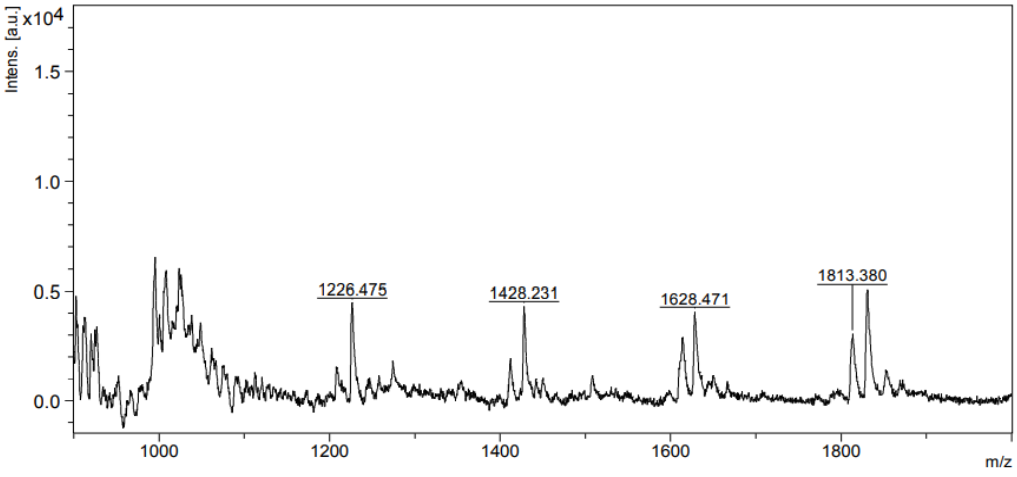


Рисунок 5.6 – Масс-спектр осадка, полученного в результате гидролиза упаренного спиртового экстракта из ЛПС

Это подтверждает селективность выбранного подхода: при обработке 95% этанолом фосфолипидные примеси переходят в спиртовую фазу, тогда как сам ЛПС в данных условиях не экстрагируется в значимых количествах. Следовательно, обработка этанолом может быть использована как простая стадия очистки перед дальнейшим кислотным гидролизом ЛПС.

Альтернативным подходом к удалению примеси фосфолипидов является экстракция фосфолипидов из клеток грамотрицательных бактерий. Экстракция клеток *E. coli* M-17 95% этанолом в аналогичных условиях, используемых для экстракции ЛПС, также привела к практически полному удалению примесей фосфолипидов (Рисунок 5.7).

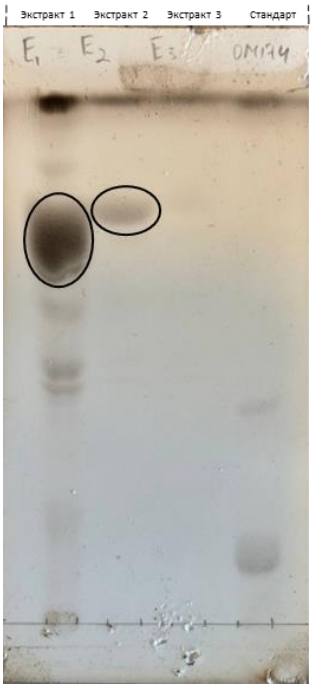


Рисунок 5.7 – ТСХ-анализ спиртовых экстрактов из клеток *E. coli* M-17

Введение стадии обработки 95% этанолом на уровне клеточной массы может быть технологически предпочтительным, поскольку позволяет снизить количество фосфолипидных примесей еще до выделения ЛПС. При этом селективность такой обработки зависит от структуры ЛПС: для более гидрофобных укороченных R-форм описана возможность их частичного извлечения спиртами, особенно метанолом [41]. Поэтому для разрабатываемой схемы использование 95% этанола

является более предпочтительным, поскольку в проведенных опытах он обеспечивал удаление фосфолипидов без выявляемой экстракции ЛПС.

5.4. Выводы по главе 5

1. Подобраны условия мягкого кислотного гидролиза деацилированного д-ЛПС, обеспечивающие преимущественное образование дифосфорилированного триацильного липида А.

2. Показано, что гидролиз ЛПС 0,2 М HCl при 100 °С позволяет получать детоксифицированный монофосфорилированный липид А, тогда как увеличение длительности обработки сопровождается частичным деацилированием продукта.

3. Установлено, что трехкратная экстракция ЛПС *E. coli* O157 95% этанолом при 50 °С обеспечивает удаление примесей фосфолипидов без заметной потери самого ЛПС.

4. Показано, что предварительная обработка клеток *E. coli* M-17 95% этанолом также позволяет эффективно удалять примеси фосфолипидов.

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТОКСИФИЦИРОВАННОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA SONNEI* НА ЭТАПЕ РАЗРАБОТКИ СУБСТАНЦИИ

6.1. Разработка спецификации на низкомолекулярный детоксифицированный липополисахарид *Shigella sonnei*

В главах 1, 3, 4 данной диссертационной работы описаны методы для изучения структуры ЛПС и д-ЛПС. Исходя из полученных данных были сформулированы основные принципы стандартизации фармацевтической субстанции на основе низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei* и определены нормативы качества на этапе разработки субстанции. В Таблице 6.1 представлены показатели качества низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*.

Таблица 6.1 – Нормативы качества для низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*

Показатель качества	Значения	Методы анализа
Описание	Белый или желтовато-белый порошок	Визуальный
Подлинность	^{1}Н-ЯМР-спектр образца О-специфического полисахарида, выделенного из низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*, соответствует литературному ^{1}Н-ЯМР-спектру О-специфического полисахарида *Shigella sonnei*	^{1}Н-ЯМР спектроскопия

Продолжение Таблицы 6.1

	Липид А, выделенный из низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*, содержит тетра-, три- и диацильные производные	Масс-спектрометрия
Растворимость	Субстанция умеренно растворима в воде	Визуальный
Белок	Не более 2%	Метод Бредфорд
Нуклеиновые кислоты	Не более 2%	Метод Спирина
Вода	Не более 5%	ГФ РФ XV изд.
Сульфатная зола	Не более 0,5%	ГФ РФ XV изд.
Остаточные растворители	Не более 0,5%	ГФ РФ XV изд.
Тяжелые металлы	Pb≤0,5; Cd≤0,5; As≤1,0; Hg≤0,1 (ppm)	ГФ РФ XV изд.
Родственные примеси	Сумма родственных примесей ≤3,0%	ВЭЖХ
Количественное содержание	95,0–105,0%	ВЭЖХ

Для д-ЛПС принципиально важны не только общие показатели чистоты, но и доказательство структурной идентичности сразу для двух доменов молекулы — углеводной части и липида А. Углеводную часть, полученную после кислотного гидролиза, анализируют с применением ^{1}H-ЯМР-спектроскопии и сопоставляют полученный спектр с литературными данными [113]. Совпадение характеристических сигналов подтверждает сохранение сероспецифического углеводного домена.

Для анализа липида А используют масс-спектрометрию после кислотного гидролиза д-ЛПС. Наличие тетра-, три- и диацильных производных соответствует ожидаемому профилю детоксифицированного липида А. Важно, что такое подтверждение идентичности одновременно выступает аналитическим свидетельством снижения токсического потенциала препарата: высокоацильные формы липида А должны отсутствовать либо присутствовать только на следовом уровне.

Показатели белка и нуклеиновых кислот отражают степень удаления типичных сопутствующих примесей клеточного происхождения, неизбежно попадающих в продукт на стадиях экстракции и выделения. Для их контроля целесообразно использовать, соответственно, метод Бредфорда и метод Спирина как быстрые и воспроизводимые процедуры, пригодные для рутинного анализа серий.

Показатели воды, сульфатной золы, остаточных растворителей и элементных примесей необходимы для общей характеристики субстанции и оценки ее технологической пригодности. Даже если на этапе ранней разработки эти показатели не всегда включаются в полном объеме в регистрационную спецификацию, их определение принципиально важно для расчета материального баланса, корректной аттестации стандартного образца и последующего переноса методик на более поздние стадии фармацевтической разработки.

Отдельное место в контроле качества низкомолекулярного д-ЛПС занимает определение родственных примесей. Для данного объекта под родственными примесями следует понимать высоко- и низкомолекулярные фракции, отличающиеся по длине углеводной части. Поэтому для их оценки оправдано применение эксклюзионной ВЭЖХ в демицеллирующих условиях, что позволяет изучать индивидуальные соединения.

6.2. Аттестация стандартного образца низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei*

Для количественного определения д-ЛПС методом внешнего стандарта разработан стандартный образец низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*. Его аттестация выполнена методом материального баланса, поскольку объект исследования является гетерогенной биотехнологической субстанцией и прямое абсолютное определение содержания действующего вещества затруднено. Стандартный образец (СО) разработан для целей количественного определения методом внешнего стандарта (паспорт СО представлен в приложении Ж). Подход к разработке и аттестации СО соответствует требованиям ОФС.1.1.0007 (ГФ РФ XV издания) и 2.3.11.0 (ФЕАЭС), включая установление аттестованного значения. Результаты оценки показателей качества материала СО представлены в таблицах 6.2-6.7. Статистическую обработку результатов, полученных в повторных опытах, проводили с расчетом среднего значения, стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) по результатам трех измерений.

Таблица 6.2 – Содержание воды в СО низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*

№	Вода, %
1	2,09
2	2,10
3	2,11
Среднее ± SD	2,10 ± 0,01
RSD, %	0,48

Содержание воды в материале СО составило 2,10 ± 0,01%, при RSD 0,48%, что свидетельствует о хорошей воспроизводимости определения. Полученное значение существенно ниже предельного уровня, предложенного для субстанции, и подтверждает пригодность лиофилизированного материала для дальнейшей аттестации.

Таблица 6.3 – Содержание сульфатной золы в СО низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*

№	Сульфатная зола, %
1	0,09
2	0,10
3	0,10
Среднее ± SD	0,10 ± 0,01
RSD, %	5,97

Содержание сульфатной золы в СО оказалось низким и составило 0,10 ± 0,01%. Это указывает на незначительный уровень неорганических примесей в образце и подтверждает достаточную химическую чистоту материала СО для использования в количественном анализе.

Таблица 6.4 – Содержание тяжелых металлов в СО низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*

Элемент	Значение, ppm	Предел, ppm	Соответствие
Pb	<0,05	≤0,5	Да
Cd	<0,02	≤0,5	Да
As	<0,05	≤1,0	Да
Hg	<0,01	≤0,1	Да

Содержание Pb, Cd, As и Hg во всех случаях оказалось ниже установленных пределов обнаружения и значительно ниже проектных нормативов. Полученные данные подтверждают, что материал СО соответствует требованиям по элементным примесям и не содержит технологически значимых количеств тяжелых металлов.

Таблица 6.5 – Содержание остаточных растворителей в СО низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*

Растворитель	Значение, ppm	Предел, ppm	Соответствие
Этанол	220	5000	Да
Н-пропанол	205	5000	Да

Суммарное содержание остаточных растворителей в СО составляет 0,04%.

В СО были обнаружены лишь следовые количества этанола и н-пропанола; суммарное содержание остаточных растворителей составило 0,04%. Это значительно ниже установленного предела и показывает, что стадии удаления органических растворителей при получении препарата и СО являются эффективными.

Таблица 6.6 – Содержание родственных примесей в СО низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*

Пик	Интерпретация	Содержание, %
1	Высокомолекулярные компоненты	0,25
2	Основной компонент (д-ЛПС)	99,05
3	Низкомолекулярные фрагменты	0,45
4	Минорные компоненты	0,25
—	Сумма родственных примесей	0,95

Основной компонент составляет 99,05% субстанции, а сумма родственных примесей — 0,95%. Это свидетельствует о высокой степени однородности СО и подтверждает, что выбранная ВЭЖХ-методика позволяет учитывать как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные сопутствующие фракции.

Расчёт аттестованного значения выполнен методом материального баланса с учётом экспериментально определённых примесей. Результаты расчёта приведены в таблице 6.7.

Таблица 6.7 – Расчёт аттестованного значения действующего вещества СО низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*

Компонент	Значение, %
Вода	2,10
Сульфатная зола	0,10
Остаточные растворители (сумма)	0,04
Родственные примеси (сумма)	0,95
Действующее вещество (по балансу)	96,81

Расчет по материальному балансу показал, что аттестованное содержание действующего вещества в СО составляет 96,81%. Полученное значение согласуется с экспериментальными данными по содержанию примесей и может быть использовано при количественном определении д-ЛПС методом внешнего стандарта.

6.3. Валидация методики определения родственных примесей

Валидация методики определения родственных примесей выполнена в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 (ГФ РФ XV) и 2.3.14.0 (ФЕАЭС) для методик испытаний на примеси. В программу валидации были включены показатели специфичности, линейности, прецизионности, внутрилабораторной воспроизводимости, правильности, предела обнаружения, предела количественного определения и робастности. Для характеристики пригодности хроматографической системы использовали разрешение между основным пиком и ближайшей примесью (Rs), коэффициент асимметрии пика (T), число теоретических тарелок (N) и относительное стандартное отклонение площади пика (RSD). Линейность оценивали по уравнению линейной регрессии $y = aC + b$, где C

— концентрация, a — угловой коэффициент, b — свободный член, R^2 — коэффициент детерминации. Предел обнаружения и предел количественного определения оценивали по отношению сигнал/шум (S/N).

Результаты представлены в таблицах 6.8-6.14.

Таблица 6.8 – Определение специфичности и пригодности хроматографической системы для методики определения родственных примесей

Параметр	Критерий	Результат
Rs (основной пик/ближайшая примесь)	≥1,5	2,1
Асимметрия (T)	≤2,0	1,2
N (осн. пик)	≥2000	5800
RSD площади (n=6), %	≤2,0	0,6

Полученные значения Rs, коэффициента асимметрии, числа теоретических тарелок и RSD площади пика соответствуют установленным критериям пригодности системы. Это подтверждает, что методика обеспечивает достаточное разделение основного пика и примесей и может использоваться для анализа родственных примесей в субстанции.

Таблица 6.9 – Определение линейности отклика и диапазона для методики определения родственных примесей

Уровень	C, мг/мл	Площадь, усл. ед.
1	0,50	512
2	0,75	770
3	1,00	1028
4	1,25	1286
5	1,50	1543
a, наклон		1031,2
b, свободный член		-3,4
R^2		0,99

В исследованном диапазоне концентраций отклик характеризуется линейной зависимостью с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,99$. Это подтверждает пригодность выбранного диапазона для количественной оценки уровня родственных примесей в анализируемом препарате.

Таблица 6.10 – Определение прецизионности для методики определения родственных примесей

№	Сумма примесей, %
1	1,22
2	1,18
3	1,21
4	1,19
5	1,20
6	1,23
Среднее ± SD	1,205 ± 0,019
RSD, %	1,55

При шести повторных определениях сумма примесей составила 1,205 ± 0,019%, а RSD не превышало 2%. Следовательно, методика характеризуется удовлетворительной сходимостью результатов и пригодна для рутинного применения.

Таблица 6.11 – Определение внутрилабораторной воспроизводимости для методики определения родственных примесей

Условие	Сумма примесей, %
День 1 / оператор А	1,20
День 2 / оператор Б	1,17
День 3 / оператор А	1,24
Среднее ± SD	1,203 ± 0,035
RSD, %	2,92

Результаты, полученные в разные дни и разными операторами, хорошо согласуются между собой; среднее значение суммы примесей составило 1,203%. Это показывает, что методика сохраняет воспроизводимость при изменении условий внутри одной лаборатории.

Таблица 6.12 – Определение правильности для методики определения родственных примесей

Уровень, %	Внесено	Определено	Степень извлечения, %
80	0,80	0,79	98,8
100	1,00	1,01	101,0
120	1,20	1,19	99,2
Среднее			99,6
RSD, %			1,20

Степень извлечения на уровнях 80, 100 и 120% находилась вблизи 100%, а среднее значение составило 99,6%. Это свидетельствует об отсутствии выраженной систематической ошибки и подтверждает правильность методики определения родственных примесей.

Таблица 6.13 – Определение предела обнаружения и предела количественного определения для методики определения родственных примесей

Параметр	Критерий	Значение, %
Предел обнаружения	S/N≈3	0,02
Предел количественного определения	S/N≈10	0,05

Предел обнаружения составил 0,02%, а предел количественного определения — 0,05%. Следовательно, чувствительность методики достаточна для контроля низких уровней примесей и значительно ниже проектного норматива по их суммарному содержанию.

Таблица 6.14 – Определение робастности для методики определения родственных примесей

Параметр	Вариант	Сумма примесей, %
Поток	−10%	1,23
Поток	Номинал	1,20
Поток	+10%	1,18
Температура	−5 °C	1,22
Температура	Номинал	1,20
Температура	+5 °C	1,19

Небольшие изменения скорости потока и температуры не приводили к существенному изменению результата по сумме примесей. Это указывает на устойчивость методики к умеренным вариациям хроматографических условий и подтверждает ее робастность.

6.4. Валидация методики количественного определения

Валидация методики количественного определения методом внешнего стандарта выполнена в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 (ГФ РФ XV издания) и 2.3.14.0 (ФЕАЭС) для методик количественного определения. В качестве аналитического сигнала использовали площадь пика основного компонента, а расчет содержания проводили относительно аттестованного СО. Для оценки специфичности дополнительно анализировали относительное отклонение времени удерживания между стандартным образцом и испытуемым образцом (ΔtR). Остальные параметры валидации — Rs, RSD, линейность, правильность и робастность — оценивали по тем же подходам, что и для методики определения родственных примесей. Результаты представлены в таблицах 6.15-6.20.

Таблица 6.15 – Определение специфичности и пригодности хроматографической системы методики количественного определения

Параметр	Критерий	Результат
ΔtR (СО/образец)	≤2,0%	0,4%
Rs (основной пик/примесь)	≥1,5	2,0
RSD площади (n=6), %	≤2,0	0,5

Малое отклонение времени удерживания между СО и испытуемым образцом, а также соответствие параметров Rs и RSD заданным критериям подтверждают специфичность методики количественного определения. Хроматографическая система является пригодной для анализа содержания д-ЛПС методом внешнего стандарта.

Таблица 6.16 – Определение линейности отклика и диапазона методики количественного определения

Уровень	С, мг/мл	Площадь, усл. ед.
1	0,50	508
2	0,75	765
3	1,00	1025
4	1,25	1280
5	1,50	1538
a, наклон		1030,0
b, свободный член		-6,8
R^2		0,99

В исследованном диапазоне концентраций установлена линейная зависимость площади пика от концентрации, с коэффициентом детерминации R^2 = 0,99. Это подтверждает возможность использования методики для количественного определения д-ЛПС в выбранном аналитическом диапазоне.

Таблица 6.17 – Определение прецизионности методики количественного определения

№	Содержание д-ЛПС, %
1	99,4
2	99,6
3	99,5
4	99,7
5	99,3
6	99,6
Среднее ± SD	99,52 ± 0,15
RSD, %	0,15

Результаты шести повторных определений содержания д-ЛПС хорошо согласуются между собой; среднее значение составило 99,52%, RSD — 0,15%. Это свидетельствует о высокой повторяемости методики количественного определения.

Таблица 6.18 – Определение внутрилабораторной воспроизводимости методики количественного определения

Условие	Содержание д-ЛПС, %
День 1	99,5
День 2	99,2
День 3	99,8
Среднее ± SD	99,50 ± 0,30
RSD, %	0,30

При выполнении анализа в разные дни получены близкие результаты, а среднее содержание д-ЛПС составило 99,50%. Низкое значение RSD подтверждает воспроизводимость методики в условиях одной лаборатории.

Таблица 6.19 – Определение правильности методики количественного определения

Уровень, %	Внесено	Определено	Степень извлечения, %
80	80,0	79,2	99,0
100	100,0	100,5	100,5
120	120,0	119,1	99,2
Среднее			99,6
RSD, %			0,81

Степень извлечения на трех уровнях внесения составила от 99,0 до 100,5%, при среднем значении 99,6%. Это указывает на хорошую правильность методики и отсутствие существенной систематической ошибки при количественном определении.

Таблица 6.20 – Определение робастности методики количественного определения

Параметр	Вариант	Содержание д-ЛПС, %
Поток	−10%	99,7
Поток	Номинал	99,5
Поток	+10%	99,4
Температура	−5 °C	99,6
Температура	Номинал	99,5
Температура	+5 °C	99,5

Изменение скорости потока и температуры колонки в заданных пределах не оказывало существенного влияния на результат количественного определения. Следовательно, методика устойчива к небольшим колебаниям аналитических условий и может рассматриваться как робастная.

6.5. Выводы по главе 6

1. Сформированы показатели качества и проектные нормативы для субстанции низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei*, включающие подлинность, показатели чистоты, родственные примеси и количественное содержание.

2. Аттестован стандартный образец низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei* методом материального баланса; аттестованное содержание действующего вещества составило 96,81%.

3. Валидированы методики определения родственных примесей и количественного определения методом внешнего стандарта для субстанции низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei* с использованием эксклюзионной ВЭЖХ в объёме, соответствующем требованиям ГФ РФ XV издания и ФЕАЭС.

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БПВ	экстрагирующая смесь бутанол-пропанол-вода
ВЖК	высшие жирные кислоты
ВР	стадия вспомогательных работ
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС	высокоэффективная жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией
ВФ	водный фенол
ГЖХ	газожидкостная хроматография
ГФ РФ	Государственная фармакопея Российской Федерации
д-ЛА	детоксифицированный липид А
д-ЛОС	детоксифицированный липоолигосахарид
д-ЛПС	детоксифицированный липополисахарид
Kd	коэффициент распределения (для эксклюзионной хроматографии)
КПС	капсульный полисахарид
КХ	контроль качества
ЛА	липид А
ЛОС	липоолигосахарид
ЛПС	липополисахарид
МС	масс-спектрометрия
ОПС	О-специфический полисахарид (О-антиген)
ОФС	общая фармакопейная статья
ПЗ	повторяющееся звено
ПФ	подвижная фаза
СО	стандартный образец
СТП	стадия технологического процесса
ТП	стадия основного технологического процесса
ТСХ	тонкослойная хроматография

ТХУ	трихлоруксусная кислота
ТЭА	триэтиламин
ФЕАЭС	Фармакопея Евразийского экономического союза
ЭС	экстрагирующая смесь
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ELSD	детектор испарительного рассеяния света
ESI-TOF	времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением
GlcN	глюкозамин
Kdo	2-кето-3-дезоксиоктулозоновая кислота
LOD	предел обнаружения
LOQ	предел количественного определения
MALDI-TOF	времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией
MD-2	фактор миелоидной дифференцировки 2
МФЛ	монофосфорилированный липид А
MWCO	порог отсечения по молекулярной массе
OM-174	детоксифицированный триацильный дифосфорилированный липид А
PBS	фосфатно-солевой буфер
RSD	относительное стандартное отклонение
S/N	отношение сигнал/шум
SD	стандартное отклонение
SDS-PAGE	электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия
SEC	эксклюзионная (гель-проникающая) хроматография
TLR4	толл-подобный рецептор 4
Tris	трис(гидроксиметил)аминометан

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vaure, C. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species / C. Vaure, Y. Liu // Frontiers in Immunology. – 2014. – Vol. 5. – Article 316. – DOI: 10.3389/fimmu.2014.00316.

2. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification / E. T. Rietschel, H. Brade, O. Holst [et al.] // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 1996. – Vol. 216. – P. 39-81. – Текст : непосредственный.

3. Zielen, S. Lipopolysaccharide challenge: immunological effects and safety in humans / S. Zielen, J. Trischler, R. Schubert // Expert Review of Clinical Immunology. – 2015. – Vol. 11, № 3. – P. 409-418. – DOI: 10.1586/1744666X.2015.1012158.

4. Klebsiella LPS O1-antigen prevents complement-mediated killing by inhibiting C9 polymerization / F. M. Masson, S. Káradóttir, S. P. A. van der Lans [et al.] // Scientific Reports. – 2024. – Vol. 14, № 1. – Article 20701.

5. Matsuura, M. Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity / M. Matsuura // Frontiers in Immunology. – 2013. – Vol. 4. – Article 109.

6. Structure and genetics of Escherichia coli O antigens / B. Liu, A. Furevi, A. V. Perepelov [et al.] // FEMS Microbiology Reviews. – 2020. – Vol. 44, № 6. – P. 655-683. – DOI: 10.1093/femsre/fuz028.

7. Cross-specificity of protective human antibodies against Klebsiella pneumoniae LPS O-antigen / T. Rollenske, V. Szijarto, J. Lukasiewicz [et al.] // Nature Immunology. – 2018. – Vol. 19, № 6. – P. 617-624. – DOI: 10.1038/s41590-018-0106-2.

8. Rohokale, R. Development in the concept of bacterial polysaccharide repeating unit-based antibacterial conjugate vaccines / R. Rohokale, Z. Guo // ACS Infectious Diseases. – 2023. – Vol. 9, № 2. – P. 178-212. – DOI: 10.1021/acsinfecdis.2c00559.

9. Frasch, C. E. Preparation of bacterial polysaccharide-protein conjugates: analytical and manufacturing challenges / C. E. Frasch // Vaccine. – 2009. – Vol. 27, № 46. – P. 6468-6470.

10. Costantino, P. The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines / P. Costantino, R. Rappuoli, F. Berti // Expert Opinion on Drug Discovery. – 2011. – Vol. 6, № 10. – P. 1045-1066.

11. Rappuoli, R. On the mechanisms of conjugate vaccines / R. Rappuoli, E. De Gregorio, P. Costantino // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2019. – Vol. 116, № 1. – P. 14-16. – DOI: 10.1073/pnas.1819612116.

12. Church, N. A. Antibiotic resistance crisis: challenges and imperatives / N. A. Church, J. L. McKillip // Biologia. – 2021. – Vol. 76, № 5. – P. 1535-1550.

13. Silipo, A. The diversity of the core oligosaccharide in lipopolysaccharides / A. Silipo, A. Molinaro // Endotoxins: structure, function and recognition. – Dordrecht : Springer, 2010. – P. 69-99. – Текст : непосредственный.

14. Gorman, A. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery / A. Gorman, A. P. Golovanov // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2022. – Vol. 180. – P. 289-307. – DOI: 10.1016/j.ejpb.2022.10.006.

15. Lipopolysaccharide lipid A: a promising molecule for new immunity-based therapies and antibiotics / P. Garcia-Vello, F. Di Lorenzo, D. Zucchetta [et al.] // Pharmacology and Therapeutics. – 2022. – Vol. 230. – Article 107970. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107970.

16. Caroff, M. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identification / M. Caroff, A. Novikov // OCL - Oilseeds and Fats, Crops and Lipids. – 2020. – Vol. 27. – Article 31. – DOI: 10.1051/ocl/2020025.

17. Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity / A. Molinaro, O. Holst, F. Di Lorenzo [et al.] // Chemistry – A European Journal. – 2015. – Vol. 21, № 2. – P. 500-519. – DOI: 10.1002/chem.201403923.

18. A journey from structure to function of bacterial lipopolysaccharides / F. Di Lorenzo, K. A. Duda, R. Lanzetta [et al.] // Chemical Reviews. – 2022. – Vol. 122, № 20. – P. 15767-15821. – DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c01321.

19. Antitumor activity of ligands of Toll-like receptors of bacteria Shigella sonnei / E. M. Novikova, O. V. Kozyreva, N. A. Razvalyayeva [et al.] // Immunologiya. – 2023. – Vol. 44, № 2. – P. 167-180.

20. Effect of detoxified Shigella sonnei lipopolysaccharide on the expression of tumor-associated antigen gp100 and MHC I antigens by B16 melanoma cells / E. M. Novikova, E. S. Chukhina, N. A. Razvalyayeva [et al.] // Immunologiya. – 2024. – Vol. 45, № 1. – P. 68-81.

21. Application of lipopolysaccharide in establishing inflammatory models / X. Zhang, X. Tian, Y. Wang [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – Vol. 279. – Article 135371. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135371.

22. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms / T. Zhao, Y. Cai, Y. Jiang [et al.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2023. – Vol. 8, № 1. – Article 283. – DOI: 10.1038/s41392-023-01557-7.

23. Андреев, Ю. Ю. Адъюванты и иммуномодуляторы в составе вакцин / Ю. Ю. Андреев, А. П. Топтыгина // Иммунология. – 2021. – Т. 42, № 6. – С. 720-729.

24. Robbins, J. B. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum / J. B. Robbins, R. Schneerson, S. C. Szu // The Journal of Infectious Diseases. – 1995. – Vol. 171, № 6. – P. 1387-1398.

25. Абрамцева, М. В. Перспективные направления разработки вакцинных препаратов для профилактики шигеллеза / М. В. Абрамцева, Е. О. Неманова, Н. С. Алехина // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2022. – Т. 22, № 3. – С. 249-265.

26. Регуляторные подходы к оценке и регистрации вакцинных адъювантов: обзор глобальной практики / А. П. Савин, В. В. Смирнов, А. В.

Филатов [и др.] // Естественные и технические науки. – 2026. – № 3 (214). – С. 148-156. – Текст : непосредственный.

27. Zhu, H. Recent advances in lipopolysaccharide-based glycoconjugate vaccines / H. Zhu, C. S. Rollier, A. J. Pollard // Expert Review of Vaccines. – 2021. – Vol. 20, № 12. – P. 1515-1538. – DOI: 10.1080/14760584.2021.1984889.

28. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure / O. Westphal, K. Jann // Methods in Carbohydrate Chemistry. – 1965. – Vol. 5. – P. 83-91.

29. Staub, A. M. Bacterial lipido-proteinopolysaccharides (O somatic antigens): extraction with trichloroacetic acid / A. M. Staub // Methods in Carbohydrate Chemistry. – 1965. – Vol. 5. – P. 92-93. – Текст : непосредственный.

30. Preparation and host-reactive properties of endotoxin with low content of nitrogen and lipid / E. Ribi, T. Haskins, M. Landy [et al.] // The Journal of Experimental Medicine. – 1961. – Vol. 114. – P. 647-663.

31. Roberts, N. A. Release of lipopolysaccharide during the preparation of cell walls of Pseudomonas aeruginosa / N. A. Roberts, G. W. Gray, S. G. Wilkinson // Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes. – 1967. – Vol. 135, № 5. – P. 1068-1071. – DOI: 10.1016/0005-2736(67)90079-X.

32. Eidhin, D. N. A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from Bacteroides, Porphyromonas and Prevotella / D. N. Eidhin, C. Mouton // FEMS Microbiology Letters. – 1993. – Vol. 110, № 2. – P. 133-138. – DOI: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06309.x.

33. Goebel, W. F. Studies on the Flexner group of dysentery bacilli. I. The specific antigens of Shigella paradysenteriae (Flexner) / W. F. Goebel, F. Binkley, E. Perlman // The Journal of Experimental Medicine. – 1945. – Vol. 81, № 4. – P. 315-330.

34. Leive, L. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of E. coli / L. Leive // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1965. – Vol. 21, № 4. – P. 290-296. – DOI: 10.1016/0006-291X(65)90191-9.

35. Darveau, R. P. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough Pseudomonas aeruginosa and Salmonella typhimurium strains /

R. P. Darveau, R. E. W. Hancock // Journal of Bacteriology. – 1983. – Vol. 155, № 2. – P. 831-838.

36. Galanos, C. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides / C. Galanos, O. Lüderitz, O. Westphal // European Journal of Biochemistry. – 1969. – Vol. 9, № 2. – P. 245-249. – DOI: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.

37. Morrison, D. C. Fractions of lipopolysaccharide from Escherichia coli O111:B4 prepared by two extraction procedures / D. C. Morrison, L. Leive // The Journal of Biological Chemistry. – 1975. – Vol. 250, № 8. – P. 2911-2919. – DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41574-3.

38. Yi, E. C. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria / E. C. Yi, M. Hackett // The Analyst. – 2000. – Vol. 125, № 4. – P. 651-656. – DOI: 10.1039/B000368I.

39. Delahooke, D. M. A re-appraisal of the biological activity of Bacteroides LPS / D. M. Delahooke, G. R. Barclay, I. R. Poxton // Journal of Medical Microbiology. – 1995. – Vol. 42, № 2. – P. 102-112. – DOI: 10.1099/00222615-42-2-102.

40. Chemical composition of a lipopolysaccharide from Legionella pneumophila / A. Sonesson, E. Jantzen, K. Bryn [et al.] // Archives of Microbiology. – 1989. – Vol. 153, № 1. – P. 72-78. – DOI: 10.1007/BF00277544.

41. Nurminen, M. Methanol extracts LPS from deep rough bacteria / M. Nurminen, M. Vaara // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1996. – Vol. 219, № 2. – P. 441-444.

42. Applications of different solvents and conditions for differential extraction of lipopolysaccharide in gram-negative bacteria / M. P. Nguyen, L. V. H. Tran, H. Namgoong, Y. H. Kim // Journal of Microbiology. – 2019. – Vol. 57, № 8. – P. 644-654. – DOI: 10.1007/s12275-019-9116-5.

43. Erwin, A. L. Comparison of lipopolysaccharides from Brazilian purpuric fever isolates and conjunctivitis isolates of Haemophilus influenzae biogroup aegyptius / A. L. Erwin, R. S. Munford // Journal of Clinical Microbiology. – 1989. – Vol. 27, № 4. – P. 762-767. – DOI: 10.1128/jcm.27.4.762-767.1989.

44. Isolation and characterisation of the lipopolysaccharide from Xanthomonas hortorum pv. vitians / A. Molinaro, R. Lanzetta, A. Evidente [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 1999. – Vol. 181, № 1. – P. 49-53. – DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08825.x.

45. Caroff, M. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of Yersinia enterocolitica serotype O:9 / M. Caroff, D. R. Bundle, M. B. Perry // European Journal of Biochemistry. – 1984. – Vol. 139, № 1. – P. 195-200.

46. Ahamad, N. A two-step method for extraction of lipopolysaccharide from Shigella dysenteriae serotype 1 and Salmonella typhimurium: an improved method for enhanced yield and purity / N. Ahamad, D. S. Katti // Journal of Microbiological Methods. – 2016. – Vol. 127. – P. 41-50.

47. Westphal, O. Chemistry and immunochemistry of bacterial lipopolysaccharides as cell wall antigens and endotoxins / O. Westphal, K. Jann, O. Lüderitz // Progress in Allergy. – 1983. – Vol. 33. – P. 9-39. – Текст : непосредственный.

48. Johnson, K. G. Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides / K. G. Johnson, M. B. Perry // Canadian Journal of Microbiology. – 1976. – Vol. 22, № 1. – P. 29-34. – DOI: 10.1139/m76-004.

49. Ridley, B. L. The type and yield of lipopolysaccharide from symbiotically deficient Rhizobium lipopolysaccharide mutants vary depending on the extraction method / B. L. Ridley, B. S. Jeyaretnam, R. W. Carlson // Glycobiology. – 2000. – Vol. 10, № 10. – P. 1013-1023.

50. Galanos, C. Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms / C. Galanos, O. Lüderitz // European Journal of Biochemistry. – 1975. – Vol. 54, № 2. – P. 603-610.

51. Host-symbiont interactions: III. Purification and partial characterization of Rhizobium lipopolysaccharides / R. W. Carlson, R. E. Sanders, C. Napoli, P. Albersheim // Plant Physiology. – 1978. – Vol. 62, № 6. – P. 912-917.

52. Патент № CN116554361B Китай. Extraction liquid and method for extracting lipopolysaccharide : № CN202310840528.9A : заявл. 11.07.2023 : опубл.

03.11.2023 / Juan Liu, Lu Li, Jianyu Wu, Yong Liu // Google Patents : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/CN116554361B/en (дата обращения: 08.03.2026). – Текст : электронный.

53. Steimle, A. Structure and function: lipid A modifications in commensals and pathogens / A. Steimle, I. B. Autenrieth, J. S. Frick // International Journal of Medical Microbiology. – 2016. – Vol. 306, № 5. – P. 290-301. – DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.03.001.

54. Lipopolysaccharide engineering in Neisseria meningitidis: structural analysis of different pentaacyl lipid A mutants and comparison of their modified agonist properties / E. Pupo, H. J. Hamstra, H. Meiring, P. van der Ley // The Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289, № 12. – P. 8668-8680. – DOI: 10.1074/jbc.M114.554345.

55. Патент № US4929604A Соединенные Штаты Америки. Lipopolysaccharides of reduced toxicity and the production thereof : опубл. 29.05.1990 / R. S. Munford, C. L. Hall // Patents.Google : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/US4929604A/en (дата обращения: 08.03.2026). – Текст : электронный.

56. Патент № WO2006065139A2. Deacylation of LPS in gram-negative bacteria : опубл. 22.06.2006 / J. P. M. Tommassen, P. A. van der Ley, J. J. G. Geurtsen // Patents.Google : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/WO2006065139A2/en (дата обращения: 08.03.2026). – Текст : электронный.

57. Патент № US7005129B1 Соединенные Штаты Америки. Non-toxic mutants of pathogenic gram-negative bacteria : опубл. 28.02.2006 / M. A. Apicella, M. G. Sunshine, N.-G. Lee [et al.] // Patents.Google : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/US7005129B1/en (дата обращения: 08.03.2026). – Текст : электронный.

58. Modulating endotoxin activity by combinatorial bioengineering of meningococcal lipopolysaccharide / A. Zariri, E. Pupo, E. van Riet [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – Article 36575. – DOI: 10.1038/srep36575.

59. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota / J. M. Bates, J. Akerlund, E. Mittge, K. Guillemin // Cell Host and Microbe. – 2007. – Vol. 2, № 6. – P. 371-382. – DOI: 10.1016/j.chom.2007.10.010.

60. The lipid A from Vibrio fischeri lipopolysaccharide: a unique structure bearing a phosphoglycerol moiety / N. J. Phillips, D. M. Adin, E. V. Stabb [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2011. – Vol. 286, № 24. – P. 21203-21219.

61. The chemistry and applications of metal-organic frameworks (MOFs) as industrial enzyme immobilization systems / A. R. M. Silva, J. Y. N. H. Alexandre, J. E. S. Souza [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27, № 14. – Article 4529.

62. Cell line development for biomanufacturing processes: recent advances and an outlook / H. Le, N. Vishwanathan, N. M. Jacob [et al.] // Biotechnology Letters. – 2015. – Vol. 37. – P. 1553-1564.

63. Vaccine adjuvants: understanding the structure and mechanism of adjuvanticity / S. Shi, H. Zhu, X. Xia [et al.] // Vaccine. – 2019. – Vol. 37, № 24. – P. 3167-3178. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.04.055.

64. Патент № US9499639B2 Соединенные Штаты Америки. LPS extraction process : опубл. 22.11.2016 / P. Charles, G. Geldhof, V. Mancuso // Patents.Google : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/US9499639B2/en (дата обращения: 08.03.2026). – Текст : электронный.

65. Патент № US20150126727A1 Соединенные Штаты Америки. Novel process : опубл. 07.05.2015 / P. Charles, G. Geldhof, V. Mancuso // Patents.Google : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/US20150126727A1/en (дата обращения: 08.03.2026). – Текст : электронный.

66. A combined fermentative-chemical approach for the scalable production of pure E. coli monophosphoryl lipid A / G. Pieretti, M. Cipolletti, D. D'Alonzo [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 98, № 18. – P. 7781-7791. – DOI: 10.1007/s00253-014-5865-6.

67. Chen, J. Construction of an Escherichia coli mutant producing monophosphoryl lipid A / J. Chen, G. Tao, X. Wang // Biotechnology Letters. – 2011. – Vol. 33. – P. 1013-1019.

68. Metabolic engineering of Escherichia coli to produce a monophosphoryl lipid A adjuvant / Y. Ji, J. An, D. Hwang [et al.] // Metabolic Engineering. – 2020. – Vol. 57. – P. 193-202.

69. MPL adjuvant contains competitive antagonists of human TLR4 / Y. Q. Wang, H. Bazin-Lee, J. T. Evans [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.577823.

70. European Pharmacopoeia. 11th ed. – Strasbourg : EDQM, 2019. – Текст : непосредственный.

71. Fully synthetic self-adjuvanting α-2,9-oligosialic acid based conjugate vaccines against group C meningitis / G. Liao, Z. Zhou, S. Suryawanshi [et al.] // ACS Central Science. – 2016. – Vol. 2, № 4. – P. 210-218.

72. Built-in adjuvants for use in vaccines / Q. Li, Z. Li, N. Deng [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2022. – Vol. 227. – Article 113917. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113917.

73. Immunogenicity of HPV and HBV vaccines: adjuvanticity of synthetic analogs of monophosphoryl lipid A combined with aluminum hydroxide / N. Taleghani, A. Bozorg, A. Azimi, H. Zamani // APMIS. – 2019. – Vol. 127, № 3. – P. 150-157.

74. Патент № WO1995014026A1. Glucosamine disaccharides, method for their preparation, pharmaceutical composition comprising same, and their use : опубл. 26.05.1995 / J. G. Davies, J. Bauer, P. Hirt, A. Schulthess // Patents.Google : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/WO1995014026A1/en (дата обращения: 08.03.2026). – Текст : электронный.

75. Ammonium hydroxide hydrolysis: a valuable support in the MALDI-TOF mass spectrometry analysis of lipid A fatty acid distribution / A. Silipo, R. Lanzetta, A. Amoresano [et al.] // Journal of Lipid Research. – 2002. – Vol. 43, № 12. – P. 2188-2195. – DOI: 10.1194/jlr.D200021-JLR200.

76. Патент № US20130035479A1 Соединенные Штаты Америки. Functionalized beta-1,6 glucosamine disaccharides and process for their preparation : опубл. 07.02.2013 / S. Moutel, J. Bauer, C. Chiavaroli // Patents.Google : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/US20130035479A1/en (дата обращения: 08.03.2026). – Текст : электронный.

77. Получение детоксифицированных производных липополисахаридов и их применение в качестве вакцинных и адъювантных препаратов / А. П. Савин, В. В. Смирнов, А. В. Филатов [и др.] // Иммунология. – 2025. – Т. 46, № 2. – С. 243-254. – Текст : непосредственный.

78. Karibian, D. Use of plasma desorption mass spectrometry in structural analysis of endotoxins: effects on lipid A of different acid treatments / D. Karibian, C. Deprun, M. Caroff // Progress in Clinical and Biological Research. – 1995. – Vol. 392. – P. 103-111.

79. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization / A. El Hamidi, A. Tirsoaga, A. Novikov [et al.] // Journal of Lipid Research. – 2005. – Vol. 46, № 8. – P. 1773-1778. – DOI: 10.1194/jlr.D500014-JLR200.

80. Caroff, M. Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the “isolated lipid A” fragment of the Bordetella pertussis endotoxin / M. Caroff, A. Tacken, L. Szabó // Carbohydrate Research. – 1988. – Vol. 175, № 2. – P. 273-282.

81. Isolation and chemical characterization of lipid A from gram-negative bacteria / J. C. Henderson, J. P. O’Brien, J. S. Brodbelt, M. S. Trent // Journal of Visualized Experiments. – 2013. – № 79. – DOI: 10.3791/50623.

82. A new rapid and micro-scale hydrolysis, using triethylamine citrate, for lipopolysaccharide characterization by mass spectrometry / I. Chafchaouni-Moussaoui, A. Novikov, F. Bhrada [et al.] // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2011. – Vol. 25, № 14. – P. 2043-2048. – DOI: 10.1002/rcm.5084.

83. Purification and mass spectrometry of six lipid A species from the bacterial endosymbiont Rhizobium etli: demonstration of a conserved distal unit and a variable

proximal portion / N. L. S. Que, S. Lin, R. J. Cotter, C. R. H. Raetz // The Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275, № 36. – P. 28006-28016. – DOI: 10.1074/jbc.M004008200.

84. Kilár, A. Structural characterization of bacterial lipopolysaccharides with mass spectrometry and on- and off-line separation techniques / A. Kilár, Á. Dörnyei, B. Kocsis // Mass Spectrometry Reviews. – 2013. – Vol. 32, № 2. – P. 90-117. – DOI: 10.1002/mas.21352.

85. Chen, Y. Supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of lipid A / Y. Chen, S. J. Lehotay, R. A. Moreau // Analytical Methods. – 2013. – Vol. 5, № 23. – P. 6864-6869.

86. Characterization of complex, heterogeneous lipid A samples using HPLC-MS/MS technique I. Overall analysis with respect to acylation, phosphorylation and isobaric distribution / V. Sándor, Á. Dörnyei, L. Makszin [et al.] // Journal of Mass Spectrometry. – 2016. – Vol. 51, № 11. – P. 1043-1063.

87. Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of Salmonella minnesota R595: purification of the dimethyl derivative by high performance liquid chromatography and complete structural determination / N. Qureshi, P. Mascagni, E. Ribi, K. Takayama // The Journal of Biological Chemistry. – 1985. – Vol. 260, № 9. – P. 5271-5278.

88. Analysis of a monophosphoryl lipid A immunostimulant preparation from Salmonella minnesota R595 by high-performance liquid chromatography / S. R. Hagen, J. D. Thompson, D. S. Snyder, K. R. Myers // Journal of Chromatography A. – 1997. – Vol. 767. – P. 53-61.

89. Standardisation of glutaraldehyde-modified tyrosine-adsorbed tree pollen vaccines containing the Th1-inducing adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL®) / M. Hopkins, B. G. Lees, D. G. Richardson [et al.] // Allergologia et Immunopathologia. – 2001. – Vol. 29, № 6. – P. 245-254. – DOI: 10.1016/S0301-0546(01)79066-0.

90. Bobbala, S. Quantitation of the immunological adjuvants, monophosphoryl lipid A and Quil A in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection / S. Bobbala, A.

McDowell, S. Hook // Journal of Chromatography B. – 2015. – Vol. 975. – P. 45-51. – DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.11.006.

91. NMR-based structural analysis of the complete rough-type lipopolysaccharide isolated from Capnocytophaga canimorsus / U. Zähringer, S. Ittig, B. Lindner [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289, № 34. – P. 23963-23976. – DOI: 10.1074/jbc.M114.571489.

92. The lipopolysaccharide of the crop pathogen Xanthomonas translucens pv. translucens: chemical characterization and determination of signaling events in plant cells / T. Steffens, K. Duda, B. Lindner [et al.] // Glycobiology. – 2017. – Vol. 27, № 3. – P. 264-274.

93. Gerwig, G. J. Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary GLC / G. J. Gerwig, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart // Carbohydrate Research. – 1979. – Vol. 77, № 1. – P. 1-7.

94. Dissecting lipopolysaccharide composition and structure by GC-MS and MALDI spectrometry / P. Garcia-Vello, I. Speciale, F. Di Lorenzo [et al.] // Lipopolysaccharide Transport: Methods and Protocols. – New York : Springer, 2022. – P. 181-209. – Текст : непосредственный.

95. Sawardeker, J. S. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography / J. S. Sawardeker, J. H. Sloneker, A. Jeanes // Analytical Chemistry. – 1965. – Vol. 37, № 12. – P. 1602-1604.

96. Wollenweber, H.-W. Analysis of lipopolysaccharide (lipid A) fatty acids / H.-W. Wollenweber, E. T. Rietschel // Journal of Microbiological Methods. – 1990. – Vol. 11, № 3–4. – P. 195-211.

97. Peterson, A. A. High-molecular-weight components in lipopolysaccharides of Salmonella typhimurium, Salmonella minnesota, and Escherichia coli / A. A. Peterson, E. J. McGroarty // Journal of Bacteriology. – 1985. – Vol. 162, № 2. – P. 738-745.

98. Lindner, B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of lipopolysaccharides / B. Lindner // Bacterial Toxins: Methods and Protocols. – Totowa : Humana Press, 2000. – P. 311-325. – Текст : непосредственный.

99. Thibault, P. Applications of combined capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry in the characterization of short-chain lipopolysaccharides: Haemophilus influenzae / P. Thibault, J. C. Richards // Bacterial Toxins: Methods and Protocols. – Totowa : Humana Press, 2000. – P. 327-344. – Текст : непосредственный.

100. Kondakov, A. Structural characterization of complex bacterial glycolipids by Fourier transform mass spectrometry / A. Kondakov, B. Lindner // European Journal of Mass Spectrometry. – 2005. – Vol. 11, № 5. – P. 535-546.

101. Comparative immunochemistry of lipopolysaccharides from typable and polyagglutinable Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with cystic fibrosis / A. Fomsgaard, R. S. Conrad, C. Galanos [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 1988. – Vol. 26, № 5. – P. 821-826.

102. Molecular lipopolysaccharide di-vaccine protects from Shiga-toxin producing epidemic strains of Escherichia coli O157:H7 and O104:H4 / I. A. Dyatlov, E. A. Svetoch, A. A. Mironenko [et al.] // Vaccines. – 2022. – Vol. 10, № 11. – DOI: 10.3390/vaccines10111854.

103. Structural studies of the O-specific side-chains of the Shigella sonnei phase I lipopolysaccharide / L. Kenne, B. Lindberg, K. Petersson [et al.] // Carbohydrate Research. – 1980. – Vol. 78, № 1. – P. 119-126. – DOI: 10.1016/S0008-6215(00)83665-4.

104. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against Shigella flexneri 2a infection / V. A. Ledov, M. E. Golovina, A. A. Markina [et al.] // Vaccine. – 2019. – Vol. 37, № 8. – P. 1062-1072. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.067.

105. Perry, M. B. Structure of the O-chain polysaccharide of the phenol-phase soluble lipopolysaccharide of Escherichia coli O157:H7 / M. B. Perry, L. MacLean, D. W. Griffith // Biochemistry and Cell Biology. – 1986. – Vol. 64, № 1. – P. 21-28. – DOI: 10.1139/o86-004.

106. Патент № RU 2 832 320 C1 Российская Федерация, МПК A61K 31/739 (2006.01); B01D 11/04 (2006.01); C08B 37/00 (2006.01); C12P 19/04 (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.] // Patents.Google : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/RU2832320C1/ru (дата обращения: 08.03.2026). – Текст : электронный.

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

108. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation / K. Alfonsi, J. Colberg, P. J. Dunn [et al.] // Green Chemistry. – 2008. – Vol. 10, № 1. – P. 31-36. – DOI: 10.1039/b711717e.

109. Lipopolysaccharide of Escherichia coli M-17 / L. D. Varbanets, E. A. Zdorovenko, E. G. Garkavaya, O. S. Brovarskaya // Microbiology. – 2012. – Vol. 81, № 3. – P. 324-331. – DOI: 10.1134/S0026261712020154.

110. Gu, X.-X. Purification of rough-type lipopolysaccharides of Neisseria meningitidis from cells and outer membrane vesicles in spent media / X.-X. Gu, C.-M. Tsai // Analytical Biochemistry. – 1991. – Vol. 196, № 2. – P. 311-318.

111. Модельные иммуногенные конъюгированные конструкты 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. Мирославский, И. К. Вернер, В. В. Смирнов, М. Р. Хаитов. // Иммунология. – 2025. – Т. 46. – №. 1. – С. 16-29. – DOI: 10.33029/1816-2134-2025-46-1-16-29. – Текст : непосредственный.

112. Simple method for repurification of endotoxins for biological use / A. Tirsoaga, A. Novikov, M. Adib-Conquy [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, № 6. – P. 1803-1808. – DOI: 10.1128/AEM.02452-06.

113. Synthesis, characterization, and immunogenicity in mice of Shigella sonnei O-specific oligosaccharide-core-protein conjugates / J. B. Robbins, J. Kubler-Kielb, E. Vinogradov [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106, № 19. – P. 7974-7978.

Приложение А. Акт внедрения в учебный процесс Института фармации им. А.П. Нелюбина

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе ФГАОУ ВО
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет)
_____ Литвинова Т.М.
_____ 20 25 г.

22 ДЕК 2025

АКТ № 822

о внедрении результатов диссертации Савина Андрея Павловича в учебный процесс Института Фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Савина Андрея Павловича

на тему «Разработка способов экстракции из клеток грамотрицательных бактерий липополисахаридов, их детоксифицированных производных и получение из них детоксифицированных липидов А» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева и кафедры биотехнологии Института Фармации им. А.П. Нелюбина

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

Директор Института Фармации им. А.П. Нелюбина _____ (Подпись) Раменская Г.В.

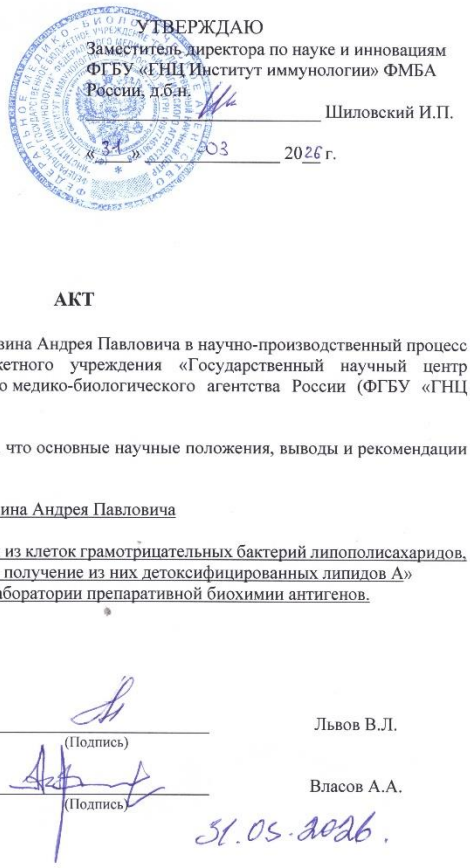
Заведующий учебной частью кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева _____ (Подпись) Кузина В.Н.

Заведующий учебной частью кафедры биотехнологии _____ (Подпись) Фельдман Н.Б.

Начальник Учебного управления _____ (Подпись) Юдина Л.Ю.

Рисунок А.1 – Акт внедрения в учебный процесс Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Приложение Б. Акт внедрения в производственный процесс ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по науке и инновациям
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА
России, д.б.н.
_____ Шиловский И.П.
«31» 03 2026 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Савина Андрея Павловича в научно-производственный процесс Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России).

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Савина Андрея Павловича

на тему «Разработка способов экстракции из клеток грамотрицательных бактерий липополисахаридов, их детоксифицированных производных и получение из них детоксифицированных липидов А» внедрены в производственный процесс лаборатории препаративной биохимии антигенов.

Зав лаб. препаративной биохимии антигенов, к.х.н. _____ (Подпись) Львов В.Л.

Ученый секретарь, к.м.н. _____ (Подпись) Власов А.А.

31.05.2026.

Рисунок Б.1 – Акт внедрения в производственный процесс ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Приложение В. Материальный баланс процесса получения детоксифицированного липоолигосахарида *S. sonnei*

Таблица В.1 — Материальный баланс процесса получения детоксифицированного липоолигосахарида (д-ЛОС) *S. sonnei*

Израсходовано		Получено	
Наименование	кг	Наименование	кг
А) Сырьё и реагенты		А) Продукт / промежуточные потоки	
Сухие бактериальные клетки	0,02000	Детоксифицированный липоолигосахарид (д-ЛОС)	0,00100
Вода очищенная	10,00000		
Вода деминерализованная	16,50000	В) Потери	
Пропанол	1,25000	Механические и неучтённые потери	0,19222
Таблетки PBS	0,02230	С) Отходы и побочные потоки	
РНКаза	0,00001	Нерастворимый клеточный осадок	0,02000
ДНКаза	0,00001	Пропанольный супернатант	1,25000
Трилон Б	0,00074	Фильтрат после ультрафильтрации и промывок	24,40000
Натрия гидроксид	0,00100	Отработанные буферы и промывные воды	1,11605
Протеиназа К	0,00001	Конденсат после лиофильного высушивания	0,90000

Продолжение Таблицы В.1

Компоненты буфера А/буфера А без ДОХ	0,24875	Конденсат после упаривания	0,20000
Аммиак 25%	0,03645		
Итого	28,07927	Итого	28,07927

Приложение Г. Материальный баланс процесса получения монофосфорилированного липида А

Таблица Г.1 — Материальный баланс процесса получения монофосфорилированного липида А

Израсходовано		Получено	
Наименование	кг	Наименование	кг
А) Сырьё и реагенты		А) Продукт / промежуточные потоки	
Сухие бактериальные клетки	0,02000	Монофосфат пента- и гексаацильного липида А (MPLA)	0,00020
Вода очищенная	10,00000		
Вода деминерализованная	16,50000	В) Потери	
Пропанол	1,25000	Механические и неучтённые потери	0,20044
Этанол 95%	1,20000	С) Отходы и побочные потоки	
Таблетки PBS	0,02230	Нерастворимый клеточный осадок	0,02000
РНКаза	0,00001	Пропанольный супернатант	1,25000
ДНКаза	0,00001	Этанольный супернатант	1,20000
Трилон Б	0,00074	Фильтрат после ультрафильтрации и промывок	24,40000
Натрия гидроксид	0,00100	Отработанные буферы и промывные воды	1,02743

Продолжение Таблицы Г.1

Протеиназа К	0,00001	Конденсат после лиофильного высушивания	0,90000
Кислота соляная 32%	0,00400	Конденсат после упаривания	0,15000
Хлороформ	0,12000		
Метанол	0,03000		
Итого	29,14807	Итого	29,14807

Приложение Д. Материальный баланс процесса получения триацильного дифосфорилированного липида А

Таблица Д.1 — Материальный баланс процесса получения триацильного дифосфорилированного липида А

Израсходовано		Получено	
Наименование	кг	Наименование	кг
А) Сырьё и реагенты		А) Продукт / промежуточные потоки	
Сухие бактериальные клетки	0,02000	Дифосфат триацильного липида А (PP-3Ac-LA)	0,00020
Вода очищенная	10,00000		
Вода деминерализованная	16,50000		
Пропанол	1,25000	В) Потери	
Этанол 95%	1,20000	Механические и неучтённые потери	0,19338
Таблетки PBS	0,02230	С) Отходы и побочные потоки	
РНКаза	0,00001	Нерастворимый клеточный осадок	0,02000
ДНКаза	0,00001	Пропанольный супернатант	1,25000
Трилон Б	0,00074	Этанольный супернатант	1,20000
Натрия гидроксид	0,00100	Фильтрат после ультрафильтрации и промывок	24,40000
Протеиназа К	0,00001	Отработанные буферы (PBS, буфер А/Б) и промывные воды	1,31861
Компоненты буфера А/буфера А без ДОХ	0,24875	Конденсат после лиофильного высушивания	0,90000

Продолжение Таблицы Д.1

Аммиак 25%	0,03645	Конденсат после упаривания	0,20000
Лимонная кислота безводная	0,00192		
Триэтиламин	0,00100		
Хлороформ	0,12000		
Метанол	0,08000		
Итого	29,48219	Итого	29,48219

Приложение Е. Аннотации структур липидов А по данным масс-спектрометрии

Таблица Е.1 – Аннотации структур липидов А по данным масс-спектрометрии

Объект исследования	m/z	Степень фосфорилирования	Степень ацилирования	Схематичная аннотация структуры	Комментарий
E. coli / Shigella	1053	1P (монофосфат)	3 ацильные цепи	$GlcN_2$–P; 14:0(3-OH)×2 + 12:0×1	Пара к 1133: -~80 (дифосфат)
	1133	2P (дифосфат)	3 ацильные цепи	$GlcN_2$–$(P)_2$; 14:0(3-OH)×2 + 12:0×1	При анализе методом ESI-TOF фиксируется $[M–2H]^{2–}$ при m/z ≈566 (соответствует M≈1134, т.е. этому пику)
	1279	1P (монофосфат)	4 ацильные цепи	$GlcN_2$–P; 14:0(3-OH)×3 + 12:0×1	От 1053: +~226 (добавление 14:0(3-OH))
	1359	2P (дифосфат)	4 ацильные цепи	$GlcN_2$–$(P)_2$; 14:0(3-OH)×3 + 12:0×1	Пара к 1279: +~80 (дифосфат)

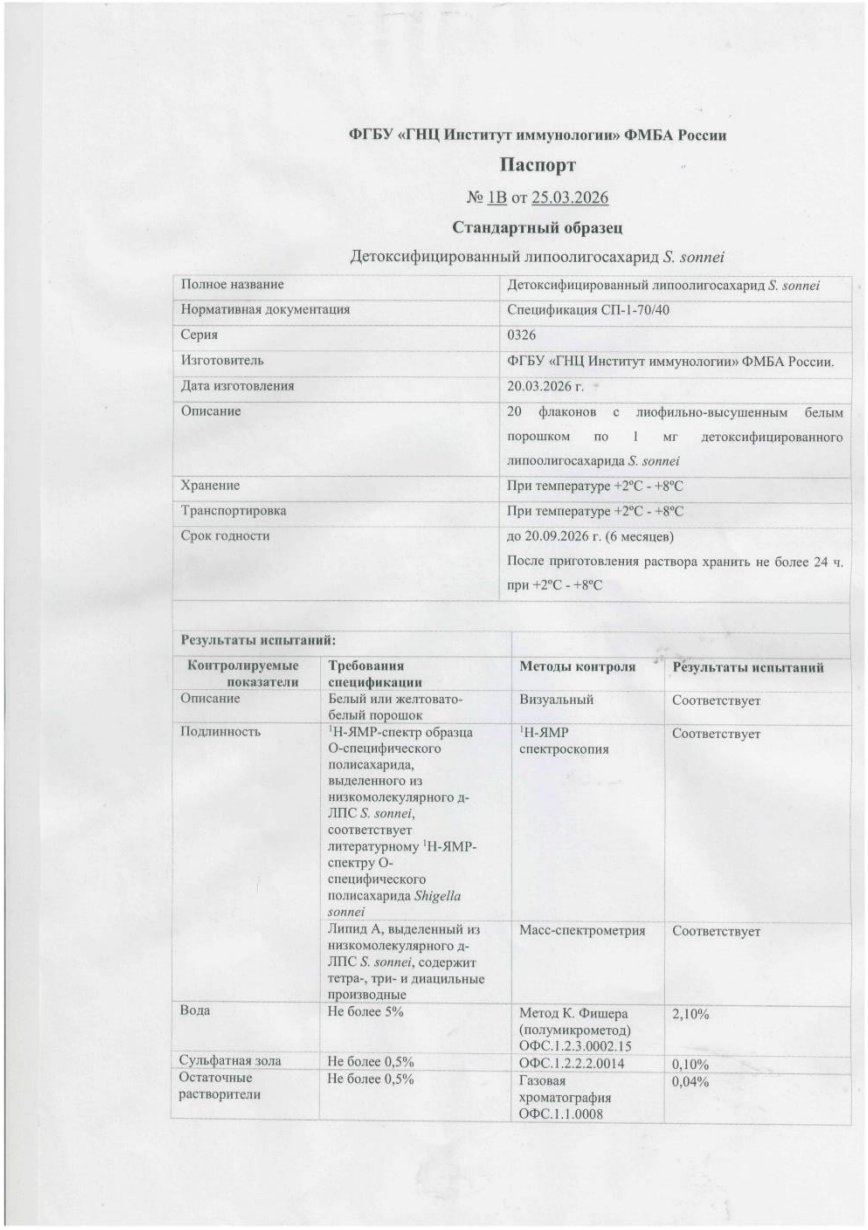
Продолжение Таблицы E.1

	1489	1P (монофосфат)	5 ацильных цепей	$GlcN_2$–P; 14:0(3-OH)×3 + 12:0×1 + 14:0×1	От 1279: +~210 (добавление 14:0)
	1569	2P (дифосфат)	5 ацильных цепей	$GlcN_2$–$(P)_2$; 14:0(3-OH)×3 + 12:0×1 + 14:0×1	Пара к 1489: +~80 (дифосфат)
	1715	1P (монофосфат)	6 ацильных цепей	$GlcN_2$–P; 14:0(3-OH)×4 + 12:0×1 + 14:0×1	От 1489: +~226 (добавление 14:0(3-OH))
	1795	2P (дифосфат)	6 ацильных цепей	$GlcN_2$–$(P)_2$; 14:0(3-OH)×4 + 12:0×1 + 14:0×1	Пара к 1715: +~80 (дифосфат)
S. typhi	1091	1P (монофосфат)	3 ацильные цепи	$GlcN_2$–P; 14:0(3-OH)×3	Триацилированный монофосфорилированный липид A
	1272	1P (монофосфат)	4 ацильные цепи	$GlcN_2$–P; 14:0(3-OH)×3 + 12:0×1	От 1091 +~182 (добавление 12:0)

Продолжение Таблицы E.1

	1352	2P (дифосфат)	4 ацильные цепи	$GlcN_2–(P)_2$; 14:0(3-OH)×3 + 12:0×1	Пара к 1272: +~80 (дифосфат)
	1497	1P (монофосфат)	5 ацильных цепей	$GlcN_2–P$; 14:0(3-OH)×4 + 12:0×1	От ~1272: +~226 (добавление 14:0(3-OH))
	1707	1P (монофосфат)	6 ацильных цепей	$GlcN_2–P$; 14:0(3-OH)×4 + 12:0×1 + 14:0×1	От 1497: +~210 (добавление 14:0)
	1944	1P (монофосфат)	7 ацильных цепей (пальмитоил.)	$GlcN_2–P$; 14:0(3-OH)×4 + 12:0×1 + 14:0×1 + 16:0×1	От 1707: +~238 (добавление 16:0; пальмитоилирование)

Приложение Ж. Паспорт стандартного образца низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei*



ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Паспорт

№ 1В от 25.03.2026

Стандартный образец

Детоксифицированный липоолигосахарид *S. sonnei*

Полное название	Детоксифицированный липоолигосахарид *S. sonnei*
Нормативная документация	Спецификация СП-1-70/40
Серия	0326
Изготовитель	ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.
Дата изготовления	20.03.2026 г.
Описание	20 флаконов с лиофильно-высушенным белым порошком по 1 мг детоксифицированного липоолигосахарида *S. sonnei*
Хранение	При температуре +2°С - +8°С
Транспортировка	При температуре +2°С - +8°С
Срок годности	до 20.09.2026 г. (6 месяцев) После приготовления раствора хранить не более 24 ч. при +2°С - +8°С

Результаты испытаний:

Контролируемые показатели	Требования спецификации	Методы контроля	Результаты испытаний
Описание	Белый или желтовато-белый порошок	Визуальный	Соответствует
Подлинность	^{1}Н-ЯМР-спектр образца О-специфического полисахарида, выделенного из низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*, соответствует литературному ^{1}Н-ЯМР-спектру О-специфического полисахарида *Shigella sonnei*	^{1}Н-ЯМР спектроскопия	Соответствует
	Липид А, выделенный из низкомолекулярного д-ЛПС *S. sonnei*, содержит тетра-, три- и диацильные производные	Масс-спектрометрия	Соответствует
Вода	Не более 5%	Метод К. Фишера (полумикрометод) ОФС.1.2.3.0002.15	2,10%
Сульфатная зола	Не более 0,5%	ОФС.1.2.2.2.0014	0,10%
Остаточные растворители	Не более 0,5%	Газовая хроматография ОФС.1.1.0008	0,04%

Рисунок Ж.1 – Паспорт СО низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei*

Тяжелые металлы	Pb≤0,5; Cd≤0,5; As≤1,0; Hg≤0,1 (ppm)	ОФС.1.2.2.2.0012.15	Pb < 0,05 ppm; Cd < 0,02 ppm; As < 0,05 ppm; Hg < 0,01 ppm
Родственные примеси	Сумма родственных примесей ≤3,0%	ВЭЖХ (частная методика) ОФС.1.2.1.2.0005.15	0,95%
Количественное содержание	95,0–105,0%	Метод материального баланса	96,81%
Маркировка	На этикетке указывают наименование сырья, количество сырья в упаковке, серию, дату изготовления, условия хранения от 2 до 8 °С	Визуальный	Соответствует
Упаковка	Флаконы пластиковые типа эппендорф вместимостью 1,5-2 мл	Визуальный	Соответствует

Заключение: серия соответствует требованиям нормативной документации на Стандартный образец детоксифицированного липоолигосахарида *S. sonnei* по всем показателям качества.

Главный эксперт группы контроля качества, заведующий НПК № 50 / / Смирнов В.В.

Эксперт группы контроля качества, М.н.с. / / Савин А.П.

Рисунок Ж.2 – Паспорт СО низкомолекулярного детоксифицированного липополисахарида *Shigella sonnei*