

УДК 544.77.022.823:546.62-31

В.В. Виноградов, Г.А. Дышина, А.В. Виноградов, А.В. Агафонов

# БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН, ЭНТРАПИРОВАННЫЙ В МАТРИЦУ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ: ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ТЕРМИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ\*

(Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН)

*Данная статья впервые описывает эффект термической стабилизации энтрапированных биомолекул в керамическую матрицу, отличную от кремнезема. Данное исследование посвящено изучению структуры золь-гель матрицы на основе оксида алюминия в присутствии модельного белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА). Золь-гель матрицы были получены с помощью гидролиза изопропоксида алюминия при различных значениях pH для получения матриц с различными текстурными свойствами. Для пептизации были использованы азотная кислота, уксусная кислота и ультразвуковая (УЗ) обработка. Развитие структуры матрицы с энтрапированным белком исследовано с помощью комплекса методов, включая рентгеноструктурный анализ, метод ИК-спектроскопии, метод динамического светорассеяния, метод атомно-силовой микроскопии и метод низкотемпературной адсорбции/десорбции азота. В итоге, были синтезированы образцы с различными текстурными характеристиками и размером частиц. По результатам дифференциальной сканирующей калориметрии показано смещение температуры денатурации свободного белка по сравнению с энтрапированным в матрицу оксида алюминия на 26°C в сторону более высоких температур.*



**Виноградов Владимир Валентинович** – к.х.н., младший научный сотрудник лаборатории химии гибридных наноматериалов и супрамолекулярных систем ИХР РАН. Область научных интересов: золь-гель синтез, гетерогенный катализ, биоматериалы. Тел.: +7(4932)20-33-31, e-mail: vvv@isc-ras.ru



**Дышина Галина Александровна** – к.х.н., младший научный сотрудник лаборатории химии гибридных наноматериалов и супрамолекулярных систем ИХР РАН. Область научных интересов: золь-гель синтез биоактивных препаратов, микроэлектромеханические системы. Тел.: +7(4932)33-62-64, e-mail: gak@isc-ras.ru



**Виноградов Александр Валентинович** – к.х.н., младший научный сотрудник лаборатории химии гибридных наноматериалов и супрамолекулярных систем ИХР РАН, старший преподаватель кафедры «Технология керамики и наноматериалов» ИГХТУ. Область научных интересов: золь-гель синтез, фотоактивные и магнитные наноматериалы. Тел.: +7(4932)33-62-64, e-mail: vav@isc-ras.ru



**Агафонов Александр Викторович** – д.х.н., зав. лабораторией химии гибридных наноматериалов и супрамолекулярных систем ИХР РАН, профессор кафедры «Технология керамики и наноматериалов» ИГХТУ. Область научных интересов: химия функциональных наноматериалов. Тел.: +7(4932)33-62-64, e-mail: ava@isc-ras.ru

**Ключевые слова:** золь-гель, оксид алюминия, биомолекулы, энтрапирование, термическая стабильность

\* Обзорная статья

## ВВЕДЕНИЕ

Начиная с 1990-х годов золь-гель метод был успешно использован для капсулирования различных объектов: от красителей [1] или масел [2] до более сложных биомолекул, таких как ферменты [3,4], бактерии [5] и клетки [6]. Капсулирование происходит при непосредственном введении биомолекул в золь в процессе образования неорганического полимерного каркаса при температуре окружающей среды. При этом образуется гель с активной фазой, равномерно распределенной по внутренней поверхности геля (или ксерогеля). Физические характеристики (такие как плотность, размер пор и наноструктура) таких оксигидроксидов, полученных в процессе золь – гель синтеза могут варьироваться за счет регулирования кинетики протекания реакций гидролиза и дальнейшей конденсации [7-9]. Возможность тщательного контролирования микроструктуры ксерогелей крайне важна при создании систем с контролируемым высвобождением биообъектов в процессе практического использования. Например, при переходе от щелочного к кислотному гидролизу структура геля  $\text{SiO}_2$  может измениться от мезопористой к микропористой, при этом подвижность закапсулированных биомолекул резко снижается и скорость высвобождения уменьшается [10]. Аналогичным образом влияют другие исходные параметры (соотношение вода/алкоксид, спирт/алкоксид, время старения, время и температура сушки и т.д.), которые также могут быть использованы для регулирования скорости высвобождения из пористой структуры гелей.

Широкий спектр различных параметров золь - гель процесса, которые могут быть использованы для регулирования скорости высвобождения лекарственных препаратов, привели к появлению новых видов продуктов, биосовместимых с организмом, включающих в своем составе закапсулированные: антибиотики [11], антикоагулянты [12], анальгетики [13], гипотоники [14], белки [15], гормоны [16], антиэстрогены [17], антипротивосудорожные [18] и противоопухолевые средства [19] и даже аденовирус [20].

Несмотря на то, что большинство исследований связано с использованием силикатных прекурсоров, существует огромное число других прекурсоров на основе переходных металлов (Ti, V, Zr) или металлов III группы периодической таблицы (B и Al), которые также могут быть использованы для эффективной иммобилизации биообъектов. Данные несиликатные прекурсоры отличаются более высокой реакционной способностью в водной среде из-за низкой электроотрицательности металла и его способности находиться в раз-

личных координационных состояниях [21]. Например, глюкозооксидаза была успешно закапсулирована в псевдобемитовый гель [22]. Оксигидроксиды алюминия были также применены для иммобилизации полифенолоксидазы [23]. Но наиболее распространенным является использование гидроксоформ алюмооксидных систем в качестве адьювантов.

Алюминиевые адьюванты используются в практической вакцинации уже более полувека для выработки защитного иммунитета у организма. Миллиарды доз вакцин на основе гидроксоформ алюминия вводились на протяжении многих лет, и они в настоящее время являются наиболее широко используемыми для вакцинации животных и человека.

Алюминиевые адьюванты считаются безопасными при использовании в соответствии с действующими нормами вакцинации [24, 25]. В отличие от традиционных вакцин, в которых антиген адсорбируется на поверхности гидроксоформ алюминия, в данной работе рассмотрены подходы по получению вакцин нового поколения – композитов, в которых белок закапсулирован в матрицу геля оксигидроксида алюминия. Необходимо рассмотреть аспекты золь-гель синтеза при различных условиях приготовления и оценить термическую стабильность белков в закапсулированном состоянии. Бычий сывороточный альбумин будет использован в качестве модельного белка для капсулирования.

В данной работе золь-гель методом был синтезирован оксигидроксид алюминия, полученный при различных условиях с целью его применения в качестве матрицы для иммобилизации бычьего сывороточного альбумина (БСА) для улучшения его термической стабильности. А также предложены подходы, позволяющие регулировать размер и структуру формирующихся композитов для использования их в качестве потенциальных вакцин.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Изопропоксид алюминия ( $\text{Al}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3$ ), азотная кислота ( $\text{HNO}_3$ ), уксусная кислота ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) и бычий сывороточный альбумин (БСА) были использованы фирмы Sigma Aldrich.

**Синтез псевдобемитовых зольей.** Псевдобемитовые золи были получены, используя метод Йолдаса, посредством пептизации осадка гидроксида алюминия азотной кислотой (образец 1) и уксусной кислотой (образец 2). Более подробно, 3.28 г  $\text{Al}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3$  было добавлено в 50 мл дистиллированной воды, что привело к образованию бе-

лого осадка. Осадок был пептизирован 0.2 (2 мл уксусной кислоты) мл концентрированной азотной (уксусной) кислоты при 90°C при интенсивном перемешивании в течение 2 часов для получения стабильного и прозрачного бемитового золя и для испарения изопропанола, образующегося при гидролизе. Конечные значения pH растворов были 2.8 (4.8 в среде уксусной кислоты). В другом случае (образец 3), для того чтобы избежать кислой среды, белый осадок обрабатывался ультразвуком (37 кГц, 0063 кВт) в течение 4 часов без добавления кислоты (pH 7.3). Через 4 ч образовался гель.

**Синтез с энтрапированными молекулами БСА.** Полученные бемитовые золи были охлаждены до 4°C. Далее 0.03 г бычьего сывороточного альбумина было растворено при комнатной температуре в среде бемитовых золь и оставлено на 3 часа. Полученные растворы были высушены при 20°C в течение недели для получения образцов 4,5,6, приготовленных с использованием азотной кислоты, уксусной кислоты и при УЗ обработке соответственно.

**Характеристика методов.** Удельная площадь поверхности, объем пор и распределение пор по размерам были определены методом адсорбции-десорбции азота при 77 K (Quantachrome Nova 1200). Площадь поверхности была рассчитана, используя уравнение BET, объем пор и распределение пор по размерам были определены используя метод ВДН. Перед анализом образцы были дегазированы в течение 4 часов при комнатной температуре. Распределение размеров гидродинамического радиуса было измерено методом динамического светорассеяния (DLS, Malvern, Zeta-sizer nano ZS). ДСК кривые были получены с использованием DSC 204 F1 Phoenix NETZSCH со скоростью нагрева 10 К/мин. Кристаллическая фаза и кристалличность образцов были измерены методом рентгеновской дифракции (РФА) (Bruker D8 Advance) с помощью Cu-K $\alpha$  излучения ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ), образцы были сканированы по  $\theta$  в диапазоне 4-60°C со скоростью 2 градуса в минуту. Твердые образцы были охарактеризованы методом ИК-спектроскопии с помощью спектрометра «Avatar 360 FTTIR ESP» и с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) SPM Solver P47H-PRO. Образцы для сканирования наносились на стеклянную подложку с идеально чистой поверхностью.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Измерения методом динамического светорассеяния.** Рис. 1 показывает средний гидродинамический размер частиц гидрозоля оксида алюминия и продуктов взаимодействия между

частицами гидрозоля оксида алюминия и бычьим сывороточным альбумином. Высокое молярное соотношение  $[H^+/Al^{3+}]$  и высокий заряд на поверхности частиц приводят к предотвращению коагуляции и осаждению агрегированных частиц оксида алюминия в присутствии БСА за счет электростатического отталкивания. Избыток кислоты может сжимать двойной электрический слой таким образом, что сила взаимодействия частиц на расстоянии уменьшается во время столкновения, в результате чего образуются агломераты.

Таким образом, мы выбрали оптимальные концентрации азотной и уксусной кислоты, необходимой, с одной стороны, для разделения частиц на более мелкие во время пептизации и для предотвращения коагуляции частиц оксида алюминия. Образец 1 имеет средний гидродинамический радиус 26.2 нм. В случае использования уксусной кислоты средний гидродинамический радиус увеличивается и соответствует 31.2 нм, что связано с меньшим значением ионной силы раствора. Использование физических методов пептизации может приводить к образованию устойчивых золь и гелей без введения дополнительных ионов. При этом интенсивность и скорость их образования зависит от частоты и мощности ультразвука. При облучении осадка, полученного в результате гидролиза изопропоксида алюминия, образуется золь с достаточно широким распределением частиц по размерам (рис. 1).

Согласно [26], необходимо отметить, что для многих вакцин на основе белков лучший эффект достигается в интервале значений pH между изоэлектрической точкой белка антигена и точкой нулевого заряда адьюванта оксида алюминия. В этом интервале адьювант и антиген будут иметь противоположные электрические заряды, способствующие электростатическому притяжению и адсорбции. В нашем случае наибольшее взаимодействие достигается в интервале pH от 4,7 до 8, поскольку именно в этом интервале молекулы бычьего сывороточного альбумина и частицы золя оксида алюминия заряжены разноименно. Использование азотной кислоты в качестве пептизатора способствует понижению значения pH до уровня 2.8, что вызывает отталкивание частиц между собой и, как следствие, взаимодействия наночастиц оксида алюминия (НОА) и молекул бычьего сывороточного альбумина (БСА) не происходит. Данный факт подтверждается присутствием нескольких пиков 16.3, 95, 553.2; 2400 нм на кривой распределения частиц по размерам (рис.1.). Использование уксусной кислоты и ультразвуковой обработки создает значение pH в растворе равное 4.8 и 7.3 соответственно, что соот-