

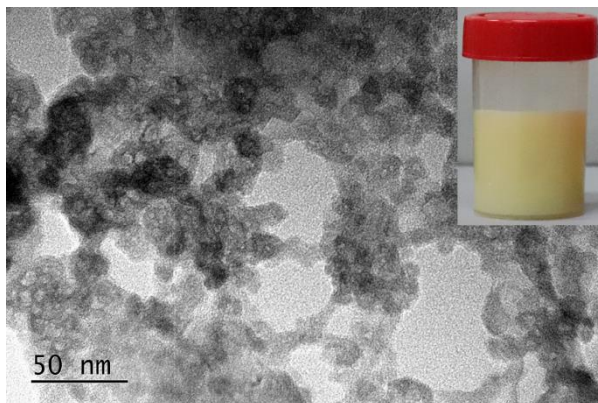
Надежда Ангелова Ангелова

**Получаване и охарактеризиране на
наноструктурирани желязо(III)-съдържащи
хидроксифосфати като потенциални
ваксинални адюванти**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на
образователната и научна степен “доктор”

Професионално направление
4.2 Химически науки (Неорганична химия)



София, 2019

Дисертацията е написана на английски език, съдържа 107 страници, включени са 43 фигури, 4 схеми и 6 таблици. Цитирани са 156 литературни източника. Част от резултатите на дисертационния труд са публикувани в три научни публикации. Дисертацията е обсъдена и насочена за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по неорганична химия към Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“, състоял се на 25.01.2019 г.

Научен ръководител: доц. дн Георги Йорданов

На корицата: ТЕМ изображение на ферифосфатен адювантен гел.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 14.05. 2019 г. от 10:00 часа в заседателната зала на Факултета по Химия и Фармация на СУ „Св. Климент Охридски“.

Съдържание:

Въведение	6
Изводи от литературния обзор.....	8
Цел и задачи	8
Наноструктурирани хидроксифосфатни адювантни гелове с различно съотношение Fe/Al.....	9
Наноструктурирани желязо(III) хидроксифосфатни адювантни гелове с различно съотношение Fe/P	24
Получаване на ферифосфатен адювантен гел: оптимизация спрямо адсорбцията на протеин	33
Резюме на основните резултати.....	37
Приноси	39
Литература.....	40
Научни публикации	42
Участия в научни конференции.....	42

Използвани съкращения

АН – алуминиев хидроксид

АР – алуминиев фосфат

FP – железен(III) фосфат

DLS – динамично светоразсейване

EDX – енергийно-дисперсионна спектроскопия

FTIR – инфрачервена спектроскопия

IP – изоелектрична точка

PBS – физиологичен фосфатен буфер

STEM – сканиращ трансмисионен електронен микроскоп

TEM – трансмисионна електронна микроскопия

XRD – прахова рентгенова дифракция

WHO (СЗО) – световна здравна организация

Величини

A – абсорбция на светлина

C – концентрация

Le – степен на натоварване

x – маса адсорбирано вещество (протеин)

n – количество адсорбент (адювант)

ζ – дзета потенциал

λ – дължина на вълната

θ – ъгъл (при XRD анализ)

Въведение

Необходимостта от все по-ефикасни и безопасни профилактични ваксини против различни инфекциозни болести е основният мотив за разработването на нови адювантни системи. Имунологичните адюванти са субстанции, които при комбинация с антиген ускоряват, удължават или усилват антиген-специфичния имунен отговор и се използват като компоненти на различни профилактични ваксини вече повече от 90 години (Pasquale et al., 2015). Единствените неорганични имунологични адюванти, които се използват в съвременните профилактични ваксини са на основата на алуминиев хидроксид (АН) и фосфат (АР), които се явяват компоненти на различни антиотоксични и инактивирани ваксини, като тези против тетанус, дифтерия, коклюш, конюгираните пневмококови ваксини, ваксините против хепатит А и В, ваксините против човешки папиломавирус (HPV), кримска хеморагична треска и др. В достъпната научна литература съществуват съобщения и за други неорганични адюванти, които са на основата на съединения на Fe(III), Ca(II), Mg(II) и др. (Paneque-Quevedo, 2013; Maughan et al., 2015).

Неорганичните ваксинални адюванти представляват гелообразни водни суспензии от малко разтворими съединения, съдържащи първични нано-размерни частици (10-50 nm), които агрегират и образуват вторични (гелни) частици (1-20 μm) (Hem and HogenEsch, 2007). Тази характерна ултраструктура на адювантните гелове е важна за тяхното приложение, защото пространствата между агрегиралите първични наночастици позволяват ефективна адсорбция на макромолекули, каквито са протеиновите антигени. От друга страна, размерът на вторичните, микронно-размерни частици е оптимален за тяхната фагоцитоза от макрофагите и други антиген-презентиращи клетки, което определя частиците като ефективни доставящи системи за антигени (протеини) до тези целеви клетки (Morefield et al., 2005). Ако частиците са с по-големи размери, това хипотетично би довело до субоптимално поглъщане от целевите клетки (макрофаги, дендритни клетки), ако пък адювантните частици са по-малки, със субмикронен размер, биха могли да попаднат чрез ендоцитоза и в други, нецелеви клетки, което е нежелателно. Следователно, при разработката на нови адювантни системи, те следва да отговарят на определени целеви характеристики: да притежават относително висок адсорбционен капацитет, вторичните частици да са с размер около 1-20 μm , да образуват стабилни гелни суспензии в разтвори с физиологична йонна сила, да бъдат стерилизирани и да запазват характеристиките си

относително постоянни във времето. За да отговарят на тези целеви характеристики, ваксиналните адюванти се получават съгласно точно определени протоколи, които често са обект на конфиденциалност от страна на производителите поради търговското значение на тези материали. Описанията на процедурите по получаването на нетърговски адюванти, които могат да бъдат открити в достъпната литература, са редки, често непълни, а понякога и невъзпроизводими.

Алуминиевите адюванти (AP и AH) са се превърнали в отправна точка при разработката и оценката на нови адювантни системи. Известният изоморфизъм при някои съединения на Al(III) и Fe(III) предполага възможността за получаването на Fe(III)-съдържащи аналози на Al(III)-съдържащите адюванти. От достъпната литература (предимно патенти) са известни само няколко процедури за получаване на ферихидроксиден (Bernhardt, 1993; Leibl, 1999; Eibl, 1999) и един патент за получаване на ферифосфатен адювант (Sauzeat, 2004). Наши предварителни проучвания обаче показаха проблеми с възпроизводимостта на характеристиките на този ферифосфатен адювант. Данните, показващи че Fe(III)-съдържащите адюванти могат да осигурят балансиран хуморален и цитотоксичен клетъчен имуноен отговор (Leibl, 1999) се явяват допълнителен мотив за по-детайлно проучване на възможностите за получаване на Fe(III)-базирани хидроксифосфатни адювантни системи с възпроизводими целеви структурни и физикохимични характеристики.

Целта на тази дисертация е да представи получаването и охарактеризирането на нови гелни суспензии, съдържащи наноструктурирани хидроксифосфати на Fe(III) с различен състав и определени целеви характеристики, които се явяват необходима предпоставка за потенциалното им приложение като ваксинални адюванти. Част от резултатите са включени в три научни публикации и са представени чрез седем съобщения на научни конференции. Имунологичните и токсикологични изпитвания на получените материали не са обект на настоящата дисертация. Изследователската работа по получаване и охарактеризиране на материалите са проведени с финансовата подкрепа на фонд „Научни изследвания” към СУ „Св. Климент Охридски” (договор 80-10-4/2018).

Изводи от литературния обзор

От направения литературен обзор могат да бъдат направени следните изводи:

1. Всички неорганични адюванти в съвременните инактивирани ваксини са малкоразтворими съединения на алуминия – алуминиев хидроксифосфат, оксихидроксид и хидроксифосфат-сулфат.
2. В литературата съществуват съобщения и за адюванти на основата на съединения на желязо(III), но изследванията върху тези адювантни системи са оскъдни и обикновено са непълно описани в патенти.
3. Съществуват данни, че адюванти на основата на железен(III) хидроксид и фосфат могат да предизвикат съизмерим имунен отговор с този при алуминиевите аналози и дори в някои случаи се наблюдава както хуморален, така и клетъчен имунен отговор, което се явява предимство. Тези изследвания обаче са недостатъчни и описани главно в няколко патента, в които практически липсва информация за физикохимичните свойства на тези системи.
4. Беше открит само един актуален патент за ферифосфатен адювант, но наши експерименти отчетоха липса на възпроизводимост на свойствата му при получаване съгласно описаната процедура.

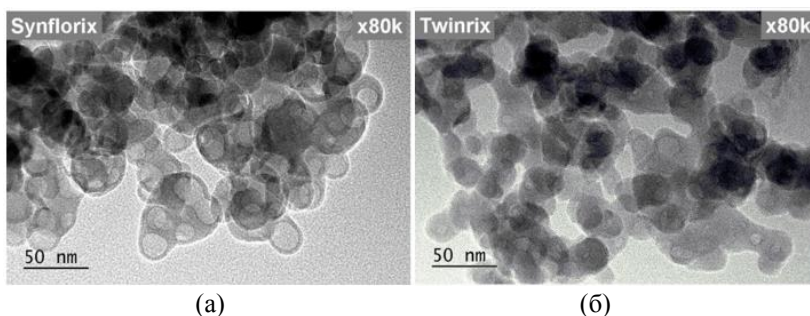
Цел и задачи

Целта на дисертационната работа е получаването и охарактеризирането на нови гелни суспензии, съдържащи наноструктурирани хидроксифосфати на Fe(III) с различен състав и определени целеви характеристики, които се явяват необходима предпоставка за потенциалното им приложение като ваксинални адюванти. За изпълнение на тази цел бяха формулирани следните задачи:

- (i) Получаване и охарактеризиране на наноструктурирани Fe/Al хидроксифосфатни суспензии с различно съотношение Fe/Al.
- (ii) Получаване и охарактеризиране на наноструктурирани хидроксифосфати на желязо(III) с различно съотношение Fe/P.
- (iii) Оценка на ефектите на условията при получаване на ферифосфатен адювантен гел върху адсорбцията на моделен протеин.

Наноструктурирани хидроксифосфатни адювантни гелове с различно съотношение Fe/Al

При разработката на новите Fe(III)-съдържащи хидроксифосфатни адювантни системи първоначално бяха проучени известните от литературата протоколи за получаване на AP адюванти. Известни са две основни процедури за промишлени цели, предложени от СЗО, при които се използва алуминиева стипца или алуминиев хлорид (WHO, 1997), както и лабораторна процедура за получаване на AP адювант, използван при производството на антисерум (Chase, 1967). Протоколите на СЗО са времеемки, изискващи едноседмичен престой на дисперсиите, а използването на стипца създава условия за включване на сулфатни йони в състава на хидроксифосфатите. За получаването на AP адювант, който да бъде използван като стандарт за сравнение на свойствата на новополучените адювантни системи, беше избрана относително лесната за изпълнение, кратка и даваща възпроизводими резултати процедура, използваща алуминиев хлорид и тринатриев фосфат (Chase, 1967). Концентрациите и съотношенията на реагентите са подбрани така, че да се получи адювантна дисперсия с целева концентрация на Al(III) от 1,4 mg/ml и концентрация на NaCl в дисперсната среда близка до физиологична йонна сила (~0,9%), без да изисква допълнителна обработка освен стерилизация чрез автоклавиране. Беше установено, че така полученият AP адювант отговаря на очакваните характеристики, а ултраструктурата му е сходна с тази на търговски продукти, както и с тази на анализирани от нас AP адюванти от съвременни комерсиални ваксини (Фиг. 1).



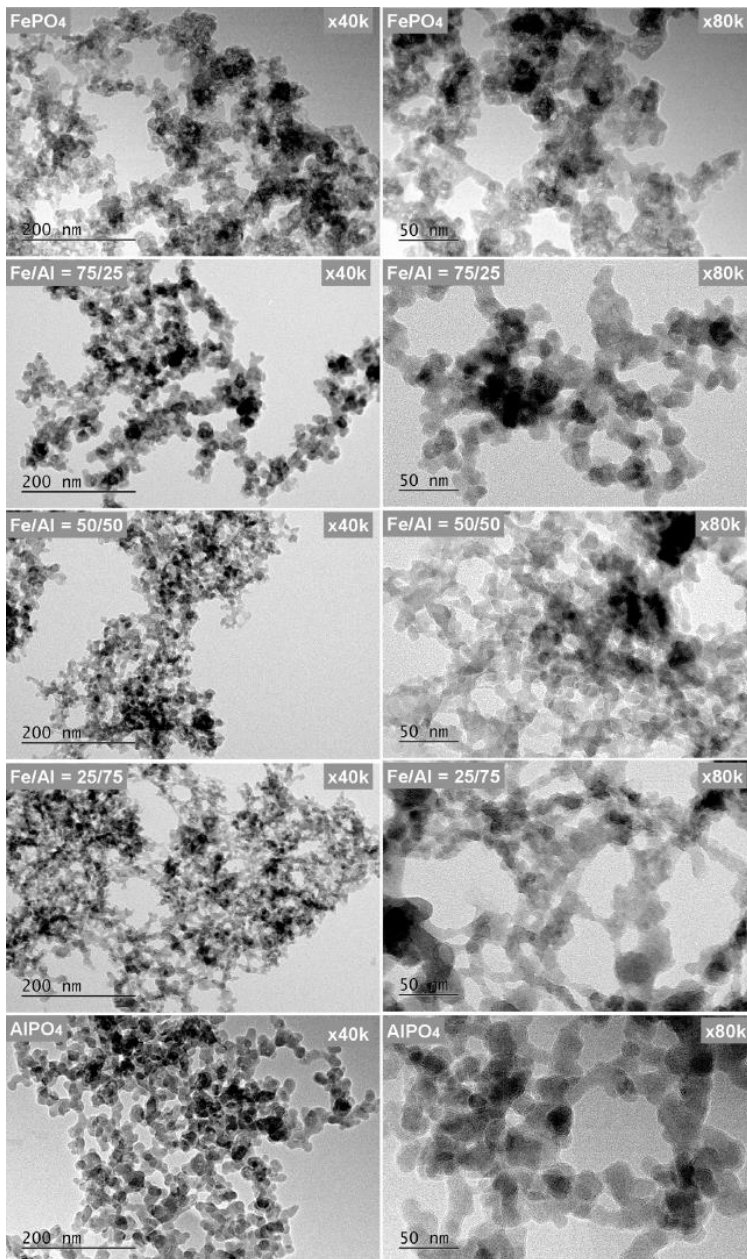
Фиг. 1. ТЕМ изображения, показващи ултраструктурата на AP адюванти от ваксините: а) Synflorix[®], и б) Twinrix[®] (за сравн. вж. Фиг. 3).

Поради тези причини, този AP адювант беше избран като своеобразен стандарт за сравнителен анализ, а съответната процедура по получаване беше използвана като изходна точка при получаването на различните Fe(III)-съдържащи хидроксифосфатни дисперсии.

В първата серия експерименти бяха получени хидроксифосфатни дисперсии с различни молни съотношения Fe/Al чрез съутаяване от смесени разтвори на алуминиев хлорид и ферихлорид с еквимоларно количество фосфат при постоянна обща концентрация на Fe(III) и Al(III) в крайната дисперсия. Целта на експеримента е да се проследи постепенната промяна в свойствата в зависимост от състава, като се сравнят ултраструктурата, размерът на вторичните агрегати, адсорбцията на моделен протеин (човешки серумен албумин, HSA) и разтворимостта в цитратен разтвор. Утаяването е проведено чрез прибавяне (със скорост 3 ml/min) на разтвора на натриев фосфат към разтвора на Fe(III)/Al(III) при постоянна скорост на разбъркване (600 rpm) и стайна температура (20-25°C). Експерименти при по-висока температура не са провеждани поради засилената хидролиза на разтворите на металните соли. Важно условие е да се използват прясно приготвени, непосредствено преди утаяването, разтвори на метални соли и натриев фосфат от едни и същи производители. След утаяването, получените гелообразни дисперсии са подложени на автоклавиране за 30 мин при 121°C с цел стерилизиране. Разтворите са приготвени така, че да бъдат приблизително изотонични (0,9% NaCl). Сухият остатък, определен гравиметрично след промиване на получените дисперсии и изсушаване във вакуум ексикатор със силикагел, е приблизително 8 до 9 mg/ml. Получените гелни дисперсии са млечно бели (AP; Fe/Al = 0/100) до бледо жълто-кафяви (ферифосфат, FP; Fe/Al = 100/0) (Фиг. 2).



Фиг. 2. Изображения на автоклавирани Fe/Al хидроксифосфатни гелове получени при различно молно съотношение Fe/Al, дадено на фигурата.



◀ Фиг. 3. ТЕМ изображения при увеличение x25k (ляво) и x80k (дясно) на Fe/Al хидроксифосфати получени при различни молни съотношения Fe/Al (дадени на снимките) (Angelova&Yordanov, 2017).

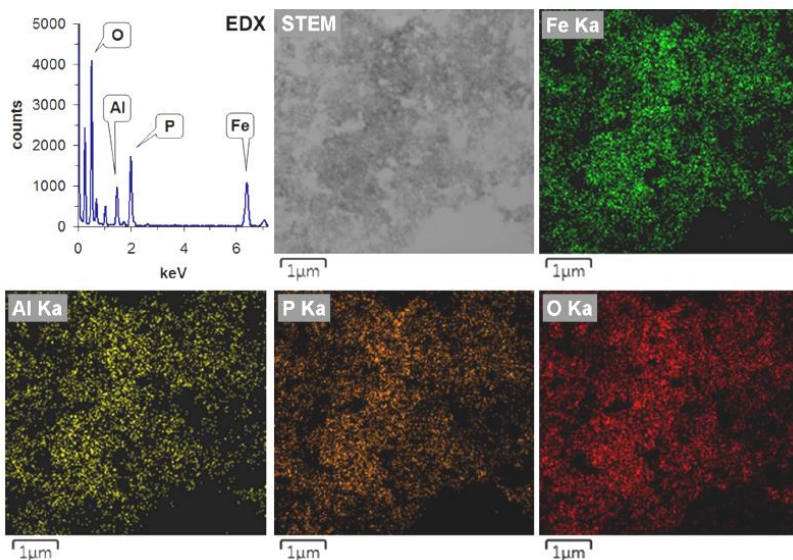
Наблюдението с трансмисионен електронен микроскоп (ТЕМ) на получените Fe/Al хидроксифосфатни гелни суспензии показва мрежи от дисковидни наночастици, подобни на тези при АР, но размерът на частиците на Fe(III)-съдържащите гелове е по-малък, около 10-30 nm (Фиг. 3). Мрежовидното свързване на наночастици в по-големи агрегати е характерна картина за колоидните гелове.

Енергийно-дисперсионната рентгенова (EDX) спектрометрия на Fe/Al хидроксифосфати показва наличието на алуминий, желязо, фосфор и кислород в съответствие с очакваните състави (Таблица 1). Съставите, получени от EDX измерванията следва да се интерпретират внимателно, имайки предвид, че в пробите се наблюдават известни структурни изменения при по-дълготрайно сканиране в STEM режим, което може да съответства и на изменения в състава. Също така, следва да се има предвид, че всички използвани изходни вещества за получаването на изследваните материали са кристалохидрати, чиито реален състав може да не съответства строго на очаквания.

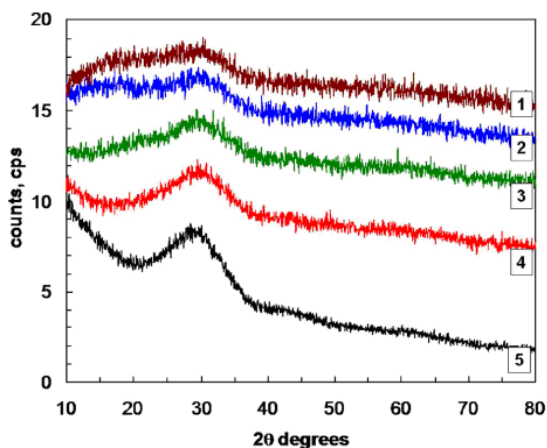
Таблица 1. Състави на Fe/Al хидроксифосфати (Angelova&Yordanov, 2017)

Initial Fe/Al molar ratio	Fe/Al/P/O molar ratio	Empiric formula
0/100	-/1.0/0.8/5.0	Al(PO ₄) _{0,8} (OH) _{0,6} ·1,2H ₂ O
25/75	0.3/1.0/1.1/5.7	Fe _{0,3} Al(PO ₄) _{1,1} (OH) _{0,6} ·0,7H ₂ O
50/50	1.3/1.0/1.7/9.9	Fe _{1,3} Al(PO ₄) _{1,7} (OH) _{1,8} ·1,3H ₂ O
75/25	2.6/1.0/3.3/18.3	Fe _{2,6} Al(PO ₄) _{3,3} (OH) _{0,9} ·4,2H ₂ O
100/0	1.0/-/1.0/6.9	FePO ₄ ·3H ₂ O

Направените EDX спектри, STEM изображения и съответните картирания показват, че елементите (Fe, Al, P и O) в Fe/Al хидроксифосфати са локализирани в едни и същи области на пробата, което показва образуването на смесени хидроксифосфатни частици (Фиг. 4). Електронната дифракция показва, че всички частици са структурно аморфни (данни не са показани). Аморфната структура на всички получени хидроксифосфатни материали се потвърждава също чрез прахов рентгено-дифракционен анализ (XRD), който не показва дифракции, характерни за кристални фази (Фиг. 5). Комерсиалните АР адюванти също са рентгено-аморфни.

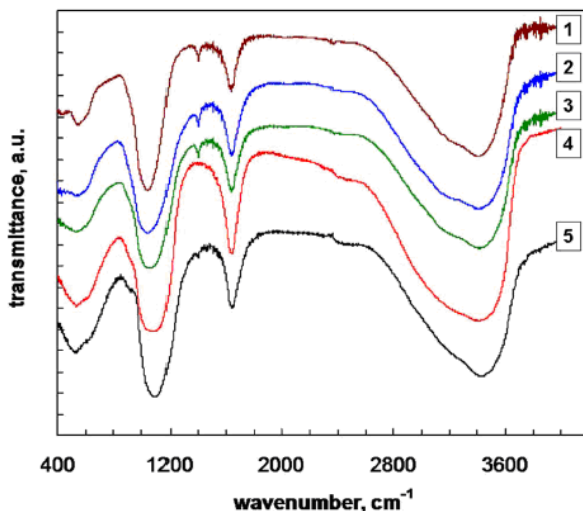


Фиг. 4. EDX спектър, STEM изображение и карти на разпределение на елементите (Fe, Al, P и O) при Fe/Al хидроксифосфат, получен при молно съотношение Fe/Al =50/50 (Angelova&Yordanov, 2017).



Фиг. 5. Рентгенови дифрактограми на Fe/Al хидроксифосфати, получени при различни молни съотношения Fe/Al, както следва: 1) 100/0, 2) 75/25, 3) 50/50, 4) 25/75, 5) 0/100 (Angelova&Yordanov, 2017).

Инфрачервените (FTIR) спектри на Fe/Al хидроксифосфатите са показани на Фиг. 6. Най-открояващата се характеристична абсорбционна ивица е в областта $1043\text{--}1095\text{ cm}^{-1}$, която съответства на P-O връзката във фосфатните йони. Широката ивица при $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ се дължи на наличието на OH-групи, докато ивиците, съответстващи на H-O-H се наблюдават при 1640 cm^{-1} , което е близко до стойността им при несвързана вода (Bugrell, 2000). Интересен резултат е това, че честотата на ивицата за P-O намалява с увеличаване на съотношението Fe/Al: от 1095 cm^{-1} в алуминиевия фосфат до 1043 cm^{-1} за желязния фосфат (Таблица 2). При предишни проучвания на други автори е наблюдавано, че честотата на абсорбционната ивица за P-O в инфрачервените спектри на AP адювант е обратнопропорционална на pH на гелообразуването (честотата на вибрациите на P-O намалява при повишаване на pH при утаяването) и структурата на PO_4 групите се повлиява от присъствието на протони (Bugrell, 2000). Не е такъв случай при проведените от нас експерименти, тъй като pH на първоначалните разтвори на Fe(III) са по-кисели от тези на Al(III). Най-вероятно, наблюдаваният от нас ефект се дължи на различната сила на координиране на Fe(III) и Al(III) с фосфатните йони.

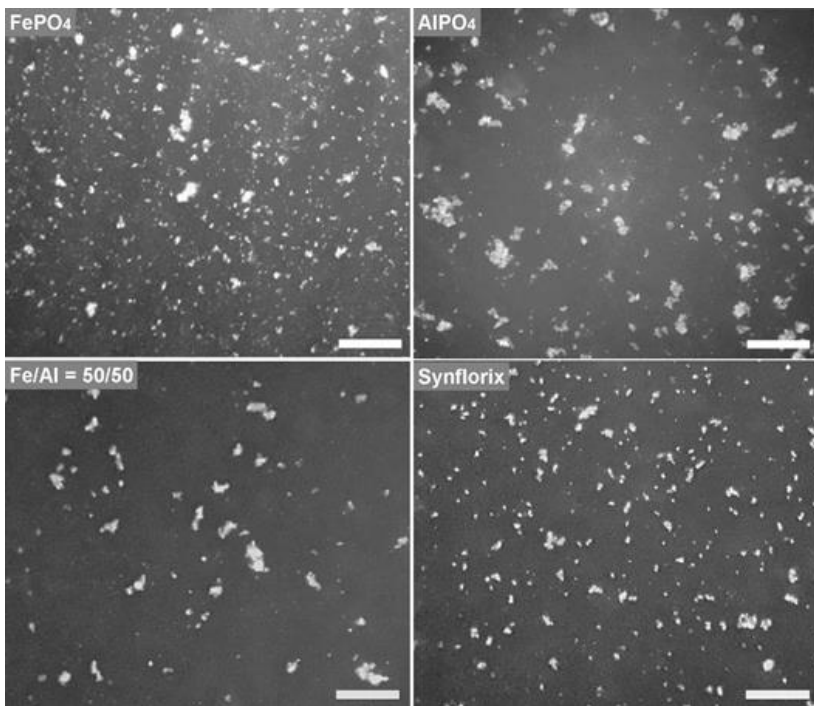


Фиг. 6. FTIR спектри (в KBr) на Fe/Al хидроксифосфати, получени при различни молни съотношения Fe/Al, както следва: 1) 100/0, 2) 75/25, 3) 50/50, 4) 25/75, 5) 0/100 (Angelova&Yordanov, 2017).

Таблица 2. Стойности вълновото число (cm^{-1}) за пиковите на P-O и O-H абсорбиционни ивици в FTIR спектрите на Fe/Al хидроксифосфати.

Initial Fe/Al molar ratio	$\nu_{\text{(P-O)}}$, cm^{-1}	$\nu_{\text{(O-H)}}$, cm^{-1}
0/100	1095	3430
25/75	1078	3420
50/50	1055	3413
75/25	1044	3407
100/0	1043	3400

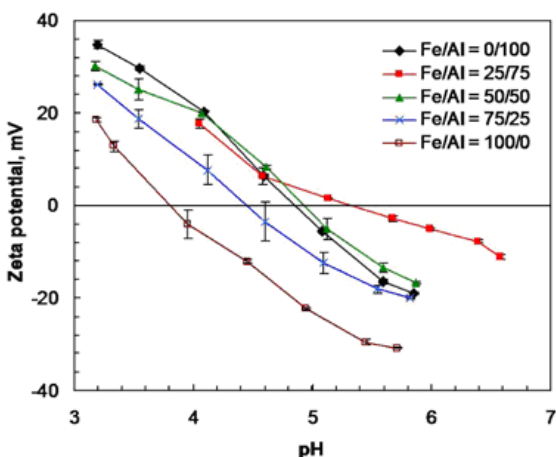
Наблюденията с TEM показват, че първичните наночастици със среден размер 10–40 nm всъщност образуват микронноразмерни агрегати (вторични частици) във водни физиологични разтвори. Измерването на размера на адювантните частици обикновено се извършва чрез динамично лазерно светлоразсейване (DLS), което не измерва размера на първичните частици, а само този на вторичните частици и агрегати. Въпреки това, тази техника има ограничението да се измерват само размери на частици до 10 μm (съгласно техническата спецификация на Zetasizer Nano ZS). Действителният размер на вторичните частици в адювантните гелове не може да бъде адекватно измерен чрез TEM (тъй като подготовката на пробата за TEM включва сушене, което води до допълнително слепване на частици) или чрез DLS (поради техническото ограничение за измерване на размери до 10 μm). Сканиращата електронна микроскопия (SEM) също не е съвсем подходяща в този случай, тъй като пробоподготовката за SEM (както за TEM) също изисква изсушаване на капка суспензия върху твърда подложка. Поради тези ограничения използвахме тъмнополева микроскопия (оптичен микроскоп с кондензор за наблюдение на тъмно поле), за да наблюдаваме директно *in situ* (във физиологичен разтвор) микронноразмерни структури. На Фиг. 7 са показани изображения от тъмнополева микроскопия на частици от водни суспензии (в 0,9% NaCl) на някои от пригответените хидроксифосфати, както и AP адювант от комерсиалната конюгирана (пневмококова) ваксина Synflorix[®]. От изображенията се забелязва, че ферифосфатният (FP) адювант се характеризира с относително най-висок дял на частиците с размери под 20 μm , наподобяващ частиците от AP адюванта в изследваната комерсиална ваксина. Трябва да се отбележи обаче, че агрегационното състояние на адювантните частици в дадена ваксина може да е различно от това в чистия адювант поради различни взаимодействия между адюванта и компонентите на ваксината (Harris et al., 2012).



Фиг. 7. Изображения с тъмнополеви микроскоп на частици от водни суспензии (0,9% NaCl) на AP, FP, Fe/Al (50/50) хидроксифосфат и AP адювант от ваксина Synflorix[®]. Размер на скалата: 100 μm .

Измерванията на дзета-потенциала показват, че частиците на всички получени хидроксифосфати са отрицателно заредени при неутрално рН (7), най-вероятно като резултат от преобладаващите фосфатни и/или хидроксидни йони на повърхността на частиците (въпреки че първоначалното молно отношение метал(III)/фосфат във всички дисперсии е 1/1). Стойностите на дзета-потенциала се доближават до точката на нулев заряд (изоелектрична точка, IP) при понижаване на рН (Фиг. 8) и стават положителни в още по-кисела среда. Предполагаме, че в силно киселата среда по повърхността на частиците преобладават положителни заряди от Fe(III) йони от повърхността и протонирани хидроксилни групи, които намаляват при увеличаване на концентрацията на хидроксидни йони (Схема 1). Увеличаването на

концентрацията на хидроксидни йони води до по-висока повърхностна концентрация на депротонирани фосфатни и хидроксидни групи, което вероятно определя и отрицателния знак на дзета-потенциала. IP на получените хидроксифосфати слабо се увеличават с увеличаване на фракцията Al(III): IP на чистия FP е 3,8; при Fe/Al 75/25 е 4,5, докато IP на останалите хидроксифосфати са около 4,9–5,3 (Фиг. 8). Изоелектричната точка е важен параметър в производството на адювантни ваксини, тъй като е свързана с електростатичното взаимодействие с протеини и следователно с адсорбцията на антигени.



Фиг. 8. Дзета-потенциали като функция на рН на Fe/Al хидроксифосфатите с различни първоначални молни съотношения Fe/Al (Angelova&Yordanov, 2017).

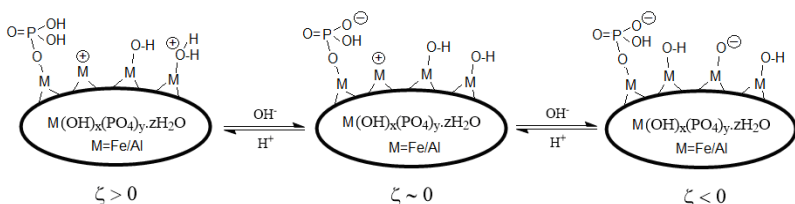


Схема 1. Хипотетичен механизъм на влиянието на киселинността на средата върху повърхностните заряди на хидроксифосфатните частици и знака на дзета-потенциала.

Антигените в адювантните ваксини са обикновено протеини или конюгирани с протеин полизахариди (в така наречените "конюгирани ваксини"). Имуногенността на протеинови антигени, адсорбирани върху адюванти, до голяма степен зависи от степента на адсорбция на антигена/протеина и дозата на адюванта (Gupta and Rost, 2000; Romero et al., 2007). Повечето протеинови антигени са заредени отрицателно при неутрално рН, тъй като са с $IP < 7$ (Dumitriu, 2002). Поради тази причина в нашите експерименти използвахме човешки серумен албумин (HSA) като модел на протеинов антиген - този протеин има $IP = 4,7$, която е подобна на IP на дифтерийния и тетанусовия токсоиди, два често използвани протеинови антигена в адювантни антитоксични ваксини. Също така, молекулната маса на албумина (66 kDa) е близка до тази на дифтерийния токсоид (58 kDa).

Албуминът съдържа аминокиселинни остатъци с ароматни пръстенни структури, които определят абсорбцията на ултравиолетова светлина при дължина на вълната 280 nm. Тази абсорбция при 280 nm се дължи главно на остатъци от тирозин и триптофан и се явява като сравнително интензивен пик, подходяща за спектрофотометрично измерване на концентрацията на протеин до 0,1 mg/ml. Установено беше, че време на инкубация от 1 час на протеиновия разтвор с адювантната дисперсия е достатъчно за адсорбцията и постигане на постоянна протеинова концентрация в дисперсната среда. При тези експерименти концентрациите на хидроксифосфат и протеин са постоянни, което дава възможност за сравнение на адсорбционния капацитет на раличните хидроксифосфати чрез сравнение на степента на натоварване, Le , (адсорбция) на протеин, дефинирана като частта (дадена в %) протеин, който е асоцииран с хидроксифосфата по отношение на общото количество протеин в пробата.

При тези експерименти следва да се има предвид, че асоциацията на протеина с хидроксифосфата е относително бърз процес и протича в рамките на първите минути от смесването, но обратният процес – десорбцията е бавен процес при същите условия и практически такава не настъпва в значима степен в първите часове след разреждане на дисперсиите във физиологичен разтвор. Също така, повърхността на адсорбента (хидроксифосфата) не представлява идеална повърхност, а размерът на първичните наночастици хидроксифосфат не е много по-голям от размерите на самите протеинови молекули. Отчитайки ултраструктурата на вторичните (гелни) частици, понятието адсорбция, което се използва тук и в литературата, следва да се разглежда условно, тъй като по-точно става въпрос за сорбция, при която част от

протеиновите молекули попадат в пространствата между агрегиралите наночастици (Схема 2).

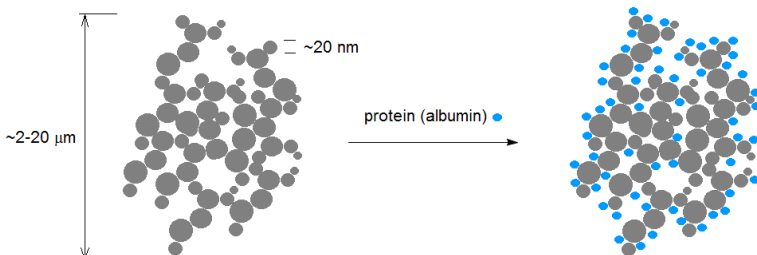
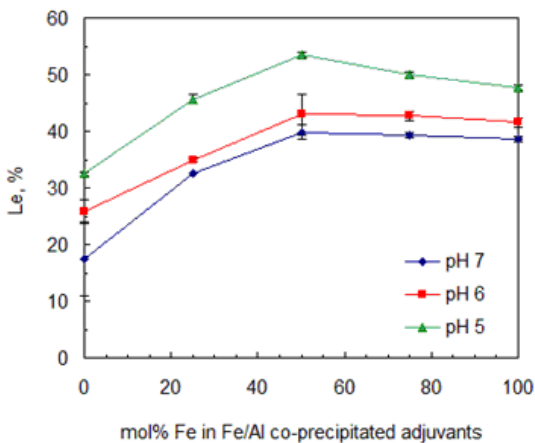


Схема 2. Схематична илюстрация на (ад)сорбцията на протеин (албумин) върху хидроксифосфатна гелна частица.

Адсорбцията на албумин (HSA) върху Fe/Al хидроксифосфатите беше изследвана при три различни стойности на рН: 5, 6 и 7 (Фиг. 9).



Фиг. 9. Степен на адсорбция на протеин (HSA) върху автоклавиран Fe/Al хидроксифосфат с различно съдържание на Fe (дадено като мол % по отношение на общото количество Fe/Al) при различни стойности на рН.

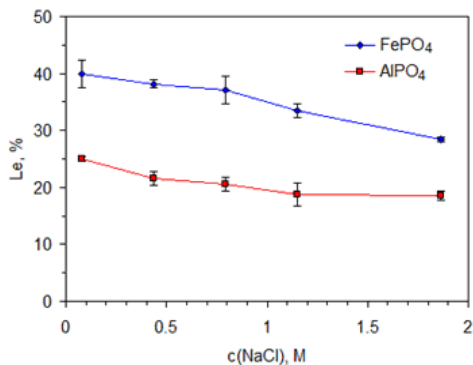
Адсорбцията на албумин при рН 7 върху AP адюванта се оказва съизмерима с тази на дифтериен токсид върху подобен AP адювант (Chase, 1967). Експериментите, проведени при по-ниски стойности на

pH показват по-висока степен на асоцииране на протеина с хидроксифосфатите. Този резултат би могъл да се свърже с това, че при по-ниски стойности на pH абсолютните стойности на дзета-потенциалите намаляват както за протеина, така и за хидроксифосфатите, което води до намаляване на нетното електростатично отблъскване между тях. При тези експерименти (най-вече при $\text{pH} \geq 6$) се наблюдава адсорбция на отрицателно заредени протеинови молекули върху отрицателно заредени частици. Това е често наблюдавано (Rabe et al., 2011) и би могло да се обясни по чрез електростатично взаимодействие на положително заредени области от комплексната протеинова повърхност с отрицателната повърхност на адсорбента (Vos et al., 2010). Също така, много протеини (вкл. албумина) притежават повърхностна активност, поради което се разполагат на междуфазови граници (Suttiprasit et al., 1992). Друга възможност е координиране на различни функционални групи от повърхността на протеиновата молекула с Fe(III) и Al(III) от повърхността на хидроксифосфатните частици.

Интересен резултат е по-голямата степен на асоцииране на протеин при FP в сравнение с AP при еднакви други условия, което би могло да се обясни с по-здрава координация на функционални групи от протеиновите молекули и Fe(III) от повърхността на хидроксифосфатите. Плътността и специфичната повърхност на гелните частици също могат да окажат влияние върху степента на асоциация с протеин (Huang et al., 2014). Специфичната повърхност на адювантните гелове обаче не може да бъде измерена чрез стандартни подходи (например, чрез азотна физисорбция), тъй като изсушаването на гелните дисперсии ги превръща в сухи материали със свойства, които са различни от тези на геловите.

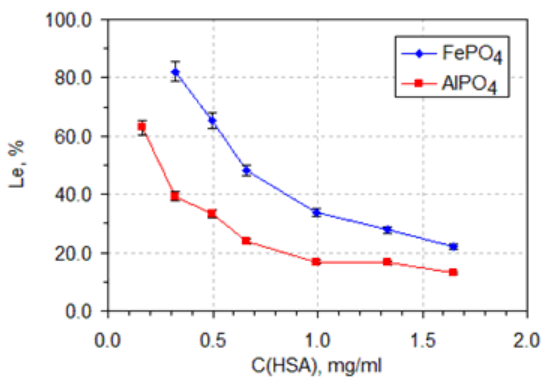
Според други автори (Al-Shakhshir et al., 1995) електростатичните взаимодействия са основен фактор при асоциацията между протеини и адювантни частици, но по-нови и детайлни изследвания показват, че такива взаимодействия могат да се опишат и от неелектростатични модели, включващи лиганден обмен, т.е. координативни връзки (Jully et al., 2016) и зависят от природата на взаимодействащата двойка протеин-адювантна частица. За приблизителна оценка на приноса на електростатичните взаимодействия между албумина и хидроксифосфатните частици, проведохме експерименти за определяне степента на натоварване с протеин при различна йонна сила (чрез различни концентрации на NaCl, до 1,8 M) в случаите на FP и AP при еднакви други условия. Повишаването на концентрацията на NaCl от 50 mM до 1,8 M води до малко намаляване на адсорбцията на протеин (Фиг. 10),

което предполага относително слабо електростатично взаимодействие. За допълнително изясняване на природата на взаимодействията са планирани допълнителни експерименти.



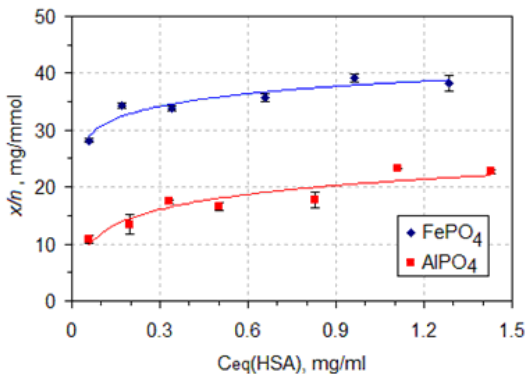
Фиг. 10. Степен на натоварване с протеин за FP и AP при pH 6 като функция от общата концентрация на NaCl в пробата.

За допълнително сравнение на адсорбционната способност на получените FP и AP адюванти бяха проведени серии експерименти при различни общи концентрации на протеин и еднакви други условия (pH = 6; 0,15 M NaCl; концентрация на адювант). Степента на натоварване с протеин намалява с увеличаване на общата протеинова концентрация в пробата (Фиг. 11), което предполага насищане на повърхността на фосфатните частици и “излишъкът” протеин остава несвързан.



Фиг. 11. Степен на натоварване с протеин за FP и AP при pH 6 като функция от общата концентрация на протеин в пробата.

От получените данни става ясно, че FP се характеризира с по-голям адсорбционен капацитет за протеин спрямо AP. Например, при обща протеинова концентрация 0.3 mg/ml, 80% е адсорбиран върху FP, докато само около 40% е адсорбиран в случая на AP. От тези данни може да се изчисли адсорбираното количество протеин за mmol Fe/Al и да се плотира спрямо концентрацията на неадсорбиран протеин във водната фаза, приета за „равновесна” (Фиг. 12).

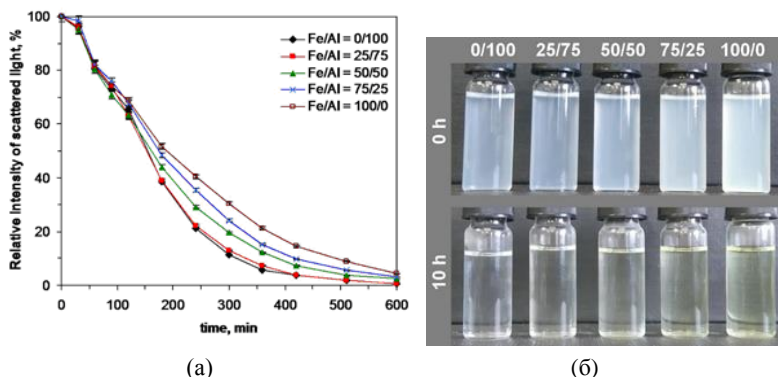


Фиг. 12. Адсорбционни изотерми на човешки серумен албумин (HSA) върху AP и FP при $23\pm 2^\circ\text{C}$ и pH 6. Тук, x = масата на адсорбирания протеин и n = количеството Fe/Al.

Както се забелязва от Фиг. 11 и 12, FP адсорбира почти двойно по-голямо количество протеин в сравнение с AP адюванта при еднакви други условия. Този факт демонстрира преимуществото на FP спрямо AP като протеинов носител. Съвсем формалното нападение на данните от Фиг. 12 с емпиричното уравнение на Фройнлих дава корелационни коефициенти $R^2 \sim 0,90-0,92$. Имайки предвид, че десорбцията е бавен процес при същите условия, не може да наречем данните от Фиг. 12 точно „адсорбционни изотерми”, тъй като процесът не е съвсем равновесен. Адсорбираният протеин не се отделя значимо за 2 часа след 8-кратно разреждане с физиологичен разтвор, но се отделя бързо при обработка с 10 mM фосфатен буфер (PBS), което отново предполага участие на лигаден обмен между протеина и адювантните частици – в

случая, фосфатните йони изместват протеиновите молекули, тъй като се свързват по-силно с Fe(III) и Al(III) от повърхността. В кръвната плазма обаче общата концентрация на фосфати е около 1,1 mM, което предполага по-слабо влияние върху десорбцията на протеин.

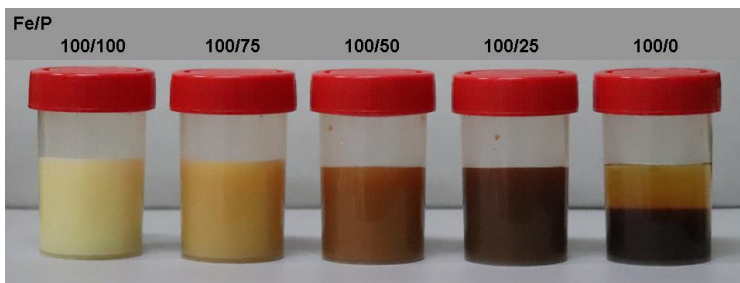
Разтварянето на адювантни гелове в разтвор от 5-10% натриев цитрат обикновено се извършва в производството, за да се установи идентичността на продукта и е един от тестовете, провеждани върху крайните продукти в съответствие с изискванията на регулаторните агенции (Gupta и Rost, 2000). Изследването на кинетиката на разтваряне на Fe/Al хидроксифосфати в 8% натриев цитрат беше проведено чрез измерване на относителната промяна в интензитета на разсеяната светлина като функция на времето при инкубация при 37°C. С (Фиг. 13а). Скоростта на разтваряне на всички тествани гелове е почти сходна и след 10 часа всички тествани дисперсии изглеждат оптически бистри и резултат на образуване на стабилни разтворими цитратни комплекси на Fe(III) и Al(III) (Фиг. 13б).



Фиг. 13. а) Кинетика на разтваряне на Fe/Al хидроксифосфати в 8% натриев цитрат, измерена като намаляване на интензитета на разсеяната светлина като функция на времето; б) изображения на суспензии с различни съотношения на Fe/Al (дадени на фигурата) в началото и след 10 часа престой в 8% натриев цитрат; наблюдава се почти пълно разтваряне (Angelova&Yordanov, 2017).

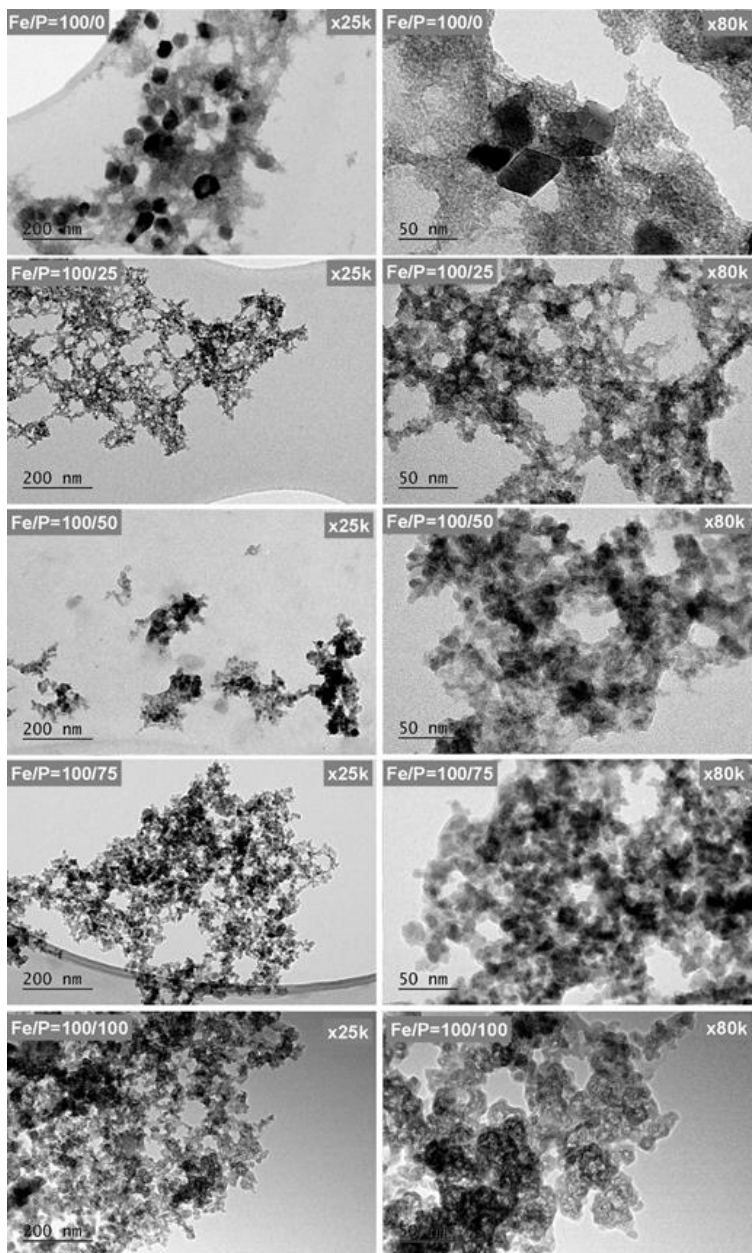
Наноструктурирани желязо(III) хидроксифосфатни адювантни гелове с различно съотношение Fe/P

При следващите експерименти бяха получени различни Fe(III) хидроксифосфати чрез използване на различни първоначални молни съотношения на Fe/P (желязо/фосфат), за да се изследват ефектите на състава върху структурата на материалите, свойствата и адсорбцията на протеин. Всички получени хидроксифосфати образуват кафяви гелообразни суспензии, които се утаяват бавно, докато полученият при подобни условия ферихидроксид образува по-големи частици, които се утаяват по-бързо (Фиг. 14).



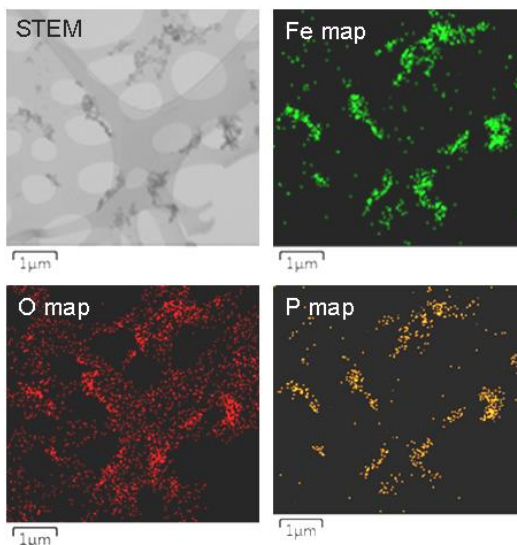
Фиг. 14. Изображения на автоклавираните Fe(III) хидроксифосфати, получени при различно молно съотношение Fe/P, дадено на фигурата.

Морфологията на получените железни хидроксифосфати показва мрежа от първични дисковидни наночастици със среден размер до около 30 nm, агрегирани във вторични микроразмерни структури, както е видно от трансмисионните електронни микрографии (Фиг. 15). Тази морфология наподобява тази на AP, въпреки че първичните частици на AP са по-големи, с размер до около 50 nm (Фиг. 3). Увеличаването на съотношението Fe/P води до образуване на железни хидроксифосфати с още по-малки първични частици, с размери по-малки от 20 nm. Тези първични наночастици агрегират в клъстери и пространствени мрежи чрез "мостове" от аморфен материал, формирайки структури, характерни за колоидните гелове, подобни на тези при Fe/Al хидроксифосфати. Значително различна е ултраструктурата на автоклавирания ферихидроксид, условно означен като такъв "Fe(OH)₃", която се характеризира с наличие на около 50 nm-ови нанокристали, както и на по-малки, с размери от няколко nm.



◀ Фиг. 15. TEM изображения при увеличение $\times 25k$ (ляво) и $\times 80k$ (дясно) на Fe(III) хидроксифосфати, получени при различни молни съотношения Fe/P (дадени на снимките).

EDX анализът на различните железни хидроксифосфати показва наличието на желязо, фосфор и кислород. STEM изображения и мапинг на разпределението на елементите (Fe, P и O) са показани на Фиг. 16. Елементите Fe, P и O са локализирани в едни и същите области на пробата, което показва образуването на хидроксифосфатни частици, чиито състав е сходен с очаквания (Таблица 3). Както и при Fe/Al хидроксифосфати, количествените данни от EDX анализа трябва да се тълкуват внимателно, тъй като по време на експеримента е установено, че те могат да зависят от анализираната площ, а също и от времето за анализ, вероятно в резултат на промени в материала при взаимодействие с електронния лъч на микроскопа.



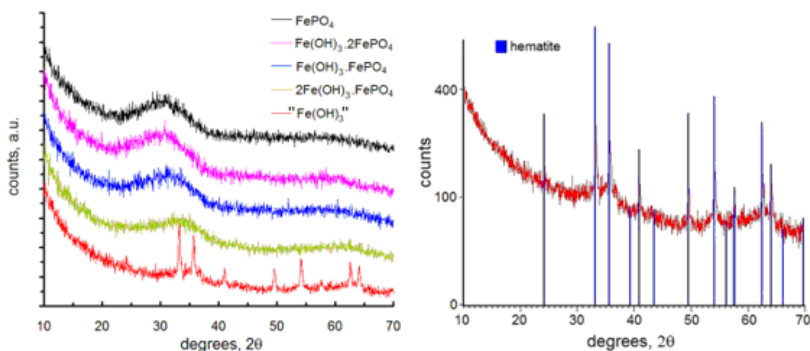
Фиг. 16. STEM изображение и карти на разпределение на елементите (Fe, O, P) при Fe(III) хидроксифосфат, получен при съотношение Fe/P=100/50.

Анализът с XRD (Фиг. 17а) показва, че всички хидроксифосфати с различно съотношение на Fe/P са структурно аморфни. XRD анализът на автоклавирания ферихидроксид показва, че той съдържа нанокристална фаза хематит (Фиг. 17б), който се образува в резултат на

автоклавирането, тъй като XRD на неавтоклаваната дисперсия показва напълно аморфен материал (не е показана на фигурата).

Таблица 3. Състав на Fe(III) хидроксифосфати с различни съотношения Fe/P.

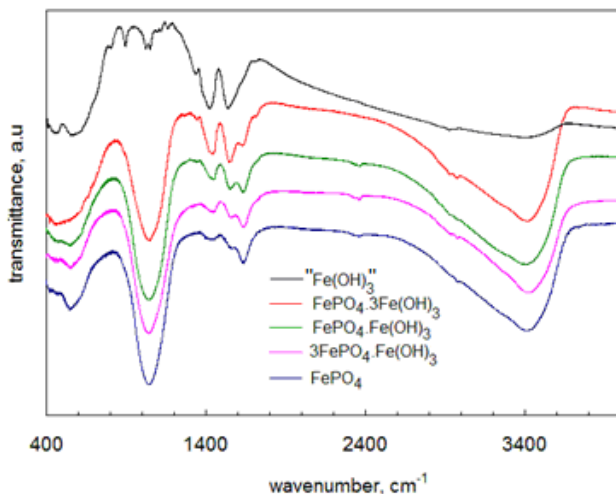
Използвано отношение Fe/P	Очакван състав	Получен състав
100/100	FePO_4	$\text{FePO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
100/75	$3\text{FePO}_4 \cdot \text{Fe}(\text{OH})_3$	$\text{Fe}(\text{OH})_{0,6}(\text{PO}_4)_{0,8} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
100/50	$\text{FePO}_4 \cdot \text{Fe}(\text{OH})_3$	$\text{Fe}(\text{OH})_{1,2}(\text{PO}_4)_{0,6} \cdot 7,4\text{H}_2\text{O}$
100/25	$\text{FePO}_4 \cdot 3\text{Fe}(\text{OH})_3$	$\text{Fe}(\text{OH})_{2,1}(\text{PO}_4)_{0,3} \cdot 2,4\text{H}_2\text{O}$
100/0	$\text{Fe}(\text{OH})_3$	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 1,8\text{H}_2\text{O}$



Фиг. 17. а) Рентгенови дифрактограми на железните хидроксифосфати, маркирани спрямо очаквания състав; б) дифрактограмата на пробата "Fe(OH)₃", показваща наличието на хематитни нанокристали (~50 nm).

ИЧ спектрите на получените Fe(III) хидроксифосфати са показани на Фиг. 18. Най-отличителната абсорбционна ивица е при 1043 cm⁻¹, която съответства на връзката P-O и е характерична за фосфата. Оказва се, че условията на утаяването не оказват влияние върху състоянието на протониране на фосфатите в крайните продукти и честотата на вибрациите на фосфатите във всички случаи е 1043 cm⁻¹. Всички спектри съдържат широка ивица с пик при 3400 cm⁻¹, която вероятно се дължи на O-H връзката от включена вода. Относителната интензивност на пика при 1635 cm⁻¹ се увеличава, докато интензитетите

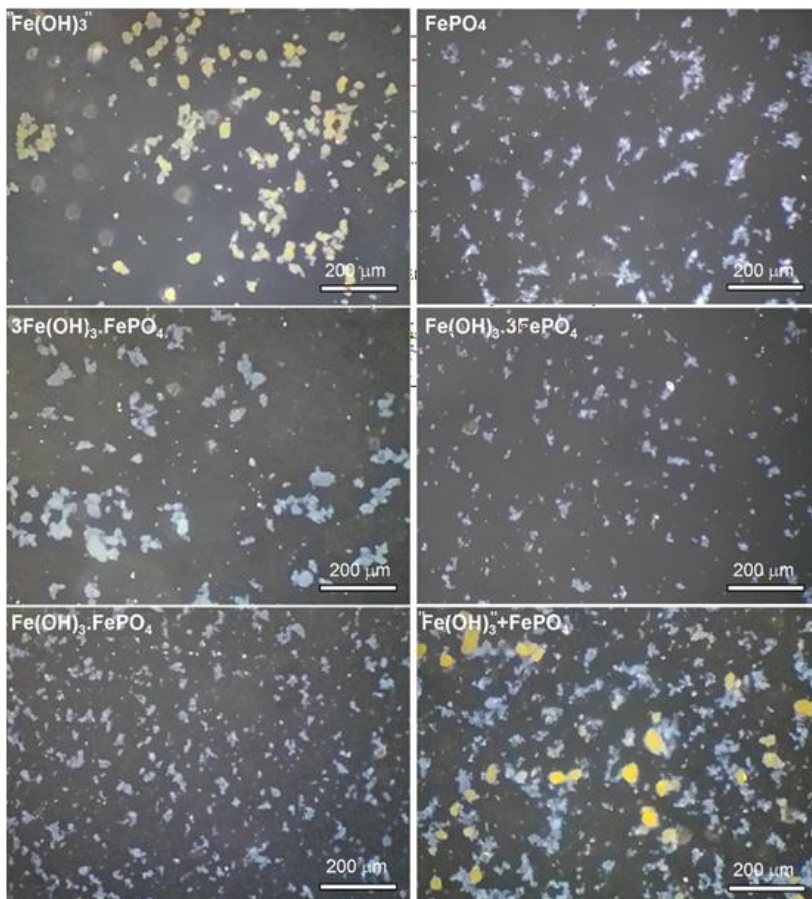
на пиковите при 1440 и 1550 cm^{-1} намаляват с намаляване на съотношение Fe/P. Изглежда, че пикът при 1635 cm^{-1} принадлежи на FP компонента, тъй като липсва в спектъра на „железния хидроксид” и се проявява само в спектъра на хидроксифосфатите с нарастваща интензивност при увеличаване на съотношението фосфат/хидроксид.



Фиг. 18. FTIR спектри на "Fe(OH)₃" и Fe(III) хидроксифосфати (в KBr).

Наблюденията на вторичните микроразмерни структури с тъмно-полеви микроскоп (Фиг. 19) показва, че те са различни по размер - някои са по-малки от 10 μm , а някои са с размери до 20-30 μm . Пробите от "Fe(OH)₃" съдържат най-големите частици, оцветени в жълто. Тези проби също се характеризират с по-бързо утаяване, при което бързо образуват фина утайка, докато всички железни хидроксифосфати образуват бавноутаяващи се гелообразни суспензии.

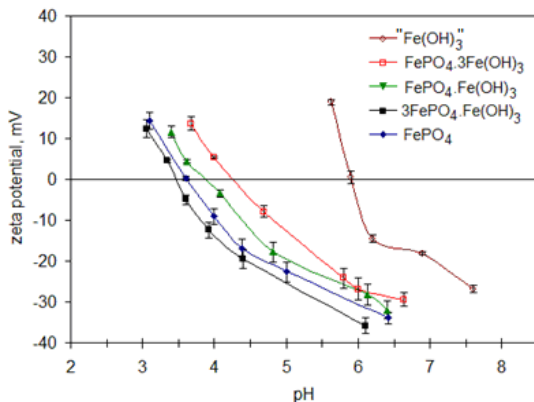
Измерванията на дзета-потенциалите показват, че всички получени материали са с отрицателно заредени частици при неутрално рН, като стойностите на дзета-потенциалите се доближават до изоелектричните точки (IP) при понижаване на рН (Фиг. 20). IP на хидроксифосфатите са в интервала 3,7–4,3, докато IP на „Fe(OH)₃” е 5,9. От литературни данни е известно, че ферихидроксидните дисперсии се характеризират с положително заредени частици и IP > 7, но в конкретния случай съставът на този материал съответства на оксид, което обяснява ниската стойност на IP в този случай.



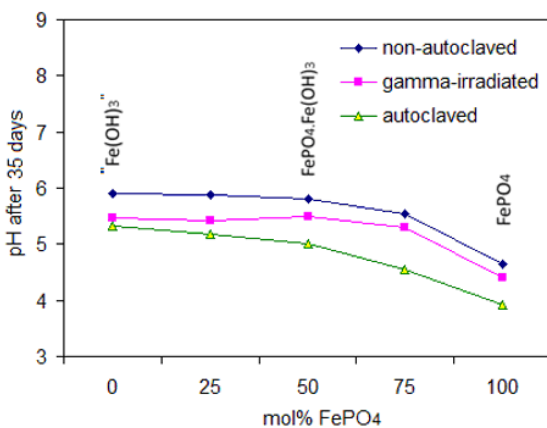
Фиг. 19. Тъмнополеви микроскопски изображения на вторични частици на “ $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ” в 0,9% NaCl и различните железни хидроксифосфати. Съществува значителна разлика във вида на частиците на сътаеният $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot \text{FePO}_4$ и физичната смес на “ $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ” и FePO_4 , което показва, че сътаиването води до образуване на хидроксифосфатни частици.

Изследвани са два различни метода за стерилизация на получените адювантни дисперсии – автоклавиране (121°C за 30 min) и гама-облъчване (27 kGy). Нестерилизираните (неавтоклавираните и необлъчени) проби служат като контроли за оценка на ефекта от стареенето при стайна температура ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Измерванията на pH се извършват след

утаяването и 35 дни след получаването на дисперсиите (Фиг. 21). Установява се, че автоклавираните дисперсии имат относително най-ниски стойности на рН, което се обяснява с ускорената хидролиза на Fe(III) от нагряването при самия процес на автоклавиране (Схема 3).



Фиг. 20. Дзета-потенциал като функция на рН на автоклавираните “Fe(OH)₃” и Fe(III) хидроксифосфати (25°C; проводимост 2.2 ± 0.3 mS/cm).



Фиг. 21. рН на адювантни суспензии (автоклавираните, неавтоклавираните и гама-облъчени) 35 дни след приготвянето като функция от техния състав (даден като mol% на FePO₄).

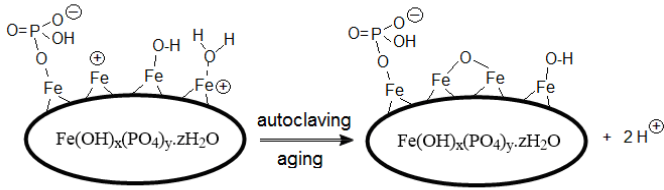
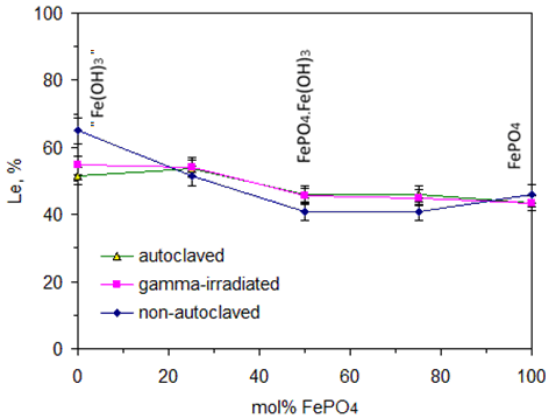


Схема 3. Предполагам механизъм за получаване на водородни катиони (и понижаване на pH) по време на автоклавиране и стареене на ферифосфатните дисперсии.

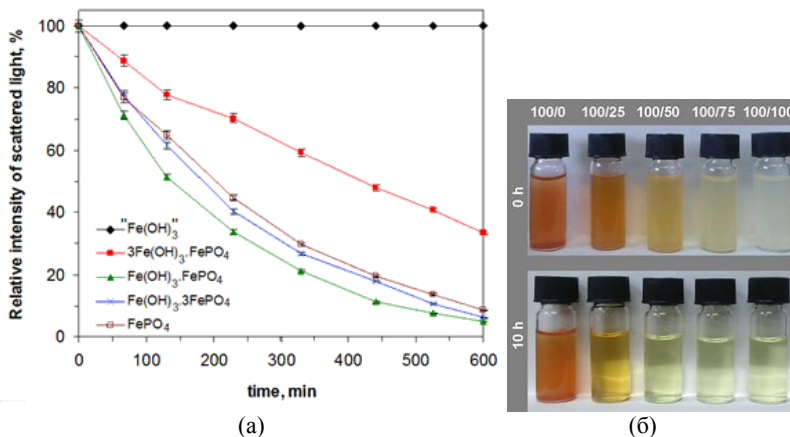
Адсорбцията на HSA е изследвана и за трите различни дисперсии - автоклавиращи, неавтоклавиращи и гама-облъчени при pH 6 (фиг. 22). Интересно е, че адсорбцията на албумин не зависи в значителна степен от състава на железните хидроксифосфати. Също така, всички проби - автоклавиращи, неавтоклавиращи и гама-облъчени, показват подобна адсорбция на протеин 35 дни след тяхното получаване.



Фиг. 22. Степен на натоварване с протеин (в физиологичен разтвор при pH 6) върху автоклавиращи, неавтоклавиращи и гама-облъчени (27 kGy) железни хидроксифосфати с различен състав. Всички проби са оставени на стайна температура в продължение на 35 дни след приготвянето.

Адсорбцията на протеин на прясно приготвените и неавтоклавиранни дисперсии е значително по-висока, например степента на натоварване с протеин при прясна неавтоклавирана дисперсия на FP е около 70-80% и намалява до около 60-65% в следващите 10-15 дни на стареене при стайна температура и спада до ~40% (колкото е на автоклавираните проби). Оказва се, че автоклавирането в този конкретен случай има ефект на "ускорено стареене", както и ефект на стабилизиране на свойствата на суспензията веднага след приготвянето, като същевременно осигурява стерилизация, която е необходима за потенциалната употреба като адювант.

Кинетиката на разтваряне на получените автоклавиранни Fe(III) хидроксифосфати е показана на Фиг. 23а. Тя се измерва индиректно чрез измерване на интензитета на разсеяната светлина като функция на времето за инкубация при 37°C. Скоростта на разтваряне на железните хидроксифосфати е почти сходна и след 10 часа дисперсиите със съотношение Fe/P < 100/50 изглеждат оптически прозрачни (Фиг. 23б). Скоростта на разтваряне за пробата с Fe/P = 100/25 (3Fe(OH)₃.FePO₄) е относително по-ниска. Дисперсията „железен хидроксид” при тези условия е практически неразтворима.



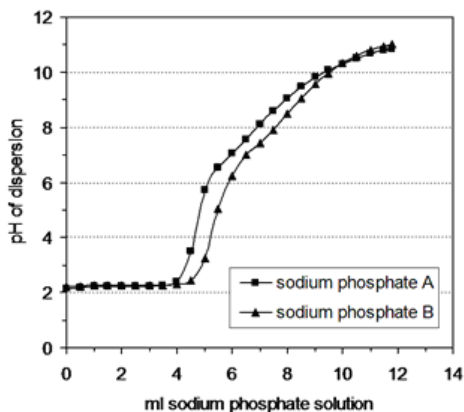
Фиг. 23. а) Скорост на разтваряне на железни хидроксифосфати в 8% натриев цитрат при 37°C. (б) изображения на суспензии с различни молни съотношения на Fe/P в началото и след 10 часа от инкубацията с цитратен разтвор. Почти пълно разтваряне се наблюдава при хидроксифосфатите, докато разтваряне не се наблюдава при “Fe(OH)₃” (хематит).

Получаване на ферифосфатен адювантен гел: оптимизация спрямо адсорбцията на протеин

Ферифосфатният гел беше избран като най-перспективен за допълнителни проучвания върху процеса на получаване с цел оптимизация за постигане на максимален адсорбционен капацитет и най-възпроизводима процедура за получаване. Мотивите за този избор са следните: i) GP притежава ултраструктурни характеристики на адювантен гел, ii) съставът му е относително прост, което улеснява възпроизводимостта на получаването и свойствата му; iii) притежава относително най-висок адсорбционен капацитет за моделен протеин (албумин) измежду тестваните хидроксифосфати при изпълнените гореизброени предимства; iv) размерът на вторичните (гелни) частици съответства на изискванията 1-20 μm , който размер е потвърдено, че е сходен с този на частиците от AP адювант в изследвани от нас комерсиални ваксини; v) има съмерима с AP разтворимост в натриев цитрат.

Беше установено, че възпроизводимостта на процедурата може да се повлияе от два главни фактора: качеството на изходните реагенти и техния произход, и най-вече pH на дисперсията в края на смесването на реагентите, преди стерилизацията. pH на дисперсията в този момент е сурогатен индикатор за молното съотношение на реагентите, Fe(III) и фосфатни йони (излишъкът на ферийони съответства на кисела среда, докато излишък на фосфати съответства на алкална среда). В хода на прибавяне на фосфатния разтвор (~0,3 M) към ферихлоридния разтвор (62 mM; 35 ml) pH на системата се повишава (Фиг. 24).

Беше установено, че използване на ферихлорид хексахидрат от различни производители (Sigma-Aldrich, Merck, Fluka) води до сходен резултат. Трябва да се има предвид, че ферихлоридът е нестабилен на въздуха реактив и силно хигроскопичен, при което поглъща влага и се втечнява, което пък води до хидролиза и изменения на свойствата му във времето. За получаване на възпроизводими резултати, реактивът трябва да е в кристално състояние, от добре затворени банки, а разтворът да е прясно приготвен, непосредствено преди утаителната процедура. Също така, бяха тествани като реагенти тринатриев фосфат додекахидрат от два различни производителя, които показаха разлики в резултата – отместване в кривата, представена на Фиг. 24, което вероятно се дължи на малка разлика в съдържанието на вода в кристалохидратите, респ. в относителното съдържание на фосфат.

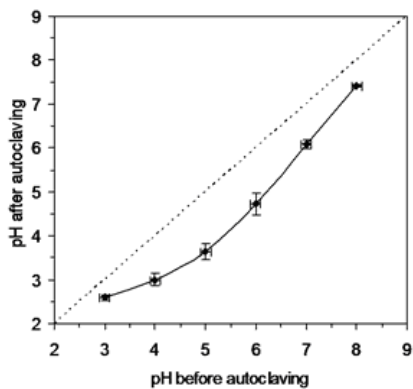


Фиг. 24. Изменение на рН като функция от обема на натриево-фосфатния разтвор, прибавен към разтвор на ферихлорид (35 ml) по време на получаването на ферифосфатен адювантен гел. Използвани са тринатриев фосфат додекахидрат от Институт за чисти вещества (phosphate A) и Sigma-Aldrich (phosphate B).

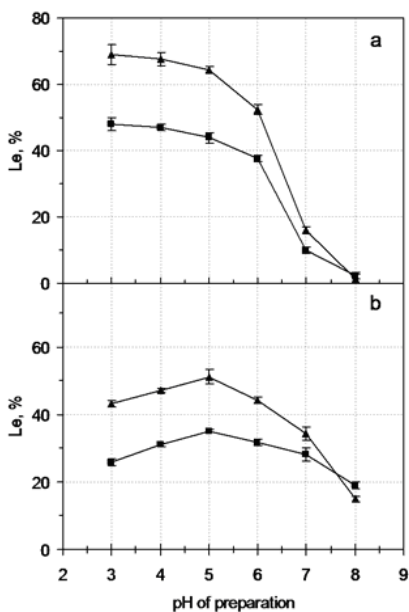
Обаче, ако рН на дисперсията се доведе до една и съща стойност, например рН 5,0, използвайки двата различни натриеви фосфата, получените FP гелове са с практически сходни характеристики и еднакъв адсорбционен капацитет за албумин. Този резултат показва, че за възпроизводимостта на адсорбционните качества на адювантния гел е важно съотношението на реагентите, за което може да се следи чрез измерване на рН в хода на утаяването, без да е нужен точен количествен анализ на използваните изходни реагенти.

За изясняване на връзката на рН при утаяването с адсорбционните свойства на получения ферифосфат, бяха получени серия дисперсии на FP с шест различни стойности на рН (вариращи от 3,0 до 8,0) чрез дозиране количеството разтвор на тринатриев фосфат, след което бяха автоклавираны. След автоклавиране за 30 минути при 121°C, рН на дисперсиите намалява във всички случаи (Фиг. 25).

Автоклавираните дисперсии показват по-ниска адсорбция на протеин, отколкото неавтоклавираните (Фиг. 26а), което вероятно се дължи на промени в повърхностните свойства на материала (Схема 3) и/или промени в структурата на частиците, които могат да станат по-консолидирани при нагриване, което намалява наличната за адсорбция повърхност.



Фиг. 25. Промени в рН на адювантните дисперсии преди и след автоклавиране.



Фиг. 26. Степен на натоварване на протеин (Le, %) за автоклавирани (■) и неавтоклавиращи (▲) железни хидроксифосфатни адюванти, приготвени при различно рН и оставени в продължение на 2 седмици: а) без промиване; б) след 5-кратно промиване с физиологичен разтвор.

Адсорбцията на протеини на неавтоклавираните гелове е доста висока веднага след получаването - например достига ефективност на натопване около 80% за ферифосфата, получен при рН 5,0. Неавтоклавираните гелове стареят и тяхната адсорбционна способност леко намалява с времето, докато автоклавираните гелове са много по-стабилни. Получените FP в излишък от Fe(III) (при рН<5) адсорбират по-големи количества протеин, вероятно поради по-високата повърхностна концентрация на Fe(III) йони, които взаимодействат с протеиновите молекули. Излишъкът от фосфати води до образуване на гелове с много по-ниска адсорбционна способност, вероятно поради факта, че излишните фосфати блокират повърхностните Fe(III) йони и намаляват взаимодействието с протеиновите молекули (фосфатите образуват стабилни комплекси с Fe(III)). Ако получените ферифосфатни гелове се промият 5-кратно с физиологичен разтвор, адсорбционният капацитет на протеините, получени в излишък от Fe(III), намалява, докато адсорбционният капацитет на гелове, получени в излишък от фосфати, се повишава леко (Фиг. 26б). Този факт също подкрепя идеята, че взаимодействието на протеините се осъществява чрез повърхностния слой от Fe(III).

Важно е да се отбележи, че ако количеството на фосфата (съответно, рН) не се контролира прецизно в областта 6-7, това може да доведе до получаването на FP с лоша възпроизводимост (относително висока вариация) на капацитета на протеинова адсорбция. Тъй като промиването на адювантни гелове след автоклавиране не е практично, препоръчваме рН на получаване между 5,0 и 6,0 (защото при рН <5 относително по-голяма част от Fe(III) остава в излишък и при рН > 6 протеиновата адсорбция на гела е доста ниска).

Бяха проведени и серия експерименти с удвояване, както и с 4-кратно увеличаване количествата на реагентите при постоянни други условия и параметри, които показаха сходни адсорбционни свойства (относно албумин) на получените ферифосфати, което е важна предпоставка за бъдещи изследвания върху прехода от лабораторен към полупромишлен мащаб на получаване на тази гелна суспензия.

Резюме на основните резултати

1. Получени са гелни суспензии от нови наноструктурирани смесени Fe(III)/Al(III) хидроксифосфати с различно молно съотношение Fe/Al чрез сътаяване от смесени разтвори на алуминиев хлорид и ферихлорид при подходящо подбрани и контролирани условия (температура, скорост на разбъркване, скорост на прибавяне на реагентите, контрол на рН на системата в хода на утаяването). Получените Fe/Al хидроксифосфати се състоят от първични дисковидни наноразмерни частици (20-40 nm), агрегирани в микро-размерни (1-20 μm) вторични частици (диспергирани в среда с физиологична йонна сила), чиито ултраструктура и размери са сходни с тези на използваните в комерсиалните ваксини алуминиево фосфатни адюванти.
2. Частиците на всички получени Fe/Al хидроксифосфати са с отрицателен дзета-потенциал при физиологично рН (7,4) и са с изоелектрични точки (IP) в интервала от 3,5 до 5,5. Материалите са рентгено-аморфни и могат да бъдат напълно солюбилизирани в 8%-ен разтвор на натриев цитрат.
3. Установено е, че ферифосфатният адювантен гел адсорбира в по-голяма степен моделен протеин (серумен албумин) в сравнение с алуминиев фосфатен гел, получен при еднакви други условия. Повишаването на рН на средата води до по-малка степен на натоварване на протеина при всички получени хидроксифосфати. От адсорбционните изотерми на албумина се установява, че при определени условия (рН 6, концентрация на протеин 0,3 mg/ml, концентрация на адювант 9,4 $\mu\text{mol/ml}$) степента на натоварване на протеина върху ферифосфатния гел достига 80% и е близо два пъти по-висока в сравнение с алуминиевия фосфат.
4. Изследването на ефекта на йонната сила върху степента на натоварване с протеин при алуминиевия фосфат и ферифосфата показва слаба зависимост, което предполага относително малък принос на електростатичните взаимодействия протеин-адювант. Изказана е хипотеза, че взаимодействията протеин-адювант се дължат основно на координативни връзки между функционални групи от протеина и Fe(III)/Al(III) от повърхността на частиците.

5. Получени са гелни суспензии от наноструктурирани желязо(III) хидроксифосфати с различно молно съотношение Fe/P и са стерилизирани чрез автоклавиране или гама-облъчване. Ултраструктурните им характеристики наподобяват тези на ферифосфатния гел, за разлика от „ферихидроксидът”, който се получава като рентгено-аморфен материал, но образува нанокристална фаза от хематит при автоклавиране и относително по-големи вторични частици, неразтворими в 8%-ен натриев цитрат. Степента на натоварване с протеин не зависи в голяма степен от състава на получените хидроксифосфати. Стерилизацията чрез автоклавиране води до намаляване, но и същевременно стабилизиране на адсорбционната способност. Прясно получените и неавтоклавиращи суспензии се характеризират с по-голям адсорбционен капацитет, но след около 35 дни период на „зреене” степента на натоварване на протеин при автоклавираните, неавтоклавираните и гама-облъчените суспензии е практически еднаква.
6. Получени са данни за адсорбцията на моделен протеин върху ферифосфатен адювантен гел, получен при различни стойности на рН на дисперсията преди автоклавирането, определени от съотношението между ферихлоридния и фосфатния прекурсор. Адювантен гел получен в излишък на Fe(III) се характеризира с относително висока адсорбционна способност за протеин, докато гел получен в излишък на фосфати почти не адсорбира протеин.
7. Новополучените хидроксифосфатни гелни суспензии след стерилизация чрез автоклавиране, са с възпроизводими характеристики, което е важно изискване за тяхното потенциално приложение като ваксинални адюванти.

Приноси

1. Получени са гелни суспензии от нови наноструктурирани смесени желязо(III)-алуминиеви хидроксифосфати с различно съотношение Fe/Al, чиито структурни и физикохимични характеристики ги определят като носители на протеини и потенциални ваксинални адюванти. Изяснени са ефектите на състава върху характеристиките на материалите и адсорбцията на моделен протеин (албумин).
2. Получени и охарактеризирани са гелни суспензии от наноструктурирани желязо(III) хидроксифосфати с различно съотношение Fe/P. Изяснени са ефектите на състава и стерилизацията върху адсорбцията на моделен протеин (албумин).
3. Получен е железен(III) фосфат под формата на гелна суспензия с близо двойно по-висок адсорбционен капацитет за моделен протеин (албумин) в сравнение с алуминиево-фосфатен ваксинален адювант.
4. Новополучените хидроксифосфатни гелни суспензии след стерилизация чрез автоклавиране, са с възпроизводимы характеристики, което е важно изискване за тяхното потенциално приложение като ваксинални адюванти.

Литература

Al-Shakhshir R., Regnier F., White J., Hem, S., 1995, Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants, *Vaccine* 13: 41–44.

Bernhardt D., 1993, Solutions containing antigen and zinc hydroxide or iron hydroxide as an adjuvant and processes for preparing such solutions. US Patent No. 5,252,327.

Burrell L., Johnston C., Schulze D., Klein J., White J., Hem S., 2000, Aluminium phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part I: composition and structure, *Vaccine* 19: 275–281.

Chase M., 1967, Production of antiserum, in: C. Williams, M. Chase (Eds.), *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Academic Press, p. 197.

Dumitriu S. (Ed.), 2002, *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*, Marcel Dekker Inc., NY, p. 226.

Eibl J., Leibl H., Mannhalter J., 1999, Adjuvant based on colloidal iron compounds, US Patent No. 5,895,653.

Gupta R., Rost B., 2000, Aluminum compounds as vaccine adjuvants. In: *Vaccine adjuvants*. Springer, New York, pp 65–89.

Jully V., Mathot F., Moniotte N., Preat V., Lemoine D., 2016, Mechanisms of antigen adsorption onto an aluminum-hydroxide adjuvant evaluated by high-throughput screening, *J. Pharm. Sci.* 105: 1829–1836.

Harris J., Soliakov A., Lewis R., Depoix F., Watkinson A., Lakey J., 2012, Alhydrogel[®] adjuvant, ultrasonic dispersion and protein binding: a TEM and analytical study, *Micron* 43: 192–200.

Hem S., Hogenesch H., 2007, Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality, *Expert Rev. Vaccines* 6(5): 685–698.

Huang M., Wang W., 2014, Factors affecting alum–protein interactions, *Int. J. Pharm.* 466: 139–146.

Leibl H., Tomasits R., Brühl P., Kerschbaum A., Eibl M., Mannhalter J., 1999, Humoral and cellular immunity induced by antigens adjuvanted with colloidal iron hydroxide, *Vaccine* 17: 1017–1023.

Maughan C., Preston S., Williams G., 2015, Particulate inorganic adjuvants: recent developments and future outlook, *J. Pharm. Pharmacol.* 67: 426–449.

- Morefield G., Sokolovska A., Jiang D., HogenEsch H., Robinson J., Hem S., 2005, Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro, *Vaccine* 23: 1588–1595.
- Paneque-Quevedo A., 2013, Inorganic compounds as vaccine adjuvants, *Biotechnol. Apl.* 30: 250–256.
- Pasquale A., Preiss S., Da Silva T., Garcon N., 2015, Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond, *Vaccines* 3: 320–343.
- Rabe M., Verdes D., Seeger S., 2011, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162: 87–106.
- Romero Mendez I.Z., Shi Y., HogenEsch H., Hem S.L., 2007, Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 25(5):825–833.
- Sauzeat E., 2004, Vaccine composition iron phosphate as vaccine adjuvant, Patent US20040228880.
- Suttiaprasit P., Krisdhasima V., McGuire J., 1992, The surface activity of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin: i. surface tension measurements with single-component and mixed solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 154: 316–326.
- Vos W., F. Leermakers, A. de Keizer, M. Stuart, J. Kleijn, 2010, Field theoretical analysis of driving forces for the uptake of proteins by like-charged polyelectrolyte brushes: effects of charge regulation and patchiness, *Langmuir* 26: 249–259.
- WHO, 1977, World Health Organization Manual for the production and control of vaccines: diphtheria toxoid; Appendix D.21: Preparation of aluminum phosphate suspension.: BLG/UNDP/77.1.Rev.1.

Научни публикации

в които са представени резултати от дисертационния труд

1. N. Angelova, G. Yordanov. 2017. Iron(III) and aluminium(III) based mixed nanostructured hydroxyphosphates as potential vaccine adjuvants: Preparation and physicochemical characterization, *Colloid Surf. A*, vol. 535, p. 184-193 (Elsevier), <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.09.043>. (1 цитат)
2. N. Angelova, G. Yordanov. 2018. Preparation and characterization of nanostructured ferric hydroxyphosphate adjuvants, *International Scientific Journal Industry 4.0*, vol. 3, issue 6, p. 308-311 (ISSN: 2534-8582; STUME-Bulgaria).
3. N. Angelova, G. Yordanov. 2019 (*in press*). On the protein adsorption properties of nanostructured ferric phosphate adjuvant. *Nanoscience & Nanotechnology: Nanostructured materials application and innovation transfer*, vol. 19 (ISSN: 1313-8995; NCCNT-BAS).

Участия в научни конференции

на които са представени резултати от дисертационния труд

1. N. Angelova, G. Yordanov, Iron and aluminium based mixed nanostructured hydroxyphosphates as potential vaccine adjuvants: preparation and physicochemical characterization, *Horizon 2020 Project "Materials Networking" "Advanced Materials" Workshop*, 10-13 September 2017, Pomorie, Bulgaria (oral presentation).
2. N. Angelova, G. Yordanov, Nanostructured ferric/aluminium hydroxyphosphates as potential vaccine adjuvants, *19-th International Workshop on Nanoscience and Nanotechnology NANO 2017*, 8-10 November 2017, Sofia, Bulgaria (poster presentation).
3. Н. Ангелова, Г. Йорданов, Синтез и физикохимично охарактеризиране на наночастици от железен(III) хидроксифосфат за потенциално приложение като ваксинални адюванти, XVII Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 16-18 май 2018, София, България (устен доклад).
4. N. Angelova, G. Yordanov, Iron(III) hydroxyphosphate nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and potential use as vaccine adjuvants, *First National Students Conference for Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 19-20 April 2018, Sofia, Bulgaria (poster presentation).
5. N. Angelova, G. Yordanov, Preparation and physicochemical characterization of nanostructured iron(III) hydroxyphosphates as potential vaccine adjuvants, *Nanotech France 2018*, 27-29 June 2018, Paris - France (poster presentation).

6. N. Angelova, G. Yordanov, On the protein adsorption properties of nanostructured ferric phosphates, *20-th International Workshop on Nanoscience and Nanotechnology NANO 2018*, 8-10 November 2018, Sofia, Bulgaria (poster presentation).
7. N. Angelova, G. Yordanov, Preparation and characterization of ferric hydroxyphosphate adjuvants, *II International Scientific Conference Industry 4.0*, 12-15 December 2018, Borovetz, Bulgaria (poster presentation).