

**POLITECNICO DI TORINO**

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Uso della liofilizzazione per la  
conservazione dei liposomi**



**Relatori**

prof. Roberto Pisano  
prof. Valentina Cauda

**Candidato**  
Giulia Bucca

Dicembre 2019



## **Indice**

<b>Capitolo 1</b> .....	1
<b>Introduzione</b> .....	1
1.1 Il mondo della nanotecnologia .....	1
1.2 Ruolo dei liposomi nel mondo farmaceutico .....	2
1.3 Tecniche di conservazione dei liposomi .....	5
1.4 Liofilizzazione liposomi.....	5
1.4.1 Cenni storici sul processo di liofilizzazione e sue applicazioni .....	6
1.4.2 Le fasi del processo di liofilizzazione .....	7
1.4.3 Il congelamento e le tecniche di controllo .....	8
1.5 Il problema della formulazione nel caso di un preparato liofilizzato .....	11
1.5.1 Formulazione di una soluzione contenente liposomi .....	14
1.6 Scopo della tesi.....	15
<b>Capitolo 2</b> .....	17
<b>Materiali e metodi</b> .....	17
2.1 Tecniche di caratterizzazione dei liposomi .....	17
2.1.1 Dynamic Light Scattering (DLS).....	17
2.1.1.1 Dimensione delle nanoparticelle .....	17
2.1.1.2 Misura del Potenziale Zeta .....	18
2.1.2 Microscopio in fluorescenza.....	20
2.1.3 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) .....	22
2.2 Caratterizzazione termica di soluzioni da liofilizzare.....	23
2.2.1 Calorimetria differenziale a scansione .....	23
2.2.2 Crio-microscopio (FDM).....	24
2.3 Impianto di liofilizzazione .....	25
2.4 Protocollo di produzione dei liposomi .....	27
2.4.1 Materiali usati .....	28
2.4.2 Pianificazione esperimenti.....	29
2.4.2.1 Scelta della formulazione .....	29
2.4.2.4 Liofilizzazione di formulazioni contenenti liposomi .....	30
2.4.2.5 Titolazione di Karl Fischer .....	31
<b>Capitolo 3</b> .....	33
<b>Risultati</b> .....	33
3.1 Formulazione lipidica .....	33
3.1.1 Stabilità nel tempo .....	36
3.2 Comportamento dei liposomi in presenza di colesterolo .....	39
3.3 Effetto di cicli di congelamento e scongelamento .....	41

3.4 Effetto della liofilizzazione .....	49
3.4.1 Scelta della formulazione .....	55
<b>Capitolo 4</b> .....	<b>57</b>
<b>Conclusioni</b> .....	<b>57</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>61</b>
<b>Appendice</b> .....	<b>65</b>
<b>Ringraziamenti</b> .....	<b>103</b>

## *Elenco figure*

- Figura 1.1:** I liposomi hanno un doppio strato costituito da lipidi cationici, anionici o neutri che racchiudono un nucleo acquoso. Sia il doppio strato lipidico che lo spazio acquoso possono incorporare composti idrofobici o idrofili. Le caratteristiche e il comportamento dei liposomi in vivo possono essere modificati mediante l'aggiunta di un rivestimento polimerico idrofilo, polietilenglicole (PEG), sulla superficie del liposoma per conferire stabilizzazione sterica; possono essere utilizzati come bersagli specifici attaccando ligandi (ad es. Anticorpi, peptidi e carboidrati) alla sua superficie o all'estremità terminale delle catene di PEG. Figura tratta da Sercombe [5], con modifiche. ....2
- Figura 1.2:** La vescicola A è unilamellare mentre la vescicola B è multilamellare. ....3
- Figura 1.3:** Esempio di evoluzione della temperatura del prodotto durante la fase di congelamento del processo di liofilizzazione. ....8
- Figura 1.4:** Soluzione sottoposta a diverse temperature di nucleazione. Basse temperature di nucleazione generano tanti cristalli piccoli mentre le alte temperature inducono pochi nuclei cristallini ad accrescersi. Figura tratta da Winter [30], con modifiche. ....9
- Figura 1.5:** Fase di congelamento con il sistema degli ultrasuoni proposto da Nakagawa. Figura tratta da Kasper [32], con modifiche. ....10
- Figura 1.6:** Il flacone A contenente liposomi di DOPC-DOTAP e trealosio possiede una struttura collassata questo perché si è superata la temperatura critica della soluzione durante l'essiccamento primario, mentre nel flacone B contenente DOPC-DOTAP-DSPE-PEG e mannitolo presenta una torta integra. ....12
- Figura 2.1:** Schema di processo dello Zetasizer Nano - Size measurements. Figura tratta Malvern [35], con modifiche. ....18
- Figura 2.2:** Modello di un doppio strato elettrico all'interfaccia solido-liquido. Figura tratta da Malvern [35], con modifiche. ....19
- Figura 2.3:** Struttura del microscopio in fluorescenza Nikon Eclipse TiE. Figura tratta da Nikon [38], con modifiche. ....21
- Figura 2.4:** Schema del dispositivo di misura dello strumento NTA. Figura tratta da Chen [40], con modifiche. ....23
- Figura 2.5:** Mostra il fronte di una goccia di campione sottoposta alla fase di congelamento ed essiccamento primario. ....25
- Figura 2.6:** Impianto del liofilizzatore REVO® (Millrock Technology, Kingston, USA). Figura tratta da Millrock [44], con modifiche. ....26
- Figura 2.7:** Temperatura in funzione del tempo applicata ai cicli di congelamento e scongelamento lento. ....30
- Figura 2.8:** Disposizione fiale all'interno del liofilizzatore. ....31
- Figura 3.1:** Liposomi con DOPC-DOTAP in acqua e fisiologica (A), sonicati a 40kHz per 20 min (B) ed in seguito estrusi con un filtro da 0.2  $\mu\text{m}$  (C). ....34
- Figura 3.2:** Liposomi con DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in acqua e fisiologica (A), sonicati a 40kHz per 20 min (B) e successivamente estrusi con un filtro da 0.2  $\mu\text{m}$  (C). ....34
- Figura 3.3:** DLS della percentuale numerica di particelle in funzione del diametro. Il picco rosso rappresenta la soluzione contenente DOPC-DOTAP, mentre il picco nero raffigura quella con DOPC-DOTAP-DSPE-PEG. Entrambi i campioni sono dispersi in H<sub>2</sub>O fisiologica, sonicati ed estrusi. ....35

<b>Figura 3.4:</b> Dati ricavati al Nanosight che mostrano la concentrazione in funzione del diametro. Il picco di sinistra rappresenta la soluzione contenente liposomi di DOPC-DOTAP ( $1.88 \cdot 10^{10}$ particelle/ml) e il picco di destra il campione con liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG ( $1.24 \cdot 10^{10}$ particelle/ml). Entrambi sono dispersi in H <sub>2</sub> O e fisiologica, sonicati ed estrusi. ....	35
<b>Figura 3.5:</b> Percentuale numerica in funzione del diametro, di soluzioni contenenti DOPC (grafico sinistro) e DOPC-DOTAP (grafico destro) in acqua e fisiologica (1:1) sonicate ed estruse, analizzate subito dopo esser state preparate (curva nera), dopo 7 giorni (curva rossa), dopo 14 giorni (curva blu). ....	37
<b>Figura 3.6:</b> Percentuale numerica in funzione del diametro, di soluzioni contenenti DOPC-DSPE-PEG (grafico sinistro) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro) in acqua e fisiologica (1:1) sonicate ed estruse, analizzate subito dopo esser state preparate (curva nera), dopo 7 giorni (curva rossa), dopo 14 giorni (curva blu). ....	37
<b>Figura 3.7:</b> DLS al variare del tempo di soluzioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP e colesterolo (rapporto molare 70:30) in acqua e fisiologica. ....	39
<b>Figura 3.8:</b> DLS al variare del tempo di soluzioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP e colesterolo (rapporto molare 80:20) in acqua e fisiologica. ....	40
<b>Figura 3.9:</b> DLS al variare del tempo di soluzioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP e colesterolo (rapporto molare 90:10) in acqua e fisiologica. ....	40
<b>Figura 3.10:</b> Frazione di liposomi (barra arancione) avente il diametro medio misurato via DLS (barra blu) per le soluzioni contenenti DOPC-DOTAP in presenza di cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio e sottoposti a congelamento e scongelamento <b>lento</b> . I risultati della DLS per le varie formulazioni sono riportati in Appendice. ....	41
<b>Figura 3.11:</b> Frazione di liposomi (barra arancione) avente il diametro medio misurato via DLS (barra blu) per le soluzioni contenenti DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in presenza di cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio e sottoposti a congelamento e scongelamento <b>lento</b> . I risultati della DLS per le varie formulazioni sono riportati in Appendice. ....	42
<b>Figura 3.12:</b> Frazione di liposomi (barra arancione) avente il diametro medio misurato via DLS (barra blu) per le soluzioni contenenti DOPC-DOTAP in presenza di cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio e sottoposti a congelamento e scongelamento <b>veloce</b> . I risultati della DLS per le varie formulazioni sono riportati in Appendice. ....	42
<b>Figura 3.13:</b> Frazione di liposomi (barra arancione) avente il diametro medio misurato via DLS (barra blu) per le soluzioni contenenti DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in presenza di cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio e sottoposti a congelamento e scongelamento <b>veloce</b> . I risultati della DLS per le varie formulazioni sono riportati in Appendice. ....	43
<b>Figura 3.14:</b> Campioni analizzati al microscopio in fluorescenza contenenti liposomi DOPC-DOTAP (A) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (B) a cui è stato aggiunto il lattosio. Entrambi hanno subito 7 cicli di congelamento e scongelamento <b>lento</b> . ....	44
<b>Figura 3.15:</b> Campioni analizzati al microscopio in fluorescenza contenenti liposomi DOPC-DOTAP (A) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (B) a cui è stato aggiunto il lattosio. Entrambi hanno subito 7 cicli di congelamento e scongelamento <b>veloce</b> . ....	44
<b>Figura 3.16:</b> DLS di due campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (grafico sinistro) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (grafico destro). ....	46
<b>Figura 3.17:</b> DLS dopo sette cicli di congelamento e scongelamento <b>lento</b> dei campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (picco sinistro, 28.2 nm) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (picco destro, 50.7 nm). ....	46

<b>Figura 3.18:</b> Grafici che mettono in relazione la percentuale del numero di particelle in funzione del diametro dopo sette cicli di congelamento e scongelamento <b>veloce</b> dei campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (picco sinistro, 29.2 nm) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (picco destro, 28.2 nm). .....	46
<b>Figura 3.19:</b> Campioni analizzati al microscopio in fluorescenza contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (figura A) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (figura B) sottoposti precedentemente a 7 cicli di congelamento e scongelamento lento. ....	47
<b>Figura 3.20:</b> Campioni analizzati al microscopio in fluorescenza contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (figura A) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (figura B) sottoposti precedentemente a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce. ....	47
<b>Figura 3.21:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del loro diametro di liposomi liofilizzati costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro). .....	51
<b>Figura 3.22:</b> Liposomi liofilizzati e reidratati costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (A) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (B) analizzati al microscopio in fluorescenza. ....	51
<b>Figura 3.23:</b> Concentrazione (particelle /ml) in funzione del diametro (nm) di campioni liofilizzati e reidratati costituiti da liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG con lattosio (grafico di sinistra) e lattosio più mannitolo (grafico di destra) analizzati al Nanosight. ....	52
<b>Figura A.1:</b> Il grafico di sinistra mostra liposomi di DOPC estrusi mentre in quello di destra sono sia sonicati che estrusi. Entrambi ricavati alla DLS e mettono in relazione la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro. Il picco rosso mostra campioni in acqua e fisiologica (1:1) mentre il picco nero raffigura le soluzioni in acqua. ....	65
<b>Figura A.2 :</b> Il grafico di sinistra mostra liposomi di DOPC-DOTAP estrusi mentre in quello di destra sono sia sonicati che estrusi. Entrambi ricavati alla DLS e mettono in relazione la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro. Il picco rosso mostra campioni in acqua e fisiologica (1:1) mentre il picco nero raffigura le soluzioni in acqua. ....	65
<b>Figura A.3:</b> Il grafico di sinistra mostra liposomi di DOPC-DSPE-PEG estrusi mentre in quello di destra sono sia sonicati che estrusi. Entrambi ricavati alla DLS e mettono in relazione la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro. Il picco rosso mostra campioni in acqua e fisiologica (1:1) mentre il picco nero raffigura le soluzioni in acqua.....	66
<b>Figura A.4:</b> Mostra liposomi di DOPC analizzati al microscopio in fluorescenza in acqua e fisiologica (A); sonicati a 40kHz per 20 min (B) ed estrusi con un filtro da 0.2 $\mu$ m (C). . ....	66
<b>Figura A.5:</b> Mostra liposomi di DOPC-DSPE-PEG analizzati al microscopio in fluorescenza in acqua e fisiologica (A); sonicati a 40kHz per 20 min (B) ed estrusi con un filtro da 0.2 $\mu$ m (C). ....	66
<b>Figura A.6:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenti liposomi di DOPC-DOTAP sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	67
<b>Figura A.7:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	67
<b>Figura A.8:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenti liposomi di DOPC-DOTAP-cellobiosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	68

<b>Figura A.9:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-lattosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	68
<b>Figura A.10:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-mannitolo sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	69
<b>Figura A.11:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-mannitolo sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	69
<b>Figura A.12:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-glucosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	70
<b>Figura A.13:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-saccarosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	70
<b>Figura A.14:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	71
<b>Figura A.15:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	71
<b>Figura A.16:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	72
<b>Figura A.17:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	72
<b>Figura A.18:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	73
<b>Figura A.19:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce. ....	73
<b>Figura A.20:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce. ....	74
<b>Figura A.21:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce. ....	74
<b>Figura A.22:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce. ....	75
<b>Figura A.23:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce. ....	75

<b>Figura A.24:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce. ....	76
<b>Figura A.25:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce. ....	76
<b>Figura A.26:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce. ....	77
<b>Figura A.27:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	77
<b>Figura A.28:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di cellobiosio e tween80, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	78
<b>Figura A.29:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-trealosio-tween80 (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di trealosio e tween80, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	78
<b>Figura A.30:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e lattosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento. ....	79
<b>Figura A.31:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e mannitolo, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento lento. ....	79
<b>Figura A.32:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e glucosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento lento. ....	80
<b>Figura A.33:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e saccarosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e congelamento lento. ....	80
<b>Figura A.34:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce. ....	81
<b>Figura A.35:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e cellobiosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce. ....	81
<b>Figura A.36:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-	

PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e trealosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce. ....	82
<b>Figura A.37:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e lattosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce. ....	82
<b>Figura A.38:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e mannitolo, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce. ....	83
<b>Figura A.39:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e glucosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce. ....	83
<b>Figura A.40:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e saccarosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce. ....	84
<b>Figura A.41:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di cellobiosio. ....	84
<b>Figura A.42:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di cellobiosio. ....	85
<b>Figura A.43:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di lattosio. ....	85
<b>Figura A.44:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di lattosio. ....	86
<b>Figura A.45:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di saccarosio. ....	86
<b>Figura A.46:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di saccarosio. ....	87
<b>Figura A.47:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di glucosio. ....	87
<b>Figura A.48:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di glucosio. ....	88
<b>Figura A.49:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di trealosio. ....	88

<b>Figura A.50:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di trealosio. ....	89
<b>Figura A.51:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di mannitolo. ....	89
<b>Figura A.52:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di mannitolo. ....	90
<b>Figura A.53:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di cellobiosio e mannitolo. ....	90
<b>Figura A.54:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di lattosio e mannitolo. ....	91
<b>Figura A.55:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di trealosio e mannitolo. ....	91
<b>Figura A.56:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di saccarosio e mannitolo. ....	91
<b>Figura A.57:</b> Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di glucosio e mannitolo. ....	92
<b>Figura A.58:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra), sottoposti alla prima liofilizzazione. ....	94
<b>Figura A.59:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di cellobiosio, sottoposti alla prima liofilizzazione. ....	94
<b>Figura A.60:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di cellobiosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ....	95
<b>Figura A.61:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di trealosio, sottoposti alla prima liofilizzazione. ....	95
<b>Figura A.62:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di trealosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ....	96
<b>Figura A.63:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di lattosio, sottoposti alla prima liofilizzazione. ....	96
<b>Figura A.64:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di lattosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ....	97

<b>Figura A.65:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di glucosio, sottoposti alla prima liofilizzazione. ....	97
<b>Figura A.66:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di glucosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ....	98
<b>Figura A.67:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di saccarosio, sottoposti alla prima liofilizzazione. ....	98
<b>Figura A.68:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di saccarosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ....	99
<b>Figura A.69:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di mannitolo, sottoposti alla prima liofilizzazione. ....	99
<b>Figura A.70:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ....	100
<b>Figura A.71:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di cellobiosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ...	100
<b>Figura A.72:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di trealosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ....	101
<b>Figura A.73:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di lattosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ....	101
<b>Figura A.74:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di glucosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ....	102
<b>Figura A.75:</b> Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di saccarosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione. ...	102

## *Elenco delle tabelle*

<b>Tabella 2.1:</b> Specifiche standard del liofilizzatore Revo™ Series. Tabella tratta da Millrock [44], con modifiche. ....	26
<b>Tabella 3.1:</b> Potenziale zeta di campioni contenenti liposomi di DOPC, DOPC-DOTAP, DOPC-DSPE-PEG in due diversi disperdenti, estrusi o sonicati con successiva estrusione. ....	37
<b>Tabella 3.2:</b> Potenziali zeta misurati nel tempo dei campioni contenenti DOPC, DOPC-DOTAP, DOPC-DSPE-PEG, DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in acqua e fisiologica sonicati ed estrusi. ....	39
<b>Tabella 3.3:</b> Valori di potenziale zeta di campioni contenenti liposomi con DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG più 5%w/w di eccipienti, sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce e lento. ....	46
<b>Tabella 3.4:</b> Potenziale zeta di campioni sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento lento e veloce, contenenti liposomi costituiti da DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in presenza del 5%w/w di eccipiente e 0.01%w/w di tween 8. 0.....	49
<b>Tabella 3.5:</b> Temperatura eutettica per il mannitolo e di collasso per trealosio, saccarosio, glucosio, lattosio, cellobiosio, dispersi tutti in acqua e fisiologica 1:1 v/v. Temperatura eutettica del campione con solo acqua e fisiologica e di altri contenenti liposomi costituiti da DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG entrambi in acqua fisiologica. ....	50
<b>Tabella 3.6:</b> Picchi ricavati dai grafici del Nanosight. Evidenziano il diametro (nm) predominante nelle soluzioni della prima liofilizzazione contenenti liposomi con lipidi di DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG e in presenza di eccipienti come: cellobiosio, lattosio, glucosio, saccarosio, mannitolo e trealosio. ....	52
<b>Tabella 3.7:</b> Picchi ricavati dai grafici del Nanosight. Evidenziano il diametro (nm) predominante nelle soluzioni della seconda liofilizzazione contenenti liposomi con lipidi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG e in presenza di eccipienti come: cellobiosio, glucosio, saccarosio, mannitolo e trealosio. ....	53
<b>Tabella 3.8:</b> Valori di umidità residua nei campioni della prima liofilizzazione. ....	54
<b>Tabella 3.9:</b> Valori di umidità residua nei campioni della seconda liofilizzazione. ....	54
<b>Tabella 3.10:</b> Valori dei potenziali zeta dei campioni reidratati dopo la prima liofilizzazione, ricavato grazie allo Zetasizer. ....	55
<b>Tabella 3.11:</b> Valori dei potenziali zeta dei campioni reidratati dopo la seconda liofilizzazione, ricavato grazie allo Zetasizer. ....	56
<b>Tabella A.1:</b> Concentrazioni (particelle/ml) ricavate al Nanosight di liposomi liofilizzati alla prima liofilizzazione in presenza di eccipienti. ....	93
<b>Tabella A.2:</b> Concentrazioni (particelle/ml) ricavate al Nanosight di liposomi liofilizzati alla seconda liofilizzazione in presenza di eccipienti. ....	93

## *Elenco dei simboli*

$T_{cr}$	Temperatura critica, °C
$T_g$	Temperatura di transizione vetrosa, °C
$T_c$	Temperatura di collasso, °C
$T_{eu}$	Temperatura eutettica, °C
$T_m$	Temperatura di fusione, °C
$T_f$	Temperatura di transizione di fase, °C
$T_n$	Temperatura di nucleazione, °C
d	Diametro particellare, $\mu\text{m}$
%NUM	Percentuale numerica
P	Pressione, Pa
$\zeta P$	Potenziale Zeta, Mv
PEG	Glicole polietilenico
DOPC	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DOTAP	<i>1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt)</i>
DSPE-PEG	<i>1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N- - amino(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)</i>
BODIPY	<i>N-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3- -Propionyl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine</i>
DID	<i>1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
LDV	<i>Laser Doppler Velocimetria</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
DSC	Calorimetria differenziale a scansione
FDM	<i>Microscopio freeze-dry</i>

*Ai miei genitori e alle mie sorelle,  
per avermi sostenuto e supportato  
fino alla fine.*



## Capitolo 1

### Introduzione

#### 1.1 Il mondo della nanotecnologia

Negli ultimi anni un settore che ha riscosso un grande successo nella ricerca scientifica è la Nanotecnologia. Scienza che studia e controlla la materia con dimensioni comprese tra 1 e 100 nm [1]. Nel mondo nanometrico avvengono fenomeni in grado di conferire ai materiali proprietà chimiche, biologiche e fisiche completamente diverse da quelle della materia di base [1], come ad esempio l'elevatissimo rapporto area superficiale/volume da cui derivano fenomeni interfacciali e l'elevata loro reattività, rendendoli disponibili a moltissime applicazioni, in particolare nel campo della nanomedicina [2]. In questo settore sono già stati sviluppati con successo biosensori e nanomateriali per applicazioni utili in campo diagnostico, terapeutico e teranostico [2]

Nello specifico nella diagnostica si studia l'utilizzo di nanosistemi per la diagnosi precoce e per l'identificazione della predisposizione a determinate malattie grazie a sistemi fluorescenti o a sistemi magnetici che sfruttano poi tecniche di imaging, quali la Risonanza Magnetica per Immagini. [3]. In campo terapeutico invece, si utilizzano nanostrutture capaci di intrappolare, proteggere e trasportare farmaci all'interno del corpo ottenendo dei buoni risultati terapeutici con sistemi privi di effetti collaterali, mentre nella teranostica si cerca di sintetizzare sistemi nanostrutturati che possano accogliere al loro interno farmaci a scopo terapeutico e nanoparticelle a scopo diagnostico [1].

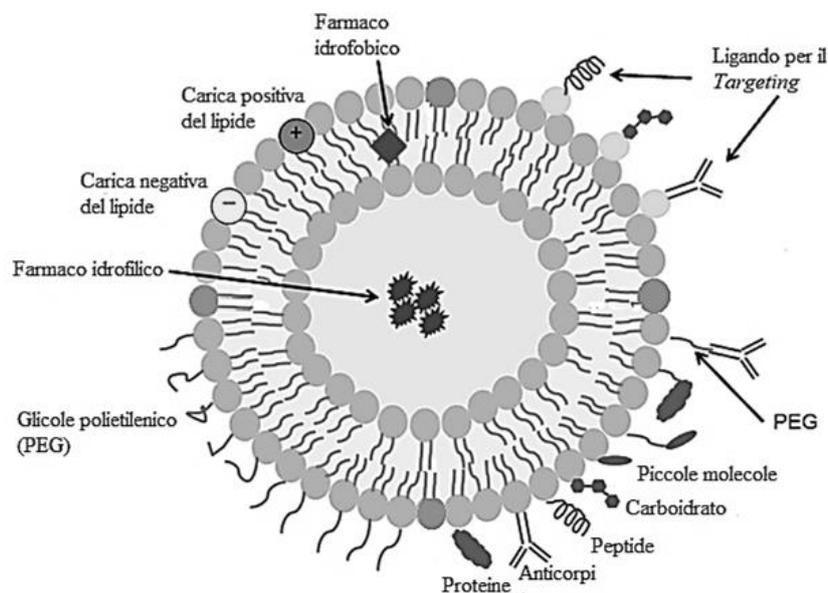
Le nanoparticelle polimeriche sono sistemi capaci di intrappolare farmaci e altri agenti per poi rilasciarli nel corpo. Esse sono definite come particelle solide colloidali con dimensioni comprese tra 1 e 1000 nm che possono essere usate terapeuticamente come trasportatori di farmaci e nelle quali il principio attivo può essere dissolto, intrappolato o incapsulato [4]. Le loro dimensioni e idrofilicità [4]. Devono possedere un ottimo *drug delivery*, ovvero il trasporto controllato al sito d'azione deve essere effettuato ad alta velocità e nel modo più efficiente possibile [2]. Questo non solo aumenta l'efficacia terapeutica, ma permette anche una riduzione della quantità di farmaco rilasciato in altri organi con conseguente riduzione degli effetti collaterali [1]. Per ottenere un buon dispositivo di *drug delivery* bisogna controllare ed ottimizzare il caricamento ed il rilascio del farmaco. Il primo si ottiene per incorporazione all'interno della nanoparticella, per legame covalente o elettrostatico, per adsorbimento sulla superficie di un dato principio farmaceutico, mentre, il rilascio nel corpo avviene per desorbimento dalla superficie, diffusione attraverso le nanoparticelle, erosione della matrice o per entrambi i fenomeni di diffusione ed erosione [4].

È importante valutare inoltre la biodistribuzione delle nanoparticelle una volta somministrati nel corpo, ovvero bisogna identificare organi e tessuti nei quali queste vengono a trovarsi dopo un dato tempo di attesa, questo perché le nanoparticelle devono rimanere abbastanza a lungo nel circolo ematico in modo da raggiungere l'organo di interesse, senza essere rimosse prima dai macrofagi, poiché riconosciute come agenti estranei dal sistema immunitario (processo di opsonizzazione) [3].

## 1.2 Ruolo dei liposomi nel mondo farmaceutico

Tra i nanosistemi polimerici più importanti si evidenziano i liposomi, sistemi biocompatibili e biodegradabili, con dimensioni che vanno da 30-40 nm fino a qualche micron. Sono vescicole costituite da un doppio strato fosfolipidico, contenenti un nucleo di soluzione acquosa [5], realizzati con polimeri naturali o sintetici. Contengono spesso anche altre sostanze come colesterolo, polimeri idrofili, cariche negative (fosfatidilserina) o positive (stearilamina) sulla membrana che aumentano lo spazio tra i doppi strati e quindi tramite repulsione elettrostatica, evitano il fenomeno di aggregazione dei liposomi [2]. Grazie alla coesistenza nei fosfolipidi di una testa polare e delle code lipofiliche costituite da acidi grassi, permettono ai farmaci idrofili di solubilizzarsi nella cavità acquosa, gli idrofobici trovano spazio nelle catene idrofobiche dei fosfolipidi e gli anfipatici si possono ripartire tra le due regioni del sistema, e verranno poi rilasciati sotto specifiche condizioni e stress [2]. La biodistribuzione può essere diversa se si lascia la nanoparticella tal quale (targeting passivo) o se la si funzionalizza sulla superficie con un agente di target (targeting attivo). Il targeting passivo sfrutta la tendenza naturale delle particelle ad accumularsi in alcune parti del corpo, in particolare nei tumori o nei tessuti infiammati che possiedono ipervascolarizzazione e scarso drenaggio linfatico [6]. Per evitare l'opsonizzazione molti studi hanno dimostrato che è possibile ricoprire i nanosistemi con il glicole polietilenico (PEG) ma in ogni caso il target passivo rimane poco efficace proprio a causa della sua non specificità verso i tessuti malati [6]. Il target attivo, invece, offre la possibilità di far legare le nanoparticelle solo a siti specifici delle cellule malate, in questo modo si massimizza la concentrazione di farmaco sul sito d'interesse e si riduce la distribuzione di esso in altre parti del corpo e, di conseguenza, gli effetti collaterali [7].

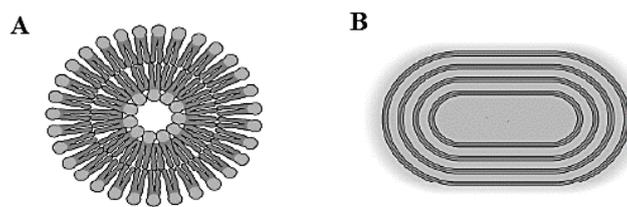
La struttura di un generico liposoma è mostrata in Figura 1.1.



**Figura 1.1:** I liposomi hanno un doppio strato costituito da lipidi cationici, anionici o neutri che racchiudono un nucleo acquoso. Sia il doppio strato lipidico che lo spazio acquoso possono incorporare composti idrofobici o idrofili. Le caratteristiche e il comportamento dei liposomi in vivo possono essere modificati mediante l'aggiunta di un rivestimento polimerico idrofilo, polietilenglicole (PEG), sulla superficie del liposoma per conferire stabilizzazione sterica; possono essere utilizzati come bersagli specifici attaccando ligandi (ad es. Anticorpi, peptidi e carboidrati) alla sua superficie o all'estremità terminale delle catene di PEG. Figura tratta da Sercombe [5], con modifiche.

I fosfolipidi utilizzati come detto in precedenza, possono essere sintetici o derivanti da tessuti di uova o bovini ma per applicazioni cliniche, nessuna di queste ultime fonti è adatta a causa di problemi di stabilità e possibilità di contaminazione virale o proteica. I prodotti di origine animale non offrono alcun vantaggio ai lipidi sintetici [7]. Anzi sono meno stabili a causa degli acidi grassi polinsaturi e, nella maggior parte dei casi, la controparte sintetica costa lo stesso o meno del prodotto derivato dai tessuti. I lipidi sintetici derivano da diverse fonti, ad esempio possono essere formulati a partire da glicerolo o glicero-3-fosfocolina prodotti a loro volta da fonti vegetali o animali [8].

I liposomi si formano perché i fosfolipidi dispersi in acqua, assumono spontaneamente una disposizione a doppio strato. Il doppio strato è solo uno dei tipi possibili di organizzazione delle molecole lipidiche, come le micelle [9]. Questo perché la testa polare e la coda lipofila dei lipidi possono occupare una porzione di spazio variabile, conferendo all'intera molecola una geometria di volta in volta diversa. Possono anche essere classificati sulla base delle dimensioni e della struttura fisica come le vescicole multilamellari grandi ( $> 0.5 \mu\text{m}$ ) disomogenee per dimensione con molti doppi strati o le unilamellari piccole ( $50\text{-}100 \mu\text{m}$ ) omogenee ma termodinamicamente instabili perché tendono ad aggregare [9], un esempio è riportato in Figura 1.2.



**Figura 1.2:** La vescicola A è unilamellare mentre la vescicola B è multilamellare.

Sono quindi di fondamentale importanza la composizione dei nanomateriali, le dimensioni delle particelle e la loro forma per migliorarne la loro biodistribuzione in vitro e in vivo e la capacità di consegna del farmaco [10].

Esistono diversi metodi di preparazione meccanici come la sonicazione, che si basa sull'applicazione di onde di pressione in acqua con frequenze intorno ai 20 KHz che permettono la rottura di agglomerati attraverso la cavitazione inerziale delle bolle di gas, formatesi nel liquido per la pressione acustica applicata [2]. Questo perché quando una bolla di gas viene esposta a un campo acustico alternato, si espande e si contrae in seguito alla pressione esterna ma quando la pressione acustica applicata è superiore alla soglia di cavitazione, l'oscillazione della bolla diventa instabile e collassa violentemente, generando onde d'urto e quindi una dispersione delle nanoparticelle [11]. L'estrusione, che avviene grazie alla pressione esercitata da un filtro con porosità specifica, ridimensiona i diametri dei liposomi. Vi sono anche tecniche basate sull'eliminazione o sostituzione di solventi organici con acqua (dialisi, cromatografia) [2].

L'uso di doppi strati e membrane lipidiche sintetiche e non, come mezzi di rivestimento consente la stabilizzazione di nanoparticelle in mezzi biologici e fluidi umani, questo grazie alla forte somiglianza alle membrane biologiche e l'incapsulamento all'interno di essi protegge i composti dall'inattivazione precoce, dalla degradazione e dalla diluizione nel percorso ematico [7]. I liposomi sono generalmente considerati farmacologicamente inattivi con una tossicità

minima, poiché tendono ad essere composti da fosfolipidi naturali. Esistono diversi farmaci chemioterapici, antinfiammatori, inibitori della trombina e anticoagulanti incapsulati nei liposomi [12], come il Vyxeos, il Marqibo, il Depocyt riconosciuti dalla Food and Drug Administration (FDA), ente governativo statunitense che si occupa della regolamentazione dei prodotti farmaceutici negli USA [2]. I liposomi possono essere impiegati anche per modificare la composizione lipidica delle membrane cellulari (terapia di sostituzione lipidica) e nel mondo della cosmesi [10].

Per la somministrazione di farmaci è importante ottenere preparati monodispersi per evitare effetti collaterali dovuti a fenomeni di aggregazione [6]. Tale fenomeno può essere ridotto attraverso una stabilizzazione elettrostatica ovvero creando una distribuzione di cariche nella soluzione oppure attraverso una repulsione sterica che può essere eseguita tramite l'aggiunta di polimeri. La loro dispersione in una soluzione acquosa può essere descritta usando la teoria di Deryagin, Landau, Verwey e Overbeek (DLVO) che tiene conto delle forze attrattive di Van der Waals e delle interazioni elettrostatiche; la somma di questi due contributi permette la valutazione del potenziale d'interazione tra le particelle [13]. Se le forze repulsive sono maggiori di quelle attrattive vi sarà una barriera energetica che impedirà alle particelle di aggregarsi e il sistema colloidale risulterà stabile sennò in caso contrario si verifica la flocculazione e il sistema colloidale non sarà stabile [14].

Solitamente, come discusso in precedenza, si utilizzando rivestimenti fatti di PEG per ridurre l'aggregazione, la fagocitosi e l'opsonizzazione delle nanoparticelle per migliorarne l'emivita nel sangue [5]. Esso può essere incorporato sulla superficie dei liposomi in diversi modi, ma il metodo più usato è quello di utilizzare un fosfolipide a cui è stato precedentemente legato il PEG, per esempio il *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-amino (polyethylene glycol) -2000 (ammonium salt)* (DSPE-PEG) [13]. È biocompatibile solubile in acqua e in miscele organiche ha scarsa tossicità [5]. La presenza del PEG sulla superficie dei liposomi, comporta una forte repulsione tra le membrane che può superare le forze attrattive di Van der Waals, stabilizzando le preparazioni prevenendone l'aggregazione [13]. Per quanto riguarda la captazione delle formulazioni da parte del sistema reticoloendoteliale, una possibile spiegazione a questa ridotta interazione con i componenti del plasma è l'impedimento sterico dato dalle molecole di PEG attaccate ai liposomi [7].

Il colesterolo è spesso utilizzato per via della sua struttura anfipatica che gli permette di introdursi in un doppio strato lipidico con l'OH orientato verso la fase acquosa ed il gruppo steroideo con la catena alchilica adiacente alle catene di acidi grassi dei fosfolipidi. Il gruppo idrossilico del colesterolo forma legami idrogeno con le teste polari dei fosfolipidi [15] e il gruppo steroideo si inserisce tra le catene degli acidi grassi dei fosfolipidi a livello dei primi dieci atomi di carbonio ed essendo relativamente rigido, ne riduce il movimento. D'altra parte, i restanti atomi di carbonio hanno più spazio per muoversi. A temperature superiori della temperatura di fusione l'effetto del colesterolo è un effetto condensante, cioè viene ridotta la mobilità del doppio strato, mentre a temperature inferiori l'effetto del colesterolo è fluidificante e impedisce ai fosfolipidi di interagire tra loro [15].

Il principale svantaggio dei liposomi è legato all'instabilità, poiché a causa della loro struttura sono particolarmente soggetti a subire degradazione ossidativa. Il caricamento del farmaco potrebbe comportare forti cambiamenti delle caratteristiche della distribuzione delle dimensioni delle particelle, del potenziale Zeta e modificare addirittura i lipidi. Fenomeni di gelificazione, aumento delle dimensioni delle particelle ed espulsione del farmaco sono i principali problemi di stabilità allo stoccaggio. La distribuzione delle dimensioni delle particelle è un problema chiave per l'iniezione a causa del pericolo di blocco capillare che

potrebbe provocare la morte per embolia [2]. Gli svantaggi includono anche basse capacità di carico del farmaco.

### *1.3 Tecniche di conservazione dei liposomi*

L'instabilità chimico-fisica dei liposomi in soluzione spesso ne limita il loro uso nelle applicazioni mediche. Poiché processi come denaturazione e aggregazione dei liposomi influenzano non solo le prestazioni in vivo dei sistemi di consegna liposomiale ma anche il comportamento alla conservazione [7]. Un esempio è la permeabilizzazione di membrana che porta ad una conseguente perdita di materiale incapsulato [7]. I prodotti lipidici contenenti catene idrocarburiche legate ad esteri sono sensibili all'idrolisi acida e basica, difatti una volta completato il processo di dimensionamento, le sospensioni lipidiche devono essere conservate il più vicino possibile a pH 7. Più è alta la temperatura di conservazione maggiore sarà la velocità di idrolisi, pertanto le sospensioni lipidiche devono essere mantenute refrigerate durante la conservazione ma un processo di congelamento potrebbe rompere le vescicole portando ad una riduzione del diametro [8]. L'uso di crioprotettori come saccarosio e trealosio può aumentare la stabilità all'idrolisi [8].

È perciò di primaria importanza elaborare condizioni adeguate per migliorare la stabilità di liposomi a lungo termine [5]. In considerazione di ciò, sono stati presi in esame il congelamento, il quenching e la liofilizzazione, ma tali procedure potrebbero influenzare fortemente la stabilità dei liposomi con due diversi meccanismi [8]. Da un lato, lo stress meccanico causato dalla formazione di cristalli di ghiaccio durante il congelamento può causare danni alle membrane liposomiali. D'altra parte, durante il congelamento, la disidratazione e il conseguente aumento della concentrazione del soluto potrebbe indurre una distruzione chimica dei liposomi. Un modo per rimediare a questi meccanismi degradanti consiste nell'utilizzare crio e lioprotettori, e nel controllo ottimale delle varie fasi di processo [16].

### *1.4 Liofilizzazione liposomi*

La liofilizzazione è un approccio promettente per garantire la stabilità a lungo termine dei liposomi, poiché quest'ultimi in soluzione acquosa sono instabili a causa di idrolisi e ossidazione, perdita di solidi incapsulati, formazione di aggregati, ecc. [16]. L'idrolisi o l'ossidazione dei fosfolipidi durante lo stoccaggio possono essere prevenute rimuovendo l'acqua dai liposomi mediante liofilizzazione. Tuttavia, l'interazione dell'acqua con i fosfolipidi svolge un ruolo chiave nella formazione dei liposomi e la sua rimozione crea ulteriori sfide [18].

Quando i liposomi vengono liofilizzati, i parametri a cui bisogna fare attenzione sono la velocità e la temperatura di congelamento, che influenzano la morfologia dei prodotti liofilizzati. L'integrità della membrana durante la liofilizzazione è fondamentale. Bisogna proteggere i doppi strati lipidici dai danni causati dai cristalli di ghiaccio durante il congelamento, dall'inibizione dell'aggregazione delle vescicole dopo la disidratazione e bisogna evitare la transizione di fase durante la reidratazione, prestando attenzione durante la ricostituzione del prodotto liofilizzato all'incorporazione di aria [15].

Il congelamento è la fase cardine che influenza maggiormente lo status delle nostre vescicole. Il congelamento veloce di solito produce cristalli fini che danneggiano poco i doppi strati lipidici e producono una struttura altamente ordinata, ma l'alta pressione osmotica prodotta dalla concentrazione della soluzione indotta dal congelamento può portare al restringimento o alla rottura del doppio strato lipidico. La formazione di ghiaccio all'interno della membrana è fatale per la vescicola quindi va assolutamente evitata [19]. Al contrario, un

congelamento lento crea cristalli grandi e quindi si viene a formare una struttura disordinata, dannosa per l'integrità della membrana, ma la formazione di cristalli di ghiaccio interni al liposoma è ridotta poiché le molecole d'acqua hanno il tempo di diffondere da dentro verso l'esterno; dato che la soluzione esterna diventa concentrata si producono meno vescicole situate all'interfaccia della zona amorfa-cristallina ma più vescicole nella matrice vetrosa e gli stress che influenzano i doppi strati lipidici si riducono [19]. Il decremento della quantità d'acqua residua nella matrice vetrosa porta ad una temperatura di transizione vetrosa più elevata.

I liposomi congelati senza alcun crioprotettore mostrano un significativo aumento del diametro medio combinato ad una diminuzione dell'omogeneità, contrassegnata da un notevole aumento del *size and polydispersity index* PDI dei liposomi ( $PDI > 0,7$ ). Questo comportamento è tipico della destabilizzazione delle particelle dovuta all'aggregazione di esse. I diametri medi delle particelle aumentano, probabilmente a causa della rottura del legame ad idrogeno tra le molecole d'acqua e i fosfolipidi [20].

L'*annealing* post-congelamento al di sopra della temperatura di transizione vetrosa può ridurre tale eterogeneità e aumentare la velocità di essiccamento primario. La velocità di essiccazione secondaria è controllata invece dai fenomeni di diffusione dell'acqua ed è accelerata da un aumento della temperatura dell'essiccamento secondario. Tuttavia, il surriscaldamento (come ad esempio riscaldamento sopra la temperatura di transizione vetrosa o altro) dovrebbe essere evitato, perché la torta residua ha perso la maggior parte della sua resistenza meccanica e diventa vulnerabile al collasso della struttura o alcune proteine termosensibili potrebbero anche perdere la loro attività [20].

#### *1.4.1 Cenni storici sul processo di liofilizzazione e sue applicazioni*

Negli ultimi decenni il processo di liofilizzazione è stato ampiamente utilizzato per la produzione di preparati farmaceutici. La liofilizzazione permette infatti di realizzare l'essiccamento di molecole molto sensibili alle alte temperature, come le proteine. Inibendo eventuali processi di denaturazione e migliorando la loro stabilità durante la fase di conservazione, fornendo anche una facile manipolazione durante la spedizione e lo stoccaggio [15].

Il termine liofilizzazione deriva da "liofilo", ossia affine al solvente, per la forte tendenza dei prodotti liofilizzati a reidratarsi. Le origini della liofilizzazione nascono nel periodo della Seconda Guerra mondiale per la conservazione di plasma umano e microrganismi. Fu inventato dai francesi Arsonval e Bordas, ricercatori presso il Collège de France. Purtroppo fino agli anni 60 gli elevati costi di processo ne hanno limitato la diffusione e solo successivamente grazie alla pubblicità legata ai cibi per astronauti (la liofilizzazione riduce significativamente il peso totale del cibo) e l'evoluzione della tecnologia ne hanno permesso la diffusione per diverse tipologie di prodotto [21].

Questo processo oltre ad essere applicato nel mondo farmaceutico, trova riscontri positivi anche nella progettazione di dispositivi diagnostici sensibili alla luce, all'ossigeno e alla temperatura, rendendo la liofilizzazione uno ottimo strumento per ridurre i rischi di conservazione a lungo termine in luoghi esposti alla luce, grazie alle porte opache della camera di liofilizzazione [22]. La liofilizzazione elimina la necessità di conservare e trasportare materiale congelato. Con materiali diagnostici liofilizzati, si ottengono alte velocità di ricostituzione e preparazione dei prodotti.

Questa tecnica è impiegata anche per la produzione di nutraceutici, ovvero nutrienti derivati da fonti organiche (piante o alimenti) usati per scopi medicinali o integratori alimentari. Oltre a preservare il prodotto originale rendendolo stabile per tempi lunghi di

conservazione, la liofilizzazione aumenta la sua concentrazione in modo che sia più efficace e mantenga i suoi nutrienti e sapori naturali. Un nutraceutico liofilizzato può essere prodotto in compresse o capsule per un facile dosaggio e per la conservazione, il trasporto e l'imballaggio [23].

Le nanoparticelle usate nell'industria farmaceutica come sistemi di rilascio dei farmaci presentano problemi di instabilità per lo stoccaggio a lungo termine e per la rimozione dell'acqua. Tali problematiche possono essere risolte mediante l'uso di questo processo [15].

La liofilizzazione è un'ottima soluzione per prodotti biotecnologici derivati da organismi viventi come enzimi o batteri che richiedono una metodologia di stabilizzazione per prolungare la durata di conservazione e consentirne il trasporto [23]. La liofilizzazione è una parte essenziale dell'industria biotecnologica perché la rimozione dell'acqua o dei solventi impedisce la degradazione e ne preserva le proteine.

La liofilizzazione è diventata un elemento cruciale nella produzione di molti ingredienti farmaceutici attivi (API), perché ne aumenta gli effetti, estende la sua durata e capacità di conservazione. A volte la liofilizzazione è una fase intermedia di ricerca e sviluppo, mentre altre volte è utilizzata per la produzione del prodotto finito [24].

Tra i prodotti biologici liofilizzati si ricordano le bio-impalcature di tessuti e il collagene, diventati una parte fondamentale di varie specialità mediche, la liofilizzazione in questo campo entra in gioco per stabilizzare il prodotto sottoposto a stoccaggio o a trasporto; dopo che la materia è stata raccolta da bovini, molluschi, suini, fonti ovine o umane. Qui l'essiccazione e il congelamento sono di fondamentale importanza e la liofilizzazione compie tutto questo senza degradare i tessuti e permette anche il controllo delle dimensioni dei pori del collagene [25].

Altre industrie che comunemente usano la liofilizzazione per la lavorazione dei prodotti fanno parte del settore: della cosmesi, di additivi per suolo, delle ceramiche, delle alghe.

#### *1.4.2 Le fasi del processo di liofilizzazione*

La liofilizzazione si compone di tre fasi successive: congelamento, essiccamento primario ed essiccamento secondario.

Durante la fase di congelamento, la soluzione è raffreddata dalla temperatura ambiente fino a  $-30/-50$  °C in modo da promuovere la separazione dell'acqua per cristallizzazione in ghiaccio e la completa solidificazione del soluto [26]. Le condizioni operative utilizzate per il congelamento determinano la dimensione media dei cristalli di ghiaccio e, quindi, dei pori che si formeranno in fase di essiccamento. Se ne deduce che questa fase è molto delicata, perché influenza le due fasi successive di essiccamento [26].

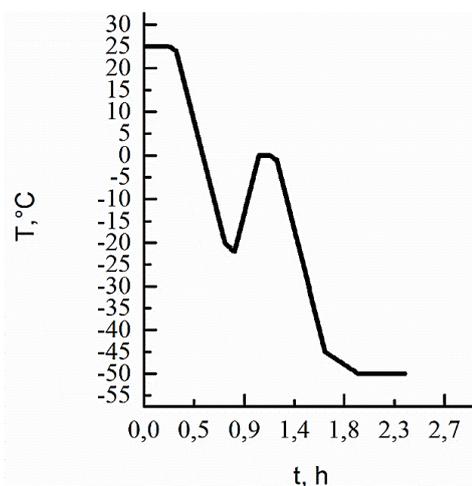
Nell'essiccamento primario o fase di sublimazione, il prodotto congelato è esposto a condizioni di alto vuoto, ad esempio 5-40 Pa, ed è riscaldato per conduzione o irraggiamento tramite piastre in acciaio a temperatura [27]. Queste condizioni favoriscono la sublimazione dell'acqua libera, frazione di acqua non legata al principio attivo o agli eccipienti [27]. Al termine dell'essiccamento primario il prodotto conterrà solo l'acqua legata al prodotto che, in genere, rappresenta il 5-10% in massa del prodotto secco [28]. Durante l'essiccamento primario, è possibile controllare due parametri, la temperatura del ripiano riscaldato e la pressione nella camera di essiccamento [28]. Questi parametri sono normalmente scelti in modo da massimizzare la velocità di sublimazione evitando, però, il surriscaldamento del prodotto che risulterebbe in un prodotto fuori specifica [28]. Se la temperatura del ripiano fosse troppo bassa, il calore trasferito al prodotto congelato potrebbe non essere sufficiente per consentire al

ghiaccio di sublimare [27]. Se invece fosse troppo elevato, la temperatura del prodotto potrebbe superare la temperatura di collasso e quindi il prodotto liofilizzato sarebbe fuori specifica.

Durante l'essiccamento secondario o fase di desorbimento si rimuove l'acqua residua "non congelata" fornendo ulteriore calore. Al termine dell'essiccamento secondario l'umidità residua è in genere minore al 3% [15]. La velocità dell'essiccamento secondario è determinata dalla morfologia del prodotto e dalla sua temperatura. La temperatura del ripiano è in genere impostata tra 25-60 ° C, a seconda di quanto la proteina attiva nel prodotto sia sensibile alla disidratazione. La temperatura è generalmente superiore alla temperatura di essiccamento primario e si consiglia di impostarla tra la temperatura di transizione vetrosa e la temperatura di collasso [15]. Per quanto riguarda la morfologia del prodotto essiccato, la sua superficie specifica dipende dalle condizioni di congelamento, il quale influenza la dimensione dei pori; più quest'ultimi sono grandi, più la superficie specifica sarà bassa e quindi minore sarà la velocità di desorbimento [15].

### 1.4.3 Il congelamento e le tecniche di controllo

Durante il congelamento, la soluzione è raffreddata da temperatura ambiente fino a circa -50°C. Un esempio di profilo termico per la fase di congelamento di una soluzione farmaceutica è mostrata in Figura 1.3.



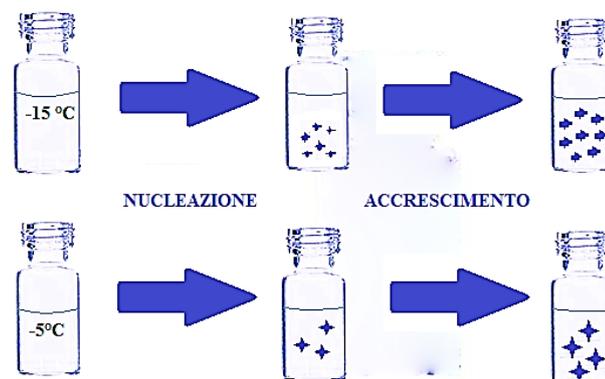
**Figura 1.3:** Esempio di evoluzione della temperatura del prodotto durante la fase di congelamento del processo di liofilizzazione.

Si osserva che la temperatura del liquido dapprima decresce fintantoché non si è raggiunto un certo grado di sottoraffreddamento, di circa 10-20°C, in corrispondenza del quale si ha la formazione dei primi nuclei stabili. Questo processo è esotermico e produce un incremento della temperatura del liquido, fino a quella di equilibrio termodinamico che, nel caso del ghiaccio, è 0°C [17]. Una volta che si sono formati i primi nuclei stabili, questi cresceranno formando cristalli via via più grandi fino al completamento della solidificazione [17]. Questa fase avviene a temperatura costante e la sua conclusione è segnalata dalla ripresa del raffreddamento del sistema. La fase di congelamento se non è ben controllata può portare alla

produzione di un lotto disuniforme in termini di morfologia del prodotto liofilizzato, umidità residua e tempo di ricostituzione della torta liofilizzata [17].

I parametri chiave del processo di congelamento sono tre. Il primo è la temperatura di nucleazione, variabile stocastica, in quanto dipende da fattori probabilistici e non deterministici. Di conseguenza è molto difficile da controllare ed è la temperatura alla quale si ha la formazione dei primi nuclei. Essa definisce la dimensione, numero e morfologia dei cristalli di ghiaccio formati durante congelamento [29]. Il secondo parametro è la velocità di raffreddamento che indica l'accrescimento dei germi cristallini nel tempo fino alla loro completa solidificazione e l'ultimo è il grado di sottoraffreddamento, definito come la differenza tra la temperatura di formazione del ghiaccio all'equilibrio e la temperatura effettiva in cui si formano i primi cristalli di ghiaccio [29].

La velocità di raffreddamento è importante perché se si diminuisce la temperatura rapidamente si ha la formazione di piccoli cristalli e questo comporta un inevitabile aumento del tempo di essiccamento primario ma riduce il tempo di essiccamento secondario. È importante anche a che temperatura si raffreddi perché per permettere la formazione dei cristalli di ghiaccio occorre sottoraffreddare il sistema, in quanto la nucleazione è un processo che richiede energia affinché i primi nuclei cristallini possano interagire tra loro, aggregarsi, per poi accrescersi [30]. Temperature di nucleazione più alte inducono la formazione di pochi e grandi cristalli di ghiaccio rispetto temperature più basse che portano alla formazione di tanti e piccoli nuclei cristallini [30], concetto descritto dalla Figura 1.4.



**Figura 1.4:** Soluzione sottoposta a diverse temperature di nucleazione. Basse temperature di nucleazione generano tanti cristalli piccoli mentre le alte temperature inducono pochi nuclei cristallini ad accrescersi. Figura tratta da Winter [30], con modifiche.

I tre principali fattori di stress che si verificano durante il congelamento e che influenzano la stabilità della proteina sono la denaturazione a freddo, la formazione di una interfaccia solido-liquido (acqua-ghiaccio) e l'aumento di concentrazione del soluto. La denaturazione a freddo è correlata alla diminuzione di temperatura sotto i 0°C ed è probabilmente dovuta ad un aumento della solubilità dei gruppi idrofobici in soluzione acquosa, che porta ad un dispiegamento della proteina e quindi alla conseguente perdita delle sue funzionalità [31]. La temperatura di denaturazione a freddo è influenzata dal pH della soluzione, dalla concentrazione della proteina e dalla presenza di additivi [31]. Tuttavia, tali temperature spesso sono al di sotto di quelle usate

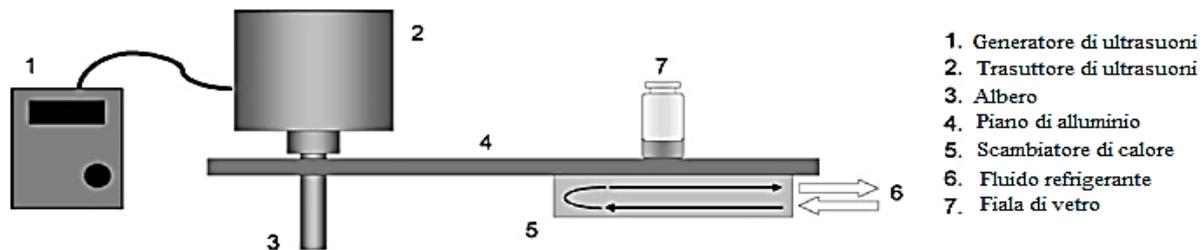
nella liofilizzazione quindi questo fenomeno di degradazione è spesso trascurato [31]. A gradi di sottoraffreddamento elevati avremo la formazione di piccoli cristalli e quindi grandi interfacce soluzione-ghiaccio, aumentando così la superficie di interfaccia solido-liquido con la quale le proteine possono interagire e incorrere in processi di denaturazione. Quando avviene il congelamento i soluti si concentrano e additivi come tamponi possono cristallizzare. La separazione di fase porterà ad un mutamento del pH e alla perdita dell'effetto stabilizzante dell'eccipiente [15]. Inoltre, le velocità di degradazione chimica aumentano con la concentrazione.

Sono stati sviluppati diversi metodi per il controllo della temperatura di nucleazione durante la fase di congelamento. Un primo metodo consiste nell'aggiunta di agenti nucleanti alla soluzione da congelare, i quali promuovono la formazione di nuclei stabili a temperature più elevate rispetto a quelle in cui la nucleazione si verifica spontaneamente. Tra gli agenti nucleanti più utilizzati si ricorda lo ioduro d'argento. Seppure questo metodo migliori l'uniformità del lotto di produzione, non permette un controllo preciso della temperatura di nucleazione e, quindi, della morfologia del prodotto finale. Inoltre, l'aggiunta di particelle estranee nella formulazione di partenza ne ostacola l'applicazione nell'ambito farmaceutico [17].

Un altro metodo che ha riscosso un certo interesse nell'industria farmaceutica prevede l'introduzione di un disturbo di pressione, da alte pressioni a basse. Ovvero una volta che i flaconi sono stati caricati, la camera di essiccamento viene pressurizzata con un gas e poi depressurizzata. Quest'ultima fase promuove il rilascio del gas assorbito che a sua volta agisce da sito eterogeneo per la nucleazione. Una sua variante prevede direttamente un disturbo a bassa pressione che favorisce l'evaporizzazione dell'acqua e l'entalpia associata all'evaporizzazione riduce a livello locale la temperatura sulla superficie dell'acqua, promuovendo la formazione di nuclei stabili sulla superficie della soluzione [17].

Esiste poi un'altra classe di metodi che permette di promuovere la nucleazione in tutti i flaconi del lotto ad una specifica temperatura e in un tempo ristretto. Uno di questi metodi è l'*ice fog* che prevede l'introduzione di un gas criogenico nella camera di essiccazione. Il gas freddo favorisce la nucleazione spontanea nel vapore acqueo, promuovendo anche la formazione di nubi che a contatto con la superficie superiore della soluzione da liofilizzare, iniziano la sua nucleazione. Si è però osservato che alcuni flaconi rimangono comunque esclusi, perché i cristalli di ghiaccio sospesi non riescono a raggiungere tutti i flaconi del lotto. Per ovviare a ciò, si depressurizza la camera di essiccazione a 66 mbar prima dell'introduzione del gas freddo [32].

Un metodo alternativo prevede l'impiego degli ultrasuoni. La probabilità di cambiamento di fase è direttamente proporzionale al numero di bolle formate dalla cavitazione acustica. Le apparecchiature di produzione sono ancora limitate dal fatto che la nucleazione del ghiaccio non avviene se i flaconcini sono collocati sui cosiddetti punti nodali, caratterizzati dalla più bassa intensità ultrasonica [32]. Un classico schema di tale impianto è riportato nella Figura 1.5.



**Figura 1.5:** Fase di congelamento con il sistema degli ultrasuoni proposto da Nakagawa. Figura tratta da Kasper [32], con modifiche.

O semplicemente i campioni vengono disposti su dei ripiani e la temperatura viene diminuita linearmente (modello rampa). Il tempo per la solidificazione completa in questo caso dipende dal volume di riempimento e i flaconi possono diventare soggetti a diversi gradi di sotto raffreddamento, ciò comporta una grande variabilità nella qualità del prodotto e nelle prestazioni del processo, solitamente si parte da temperatura ambiente ma per ottenere dei campioni più omogenei si può anche effettuare un preraffreddamento [32].

L'*annealing* viene effettuato tramite l'incremento di temperatura della soluzione crioconcentrata e mantenimento di tale temperatura ad un valore superiore a quello di transizione vetrosa ma inferiore a quello dell'eutettico. Questo incremento consente la crescita di cristalli più grandi a scapito di quelli più piccoli ed è fondamentale applicarlo quando i campioni sono congelati troppo velocemente e l'acqua capace di cristallizzare è bloccata come acqua amorfa nella matrice vetrosa [17].

Mentre il metodo del *Quench freezing* avviene per immersione di provette in azoto liquido o in liquidi incongelabili, abbastanza a lungo per una completa solidificazione. I flaconi poi vengono riposizionati su ripiani raffreddati o a temperatura ambiente. La temperatura è quindi diminuita velocemente provocando la formazione di piccoli cristalli di ghiaccio [17] [32].

### 1.5 Il problema della formulazione nel caso di un preparato liofilizzato

La stabilità del liposoma liofilizzato è determinata da molti fattori tecnologici, come i protocolli di liofilizzazione e il tipo di fiale. Un protocollo di liofilizzazione ben progettato non solo migliora la stabilità del liposoma, ma può anche aumentare l'efficienza del processo di fabbricazione. Nel processo di liofilizzazione dei liposomi il congelamento è un passo fondamentale che determina il processo di nucleazione del ghiaccio e determina la morfologia dei materiali congelati. Si possono osservare diversi problemi come la formazione di ghiaccio intracellulare fatale per la vescicola perché ne provoca la sua rottura, fenomeni di aggregazione, presenza di soluti che favoriscono una nucleazione eterogenea del ghiaccio e così via [15]. Una soluzione a questo problema è l'utilizzo di crioprotettori che riducono l'aggregazione delle vescicole e la concentrazione del soluto quando l'acqua cristallizza [18].

Gli zuccheri come i disaccaridi, tendono a proteggere le sostanze bioattive durante il processo di liofilizzazione perché interagiscono in modo positivo con i siti fosfati del doppio strato lipidico grazie a legami ad idrogeno e riescono a mantenere la struttura ordinata della membrana [18]. Questo può essere spiegato dalla teoria di Crowe [15], secondo la quale le molecole d'acqua vengono gradualmente sostituite con molecole di lioprotettore e le interazioni tra i lioprotettori e fosfolipidi sono tali da mantenere la spaziatura tra le teste lipidiche,

riducendo così le interazioni di Van der Waals tra le catene aciliche dei fosfolipidi allo stato secco ed evitando l'aggregazione delle vescicole [15]. L'altro meccanismo lioprotettivo è il modello di amorfizzazione, la soluzione zuccherina diventa un amorfo stabile che ingloba i liposomi durante il congelamento, riducendo la loro mobilità all'interno della soluzione. La matrice vetrosa ha alta viscosità e bassa mobilità, previene quindi l'aggregazione dei liposomi e protegge i doppi strati lipidici dai danni causati dai cristalli di ghiaccio. Si sviluppa anche un effetto osmotico correlato al numero di molecole e un effetto volumetrico legato alle dimensioni delle molecole. Questi due effetti riducono lo stress meccanico quando le membrane si aggregano, perché impediscono ogni stretto contatto tra doppi strati lipidici [20].

Le soluzioni contenenti liposomi sono caratterizzate da una temperatura di transizione di fase ( $T_f$ ), necessaria ad indurre un cambiamento di stato da ordinato (gel) a disordinato (liquido-cristallino). La fase di gel è caratterizzata da catene aciliche degli acidi grassi al massimo della loro estensione, formando dei doppi strati multi ordinati ed impacchettati mentre nella fase liquida-cristallina le molecole si muovono facilmente grazie all'energia acquisita, incrementando però la permeabilità di membrana [29]. Questo risulta essere un problema quando si reidratano i campioni, poiché, nella forma reidratata tendono a trovarsi nello stato liquido-cristallino ma nello stato disidratato ed a temperatura ambiente assumono lo stato ordinato, in quanto la  $T_f$  della membrana lipidica aumenta. Si ha un incremento della  $T_f$  perché bisogna fornire più energia per interrompere l'impacchettamento a causa del poco spazio tra i gruppi di testa delle catene lipidiche e al conseguente aumento dell'interazioni di Van der Waals. L'aggiunta di un lioprotettore può essere un'ottima soluzione, dal momento in cui riducono la  $T_f$  dei fosfolipidi al di sotto della temperatura ambiente ed intorno ad un valore di poco inferiore a quella della membrana lipidica idratata. In tal modo, i liposomi disidratati si trovano nello stato disordinato e la reidratazione non porta ad un cambiamento di fase, evitando così la fuoriuscita del soluto incapsulato [18].

Durante l'essiccamento primario può verificarsi il collasso della torta liofilizzata e questo accade se si supera la temperatura critica della formulazione, chiamata anche temperatura di collasso che presenta qualche grado in più della temperatura di transizione vetrosa per un amorfo o temperatura eutettica per sistemi cristallini [29]. Tale fenomeno compromette la qualità e l'eleganza del prodotto, con annesso incremento dell'umidità residua e dei tempi di ricostituzione della matrice liofilizzata. Un esempio di soluzioni liofilizzate è mostrato in Figura 1.6.



**Figura 1.6:** Il flacone A contenente liposomi di DOPC-DOTAP e trealosio possiede una struttura collassata, questo perchè si è superata la temperatura critica della soluzione durante l'essiccamento primario, mentre il flacone B contenente DOPC-DOTAP-DSPE-PEG e mannitolo presenta una torta integra.

Al fine di sviluppare un ciclo di liofilizzazione ottimale, un valore rappresentativo di massima temperatura alla quale il prodotto può essere sottoposto durante l'essiccamento primario è necessario [29].

Il contenuto di acqua residua ha anche una grande effetto sulla temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) del lioprotettore, più acqua resta più la  $T_g$  diminuisce. Se il contenuto d'acqua residuo è estremamente basso (meno del 10%) durante l'essiccamento delle proteine contenute nei liposomi possono essere rimosse dal guscio d'idratazione, portando alla perdita irreversibile della loro attività dopo la liofilizzazione [16]. Questo accade perché le proteine in una soluzione acquosa sono totalmente idratate, difatti presentano un monostrato di acqua che copre la loro superficie. Pertanto, una proteina idratata quando esposta a un ambiente povero di acqua durante la fase di essiccamento, tende a trasferire protoni a gruppi carbossilici ionizzati e rimuove quante più cariche possibili nella proteina [16]. La diminuzione della densità di carica può facilitare l'interazione idrofobica proteina-proteina, sviluppando una aggregazione proteica [33]. Un altro fattore da prendere in considerazione è che le molecole d'acqua possono essere parte integrante di siti attivi nelle proteine, e quindi non va assolutamente rimossa [33]. Infine, la disidratazione durante la liofilizzazione può causare una notevole differenza nella distribuzione di umidità residua all'interno di un prodotto, come conseguenza di ciò, nel medesimo flacone si presenteranno problematiche differenti [33].

### *1.5.1 Formulazione di una soluzione contenente liposomi*

L'utilizzo di eccipienti in soluzioni contenenti liposomi è fondamentale, sono sostanze diverse dal principio attivo, e devono svolgere diverse funzioni ad esempio devono aiutare la somministrazione del farmaco e la sua elaborazione, migliorare il sistema di consegna durante la sua fabbricazione, proteggere, supportare e aumentare la stabilità del principio attivo, incrementare la resistenza della torta liofilizzata evitando così la formazione di polveri, mitigare gli effetti deleteri dell'acqua residua, ridurre il grado di concentrazione del soluto a causa di un congelamento, aumentare anche la biodisponibilità o accettabilità da parte del paziente [15]. Vengono spesso aggiunte anche delle cariche solo per rendere più robusto il farmaco. Bisogna fare attenzione però che in determinate situazioni, gli eccipienti interagiscono con il principio attivo andando ad influire sulle sue modalità di disattivazione e ciò va assolutamente evitato [15].

Gli stabilizzatori utilizzati in un processo di liofilizzazione si suddividono in crioprotettori e lioprotettori, a seconda delle funzioni che svolgono. Essi devono garantire la protezione dei liposomi e dei principi attivi durante le fasi di congelamento ed essiccamento, devono mantenere una struttura amorfa durante l'intero processo in modo da assicurare la presenza di una matrice molto viscosa con bassa mobilità per ridurre fenomeni di aggregazione, non devono essere riducenti per evitare reazioni con il farmaco contenuto nel liposoma, devono garantire la struttura nativa del prodotto anche allo stato secco, devono assicurare una certa eleganza al prodotto finale dal punto di vista estetico e devono essere già stati approvati per scopi terapeutici [19]. Nello specifico, i crioprotettori all'interno di formulazioni prevengono le modifiche e le degradazioni di liposomi e proteine durante il congelamento [19]. Mentre i lioprotettori devono in qualche modo "sostituire" l'acqua che viene eliminata nel processo di liofilizzazione per evitare un dispiegamento proteico

Fino ad ora, amminoacidi, polialcoli e zuccheri come monosaccaridi, disaccaridi, polisaccaridi e saccaridi sintetici sono stati usati per tali scopi [15].

Un esempio di lioprotettore e crioprotettore è il trealosio, capace di rallentare la velocità di aggregazione liposomica e stabilizzare le strutture proteiche. In generale, aggiungere un quantitativo d'acqua ad una sostanza amorfa comporta l'aumento della sua mobilità, con conseguente diminuzione della sua  $T_g$  [34]. Nel caso del trealosio, tale fenomeno risulta molto più evidente se confrontato con quello del saccarosio o del maltosio [34]. Però la sua  $T_g$  non sarà mai più bassa della temperatura di conservazione del prodotto, che si aggira solitamente sui 37 ° C [34]. Il trealosio resta, comunque, il più usato in quanto disturba il legame dell'acqua più di qualsiasi altro zucchero. Inoltre, è in grado di ridurre la temperatura di congelamento delle soluzioni biologiche ad un valore inferiore rispetto a quello raggiunto dal maltosio e saccarosio. Si ipotizza che il trealosio si sostituisca all'acqua presente attorno alla biomolecola, riducendo la mobilità di quest'ultima, mantenendo la sua struttura tridimensionale e fornendo siti per la formazione di legami ad idrogeno [35]. Il saccarosio ha un comportamento molto simile al trealosio e può essere un'ottima alternativa economica [35].

Il glucosio potrebbe essere un efficace lioprotettore ma non fornisce alcuna protezione contro il congelamento. Ha una  $T_g$  relativamente bassa che gli impedisce di avere un effetto protettivo sufficientemente adeguato a garantire la stabilità dei liposomi [16]. Tuttavia, una combinazione di amido idrossietilico con il glucosio potrebbe raggiungere un compromesso accettabile, perché il glucosio produce una riduzione della  $T_f$  ed evita così la transizione di fase durante la reidratazione, mentre l'amido aumenta la  $T_g$  della matrice [16].

Per gli oligosaccaridi della famiglia raffinosa, l'effetto protettivo è progressivamente migliore con il crescere del grado di polimerizzazione, visto che con esso cresce anche il valore

della  $T_g$  [15]. Ci sono anche zuccheri sintetici con additivi (ad es. etilene glicole, glicole propilenico, glicerolo) che hanno un effetto protettivo simile a quello raggiunto con il trealosio [16].

I casi più difficili sono crioprotettori che mostrano una cristallizzazione parziale per l'appunto come il mannitolo, se il ghiaccio si scioglie è un problema perché potrebbe diluire la soluzione, portare ad un collasso meccanico e cambiamenti chimici (di solito deterioramento) del prodotto, può anche separarsi dalla soluzione congelata sotto forma di fase cristallina o addirittura cristallizzare all'interno della torta liofilizzata, il suo utilizzo per stabilizzare i liposomi è perciò fortemente sconsigliato [29].

I polimeri, invece, sono generalmente molto meno efficaci, probabilmente a causa del loro ingombro sterico che riduce le interazioni e la formazione di legami idrogeno con la proteina [15].

Nel mondo della liofilizzazione trovano impiego anche i tensioattivi, i quali sono ampiamente utilizzati all'interno delle formulazioni proteiche. Prevengono la perdita della struttura nativa della proteina a causa del suo adsorbimento sulle superfici di filtri, apparecchiature e contenitori, funge da chaperone per aiutare a ripiegare forme strutturalmente alterate e prevengono la formazione di aggregati liposomici, un esempio è il tween80 [34].

## 1.6 Scopo della tesi

Il primo obiettivo della ricerca sarà la sintesi e la caratterizzazione di liposomi contenenti lipidi di DOPC, DOTAP, DSPE-PEG in presenza di due diverse soluzioni disperdenti, per applicazioni farmaceutiche. Il protocollo standard di preparazione scelto permetterà di ottenere liposomi che rispondano alle caratteristiche richieste come proprietà dimensionali specifiche, omogeneità e stabilità dei campioni. Sarà poi effettuato un secondo studio dove soluzioni contenenti liposomi ed eccipienti verranno sottoposti a cicli di congelamento e scongelamento veloci e lenti al fine di trovare la formulazione con le caratteristiche necessarie per una liofilizzazione. Verranno poi stabiliti i parametri chiave per ottimizzare il processo di liofilizzazione come la *T-shelf*, la pressione in camera e la velocità di raffreddamento grazie ad una precedente analisi effettuata alla Calorimetria differenziale a scansione. La parte finale della Tesi si concentrerà sull'utilizzo del liofilizzatore *REVO*<sup>®</sup> dell'azienda americana *Millrock Technology*. I risultati sperimentali ottenuti, saranno analizzati con tecniche di caratterizzazione effettuate al *Dynamic Light Scattering*, al *Nanoparticle Tracking Analysis*, al microscopio in fluorescenza, mentre con la titolazione di Karl Fischer verrà estrapolata l'umidità residua dei campioni liofilizzati.

Nel Capitolo 1 si è discusso l'applicazione delle nanoparticelle nell'industria farmaceutica con le loro principali problematiche tra cui processi di conservazione come la liofilizzazione.

Nel Capitolo 2 si presentano i materiali e gli strumenti impiegati, esponendo in dettaglio le metodologie sperimentali adottate.

Nel Capitolo 3 della trattazione saranno presentati e discussi gli esiti delle analisi di laboratorio.

Nel Capitolo 4 si espongono le conclusioni a seguito dei risultati ottenuti.



## Capitolo 2

### Materiali e metodi

#### 2.1 Tecniche di caratterizzazione dei liposomi

Tutte le soluzioni sono state caratterizzate con tecniche specifiche per valutare i parametri chiave quali dimensione, polidispersità, concentrazione e stabilità nel tempo di soluzioni contenenti liposomi ed eccipienti. A questo scopo si sono usate varie tecniche analitiche che sono illustrate nel seguito.

##### 2.1.1 Dynamic Light Scattering (DLS)

La tecnica del *Dynamic Light Scattering* DLS è una tecnica non invasiva per i campioni, ormai affermata da anni, chiamata anche Photon Correlation Spectroscopy (PCS) o Quasi-Elastic Light Scattering (QELS), ed è usata per la stima della dimensione di nanoparticelle e colloidi tipicamente sub-micronici, per la misura del potenziale Zeta e del punto isoelettrico delle proteine [35].

##### 2.1.1.1 Dimensione delle nanoparticelle

Il diametro medio dei liposomi è determinato utilizzando la tecnica della DLS grazie allo strumento Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) dotato di laser a diodi da 4,5 mW come sorgente di luce operante a 670 nm. I fotoni delle particelle disperse vengono rilevati con un angolo di 173°. I risultati della dimensione delle particelle sono espressi in termini di distribuzione numerica del diametro delle particelle. La temperatura impostata per le prove è pari a 25°C. Il campione opportunamente diluito con acqua fisiologica (50% v/v) è stato inserito all'interno di cuvette ZEN0118 in vetro ottico (Malvern). Tre misurazioni indipendenti sono eseguite per ciascun campione.

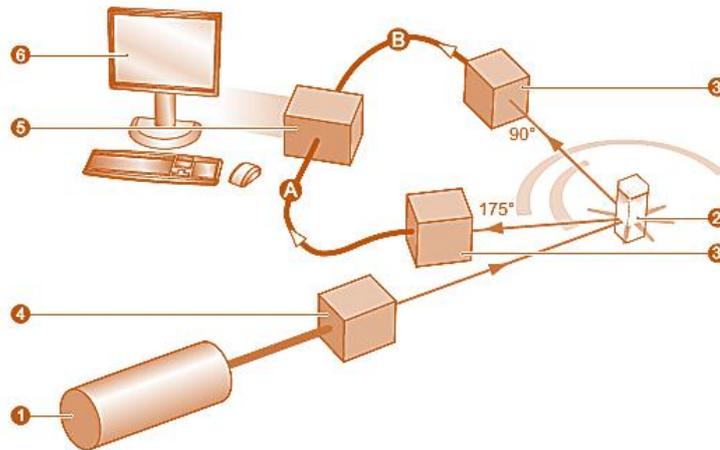
La DLS mette in relazione il moto browniano con la dimensione delle particelle illuminate da un laser, analizzando le fluttuazioni di intensità della loro luce diffusa. Si utilizza poi l'equazione di Stokes-Einstein (2.1), per correlare il coefficiente di diffusione traslazionale in diametro idrodinamico ( $d_H$ ) di una sfera [35]:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2.1)$$

dove  $k$  è la costante di Boltzmann,  $T$  la temperatura assoluta,  $\eta$  la viscosità,  $D$  il coefficiente di diffusione.

Lo strumento Nano Zetasizer misura la frequenza con cui l'intensità della luce diffusa emessa dalle particelle fluttua e la utilizza per calcolarne la loro dimensione, attraverso la funzione di correlazione tra il tasso di decadimento dell'intensità della luce diffusa (molto più veloce per le particelle piccole che per le particelle grandi) e le dimensioni delle particelle, utilizzando queste informazioni per calcolarne poi la distribuzione dimensionale. Un esempio di risultato fornito da questa tecnica è rappresentato da un grafico che riporta in ordinate l'intensità della luce diffusa e in ascisse una distribuzione dimensionale. Sebbene la distribuzione dimensionale generata dalla DLS sia una distribuzione d'intensità, questa può essere convertita, usando la teoria di Mie [35], in una distribuzione di volume che a sua volta può essere ulteriormente trasformata in una distribuzione numerica [35].

Un tipico sistema DLS è rappresentato in Figura 2.1 e comprende sei componenti principali: un laser fonte di luce che illumina il campione all'interno della cuvetta (2), il rivelatore (3) misura l'intensità della luce diffusa, posizionato a 175 ° e 90 °. L'intensità della luce diffusa deve essere all'interno di un intervallo specifico per essere rilevato e per questo viene utilizzato un l'attenuatore (4). Il segnale di intensità di scattering dal rivelatore passa ad un correlatore (5), che confronta l'intensità di scattering per ricavare la velocità con cui l'intensità varia. Le informazioni del correlatore vengono trasmesse a un computer (6), dove il software Malvern Zetasizer analizzerà i dati e ricaverà i risultati [35].

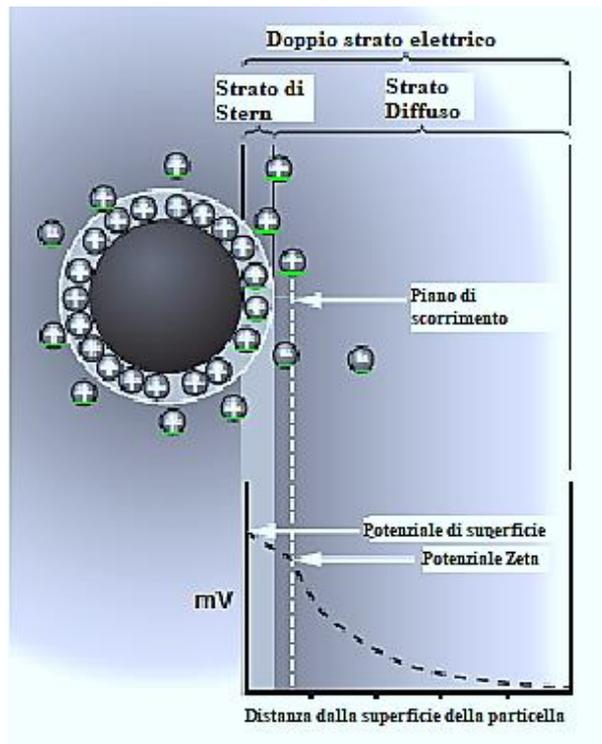


**Figura 2.1:** Schema di processo dello Zetasizer Nano - Size measurements. Figura tratta da Malvern [35], con modifiche.

### 2.1.1.2 Misura del Potenziale Zeta

Per il potenziale Zeta si è usa il medesimo strumento della DLS. I campioni opportunamente diluiti con acqua fisiologia (50% v/v) vengono inseriti all'interno di cuvette DTS1070 (Malvern). Quest'ultime sono dotate di due elettrodi funzionalizzati a produrre un campo elettrico che attraversa il campione e sono costituite da materiale monouso, in modo da eliminare i tipici problemi del *cross-contamination* delle celle ad elettrodi fissi. La temperatura impostata per le prove è pari a 25°C e si eseguono tre misurazioni indipendenti per ciascun campione.

Al Nano Zetasizer le misure del potenziale Zeta determinano il valore di mobilità elettroforetica e quindi viene applicata l'equazione di Henry. La mobilità elettroforetica si ottiene eseguendo un esperimento di elettroforesi sul campione e misurando la velocità delle particelle grazie all'utilizzo del Laser Doppler Velocimetria (LDV) [36]. Lo sviluppo di una carica netta sulla superficie delle particelle influenza la distribuzione di ioni nella regione d'interfaccia soluzione-particella, con conseguente aumento della concentrazione di ioni di carica opposta a quella della particella vicino la superficie come mostra la Figura 2.2.



**Figura 2.2:** Modello di un doppio strato elettrico all'interfaccia solido-liquido. Figura tratta da Malvern [35], con modifiche.

Lo strato liquido che circonda la particella ha una regione interna stazionaria e una regione esterna diffusa; nella prima gli ioni sono fortemente legati mentre nella seconda lo sono meno. Questo indica la presenza di un doppio strato elettrico attorno ad ogni particella. All'interno dello strato diffuso vi è una regione limite chiamata superficie di taglio idrodinamico dove gli ioni e le particelle formano un'entità stabile. Quando una particella si muove ad esempio a causa della gravità, gli ioni all'interno di tale regione si muovono con essa, ma qualsiasi ione che va oltre non viaggerà più con la particella. Il potenziale che si trova al confine della superficie di taglio idrodinamico è noto come potenziale Zeta [35].

Il valore del potenziale Zeta indica la stabilità o meno di un sistema colloidale. Se le particelle in sospensione hanno un elevato potenziale Zeta positivo o negativo, allora tendono a respingersi e hanno bassa tendenza a flocculare. Però, se le particelle hanno bassi valori di potenziale Zeta, non vi è alcuna forza per impedire alle particelle di unirsi. Di solito le particelle con potenziale Zeta più alto di + 30 mV o più basso di -30 mV sono normalmente considerati stabili. Se ci troviamo all'interno di tale intervallo le nostre particelle saranno instabili ovvero tenderanno a flocculare. Il valore del pH è importante perché influisce sul valore del potenziale difatti quest'ultimo sarà positivo a basso pH e negativo ad alto pH [36]. Al punto isoelettrico il sistema colloidale è meno stabile.

In conclusione, per il calcolo del potenziale Zeta viene applicato un campo elettrico alle cariche elettriche che si trovano sulla superficie e in queste condizioni mostreranno effetti elettrocinetici [35], ovvero le particelle cariche vengono sospese nell'elettrolita e sono attratte verso l'elettrodo di carica opposta mentre le forze viscose che agiscono sulle particelle tendono ad opporsi a questo movimento. Quando l'equilibrio è raggiunto tra queste due forze opposte, le particelle si muovono con velocità costante che dipenderà dalla viscosità, dalla costante

dielettrica, dal potenziale Zeta e dall'intensità del campo elettrico o gradiente di tensione. Per misurare questo campo elettrico, semplicemente si applica agli elettrodi di una cella un potenziale e le particelle cominceranno a muoversi verso l'elettrodo di carica opposta [36]. La loro velocità viene misurata grazie ad un Laser Doppler Velocimetry ed espressa in intensità di campo.

### *2.1.2 Microscopio in fluorescenza*

Grazie al microscopio in fluorescenza Nikon Eclipse TiE, si effettuano caratterizzazioni di tipo qualitativo. Microscopio ottico con sistema Perfect Focus (PFS) incorporato per la correzione automatica della messa a fuoco, controllo motorizzato dell'angolo di incidenza del laser, ampio spettro grazie alla sorgente Shutter Lambda XL e alla presenza di quattro filtri cubici. Il sistema acquisisce le immagini con una fotocamera ad alta risoluzione (4098x3264 pixel) e con quattro obiettivi (4, 20, 40, 60x), ottica DIC. Il sistema utilizza il software NIS-element.

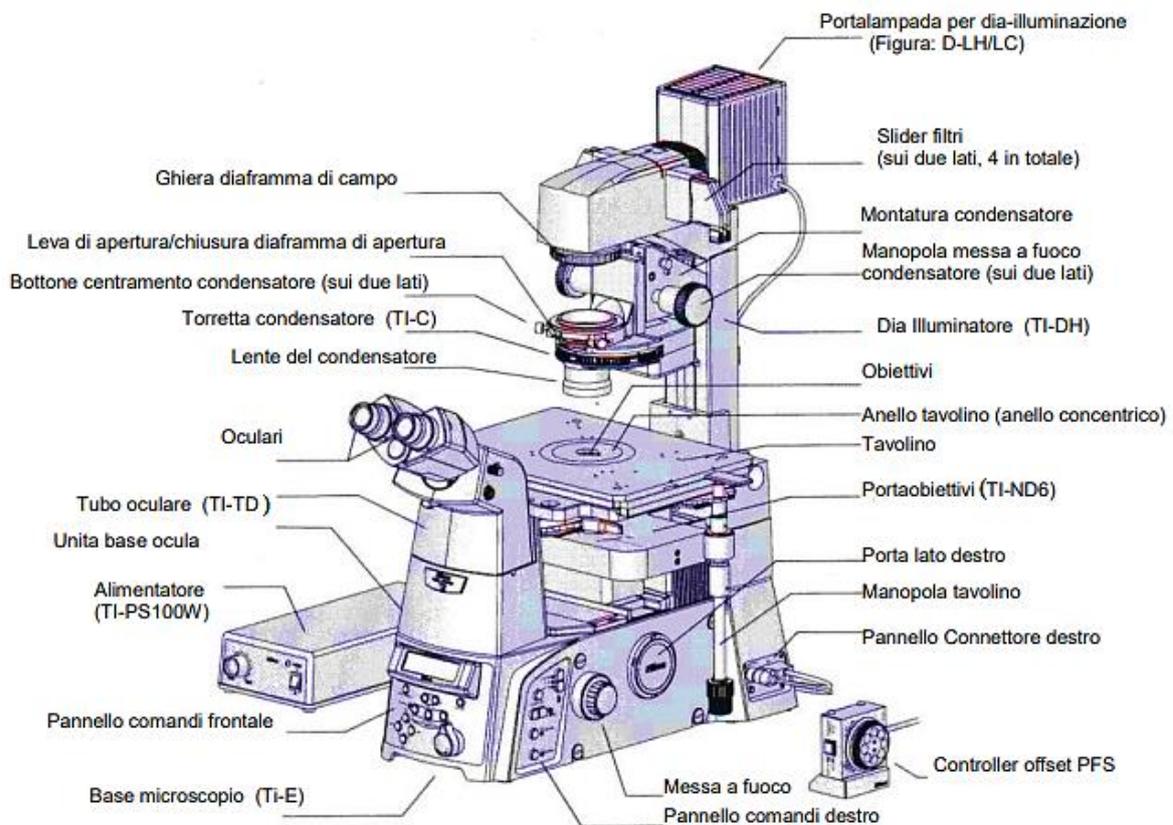
Per effettuare le prove si utilizza il colorante BODIPY pari al 2% v/w rispetto la massa totale dei lipidi, inserendolo all'inizio con ques'ultimi. Per via di esaurimento scorte, in sostituzione si adoperano anche il DID (diluito 1:100 con acqua bidistillata) aggiunto dopo la fase di estrusione in rapporto 0.25% v/v rispetto al volume totale finale della soluzione. Il campione poi va tenuto sotto agitazione termica a 37°C per 30 minuti con velocità 110 giri al minuto tramite l'utilizzo dell'Incubating Orbital Shaker della VWR.

La fluorescenza si basa sull'assorbimento e la successiva emissione della luce da parte di campioni organici e inorganici. L'emissione di luce attraverso il processo di fluorescenza persiste più a lungo della luce di eccitazione. Stokes dimostrò che la lunghezza d'onda della luce riflessa è più lunga di quella dell'eccitazione [37].

L'applicazione di fluorocromi o fluorofori (sonde), eccitati da specifiche lunghezze d'onda da parte della luce irradiante con successiva emissione di luce ad intensità definita, ha permesso di identificare cellule e componenti cellulari sub-microscopici con un alto grado di specificità in un mezzo composto da materiale non fluorescente. Spesso sono altamente specifici in quanto si legano con specifici siti e posseggono una resa quantica significativa (rapporto tra assorbimento di fotoni ed emissione) [37]. Il fluoroforo viene eccitato a lunghezze d'onda che variano in un intervallo ampio ma vicine al picco di emissione. Attraverso l'uso di diverse sonde si possono individuare nello stesso momento diverse molecole bersaglio.

L'efficienza con cui un fluoroforo assorbe un fotone da parte della luce di eccitazione è funzione della sezione molecolare e la probabilità di assorbimento è nota come coefficiente di estinzione. Coefficienti di estinzione più grandi indicano che è più probabile l'assorbimento di un fotone in una data regione di lunghezza d'onda [37]. La resa quantica è il rapporto tra il numero di fotoni emessi rispetto a quelli assorbiti. Valori di resa quantica inferiori a 1 sono il risultato della perdita di energia attraverso percorsi non radiativi, come il calore o una reazione fotochimica, piuttosto che il percorso di emissione dovuta a fluorescenza. Il coefficiente di estinzione, la resa quantica, l'intensità luminosa media della sorgente luminosa e la durata della fluorescenza sono tutti fattori importanti che contribuiscono all'intensità e all'utilità dell'emissione di fluorescenza [37].

In Figura 2.3 è riportato lo schema del microscopio in fluorescenza (Eclipse TiE, Nikon) che è stato utilizzato in questo lavoro di tesi.



**Figura 2.3:** Struttura del microscopio in fluorescenza Nikon Eclipse TiE. Figura tratta da Nikon [38], con modifiche.

Il microscopio consiste di una lampada che dirige la luce con una lunghezza d'onda specifica attraverso un filtro di eccitazione e si riflette tramite l'uso di una superficie specchiata o di un beamsplitter dicromatico o dicroico sull'obiettivo (che in questa configurazione funge da condensatore) del microscopio e che permette di dirigere la luce sul campione da analizzare. Se il campione è fluorescente, la luce di emissione raccolta dall'obiettivo ritorna attraverso lo specchio dicromatico e viene successivamente filtrata da un filtro barriera o di emissione, che blocca le lunghezze d'onda di eccitazione indesiderate. La luce emessa si irradia in tutte le direzioni, indipendentemente dalla direzione della sorgente luminosa di eccitazione. L'obiettivo (o illuminatore) del microscopio a fluorescenza serve dapprima come condensatore ben corretto e in secondo luogo come raccogliatore di luce che forma l'immagine. La maggior parte della luce di eccitazione che raggiunge il campione passa senza interazione e si allontana dall'obiettivo [37]. Più nello specifico la luce di eccitazione viaggia lungo l'illuminatore perpendicolare all'asse ottico del microscopio, passa attraverso le lenti del collettore e un diaframma ad apertura variabile e centrabile. La luce quindi colpisce il filtro di eccitazione in cui si verifica la selezione della banda desiderata e il blocco della lunghezza d'onda indesiderata. Le lunghezze d'onda selezionate, dopo aver attraversato il filtro di eccitazione, raggiungono lo specchio di suddivisione del fascio dicromatico, che è un filtro di interferenza specializzato a riflettere la luce di lunghezza d'onda più corta e a far passare la luce

di lunghezza d'onda più lunga. Il beamsplitter dicromatico è inclinato di un angolo di  $45^\circ$  rispetto la luce di eccitazione in entrata e riflette questa illuminazione con un angolo di  $90^\circ$  direttamente attraverso l'obiettivo e sul campione. L'emissione di fluorescenza prodotta dal campione illuminato viene raccolta dall'obiettivo, che ora svolge la sua consueta funzione di formazione dell'immagine. Poiché la luce emessa è costituita da lunghezze d'onda più lunghe rispetto all'illuminazione di eccitazione. Prima che la fluorescenza emessa possa raggiungere l'oculare o il rivelatore, deve prima passare attraverso la barriera o il filtro di soppressione che blocca qualsiasi luce di eccitazione residua e fa passa le lunghezze d'onda di emissione [39].

L'energia vibrazionale viene persa quando gli elettroni si rilassano dallo stato eccitato allo stato fondamentale e quindi lo spettro di emissione di un fluoroforo eccitato viene solitamente spostato su lunghezze d'onda più lunghe rispetto allo spettro di assorbimento questo perchè la lunghezza d'onda varia inversamente all'energia di radiazione, fenomeno noto come *Stokes's Law o Stokes's shift*. Con l'aumentare dei valori di tale fenomeno, diventa più facile separare l'eccitazione dalla luce di emissione attraverso l'uso di combinazioni di filtri [39].

Il moderno microscopio a fluorescenza combina la potenza dei componenti ottici ad alte prestazioni, il controllo computerizzato dello strumento e l'acquisizione di immagini digitali per raggiungere un livello di sofisticazione che supera di gran lunga quello della semplice osservazione da parte dell'occhio umano.

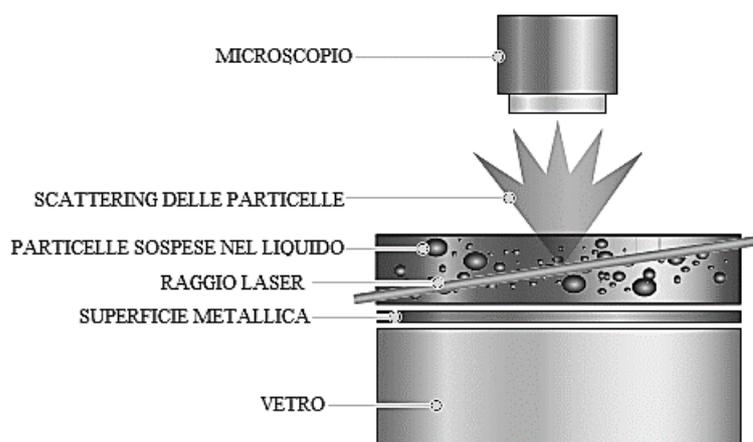
### 2.1.3 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

La tecnologia *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) caratterizza particelle con diametro 10-2000 nm ed è implementata sul NanoSight NS300 della Malvern con un laser da 532 nm (verde). Il metodo NTA analizza particella per particella e consente di ottenere sia la granulometria che la concentrazione delle particelle con una misura ad alta risoluzione, mentre l'osservazione visiva al microscopio fornisce una validazione unica dei dati. Si selezionano le impostazioni automatiche per la sfocatura. La soglia di rilevamento per tutti i campioni la si imposta su 10. Alla pompa di campionamento NanoSight stabilizzata su 0 (nessun flusso), gli viene dato un valore iniziale di 1000 per farle vincere le forze di attrito che si creano tra il pistone e il corpo della siringa, dopo 5 sec la si imposta su 50. La pompa è utilizzata in combinazione con siringhe da 1 ml. Vengono eseguite tre misure indipendenti per ciascun campione e i dati vengono analizzati dal software NTA 3.4.

La NTA Si tratta di un metodo che analizza particelle in sospensione, mettendo in relazione la velocità del moto browniano con la luce scatterata dalle molecole per trovare il loro diametro, la loro fluorescenza, l'intensità relativa emessa, la polidispersività e la concentrazione della soluzione. La velocità è legata alla dimensione, alla viscosità delle particelle e alla temperatura del liquido ma non è influenzata dalla densità particellare o dall'indice di rifrazione. Il diametro idrodinamico trovato è equivalente a quello di una sfera calcolato attraverso l'equazione di Stokes-Einstein [40].

Il campione contenente le particelle da analizzare tramite una siringa e ad una pompa che garantisce un flusso costante entra nel *flow cell* dove la soluzione è esposta ad un raggio laser. Le particelle diffondono la luce in tutte le direzioni e viene catturata mediante una fotocamera digitale per tracciare il movimento di ciascuna particella, fotogramma per fotogramma, grazie ad un software appositamente sviluppato [40]. La parte video costituisce la base dell'analisi, difatti è possibile un'accurata caratterizzazione di eventi in tempo reale come aggregazione e dissoluzione [40].

Il funzionamento è mostrato in Figura 2.4.



**Figura 2.4:** Schema del dispositivo di misura dello strumento NTA. Figura tratta da Chen [40], con modifiche.

L'intervallo di concentrazione di particelle che riesce a leggere va da  $10^6$  a  $10^9$  per ml, perché se sono troppo poche il software non riesce a fare uno studio di tipo statistico mentre se sono tante non riesce a rilevare particelle vicine. Il software ha anche un diametro limite di lettura tra i 10 e i 2000nm che dipende dal tipo di materiale, dalla sensibilità della fotocamera, dalla lunghezza d'onda e dalla potenza della fonte di illuminazione. Le particelle da analizzare si devono trovare in sospensioni liquide, precedentemente sonicate, estruse e miscelate nel vortex, per evitare la presenza di aggregati o particelle molto grandi a livello di diametro [40].

## 2.2 Caratterizzazione termica di soluzioni da liofilizzare

### 2.2.1 Calorimetria differenziale a scansione

La calorimetria differenziale a scansione (DSC) permette di osservare fenomeni come fusione, sublimazione, condensazione, congelamento, evaporazione, transizioni vetrose, reazioni chimiche endotermiche e esotermiche e di conoscere le loro cinetiche, capacità termiche, entalpie di transizione e le rispettive temperature [41].

Il principio di funzionamento consiste nel posizionare un portacampione vuoto (riferimento) in alluminio e un altro con una quantità nota del campione da analizzare, all'interno di una camera. Quest'ultima viene chiusa ermeticamente in modo da isolare l'ambiente di prova dall'esterno. Si inserisce il programma termico e viene creata un'atmosfera inerte con un flusso continuo di azoto. Una volta iniziata la prova, il calore ceduto riscalda sia il campione che il riferimento per raggiungere la medesima temperatura. Ogni variazione del flusso termico tra i due è dovuta a fenomeni che si sviluppano nel materiale da esaminare (come transizioni di fase). Il sistema di termocoppie posizionate sotto le basi dei due portacampioni, raccoglie i dati di temperatura e li invia ad un elaboratore che mediante un apposito software li elabora per generare i risultati finali [41].

Un esempio di risultato fornito da questa tecnica è rappresentato da un grafico che riporta in ordinate il flusso di calore e in ascisse la temperatura [41]. Nel caso di una transizione vetrosa mostra la presenza di un flesso, per una cristallizzazione una parabola con concavità

verso l'alto in quanto si ha una cessione di calore da parte del materiale e quindi il flusso di calore fornito diminuisce, mentre per una fusione si ha una parabola con concavità verso il basso, poiché l'agitazione delle molecole è tale da vincere le forze di coesione nei cristalliti, i quali si rompono assorbendo calore e il flusso di calore da fornire deve perciò aumentare [41].

Il comportamento termico dei campioni in questo studio è avvenuto grazie all'utilizzo del DSC Q200 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). I termogrammi sono ottenuti da campioni con le seguenti composizioni:

- acqua e fisiologica (50%v/v),
- liposomi con 70% DOPC, 30% DOTAP e 65% DOPC, 30% DOTAP, 5% DSPE-PEG percentuale riferita alla massa totale di lipidi, in acqua e fisiologica (50%v/v),
- eccipienti (glucosio, trealosio, saccarosio, mannitolo, cellobiosio, lattosio) in acqua e fisiologica (50%v/v) al 5%w/w.

E per ogni prova circa 10-20  $\mu$ l di soluzione sono prelevati, collocati in portacampioni sigillati ermeticamente con dei coperchi grazie all'utilizzo della Tzero PRESS (TA Instruments), equilibrati ad una temperatura di 25 °C, raffreddati con 1 °C / min fino a -60 °C, tenuta costante poi per 5 min e riscaldati ad una velocità di 2°C/min fino a 20°C.

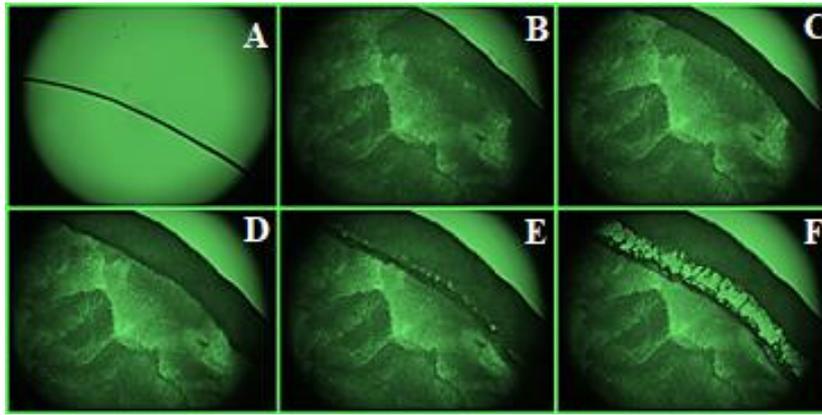
### 2.2.2 Crio-microscopio (FDM)

Il crio-microscopio è utilizzato per misurare la temperatura di collasso, tramite un primo congelamento con una rampa molto lenta (2-3 °C/min) a pressione atmosferica del prodotto in esame, attraverso l'utilizzo di azoto liquido aspirato dal dewar grazie ad una pompa. Segue un abbassamento di pressione (P=10 Pa, vuoto) tramite una pompa da vuoto e riscaldamento che permette l'essiccamento primario e secondario. Le immagini sono estrapolate grazie ad un sistema di lenti che ingrandisce l'immagine del campione, illuminato con un fascio di luce nel campo del visibile (dal vicino infrarosso all'ultravioletto).

Nel microscopio vengono riprodotte le stesse condizioni del liofilizzatore e questo tipo di studio è fondamentale, in quanto nel processo non bisogna mai avere una temperatura massima superiore alla temperatura critica ( $T_{cr}$ ) durante l'essiccamento primario, se non si vuole il crollo strutturale del prodotto. Quest'ultima dipende dalle caratteristiche termiche, se la soluzione è amorfa allora la  $T_{cr}$  corrisponde a qualche grado superiore della  $T_g$ , mentre per soluzioni cristalline corrisponde a qualche grado in più della temperatura eutettica [42].

Il crio-microscopico tramite una determinazione visiva durante il tempo di osservazione, consente di capire quando si ha il collasso della struttura grazie a cambiamenti strutturali, come buchi o fessure nella matrice secca adiacente all'interfaccia di sublimazione [43]. Questo viene visualizzato durante l'essiccamento primario poiché viene superata la temperatura di collasso.

Un classico esempio è riportato in Figura 2.5 dove viene mostrato il fronte di una goccia di campione sottoposto a congelamento ed essiccamento primario. Partendo dalla prima fase, il campione passa da liquido (A) a completamente congelato (B), viene poi applicata la seconda fase, che provoca lo sviluppo di un fronte di sublimazione (C-D), la temperatura aumenta e supera la  $T_{cr}$  e questo è osservabile grazie al collasso della matrice del campione, poiché, il soluto non riesce a mantenere la sua integrità strutturale dopo la rimozione del solvente (E-F).



**Figura 2.5:** In questa serie di immagini è mostrato il fronte di una goccia di campione sottoposta alla fase di congelamento ed essiccamento primario.

Per calcolare la temperatura critica dei campioni doveva essere utilizzato il crio-microscopio BX51 (Olympus Europa, Amburgo, Germania) con regolatore di temperatura PE95-T95 (Linkam, Scientific Instruments, Tadworth, Surrey, Regno Unito) ma a causa di un guasto non è stato possibile.

Va specificato che la temperatura di transizione vetrosa di un amorfo calcolata alla DSC è diversa dalla temperatura di collasso letta al crio-microscopio (di circa  $2-58^{\circ}\text{C}$ ).

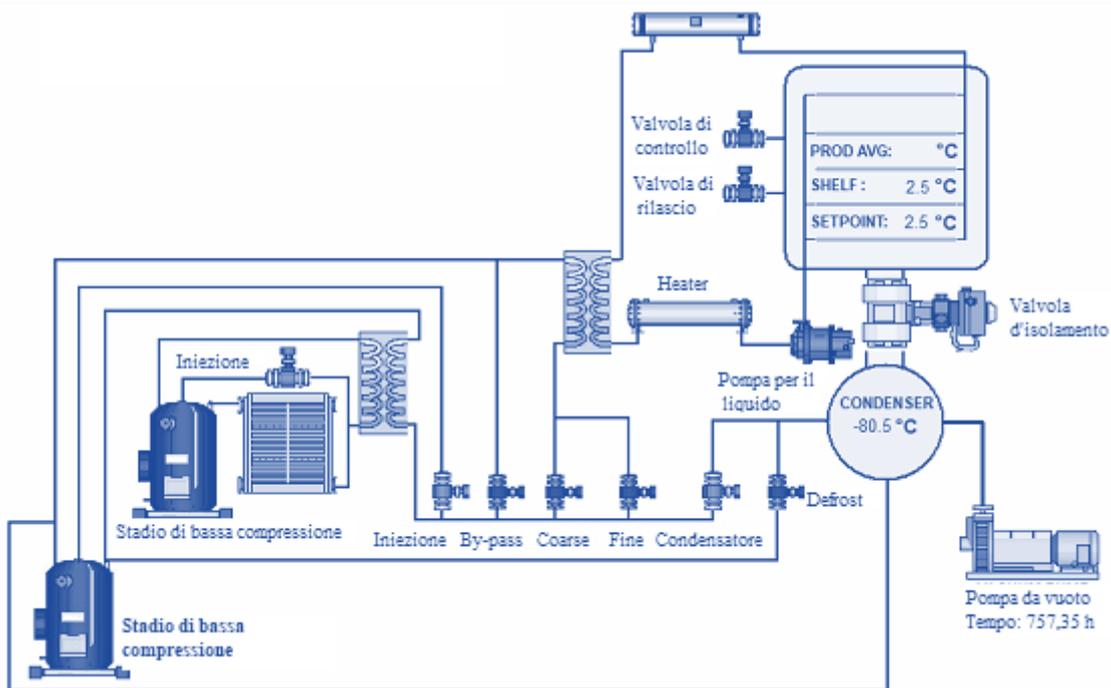
Perché alla DSC, la matrice amorfa è a diretto contatto con il ghiaccio e la misura della temperatura viene eseguita a pressione atmosferica senza una fase di essiccazione. È una temperatura di transizione vetrosa apparente, in quanto, il contenuto di acqua in contatto con il ghiaccio è pari ad un valore fisso. La transizione appare come uno spostamento endotermico dovuta alla diminuzione di viscosità da parte della matrice, in un piccolo intervallo di temperatura.

Al contrario, nel FDM il campione viene prima congelato, sotto pressione atmosferica, e a riscaldamento controllato per consentire la sublimazione del ghiaccio dalla matrice del campione. Si osserva nel tempo, un flusso viscoso nella regione secca adiacente al ghiaccio, quando il contenuto di acqua sta diminuendo [43]. Anche differenti velocità di riscaldamento, pregiudicano i valori della  $T_g$  e della  $T_{cr}$ , ecco perché la prima è inferiore alla seconda a basse velocità di riscaldamento.

### 2.3 Impianto di liofilizzazione

Questo studio è stato condotto utilizzando un impianto di liofilizzazione di scala pilota Figura 2.6. È costituito da una camera di liofilizzazione con cinque ripiani (di acciaio inossidabile 316L su tutte le parti a contatto con il fluido,  $0,304\text{ m} \times 0,608\text{ m}$ ) su cui sono disposti i flaconi, sotto di essa è posizionata una valvola di connessione collegata al collettore che mette in comunicazione la camera al condensatore (a bobina esposta per la massima efficienza, sbrinato con gas caldo). Il condensatore ha delle superfici molto fredde con temperature molto più basse di quelle nella camera, in quanto deve condensare il vapore prodotto dalla sublimazione. La pompa da vuoto collegata al condensatore ha il compito di rimuovere gli incondensabili [44]. L'impianto dispone inoltre di sistemi di raffreddamento o riscaldamento che servono a raffreddare i ripiani della camera e del condensatore, usando nello specifico un sistema di compressione *scroll* ad alta affidabilità dove il gas prima compresso viene fatto espandere

portando ad un abbassamento di temperatura del liquido che circola nei ripiani; tale fluido messo in circolo da una pompa, oltre che essere raffreddato, può essere riscaldato tramite uno scambiatore di calore ad esempio quando ci sono delle rampe di temperatura [44]. Di solito ci sono due stadi di compressione per garantire anche il raggiungimento di basse temperature, ad esempio  $-60^{\circ}\text{C}$ . I sensori di pressione presenti sono di tipo capacitivo (Baratron tipo 626A, MKS Instruments, Andover, MA, USA) che permette di misurare la pressione in camera tramite la deformazione di una membrana in metallo, esposta alla pressione di processo da un lato e alla pressione di riferimento dall'altro. Quando il diaframma subisce tale variazione, la capacità elettrica diminuisce proporzionalmente e questa può essere misurata elettricamente e poi messa in relazione con la pressione applicata. L'altro sensore è di tipo termo-conduttivo (Pirani tipo PSG- 101-S, Inficon, Bad Ragaz, Svizzera) poiché misura la conducibilità termica del gas [44].



**Figura 2.6:** Impianto del liofilizzatore REVO® (Millrock Technology, Kingston, USA). Figura tratta da Millrock [44], con modifiche.

Le specifiche dell'impianto di liofilizzazione REVO® (Millrock Technology, Kingston, USA), sono riportate in Tabella 2.1.

**Tabella 2.1:** Specifiche standard del liofilizzatore Revo™ Series. Tratto da Millrock [44], con modifiche.

Intervallo temperatura del ripieano	da -45°C;-70°C a +65 °C
Dimensione ripiano	0,304 m x 0,608 m
Portata vapore	6" standard
Temperatura condensatore	da -53°C a -85°C
volume condensatore	0,03 m <sup>3</sup>
Capacità del condensatore	0,02 m <sup>3</sup> in 24h
Compressori (Scroll)	25,742 kW (-53°C); 25,742 kW e 1,471 kW (-85°C)
Sensori di temperatura	termocoppie di tipo T
Portata della pompa da vuoto	22,5 $\frac{m^3}{h}$ , resistente alla corrosione
Controllo del vuoto	Pirani con elettrovalvola e valvola a spillo
Sistema di controllo	PC/PLC con software Opt-Dry
Dimensione cabinet (larghezza x profondità x altezza)	0,889 m x 1,168 m x 1,905 m
Consumo cabinet	230V/1ph/60Hz/30A

#### 2.4 Protocollo di produzione dei liposomi

Principalmente si sono utilizzate due formulazioni contenenti le seguenti percentuali riferite alla massa totale di lipidi:

- 70% DOPC, 30% DOTAP
- 65% DOPC, 30% DOTAP, 5% DSPE-PEG

I lipidi in cloroformio sono messi all'interno di flaconi di vetro e conservati sotto cappa a temperatura ambiente per un giorno intero, al fine di rimuovere il solvente. I liposomi vengono idrati con acqua e fisiologica (50% v/v) con raggiungimento di una concentrazione finale pari a 0.5 mg/ml. Miscelati per 1 min all'Advanced Vortex Mixer (VELP scientifica), sonicati per 20 min con una frequenza di 40 kHz (bagnetto di sonicazione Branson) ed estrusi grazie all'utilizzo di siringhe da 5 ml e un filtro in policarbonato con porosità di 0.2 µm. In modo da ridurre le dimensioni delle vescicole.

Per le soluzioni sottoposte a sette cicli di congelamento e scongelamento lento e veloce, contenenti liposomi con glucosio, lattosio, mannitolo, trealosio, saccarosio, cellobiosio presentano la medesima procedura di formulazione ma con una piccola differenza, ovvero che gli eccipienti vanno aggiunti dopo la reidratazione dei campioni e rappresentano il 5% w/w rispetto la massa totale della soluzione. Anche per i campioni contenenti il tween80 la preparazione è uguale, soltanto che va introdotto in quantità pari a 0.01% w/w dopo la fase finale di estrusione.

I campioni liofilizzati di liposomi in presenza di eccipienti, seguono le concentrazioni e la procedura applicata a quelli del *freeze and thawing* ma in più si aggiungono formulazioni contenenti il 4%w/w di eccipiente (glucosio, lattosio, cellobiosio, saccarosio, trealosio) più l'1% w/w di mannitolo.

#### 2.4.1 Materiali usati

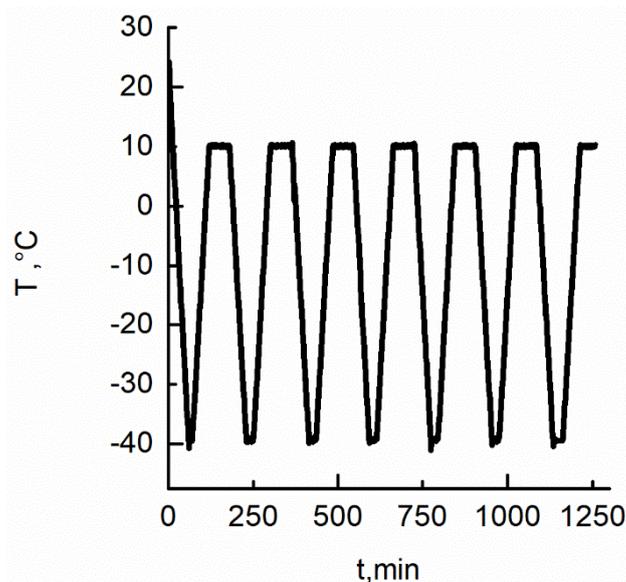
- *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* (DOPC), formula bruta  $C_{44}H_{84}NO_8P$ , massa molecolare 786.11, purezza > 99%,  $25 \frac{mg}{ml}$  in cloroformio, dell'Avanti Polar Lipds.
- *1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt)* (DOTAP), formula bruta  $C_{42}H_{80}NOCl$ , massa molecolare 698.54, purezza 99%,  $10 \frac{mg}{ml}$  in cloroformio, dell'Avanti Polar Lipds.
- *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)* (DSPE-PEG), formula bruta  $C_{132}H_{266}N_3O_{54}P$ , massa molecolare 2790.486, purezza >99%, dell'Avanti Polar Lipds.
- *N-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Propionyl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt*, (BODIPY FL DHPE), formula bruta  $C_{57}H_{102}BF_2N_4O_9P$ , massa molecolare 1067.23476, purezza >99%, della Molecular Probes.
- *1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine* (DID), formula bruta  $C_{67}H_{103}ClN_2O_3S$ , massa molecolare 1052.0753., purezza >99%, della della Molecular Probes.
- ZEN0118 Cuvetta monouso, minimo volume 50 $\mu$ L, adatta per tutti i sistemi che misurano le dimensioni che hanno uno scattering con angolo di 90 gradi. Può essere utilizzata con disperdenti acquosi. Utilizzata allo Zetasizer per il calcolo del *size* dei liposomi.
- DTS1070 Cuvette completamente usa e getta per la misurazione del potenziale Zeta con Zetasizer. Richiede la versione 7.02 o successiva del software Zetasizer.
- *D(+)-cellobosio*, formula bruta  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , massa molecolare 342,3, purezza 98%, dell'Acros Organics.
- *D(+)-trealosio diidrato*, formula bruta  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , massa molecolare 378.33, purezza 99%, della Sigma.
- Saccarosio, formula bruta  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , massa molecolare 342,30 purezza 99%, della Fluka.
- *D(-)-mannitolo*, formula bruta  $C_6H_{14}O_6$ , massa molecolare 182.17, purezza 98%, di Chem-Lab.
- Lattosio, formula bruta  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , massa molecolare 342.30, della Fluka.
- *D-(+)- glucosio*, purezza >99%, formula bruta  $C_6H_{12}O_6$ , massa molecolare 180.16, della Sigma-Aldrich.
- TWEEN<sup>®</sup> 80, formula bruta  $C_{64}H_{124}O_{26}$ , massa molare 1.310, purezza >99%, densità 1.06 g/ml a 25°C, della Sigma-Aldrich.
- Hydranal, formula bruta  $CH_4O$ , massa molecolare 32.04, purezza >99%, della Fluka.
- Siringhe soft-ject da 5 ml della Henke Sass Wolf.
- Aghi ad uso unico Fine-Jecy 0.8x50mm, della Henke Sass Wolf.
- Acrodisk 13 mm, minispikes con 0.2  $\mu$ m GHP della Pall Corporation.
- Vial di vetro da 1.5 ml, 32x11.6 mm, trasparente con filettatura sul collo della vial per chiusura tramite l'utilizzo di un tappo, della VWR.
- Tappo a vite pp nero, con diametro di 8mm e un buco al centro fatto di silicone bianco e con diametro 1.3mm della VWR.
- Flacons 4R, 16 x 45 mm, della Nuova Ompi glass division, Stevanato Group.
- Il sistema di chiusura del flacone è un tappo NovaPure Bromobutyl della West Pharmaceutical Services, con diametro interno pari a 13mm.
- Panni bianchi per pulire l'obiettivo del microscopio in fluorescenza, 11x21 cm della Kimberly-Clark-Profession.

- Tappi sterili(Aerosol Filter Pipet Tips) per le pipette di Pipetman e altre marche, con volumi, 100-1000  $\mu$ l, 1-100  $\mu$ l, 0.1-10  $\mu$ l della VWR.
- Vetrini coprioggetto 21x26 mm della VWR.
- Vetrini per microscopio con bordi smerigliati, della VWR.
- Immersion oil for microscopy, tipo A,  $n_d=1.515(23^\circ\text{C})$ , 8 cc., per il microscopio in fluorescenza della Nikon.
- Provette per criogenia, con base di appoggio, 2 ml, filettatura esterna e bordo di tenuta, della VWR.
- Guanti protettivi monouso in nitrile, AQL 1.5, della VWR.
- Etanolo con purezza allo 96° di Carlo Erba, con alcool metilico < 0.1%.
- Parafilm 10.16 x7620 cm, della Laboratory Film.
- Provette per Micro-centrifughe e alte forze con volume 1.5 ml, colore naturale della VWR.
- Provette da centrifuga con scala graduata stampata e tappo, volume 15 ml della VWR.
- Pipette da 100-1000  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 0.5-10  $\mu$ l, della VWR.
- Bilancia Pioneer<sup>®</sup> Analytical della Ohaus.
- Visiera Clearways supportato dall'elmetto della linea Clearways, D166 3 B, D230.1 3 B della Honeywell.
- Guanti Cryo-Gloves<sup>™</sup>, della Tempshield<sup>™</sup>, temperatura massima  $-196^\circ\text{C}$ , protezione termica elevata durante l'uso di congelatori a temperatura bassissima, aerorefrigeratori, ghiaccio secco e celle frigorifere; utilizzabili anche con gas naturale liquefatto.
- Coperchi Tzero hermetic Lid di alluminio della TA Instruments.
- Padellini Tzero di alluminio della TA Instruments.
- Siringhe da 1 ml della Terumo Syringe.

## 2.4.2 Pianificazione esperimenti

### 2.4.2.1 Scelta della formulazione

Per scegliere i lioprotettori che proteggono in modo più efficace le vescicole, si è pensato di sottoporre varie formulazioni a 7 cicli di congelamento e scongelamento lento. Le formulazioni contengono 6 diversi eccipienti (cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio) al 5% in peso e tween80 allo 0,01% w/w. Con una velocità di  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  la temperatura è stata diminuita da  $25^\circ\text{C}$  a  $-40^\circ\text{C}$  tenuta costante per 20 min, aumentata poi a  $10^\circ\text{C}$  e successivamente mantenuta per 60 min. Questo decremento e incremento di temperatura è stato effettuato per altre 6 volte, come mostra la Figura 2.7.



**Figura 2.7:** Temperatura in funzione del tempo applicata ai cicli di congelamento e scongelamento lento.

Tutto è stato realizzato grazie all'utilizzo di un liofilizzatore di processo, Revo™ series, Millrock Technology, Inc.

Le stesse formulazioni sono state usate per 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce. Le soluzioni all'interno di cryovials sono state inserite in un canister della Air Liquide ed il congelamento è avvenuto per immersione in azoto liquido utilizzando un dewar Voyageur 5 (Air Liquide, con capacità 6.5 l) per 5 minuti mentre lo scongelamento è stato effettuato a temperatura ambiente per 20 minuti.

I campioni sono stati poi analizzati per calcolare la dimensione delle vescicole, il potenziale Zeta ed è stata fatta anche un'analisi qualitativa al microscopio in fluorescenza.

Vengono effettuate dopo due liofilizzazioni, in cui nella prima le formulazioni scelte contengono liposomi con 70%w/w DOPC, 30%w/w DOTAP e 65%w/w DOPC, 30%w/w DOTAP, 5%w/w DSPE PEG con sei diversi eccipienti (cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio) aggiunti dopo la reidratazione al 5% w/w, mentre per la seconda, si sono replicate le medesime formulazioni ma con l'aggiunta di altre contenenti le stesse concentrazioni lipidiche ma con il 4%w/w (cellobiosio, lattosio, saccarosio, trealosio e glucosio) più l'1%w/w di mannitolo.

#### 2.4.2.4 Liofilizzazione di formulazioni contenenti liposomi

Per liofilizzare le soluzioni si utilizza il liofilizzatore REVO® (Millrock Technology, Kingston, USA).

I campioni contenenti le soluzioni da liofilizzare vengono semi-chiusi con l'apposito tappo forato che mette in comunicazione l'interno del flacone alla camera di liofilizzazione durante l'intero processo. Il caricamento dei flaconi nella camera di liofilizzazione avviene partendo dal lato sinistro del ripiano centrale e disponendole uno ad uno in modo da formare tanti esagoni, come mostra la Figura 2.8.



**Figura 2.8:** Disposizione fiale all'interno del liofilizzatore.

Per la prima liofilizzazione si effettua un congelamento (*shelf-ramped*) con una rampa da  $0.5 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$  fino a  $-45^{\circ}\text{C}$ , temperatura mantenuta per 120 min. Dopo si parte con l'essiccamento primario creando il vuoto a 10 Pa (scala Baratro), la temperatura del ripiano la si imposta a  $-10^{\circ}\text{C}$  (visto che il campione avrà una temperatura sui  $-30^{\circ}\text{C}$ ) per un tempo necessario a garantire il raggiungimento del medesimo valore di pressione per la sonda Pirani e il sensore Baratro. Questo perché appena la curva di pressione Pirani decresce nel tempo, indica che l'acqua nella camera sta diminuendo e quindi si può passare all'essiccamento secondario, impostando una rampa di  $0.25 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$  per arrivare da  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ , temperatura mantenuta poi per 3 h. Finita questa fase si rilascia il vuoto e si scarica la camera di liofilizzazione.

La seconda liofilizzazione differenzia dalla prima soltanto per la pressione con cui si fa il vuoto ridotta a 5 Pa (scala Baratro) e per la *T-shelf* impostata a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

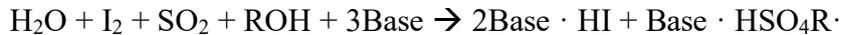
#### 2.4.2.5 Titolazione di Karl Fischer

Alla fine di entrambe le due liofilizzazioni, utilizzando lo strumento *Karl Fischer titrator* (CA-31 Moisture Meter, Mitsubishi Chemical Analytech), si misura l'umidità di tutti i campioni applicando la titolazione coulometrica di Karl Fischer. Hydranal è usato come solvente dei campioni contenenti lattosio, cellobosio, trealosio, glucosio mentre per quelli contenenti il mannitolo si adopera la formammide.

In linea teorica, la titolazione è un'analisi chimica che determina il contenuto di una sostanza, come l'acqua, aggiungendo un reagente di concentrazione nota in quantità accuratamente misurate fino al completamento di una reazione chimica [45]. Con il metodo coulometrico, il titolante viene generato elettrochimicamente e basta versare l'elettrolita

contenente ione ioduro, anidride solforosa (SO<sub>2</sub>), base e alcool (ROH) nella cella di titolazione per misurare l'umidità grazie alla produzione di iodio. Le reazioni che avvengono sono le seguenti [45]:

1) Reazione di Karl Fischer



L'acqua reagisce con lo iodio e l'anidride solforosa, in un elettrolita contenente una base ed un alcool (ROH).

2) Reazione coulometrica



Dalla soluzione elettrolitica (anodo) viene generato iodio da ioni iodio.

Nello specifico, lo iodio (I<sub>2</sub>) viene generato elettrochimicamente dallo ioduro (I<sup>-</sup>). Quando lo iodio (I<sub>2</sub>) viene a contatto con l'acqua nel campione, quest'ultima viene titolata secondo la reazione 1. Una volta che tutta l'acqua disponibile ha reagito, la reazione è completa [45].

La quantità di acqua nel campione viene perciò calcolata misurando la corrente necessaria per la generazione elettrochimica di iodio (I<sub>2</sub>) da ioduro (I<sup>-</sup>), reazione 2. Perché secondo la legge di Faraday, lo iodio generato è proporzionale alla quantità elettrica [45].

La percentuale di umidità è stata ricavata dalle seguenti equazioni (2.2) e (2.3):

$$g_{\text{H}_2\text{Ototali}} = \frac{E \cdot 10^{-6} \cdot (B + g_{\text{solido}})}{C} \quad (2.2)$$

$$\% \text{Umidità} = \frac{g_{\text{H}_2\text{Ototali}} \cdot 100}{g_{\text{solido}} - g_{\text{H}_2\text{Ototali}}} \quad (2.3)$$

Dove  $g_{\text{solido}}$  sono i grammi di campione da analizzare, B è la massa di solvente iniettata nel flacone, C è la massa di campione più quella del solvente iniettata nella cella di titolazione, E è la *moisture* letta sullo strumento.

## Capitolo 3

### Risultati

#### 3.1 Formulazione lipidica

L'utilizzo di formulazioni a base di liposomi aiuta a risolvere problemi di farmacocinetica cambiando la biodistribuzione del farmaco e favorendone l'interazione di quest'ultimo con cellule bersaglio.

Le proprietà fisico-chimiche dei liposomi, come la carica netta di superficie, l'idrofobicità e le dimensioni influenzano la loro stabilità e il tipo di proteine che si legano ad essi [52]. Uno dei maggior svantaggi del loro utilizzo è che una volta iniettati nel circolo sanguigno sono rapidamente captati dai macrofagi ed eliminati per fagocitosi o per lisi degli stessi (*Opsonizzazione*) [52]. Per ridurre il riconoscimento dei liposomi da parte del sistema reticolo endoteliale, sono stati presi in considerazione la modulazione delle loro dimensioni e della loro carica superficiale, nonché la presenza del polimero polietilen glicole (PEG), perché in generale i liposomi con dimensioni molto grandi sono eliminati dalla circolazione sanguigna più rapidamente rispetto a quelli piccoli [50]. È noto anche che le modifiche alle dimensioni sono strettamente correlate alla perdita di soluto incapsulato. Più grande è la variazione dimensionale, più il soluto incapsulato potrebbe fuoriuscire [6]. Questo perché le vescicole lipidiche grandi (diametro maggiore ai 200nm) sono suscettibili a danni sviluppati da forze meccaniche e osmotiche, e la mancanza di spazio tra i doppi strati non garantisce una distribuzione omogenea dei lipoprotettori [6]. Anche i liposomi con diametro al di sotto degli 80 nm hanno comunque delle perdite di principio attivo a causa di maggiori difetti di curvatura [6]. Diversi studi, a seguito di queste indagini, dimostrano che il diametro ottimale si aggira intorno ai 100 nm [15].

Per ottenere dei liposomi con tali dimensioni e adatti per le successive prove di conservazione, sono state esaminate diverse formulazioni lipidiche e differenti metodi di produzione delle particelle liposomiali.

Le composizioni prese in esame hanno le seguenti percentuali in massa:

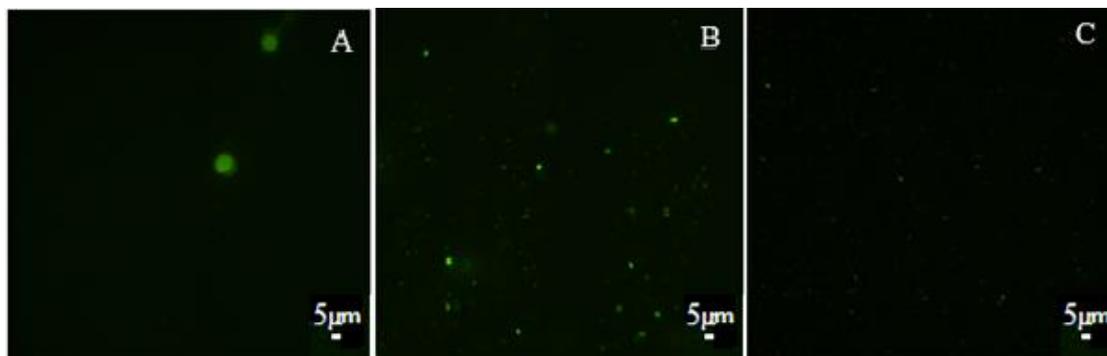
- 100%w/w DOPC;
- 70%w/w DOPC, 30%w/w DOTAP;
- 95%w/w DOPC, 5%w/w DSPE-PEG;
- 65%w/w DOPC, 30%w/w DOTAP, 5%w/w DSPE-PEG.

Mentre le corrispettive percentuali in moli sono le seguenti:

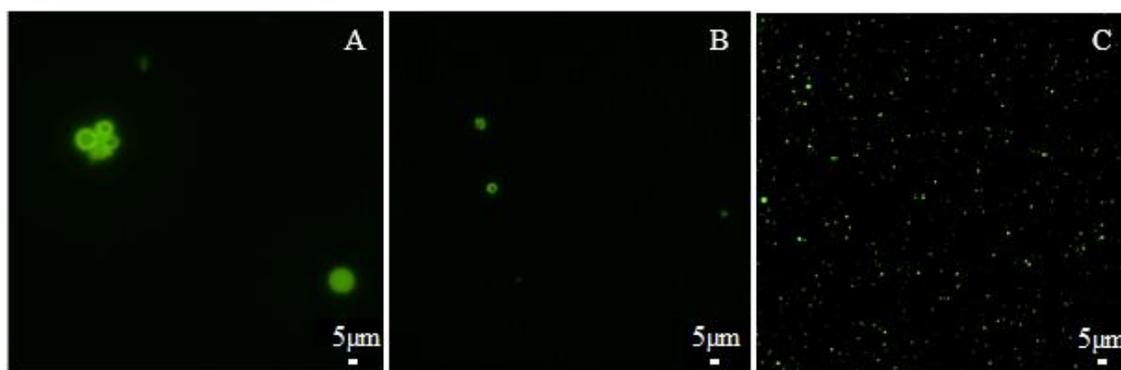
- 100%n/n DOPC;
- 67%n/n DOPC, 33%n/n DOTAP;
- 99%n/n DOPC, 1%n/n DSPE-PEG;
- 65%n/n DOPC, 34%n/n DOTAP, 1%n/n DSPE-PEG.

Inizialmente, i lipidi si trovano in cloroformio; dopo aver fatto evaporare il solvente, vengono risospesi in acqua oppure in acqua e fisiologica (rapporto volumico 1:1) tramite un vortex. I campioni vengono poi estrusi attraverso un filtro con porosità 0.2  $\mu\text{m}$  e, in alcuni casi, prima dell'estrusione sono sonicati per 20 min a 40 kHz [6]. Entrambi sono processi meccanici che permettono di ridurre le dimensioni delle vescicole [11].

La microscopia in fluorescenza evidenzia come il diametro delle vescicole viene ridotto nelle fasi di sonicazione e successiva estrusione come mostrato in Figura 3.1 e Figura 3.2.z in cui le vescicole con lipidi rispettivamente di DOCP-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG sono caratterizzate prima (Figure A) e dopo la sonicazione (Figure B) e dopo la fase finale di estrusione (Figure C), per i risultati delle altre composizioni vedere l'Appendice.

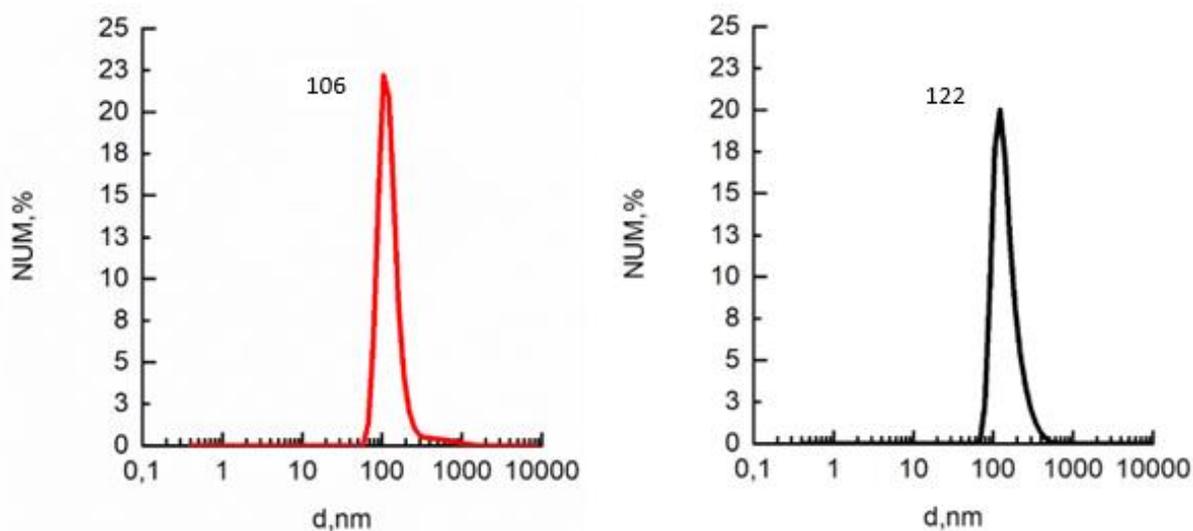


**Figura 3.1:** Liposomi con DOPC-DOTAP in acqua e fisiologica (A), sonicati a 40kHz per 20 min (B) ed in seguito estrusi con un filtro da 0.2  $\mu\text{m}$  (C).

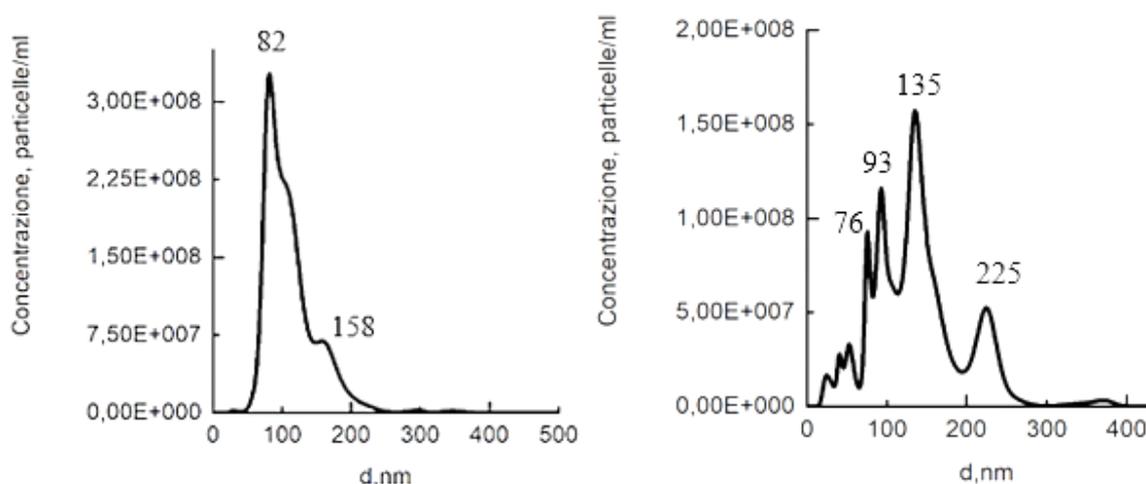


**Figura 3.2:** Liposomi con DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in acqua e fisiologica (A), sonicati a 40kHz per 20 min (B) e successivamente estrusi con un filtro da 0.2  $\mu\text{m}$  (C).

Le caratterizzazioni tramite DLS e NTA mostrano che le soluzioni contenenti DOPC, DOPC-DOTAP, DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in acqua e fisiologica sonicati ed estrusi presentano un diametro attorno ai 100 nm (Figura 3.3 e Figura 3.4); i risultati delle altre composizioni si trovano in Appendice.



**Figura 3.3:** DLS della percentuale numerica di particelle in funzione del diametro. Il picco rosso rappresenta la soluzione contenente DOPC-DOTAP, mentre il picco nero raffigura quella con DOPC-DOTAP-DSPE-PEG. Entrambi i campioni sono dispersi in H<sub>2</sub>O fisiologica, sonicati ed estrusi.



**Figura 3.4:** Dati ricavati al Nanosight che mostrano la concentrazione in funzione del diametro. Il picco di sinistra rappresenta la soluzione contenente liposomi di DOPC-DOTAP ( $1.88 \cdot 10^{10}$  particelle/ml) e il picco di destra il campione con liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG ( $1.24 \cdot 10^{10}$  particelle/ml). Entrambi sono dispersi in H<sub>2</sub>O e fisiologica, sonicati ed estrusi.

Il potenziale Zeta mostrato in Tabella 3.1 del campione con DOPC-DOTAP è pari a 31,9 mV, quindi i liposomi fra di loro tendono a respingersi grazie all'interazione fra le cariche del doppio strato elettrico situato sulla superficie mentre quello con DOPC-DOTAP-DSPE-PEG è 12.9 mV, un po' basso come valore difatti queste particelle se conservate per molto tempo tendono ad aggregare [36]. I liposomi con solo DOPC e DOPC-DSPE-PEG hanno un potenziale Zeta prossimo allo zero grazie al bilanciamento delle cariche [46].

**Tabella 3.1:** Potenziale Zeta di campioni contenenti liposomi di DOPC, DOPC-DOTAP, DOPC-DSPE-PEG in due diversi disperdenti, estrusi o sonicati con successiva estrusione.

<b>Liposomi estrusi</b>	<b>[mV]</b>	<b>Liposomi sonicati ed estrusi</b>	<b>[mV]</b>
<b>in H<sub>2</sub>O</b>		<b>in H<sub>2</sub>O</b>	
DOPC	1.32	DOPC	12.1
DOPC-DOTAP	52.7	DOPC-DOTAP	67.2
DOPC-DSPE-PEG	-5.49	DOPC-DSPE-PEG	-8.6
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	n. d.	DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	n. d.
<b>in H<sub>2</sub>O e fisiologica (1:1)</b>		<b>in H<sub>2</sub>O e fisiologica (1:1)</b>	
DOPC	0.348	DOPC H <sub>2</sub> O	0.68
DOPC-DOTAP	29.2	DOPC-DOTAP	31.9
DOPC-DSPE-PEG	-0.205	DOPC-DSPE-PEG	-0.867
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	n. d.	DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	12.9

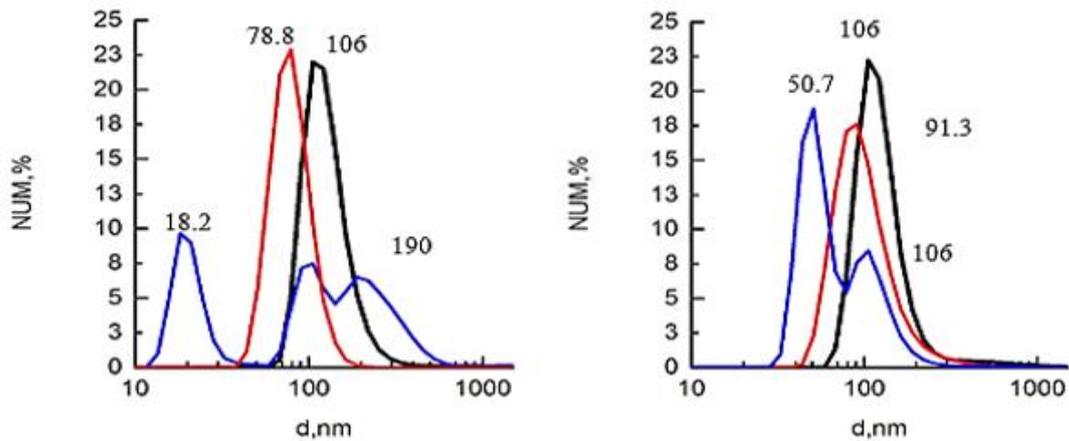
I liposomi PEGilati, mostrano maggiore stabilità, riducono l'opsonizzazione e quindi il tempo di circolazione del sangue delle vescicole aumenta [13]. Il meccanismo base chiamato targeting passivo sta nel fatto che un polimero idrofilico o un glicolipide come il polietilen glicole (PEG), possedendo una catena flessibile che occupa lo spazio adiacente alla superficie liposomiale, tende a ridurre lo spazio libero per altre molecole, per questo il legame delle opsonine nel plasma sulla superficie dei liposomi è impedita [50]. Viene così evitato il riconoscimento da parte del sistema reticolo endoteliale e l'eliminazione dei liposomi stessi dal circolo ematico [53]. Un altro beneficio garantito dal DSPE-PEG sta sempre nella sua catena idrocarburica voluminosa che fornisce un maggiore impedimento sterico in grado a sua volta di favorire un'alta curvatura della superficie liposomiale, la formazione di strutture micellari e la riduzione di fenomeni di aggregazione [46].

La presenza di cariche sulla superficie delle vescicole favorisce il riconoscimento e quindi l'eliminazione dei liposomi dal circolo sanguigno. Liposomi carichi negativamente hanno una breve emivita plasmatica rispetto ai liposomi neutri come il DOPC [54] mentre liposomi carichi positivamente (DOTAP) essendo tossici sono rimossi velocemente dalla circolazione. Una soluzione a quest'ultima problematica è quella di miscelare lipidi carichi con altri neutri (DOPC oppure DSPE-PEG) per attenuare questo aspetto [50].

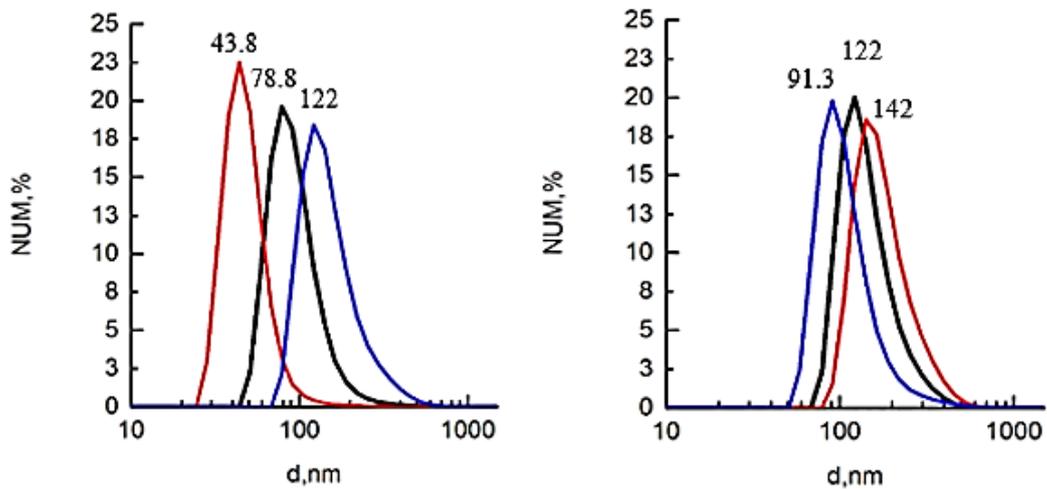
Campioni contenenti DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG sonicati e poi estrusi verranno perciò utilizzati per tutte le prove che seguono poiché permettono di ottenere un elevato numero di particelle con diametro sui 100 nm. Dove il DOPC darà struttura al liposoma [46], il DOTAP carico positivamente fornirà valori positivi al potenziale Zeta riducendo così i fenomeni di aggregazione grazie alla forza di repulsione fra le cariche, mentre il DSPE-PEG oltre ad aumentare l'emivita del liposoma darà un ingombro sterico che ridurrà ulteriormente fenomeni di fusione vescicolare.

### 3.1.1 Stabilità nel tempo

Per studiare la stabilità nel tempo delle quattro formulazioni di liposomi si sono confrontati le loro dimensioni e il potenziale Zeta acquisito tramite il DLS, effettuate subito dopo esser state preparate, dopo sette e quattordici giorni. I risultati sono mostrati nella Figura 3.5 e Figura 3.6.



**Figura 3.5:** Percentuale numerica in funzione del diametro, di soluzioni contenenti DOPC (grafico sinistro) e DOPC-DOTAP (grafico destro) in acqua e fisiologica (1:1) sonicate ed estruse, analizzate subito dopo esser state preparate (curva nera), dopo 7 giorni (curva rossa), dopo 14 giorni (curva blu).



**Figura 3.6:** Percentuale numerica in funzione del diametro, di soluzioni contenenti DOPC-DSPE-PEG (grafico sinistro) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro) in acqua e fisiologica (1:1) sonicate ed estruse, analizzate subito dopo esser state preparate (curva nera), dopo 7 giorni (curva rossa), dopo 14 giorni (curva blu).

Mentre i rispettivi potenziali Zeta sono riportati nella seguente Tabella 3.2.

**Tabella 3.2:** Potenziali zeta misurati nel tempo dei campioni contenenti DOPC, DOPC-DOTAP, DOPC-DSPE-PEG, DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in acqua e fisiologica sonicati ed estrusi.

<b>LIPOSOMI</b>	<b>[mV]</b>
<b>1 giorno</b>	
DOPC	0.68
DOPC-DOTAP	31.9
DOPC-DSPE-PEG	-0.867
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	12.9
<b>dopo 7 giorni</b>	
DOPC	-2.04
DOPC-DOTAP	21.2
DOPC-DSPE-PEG	-1.7
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	23
<b>dopo 14 giorni</b>	
DOPC	-1.73
DOPC-DOTAP	31
DOPC-DSPE-PEG	-0.784
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	27.8

Come si osserva dal primo grafico il meno stabile di tutti è il DOPC poiché col passare del tempo tende a frammentarsi e a creare vescicole più piccole. Il suo potenziale è intorno allo zero perché questo lipide ha cariche che si bilanciano fra di loro ma nel tempo tende ad essere negativo, questo perché si ha un progressivo orientamento delle teste polari dei fosfolipidi e le cariche negative possono disporsi verso la superficie esterna del liposoma [55].

Il DOPC-DOTAP nel tempo tende a formare liposomi più piccoli. Questo è provocato dal DOTAP carico positivamente che crea una forza di repulsione interna ma allo stesso tempo aumenta il valore positivo del potenziale Zeta, che resta circa costante nel tempo e, quindi, la probabilità di avere fenomeni di aggregazione rispetto al campione con solo DOPC è più bassa [55]. Il diametro medio delle vescicole nel tempo diminuisce ma resta sempre intorno ai 100nm.

Il DOPC-DSPE-PEG ha un comportamento mutevole, dato che dopo 7 giorni il diametro aumenta mentre dopo 14 giorni è più piccolo di quello che si ha subito dopo esser stato preparato. Tutto questo dipende da come l'ingombro del DSPE-PEG si dispone all'interno del liposoma e, quindi, ciò influenza la sua capacità di ridurre l'aggregazione dei liposomi [46]. Il potenziale rimane prossimo allo zero, quindi molto probabilmente l'assenza di repulsione fra le cariche tende ad aumentare il fenomeno di fusione, ma questo aspetto è meno influente rispetto all'azione di ingombro provocato dalla catena del DSPE-PEG.

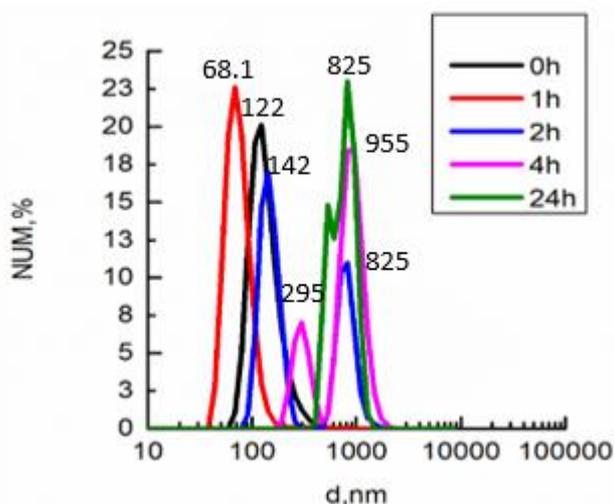
Infine, i liposomi costituiti da DOPC-DOTAP-DSPE-PEG hanno un diametro che nel tempo rimane stabile ai 100 nm; questo grazie all'ingombro sterico provocato dal DSPE-PEG e alla repulsione esercitata dalle cariche del DOTAP [46]. Il potenziale Zeta positivo è dovuto alla presenza del DOTAP che incrementa nel tempo. Ne deriva che il fenomeno di aggregazione nel tempo è ridotto.

### 3.2 Comportamento dei liposomi in presenza di colesterolo

Il colesterolo contribuisce alla formazione di strutture lipidiche stabili in vitro e in vivo, rendendole omogenee, aumentando la coesione dei lipidi e il tempo di circolazione [15].

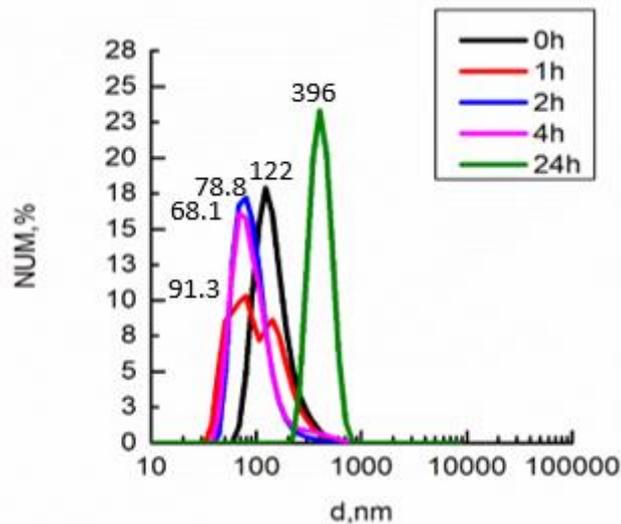
Nei liposomi i fosfolipidi a catena lunga sviluppano difetti di impaccamento ed espongono i domini idrofobici sulla superficie del doppio strato che aumentano il contatto tra proteine e catene aciliche [47]. Al contrario, i doppi strati con il colesterolo rendono le superfici delle vescicole lisce senza tanti difetti strutturali riducendo così le interazioni con le proteine e diminuendo l'adsorbimento delle proteine sulla superficie [47]. La presenza di colesterolo aumenta l'ordine dei lipidi e la fluidità dei doppi strati fosfolipidici, modificando sia l'idratazione che le interazioni steriche tra le membrane [48]. Il colesterolo sembra fornire protezione contro gli effetti biofisici deleteri di piccole molecole di solvente, che interagiscono con i doppi strati lipidici in fase gel, in particolare l'interdigitazione indotta dall'etanolo [48].

Sono state perciò effettuate delle prove con diversi rapporti molari di colesterolo, per analizzare le eventuali mutazioni strutturali e la stabilità nel tempo dei liposomi così ottenuti. Lo studio è stato condotto su una sola formulazione lipidica, il DOPC-DOTAP in acqua e fisiologica, con l'aggiunta di diversi rapporti molari di colesterolo, in particolare il 70:30, 80:20 e 90:10. I valori dei diametri dei campioni sono stati ricavati grazie all'utilizzo della DLS dopo un tempo pari a: 0h, 1h, 2h, 4h e 24h dalla preparazione dei campioni. I risultati dimensionali acquisiti sono mostrati nelle Figure da 3.7 a 3.9.



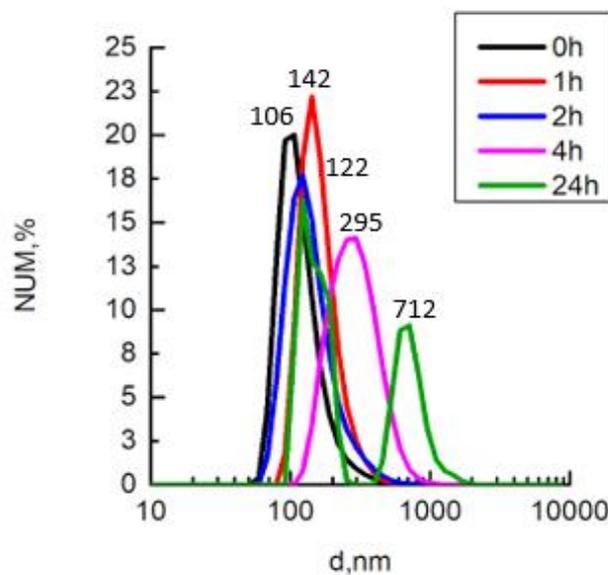
**Figura 3.7:** DLS al variare del tempo di soluzioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP e colesterolo (rapporto molare 70:30) in acqua e fisiologica.

Si inizia ad avere un PDI alto a 2h dalla fine della preparazione del campione (70:30 rapporto molare, lipidi-colesterolo) con un valore di 0.871 quindi è molto polidisperso. Il report della DLS indica anche la presenza di grandi particelle ed aggregati di cui alcuni sono sedimentati. Lo stesso comportamento si ha dopo 4 h; infatti il PDI è 0.843 e a 24h il PDI è di 0.804.



**Figura 3.8:** DLS al variare del tempo di soluzioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP e colesterolo (rapporto molare 80:20) in acqua e fisiologica.

Il campione contenente il rapporto molare 80:20 di colesterolo ha un PDI pari a 0.867 dopo 24h ed è, quindi, molto polidisperso. Il report della DLS indica anche la presenza di grandi particelle ed aggregati, dove alcuni sono sedimentati.



**Figura 3.9:** DLS al variare del tempo di soluzioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP e colesterolo (rapporto molare 90:10) in acqua e fisiologica.

Nel terzo campione dopo 24 h il PDI è di 0.622, quindi è polidisperso ma in misura minore rispetto agli altri campioni.

Da questi dati si può constatare che aumentando il contenuto di colesterolo le particelle tendono ad aggregare nel tempo perché l'affinità tra lipidi aumenta [15]. Per studi futuri, si può provare ad aggiungere il DSPE-PEG, che grazie al suo ingombro sterico può ridurre questo fenomeno di fusione tra le vescicole [47].

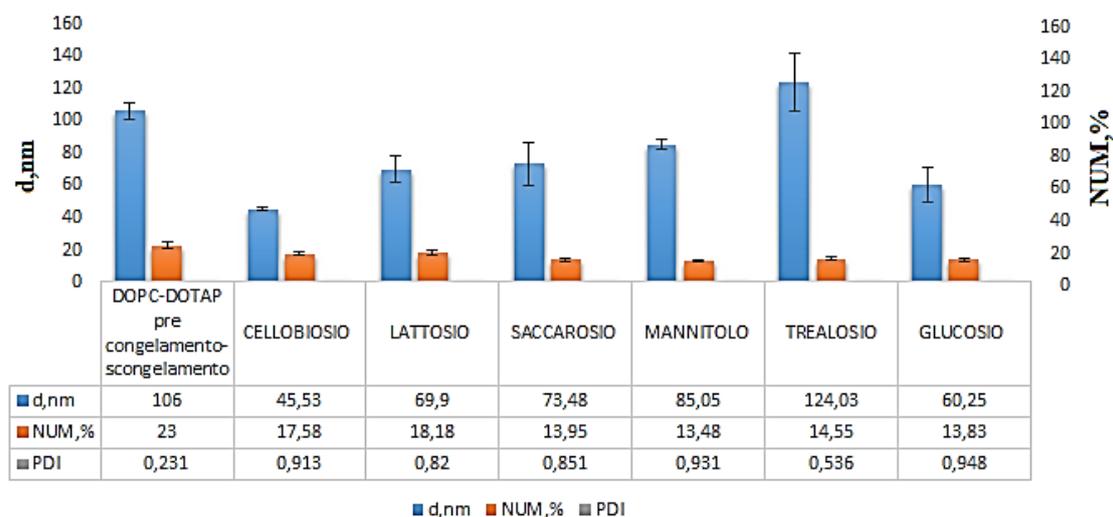
### 3.3 Effetto di cicli di congelamento e scongelamento

La distribuzione delle dimensioni può cambiare durante la conservazione a causa della degradazione e aggregazione dei componenti. Le formulazioni acquose di prodotti farmaceutici tendono ad essere meno stabili poiché la presenza di acqua porta a una rapida degradazione idrolitica nelle preparazioni lipidiche [43]. La velocità di idrolisi è catalizzata dalle alte temperature, pertanto le sospensioni lipidiche devono essere mantenute refrigerate durante la conservazione [8].

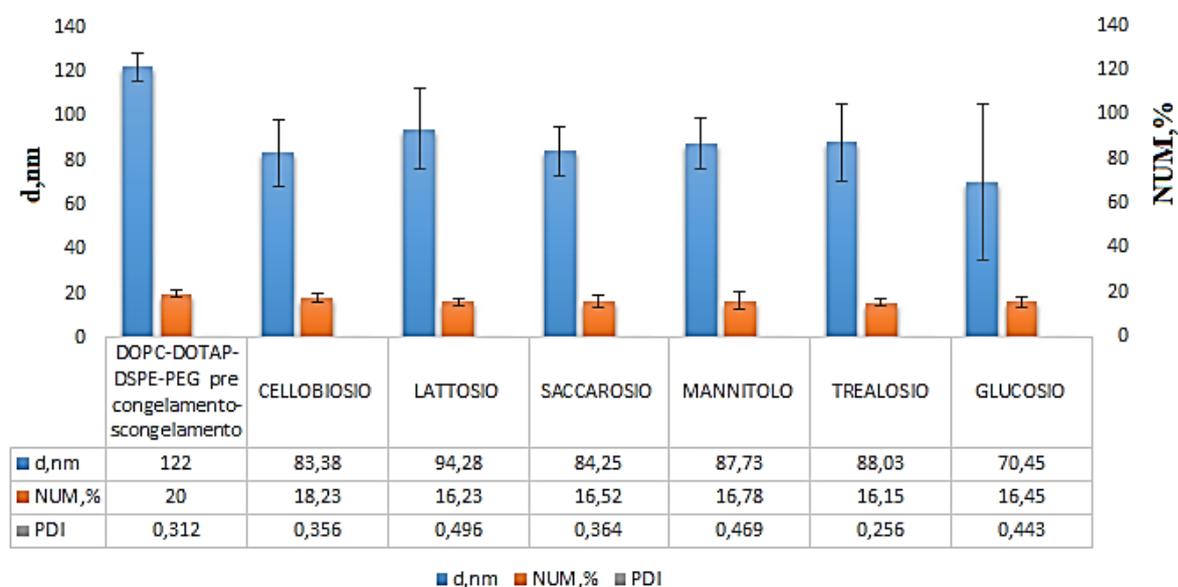
Si è scelto di studiare il comportamento dei liposomi contenenti DOPC- DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in presenza di saccarosio, trealosio, glucosio, lattosio, mannitolo e cellobiosio qualora questi siano sottoposti a sette cicli di congelamento e scongelamento lento e veloce, per studiarne anche come la velocità di congelamento influenzi la stabilità dei liposomi.

Sono state effettuate delle prove anche in presenza di tween80. Tale tensioattivo è utilizzato per diminuire la tensione superficiale dei liposomi in acqua e, quindi, per aumentare la loro stabilità, riducendo così i fenomeni di aggregazione [51].

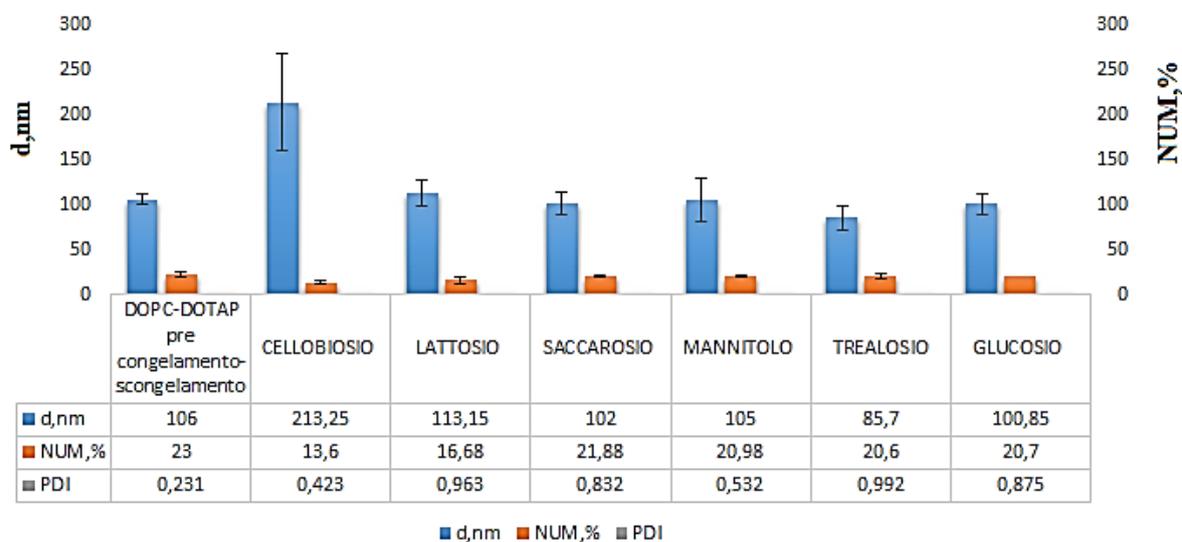
Di seguito, vengono mostrati istogrammi che consentono di visualizzare in modo più sintetico e immediato i picchi ricavati dai grafici ottenuti con le analisi alla DLS e riportati in Appendice, con i corrispettivi PDI, di campioni sottoposti a sette cicli di congelamento e scongelamento lento (Figura 3.10 e Figura 3.11) e veloce (Figura 3.12 e Figura 3.13), di liposomi contenenti lipidi di DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in presenza di eccipienti.



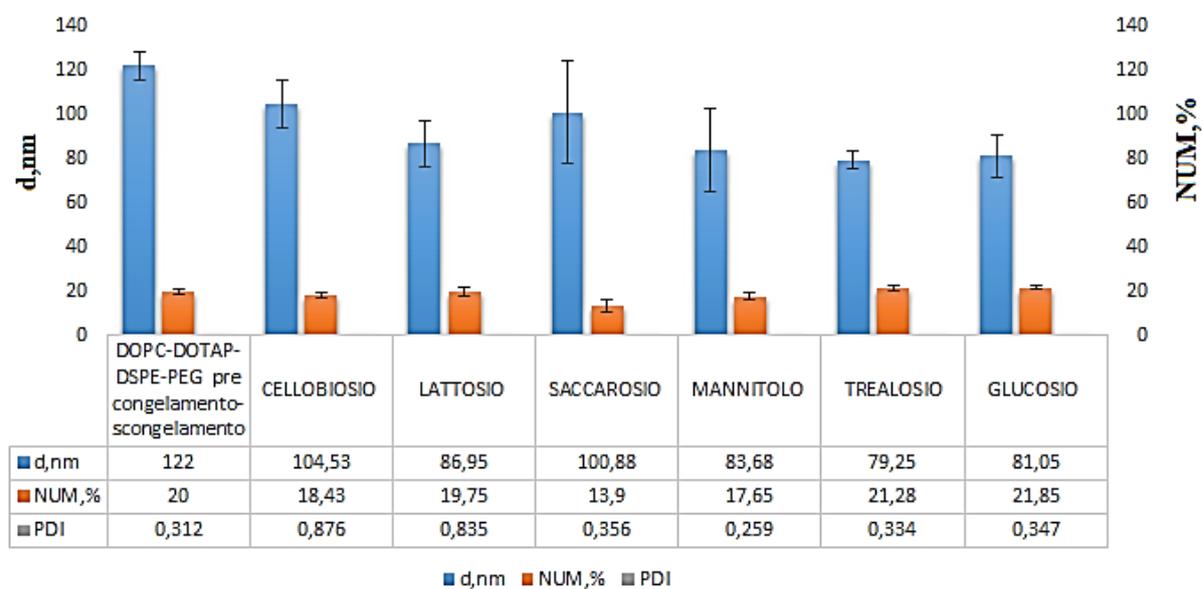
**Figura 3.10:** Frazione di liposomi (barra arancione) avente il diametro medio misurato via DLS (barra blu) per le soluzioni contenenti DOPC-DOTAP in presenza di cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio e sottoposti a congelamento e scongelamento **lento**. I risultati della DLS per le varie formulazioni sono riportati in Appendice.



**Figura 3.11:** Frazione di liposomi (barra arancione) avente il diametro medio misurato via DLS (barra blu) per le soluzioni contenenti DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in presenza di cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio e sottoposti a congelamento e scongelamento **lento**. I risultati della DLS per le varie formulazioni sono riportati in Appendice.



**Figura 3.12:** Frazione di liposomi (barra arancione) avente il diametro medio misurato via DLS (barra blu) per le soluzioni contenenti DOPC-DOTAP in presenza di cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio e sottoposti a congelamento e scongelamento **veloce**. I risultati della DLS per le varie formulazioni sono riportati in Appendice.



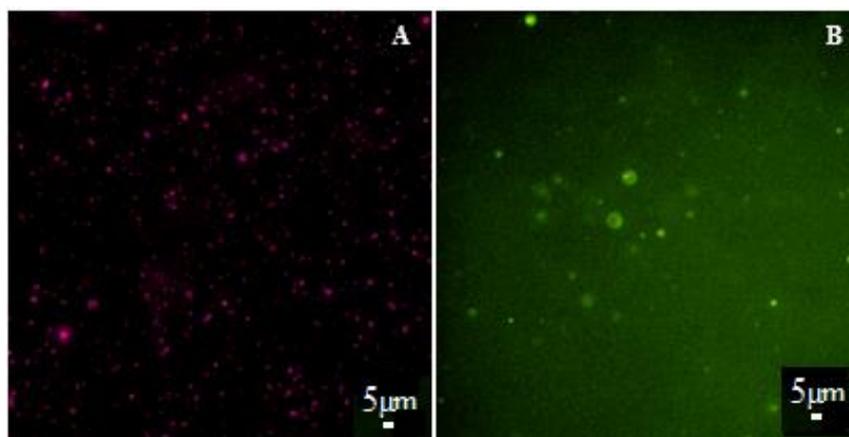
**Figura 3.13:** Frazione di liposomi (barra arancione) avente il diametro medio misurato via DLS (barra blu) per le soluzioni contenenti DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in presenza di cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio e sottoposti a congelamento e scongelamento **veloce**. I risultati della DLS per le varie formulazioni sono riportati in Appendice.

La popolazione di particelle non è distribuita uniformemente attorno ad una dimensione. Difatti per quasi tutti i campioni otteniamo grafici bimodali alla DLS (riportati in Appendice); tranne per campioni contenenti DOPC-DOTAP-trealosio, DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio, DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio per i cicli di congelamento e scongelamento lento, mentre per quelli veloci hanno grafici unimodali le soluzioni contenenti DOPC-DOTAP-glucosio, DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio, DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio. La presenza di due mode nel grafico di un campione potrebbe essere indice di una non omogeneità dimensionale o potrebbe indicare l'esistenza di due sottogruppi omogenei all'interno del campione, ma distinti l'uno dall'altro.

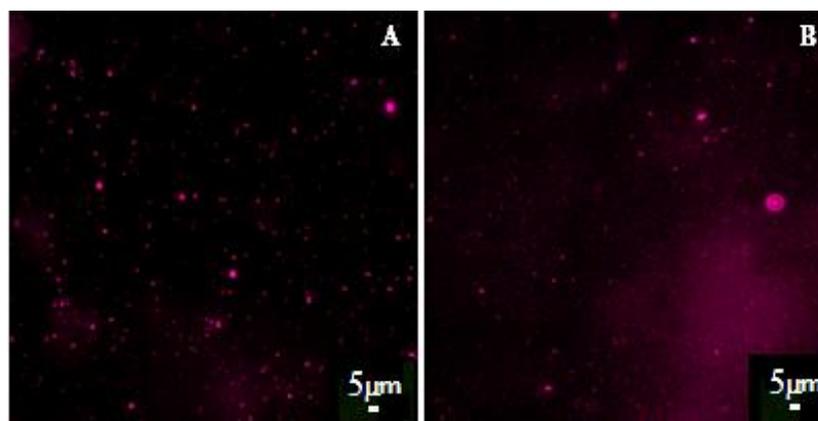
I dati ottenuti mostrano che i cicli di congelamento e scongelamento veloce riescono a preservare meglio le dimensioni delle vescicole; infatti, in media, quest'ultime hanno tutte il diametro intorno ai 100 nm tranne per il DOPC-DOTAP-cellobiosio che è quasi il doppio ( $d=200$  nm). Durante i cicli di congelamento e scongelamento lento, molto probabilmente le vescicole tra il congelamento e lo scongelamento hanno il tempo di riassemblarsi, questo spiegherebbe i grafici bimodali e PDI alti. Quindi la velocità con cui si raffredda e scongela influenza il comportamento delle vescicole e più sarà veloce meno tempo avranno le vescicole a cambiare la loro conformazione.

Gli eccipienti che hanno riscosso maggior successo in questo studio sono il trealosio e glucosio perché, nonostante il trattamento aggressivo dato alle vescicole, hanno fatto in modo che il loro diametro restasse sui 100 nm senza farle rompere o aggregare.

In generale si può quindi dire che per le sospensioni di liposomi va evitato il congelamento come tecnica di conservazione, poiché potrebbe fratturare o rompere le vescicole portando a un cambiamento nella distribuzione delle dimensioni come mostra la Figura 3.14 per cicli condotti in modo lento e Figura 3.15 per quelli veloce, e in caso futuro di liposomi caricati con il farmaco di interesse provocherebbe la perdita di quest'ultimo modificandone le funzionalità [8].



**Figura 3.14:** Campioni analizzati al microscopio in fluorescenza contenenti liposomi DOPC-DOTAP (A) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (B) a cui è stato aggiunto il lattosio. Entrambi hanno subito 7 cicli di congelamento e scongelamento lento.



**Figura 3.15:** Campioni analizzati al microscopio in fluorescenza contenenti liposomi DOPC-DOTAP (A) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (B) a cui è stato aggiunto il lattosio. Entrambi hanno subito 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce.

Per quanto riguarda il potenziale Zeta si riscontrano i valori riportati in Tabella 3.3.

**Tabella 3.3:** Valori di potenziale Zeta di campioni contenenti liposomi con DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG più 5%w/w di eccipienti, sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce e lento.

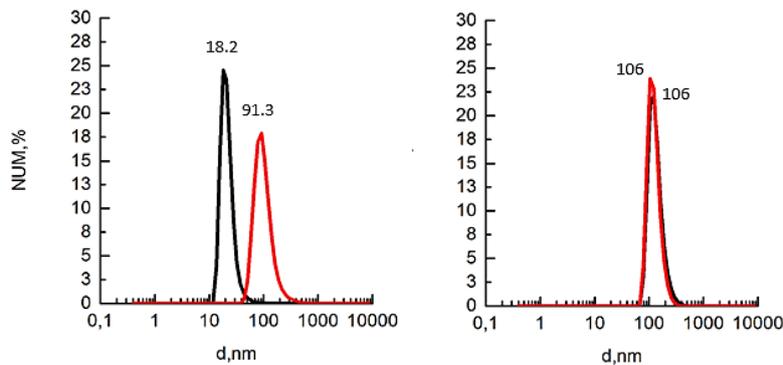
<b>LIPOSOMI</b>	<b>[mV]</b>
<b>Pre congelamento e scongelamento</b>	
DOPC-DOTAP	31.9
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	12.9
<b>Dopo 7 cicli di congelamento e scongelamento lento</b>	
DOPC-DOTAP	26.88
DOPC-DOTAP-cellobiosio	18.19
DOPC-DOTAP-lattosio	24.87
DOPC-DOTAP-saccarosio	32.85
DOPC-DOTAP-mannitolo	27.35
DOPC-DOTAP-trealosio	13.05
DOPC-DOTAP-glucosio	27.52
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	3.28
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio	5
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio	4.45
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio	4.37
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo	5.96
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio	4
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio	2
<b>Dopo 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce</b>	
DOPC-DOTAP	33.18
DOPC-DOTAP-cellobiosio	24.85
DOPC-DOTAP-lattosio	20.25
DOPC-DOTAP-saccarosio	22.5
DOPC-DOTAP-mannitolo	27.43
DOPC-DOTAP-trealosio	14.6
DOPC-DOTAP-glucosio	24.15
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	3.06
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio	-0.59
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio	-0.34
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio	0.86
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo	1.92
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio	-0.2
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio	-0.665

I campioni contenenti DOPC-DOTAP con e senza il 5%w/w di eccipienti hanno mantenuto il potenziale Z iniziale. Il valore positivo del potenziale assicura una bassa probabilità di aggregazione dei campioni, nonostante gli stress a cui i liposomi sono stati sottoposti.

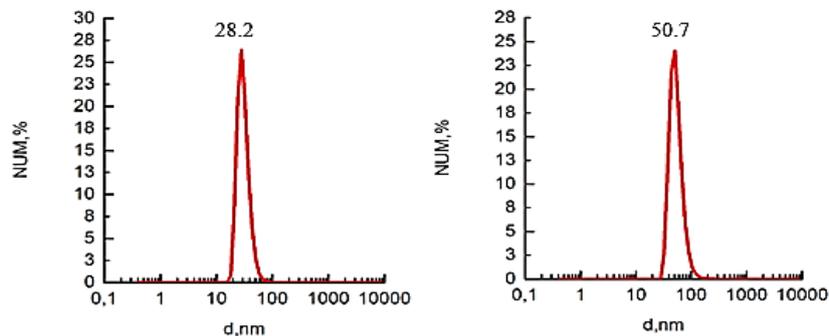
Un comportamento diverso viene mostrato dalle formulazioni contenenti DOPC-DOTAP-DSPE-PEG con e senza il 5%w/w eccipienti, perché si passa da un potenziale di 21.3

mV prima delle prove di *freeze-thawing* ad un potenziale molto più basso, 3.06 mV, questo implica che le particelle sono diventate più instabili e di conseguenza avranno più tendenza ad aggregare.

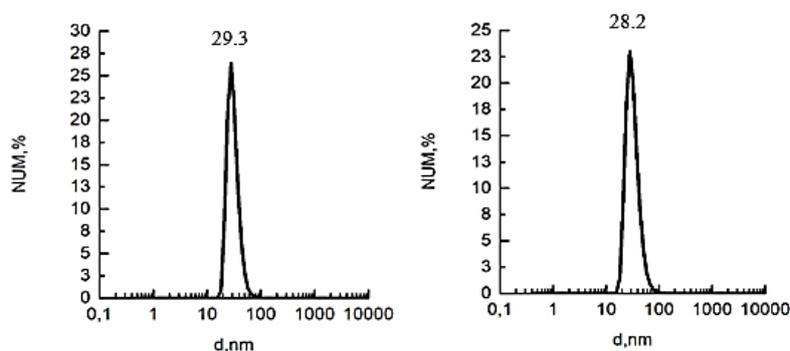
I campioni contenenti il tween80 dopo entrambi i processi hanno mostrato un diametro medio inferiore ai 70 nm, poiché le vescicole si sono fratturate e il tensioattivo, incrementando la tensione superficiale delle micelle, non ha permesso il loro aggregamento [51] come si vede nella Figura 3.16, Figura 3.17, Figura 3.18 e Figura 3.19.



**Figura 3.16:** DLS di due campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (grafico sinistro) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (grafico destro).

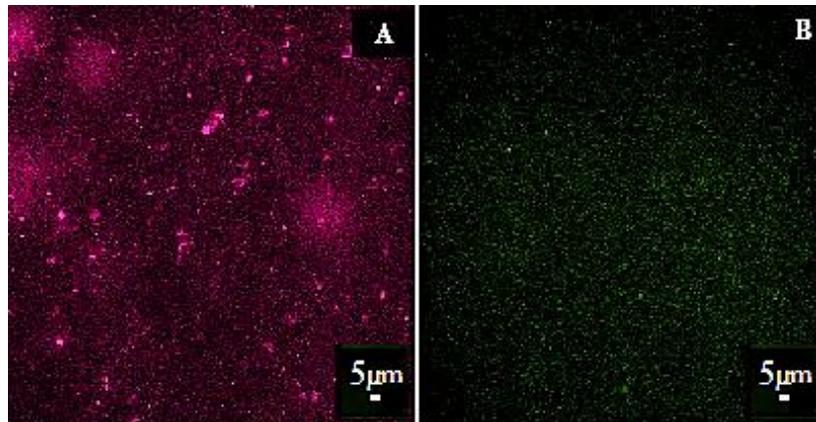


**Figura 3.17:** DLS dopo sette cicli di congelamento e scongelamento **lento** dei campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (picco sinistro, 28.2 nm) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (picco destro, 50.7 nm).

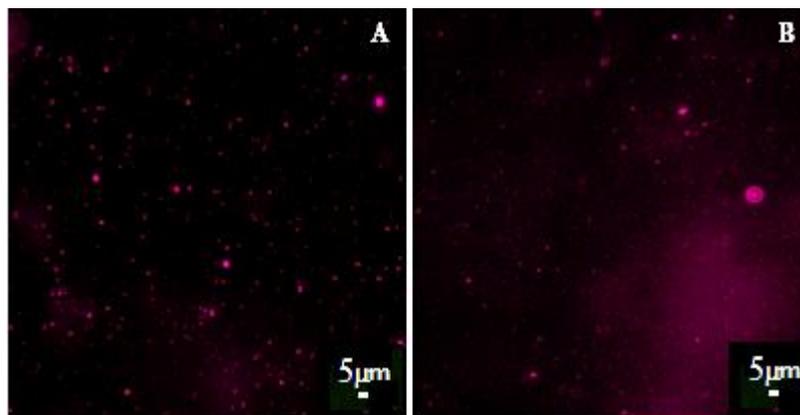


**Figura 3.18:** Grafici che mettono in relazione la percentuale del numero di particelle in funzione del diametro dopo sette cicli di congelamento e scongelamento **veloce** dei campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (picco sinistro, 29.2 nm) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (picco destro, 28.2 nm).

Grazie al microscopio in fluorescenza si riesce ad avere un'idea a livello qualitativo di come le vescicole in presenza di tween80 sono diventate dopo questi due trattamenti, Figura 3.19 e Figura 3.20.



**Figura 3.19:** Campioni analizzati al microscopio in fluorescenza contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (figura A) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (figura B) sottoposti precedentemente a 7 cicli di congelamento e scongelamento lento.



**Figura 3.20:** Campioni analizzati al microscopio in fluorescenza contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-tween80 (figura A) e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80 (figura B) sottoposti precedentemente a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce.

Mentre per quanto riguarda i rispettivi potenziali zeta sono riportati in Tabella 3.4.

**Tabella 3.4:** Potenziale Zeta di campioni sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento lento e veloce, contenenti liposomi costituiti da DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in presenza del 5%w/w di eccipiente e 0.01%w/w di tween80.

<b>LIPOSOMI</b>	<b>[mV]</b>
<b>Pre congelamento e scongelamento</b>	
DOPC-DOTAP-tween80	26
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80	7.6
<b>Dopo 7 cicli di congelamento e scongelamento lento</b>	
DOPC-DOTAP-tween80	0.961
DOPC-DOTAP-cellobiosio-tween80	2.46
DOPC-DOTAP-lattosio-tween80	0.62
DOPC-DOTAP-saccarosio-tween80	-1.28
DOPC-DOTAP-mannitolo-tween80	3.75
DOPC-DOTAP-trealosio-tween80	-0.251
DOPC-DOTAP-glucosio-tween80	2.82
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80	4.75
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio-tween80	6.21
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio-tween80	5.09
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio-tween80	4.82
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo-tween80	4.72
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio-tween80	5.37
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio-tween80	3.72
<b>Dopo 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce</b>	
DOPC-DOTAP-tween80	1.61
DOPC-DOTAP-cellobiosio-tween80	3.42
DOPC-DOTAP-lattosio-tween80	-0.434
DOPC-DOTAP-saccarosio-tween80	-176
DOPC-DOTAP-mannitolo-tween80	0.285
DOPC-DOTAP-trealosio-tween80	-1.61
DOPC-DOTAP-glucosio-tween80	-1.02
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-tween80	-1.38
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio-tween80	-1.76
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio-tween80	-1.65
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio-tween80	-2.82
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo-tween80	-1.91
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio-tween80	-0.78
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio-tween80	-1.36

Il potenziale è molto basso per tutti i campioni di conseguenza la probabilità che i campioni nel tempo tendano ad aggregare aumenta, ma si pensa che tale fenomeno sia ridotto dalla presenza del tween80 che aumenta la tensione superficiale evitando così l'esplicitarsi di tale fenomeno.

Visto che il tween80 dopo i trattamenti di congelamento e scongelamento restituisce vescicole con diametro molto bassi (al di sotto dei 70 nm) e il potenziale Zeta non dà garanzia che nel tempo siano stabili, si può concludere che tale tensioattivo non sia adatto a questo studio.

### 3.4 Effetto della liofilizzazione

Per progettare e realizzare un processo di liofilizzazione che garantisca l'ottenimento di un liofilo di adeguata stabilità, umidità residua, rapida ricostituzione per aggiunta di solvente, elevata resistenza meccanica ed eleganza della struttura essiccata, bisogna conoscere le giuste condizioni al contorno come temperatura e pressione nel processo di liofilizzazione.

Il principale ostacolo che si riscontra nello studio è proprio nella prima fase di congelamento dove a causa della natura stocastica della temperatura di nucleazione, ogni campione nuclea a tempi e temperature differenti tra i -10 ed i -20°C e a distanza di un'ora l'una dall'altra, ciò porta ad una disomogeneità complessiva nel lotto ed una distribuzione disuniforme per quanto riguarda la dimensione dei cristalli di ghiaccio [56]. Per tale motivo si otterranno diverse velocità di essiccamento per le diverse dimensioni dei pori generati, diverse aree specifiche e diverse proprietà del prodotto finale [56]. In fase di congelamento è necessario assicurare che tutto il prodotto sia in forma solida prima di procedere all'essiccamento; inoltre, la temperatura del prodotto deve essere mantenuta al di sotto della soglia critica che corrisponde alla temperatura di collasso ( $T_c$ ) per una sostanza amorfa o alla temperatura eutettica ( $T_{eu}$ ) per una sostanza cristallina in modo da evitare il collasso o la fusione della torta liofilizzata [57]. La conoscenza di tali temperature risulta essere indispensabile per l'ottimizzazione del ciclo di liofilizzazione e per determinarle i campioni contenenti liposomi costituiti da DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG a cui sono stati aggiunti il 5%w/w di eccipienti come cellobiosio, mannitolo, trealosio, saccarosio, lattosio e glucosio, si è usata la calorimetria differenziale a scansione da cui sono stati ottenuti i risultati riportati in Tabella 3.5.

**Tabella 3.5:** Temperatura eutettica per il mannitolo e di collasso per trealosio, saccarosio, glucosio, lattosio, cellobiosio, dispersi tutti in acqua e fisiologica 1:1 v/v. Temperatura eutettica del campione con solo acqua e fisiologica e di altri contenuti liposomi costituiti da DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG entrambi in acqua fisiologica.

<b>Eccipienti 5%w/w con acqua e fisiologica (1:1)</b>	<b><math>T_{eu}/T_c</math> °C</b>
Mannitolo	-22,92
Trealosio	-43,73
Saccarosio	-43,68
Glucosio	-27,38
Lattosio	-38,96
Cellobiosio	-41,45
<b>Liposomi</b>	
Acqua e fisiologica (1:1)	-21,44
DOPC- DOTAP- acqua e fisiologica	-21,66
DOPC- DOTAP- DSPE-PEG- acqua e fisiologica	-21,6

Osservando le temperature dei campioni contenenti liposomi si può dedurre che non influenzano il comportamento della soluzione costituita da acqua e fisiologica perché si ottiene la medesima temperatura eutettica del campione contenente soltanto il disperdente.

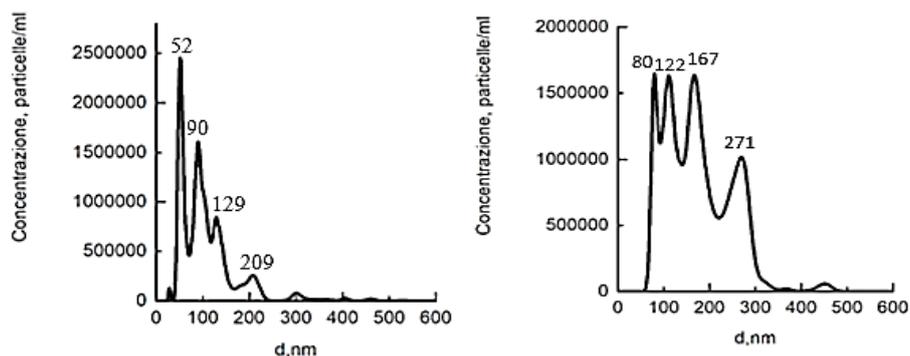
Per i campioni contenenti eccipienti si notano al contrario temperature critiche molto basse. Questo è dovuto alla presenza del sale (cloruro di sodio, NaCl) che interagisce con gli eccipienti diminuendo di molto tali temperature [49]. Ad esempio, per la soluzione contenente mannitolo, il sale inibisce la cristallizzazione di quest'ultimo ritardandola nella fase di raffreddamento e completandola durante la fase di *annealing* del campione [26].

Nella fase di essiccamento primario è importante che la temperatura del prodotto sia inferiore alla sua temperatura critica. Nello specifico, la temperatura del prodotto dovrà essere inferiore a quella di fusione dell'eutettico per un prodotto cristallino e al fine di evitare la comparsa della fase liquida e a quella di collasso per un prodotto amorfo. Un altro parametro di processo importante è la velocità di produzione del vapore che deve essere conciliabile con la capacità del condensatore perché se questo non riesce a rimuoverlo adeguatamente, si avrà un accumulo di vapore in camera con conseguente aumento di pressione [58]. Le due fasi di essiccamento dipendono dal grado di sottoraffreddamento e dalla velocità di cristallizzazione del ghiaccio, questo perché se la dimensione dei cristalli è troppo piccola, come detto nei precedenti capitoli, si riduce il tempo di essiccamento secondario mentre se formiamo cristalli molto grandi diminuiamo il tempo di essiccamento primario [28].

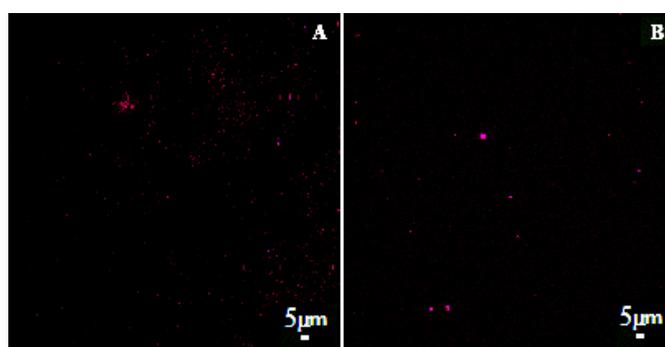
Quindi per i campioni contenenti liposomi con lipidi di DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in presenza del 5%w/w di eccipiente si sono scelte come condizioni di processo una temperatura di raffreddamento di -45 °C raggiunta con una velocità di 0.5 °C/min, ottimo compromesso per ottenere una modesta area superficiale di ghiaccio con una struttura uniforme all'interno dei flaconi. Nella fase di essiccamento primario si crea il vuoto nella camera con una pressione di 100 μbar e la temperatura del ripiano è stata impostata a -10 °C. Ciò non è stato sufficiente ad evitare il collasso dei campioni contenenti trealosio, saccarosio, glucosio e cellobiosio.

È stata effettuata una seconda liofilizzazione cambiando alcuni parametri tra cui la pressione durante l'essiccamento primario, impostandola a 50 μbar e la temperatura del ripiano riscaldante diminuendola a -20 °C. Si sono replicate le medesime composizioni, in più vengono aggiunti campioni contenenti le due tipologie di liposomi ma con l'1%w/w di mannitolo per incrementare la temperatura critica della torta essiccata riducendone il fenomeno di collasso e il 4%w/w di eccipiente (come lattosio, saccarosio, glucosio, cellobiosio, trealosio). I campioni che in questa seconda liofilizzazione hanno subito un collasso sono quelli contenenti liposomi di DOPC-DOTAP in presenza di glucosio, mannitolo-glucosio, mannitolo-cellobiosio, mannitolo-saccarosio, mannitolo-trealosio, e quelli costituiti da DOPC-DOTAP-DSPE-PEG con glucosio, mannitolo-glucosio, mannitolo-saccarosio e mannitolo-cellobiosio. Questo perché il sale influenza molto il comportamento dei nostri eccipienti quindi è molto difficile trovare un punto d'incontro tra ottimizzazione del processo ed eleganza del prodotto.

Dal confronto di campioni contenenti liposomi liofilizzati tal quali e altri a cui sono stati aggiunti eccipienti, a seguito di una reidratazione di acqua e fisiologica, si nota che quest'ultimi hanno mantenuto la loro dimensione iniziale, mentre i primi tendono a frammentarsi in vescicole più piccole come mostra la Figura 3.21 e la Figura 3.22.



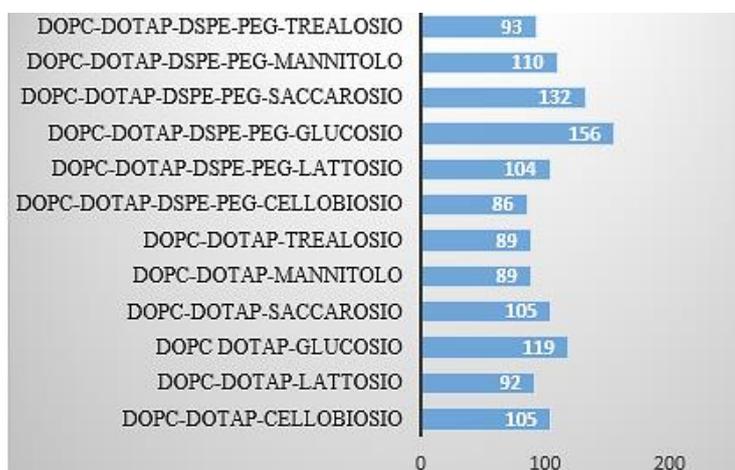
**Figura 3.21:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del loro diametro di liposomi liofilizzati costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro).



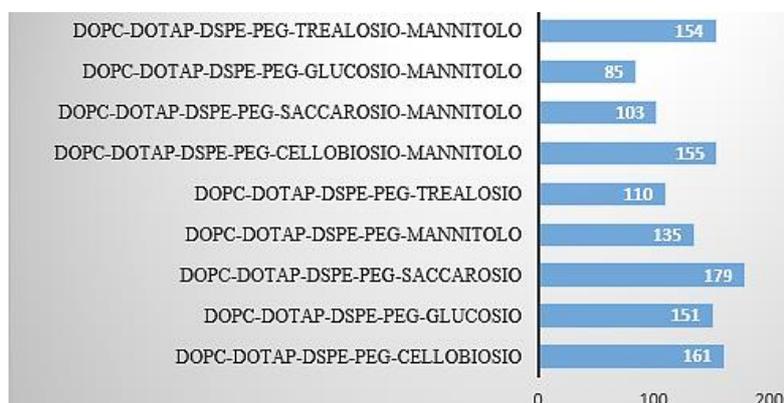
**Figura 3.22:** Liposomi liofilizzati e reidratati costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (A) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (B) analizzati al microscopio in fluorescenza.

I liposomi con il DOPC-DOTAP-DSPE-PEG hanno un diametro medio sui 100 nm indipendentemente dalla presenza del mannitolo. Le Tabelle 3.6 e 3.7 mostrano i valori dei diametri a più alta concentrazione (particelle/ml) dei campioni analizzati al NTA dopo la prima e la seconda liofilizzazione e che non presentano un comportamento polidisperso.

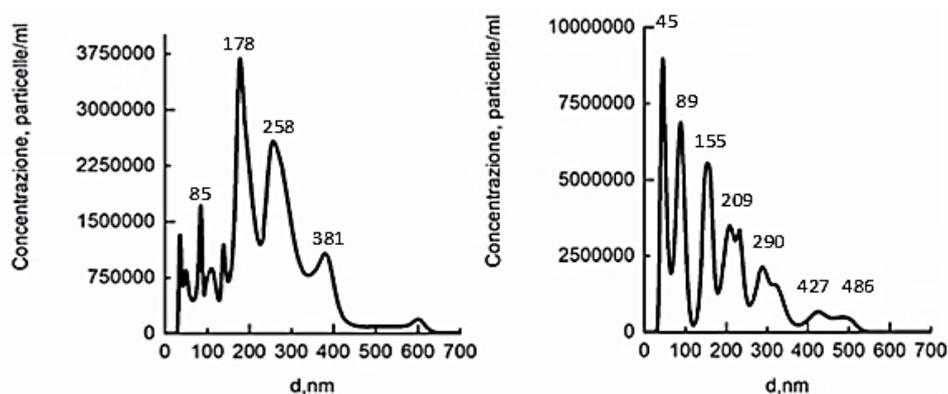
**Tabella 3.6:** Picchi ricavati dai grafici del Nanosight. Evidenziano il diametro (nm) predominante nelle soluzioni della prima liofilizzazione contenenti liposomi con lipidi di DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG e in presenza di eccipienti come: cellobiosio, lattosio, glucosio, saccarosio, mannitolo e trealosio.



**Tabella 3.7:** Picchi ricavati dai grafici del Nanosight. Evidenziano il diametro (nm) predominante nelle soluzioni della seconda liofilizzazione contenenti liposomi con lipidi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG e in presenza di eccipienti come: cellobiosio, glucosio, saccarosio, mannitolo e trealosio.



Unica eccezione è il lattosio che nella seconda liofilizzazione, sia da solo che in combinazione con il mannitolo, presenta diametri un più grandi, vedi Figura 3.23.



**Figura 3.23:** Concentrazione (particelle /ml) in funzione del diametro (nm) di campioni liofilizzati e reidratati costituiti da liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG con lattosio (grafico di sinistra) e lattosio più mannitolo (grafico di destra) analizzati al Nanosight.

Mentre nella prima liofilizzazione i liposomi di DOPC-DOTAP in presenza di eccipienti mantenevano tutti un diametro sui 100 nm, nella seconda liofilizzazione i campioni sono molto eterogenei. Innanzitutto, il mannitolo essendo l'unico additivo cristallino mostra un comportamento diverso dagli altri eccipienti; infatti i liposomi presentano un diametro decisamente alto (nell'ordine dei micron). Tuttavia, risulta in grado di aumentare l'eleganza della torta liofilizzata, di incrementare la stabilità del principio attivo e di ridurre la velocità di ricostituzione dei prodotti [26]. Con gli altri eccipienti le vescicole mostrano, invece una tendenza a crescere di dimensioni nel tempo anche quando sono combinati con il mannitolo con l'eccezione del trealosio, lattosio e glucosio. Molto probabilmente i diametri di quest'ultimi campioni sono diventati talmente grandi da non riuscire più a mantenere le micelle in soluzione e, quindi, sedimentando, lo strumento di misura non riesce più a rilevarle. Tali risultati sono stati estrapolati dai grafici ottenuti alla DLS riportati in Appendice, dove i campioni reidratati nel medesimo momento sono stati analizzati in successione per studiare il loro comportamento nel tempo. Nello specifico il picco nero indica il primo campione ad essere analizzato, poi segue il picco rosso ed infine il picco blu. Riassumendo gli eccipienti aggiunti come trealosio,

glucosio, saccarosio e cellobosio aiutano i liposomi a restare integri, tranne il mannitolo che sì, evita il collasso di alcuni campioni, ma non garantisce le dimensioni ottimali dei liposomi. Anche il lattosio non ha dato ottimi risultati a causa della formazione di grandi vescicole all'interno dei campioni.

Per quanto riguarda il valore di umidità residua dei campioni dopo liofilizzazione, si vedano le Tabelle 3.8 e 3.9.

**Tabella 3.8:** Valori di umidità residua nei campioni della prima liofilizzazione.

<b>Liofilizzazione 1</b>	<b>Umidità,%</b>
DOPC-DOTAP	4.42
DOPC-DOTAP-saccarosio	8.4
DOPC-DOTAP-lattosio	7.84
DOPC-DOTAP-trealosio	6.16
DOPC-DOTAP-cellobiosio	1.52
DOPC-DOTAP-glucosio	9.32
DOPC-DOTAP-mannitolo	4.05
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	5.07
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio	6.57
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio	6.18
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio	1.97
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio	6.58
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio	2.67
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo	6.63

**Tabella 3.9:** Valori di umidità residua nei campioni della seconda liofilizzazione.

<b>Liofilizzazione 2</b>	<b>Umidità,%</b>
DOPC-DOTAP-saccarosio	5.18
DOPC-DOTAP-lattosio	4.52
DOPC-DOTAP-trealosio	1.33
DOPC-DOTAP-cellobiosio	1.34
DOPC-DOTAP-glucosio	1.49
DOPC-DOTAP-mannitolo	1.5
DOPC-DOTAP-saccarosio-mannitolo	6.53
DOPC-DOTAP-lattosio-mannitolo	6.05
DOPC-DOTAP-trealosio-mannitolo	3.69
DOPC-DOTAP-cellobiosio-mannitolo	4.52
DOPC-DOTAP-glucosio-mannitolo	5.15
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio	9.55
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio	7.52
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio	1.5
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio	1.49
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio	5.67
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo	7.06
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio-mannitolo	4.85
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio-mannitolo	5.24
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio-mannitolo	6.68
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio-mannitolo	4.52
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio-mannitolo	7.29

Solitamente l'umidità residua dovrebbe essere molto bassa, in genere dell'ordine del 2-3% [27], mentre questi campioni presentano valori ben al di sopra. Si sospetta però che i campioni liofilizzati abbiano assorbito l'umidità ceduta dal tappo. Quest'ultimo è costituito da un materiale di natura polimerica che, se non opportunamente trattato, può trattenere l'umidità e rilasciarla progressivamente nel flacone in fase di stoccaggio. Un altro motivo è dato dal passaggio dell'umidità presente nell'ambiente di conservazione attraverso i tappi dei campioni che non sono stati immediatamente ghierati ed infine l'ultima causa, non meno importante, è identificata dal collasso di quasi tutte le strutture liofilizzate. Di conseguenza grandi quantità d'acqua restano intrappolate durante le due fasi di essiccamento [20].

Per quanto riguarda i valori dei potenziali zeta, come mostra la Tabella 3.10 e la Tabella 3.11, sono tutti nell'intorno di 0 mV, tranne per i liposomi di DOPC-DOTAP che in modulo sono un po' più grandi e positivi. Tutti i campioni, dopo il processo di liofilizzazione, mostrano quindi una più spiccata propensione a sviluppare fenomeni di aggregazione poiché in modulo il valore del potenziale Zeta è molto al di sotto dei 30 mV [36].

**Tabella 3.10:** Valori dei potenziali zeta dei campioni reidratati dopo la prima liofilizzazione, ricavato grazie allo Zetasizer.

<b>Campioni</b>	<b>[mV]</b>
<b>Pre liofilizzazione</b>	
DOPC-DOTAP	31.9
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	12.9
<b>LIOFILIZZAZIONE 1</b>	
DOPC-DOTAP	10.43
DOPC-DOTAP-cellobiosio	8.21
DOPC-DOTAP-lattosio	14.2
DOPC DOTAP-glucosio	7.59
DOPC-DOTAP-saccarosio	9.19
DOPC-DOTAP-mannitolo	9.34
DOPC-DOTAP-trealosio	5.06
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	3.54
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio	-1.28
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio	-3.8
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio	0.43
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio	-0.289
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo	-0.49
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio	-2.02

**Tabella 3.11:** Valori dei potenziali zeta dei campioni reidratati dopo la seconda liofilizzazione, ricavato grazie allo Zetasizer.

<b>Campioni</b>	<b>[mV]</b>
<b>Pre liofilizzazione</b>	
DOPC-DOTAP	31.9
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG	12.9
<b>LIOFILIZZAZIONE 2</b>	
DOPC-DOTAP-cellobiosio	12.43
DOPC-DOTAP-lattosio	13.26
DOPC-DOTAP-glucosio	17.92
DOPC-DOTAP-saccarosio	16.47
DOPC-DOTAP-mannitolo	10.3
DOPC-DOTAP-trealosio	8.73
DOPC-DOTAP-cellobiosio-mannitolo	10.34
DOPC-DOTAP-lattosio-mannitolo	3.73
DOPC-DOTAP-glucosio-mannitolo	9.59
DOPC-DOTAP-saccarosio-mannitolo	13.74
DOPC-DOTAP-trealosio-mannitolo	4.52
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio	-0.82
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio	1.97
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio	-0.035
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio	-2.58
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo	-7
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio	-0.47
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio-mannitolo	-2.53
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio-mannitolo	-4.14
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio-mannitolo	-6.95
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio-mannitolo	-2.42
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio-mannitolo	-1.95

### 3.4.1 Scelta della formulazione

I risultati finora raccolti suggeriscono che, per riuscire ad ottenere dei liposomi con un diametro di circa 100 nm, si può scegliere tra due tipologie di formulazioni, una contenente DOPC-DOTAP e l'altra DOPC-DOTAP-DSPE-PEG, reidratati in acqua e fisiologica con successiva sonicazione ed estrusione. Questi campioni così ottenuti ci garantiscono un'ottima stabilità fino a due settimane; questo grazie alla presenza del DOTAP e del DSPE-PEG. L'azione di repulsione fra le cariche del primo e l'impedimento sterico del secondo, evitano l'aggregazione nel tempo delle vescicole.

L'inserimento del colesterolo all'interno della formulazione, con lo scopo unico di modulare la fluidità, l'elasticità e la permeabilità della membrana dei liposomi, non ha mostrato alcun giovamento per le varie formulazioni investigate. Infatti, si riscontra un aumento nel tempo del diametro medio nel caso di liposomi di DOPC-DOTAP. Tale fenomeno è più accentuato all'aumentare del contenuto di colesterolo.

Prima di sottoporre i campioni ad un ciclo di liofilizzazione si è testato il loro comportamento in presenza di eccipienti dopo sette cicli di congelamento e scongelamento lento e veloce. Questi trattamenti molto aggressivi hanno messo in evidenza che un'elevata velocità di congelamento e scongelamento riesce a preservare meglio le dimensioni delle vescicole, questo perché le vescicole avranno meno tempo di cambiare la loro conformazione. Gli eccipienti che hanno riscosso maggior successo in questo studio sono il trealosio e glucosio poiché le vescicole presentano comunque un diametro medio sui 100 nm. Quindi, per le sospensioni di liposomi va evitato il congelamento come tecnica di conservazione, perché promuove la rottura delle vescicole. All'interno di queste prove sono stati analizzati anche campioni contenenti tween80 ma si è deciso di escluderlo per i successivi processi di liofilizzazione, in quanto promuoveva la formazione di liposomi con diametri al di sotto dei 70 nm che non sono adatti per lo scopo di questa ricerca.

Infine, sono state effettuate due prove di liofilizzazione ma a causa della presenza di NaCl nella soluzione utilizzata per reidratare i campioni e al guasto del FDM, è stato difficile trovare un ottimo compromesso tra ottimizzazione del processo ed eleganza del prodotto. Infatti, è noto che il sale diminuisce di molto la  $T_g$  dei campioni e quindi anche il valore della temperatura di collasso. Purtroppo, a causa di un malfunzionamento del FDM questo tipo di effetto non è stato quantificato. Comunque, nonostante alcuni campioni siano collassati, l'utilizzo di eccipienti durante la liofilizzazione è necessario per preservarne le loro dimensioni. Gli eccipienti che hanno mostrato un esito positivo sono il trealosio, il glucosio, il saccarosio e il cellobiosio con DOPC-DOTAP-DSPE-PEG poiché aiutano i liposomi a restare integri. Per quanto riguarda i potenziali Zeta tutti i campioni dopo la liofilizzazione riscontrano un valore prossimo allo zero, quindi questo vuol dire che la probabilità che i liposomi dopo la reidratazione aggregino aumenta, mentre per quanto riguarda l'umidità si ottengono per tutti valori molto alti, superiori all'1%, risultato non positivo perché con il tempo può portare a fenomeni di idrolisi delle vescicole. Questo può essere dovuto al collasso parziale della struttura, pertanto si ritiene che il contenuto finale di umidità possa essere diminuito con una scelta più oculata delle condizioni operative per la fase di essiccamento primario.

## Capitolo 4

### Conclusioni

Nel settore della Nanomedicina, le nanoparticelle rivestono un ruolo importante. Sono sistemi capaci di intrappolare grandi quantitativi di farmaco, per poi rilasciarli nel corpo in un sito specifico. Tra i nanosistemi polimerici più importanti si evidenziano i liposomi, sistemi biocompatibili e biodegradabili che contengono spesso anche altre sostanze come colesterolo, glicole polietilenico (PEG), fosfolipidi con cariche negative o positive.

Per la somministrazione di farmaci è importante ottenere preparati monodispersi, per evitare effetti collaterali dovuti a fenomeni di aggregazione [6]. Tale fenomeno può essere ridotto attraverso una distribuzione di cariche nei liposomi (con ad esempio il fosfolipide DOTAP), in modo da produrre forze di repulsione nei confronti di altre vescicole, oppure, tramite l'utilizzo di un ingombro sterico (come il fosfolipide DSPE-PEG) che evita l'assorbimento di altre particelle. Il PEG è spesso utilizzato anche per la riduzione della fagocitosi e della opsonizzazione delle nanoparticelle. La modulazione delle dimensioni delle vescicole può essere un'ottima strategia per diminuire sia il loro riconoscimento da parte del sistema immunitario e sia per ridurre la quantità persa di soluto incapsulato, evitando così difetti di curvatura e danni sviluppati da forze meccaniche. A fronte di queste problematiche, il diametro ottimale si aggira intorno ai 100 nm [11]. Esistono diversi metodi di preparazione meccanica per ridurre ed omogenizzare il diametro dei liposomi come la sonicazione e l'estrusione.

Durante lo svolgimento della presente tesi di Laurea Magistrale, il protocollo scelto per le preparazioni dei liposomi ha previsto l'utilizzo di lipidi di DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in acqua e soluzione fisiologica, sonicati ed estrusi, riuscendo a garantire un diametro medio delle vescicole di 100 nm e soluzioni molto omogenee. Nello specifico il DOPC ha il compito di dare struttura al liposoma [40], il DOTAP carico positivamente deve ridurre i fenomeni di aggregazione grazie alla forza di repulsione fra le cariche, mentre il DSPE-PEG oltre ad aumentare l'emivita del liposoma nell'organismo fornisce un ingombro sterico in grado di ridurre ulteriormente i fenomeni di fusione. Bisogna però sottolineare che liposomi carichi positivamente (DOTAP), essendo tossici, sono rimossi velocemente dalla circolazione e, per tale motivo, è importante miscelarli con altri lipidi neutri (DOPC oppure DSPE-PEG) in modo da attenuare tale fenomeno [50].

È stato verificato il comportamento nel tempo di tali formulazioni. Queste sono stabili poiché i liposomi di DOPC-DOTAP tendono a formare liposomi più piccoli ma sempre con diametri prossimi ai 100 nm. Si è dedotto che il DOTAP carico positivamente crea una forza di repulsione interna ma allo stesso tempo aumenta il valore positivo del potenziale Zeta, mentre i liposomi costituiti da DOPC-DOTAP-DSPE-PEG hanno un diametro che rimane stabile sui 100 nm, questo grazie all'ingombro sterico provocato dalla catena del PEG e alla repulsione esercitata dalle cariche del DOTAP [46]. Anche il potenziale Zeta rimane positivo quindi la probabilità di aggregazione nel tempo è molto bassa.

Si sono effettuate anche altre prove, in cui alla formulazione base si è aggiunto il colesterolo, in modo da rendere le superfici delle vescicole libere da difetti [41]. Aumentando però il contenuto di colesterolo, si è visto che le particelle tendevano ad aggregare nel tempo, questo perché l'affinità tra i lipidi aumentava [41]. Tale fenomeno non è stato ritenuto favorevole al fine di questa tesi, difatti è stato escluso per le prove seguenti. Per studi futuri, si è quindi suggerito di provare ad aggiungere il DSPE-PEG e vedere se l'ingombro esercitato dal PEG basti a ridurre i fenomeni di aggregazione [41].

I liposomi se sottoposti ad un periodo di conservazione vanno protetti dall'idrolisi acida e basica. Per tale motivo, le soluzioni in cui sono contenuti devono possedere un pH pari a 7 e la temperatura di conservazione deve essere bassa in modo da ridurre la velocità di idrolisi [8]. Note queste prerogative, durante questa Tesi si è posta l'attenzione al processo di congelamento, poiché l'assenza di un crioprotettore mostra un significativo aumento del diametro medio, combinato ad una diminuzione dell'omogeneità del campione [8]. Gli zuccheri come i disaccaridi, tendono a proteggere le sostanze bioattive durante il congelamento, perché interagiscono in modo positivo con i siti fosfati del doppio strato lipidico grazie a legami ad idrogeno e riescono a mantenere la struttura ordinata della membrana [18].

Per scegliere i crioprotettori più efficaci, si sono sottoposti i campioni di liposomi con sei diversi eccipienti (cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio) e tween80 a sette cicli di congelamento e scongelamento sia lento sia veloce.

I risultati ottenuti hanno mostrato che con i cicli di congelamento e scongelamento veloce per i campioni con liposomi addizionati di eccipienti, si riesce a preservare meglio le dimensioni delle vescicole. In media infatti i liposomi hanno mostrato tutti il diametro intorno ai 100 nm, tranne per il DOPC-DOTAP-cellobiosio che presenta un valore di quasi il doppio. Durante i cicli di congelamento e scongelamento lento, molto probabilmente le vescicole hanno avuto il tempo di riassemblarsi, questo spiegherebbe la non omogeneità dimensionale che è stata riscontrata nei campioni. La velocità con cui si raffredda e scongela influenza perciò il comportamento delle vescicole e più è alta meno tempo hanno le vescicole di aggregare o rompersi. Gli eccipienti che hanno restituito delle ottime risposte sono il trealosio e glucosio, perché mantengono il diametro iniziale dei liposomi. Per entrambe le formulazioni, i campioni contenenti DOPC-DOTAP ed eccipienti mantengono il potenziale Zeta iniziale, quindi si ha una bassa probabilità di aggregazione una volta che i campioni sono ricostituiti. Un risultato opposto è stato osservato per le formulazioni contenenti DOPC-DOTAP-DSPE-PEG, perché si è passati da un potenziale Zeta di 21.3 mV prima delle prove di *freeze-thawing* ad un potenziale molto più basso, pari a 3.06 mV.

Tutti i campioni con il tween80 hanno al contrario mostrano un diametro medio inferiore ai 70 nm, perché le vescicole si sono fratturate e il tensioattivo ha diminuito la loro tensione superficiale [51]. In contrapposizione a tale fenomeno, si è ottenuto un potenziale Zeta molto basso per tutti i campioni, di conseguenza la probabilità che i campioni nel tempo tendano ad aggregare aumenta. Si pensa tuttavia che tale fenomeno sia stato meno influente rispetto a quello esercitato dal tween80. A seguito di questi risultati si è pensato di escludere questo tensioattivo per le prove di liofilizzazione, poiché il suo utilizzo non è stato utile al conseguimento dello scopo di questa Tesi.

A fronte di questo studio, si può dire che il congelamento come tecnica di conservazione vada evitato, in quanto restituisce fenomeni di rottura e aggregazione delle vescicole [8] o, comunque, un opportuno crio-protettore vada aggiunto.

Un'altra soluzione è stata quella di essiccare le vescicole mediante il processo di liofilizzazione. In questo processo bisogna proteggere i doppi strati lipidici dai danni causati dai cristalli di ghiaccio durante il congelamento, dall'inibizione dell'aggregazione delle vescicole dopo la disidratazione e bisogna evitare la transizione di fase durante la reidratazione, prestando attenzione all'incorporazione di aria durante la ricostituzione del prodotto liofilizzato [15]. I parametri chiave da controllare per l'ottimizzazione del processo di congelamento sono stati la temperatura di nucleazione, la velocità di raffreddamento e il grado di sottoraffreddamento [29], in quanto determinano la morfologia dei materiali congelati e il loro comportamento durante l'essiccamento. Durante l'essiccamento primario può verificarsi il collasso della torta liofilizzata e questo accade se si supera la temperatura di collasso della

formulazione che presenta qualche grado in più della temperatura di transizione vetrosa per un amorfo o temperatura eutettica per sistemi cristallini [29]. Tale fenomeno compromette la qualità e l'eleganza del prodotto, con annesso incremento dell'umidità residua e dei tempi di ricostituzione della matrice liofilizzata. I crioprotettori e lioprotettori devono quindi garantire la protezione dei liposomi e dei principi attivi durante le fasi di congelamento ed essiccamento, devono mantenere una struttura amorfa durante l'intero processo in modo da ridurre i fenomeni di aggregazione, non devono reagire con il principio attivo, devono assicurare una certa "eleganza" del prodotto finale e devono essere già stati approvati per scopi terapeutici [19].

Per calcolare la  $T_g$  di componenti amorfi o la  $T_{eu}$  di composti cristallini è stata utilizzata la tecnica di caratterizzazione DSC. Inoltre, è noto da letteratura che la temperatura di collasso corrisponde a qualche grado superiore della  $T_g$  per gli amorfi e della  $T_{eu}$  per le soluzioni cristalline [48]. Osservando i risultati ottenuti, si è potuto affermare che i liposomi non influenzano la  $T_{eu}$  della soluzione utilizzata per reidrattare costituita da acqua e fisiologica. Inoltre, per i campioni contenenti eccipienti si è potuto notare la presenza di temperature critiche molto basse a causa della presenza del sale (cloruro di sodio, NaCl), che va ad interagire con gli eccipienti [49].

Dopo le due liofilizzazioni di liposomi costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP e DOPC-DOTAP-DSPE-PEG con sei diversi eccipienti (cellobiosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, trealosio e glucosio), sono state effettuate le caratterizzazioni sui campioni grazie all'utilizzo della DLS per il calcolo del diametro medio e del potenziale Zeta, del microscopio in fluorescenza per l'ottenimento di risultati di tipo qualitativo, del NTA per ricavare i valori delle concentrazioni in funzione del diametro e della titolazione di Karl Fischer per la misura dell'umidità residua.

Da tali analisi è risultato che i liposomi con il DOPC-DOTAP-DSPE-PEG, per entrambe le liofilizzazioni effettuate, presentano un diametro medio sui 100 nm sia con gli eccipienti sia con gli eccipienti addizionati di mannitolo. I liposomi di DOPC-DOTAP in presenza di eccipienti hanno mantenuto tutti un diametro sui 100 nm nella prima liofilizzazione ma nella seconda i campioni sono stati riscontrati molto eterogenei in termini di diametro. Nello specifico quelli con il mannitolo hanno presentato un diametro molto grande (nell'ordine dei micron); tuttavia l'aggiunta del mannitolo ha permesso di aumentare l'eleganza della torta liofilizzata e di ridurre la velocità di ricostituzione dei prodotti [26]. Gli eccipienti aggiunti come trealosio, glucosio, saccarosio e cellobiosio hanno aiutato i liposomi a restare integri e sono stati capaci di rallentare la velocità di aggregazione. Il lattosio non ha dato ottimi risultati, a causa della formazione di grandi vescicole all'interno dei campioni. Per quanto riguarda l'umidità residua nei campioni, che secondo letteratura dovrebbe essere molto bassa, in genere meno dell'1% [27], si sono purtroppo riscontrati valori ben al di sopra. Questo risultato potrebbe essere conseguenza dell'assorbimento dell'umidità ceduta dal materiale del tappo o quella presente nell'ambiente a causa di una non perfetta chiusura dei flaconi. Un altro aspetto fondamentale è che la maggior parte delle matrici liofilizzate sono collassate e in conseguenza di questo evento, la percentuale di acqua che resta intrappolata aumenta [20]. Per quanto riguarda i valori dei potenziali Zeta, una volta ricostituiti i campioni con soluzione fisiologica e acqua, si sono attestati tutti nell'intorno di 0 mV, quindi tutti i campioni dopo il processo di liofilizzazione hanno aumentato la probabilità di sviluppare fenomeni di aggregazione una volta ricostituiti.

In conclusione, si può dire che la tecnica cardine da adottare per la conservazione dei liposomi è proprio la liofilizzazione, ma con l'utilizzo necessario di trealosio o saccarosio al fine di proteggere le vescicole dalle problematiche che insorgono nelle fasi di congelamento, di essiccamento primario e secondario e con l'aggiunta di una piccola percentuale di mannitolo,

in modo da ridurre i fenomeni di collasso. Inoltre, la formulazione che garantisce un'alta stabilità nel tempo, sia prima che dopo tale processo, è costituita da liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG in acqua e fisiologica, preparati tramite processi di sonicazione ed estrusione.

## Bibliografia

- [1] Kreuter J., “Nanoparticles as Drug Delivery Systems”, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004, 7, pp.161-180.
- [2] Limongi T., Susa F., Cauda V., “Nanoparticles for hematologic diseases detection and Treatment”, *Hematology & Medical Oncology*, 2019, 4(3), 1015761.
- [3] Maier-Hauff K., Ulrich F., Nestler D., Niehoff H., Wust P., Thiesen B., Orawa H., Budach V., Jordan A., “Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme”, *Journal of Neuro-Oncology*, 2011, 103(2), pp.317-324.
- [4] Qinqin H., Hua L., Lihua W., “DNA Nanotechnology-Enabled Drug Delivery Systems”, *Chemical Reviews*, 2019, 119(10), pp.6459-6506.
- [5] Sercombe L., Veerati T., Moheimani F., Sherry Y. W., Sood A. k., Susan Hua S., “Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery”, 2015, *Frontiers in Pharmacology*, 6, 10.3389.
- [6] Limongi T., Canta, M., Racca L., Ancona A., Tritta S., Vighetto V., Cauda V., “Improving dispersal of therapeutic nanoparticles in the human body” *Nanomedicine*, 14(7), pp.797-801.
- [7] Locatelli E., Franchini M.C., “Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system”, *Journal of Nanoparticles Research*, 2012, 14, pp.1-17.
- [8] “FAQs”, Avanti Polar lipid, <https://avantilipids.com>, consultato 1 novembre 2019.
- [9] Wu I.Y., Bala S., Skalko-Basnet N., di Cagno M.P. , “Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 138, 105026 .
- [10] Nikpoor A.R., Jaafari MR., Zamani P., Teymouri M., Gouklani H., Saburi E., Darban S.A., Badiee A., Bahramifar A., Fasihi-Ramandi M., Taheri R.A., “Cell cytotoxicity, immunostimulatory and antitumor effects of lipid content of liposomal delivery platforms in cancer immunotherapies. A comprehensive in-vivo and in-vitro study”, *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 567, 118492.
- [11] Canavese G., Ancona A., Racca L., “Nanoparticle-assisted ultrasound: a special focus on sonodynamic therapy against cancer”, *Chemical Engineering Journal* ,2018, 340, pp.155–172.
- [12] DeRosa F, Guild B, Karve S, Smith L, Love K, “Therapeutic efficacy in a hemophilia B model using a biosynthetic 2016 ,23(10), pp. 699-707.
- [13] Hu C., Fang R., Luk B., Zhang L., “Polymeric nanotherapeutics: clinical development and advances in stealth functionalization strategies”, *Nanoscale*, 2014, 6(1), 65–75.
- [14] Martynov G., “Stability of colloids and the Deryagin-Landau-Verwey-Overbeek theory of surface forces (DLVO)”, *Russian Journal of Physical Chemistry* , 73(10), pp.1567-1576.
- [15] Chen Chengjun, Han Dandan, Cai Cuifang, “An overview of liposome lyophilization and its future potential”, *Journal of controlled release*, 2010, 142(3), pp.299-311
- [16] Stark Brigitte, Pabst Georg, Prassl Ruth, “Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 41(3-4), pp.546-555.

- [17] Pisano R., “Alternative methods of controlling nucleation in freeze drying”, *Methods in Pharmacology and Toxicology*, 2019, pp.79-111.
- [18] Kannan V., Balabathula P., Thoma L.A., Wood G.C., “Effect of sucrose as a lyoprotectant on the integrity of paclitaxel-loaded liposomes during lyophilization”, *Journal of Liposome Research*, 2015, 25(4), pp. 270-278.
- [19] Crowe Jh, Crowe Lm, Carpenter Jf, “Stabilization of dry phospholipid-bilayers and proteins by sugars”, *Biochemical Journal*, 1987, 242(1), pp.1-10.
- [20] Wolfgang Mehnert, Karsten Mäder,” Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, pp.83-101.
- [21] Hayashi H., “Drying Technologies of Foods -Their History and Future”, *Drying Technology*, 1989, 7(2) pp.315-369.
- [22] Gupta D., Singh A. K., Dravid A., “Multiscale Porosity in Compressible Cryogenically 3D Printed Gels for Bone Tissue Engineering”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(22), pp. 20437-20452.
- [23] Papillo V,A., Locatelli M., Travaglia F., Bordiga M., Garino C., Arlorio M., Coisson J.D., “Spray-dried polyphenolic extract from Italian black rice (*Oryza sativa* L., var. Artemide) as new ingredient for bakery products”, *Food Chemistry*, 2018, 269, pp.603-609.
- [24] Sheng F., Chow P.S., Dong Y.C., Heng D., Lee S.H., Tan R.B.H., “Continuous and Scalable Process for the Production of Hollow Crystals of a Poorly Water-Soluble Active Pharmaceutical Ingredient for Dissolution Enhancement and Inhaled Delivery”, *Crystal Growth & Design*, 19(6), pp. 3402-3409.
- [25] Krishnakumar G.S., Gostynska N., Campodoni E., Dapporto M., Montesi M., Panseri S., Tampieri A. Kon E., Marcacci M., Sprio S., Sandri M., “Ribose mediated crosslinking of collagen-hydroxyapatite hybrid scaffolds for bone tissue regeneration using biomimetic strategies”, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2017, 77, pp. 594-605.
- [26] Telang C., Yu L., Suryanarayanan R., “Effective inhibition of mannitol crystallization in frozen solutions by sodium chloride”, *Pharmaceutical Research*, 2003 Apr;20(4):660-7.
- [27] Pisano R., Fissore D., Barresi A., “Heat Transfer in Freeze-Drying Apparatus. Developments in Heat Transfer”, InTechOpen publisher, 2011, pp. 91-114.
- [28] Khairnar, S., Kini, R., Harwalkar, M., Dr. Salunkhe, K., & Dr. Chaudhar, S. R., “A Review on Freeze Drying Process of Pharmaceuticals. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*”, 2013, 4(1), pp.76-94.
- [29] Franks F., “Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals”, Londra, RSCPublishing, 2007, pp.1-201.
- [30] Geidobler R., Winter G. “Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying:Fundamentals and technology review”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, 85(2), pp.214-222.
- [31] Bhatnagar B.S, Bogner R.H, Pikal M.J., “Protein Stability During Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization.” *Pharmaceutical Development and Technology*, 2007, 12(1), pp.505–23.
- [32] Kasper J. C., Friess W., “The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality

attributes of biopharmaceuticals”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, 78(2), pp.248-263.

[33] Rupley J.A., Careri G., “Protein hydration and function”, *Advanced Protein Chemistry*, 1991, 41(1), pp.37-173.

[34] Prasanthan P., Kishore N., “ Combined effect of equimolal osmolytes trehalose and glycine on stability of hen egg-white lysozyme: Quantitative mechanistic aspects”, *Journal of molecular liquids*, 2019, 278, pp.477-483.

[35] “Zetasizer Nano User Manual”, Malvern, 2013, pp.1-250.

[36] Chibowski E., Szcześ A., “Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme”, 2016, 22(4-6), pp.755-765.

[37] Rost F., “Fluorescence microscopy”, Cambridge University Press, Cambridge, 1995, 2, pp.1-457.

[38] “Piattaforma all'avanguardia per imaging avanzato”, Nikon, <https://www.microscope.healthcare.nikon.com>, consultato il 10 ottobre 2019.

[39] Shimizu Y., and Takenaka H., “Microscope objective design”, *Advances in Optical and Electron Microscopy*, 1994, 14, pp. 249-334.

[40] Chen Y.S., “Nanoparticle Tracking Analysis”, Malvern, <https://www.malvernpanalytical.com>, consultato il 12 ottobre 2019.

[41] “Discover DSC Systems”, TA Instruments, <https://pdf.directindustry.com>, consultato il 7 ottobre 2019.

[42] Meister E., Gieseler H., “Freeze-Dry Microscopy of Protein/Sugar Mixtures: Drying Behavior, Interpretation of Collapse Temperatures and a Comparison to Corresponding Glass Transition Data”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 98(9), pp. 3072-3082.

[43] Meister, Eva; Gieseler, Henning, “Freeze-Dry Microscopy of Protein/Sugar Mixtures: Drying Behavior, Interpretation of Collapse Temperatures and a Comparison to Corresponding Glass Transition Data”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 98(9), pp. 3072-3087.

[44] “REVO® Research and Development Freeze Dryer”, Millrocktech, consultato il 9 ottobre 2019.

[45] “Compact Karl Fischer Moisture Meter CA-31”, Mitsubishi Chemical Analytech, <https://www.mccat.co.jp>, consultato il 20 novembre 2019.

[46] Cheung, Calvin C. L.; Al-Jamal, Wafa T., “ Sterically stabilized liposomes production using staggered herringbone micromixer: Effect of lipid composition and PEG-lipid content”, *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 566, pp.687-696.

[47] Papageorgiou F., Natassa P., Nikolaos N., “Physicochemical study of the protein–liposome interactions: influence of liposome composition and concentration on protein binding”, *Journal of liposome research*, 2019, 101080.

[48] Tierney, K.J., Block, D.E., and Longo, M.L., 2005. Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol and ethanol. *Biophysical journal*, 89 (4), 2481–2493.

[49] Startzel P., Gieseler H., Gieseler M., Abdul-Fattah A.M., Adler M., Mahler H. C., Goldbach P., “Mannitol/L-Arginine-Based Formulation Systems for Freeze Drying of Protein Pharmaceuticals: Effect of the L-Arginine Counter Ion and Formulation Composition on the

Formulation Properties and the Physical State of Mannitol”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 105(10), pp. 3123-3135.

[50] Senior J., “Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability?”, *FEBS Lett*, 1982, 145(1), pp.109–14.

[51] Gizawy S.A, Maghraby G. M., Hedaya A.A., “Formulation of acyclovir-loaded solid lipid nanoparticles: design, optimization, and in-vitro characterization”, *Pharmaceutical Development and Technology*, 2019, 24(10), pp.1287-1298

[52] Oja C.D.M., Semple S.C., Chonn A., “Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins”, *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1281(1), pp.31–7.

[53] Drummond D.C., Meyer O., Hong K., “Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors”, *Pharmacol Rev*, 1999, 51(4), pp.691–743.

[54] Funato K., Yoda R., Kiwada H., “Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma”, *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1103(2), pp.198-204.

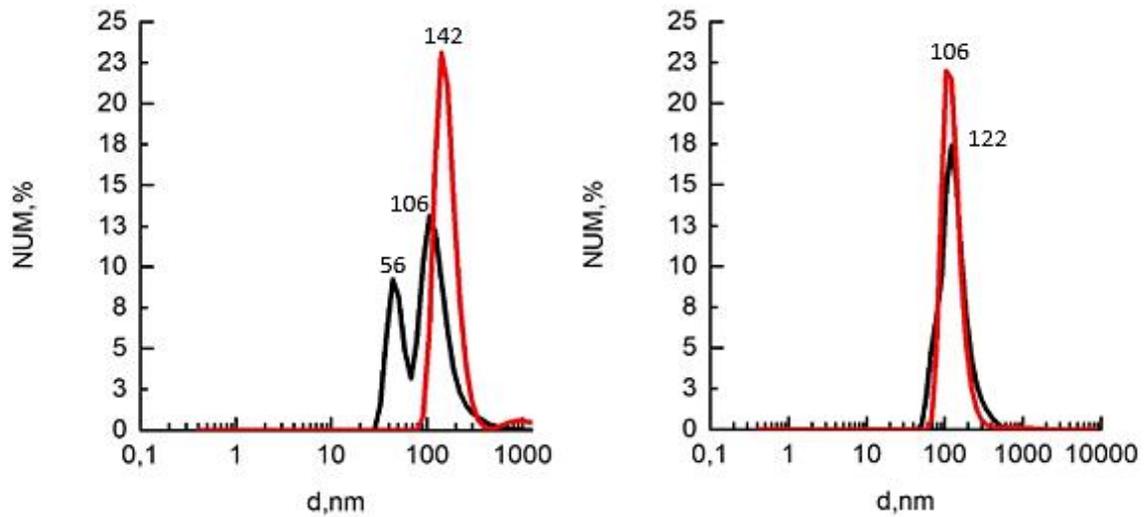
[55] Chibowski E., Szczes´ A., “Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme”, *adsorption-journal of the international adsorption society*, 2016, 22(4-6), PP. 755-765.

[56] Siew, A., “Controlling Ice Nucleation During the Freezing Step of Lyophilization. *Pharmaceutical Technology*”, 2013, 37(5), p. 36-40.

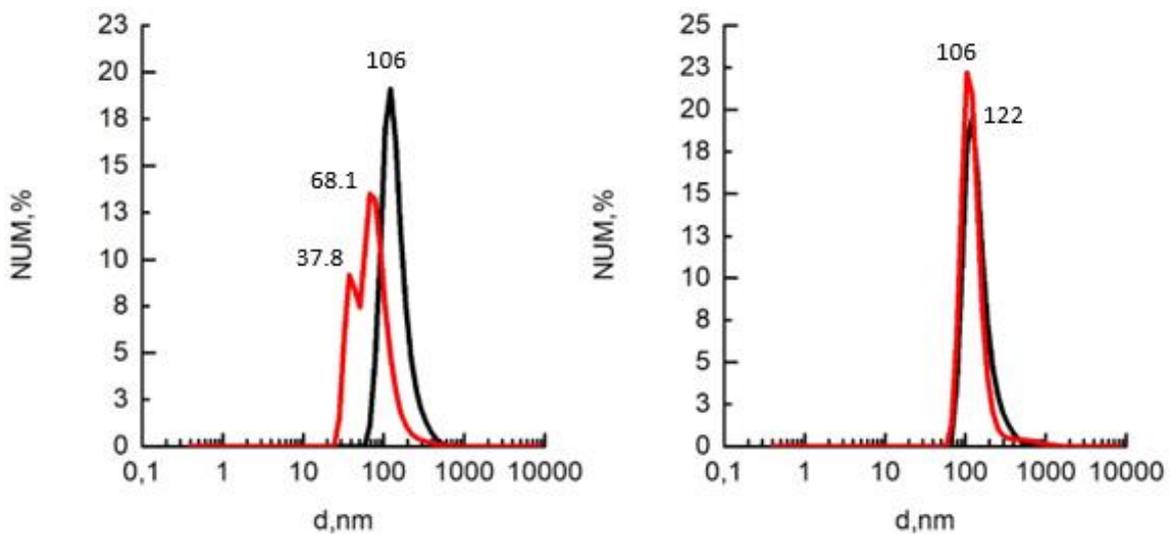
[57] Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Niranjana Babu, M., & Lavakumar, V., “Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*”, 2013, 3(4), 87-98.

[58] Fissore, D., Pisano, R., Barresi, A., “Process Analytical Technology for Monitoring Pharmaceutical Freeze-drying—A Comprehensive Review”, *Drying Technology*, 2018, 36(15), pp. 1839-1865.

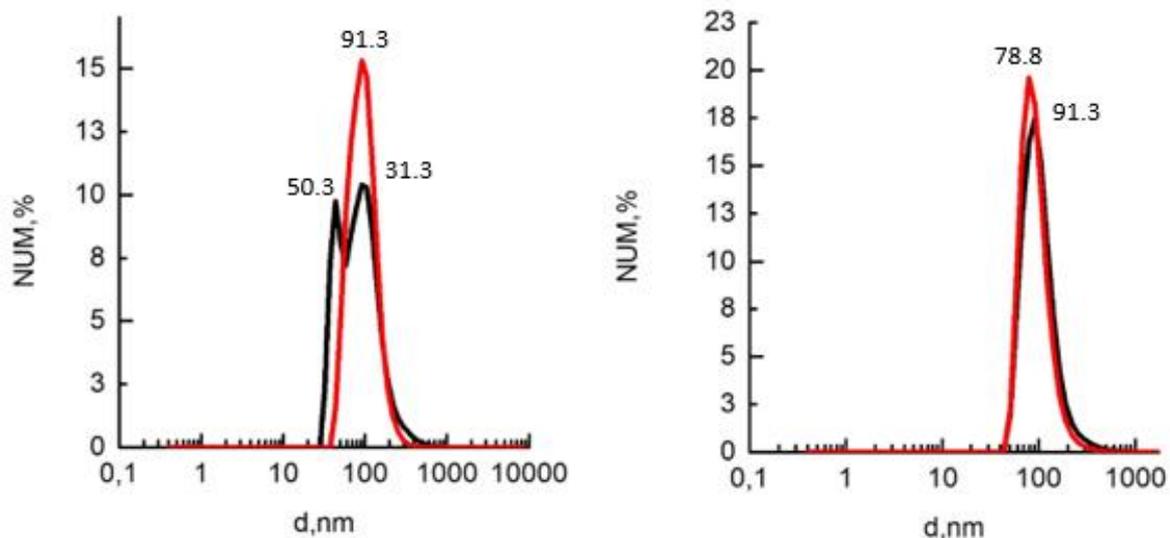
## Appendice



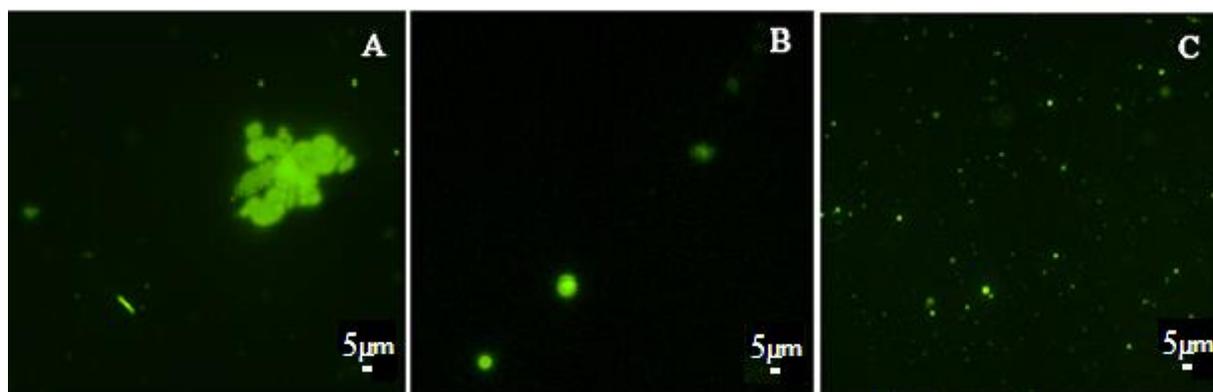
**Figura A.1:** Il grafico di sinistra mostra liposomi di DOPC estrusi mentre in quello di destra sono sia sonicati che estrusi. Entrambi ricavati alla DLS e mettono in relazione la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro. Il picco rosso mostra campioni in acqua e fisiologica (1:1) mentre il picco nero raffigura le soluzioni in acqua.



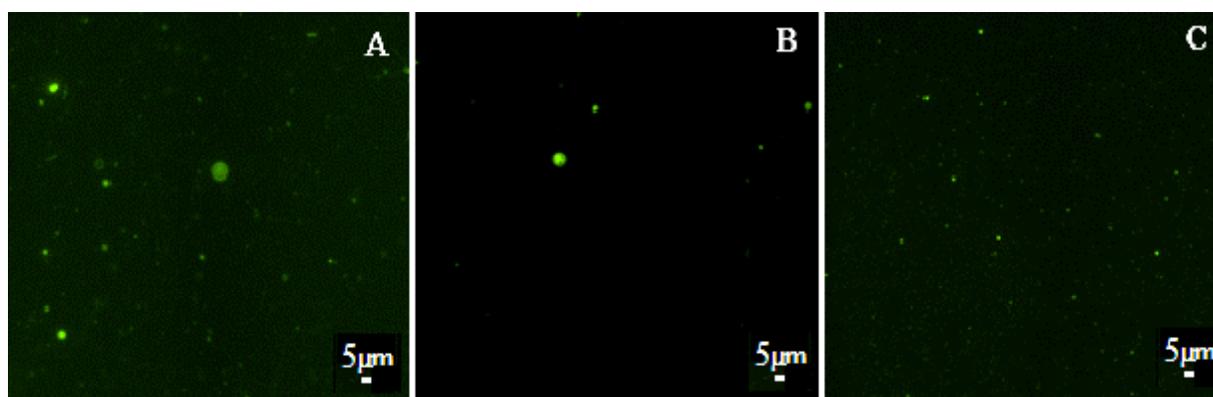
**Figura A.2:** Il grafico di sinistra mostra liposomi di DOPC-DOTAP estrusi mentre in quello di destra sono sia sonicati che estrusi. Entrambi ricavati alla DLS e mettono in relazione la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro. Il picco rosso mostra campioni in acqua e fisiologica (1:1) mentre il picco nero raffigura le soluzioni in acqua.



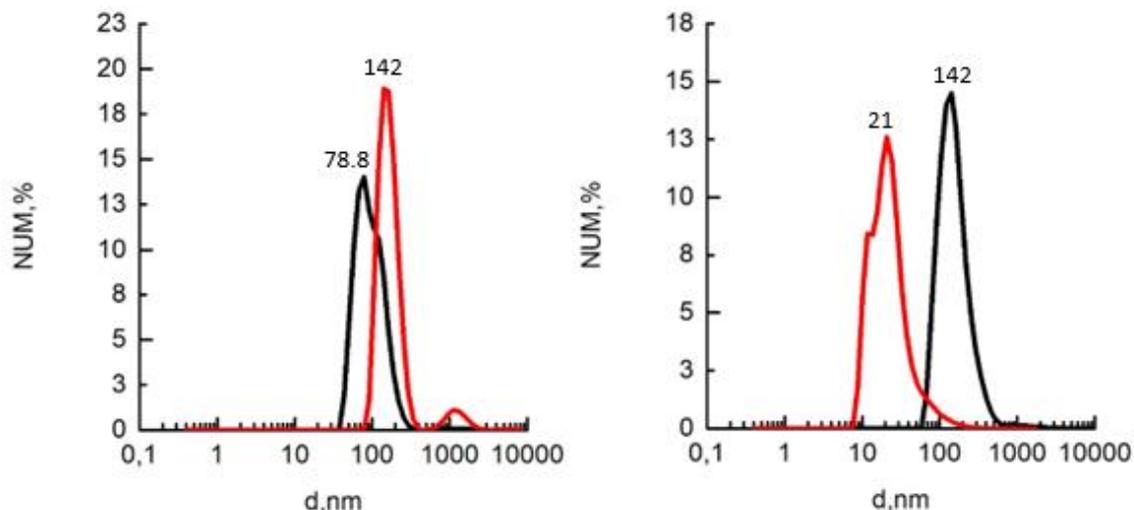
**Figura A.3:** Il grafico di sinistra mostra liposomi di DOPC-DSPE-PEG estrusi mentre in quello di destra sono sia sonicati che estrusi. Entrambi ricavati alla DLS e mettono in relazione la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro. Il picco rosso mostra campioni in acqua e fisiologica (1:1) mentre il picco nero raffigura le soluzioni in acqua.



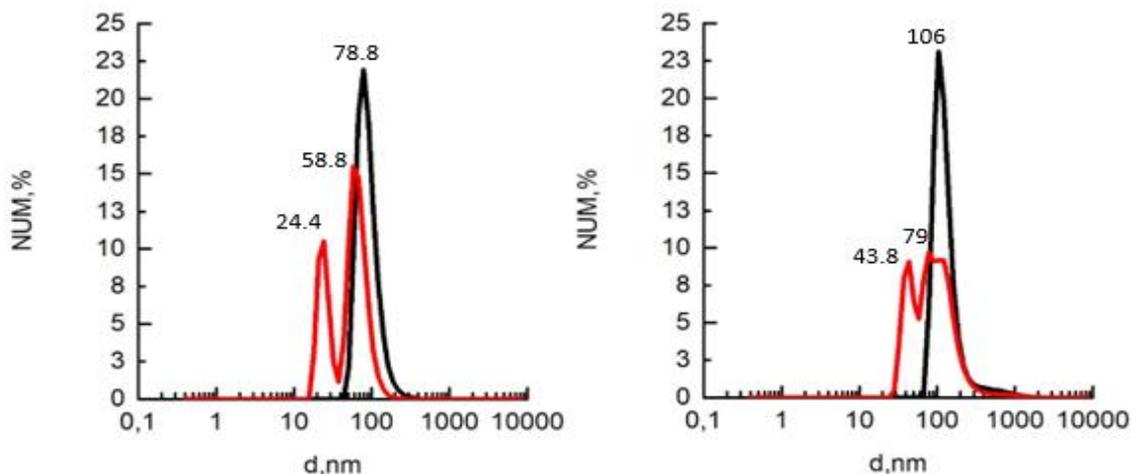
**Figura A.4:** Mostra liposomi di DOPC analizzati al microscopio in fluorescenza in acqua e fisiologica (A); sonicati a 40kHz per 20 min (B) ed estrusi con un filtro da 0.2 μm (C).



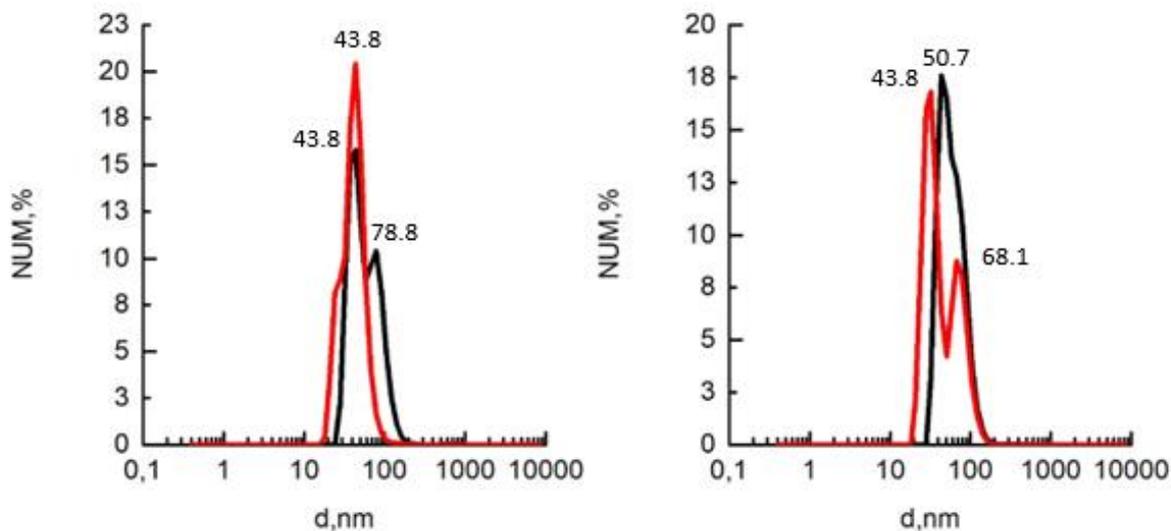
**Figura A.5:** Mostra liposomi di DOPC-DSPE-PEG analizzati al microscopio in fluorescenza in acqua e fisiologica (A); sonicati a 40kHz per 20 min (B) ed estrusi con un filtro da 0.2 μm (C).



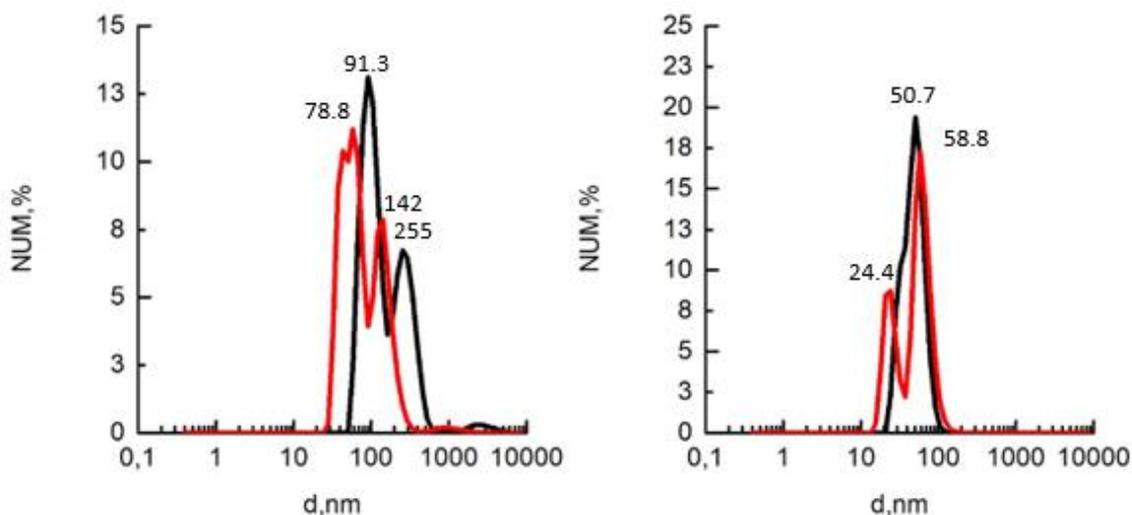
**Figura A.6:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



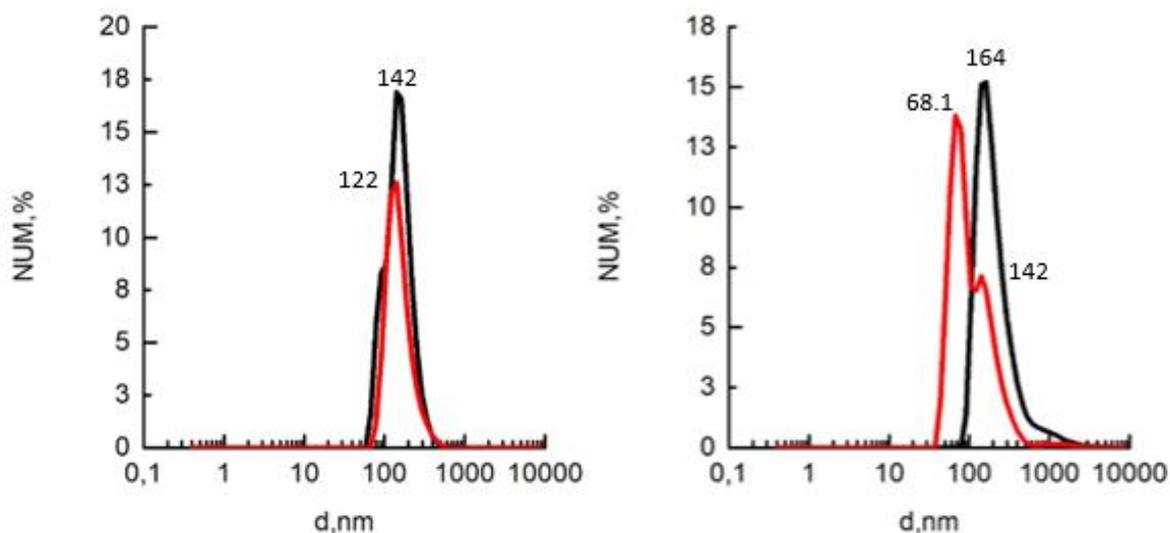
**Figura A.7:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



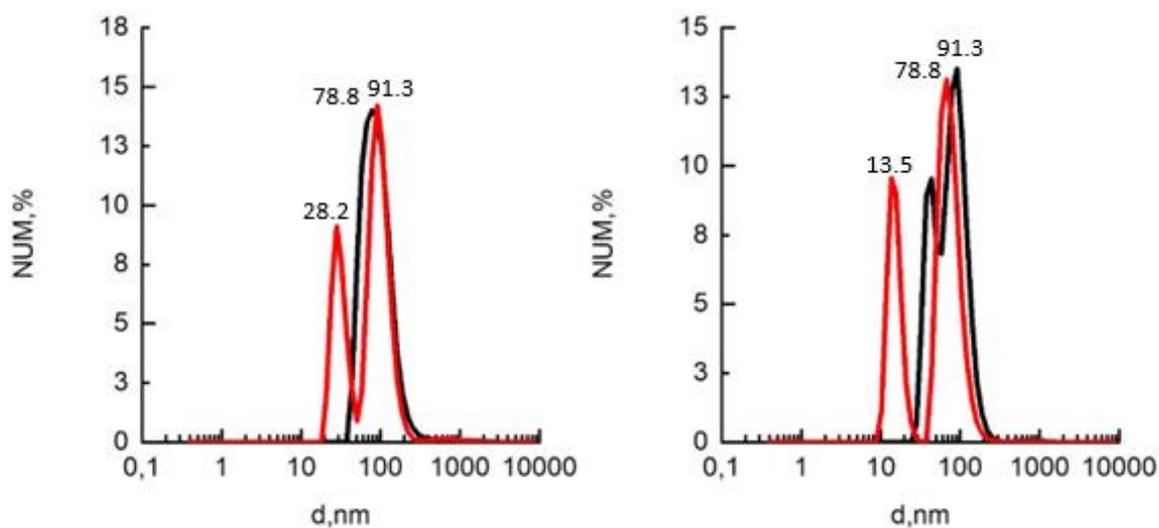
**Figura A.8:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-cellobiosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



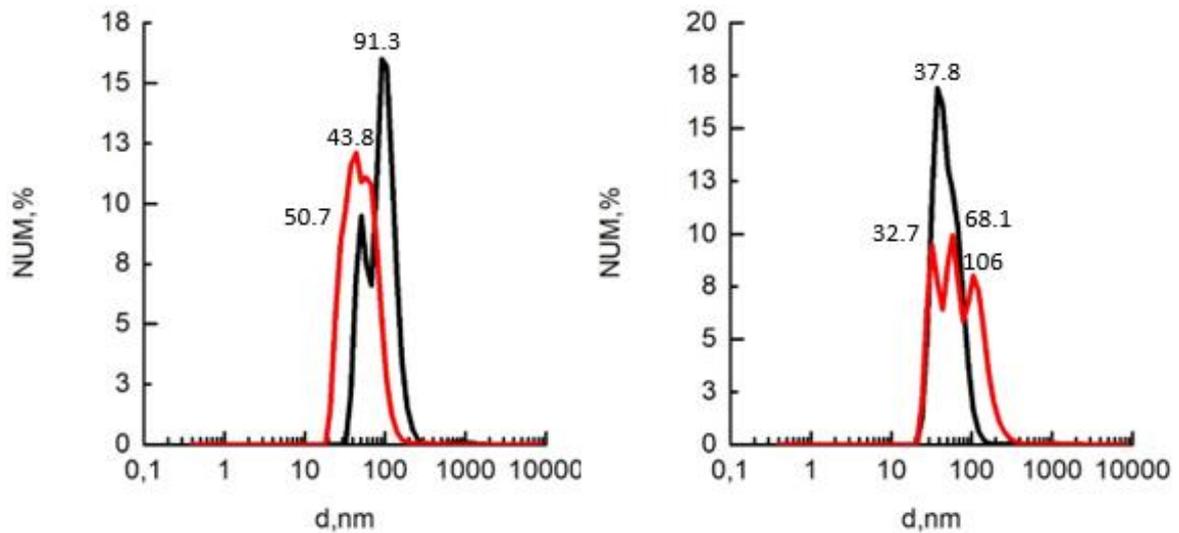
**Figura A.9:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-lattosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



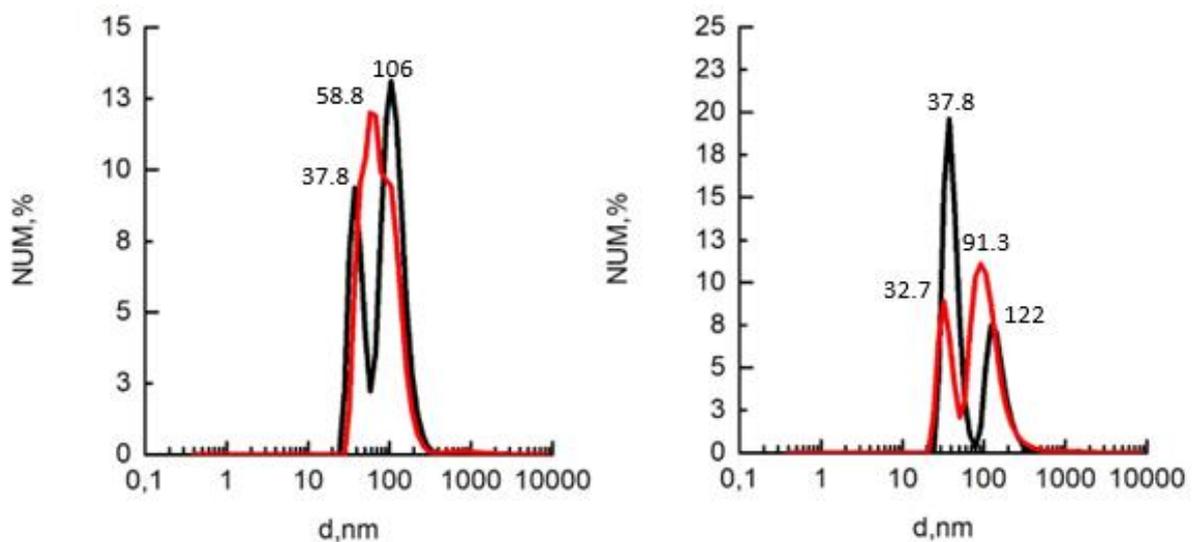
**Figura A.10:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-mannitolo sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



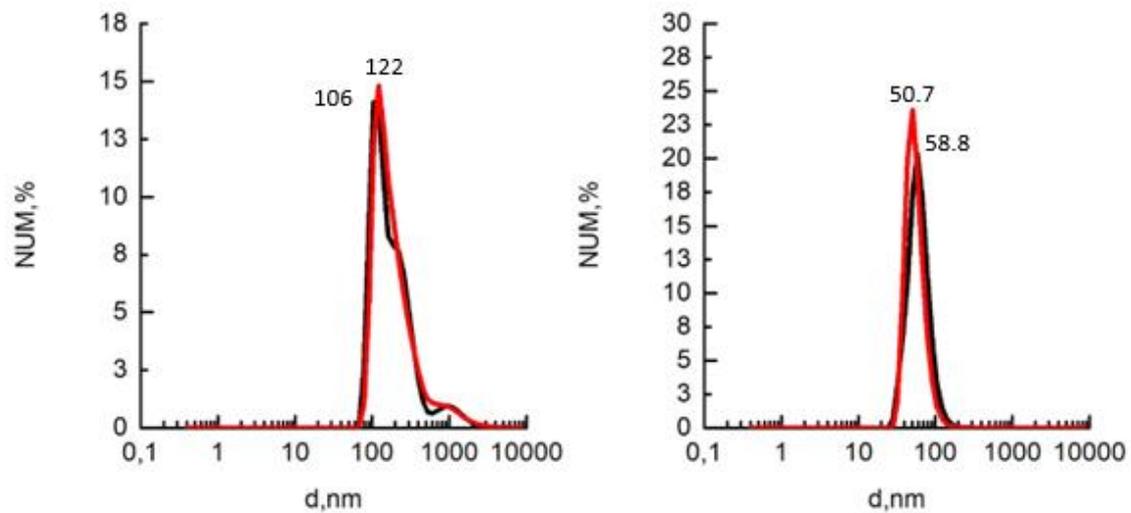
**Figura A.11:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-mannitolo sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



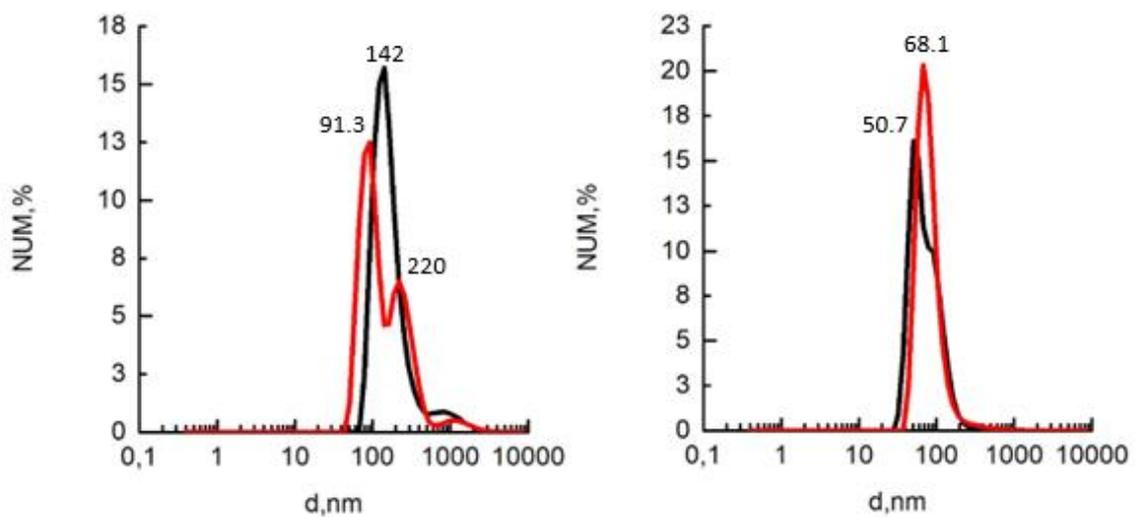
**Figura A.12:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-glucosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



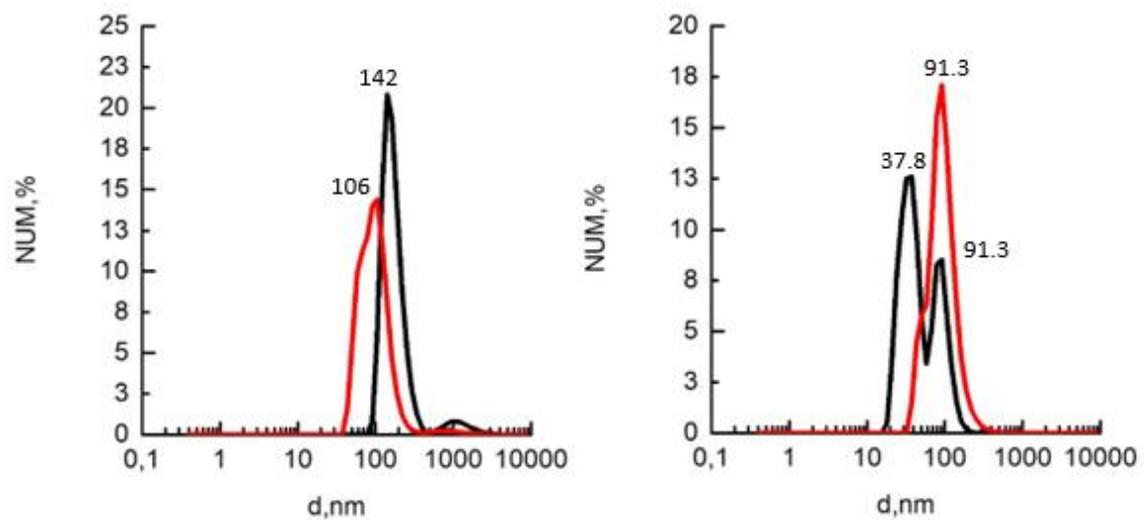
**Figura A.13:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-saccarosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



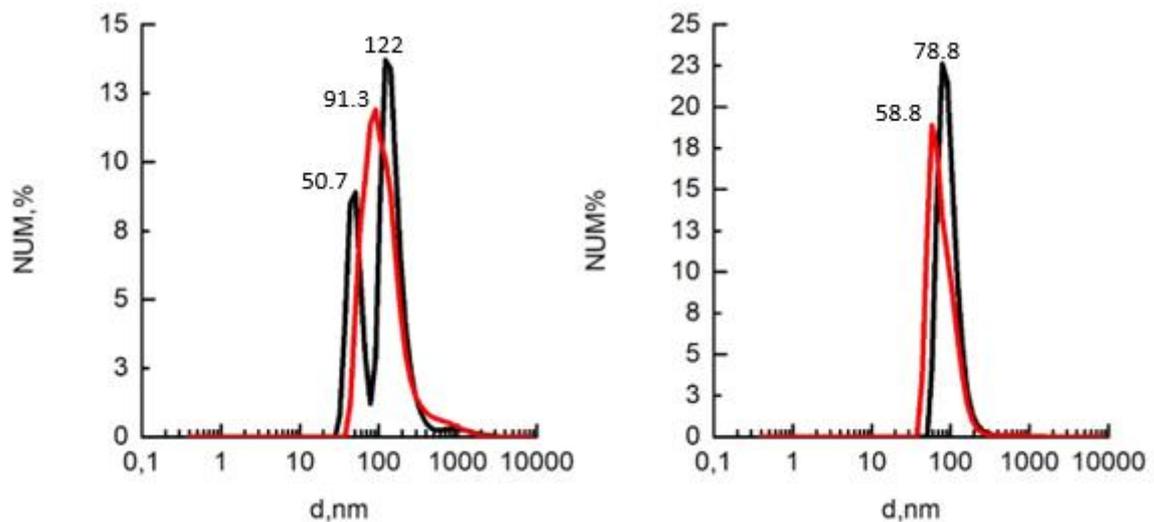
**Figura A.14:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



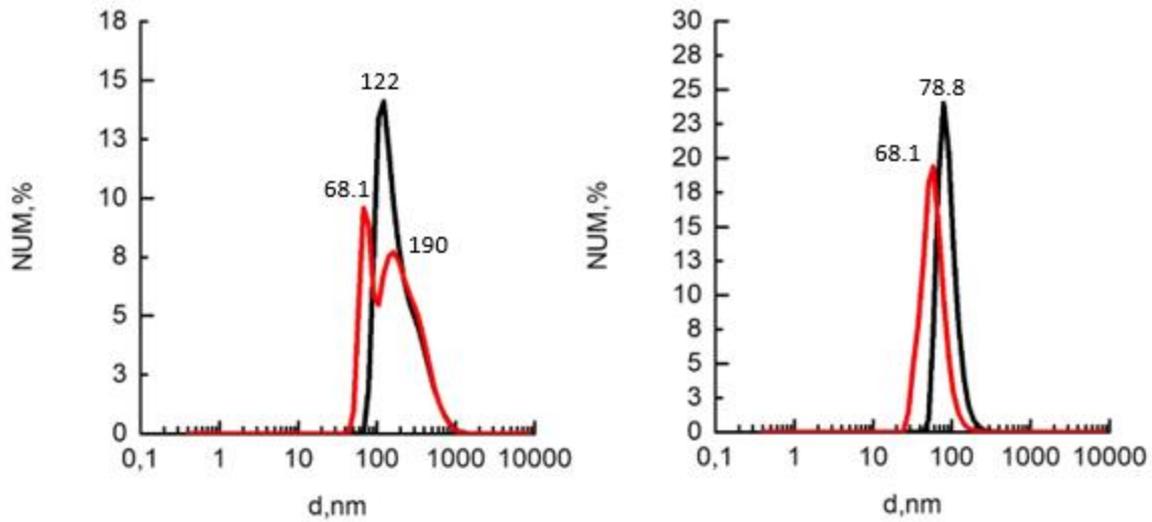
**Figura A.15:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



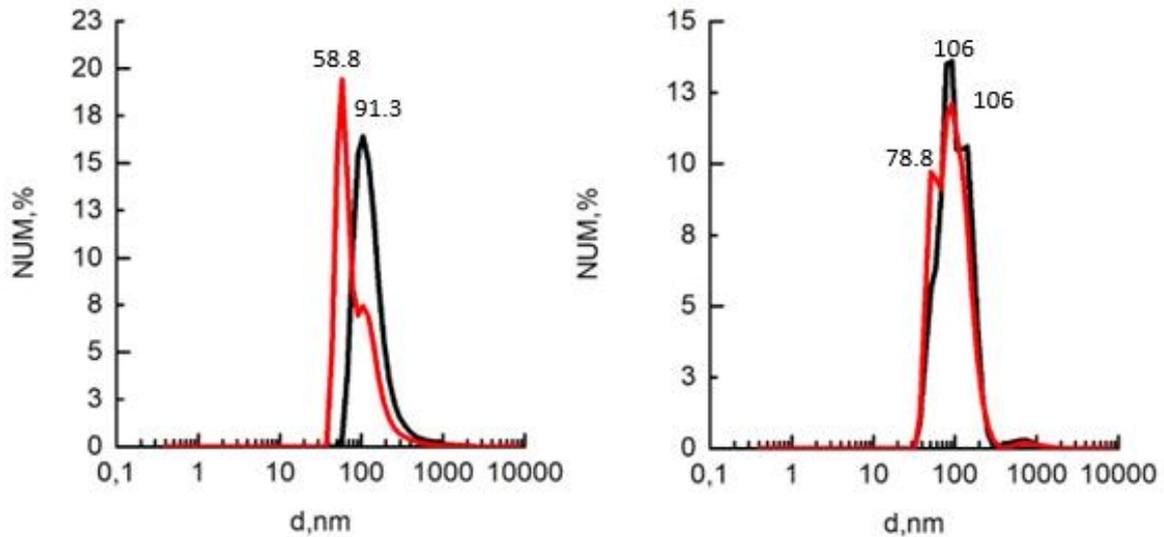
**Figura A.16:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



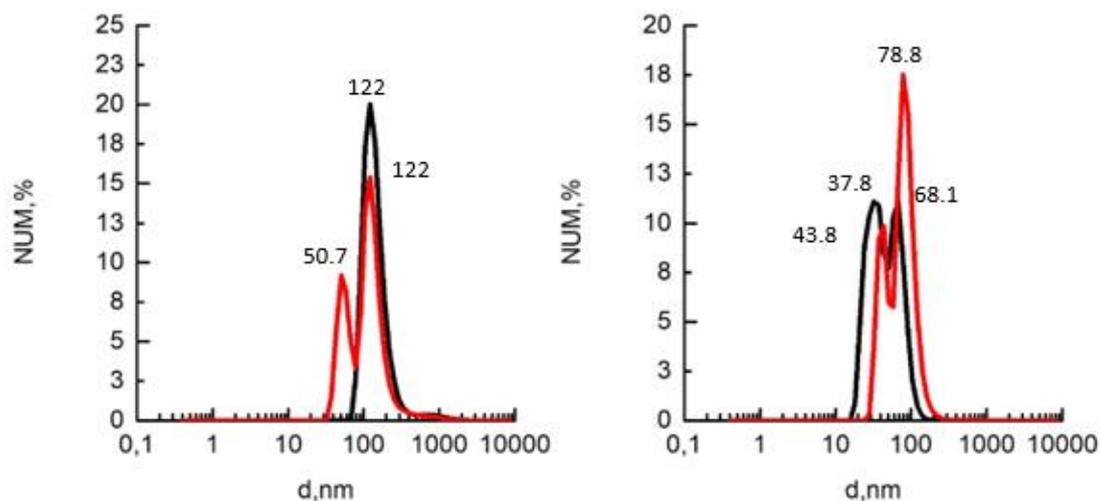
**Figura A.17:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



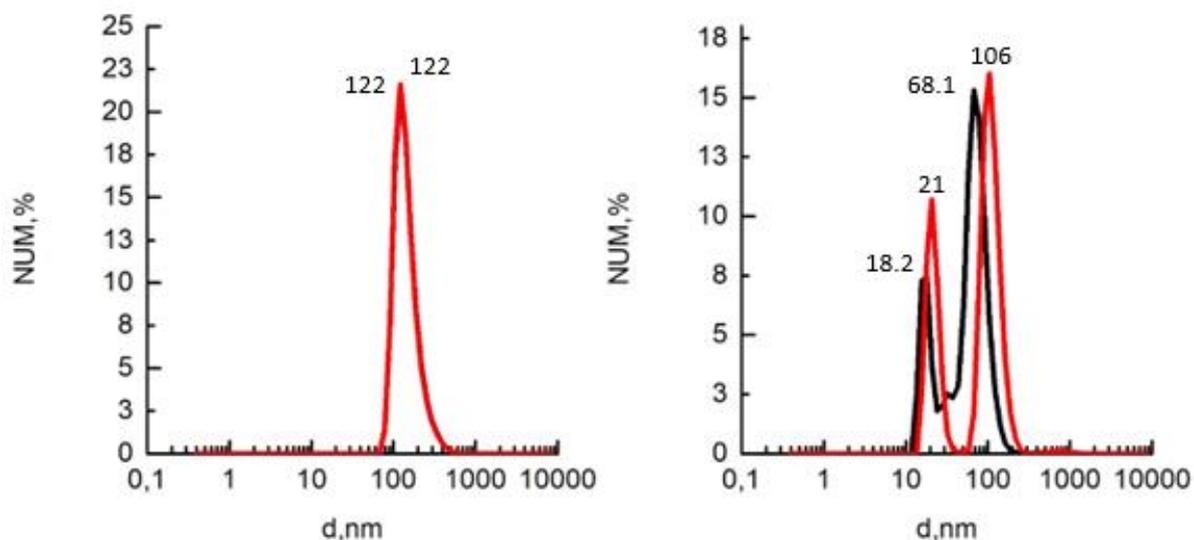
**Figura A.18:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



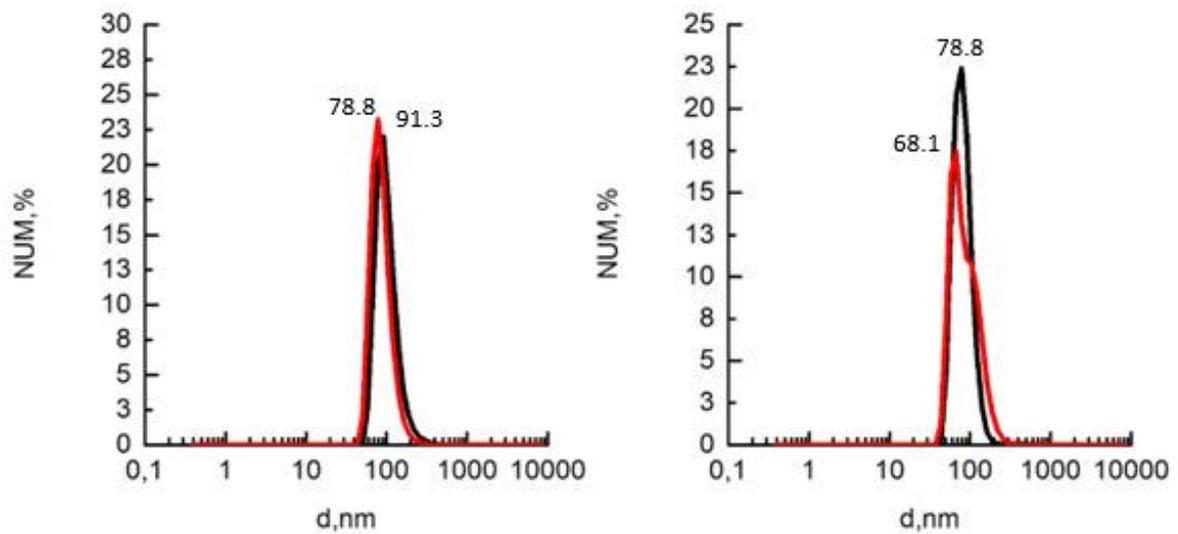
**Figura A.19:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce.



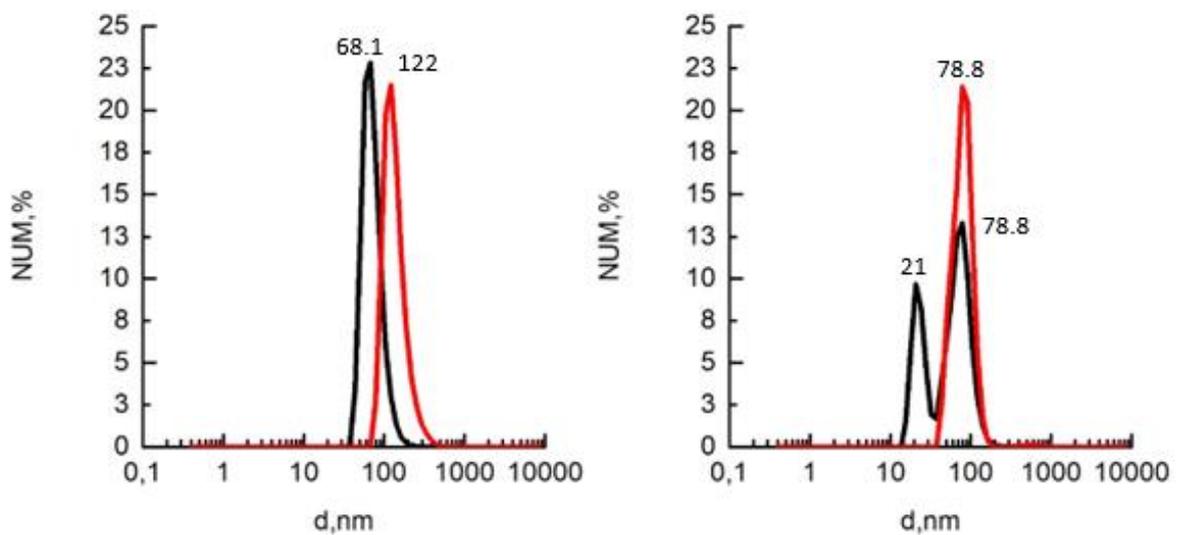
**Figura A.20:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce.



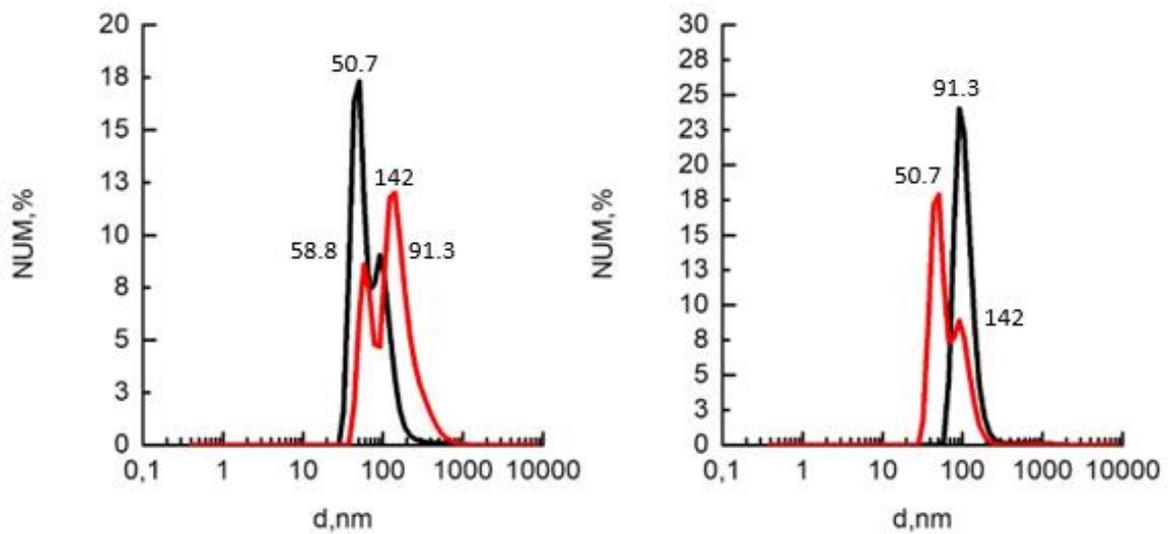
**Figura A.21:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce.



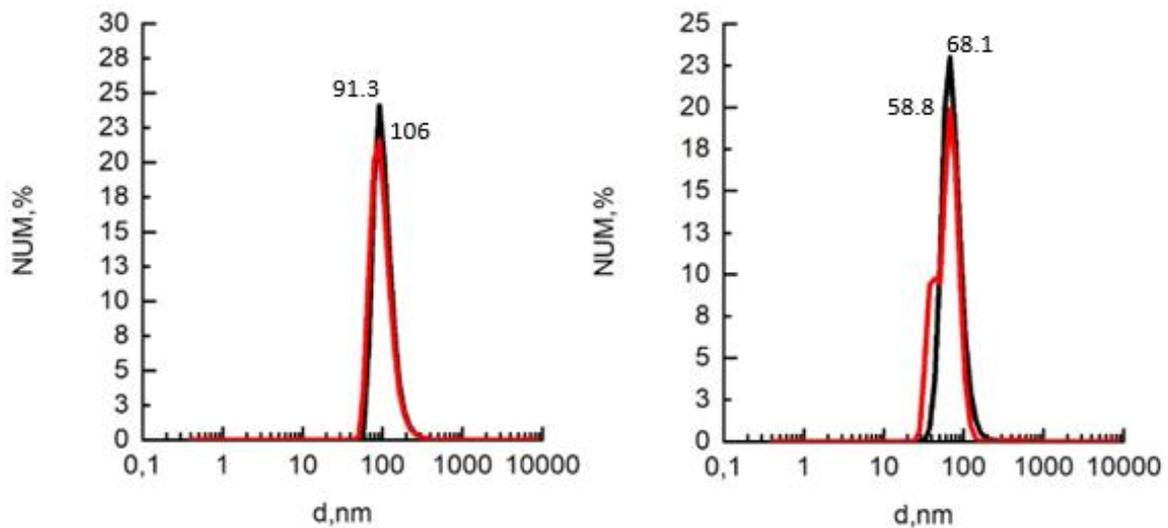
**Figura A.22:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce.



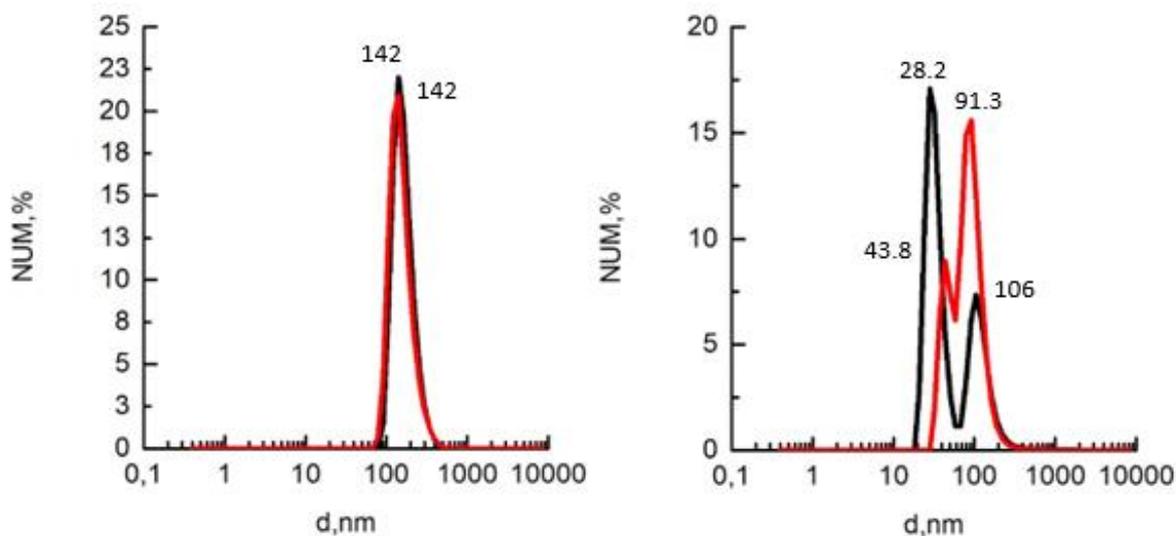
**Figura A.23:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce.



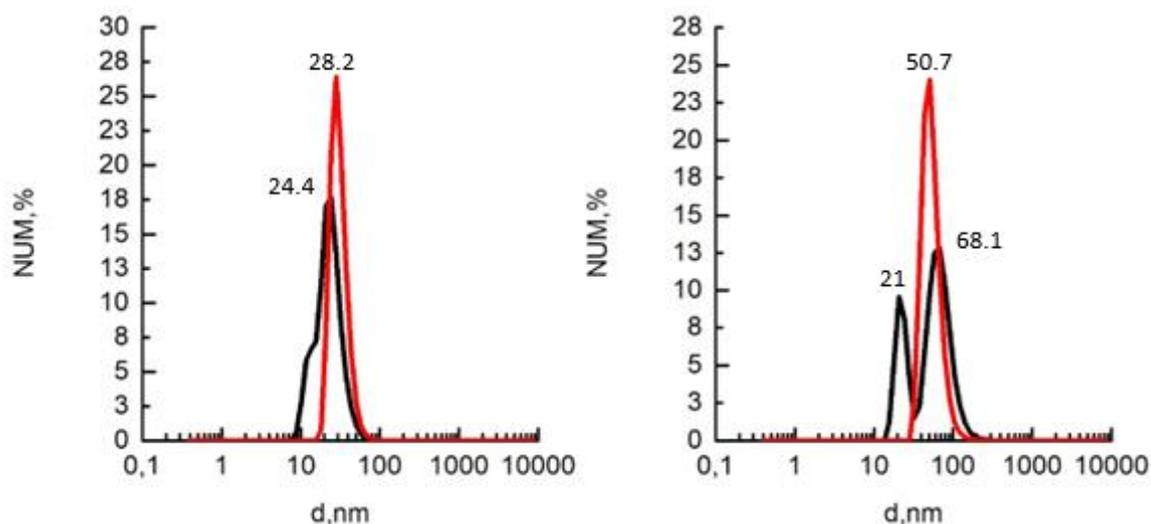
**Figura A.24:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce.



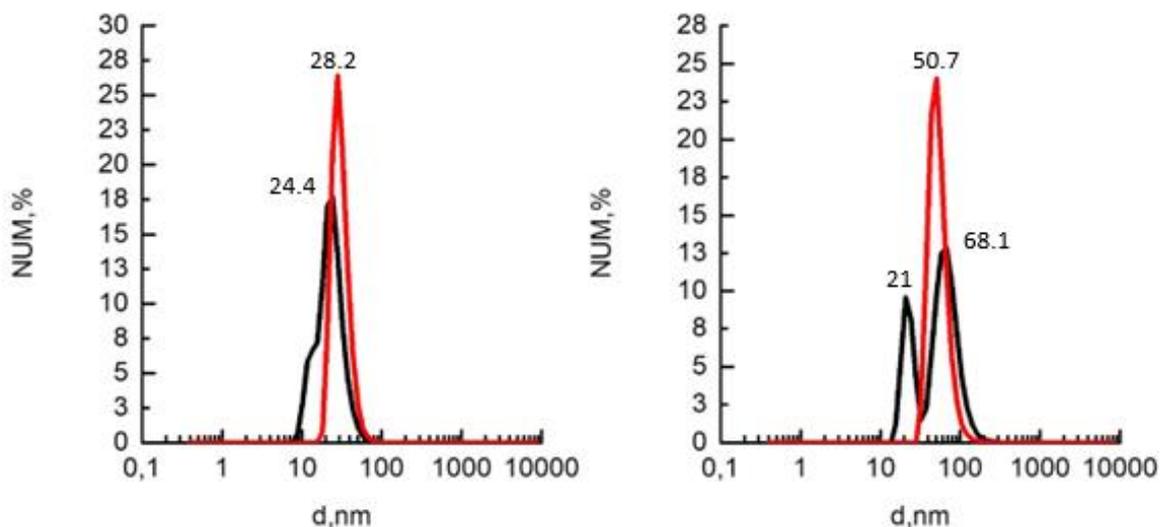
**Figura A.25:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce.



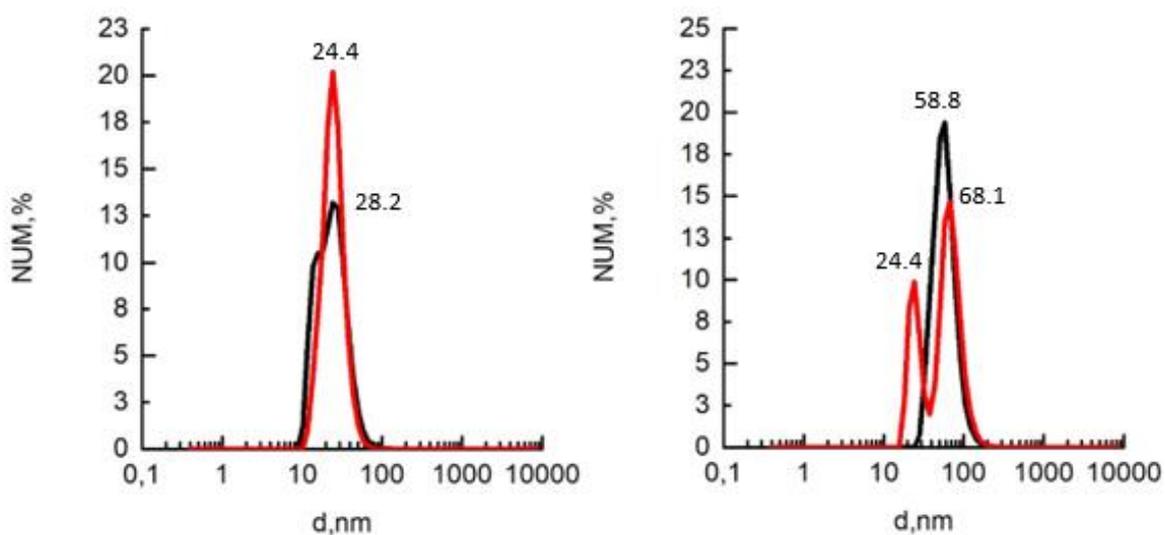
**Figura A.26:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di quattro campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento veloce.



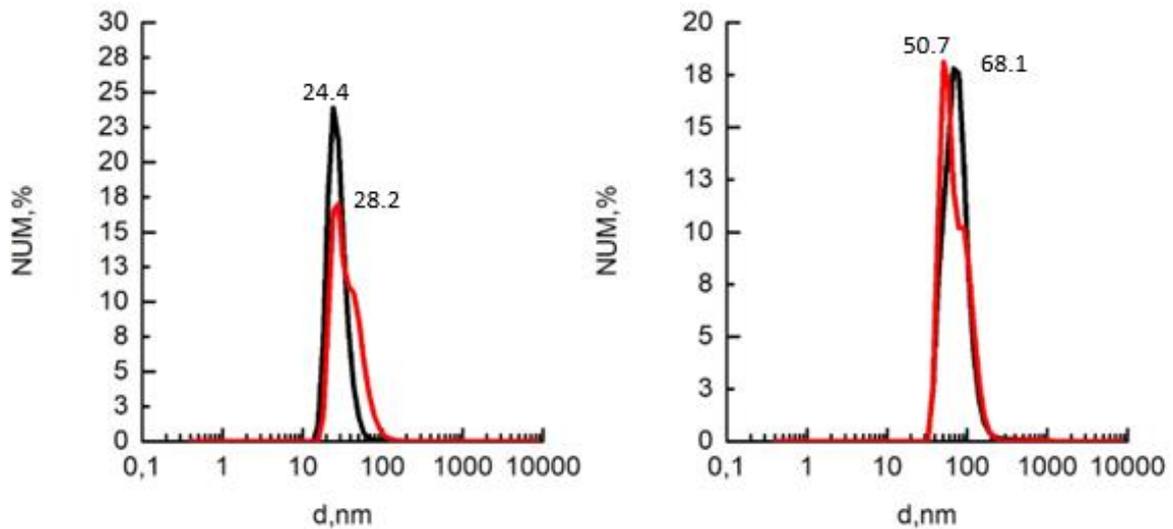
**Figura A.27:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



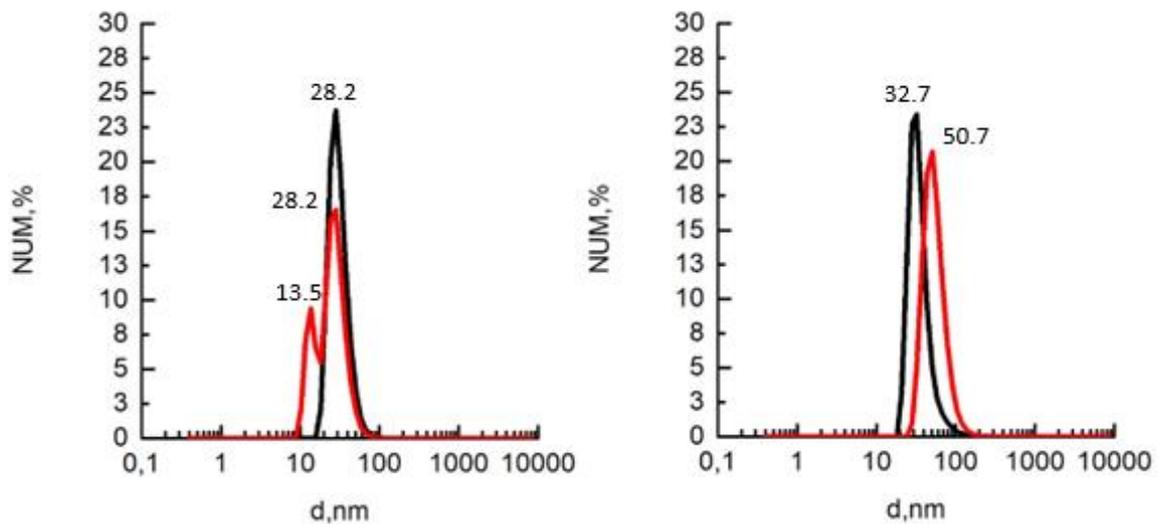
**Figura A.28:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di cellobiosio e tween80, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



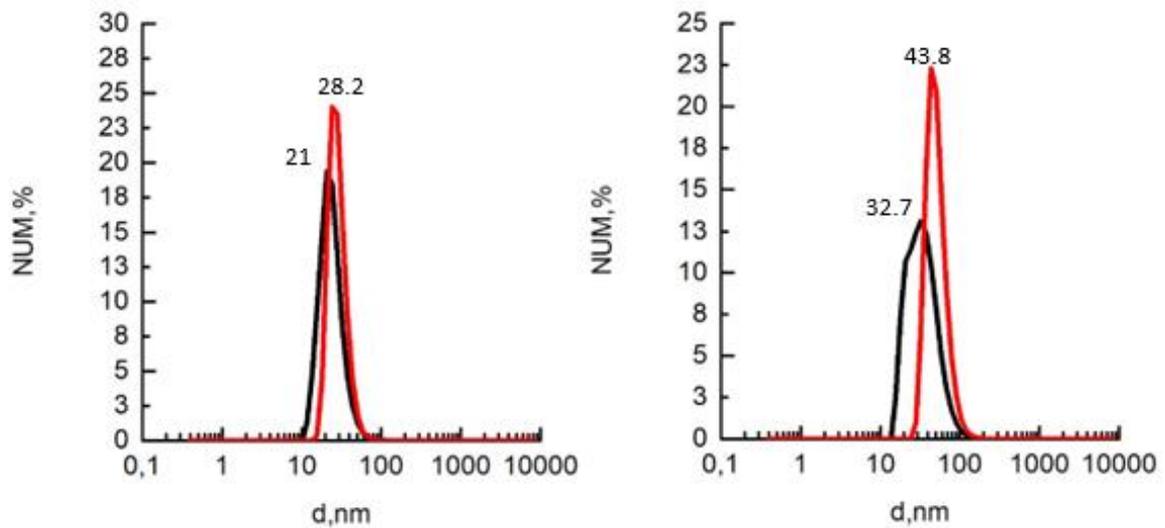
**Figura A.29:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP-trealosio-tween80 (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di trealosio e tween80, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



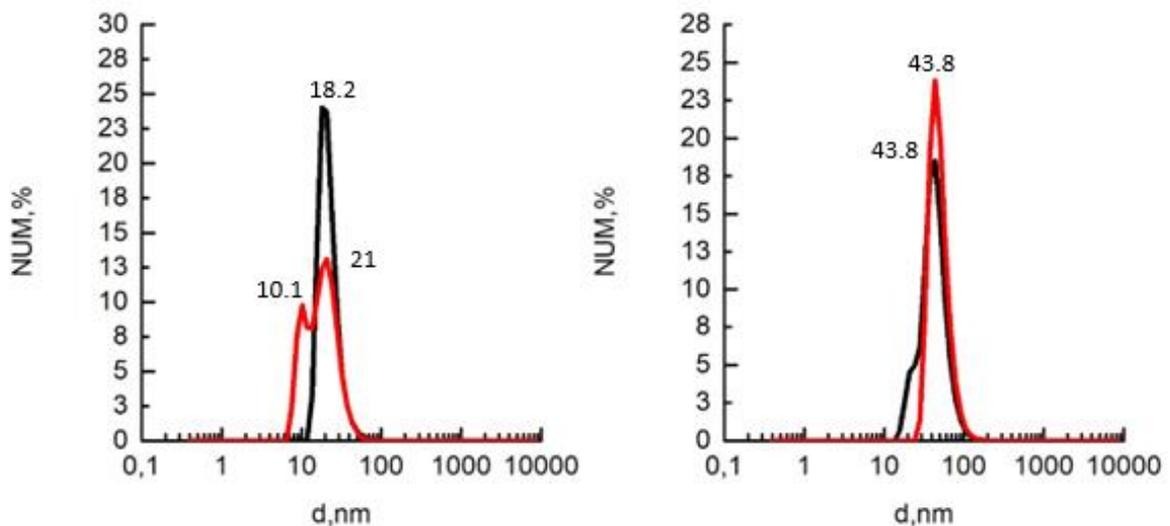
**Figura A.30:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e lattosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento scongelamento lento.



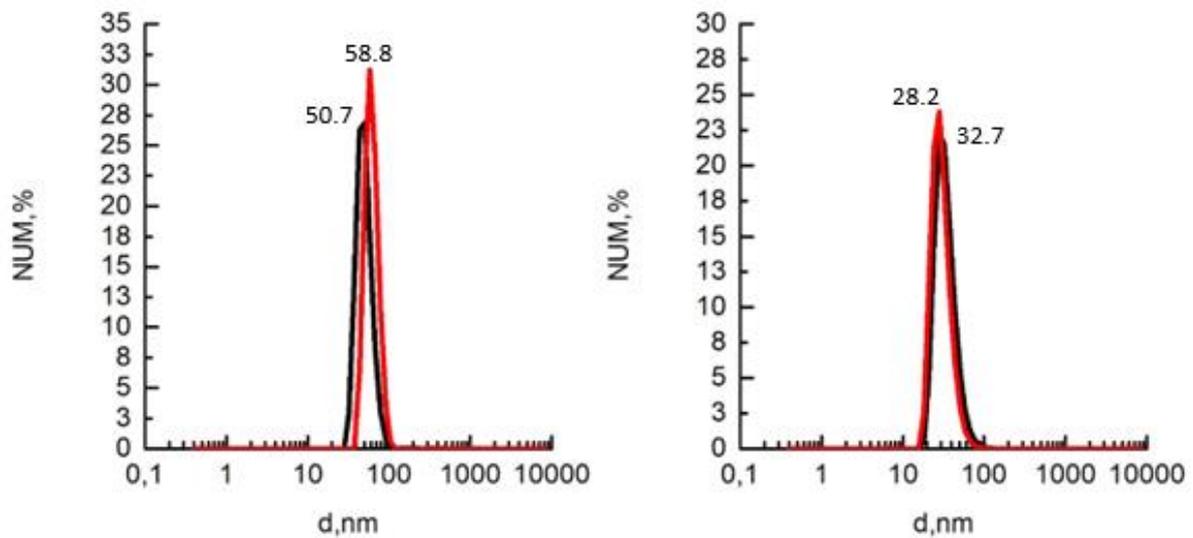
**Figura A.31:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e mannitolo, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento lento.



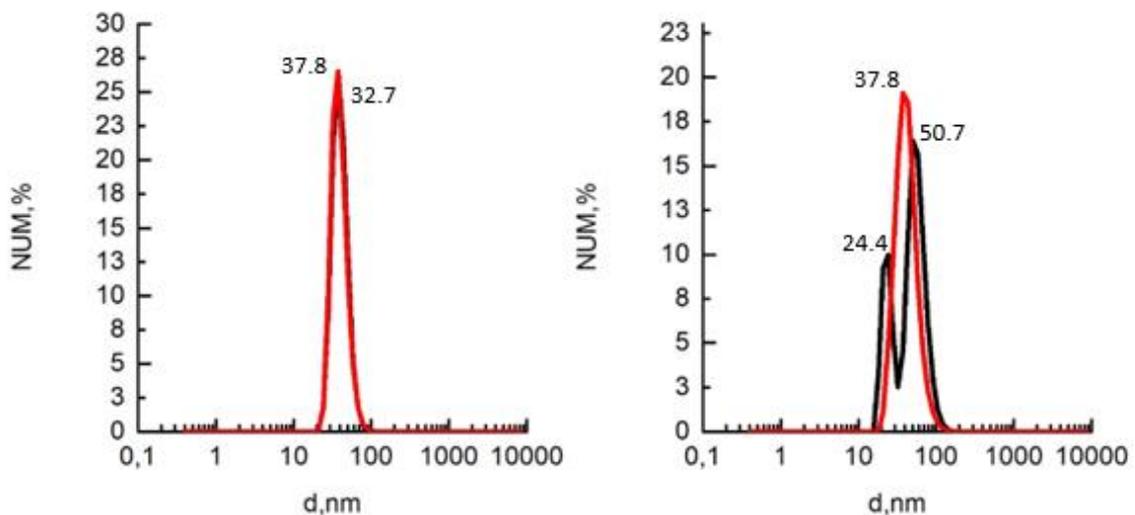
**Figura A.32:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e glucosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento lento.



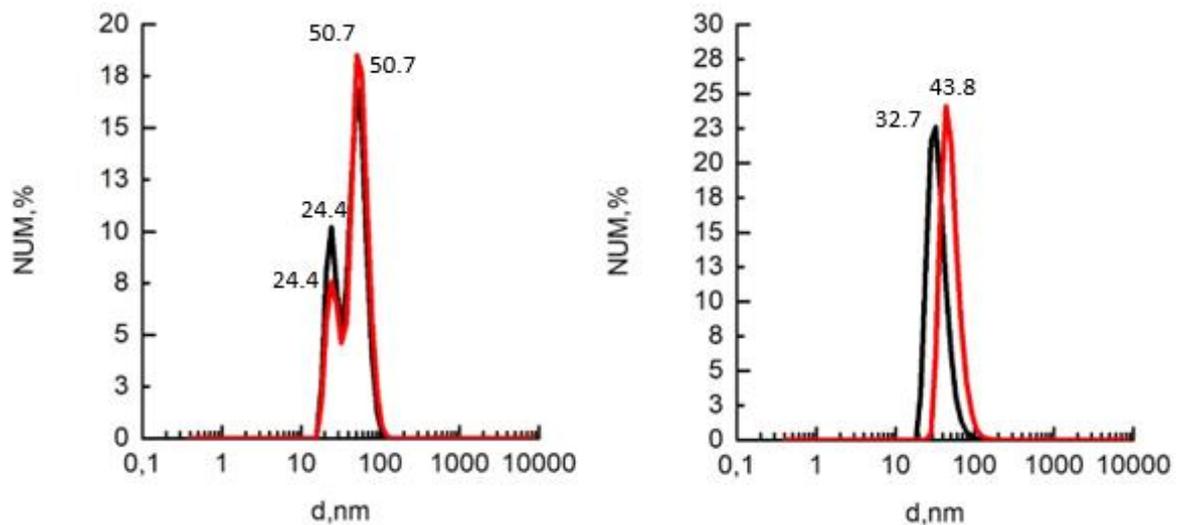
**Figura A.33:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e saccarosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e congelamento lento.



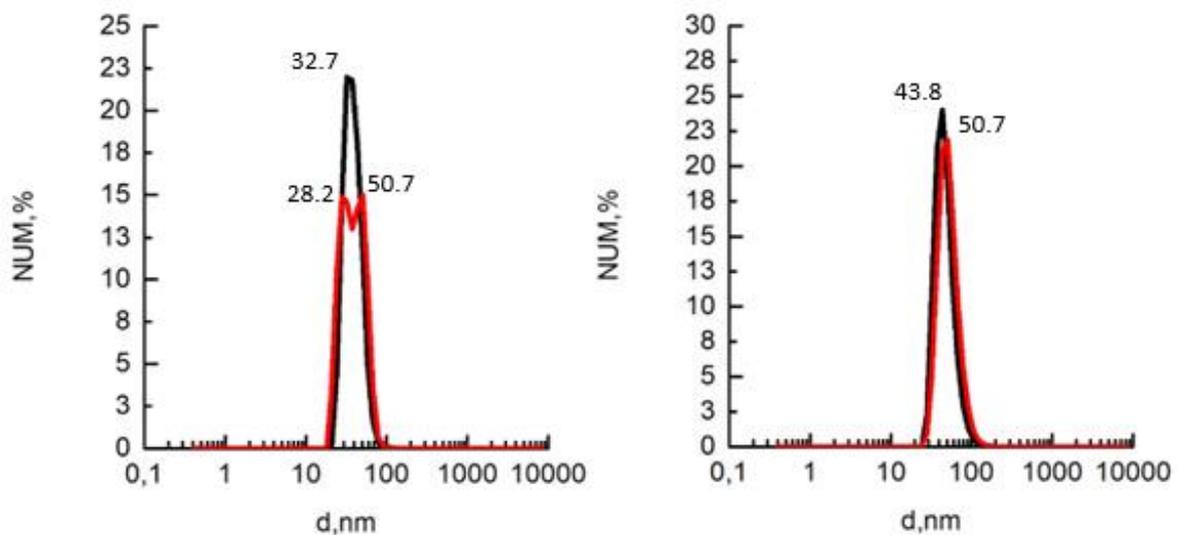
**Figura A.34:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce.



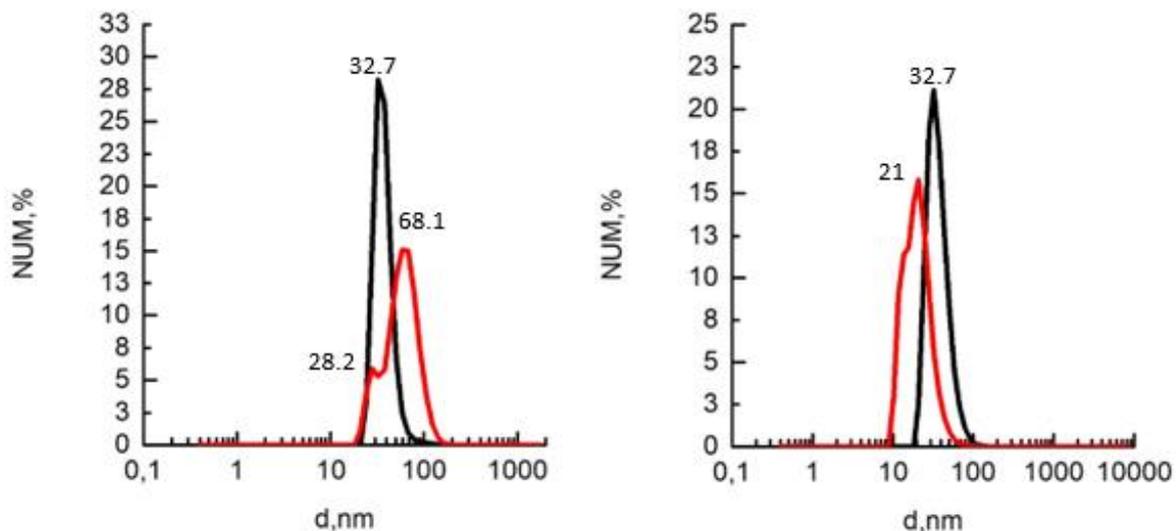
**Figura A.35:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e cellobiosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce.



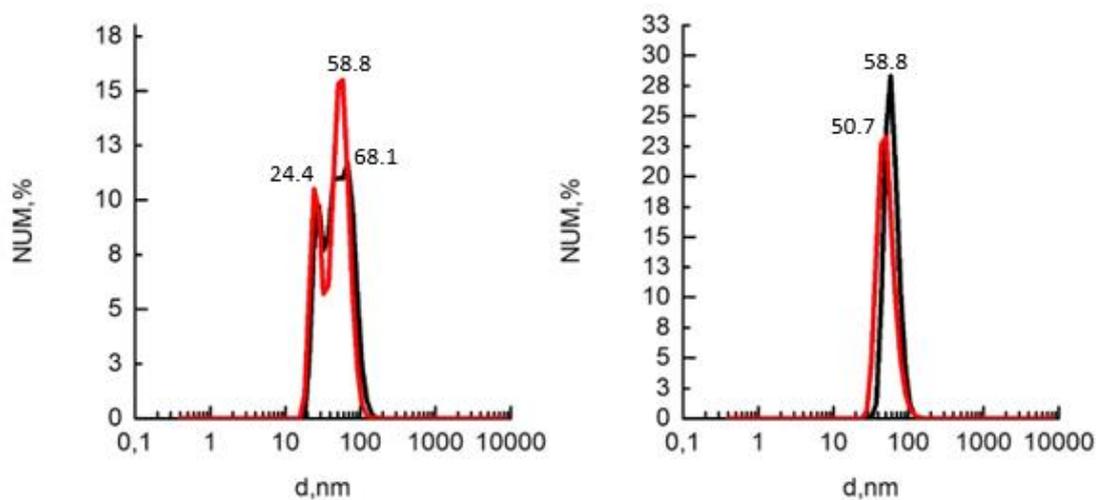
**Figura A.36:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e trealosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce.



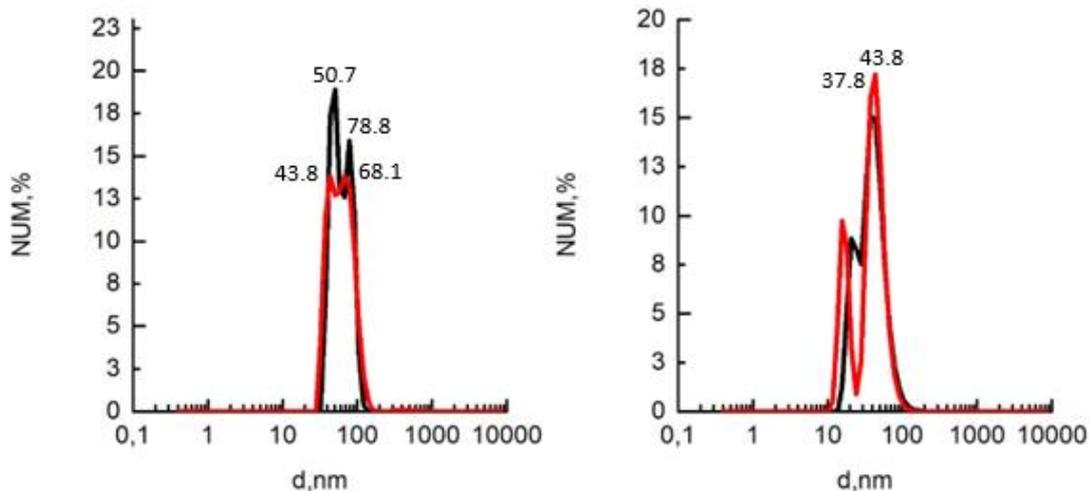
**Figura A.37:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e lattosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce.



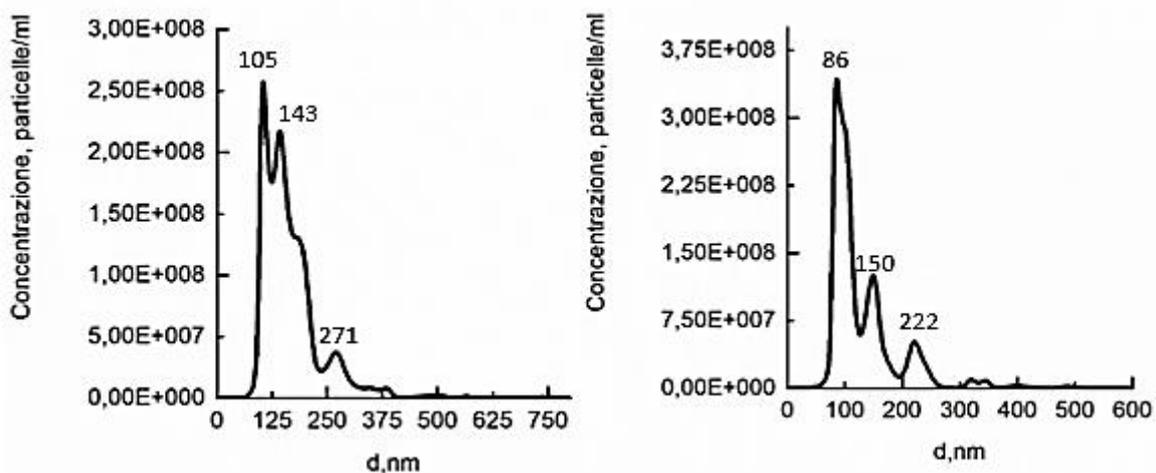
**Figura A.38:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e mannitolo, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce.



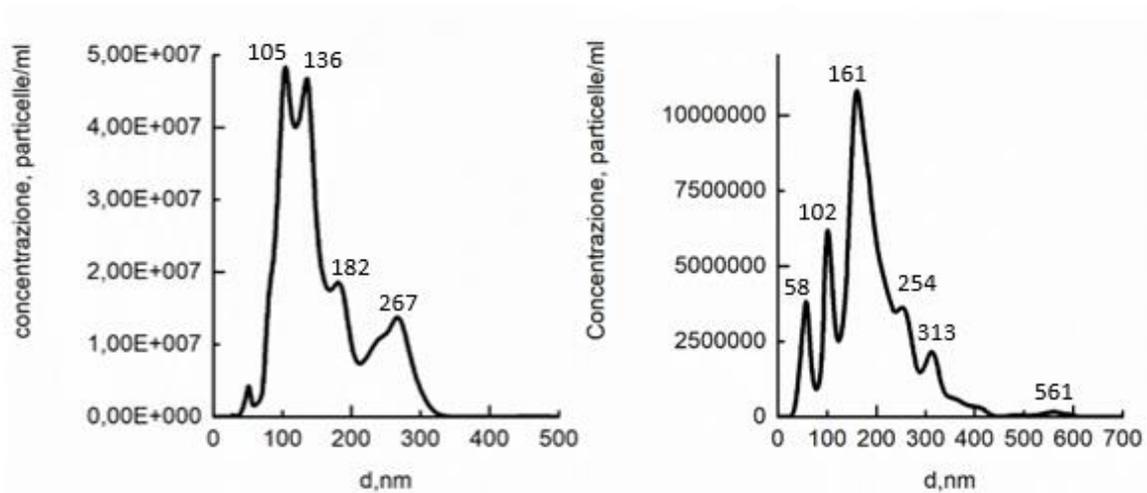
**Figura A.39:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e glucosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce.



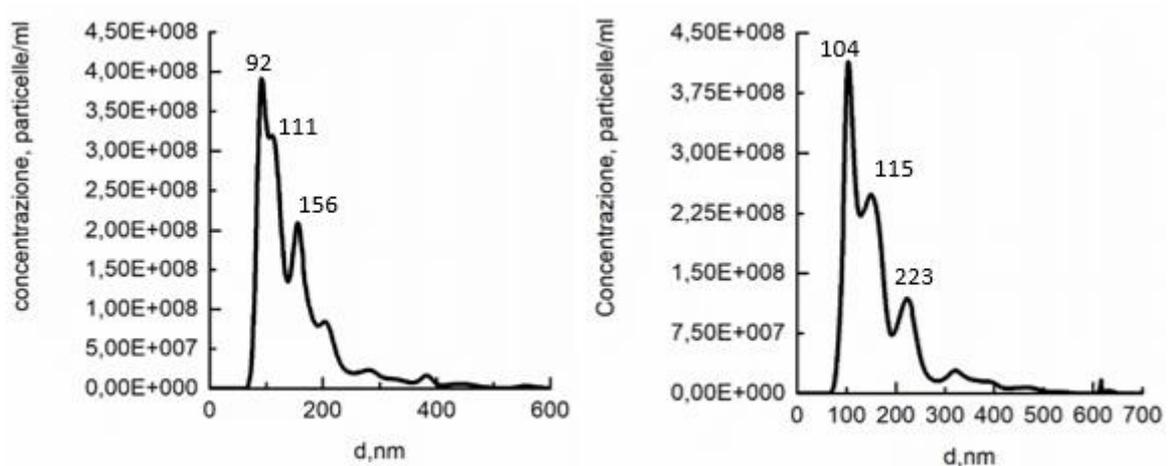
**Figura A.40:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di due campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e due di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di tween80 e saccarosio, tutti sottoposti a 7 cicli di congelamento e scongelamento veloce.



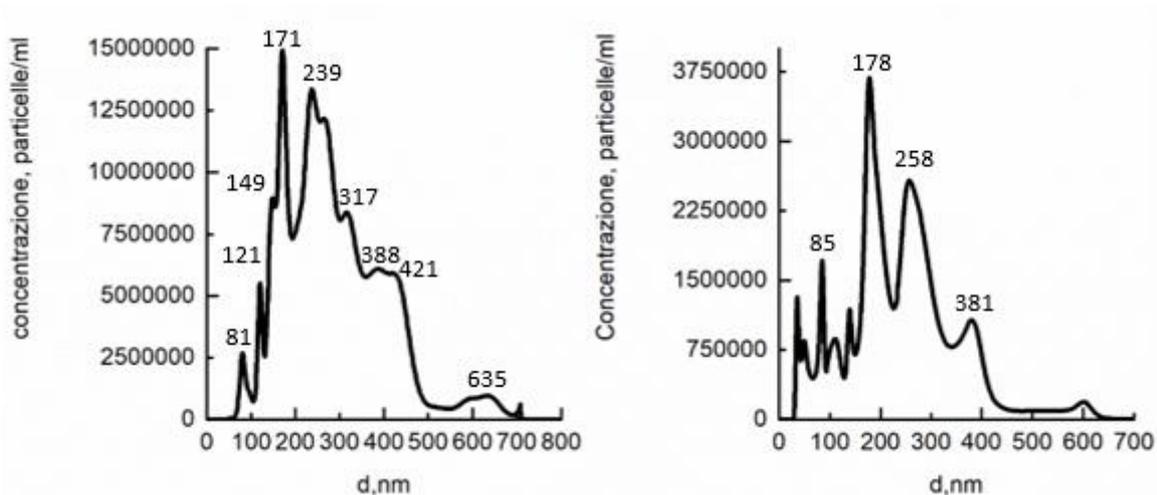
**Figura A.41:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di cellobiosio.



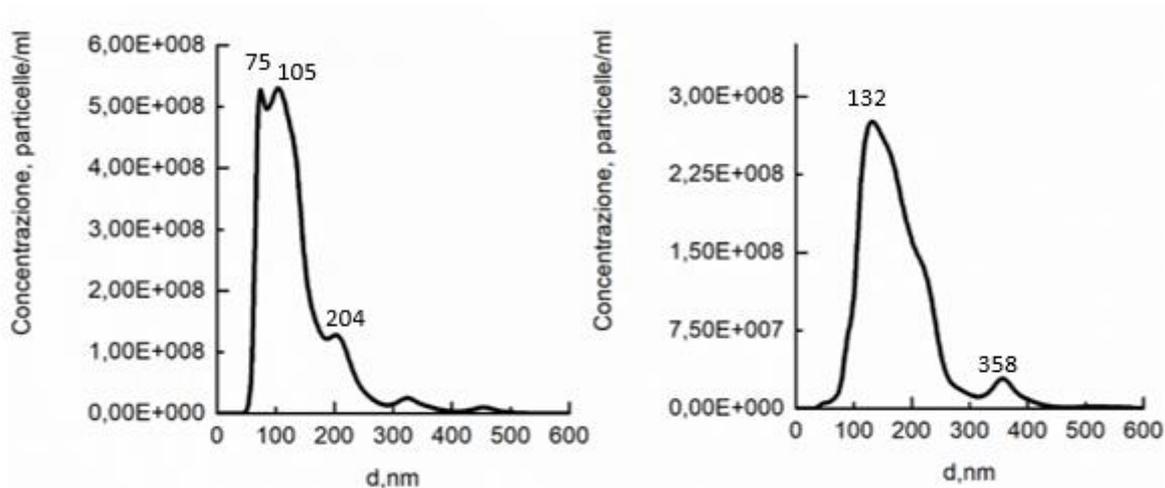
**Figura A.42:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di cellobiosio.



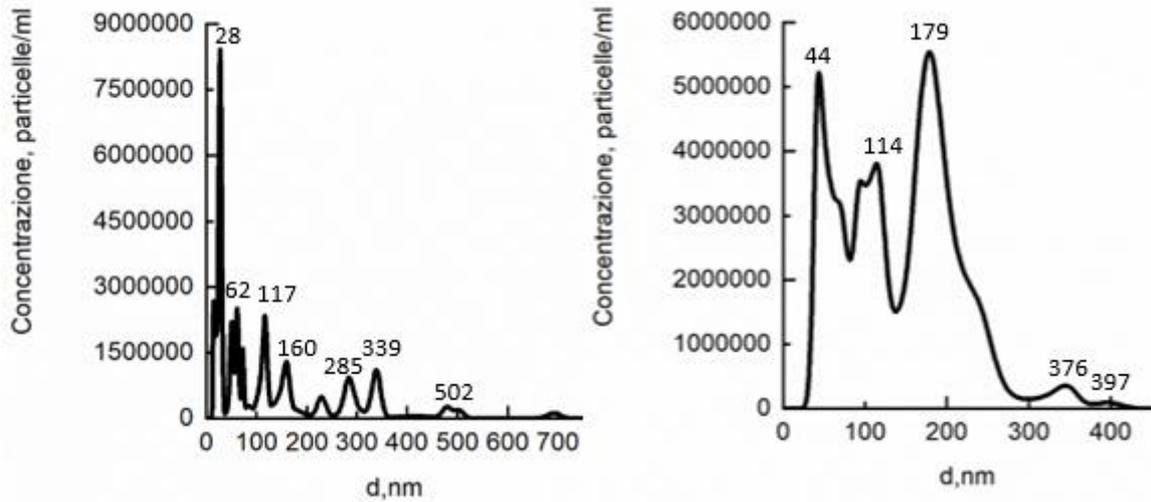
**Figura A.43:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di lattosio.



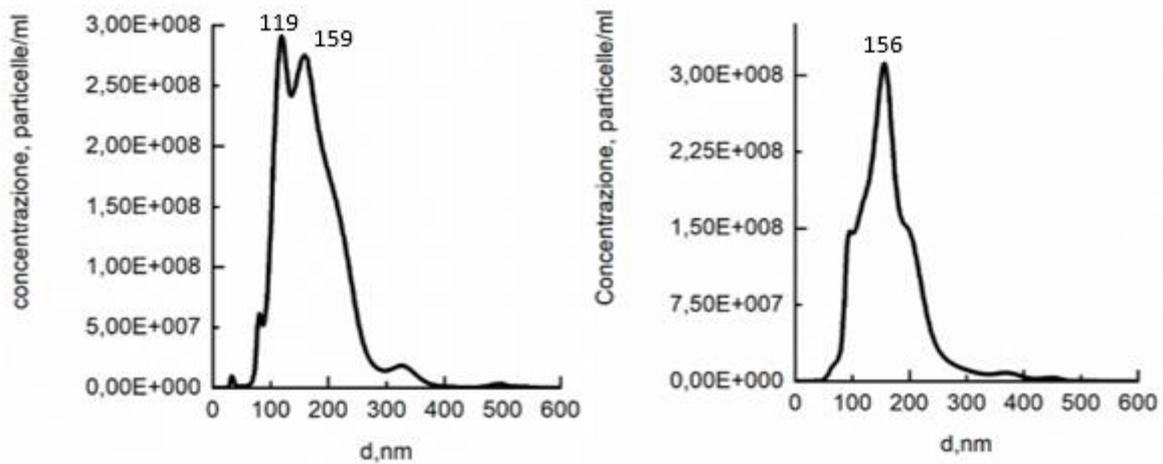
**Figura A.44:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di lattosio.



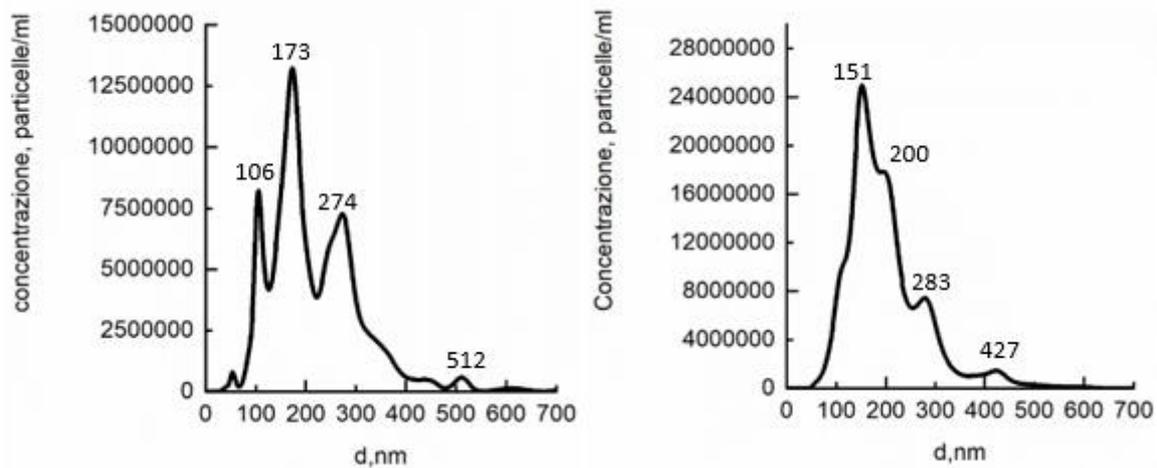
**Figura A.45:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di saccarosio.



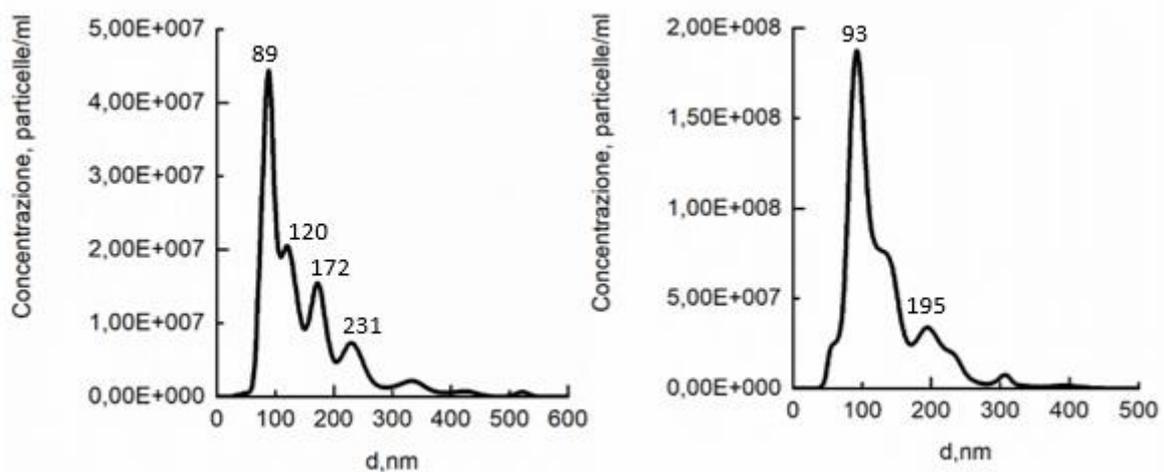
**Figura A.46:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di saccarosio.



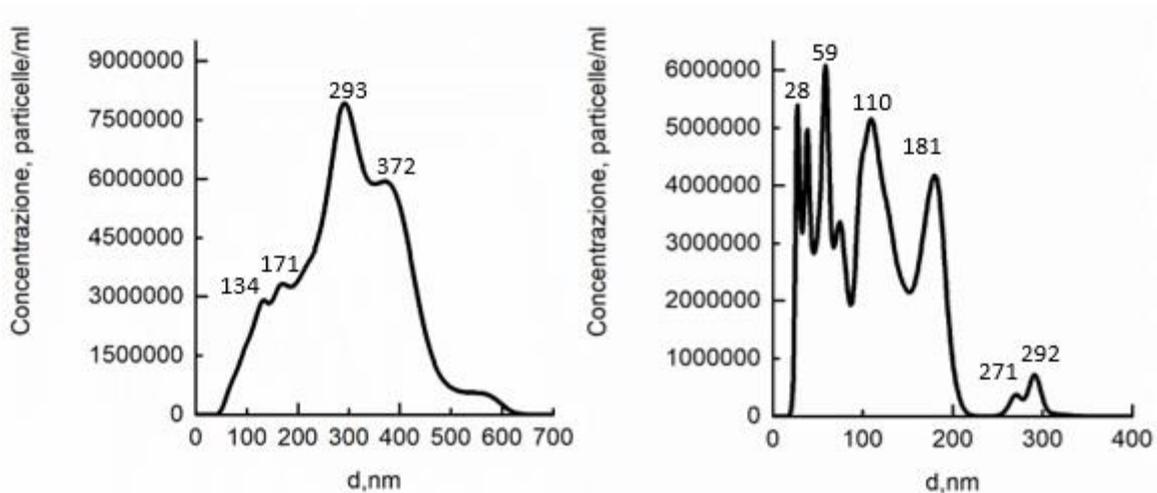
**Figura A.47:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di glucosio.



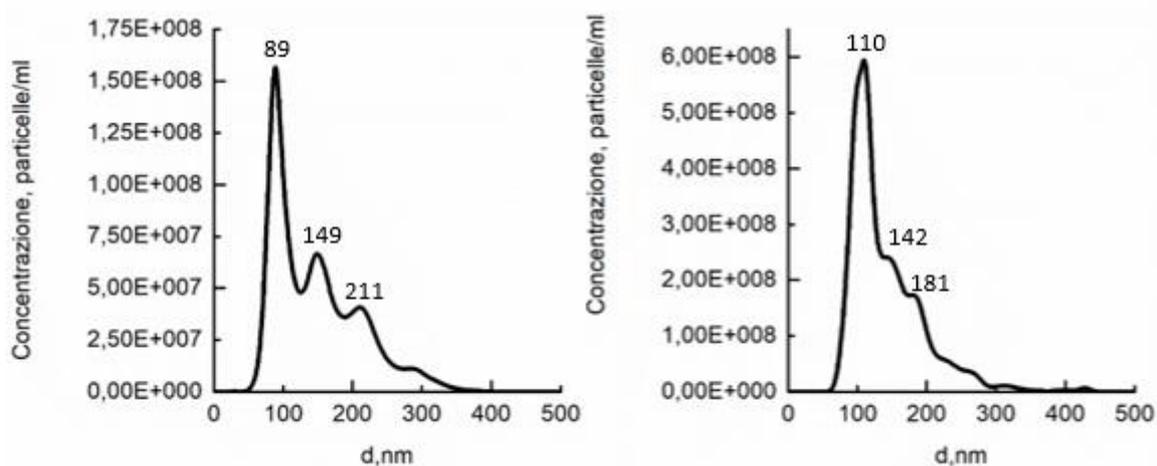
**Figura A.48:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di glucosio.



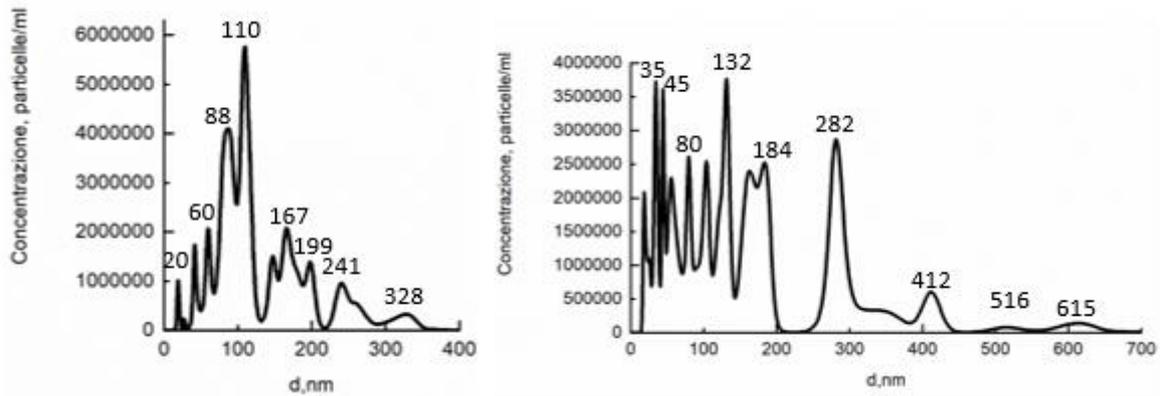
**Figura A.49:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di trealosio.



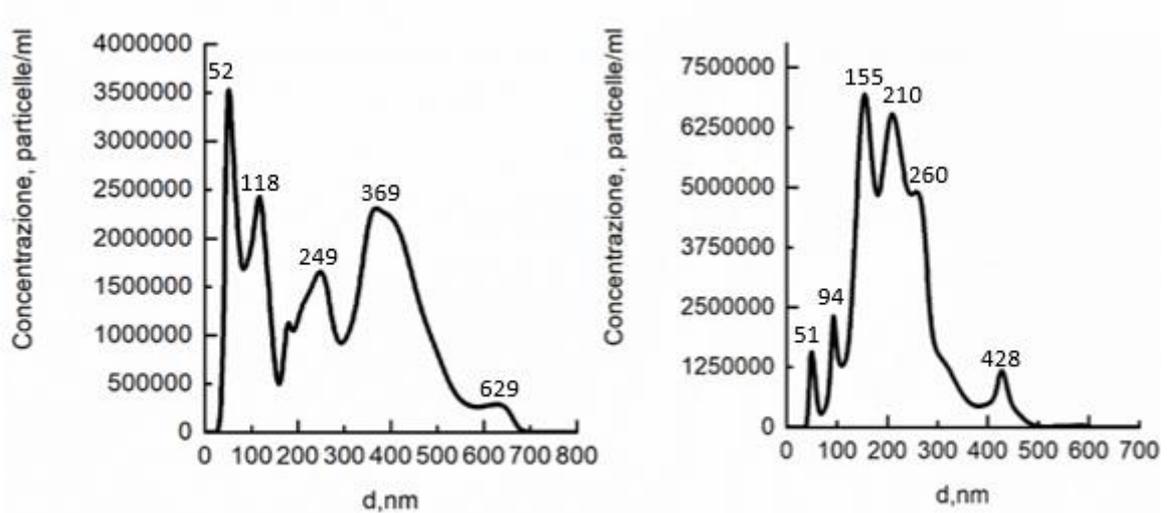
**Figura A.50:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di trealosio.



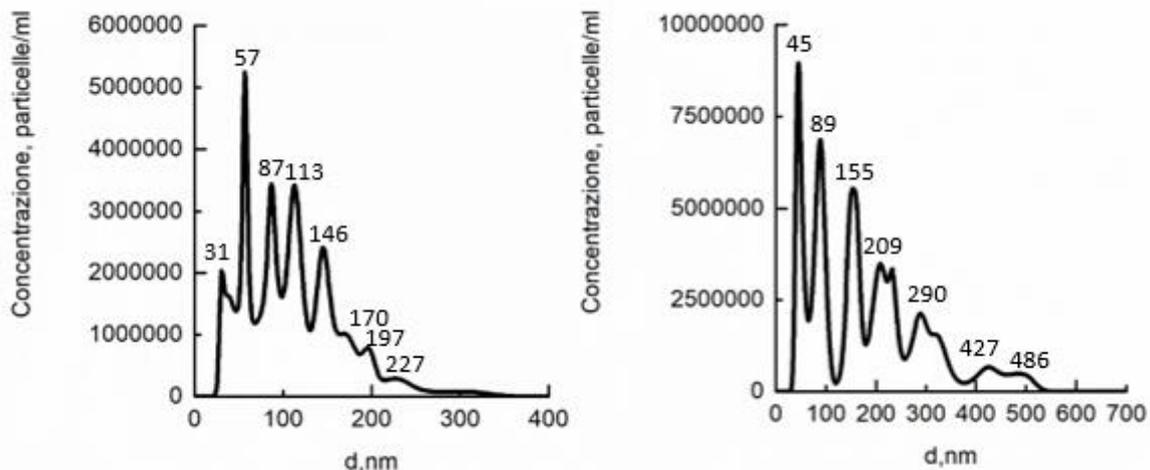
**Figura-A.51:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella prima liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di mannitolo.



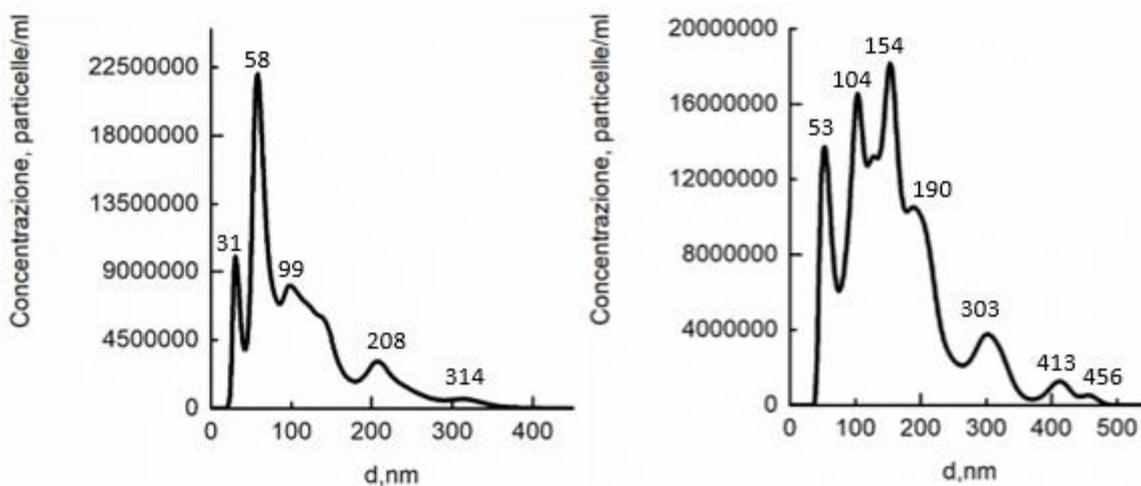
**Figura A.52:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di mannitolo.



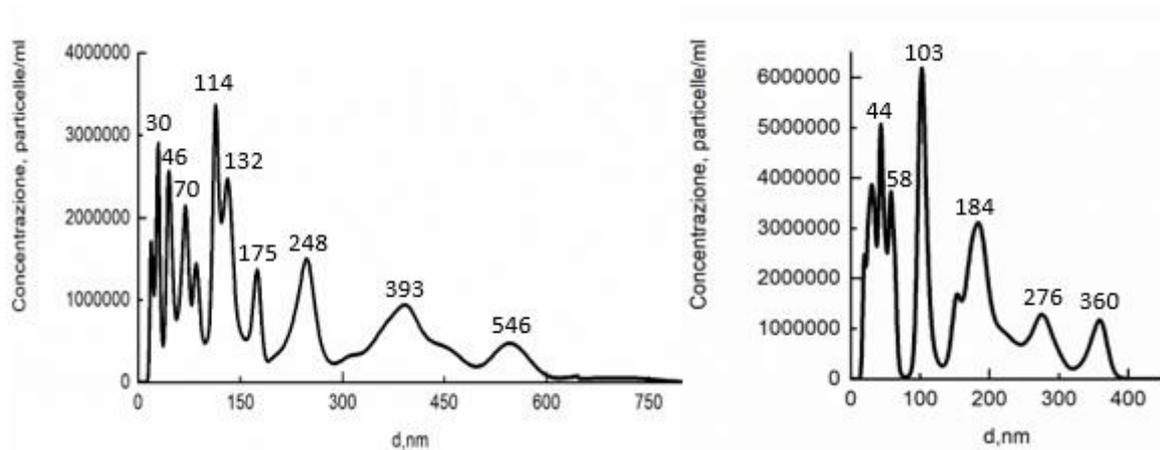
**Figura A.53:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di cellobiosio e mannitolo.



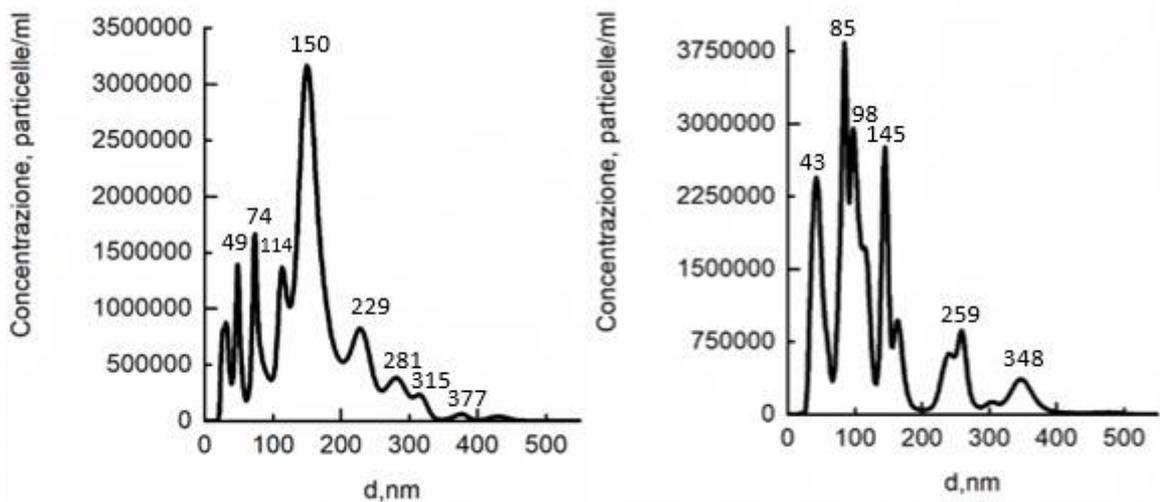
**Figura A.54:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di lattosio e mannitolo.



**Figura A.55:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di trealosio e mannitolo.



**Figura A.56:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di saccarosio e mannitolo.



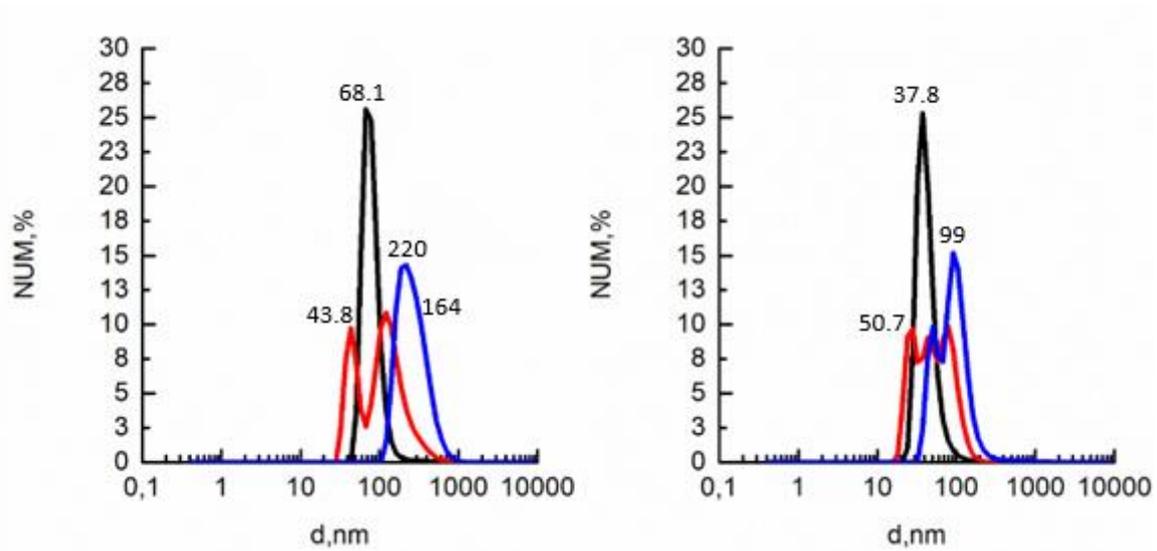
**Figura A.57:** Concentrazione (particelle/ml) in funzione del diametro dei liposomi liofilizzati nella seconda liofilizzazione, costituiti da lipidi di DOPC-DOTAP (grafico sinistro) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico destro), in presenza di glucosio e mannitolo.

**Tabella A.1:** Concentrazioni (particelle/ml) ricavate al Nanosight di liposomi liofilizzati alla prima liofilizzazione in presenza di eccipienti.

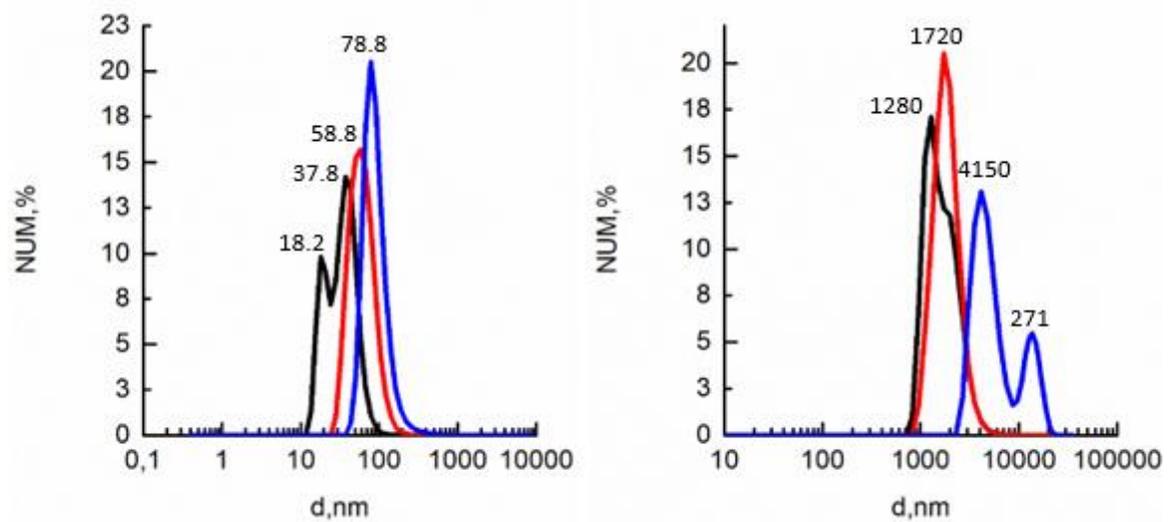
<b>CONCENTRAZIONE</b>	<b>particelle/ml</b>
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio	$1.82 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio	$3.39 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio	$3.40 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo	$4.12 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio	$1.20 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio	$2.97 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-cellobiosio	$2.35 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-lattosio	$3.00 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-saccarosio	$5.55 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-mannitolo	$1.15 \cdot 10^{10}$
DOPC-DOTAP-trealosio	$3.05 \cdot 10^9$
DOPC-DOTAP-glucosio	$3.48 \cdot 10^{10}$

**Tabella A.2:** Concentrazioni (particelle/ml) ricavate al Nanosight di liposomi liofilizzati alla seconda liofilizzazione in presenza di eccipienti.

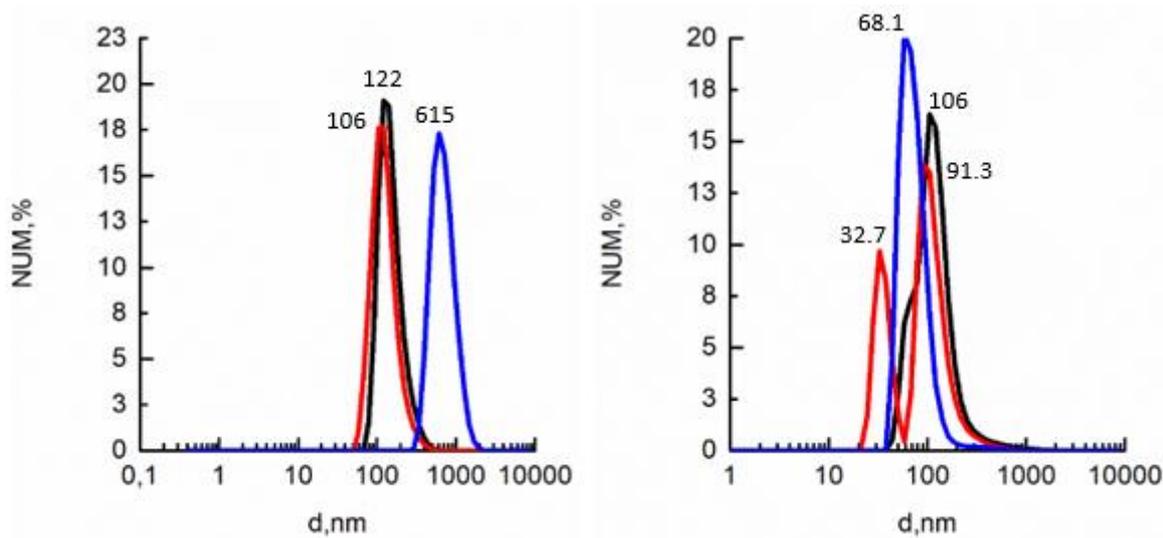
<b>CONCENTRAZIONE</b>	<b>particelle/ml</b>
DOPC-DOTAP-cellobiosio	$4.75 \cdot 10^9$
DOPC-DOTAP-lattosio	$3.02 \cdot 10^9$
DOPC DOTAP- glucosio	$1.70 \cdot 10^9$
DOPC-DOTAP-saccarosio	$2.80 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-mannitolo	$3.59 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-trealosio	$1.81 \cdot 10^9$
DOPC-DOTAP-cellobiosio-mannitolo	$8.09 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-lattosio-mannitolo	$3.27 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-glucosio-mannitolo	$2.58 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-saccarosio-mannitolo	$4.44 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-trealosio-mannitolo	$1.37 \cdot 10^9$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio	$1.26 \cdot 10^9$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio	$5.32 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio	$2.67 \cdot 10^9$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio	$7.24 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-mannitolo	$4.48 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio	$6.37 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-cellobiosio-mannitolo	$1.09 \cdot 10^9$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-lattosio-mannitolo	$9.27 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-saccarosio-mannitolo	$5.45 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-glucosio-mannitolo	$2.74 \cdot 10^8$
DOPC-DOTAP-DSPE-PEG-trealosio-mannitolo	$2.53 \cdot 10^9$



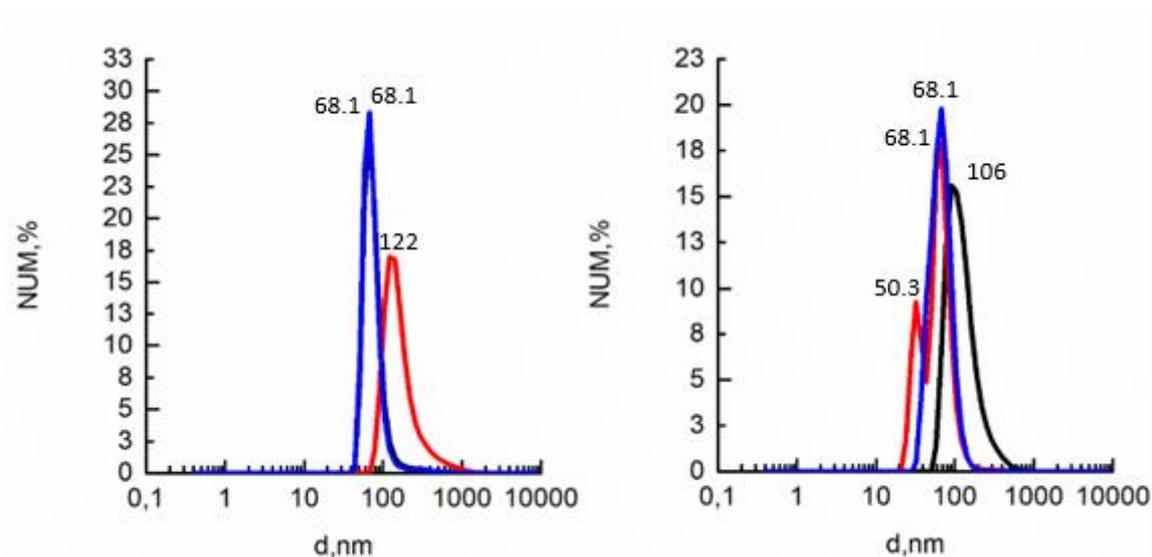
**Figura A.58:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra), sottoposti alla prima liofilizzazione.



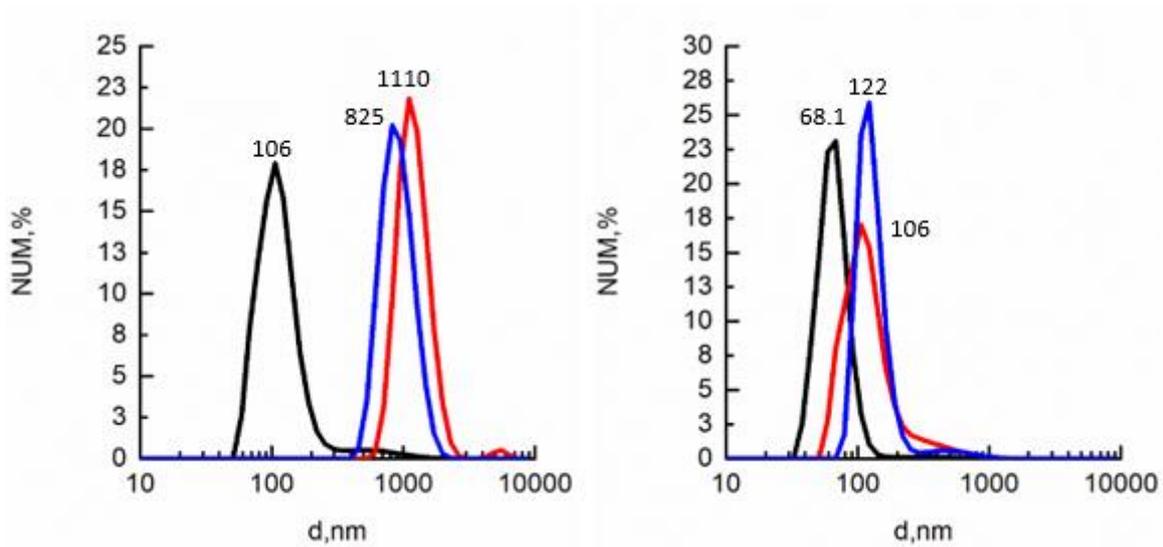
**Figura A.59:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di cellobiosio, sottoposti alla prima liofilizzazione.



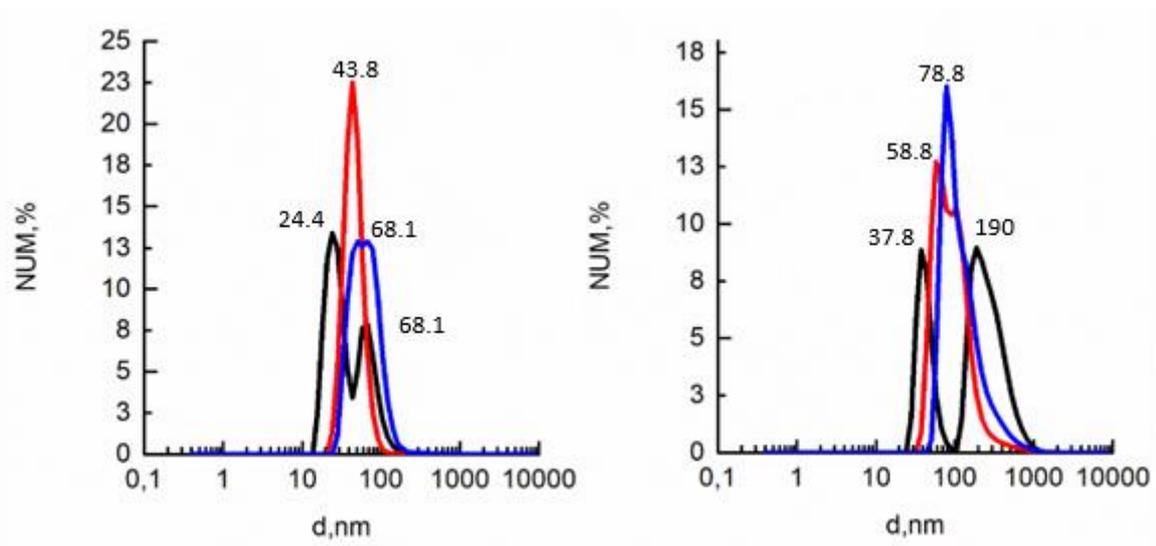
**Figura A.60:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di cellobiosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



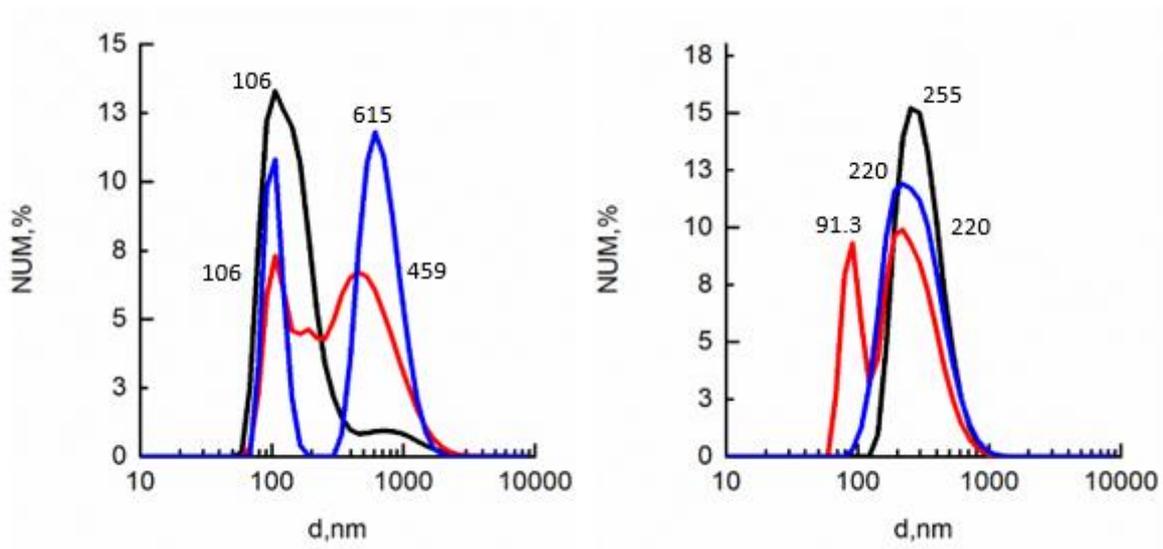
**Figura A.61:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di trealosio, sottoposti alla prima liofilizzazione.



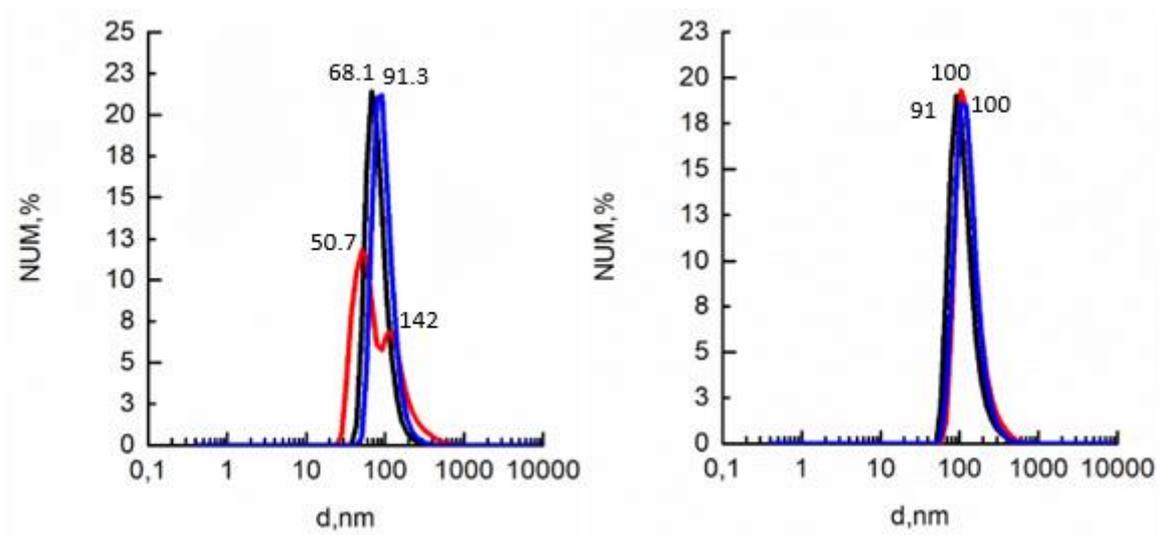
**Figura A.62:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di trealosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



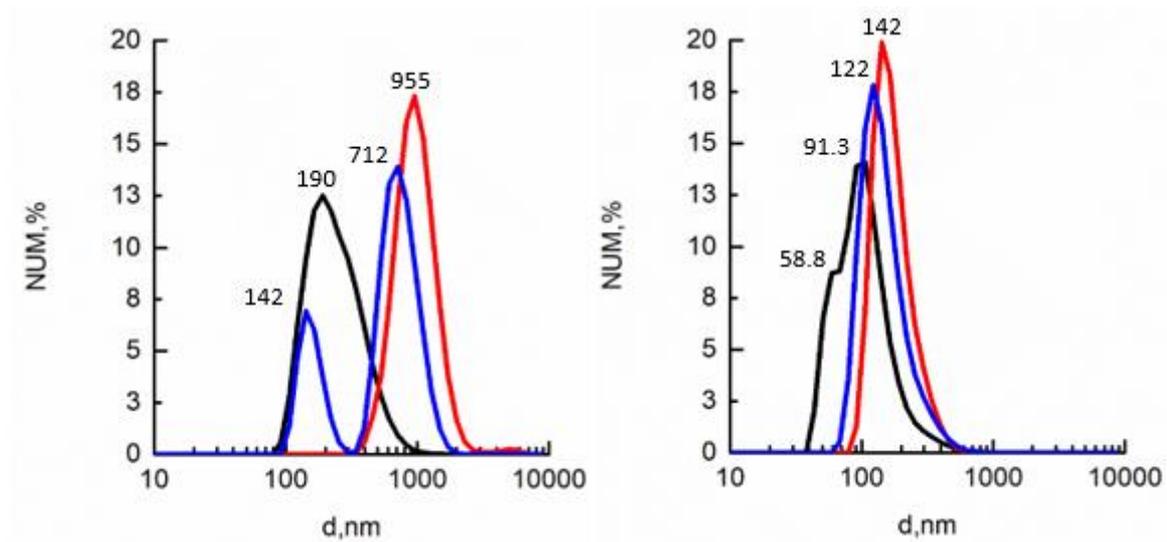
**Figura A.63:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di lattosio, sottoposti alla prima liofilizzazione.



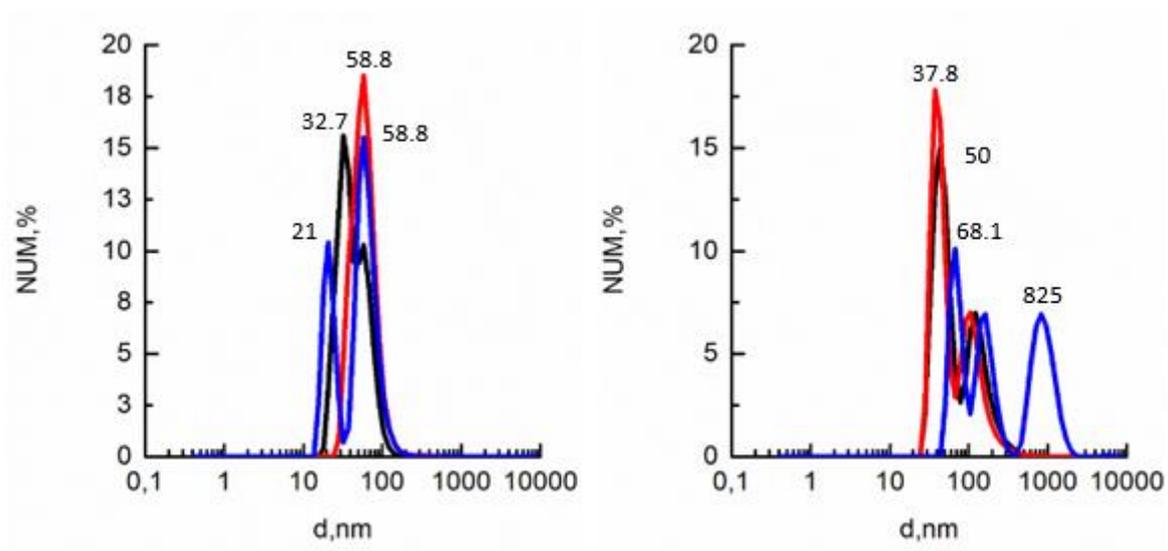
**Figura A.64:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di lattosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



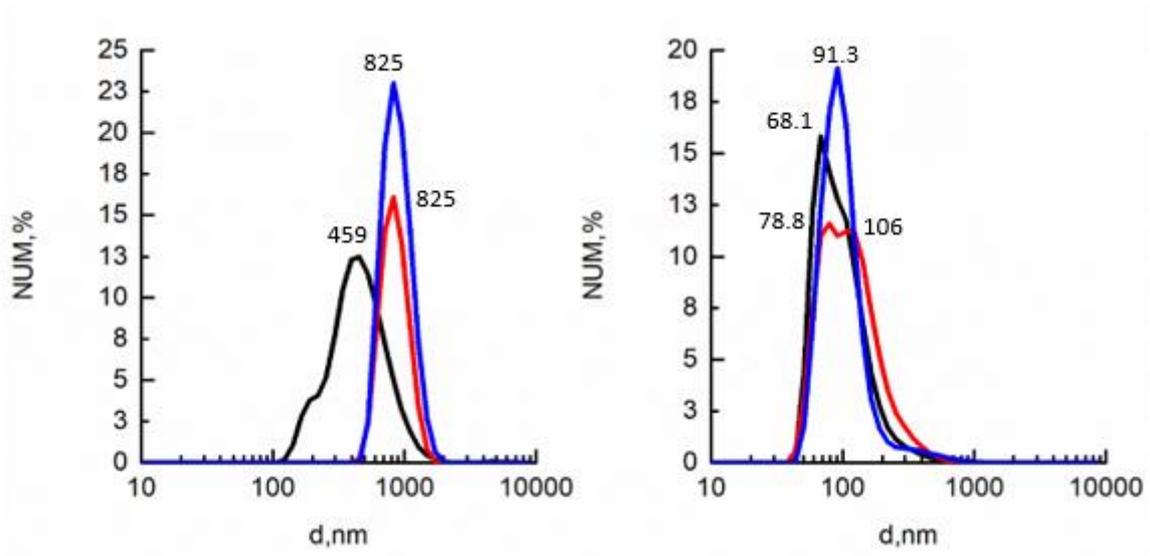
**Figura A.65:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di glucosio, sottoposti alla prima liofilizzazione.



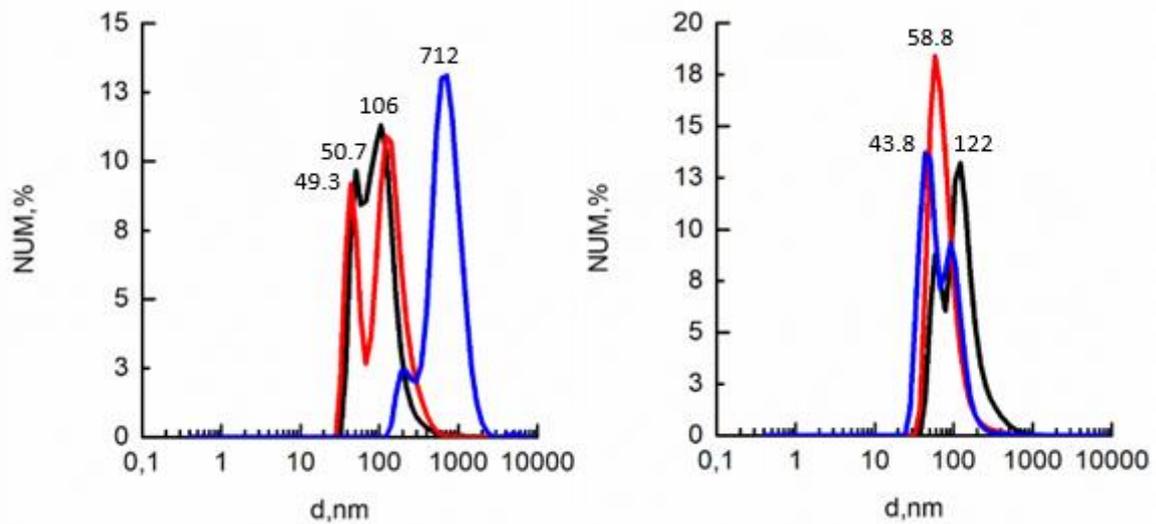
**Figura A.66:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di glucosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



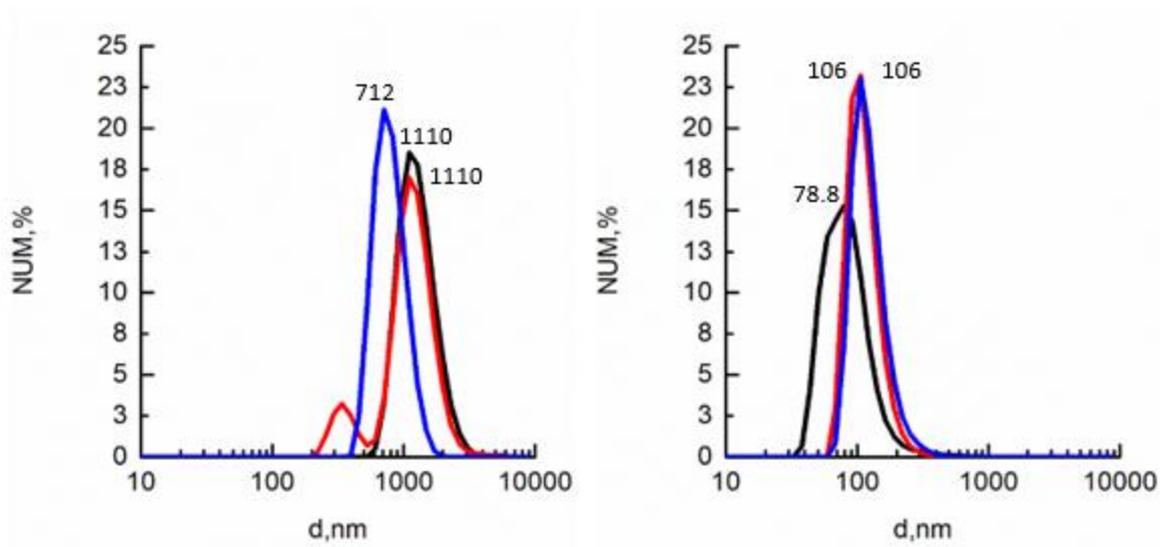
**Figura A.67:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di saccarosio, sottoposti alla prima liofilizzazione.



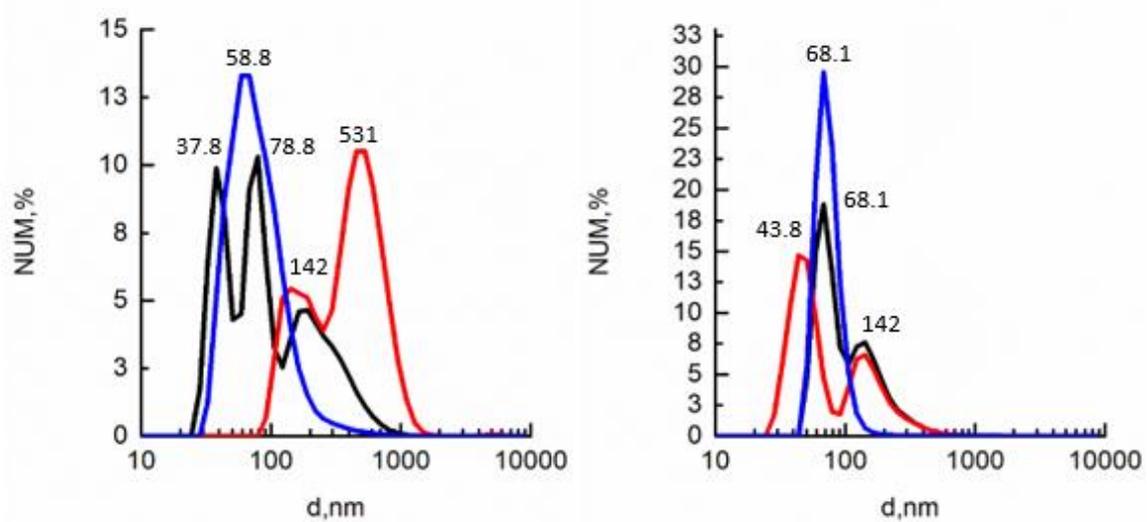
**Figura A.68:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di saccarosio, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



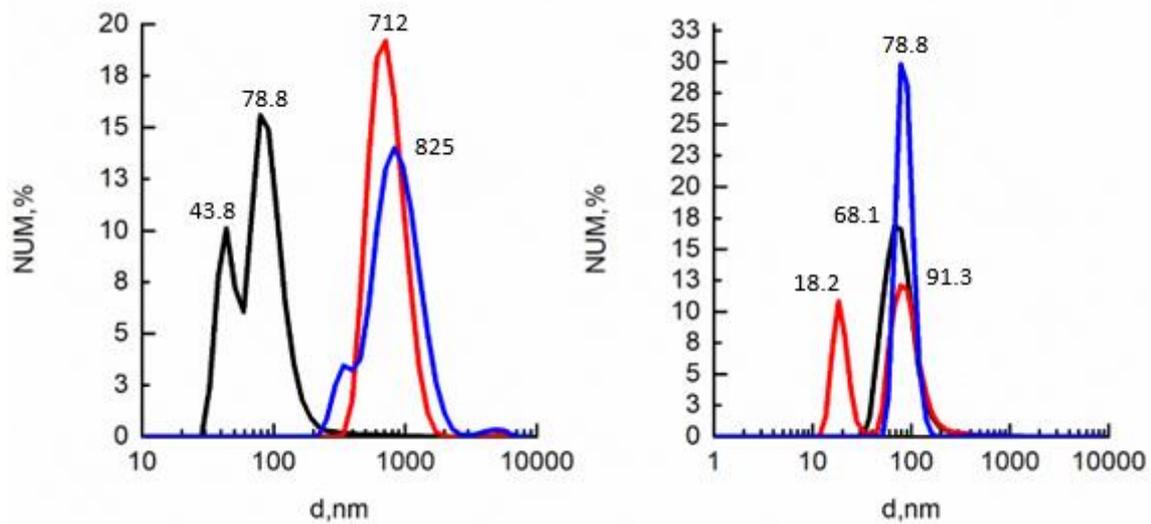
**Figura A.69:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenenti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di mannitolo, sottoposti alla prima liofilizzazione.



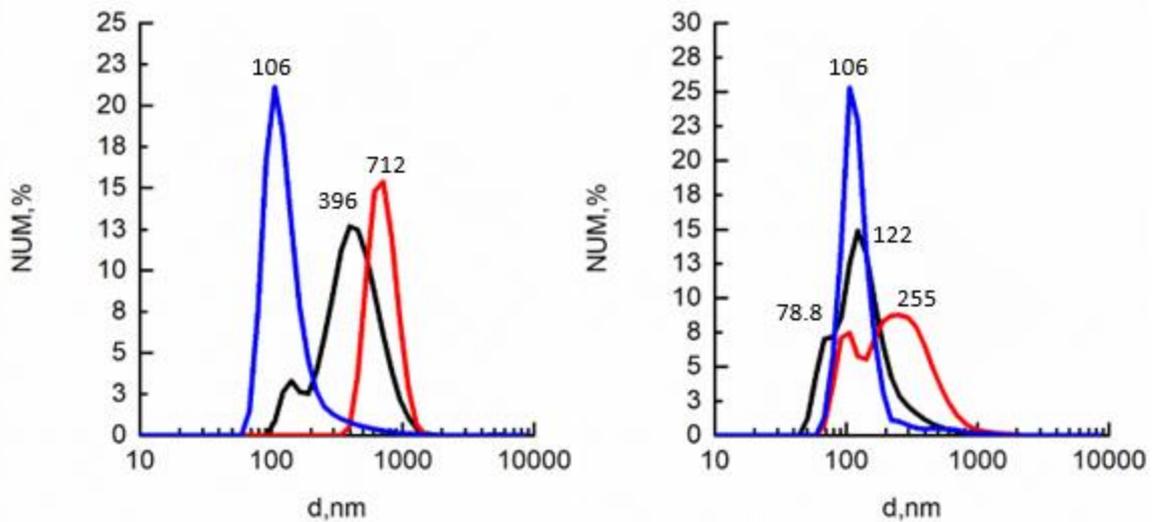
**Figura A.70:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



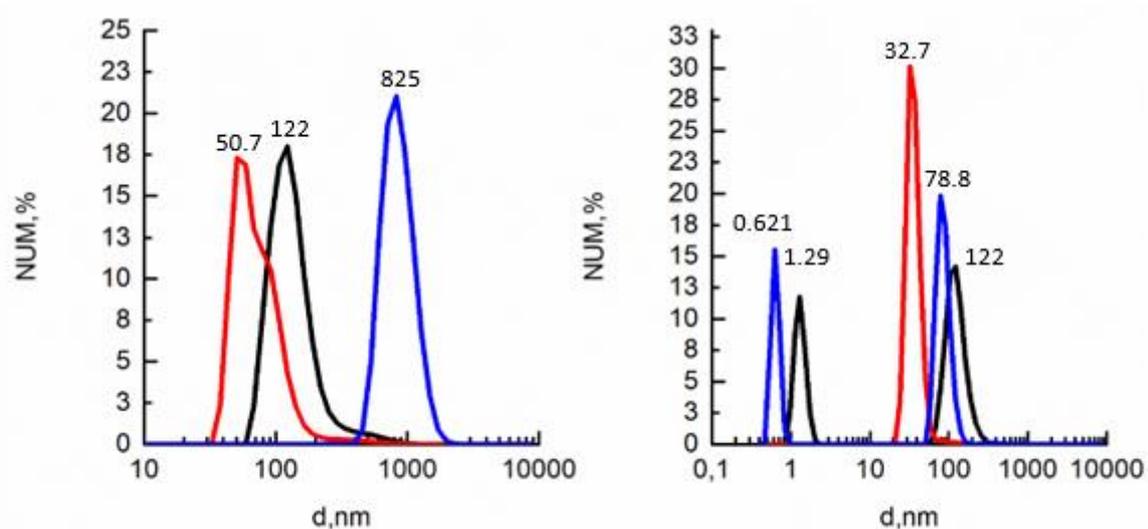
**Figura A.71:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di cellobiosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



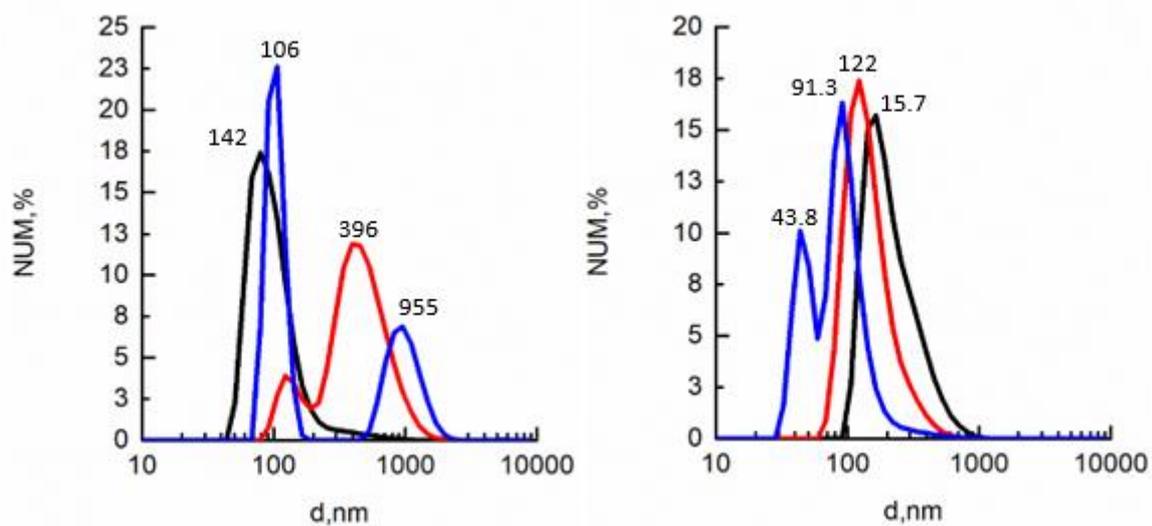
**Figura A.72:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di trealosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



**Figura A.73:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di lattosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



**Figura A.74:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di glucosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione.



**Figura A.75:** Grafici che riportano la percentuale numerica di particelle in funzione del diametro di campioni contenuti liposomi di DOPC-DOTAP (grafico di sinistra) e di DOPC-DOTAP-DSPE-PEG (grafico di destra) in presenza di saccarosio e mannitolo, sottoposti alla seconda liofilizzazione.

## Ringraziamenti

Ogni volta che si affronta un percorso didattico, o di qualsiasi altro tipo, che impegna molto del proprio tempo, verrai sempre investito da due tipologie di emozioni differenti. Quando inizi, e man a mano che lo percorri sarai sempre dominato dalla voglia di finire il prima possibile e non vedere mai più quel posto, di non volerne sapere più nulla. Tuttavia giunto al tanto atteso ultimo giorno. Dovresti gioire, esultare, ma una strana malinconia si fa avanti dentro di te. Non puoi fare a meno che accoglierla e farne tesoro. Significa che quella che stai percorrendo è la strada giusta, contornata da persone che non dimenticherai mai, luoghi che resteranno per sempre parte di te e momenti di cui farai tesoro. Io essendo una studentessa fuori sede, ho imparato molto da questa esperienza. Ho imparato a staccarmi dal mio nucleo familiare e ad essere indipendente. Ho sacrificato tanto per raggiungere questo obiettivo per niente facile ma oggi, dopo cinque anni, mi sento più matura con un bagaglio pieno di nuove esperienze da portare con me per il resto della mia vita.

Questo “viaggio universitario” per fortuna non l’ho mai percorso da sola ma ho avuto il sostegno e il supporto di tante persone a me care, difatti, per questo motivo vorrei ringraziare il prof. Roberto Pisano e la prof. Valentina Alice Cauda di avermi dato l’opportunità di poter lavorare con loro, ma anche per i consigli, le spiegazioni, la costante disponibilità e l’immensa passione che mettono nel loro lavoro. Vorrei anche ringraziare Francesca Susa per aver vissuto i momenti salienti di questa Tesi con me e per il suo immancabile aiuto. Dico un enorme grazie anche ad Andrea A. e Claudia U. di aver reso il laboratorio un posto migliore, grazie alla loro solarità e bontà.

Alla mia famiglia, tassello fondamentale per il conseguimento di questo traguardo, dedico questo manoscritto, in quanto devo ringraziare loro per avermi permesso di vivere questa esperienza a 1500km da casa, di avermi portato fiducia a 19 anni che non li avrei mai delusi e di avermi sempre sostenuto, soprattutto nei miei grandi momenti di sconforto. Spero di averli reso fieri di loro e di avergli regalato tante soddisfazioni. Grazie soprattutto per i “famosissimi” pacchi da giù, pieni di tanta roba buona per il mio sostentamento, come le passate di pomodoro fatte in casa, le melanzane e peperoni sott’olio, i formaggi, la frutta secca e altre pietanze poco *light*.

Un altro ringraziamento lo rivolgo a Francesco B., che nonostante tutto, nonostante la distanza per quattro anni mi ha dato la forza necessaria al raggiungimento di questo traguardo. È stato il primo a credere in me, non ha mai dubitato anche quando io pensavo di non farcela. E se oggi sono quella che sono è soprattutto grazie a lui. Mi ha insegnato a lottare quando tutto sembrava perso e a non perder mai la speranza, e cosa non di minor importanza c’è sempre stato.

Ora è il turno della famiglia Bonarrigo, la mia seconda famiglia acquisita che qui a Torino mi ha fatta sentire come la loro terza figlia. A loro devo tanto perché con me sono stati sempre così disponibili e sinceri; hanno contribuito al conseguimento di questa Tesi grazie alla loro costante presenza.

Ai miei amici di una vita, dico grazie per esserci stati sempre, sia giù in Sicilia che qui a Torino. Ho avuto la fortuna di portare con me in questo viaggio molti di loro e per questo motivo anche qui, sono riuscita a sentirmi sempre a casa.

Un altro ringraziamento lo dedico a Maria F., una piccola matricioletta (per me resterà sempre così) e nonché mia coinquilina che mi ha supportato e sopportato nei miei momenti no e nei momenti sì. La ringrazio per avermi fatto compagnia nei periodi di studio intensi pre-esami e per aver vissuto il quotidiano con me.

Tra i miei colleghi voglio ringraziare Giulio M., ci siamo sempre sopportati a vicenda visto che entrambi abbiamo due caratteri particolari. Ma a lui devo molto, perché mi ha dedicato tanto del suo tempo. Io e lui abbiamo condiviso intense giornate di vita al Politecnico, tra mille risate e infinite ore di lezione e so che il nostro rapporto di amicizia continuerà anche al di fuori dei banchi universitari.

Infine, voglio ringraziare me stessa perché se ad oggi sono qui e soprattutto grazie a me, perché ho scelto io di intraprendere questa strada e di portarla a termine costi quel che costi e ce l'ho fatta. E concludo con una citazione che condivide ciò che mi ha spinto a dedicarmi a questo percorso di studi: "Io sono tra quelli che pensano che la scienza abbia una grande bellezza. Uno scienziato nel suo laboratorio non è solo un tecnico: è anche un bambino posto di fronte a fenomeni naturali che lo impressionano come un racconto di fiabe", Marie Curie.