

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

***“Liofilizzazione di enzimi utilizzando la tecnica dei
flaconi sospesi”***



Relatore

prof. Roberto Pisano

Candidato

Paolo Giorsello

Dicembre 2019

Indice

1.	Introduzione	1
1.1	Tecnologie in continuo per l'industria farmaceutica	1
1.2	Processo di liofilizzazione	2
1.2.1	Cenni storici	2
1.2.2	Fasi del processo di liofilizzazione	3
1.2.2.1	Congelamento.....	3
1.2.2.2	Essiccamento primario	4
1.2.2.3	Essiccamento secondario.....	5
1.3	Svantaggi liofilizzazione discontinua	6
1.3.1	Tempi morti del processo	6
1.3.2	Eterogeneità nella fase di congelamento	7
1.3.3	Eterogeneità nel trasferimento di calore durante la fase di essiccamento.....	8
1.3.4	Variabilità degli standard di qualità da lotto a lotto	9
1.3.5	Scale-Up	9
1.4	Meccanismi di denaturazione provocati dal congelamento	10
1.4.1	Denaturazione provocata dalla bassa temperatura	10
1.4.2	Denaturazione provocata dall'interfaccia acqua-ghiaccio	11
1.4.3	Denaturazione provocata dalla variazione del pH.....	12
1.5	Tecnologie di liofilizzazione in continuo	13
1.5.1	Active freeze drying	13
1.5.2	Fine-spray freeze drying.....	14
1.5.3	Spin freeze drying	15
1.5.4	Suspended vials	16
1.6	Obiettivo della tesi	19
2.	Metodi sperimentali.....	21
2.1	Impianto di liofilizzazione	21
2.2	Caso di studio	23
2.2.1	Mioglobina	23
2.2.2	Lattato deidrogenasi	24
2.3	Preparazione delle formulazioni da liofilizzare	26
2.4	Programmazione degli esperimenti	29
2.4.1	Quenching in azoto liquido	31
2.4.2	Congelamento shelf ramped.....	32
2.4.3	Congelamento di flaconi sospesi.....	32
2.4.4	Prove di liofilizzazione.....	33

2.5	Misure di attività biologica	34
2.6	Misure di umidità residua nei campioni liofilizzati	35
3.	Risultati	37
3.1	Mioglobina	37
3.1.1	Scelta della concentrazione ottimale di tensioattivo (Tween 80).....	37
3.1.2	Effetto delle condizioni di congelamento.....	39
3.1.3	Freeze-drying	48
3.2	LDH	52
3.2.1	Effetto delle condizioni di congelamento.....	52
4.	Conclusioni	61
	<i>Bibliografia</i>	64

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 Tecnologie in continuo per l'industria farmaceutica

L'evoluzione di nuovi farmaci e nuove forme di dosaggio stanno inducendo l'industria farmaceutica ad investire sempre più risorse nello studio di nuove soluzioni impiantistiche, al fine di ridurre il pericolo di contaminazione, incrementare gli standard di qualità e l'efficienza produttiva, nonché realizzare piattaforme di produzione meno ingombranti e flessibili.

Come risposta ad un mercato sempre più esigente, le industrie farmaceutiche di tutto il mondo hanno risposto con l'avvio di progetti di ricerca finalizzati alla modernizzazione dei loro processi e delle tecnologie di produzione.

L'obiettivo comune è l'incremento di competitività ed il miglioramento delle proprie linee produttive, attraverso una produzione a basso costo, ma mantenendo standard di qualità sempre più elevati.

Tra le varie strategie in fase di studio, le aziende stanno concentrando le proprie risorse al fine di sviluppare o adattare tecnologie esistenti che possano promuovere la transizione delle proprie piattaforme di produzione da discontinuo a continuo.

La tecnologia in continuo, operante 24 ore al giorno, 7 giorni la settimana, permetterebbe di ottenere una produzione con più alte efficienze, riducendo i tempi morti. Inoltre, dato il minor impiego di manodopera o meglio di intervento degli operatori nella catena produttiva, diminuirebbe il pericolo di contaminazione e di errore umano (Badman e Trout, 2015). Inoltre, grazie all'elevata efficienza del processo in continuo, le aziende farmaceutiche potranno produrre farmaci per un mercato sempre più esigente, riducendo i costi di produzione, adattarsi meglio alle esigenze del mercato.

Oggi giorno, circa il 95% dei farmaci è prodotto mediante processi in modalità discontinua o comunemente chiamati *batch*.

A causa degli elevati tempi di produzione, il processo discontinuo risulta essere poco flessibile alla richiesta di mercato. A fronte di un improvviso aumento della domanda, un sistema continuo potrebbe in poco tempo accrescere l'offerta grazie alla migliore gestione dei tempi e dei volumi prodotti. Il sistema continuo, inoltre, non porterebbe solo ad una riduzione dei pericoli di contaminazione, ma anche ad una produttività più sicura, eliminando le interruzioni e gli avviamenti di processo tipici di una produzione discontinua (Rutter, 2011; Allison et al., 2015; Pisano et al., 2019).

In questo contesto, anche la liofilizzazione, come operazione a valle di un processo farmaceutico, dovrà seguire una trasformazione da discontinuo a continuo.

L'industria farmaceutica sta compiendo notevoli progressi nell'implementazione di processi in continuo e numerose sono le società che investono sui reparti di ricerca e sviluppo con l'obiettivo di meglio comprendere tali processi. D'altro canto, un'indagine condotta da ACS GCI *Pharmaceutical Roundtable* ha evidenziato che l'ostacolo principale all'implementazione

dei processi in continuo è la mole degli investimenti e l'attuale mancanza di conoscenza dei reparti R&D delle nuove tecnologie (Poechlauer et al., 2012).

1.2 Processo di liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo condotto a bassa temperatura ed è efficace per conservare per lunghi periodi tutti quei prodotti che sono termolabili e non possono essere trattati ad alte temperature. Per questo motivo la liofilizzazione è tra le principali tecnologie di essiccamento usate nell'industria farmaceutica.

Uno dei principali limiti di questo processo è la sua inefficienza legata agli elevati costi energetici per mantenere basse temperature e condizioni di alto vuoto per un lungo periodo. In base alle condizioni del ciclo di liofilizzazione e alla durata delle operazioni ad esso associate (carico, scarico, sterilizzazione ecc.), un ciclo di liofilizzazione tradizionale può variare da poche ore a più di una settimana (Pisano et al., 2019).

1.2.1 Cenni storici

Nell'industria farmaceutica, la liofilizzazione si è gradualmente affermata come metodo principale per trasformare soluzioni acquose in composti solidi stabili. La differenza sostanziale risiede nel costo della materia prima nettamente superiore al costo delle lavorazioni.

L'attuale processo di liofilizzazione venne implementato per la prima volta a Lipsia in Germania nel 1890 (Altmann, 1894). Diventò di vitale importanza durante la seconda guerra mondiale, quando la croce rossa Canadese dovette effettuare consegne settimanali fino a 2000 unità di plasma umano.

Durante gli anni '50, la liofilizzazione iniziò ad essere utilizzata anche dall'industria alimentare e farmaceutica. In questi anni crebbero vorticosamente le pubblicazioni e le conoscenze tecniche sull'argomento; gli studi passarono da essere una decina prima del 1930 a diverse centinaia tra il 1930 e il 1945.

Durante gli anni '70, l'interesse si è spostato sullo studio e la modellizzazione del trasferimento di calore e sul problema del collasso strutturale. Solo nel decennio successivo, l'attenzione si è spostata sullo sviluppo di dispositivi elettronici in grado di controllare il processo. Bisogna giungere fino agli anni '90 per avere i primi studi di scale up e rendere la liofilizzazione un'operazione industriale in larga scala (Franks, 2007).

In questi ultimi anni l'incremento di sostanze liofilizzate quali enzimi, antibiotici e oncologici ha richiesto l'implementazione di sistemi di produzione più efficienti. L'obiettivo si è, quindi, spostato sullo sviluppo di soluzioni tecnologiche che possano rendere la liofilizzazione un processo "end to end", ovvero la trasformazione delle materie prime in prodotti finiti senza interruzioni ed incrementandone l'efficienza produttiva. Nuove soluzioni tecnologiche come *active freeze-drying*, *fine spray freeze-drying* e *spin freeze drying* sono state proposte per, ma a causa della difficoltà nel controllo della morfologia del prodotto, tali metodi non hanno trovato diffusione. Tutt'oggi si stanno esplorando nuove tecnologie e configurazioni di processo in continuo che possano rispondere ai numerosi requisiti di questo processo (Capozzi et al., 2019; Pisano et al., 2019).

1.2.2 Fasi del processo di liofilizzazione

Il processo di liofilizzazione si compone di tre fasi distinte che coinvolgono delle trasformazioni che sono evidenziate sul diagramma di stato dell'acqua riportato in Figura 1.1. La prima fase consiste nel congelamento del prodotto, il quale è poi esposto a bassa pressione e moderato riscaldamento al fine di promuovere la sublimazione del ghiaccio. Una volta che tutto il ghiaccio è stato allontanato si avvia l'essiccamento secondario in cui si promuove il desorbimento dell'acqua rimasta intrappolata nella matrice solida. Tale operazione viene attuata aumentando temperatura nella camera e mantenendo lo stato di vuoto.

All'avvio e a valle di ciascun ciclo di liofilizzazione occorre eseguire delle operazioni aggiuntive che contribuiscono alla definizione della durata del processo. Queste operazioni includono il riempimento dei flaconi e il loro trasferimento nella camera di essiccamento, test di mantenimento del vuoto, le operazioni di pulizia e sterilizzazione del liofilizzatore e infine lo scongelamento del condensatore. Queste operazioni contribuiscono alla definizione dei tempi morti di un ciclo di liofilizzazione (Pisano et al., 2019).

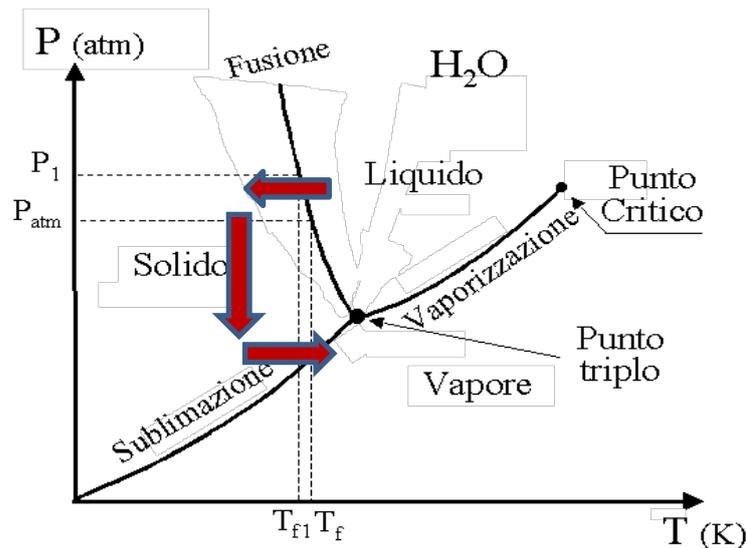


Figura 1.1. Diagramma di stato dell'acqua. Figura tratta da sito web chimica-chimica con modifiche.

1.2.2.1 Congelamento

Il congelamento è uno stadio determinante di un ciclo di liofilizzazione, in quanto determina la struttura finale del prodotto.

Oltre a influenzare la stabilità del prodotto, il congelamento gioca un ruolo fondamentale nel determinare i tempi di essiccamento. Infatti, variando le condizioni di congelamento è possibile modificare la dimensione media dei cristalli di ghiaccio e, quindi, dei pori che si formano durante la fase di essiccamento primario. Quest'ultimi determinano la resistenza del prodotto essiccato al trasporto di vapore. Matrici con pori più o meno piccoli necessiteranno di tempi di essiccamento diversi.

Una volta che i flaconi sono stati riempiti e caricati nella camera del liofilizzatore, la temperatura dei ripiani viene ridotta al di sotto di un determinato valore, spesso pari a $-45/-50$ °C, in modo da trasformare l'acqua liquida contenuta nei flaconi in ghiaccio.

Più precisamente, la temperatura della soluzione, composta dal farmaco e dal solvente acquoso, sarà ridotta al di sotto della temperatura eutettica T_{eu} per un prodotto cristallino, mentre inferiore alla temperatura di transizione vetrosa T_g' per un solido amorfo (Franks, 2007).

In un impianto discontinuo, in cui i flaconi sono appoggiati sul ripiano del liofilizzatore, i meccanismi di trasferimento di calore tra il flacone e l'impianto sono:

- Irraggiamento tra le pareti interne del liofilizzatore e il flacone;
- conduzione per contatto diretto tra il ripiano e il flacone;
- conduzione attraverso il gas presente nell'intercapedine tra la superficie inferiore del flacone e il ripiano;
- convezione del gas sulla superficie laterale del flacone (Capozzi et al, 2019).

Come mostrato nello studio di Pisano e Capozzi (2017) il contributo conduttivo del gas è il 90 % del calore totale scambiato e quindi rappresenta il meccanismo di trasferimento predominante.

1.2.2.2 Essiccamento primario

Prima dell'essiccamento primario, la maggior parte dell'acqua presente nel prodotto è allo stato solido. In tale fase, applicando il vuoto in camera di liofilizzazione, il prodotto verrà essiccato tramite la sublimazione del ghiaccio. Come mostrato in Figura 1.2, in un liofilizzatore tradizionale i flaconi sono in diretto contatto con i ripiani ed il calore viene fornito principalmente sul fondo del flacone. Nella parte sommitale del flacone, il calore latente di sublimazione sottrae calore al prodotto e questo si traduce in un gradiente di temperatura longitudinale. Nel corso dell'essiccamento primario bisogna fornire una quantità di calore in grado di bilanciare esattamente la potenza termica sottratta dalla sublimazione del ghiaccio e mantenere la temperatura costante al valore ottimale di processo. D'altro canto, il controllo termico non dovrà permettere che la temperatura del prodotto superi la temperatura eutettica T_{eu} della miscela solida acqua-soluto, comportando la fusione del soluto.

Per soluti non cristallini, che non presentano un punto eutettico vero e proprio, la temperatura non dovrà superare la temperatura di collasso T_n , di poco superiore a quella di transizione vetrosa T_g' , con l'obiettivo di evitare il collasso strutturale del prodotto.

Il controllo della temperatura gioca quindi un ruolo fondamentale durante l'essiccamento primario. Quando viene applicato il vuoto alla camera di liofilizzazione, il prodotto contenuto nei flaconi deve essere riscaldato dai ripiani e mantenuto ad una temperatura maggiore di quella presente al condensatore. Se così non fosse il processo di sublimazione sarebbe interrotto, in quanto il calore sottratto dalla sublimazione porterebbe all'eguaglianza della temperatura dei flaconi e del condensatore.

Il condensatore ha il ruolo di condensare il vapore prodotto dalla sublimazione e quindi si trova ad una temperatura minore di quella presente in camera di liofilizzazione. I due valori di temperatura comportano quindi valori di pressione di vapore differenti, maggiore sul fronte di sublimazione dei flaconi e minore sulla superficie del condensatore, sulla quale si deposita il ghiaccio. Ciò permette la sublimazione del ghiaccio che si trova a passare, sotto forma di vapore, da una zona di “*relativa*” alta pressione ad una di bassa pressione.

Garantito quindi un valore ottimale di temperatura e di pressione, il tempo di essiccamento dovrà essere sufficientemente lungo da permettere il completamento della sublimazione in tutti i flaconi presenti nel liofilizzatore (Franks, 2007).

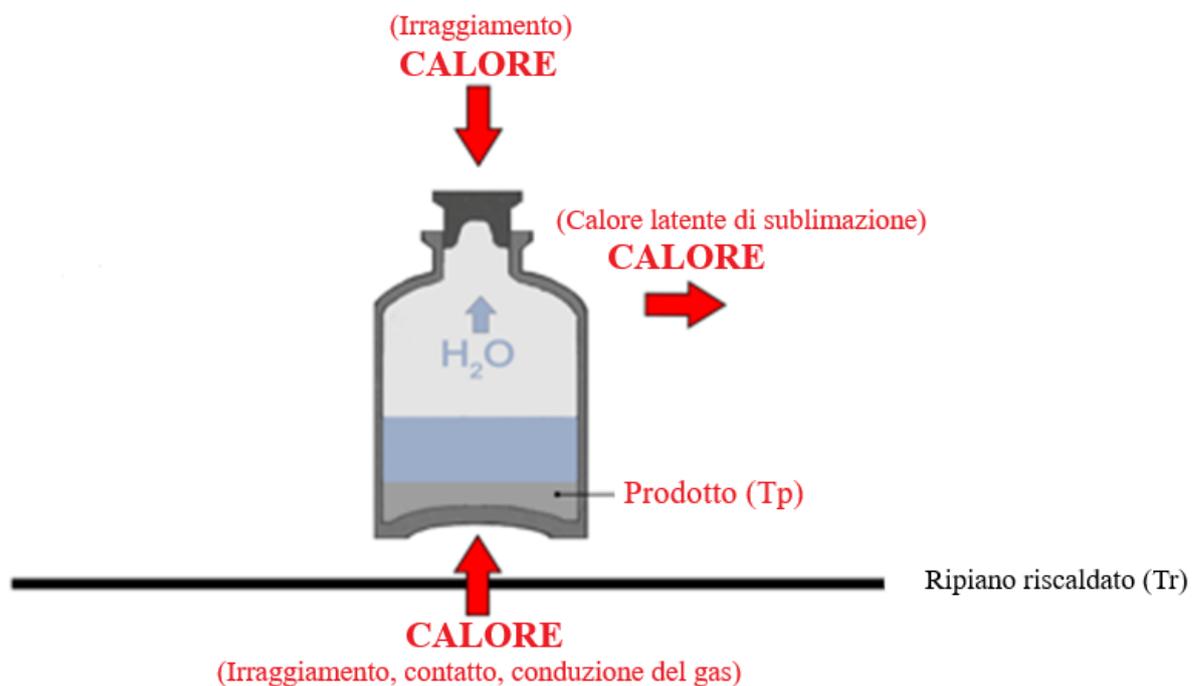


Figura 1.2. Trasferimento di calore tra il flacone e l'ambiente circostante, durante l'essiccamento primario, nella configurazione in cui ogni flacone è in diretto contatto con i ripiani del liofilizzatore. Figura tratta da (Franks, 2007) con modifiche.

1.2.2.3 Essiccamento secondario

Dopo che il ghiaccio è stato sublimato, l'eventuale acqua residua, non congelata ed intrappolata nel solido, deve essere rimossa per desorbimento. Questo processo è denominato essiccamento secondario.

All'interno di ogni flacone, dopo il congelamento, la quantità di acqua non congelata può variare dal 20 al 30 % in peso. In generale non vi è una vera e propria distinzione tra essiccamento primario e secondario, in quanto l'acqua liquida può desorbirsi contemporaneamente alla sublimazione del ghiaccio e quindi i due stadi possono essere concomitanti.

Esso viene in genere condotto a temperature più elevate rispetto al primario e deve essere sufficientemente lungo da portare l'acqua residua presente nel prodotto al valore desiderato. Il

punto più importante è che dopo il completamento della sublimazione del ghiaccio, la temperatura dovrà essere mantenuta il più vicino possibile alla temperatura di transizione vetrosa del prodotto secco T_g . Tuttavia, un eccessivo riscaldamento dei flaconi porterebbe a superare la temperatura di transizione vetrosa e causerebbe un collasso della struttura amorfa del prodotto. Tale collasso è dovuto ad una diminuzione della viscosità della matrice solida all'aumentare della temperatura, relativo al passaggio della struttura solida dal suo stato vetroso a quello amorfo (Franks, 2007).

1.3 Svantaggi liofilizzazione discontinua

Un processo discontinuo è costituito da una sequenza di stadi ed operazioni per la lavorazione e la trasformazione delle materie prime in prodotti finiti. Nonostante le crescenti attenzioni relative alla produzione in continuo, ci sono ancora molti processi in campo farmaceutico limitati da una conoscenza non adeguata. Ciò rende ancora più difficoltoso la loro implementazione in modalità continue.

Nonostante possa sembrare semplice, la liofilizzazione è un processo complesso e costoso che richiede lunghi tempi di lavorazione. Ciò è aggravato dal fatto che, nella quasi totalità dei casi, si tratta di un processo discontinuo.

Nei processi convenzionali, sussistono una moltitudine di problematiche che introducono eterogeneità nel prodotto e rendono molto difficile ottenere un'adeguata uniformità tra dose e dose. Inoltre, l'intervento umano nelle operazioni preliminari di carico e scarico, è il principale colpevole di contaminazione e quindi del mancato raggiungimento degli standard di qualità.

Il passaggio ad una produzione in continuo potrebbe migliorare l'omogeneità del prodotto incrementandone l'efficienza, la purezza e limitando l'interazione operatore-processo. Nel seguito si discuteranno i principali svantaggi o limiti della liofilizzazione in qualità di processo discontinuo.

1.3.1 Tempi morti del processo

Un tipico ciclo di liofilizzazione può durare da poche ore a più settimane a seconda dei volumi di riempimento, del tipo di flacone e dalle operazioni preliminari.

Il tempo di inattività tra due cicli di liofilizzazione può essere anche molto lungo, in quanto prevede le seguenti operazioni:

- dosaggio del principio attivo nei flaconi;
- introduzione dei flaconi nel liofilizzatore (*loading*);
- pulizia e sterilizzazione della camera di liofilizzazione;
- scongelamento del condensatore;
- test di tenuta della pressione della camera di liofilizzazione;
- test d'integrità dei filtri e del condensatore (Pisano et al., 2019).

Anche se tali operazioni vengono condotte da mezzi automatici, il riempimento e la fase di carico dei flaconi possono durare diverse ore per produzioni su larga scala. La pulizia e la

sterilizzazione della camera di liofilizzazione devono essere sufficientemente lunghi al fine di ridurre pericoli di contaminazione.

1.3.2 Eterogeneità nella fase di congelamento

Il congelamento è un processo molto importante in un ciclo di liofilizzazione e può essere una sorgente di disomogeneità tra flacone e flacone e tra lotto e lotto. Per comprendere come il congelamento produce eterogeneità tra i flaconi, bisogna analizzare le varie fasi che susseguono durante il congelamento e meglio comprendere il concetto di temperatura di nucleazione. In Figura 1.3 si possono notare le fasi del congelamento dallo studio del profilo di temperatura del prodotto contenuto nei flaconi.

Inizialmente vi è un raffreddamento della soluzione fino alla temperatura di nucleazione, alla quale si formano i primi nuclei di ghiaccio. Il rapido innalzamento della temperatura è dovuto all'esotermicità del fenomeno ed è seguito dall'accrescimento dei cristalli. Durante il congelamento di una soluzione farmaceutica è necessario un certo grado di sotto raffreddamento al fine di indurre spontaneamente il fenomeno di nucleazione. Questa fase gioca un ruolo fondamentale nella struttura finale del prodotto essiccato, in quanto, un maggior grado di sotto raffreddamento riduce la temperatura di nucleazione, incrementando la velocità con la quale si formano i nuclei di ghiaccio e portando così la formazione di cristalli di ghiaccio più piccoli. La nucleazione è un fenomeno stocastico e risulta quindi imprevedibile se non vi è un opportuno controllo. Nelle tecniche convenzionali risulta difficile mantenere costante in tutti i flaconi lo stesso grado di sotto raffreddamento. Questo ne comporta la variabilità della temperatura di nucleazione da flacone a flacone e quindi della struttura finale del prodotto. Inoltre, matrici solide con una dimensione dei pori più o meno piccola comporteranno tempi di essiccamento differenti durante le fasi successive.

In letteratura sono state presentate una moltitudine di metodologie al fine di ridurre la variabilità della temperatura di nucleazione, tra queste la tecnologia *Vacuum-Induced Surface Freezing* (VISF) ha mostrato la maggior competitività nel controllo della temperatura di nucleazione (Pisano, 2019; Searles et al., 2001).

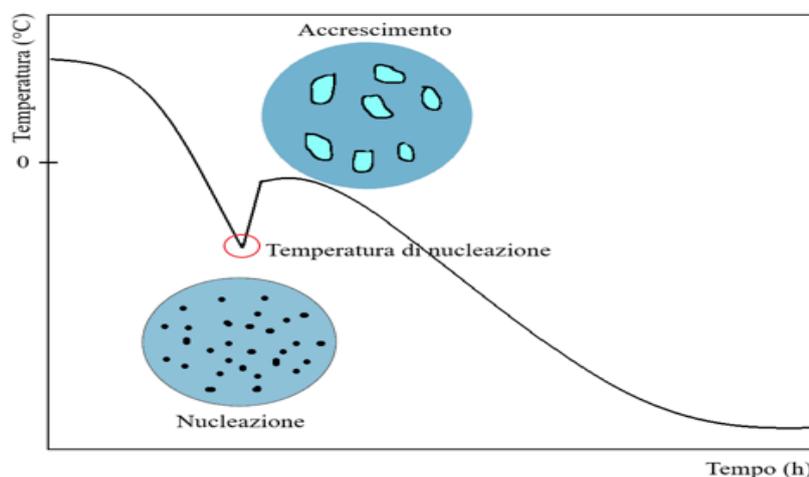


Figura 1.3 Profilo di temperatura del prodotto contenuto nei flaconi durante il congelamento.

1.3.3 Eterogeneità nel trasferimento di calore durante la fase di essiccamento

Durante l'essiccamento, l'eterogeneità è rappresentata dalle differenze nei meccanismi di trasferimento di calore.

Tali variazioni possono essere dovute a:

- geometria del flacone e spessore del ripiano;
- differenti posizioni dei flaconi sul ripiano;
- gradienti di temperatura nel ripiano;
- non uniformità della pressione nella camera di liofilizzazione (Pisano et al., 2019).

Durante un ciclo di liofilizzazione il calore fra l'ambiente circostante e il flacone è scambiato secondo tre meccanismi principali: irraggiamento, conduzione e convezione. Questi contributi al trasferimento di calore possono essere ampiamente diversi da flacone a flacone all'interno di un singolo lotto e possono causare delle disomogeneità all'interno del prodotto.

Nella liofilizzazione discontinua, i flaconi sono a diretto contatto con il ripiano ed occupano posizioni diverse all'interno della camera di liofilizzazione. Come detto in precedenza, il flusso di calore tra il ripiano e il flacone dipende da vari parametri geometrici e dalle condizioni di pressione e temperatura all'interno della camera.

Durante la liofilizzazione, condotta in modalità discontinua, i meccanismi di calore che provocano una non uniformità del prodotto sono:

- conduzione per diretto contatto tra il flacone e il ripiano;
- conduzione del gas nell'intercapedine tra il fondo del flacone e il ripiano;
- irraggiamento tra le parti interne del liofilizzatore e il flacone (Capozzi et al., 2019).

La conduzione dovuta al contatto diretto costituisce il 40 % dello scambio di calore ed è fonte di notevole disomogeneità, in quanto la sezione del flacone a contatto con il ripiano dipende dalla curvatura e perciò dalla tipologia di flacone utilizzato.

Il secondo meccanismo di scambio di calore è condizionato dall'intercapedine tra il fondo del flacone e il ripiano. Tale contributo dipende inoltre dalla pressione della camera, nonché dalla curvatura e quindi dalla tipologia di flacone. La variabilità della curvatura del flacone è un ulteriore contributo alla non uniformità dello scambio di calore.

Il terzo contributo è il flusso di calore dovuto alle radiazioni provenienti dall'ambiente circostante quali la porta, le pareti ed i ripiani del liofilizzatore. Questo meccanismo è molto importante nello studio di liofilizzazione discontinua, in quanto fiale in posizioni diverse all'interno della camera sono più o meno irradiate. Infatti, sebbene le fiale nel centro del ripiano ricevano calore dai ripiani inferiori e superiori, i flaconi in posizione esterne sono maggiormente irradiati dalle pareti e dalla porta del liofilizzatore. Questo può comportare una maggiore temperatura dei flaconi laterali rispetto a quelli centrali (*edge effect*).

Un ulteriore meccanismo che porta alla non uniformità è il gradiente di temperatura sul ripiano. In un liofilizzatore, il fluido termovettore passa attraverso un canale di flusso all'interno dei ripiani e riscalda i prodotti. La variazione di temperatura fra l'ingresso e l'uscita può essere

dell'ordine di 1-2 K e tale differenza è amplificata in un liofilizzatore su scala industriale (Capozzi et al., 2019).

1.3.4 Variabilità degli standard di qualità da lotto a lotto

La variabilità delle caratteristiche del prodotto, tra differenti cicli di liofilizzazione, è un problema tipico di ogni processo discontinuo e che non può essere completamente eliminato neanche mediante un preciso controllo delle variabili operative.

Eventuali deviazioni come variazioni dei fornitori, mal funzionamento delle apparecchiature ed errore umano possono compromettere la qualità e la sicurezza del prodotto, con la conseguente perdita del lotto. Lo sviluppo di un solido protocollo “*Quality by Design*” ridurrebbe la variabilità del prodotto dovuta ad un cambiamento delle specifiche delle materie prime o delle variabili di processo (Pisano et al., 2019).

Inoltre, come visto precedentemente, una produzione in continuo potrebbe ridurre le interazioni tra operatore e prodotto, riducendo al minimo il pericolo di contaminazione e la perdita di qualità.

1.3.5 Scale-Up

I passaggi di scala giocano un ruolo fondamentale nella progettazione di un ciclo di liofilizzazione. Quando si passa dal laboratorio ad una apparecchiatura pilota ed infine ad una produzione industriale, bisogna tenere in conto molte variabili. I tipici problemi di scalabilità sono: lunghi tempi di carico e scarico dei lotti, variabilità nel trasferimento di calore, variazione delle resistenze al trasporto di materia e calore nel prodotto e gradienti di temperatura sul ripiano del liofilizzatore (Pisano et al. 2019).

La rimozione del vapore d'acqua tramite sublimazione e desorbimento è influenzata dalla struttura formatasi durante il congelamento. Eterogeneità dovute allo spessore e porosità della torta liofilizzata possono essere dei veri e propri problemi durante lo scale-up del ciclo di liofilizzazione.

Nella progettazione su grande scala è molto importante lo studio dei gradienti di temperatura sui ripiani. Come detto precedentemente, nei liofilizzatori di laboratorio sono state misurate delle differenze di temperatura del fluido, tra ingresso e uscita del liofilizzatore, dell'ordine di 1-2 K. Nei cicli di liofilizzazione industriali, queste differenze di temperatura possono essere notevolmente amplificate fino a raggiungere 0,02-0,07 K/cm (Capozzi et al., 2019).

Precedentemente, nella discussione dell'eterogeneità nei meccanismi di trasferimento di calore, è stato descritto il fenomeno denominato *edge effect*, per il quale flaconi posti in prossimità delle pareti/porta della camera di liofilizzazione risultano maggiormente irradiati e possono presentare una temperatura maggiore rispetto ai flaconi posti in posizione centrale. Questo effetto risulta tra i principali problemi di scale up, in quanto potrebbe portare, durante l'essiccamento primario, all'istaurarsi di trasformazioni irreversibili del prodotto con la conseguente fusione o collasso della sua struttura (Capozzi et al., 2019).

Infine, quando si progetta un liofilizzatore industriale, è molto importante ridurre i gradienti di pressione dovuti ad un accumulo del vapore acqueo nella camera di liofilizzazione. Questo

perché, durante l'essiccamento primario, gradienti di pressione causerebbero dell'eterogeneità nella temperatura raggiunta dai flaconi e nella velocità di sublimazione del ghiaccio a causa della diversa potenza termica scambiata tra i flaconi e l'ambiente circostante. Ciò comporterebbe la variazione dei tempi di essiccamento da flacone a flacone e l'incremento del collasso strutturale (Capozzi et al., 2019).

1.4 Meccanismi di denaturazione provocati dal congelamento

Come citato precedentemente, il metodo più comune utilizzato per la conservazione di enzimi è la liofilizzazione. La fase di congelamento, in un ciclo di liofilizzazione, è considerata importante quanto la fase di essiccamento a causa di notevoli stress indotti sulle proteine. Tali stress possono compromettere la struttura proteica con la conseguente perdita del principio attivo (Wang, 2000).

Al fine di una migliore comprensione dei risultati presentati in seguito nel CAPITOLO 3, saranno ora discussi i meccanismi di denaturazione generati durante il congelamento.

1.4.1 Denaturazione provocata dalla bassa temperatura

Il primo studio quantitativo del fenomeno di denaturazione a freddo viene attribuito a Shikama e Yamazaki (1961) che hanno investigato la perdita di attività dell'enzima Catalasi, in buffer fosfato 10 mM pH 7.0, durante il congelamento.

Tale studio ha rilevato il 20% di perdita di attività dell'enzima durante il congelamento a -12 °C. Tra -12 °C e -75 °C la perdita di attività è rimasta invariata ed è diminuita gradualmente tra -75 °C e -120 °C. Non è stata misurata un'ulteriore perdita di attività tra -129 °C e -192 °C. Lo studio di Shikama e Yamazaki (1961) è un chiaro esempio di denaturazione a freddo, piuttosto che un effetto provocato dal congelamento/scongelo (Wang, 2000).

Il fenomeno di denaturazione a freddo può essere spiegato mediante lo studio del comportamento idrofobo della proteina. La proteina nativa, in soluzione liquida, si dispone con una determinata configurazione, tale da racchiudere all'interno della propria struttura i gruppi idrofobici della quale è composta. Con l'abbassamento della temperatura, aumenta la solubilità in acqua di tali gruppi e il comportamento idrofobo della proteina diventa sempre più debole. Ciò comporta la variazione della propria conformazione e la perdita della struttura terziaria (Anfinsen, 1973; Dill et al., 1989; Graziano et al., 1997).

La Figura 1.4 mostra il profilo della barriera energetica tra la struttura nativa della proteina e quella denaturata, in funzione della temperatura. La barriera energetica tra le due forme è calcolata con l'equazione 1.1:

$$\Delta G = \Delta G^u - \Delta G^f \quad (1.1)$$

dove ΔG^f e ΔG^u rappresentano rispettivamente l'energia libera della struttura nativa e della forma denaturata della proteina.

La proteina nativa è stabile se $\Delta G > 0$, mentre evolve spontaneamente verso la forma denaturata se $\Delta G < 0$. Essendo l'energia libera funzione della temperatura, il meccanismo di denaturazione s'innesca quando la temperatura raggiunge un valore tale per cui entrambe le configurazioni, nativa e denaturata, acquistano la medesima energia libera. In tale condizione la barriera energetica tra le due forme risulta nulla $\Delta G = 0$ (Dias et al., 2010).

D'altro canto, come si denota dalla Figura 1.4, la relazione tra l'energia libera di dispiegamento e la temperatura assume un profilo parabolico. Ciò significa che esiste un valore di temperatura alla quale la stabilità proteica è massima, condizione rappresentata dal punto di massimo della curva (Jaenicke, 1990; Kristjansson e Kinsella, 1991).

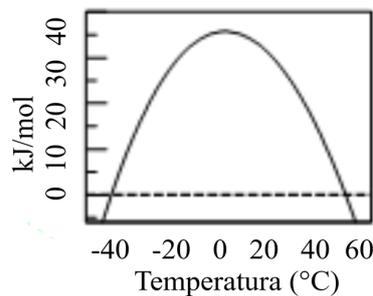


Figura 1.4 Barriera energetica tra la struttura nativa e la forma denaturata della proteina. Figura tratta da (Dias et al., 2010) con modifiche.

1.4.2 Denaturazione provocata dall'interfaccia acqua-ghiaccio

L'interfaccia acqua-ghiaccio, formatasi durante il congelamento, può essere la causa principale di denaturazione dovuta all'adsorbimento delle proteine (Strambini e Gabellieri, 1996).

Sono stati investigati diversi protocolli di congelamento e si è notato che, metodi di congelamento estremamente veloce, come l'immersione in azoto liquido, hanno prodotto una perdita di attività proteica come undici cicli di congelamento lento (Chang et al., 1996).

Tale perdita di attività è stata attribuita proprio all'estensione dell'interfaccia acqua-ghiaccio. Protocolli con velocità di congelamento elevata producono un'interfaccia acqua-ghiaccio più estesa e quindi favoriscono la denaturazione proteica.

In Figura 1.6 sono mostrate le curve di raffreddamento ottenute con una tecnica di calorimetria differenziale a scansione (DSC). Il picco mostrato in Figura 1.6, nella fase di congelamento, è conseguenza della cristallizzazione che determina la formazione dei cristalli di ghiaccio.

All'aumentare della velocità di congelamento la temperatura di cristallizzazione diminuisce e la velocità di nucleazione aumenta. Ciò comporta la formazione di un maggior numero di nuclei di ghiaccio e quindi la creazione di cristalli di ghiaccio più piccoli (Michelmor e Franks, 1982; Bronshteyn e Steponkus, 1995). D'altro canto durante un congelamento lento il sistema

viene meno raffreddato e si formano meno nuclei di ghiaccio. Ciò permette ai cristalli di crescere maggiormente ed in modo più omogeneo.

La stessa quantità di ghiaccio in forma di piccoli cristalli offre una superficie molto più ampia rispetto ai cristalli di grande dimensione e quindi incrementa la possibilità di provocare la denaturazione della proteina (Hillgren et al., 2002).

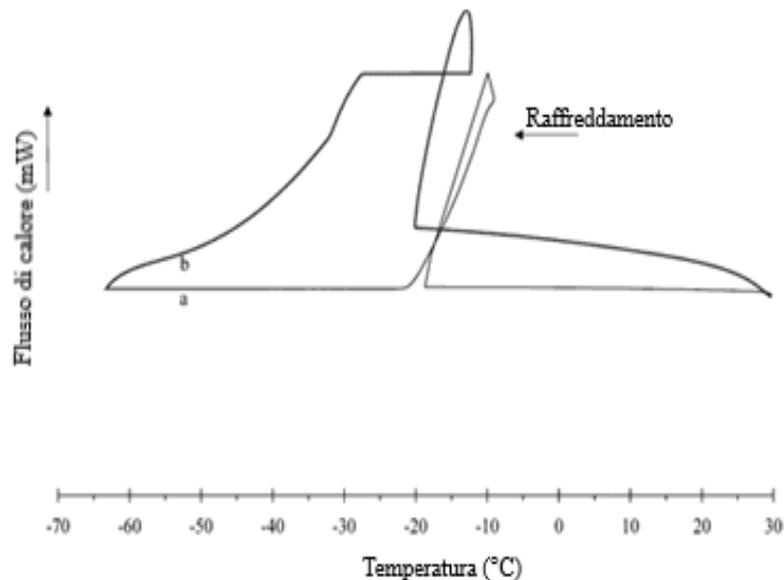


Figura 1.5 Termogramma di raffreddamento ottenuto con tecnica DSC. Campione contenente LDH 25 µg/ml in tampone citrato. a) Velocità di raffreddamento 5 °C/min e b) velocità di raffreddamento 20 °C/min. Figura tratta da (Hillgren et al., 2002) con modifiche.

1.4.3 Denaturazione provocata dalla variazione del pH

Molte proteine sono stabili in un intervallo di pH molto ristretto, ne è un esempio l'enzima urochinasi a basso peso molecolare (LMW-UK), il quale risulta stabile nell'intervallo di pH 6-7 (Vrkljan et al., 1994). A valori di pH estremi, le repulsioni elettrostatiche, dovute alle cariche dei gruppi proteici, possono comportare la denaturazione delle proteine (Wang, 2000).

La variazione del pH di una soluzione proteica può essere causata dal congelamento, a causa della cristallizzazione e precipitazione di uno o più componenti presenti in soluzione (Wang, 1999). In seguito al congelamento di LDH è stata misurata una variazione del pH da 7,5 a 4,5 a causa della cristallizzazione del tampone fosfato Na_2HPO_4 (Anchordoquy e Carpenter, 1996). Inoltre, LDH è risultata molto sensibile alla variazione del pH e può denaturarsi anche in presenza di eccipienti stabilizzanti (Nema e Avis, 1992).

Tuttavia in letteratura sono stati individuati determinati tamponi: fosfato di potassio (Van den Berg e Rose, 1959) e citrato di sodio (Chang e Randall, 1996) che non inducono cambiamenti di pH significativi durante il congelamento.

1.5 Tecnologie di liofilizzazione in continuo

Le tecniche di liofilizzazione in continuo possono essere raggruppate in due grandi categorie: liofilizzazione che opera con materiale sfuso in forma granulare o in forma liquida e liofilizzatori che lavorano direttamente con dosi singole.

Per la prima categoria, conosciuta come liofilizzazione di *bulk*, il dosaggio del prodotto in contenitori adeguati viene fatto dopo il ciclo di liofilizzazione; al contrario, per la liofilizzazione in singole dosi, invece, il dosaggio è effettuato come prima operazione.

La liofilizzazione in singole dosi è preferita dall'industria farmaceutica perché riduce il pericolo di contaminazione post-processo durante l'operazione di dosaggio; inoltre garantisce un dosaggio del principio attivo più accurato. D'altro canto, il controllo di una tecnica di liofilizzazione in singole dosi appare più complesso, data la difficoltà di adeguare l'apparato in continuo alle diverse tipologie di contenitori esistenti per prodotti farmaceutici.

Dal punto di vista progettuale, una liofilizzazione di *bulk* risulta essere più semplice, in quanto, il processo in continuo può essere implementato con un semplice letto fluidizzato o un trasportatore vibrante. Per questo motivo, le prime tecniche di liofilizzazione in continuo sono state progettate nella seconda modalità e sono state proposte per l'industria alimentare dove i vincoli sulla sterilità del processo produttivo sono meno stringenti (Pisano et al., 2019).

A fine illustrativo, in questa sezione saranno presentate alcune delle configurazioni tecnologiche di liofilizzazione, operanti in *bulk* o in singole dosi.

1.5.1 *Active freeze drying*

Uno tipico problema della tradizionale liofilizzazione di *bulk* su ripiani è la formazione di *cluster* di materiale dalle grandi dimensioni durante il processo di essiccamento, a causa dell'assenza di agitazione del prodotto granulare. Per risolvere il problema, è necessario condurre delle operazioni aggiuntive a valle del processo di liofilizzazione, il prodotto dovrà essere macinato, al fine di trasformare grandi blocchi di materiale in polvere.

Tali operazioni possono essere fonte di contaminazione e portare alla perdita di attività del principio attivo, a causa di eccessivi stress meccanici provocati dalla macinazione. Inoltre, la manipolazione del materiale sfuso, a valle del processo di liofilizzazione, può portare alla formazione di polveri provocando situazioni di pericolo. Un ulteriore problema è la lentezza del trasferimento di calore all'interno del sistema, dovuto all'assenza di dispositivi adibiti all'agitazione del materiale granulare.

Questi problemi sono stati risolti dalla *Hosokawa Micron BV company in Doetinchem* presentando una nuova soluzione impiantistica per la liofilizzazione di *bulk*, mostrata in Figura 1.6 (Van der Wel, 2015).

La materia prima da liofilizzare viene congelata mediante l'iniezione di un fluido refrigerante o attraverso l'utilizzo di una camicia esterna. Dopo il congelamento, viene applicato un certo livello di vuoto per indurre la sublimazione.

Durante l'intero ciclo di liofilizzazione, il calore sottratto dalla sublimazione e poi dal desorbimento dell'acqua viene bilanciato con l'utilizzo di un fluido termovettore presente nella camicia esterna della camera di liofilizzazione. Inoltre, una continua miscelazione impedisce la formazione di blocchi di materiale di grandi dimensioni.

Questa tecnologia ha il vantaggio, rispetto ad una liofilizzazione in granuli tradizionale, di avere dei coefficienti di trasferimento di calore più elevati, grazie alla continua miscelazione del prodotto granulare. Ciò si traduce in tempi di essiccamento minori.

Inoltre, il prodotto non necessita di una macinatura finale, con il pericolo di deteriorare e contaminare il principio attivo.

Tale soluzione impiantistica occorre però di filtri, per evitare la fuoriuscita di polveri secche durante il processo di liofilizzazione (Pisano et al., 2019).

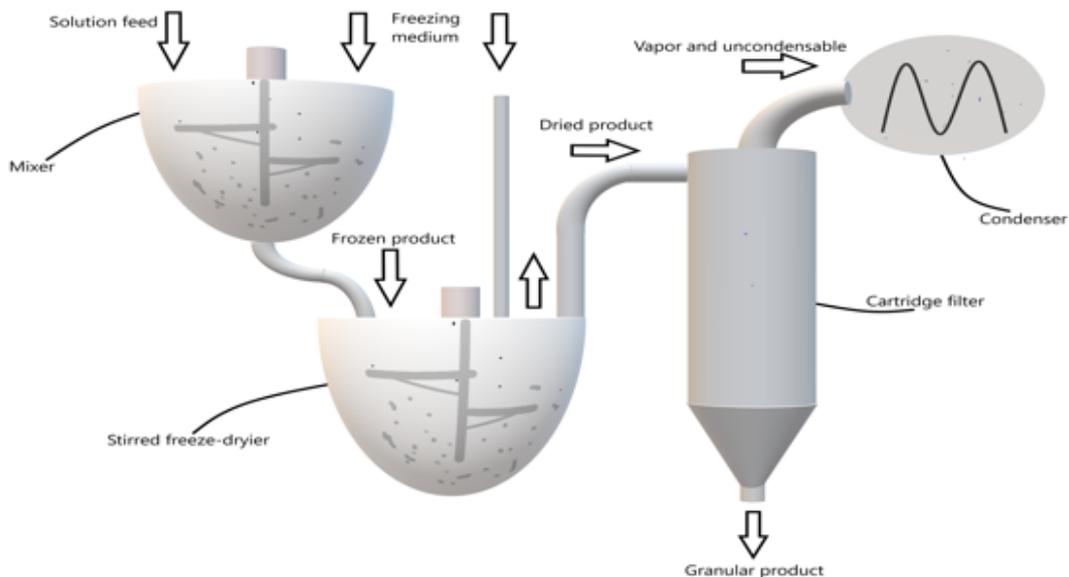


Figura 1.6 *Impianto Active freeze drying sviluppato da Hosokawa Micron BV company in Dotinchem. Immagine tratta da (Pisano et al., 2019) con modifiche.*

1.5.2 Fine-spray freeze drying

Tra le nuove tecnologie di liofilizzazione di bulk, si vede protagonista la Ulvac Technologies (Pisano et al., 2019) con lo sviluppo di un nuovo processo di liofilizzazione spray.

Il liquido viene spruzzato nella camera di liofilizzazione tramite degli ugelli e poi congelato su ripiani a temperatura controllata. In questa configurazione, le gocce congelano e si depositano sui ripiani del liofilizzatore in forma di micro-particelle.

A differenza della liofilizzazione in massa tradizionale, l'interfaccia di sublimazione è estremamente ampia, grazie all'elevato numero di gocce di piccole dimensioni.

Dato l'elevato rapporto superficie/volume, lo scambio di calore e di massa viene agevolato e questo permette di ottenere un congelamento ed essiccamento del prodotto più veloce. È stato stimato che atomizzando 1 ml di soluzione in gocce di dimensione 0,5 mm, si produca un'interfaccia gas/liquido 80 volte maggiore rispetto all'utilizzo di un flacone con diametro 14 mm (Sebastiao et al., 2019).

Grazie ai processi di congelamento ed essiccamento estremamente veloci, questa tecnica di liofilizzazione permette di ottenere un'elevata uniformità nelle dimensioni del prodotto finale

e quindi non sono necessarie operazioni aggiuntive di macinazione. Inoltre, l'apparecchio è completamente chiuso, riducendo il pericolo di contaminazione (Pisano et al., 2019).

1.5.3 *Spin freeze drying*

Sono stati sviluppati dei metodi di liofilizzazione direttamente in flacone denominati *spin freezing method*. Durante il congelamento il flacone viene fatto ruotare per indurre l'adesione del prodotto liquido sulla superficie interna del flacone e la conseguente solidificazione con forma a guscio.

Becker (1957) propose un processo di liofilizzazione in continuo, in cui ogni flacone viene trasportato per mezzo di una capsula guida. Il flacone, guidato dalla capsula guida, viene prelevato ed introdotto nella camera di congelamento, dove è mantenuto in rotazione. Successivamente viene trasportato nella camera di essiccamento, un lungo condotto a forma di spirale, in cui si muove rotolando per effetto del proprio peso. Dopo di che la capsula guida torna indietro e ripete l'intero ciclo.

Un'ulteriore liofilizzazione in continuo, che utilizza una metodologia spin, è il processo Broadwin (1965). Tale apparato è adatto per liquidi sensibili al calore, come enzimi, sieri contenenti cellule e proteine. Il metodo consiste in una liofilizzazione sotto vuoto, senza l'utilizzo di fluidi refrigeranti. All'interno della camera di liofilizzazione, i flaconi vengono adagiati su una centrifuga. Grazie al movimento rotativo, il liquido si distribuisce sulla superficie interna dei flaconi assumendo una forma a conchiglia.

Il liquido viene congelato per raffreddamento, indotto da un certo livello di vuoto nella camera di liofilizzazione. Una volta congelato il prodotto, la centrifuga viene fermata e si procede con l'essiccamento vero e proprio.

L'essiccamento viene condotto in due fasi: la prima fase consiste nell'evaporazione dell'acqua non congelata, fornendo calore per conduzione a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poi, il prodotto è raffreddato a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ per terminare l'essiccamento.

Nel modello di Becker (1957), i flaconi compiono un percorso traumatico dalla camera di congelamento al tunnel di essiccamento. Gli stress meccanici, prodotti dal trasporto del flacone nelle varie camere di cui è composto il macchinario, potrebbero compromettere la struttura del prodotto congelato, causandone la disattivazione del principio attivo. Inoltre, la capsula guida introduce nella camera di essiccamento un flacone alla volta e questo riduce la produttività del processo. Anche il processo Broadwin (1965), per fluidi termolabili, ha una efficienza di produzione bassa perché prevede il congelamento e l'essiccamento nella stessa camera.

Più tardi è stato proposto da Oughton (1999) un nuovo processo di liofilizzazione, con lo scopo di risolvere i problemi citati in precedenza. Tale configurazione si propone di ridurre i tempi di essiccamento e minimizzare il pericolo di contaminazione. La procedura, attuando tempi di permanenza bassi dei flaconi all'interno del liofilizzatore, può essere ulteriormente utilizzata con composti termolabili come proteine e cellule.

I flaconi vengono inizialmente caricati su un supporto che fungerà da guida nel processo di liofilizzazione.

Tramite un movimentatore a rulli, il supporto viene trasportato in una seconda zona adibita alla pulizia. I flaconi vengono quindi lavati e sterilizzati con aria calda. La sezione di

congelamento segue il modulo di pulizia, dove i flaconi vengono presi da un braccio meccanico, posti in posizione orizzontale e fatti ruotare. Il congelamento avviene grazie all'iniezione di un gas refrigerante inerte direttamente all'interno del flacone per accelerare il processo. La rotazione deve essere controllata, in modo che si formi un guscio di materiale solido in ogni flacone. Il peso viene continuamente monitorato, prima e dopo il processo, in modo che il dosaggio del prodotto in ogni fiala sia effettuato con i giusti volumi.

Una volta terminato il congelamento, un sistema di movimentazione automatico porta i flaconi nella sezione di essiccamento, dove grazie all'applicazione del vuoto si induce la sublimazione del ghiaccio. Blocchi di trasmissione del calore sono inseriti nel tunnel di essiccamento primario per controbilanciare il calore sottratto dalla sublimazione.

Il calore è trasferito radialmente verso l'interno dei flaconi per accelerare l'essiccamento e può essere modulato, regolando la potenza termica fornita dai blocchi.

Dopo la fase di essiccamento i flaconi vengono sigillati ed etichettati (Pisano et al., 2019).

Più recentemente una nuova tecnologia di liofilizzazione in continuo, lavorante con singole dosi, è stata proposta da Corver (2012) e successivamente approfondita da De Meyer et al. (2015).

Inizialmente, il sistema prevede il riempimento e il congelamento dei flaconi in continuo. Durante tale operazione, i flaconi vengono ruotati rapidamente lungo il proprio asse longitudinale e raffreddati da un flusso di gas sterile a temperatura controllata. Grazie a tale configurazione, il liquido presente nei flaconi viene congelato su una superficie del flacone maggiore rispetto ai processi tradizionali.

Successivamente, i flaconi sono trasferiti in continuo, grazie ad un sistema load-lock alla camera di essiccamento; viene adibita una sezione per l'essiccamento primario ed una successiva, per l'essiccamento secondario. Nelle due camere il calore necessario alla sublimazione e al desorbimento dell'acqua viene scambiato tramite meccanismo radiante e conduttivo mentre il prodotto è movimentato tramite l'utilizzo di una cinghia. Infine, il condensatore si occupa di condensare ed allontanare il vapore acqueo dal prodotto essiccato.

Tale processo ha il vantaggio di ridurre notevolmente i tempi di essiccamento. Grazie alla formazione di uno strato sottile di materiale congelato su una superficie molto ampia del flacone, è stato osservato da De Meyer et al. (2015) una riduzione, di un fattore 10-40, del tempo di essiccamento.

1.5.4 Suspended vials

Il metodo Suspended è un'ulteriore tecnica di liofilizzazione in singole dosi proposta da Capozzi et al. (2019). In questo apparecchio, i flaconi sono sospesi tramite una cinghia e si muovono in continuo, attraverso camere a pressione e temperatura controllate.

L'apparecchiatura è suddivisa in diverse sezioni, ognuna dedicata ad una specifica operazione: congelamento, essiccamento primario e secondario.

Un dispositivo noto come load-lock collega i diversi moduli, operanti a valori di pressione e temperatura diversi, al fine di garantire la continuità delle operazioni.

Il sistema load-lock non è altro che una camera intermedia, nella quale si regola la pressione e la temperatura. Una volta terminata l'operazione di un modulo, i flaconi sono prelevati e

trasportati in tale camera, dove la pressione e la temperatura eguagliano quelle del primo modulo. A questo punto la camera intermedia viene isolata dal primo modulo ed i valori di pressione e temperatura vengono regolati tramite l'uso di una pompa da vuoto o grazie all'inserimento di un gas inerte, in modo da eguagliare quelli del modulo successivo. Una volta completata l'operazione, la camera viene messa in comunicazione con il secondo modulo e il ciclo continua.

Il primo passo è il riempimento in continuo dei flaconi. Tale operazione viene condotta anche in sistemi discontinui e rappresenta un notevole tempo morto (Capozzi et al, 2019). In questo caso però, grazie alla continuità del processo, non sono necessari sistemi di riempimento automatico ad alta velocità e il riempimento è condotto in parallelo al processo stesso. Inoltre, nella modalità dei flaconi sospesi si riduce al minimo il pericolo di contaminazione nel passaggio dal modulo di riempimento al modulo di congelamento. Dopo essere stati riempiti, i flaconi vengono parzialmente chiusi e trasportati in continuo al modulo successivo.

Dopo il riempimento, i flaconi sono trasferiti al modulo di congelamento, costituito da tre sotto moduli: modulo di condizionamento, sistema *load-lock* e modulo di congelamento vero e proprio. Le operazioni effettuate dipendono dal ciclo di liofilizzazione che si vuole attuare.

Il modulo di condizionamento ha il compito di uniformare la temperatura all'interno di ogni flacone, mediante l'utilizzo di un fluido refrigerante inerte come l'azoto a temperatura e portata controllata. I flaconi sono sospesi e si muovono nella camera di condizionamento fino a quando non si sono raggiunte le condizioni operative desiderate. Il condizionamento, necessario se si usa una tecnica di nucleazione controllata, è anche suggerito per la liofilizzazione tradizionale, al fine di ottenere una migliore omogeneità del prodotto al termine del congelamento.

Nel caso si voglia ottenere un miglior controllo della temperatura di nucleazione durante il congelamento, il sistema *load-lock* permette facilmente l'implementazione della tecnica di nucleazione controllata VISF. Tuttavia, il macchinario permette di implementare anche altri metodi per il controllo della temperatura di nucleazione.

Le metodologie per controllare la nucleazione sono molteplici: *VISF*, *ice fog*, *ultrasounds* e *pressure disturbance*. Tra queste, la VISF è una tecnica in cui si induce la nucleazione, abbassando rapidamente la pressione. Tale depressione provoca una parziale evaporazione del solvente, con conseguente abbassamento della temperatura, confinato all'interfaccia gas liquido, e formazione di cristalli di ghiaccio di grosse dimensioni. Grazie a tale tecnica, si ottengono delle strutture più omogenee e quindi migliora la qualità del prodotto (Oddone et al., 2014).

Nella configurazione proposta da Capozzi et al (2019) la nucleazione indotta dall'abbassamento della pressione può essere condotta direttamente nel sistema *load-lock*, utilizzato per il carico della fiala nella camera di congelamento.

Nella camera di congelamento, grazie alla circolazione forzata di un gas refrigerante, la temperatura viene abbassata fino alla completa solidificazione del prodotto.

In questo modulo, il calore è trasferito per convezione dal gas circolante e mediante radiazione dall'ambiente circostante. Si elimina il contributo di calore conduttivo dato dal contatto tra il flacone e il ripiano del liofilizzatore.

Al fine di ridurre l'eterogeneità nel trasferimento di calore, tipici dei processi tradizionali, l'apparecchiatura costringe il gas refrigerante a fluire lungo il modulo di congelamento, in modo tale da lambire in egual misura i flaconi da congelare. Inoltre, risulta possibile

l'implementazione di differenti protocolli di congelamento variando la velocità e la temperatura del fluido criogenico.

È stato rilevato da Capozzi et al. (2019), mediante un diretto confronto tra la tecnologia dei flaconi sospesi e la classica configurazione discontinua, che, nel caso di liofilizzazione discontinua durante il congelamento, la temperatura del prodotto è compresa tra la temperatura del ripiano e quella dell'ambiente circostante. Il calore viene quindi rimosso dal fondo del flacone, in contatto con il ripiano e fornito dall'ambiente circostante, mediante meccanismo convettivo dell'aria. Ciò comporta notevoli gradienti di temperatura all'interno del prodotto. Diversamente, utilizzando la modalità sospesa, il calore viene scambiato unicamente attraverso la convezione del gas refrigerante in camera e viene eliminato il contributo di calore conduttivo, relativo al contatto tra flacone e ripiano. Per tali motivi, il metodo dei flaconi sospesi permette di ottenere strutture solide più omogenee dato che tutti i flaconi sono esposti alle medesime condizioni.

Inoltre, tramite microscopio elettronico a scansione è stata studiata, da Capozzi et al. (2019), l'influenza di diversi protocolli di congelamento sulla morfologia del prodotto finito, investigando la dimensione media dei pori e la loro distribuzione. Si è osservato che il congelamento sospeso permette di ottenere una matrice solida porosa più uniforme, con una dimensione dei pori compresa nell'intervallo (65-85) μm e con una dimensione media di 70 μm , maggiore rispetto alla liofilizzazione classica la quale ha presentato un grande divario tra i diametri dei pori (10-60) μm e un diametro medio di circa la metà 40 μm . Ciò riduce notevolmente i tempi di essiccamento delle fasi successive.

Successivamente al congelamento, i flaconi vengono trasportati, sempre sospesi, al modulo di essiccamento primario e secondario.

Questi due moduli sono completamente identici, ma lavorano a valori di pressione e temperatura differenti, rispettivamente regolati dal sistema di vuoto, composto da pompa e condensatore, e dall'olio di silicio utilizzato come fluido termovettore.

Nella configurazione coi flaconi sospesi, il calore è trasferito principalmente per irraggiamento e viene ridotto il contributo di trasferimento di calore relativo alla conduzione del gas. Tale contributo, preponderante nella liofilizzazione discontinua, è ridotto a circa 5-6 % del calore totale scambiato nella configurazione dei flaconi sospesi (Capozzi et al., 2019). Ciò rende il trasferimento di calore indipendente dal grado di vuoto presente nella camera di liofilizzazione e permette di incrementare la velocità di sublimazione, lavorando a bassi valori di pressione.

La soluzione tecnologica proposta da Capozzi et al. (2019), per il modulo di essiccamento primario e secondario è mostrata in Figura 1.7. Mediante l'implementazione di piastre a temperatura controllata, il calore radiante scambiato tra le piastre e i flaconi risulta più uniforme. Questo si traduce in un controllo migliore della temperatura del prodotto.

Grazie alla sospensione dei flaconi, il processo non produce eterogeneità dovute alla variazione della geometria del flacone. Questo è un problema tipico dei liofilizzatori tradizionali in cui i flaconi sono in diretto contatto con il ripiano e la conduzione del gas, presente nell'intercapedine tra flacone e ripiano, produce notevoli eterogeneità.

Inoltre, la movimentazione dei flaconi nel modulo di essiccamento, tra le piastre radianti a temperatura controllata, garantisce che tutti i flaconi seguano lo stesso percorso e quindi soggetti alle stesse condizioni di temperatura e pressione. Ciò riduce ulteriormente

l'eterogeneità nel trasferimento di calore e risolve il problema *edge effect*, discusso precedentemente, per il quale flaconi posti in posizione laterale nella camera di liofilizzazione risultano maggiormente riscaldati dalle pareti e dalla porta del liofilizzatore.

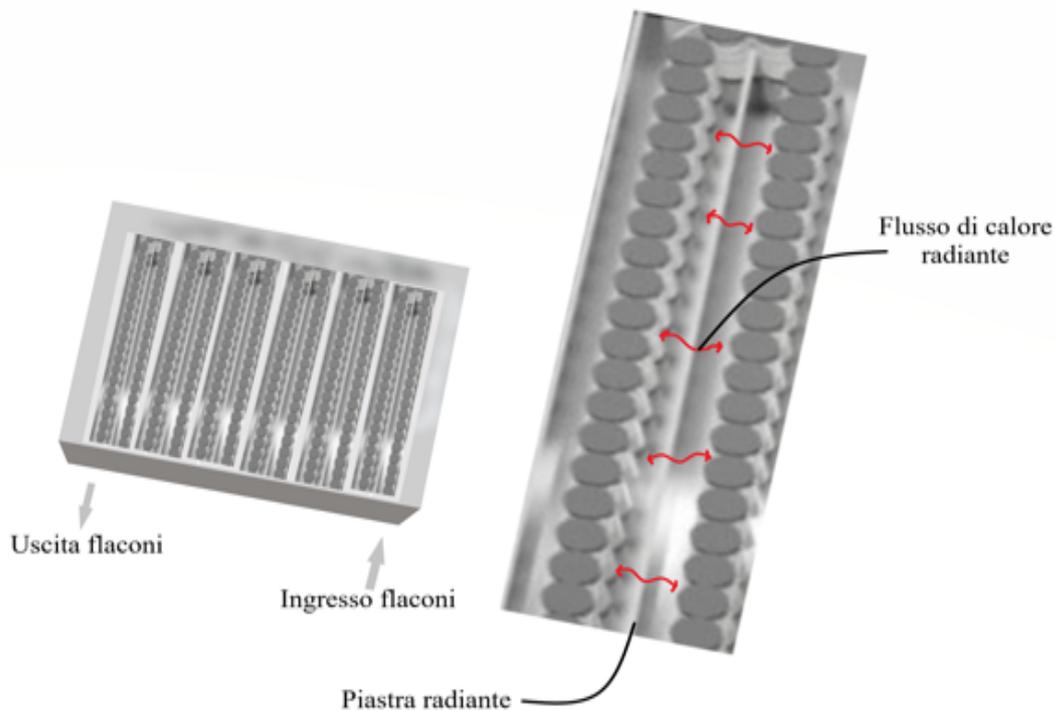


Figura 1.7 *Macchinario per liofilizzazione in continuo con flaconi sospesi. Modulo di essiccamento. Figura tratta da (Capozzi et al., 2019) con modifiche.*

1.6 Obiettivo della tesi

In questa tesi, si è valutata l'influenza di differenti configurazioni di congelamento sulla stabilità di due proteine: lattato deidrogenasi e mioglobina. Nello specifico, si sono studiate due configurazioni (flaconi sospesi e a contatto con il ripiano) e si è variata la velocità di raffreddamento.

L'obiettivo del lavoro è valutare quale sia l'impatto di una diversa configurazione di carico (sospeso vs. a contatto) sulla morfologia del prodotto liofilizzato e sulla stabilità delle proteine.

Durante la sperimentazione in laboratorio, sono state utilizzate formulazioni contenenti la proteina d'interesse, crio-protettori e un tensioattivo.

È stata misurata la concentrazione di proteina ancora attiva dopo il ciclo di congelamento e scongelamento, cercando di identificare il crio-protettore ottimale. Si è inoltre valutata l'importanza del tensioattivo nel preservare la proteina durante tale ciclo.

Successivamente è stata data una particolare attenzione alla velocità di congelamento, valutando l'azione del tensioattivo sulla denaturazione proteica dovuta all'interfaccia acqua-ghiaccio.

Alte velocità di raffreddamento incrementano l'estensione della superficie acqua-ghiaccio. Il tensioattivo dovrebbe invece concentrarsi all'interfaccia, evitando l'adsorbimento della proteina.

Grazie alla sperimentazione, si è notato che metodi come il Quenching in azoto liquido, operanti con elevate velocità di raffreddamento, causano una maggior perdita di attività proteica.

Infine, abbiamo condotto tre cicli di liofilizzazione completa, nelle modalità sopra citate. In questo modo, abbiamo potuto valutare l'incidenza dello stadio di congelamento rispetto al processo totale.

CAPITOLO 2

Metodi sperimentali

Tale lavoro a carattere sperimentale è stato condotto nei laboratori del gruppo Molecular Engineering Laboratory presso il Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia del Politecnico di Torino. In questo capitolo si descriveranno i materiali e i metodi utilizzati per condurre le prove sperimentali i cui risultati saranno presentati nel Capitolo 3.

2.1 Impianto di liofilizzazione

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un liofilizzatore di scala pilota (REVO, Millrock Technology, Kingston, NY, USA). Tale apparecchiatura è composta da una camera di liofilizzazione contenente cinque ripiani aventi una superficie di 0,93 m². Il carico/scarico dei flaconi sui ripiani viene effettuato manualmente all'inizio e al termine dell'operazione di liofilizzazione. Inoltre, il liofilizzatore è dotato di:

- un impianto di refrigerazione costituito da un impianto frigorifero meccanico;
- un sistema di riscaldamento per il fluido di trasferimento termico costituito da una resistenza elettrica;
- una pompa da vuoto di tipo Leybold (Leybold GmbH, Colonia, Germania);
- un sistema di condensazione per i vapori di solvente.

Il sistema di refrigerazione è costituito da un impianto frigorifero che, attraverso la compressione e la successiva laminazione del gas refrigerante clorofluorocarburo R12 (CFC), raffredda l'olio siliconico utilizzato come fluido termovettore. Tramite la pompa, l'olio siliconico sarà poi fatto circolare all'interno di canali posti nei ripiani, permettendo di raggiungere la temperatura limite di -70 °C. Durante la fase di essiccamento la termostatazione dei flaconi viene effettuata direttamente dai ripiani nei quali viene fatto circolare l'olio siliconico. Il dispositivo di circolazione deve essere in grado di mantenere la temperatura di ogni ripiano al valore desiderato. A tal proposito l'olio siliconico viene riscaldato da una resistenza al fine di garantire la temperatura scelta in camera di liofilizzazione.

La pompa da vuoto e il condensatore mantengono la pressione richiesta dal processo all'interno della camera di liofilizzazione in modo da garantire la completa sublimazione del ghiaccio formatosi durante il congelamento. Successivamente all'essiccamento, il vuoto nella camera di liofilizzazione può essere rotto tramite un'infiltrazione controllata di gas inerte.

Al fine di allontanare il vapore acqueo dal prodotto essiccato, il liofilizzatore REVO utilizza un condensatore con capacità 30 L, in grado di raggiungere la temperatura limite di -85 °C. La temperatura del prodotto è misurata mediante l'utilizzo di termocoppie di tipo T inserite direttamente all'interno di flaconi modello, mentre la temperatura del ripiano è misurata mediante una termoresistenza al platino di tipo Pt 100 meglio nota come *Resistance Temperature Detector (RTD)*. La termoresistenza misura indirettamente la temperatura del

ripiano sfruttando la variazione della resistività del materiale conseguente al cambiamento di temperatura.

La pressione in camera di liofilizzazione viene misurata tramite un sensore a membrana tipo Baratron (Baratron 626-A, MKS, Andover, Massachusetts (US)) ed una sonda termo-conduttiva tipo Pirani (PSG-101-S, INFICON, Bad Ragaz, Svizzera). La variazione tra la misura del sensore a membrana e quella della sonda Pirani, calibrata in aria, permette di individuare la fine dell'essiccamento primario. Durante l'essiccamento primario, l'atmosfera in camera di liofilizzazione è ricca di vapore acqueo, prodotto dalla sublimazione del ghiaccio. Il sensore a membrana misura la pressione indipendentemente dalla concentrazione di vapore presente in camera di liofilizzazione, mentre la misura della sonda termo-conduttiva è invece influenzata dalla conducibilità del gas in camera. Dato che la conducibilità del vapore è 1,6 volte quella dell'azoto, Pirani misura un valore di pressione, durante l'essiccamento, maggiore del 60% rispetto a quello misurato dal sensore a membrana. Al termine dell'essiccamento primario, la quantità di vapore in camera di liofilizzazione è minima e la sonda Pirani misura un valore di pressione uguale al sensore a membrana. Monitorando quindi il profilo di pressione ottenuto con i due sensori, può ritenersi compiuto l'essiccamento primario quando le due curve coincidono.

Infine, un sistema computerizzato Opti Dry[®] -PC/PLC (MCS Software) permette di praticare diversi protocolli, variando le velocità di congelamento/scongelo ed i valori di temperatura e pressione negli stadi di essiccamento. In Figura 2.1 è mostrata un'immagine del liofilizzatore REVO utilizzato per le prove sperimentali.

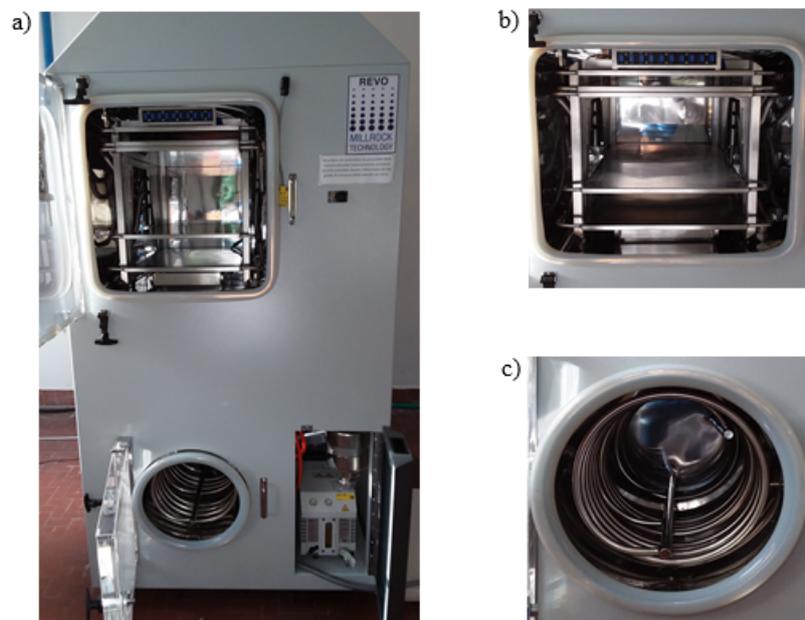


Figura 2.1 a) Liofilizzatore REVO. b) Camera di liofilizzazione di REVO. c) Condensatore liofilizzatore REVO.

2.2 Caso di studio

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando varie formulazioni contenenti due principi attivi: Mioglobina (Mb) estratta da cuore di cavallo (Merck, Darmstadt, Germania) e lattato deidrogenasi (LDH) estratto da muscolo di coniglio (Roche, Milano, Italia). Sono state selezionate queste due proteine in quanto entrambe sono sensibili agli stress indotti dalle fasi di congelamento ed essiccamento ma, come si discuterà nel Capitolo 3, presentano una differente struttura e proprietà.

2.2.1 Mioglobina

La mioglobina, situata nelle fibrocellule muscolari, ha la funzione di riserva di ossigeno nei muscoli. Tale proteina ha la capacità di legare molecole di ossigeno, cedendole ai muscoli nel momento del bisogno.

Avente peso molecolare di 16700 kDa, la mioglobina è formata da una singola catena polipeptidica costituita da 153 amminoacidi (Figura 2.2). Nella sua struttura si identificano otto tratti α -elica e nessun β -foglietto.

Oltre alla catena polipeptidica, la mioglobina contiene un gruppo chimico distinto detto gruppo prostetico o gruppo *eme*. Il gruppo prostetico è una molecola organica legata covalentemente alla catena polipeptidica e svolge numerose funzioni all'interno della proteina. È perciò considerato il cuore funzionante della proteina. Esso deriva dalla molecola precursore chiamata protomorfina che, a sua volta, è costituita da un anello tetra-pirrolico (Figura 2.3 a) e presenta al centro un atomo di ferro (Figura 2.3 b).

Il ferro, contenuto nel gruppo *eme*, ha stato di ossidazione (+2) e va incontro alla formazione di sei legami: quattro con gli atomi di azoto della protomorfina e due nella parte superiore ed inferiore dell'anello tetra-pirrolico.

La parte inferiore interagisce con la porzione proteica della mioglobina. In particolare il ferro si lega con il residuo d'istidina dell'ottavo tratto di α -elica, per cui si dice che è legato all'istidina F8. Questa istidina prende il nome di istidina prossimale in quanto occupa la posizione più vicina all'atomo di ferro. Il legame superiore a disposizione per il ferro sarà occupato dalle molecole di ossigeno in modo che la mioglobina espliciti la propria funzione.

Il legame tra l'ossigeno e il ferro del gruppo *eme* è accompagnato dal parziale trasferimento di un elettrone dallo ione ferroso all'ossigeno. La struttura formata da tale interazione può essere descritta mediante un complesso tra lo ione ferrico (Fe^{3+}) e lo ione superossido (O_2^-).

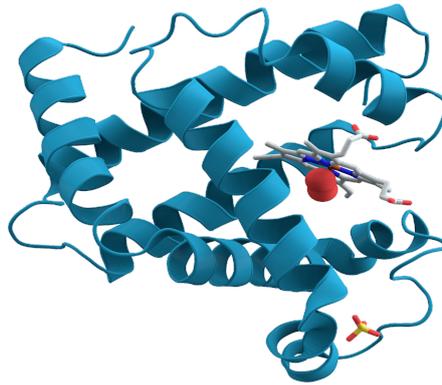


Figura 2.2 Immagine tridimensionale della mioglobina. Indicato in rosso il gruppo eme.
 Figura di pubblico dominio tratta da enciclopedia online Wikipedia.

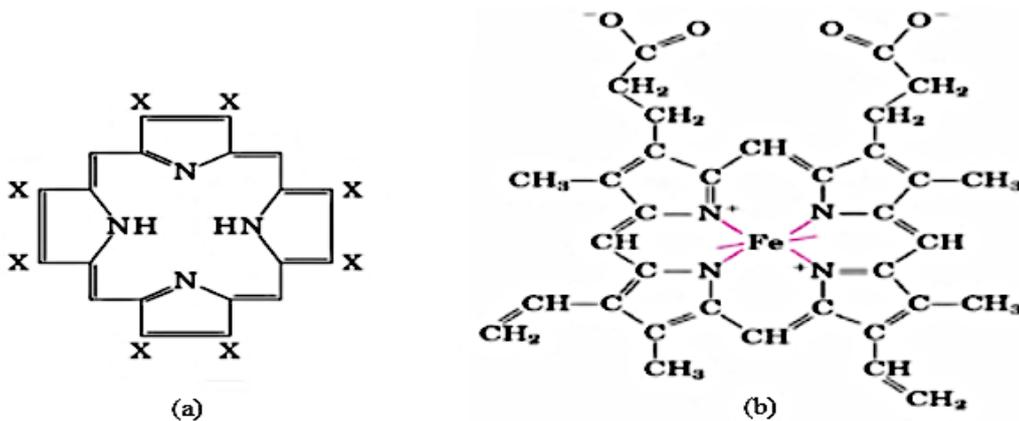


Figura 2.3 a) Anello tetra-pirrolico della molecola precursore protomorfin. b) Gruppo eme mioglobina. Figura tratta da elearning@unite.it con modifiche.

2.2.2 Lattato deidrogenasi

Il lattato deidrogenasi, mostrato in Figura 2.4, è un tetramero e quindi costituito da 4 monomeri. Le varie combinazioni di due diverse subunità:

- tipo H, maggiormente espressa nel cuore;
- tipo M, maggiormente espressa nel muscolo scheletrico.

permettono di individuare 5 differenti isoenzimi.

- LDH1, tipica del miocardio e dei globuli rossi ma presente anche, seppur in misura minore, a livello renale e nel muscolo scheletrico;
- LDH2, prevalente nel miocardio e negli eritrociti;

- LDH3, localizzata principalmente nei polmoni, si trova anche nel pancreas e nella placenta;
- LDH4, si trova nel rene al livello midollare, nel muscolo scheletrico, nei polmoni e nella placenta;
- LDH5, presente nel fegato e nel muscolo scheletrico in concentrazioni maggiori di LDH4.

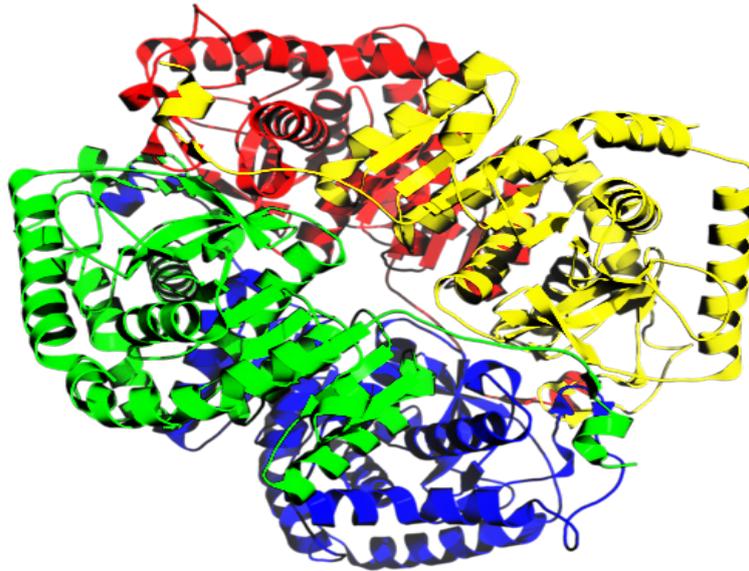


Figura 2.4 Immagine tridimensionale di LDH. Figura di pubblico dominio tratta da enciclopedia online Wikipedia

L'enzima, facente parte della classe ossidoreduttasi, catalizza in via bidirezionale la reazione di produzione di lattato e il ripristino di NAD^+ a partire dal NADH , utilizzando come molecola ossidante il piruvato (Figura 2.5).

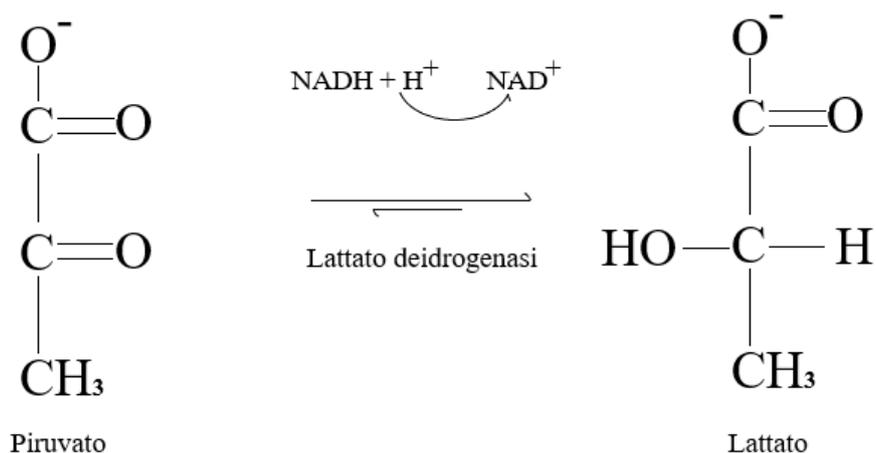


Figura 2.5 Fermentazione lattica catalizzata da lattato deidrogenasi.

Durante un'intensa attività fisica, il lattato deidrogenasi permette di produrre energia anche in condizioni di anaerobiosi e prende parte ai processi metabolici di glicolisi e gluconeogenesi costituenti il ciclo di Cori. Il ciclo di Cori, mostrato in Figura 2.6, è un cammino metabolico che unisce il muscolo e il fegato in condizioni di anaerobiosi.

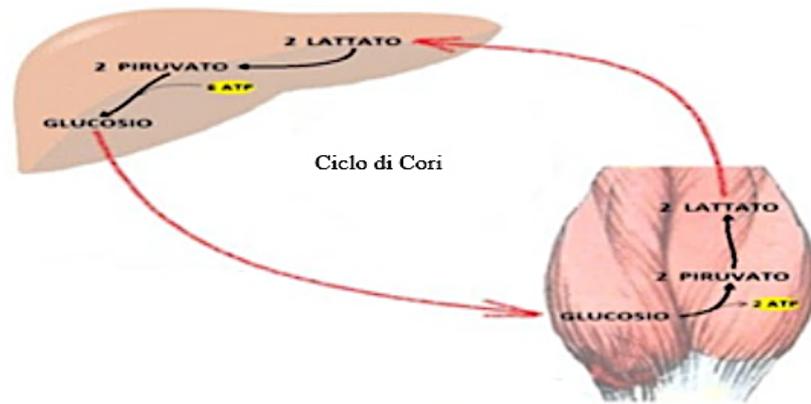


Figura 2.6 Ciclo di cori. Figura tratta da enciclopedia online Wikipedia con modifiche.

Il lattato, prodotto nel muscolo, viene trasportato nell'ambiente extracellulare e successivamente, grazie al torrente sanguigno, giunge al fegato. Nel fegato, il lattato viene trasformato, grazie all'enzima lattato de-idrogenasi, in piruvato e successivamente in glucosio (gluconeogenesi), fondamentale per il sostentamento dei nostri organi.

Il lattato deidrogenasi è stato ampiamente utilizzato come proteina modello nella letteratura scientifica. Il principale metodo di conservazione è la liofilizzazione e sono presenti una moltitudine di studi a riguardo data l'alta sensibilità agli stress provocati dal congelamento e dall'essiccamento.

2.3 Preparazione delle formulazioni da liofilizzare

Le formulazioni sono state preparate sciogliendo Mb in un tampone contenente acido citrico con una concentrazione 10 mM e neutralizzato a pH neutro 6,5 con idrossido di sodio. Il tampone citrato è stato selezionato nella letteratura scientifica in quanto non provoca, durante il congelamento e scongelamento, una precipitazione di acido citrico con conseguente variazione del pH (Chang e Randall, 1996). Ogni formulazione è stata preparata con una concentrazione di Mb di 0,1 mg/ml e con una concentrazione di tensioattivo Tween 80 (Sigma Aldrich, Milano, Italia) di 0,01% p/v. Tutte le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua per soluzioni iniettabili (Fresenius Kabi, Verona, Italia). In aggiunta, è stato introdotto all'interno di ogni formulazione un crio-protettore utilizzando quattro differenti eccipienti al 5% p/p: saccarosio, mannitolo, trealosio e lattosio. Inoltre, sono state preparate formulazioni contenenti 0,1 mg/ml di Mb senza l'aggiunta di eccipienti e tensioattivo.

LDH è stato dializzato in buffer citrato 10 mM e neutralizzato a pH 6,5 mediante idrossido di sodio. La dialisi è stata condotta a 277 K cambiando il buffer 3 volte. Le prime due volte ogni 3 ore e la terza volta dopo 24 ore. Dopo la dialisi, la concentrazione di LDH è stata determinata attraverso spettroscopia UV/VIS (spettrofotometro UV/VIS 6850, Jenway Stone, Staffordshire, UK). È stato monitorato il picco a 280 nm ed utilizzato per i calcoli un coefficiente di estinzione molare di 1,44 mL/(mg cm). Analogamente a quanto fatto per la Mb, sono state preparate formulazioni contenenti 0,1 mg/ml di LDH e con l'aggiunta di Tween 80 0,01% p/v e crio-protettori (saccarosio, mannitolo, trealosio e lattosio) al 5% p/p. Parallelamente sono state preparate formulazioni contenenti LDH 0,1 mg/ml senza l'aggiunta di tensioattivo e crio-protettori.

In Tabella 2.1 si riassumono le composizioni di tutte le formulazioni utilizzate durante le prove di laboratorio.

Tabella 2.1 Composizione delle varie formulazioni utilizzate in questo lavoro di tesi.

Gruppo	Formulazione	API (0,1 mg/ml)	Buffer (10 mM)	Crio- protettore (5% p/p)	Tensioattivo (0,01% p/v)
(1)	A	Mb	citrato (pH 6,5)	saccarosio	/
	B			mannitolo	
	C			trealosio	
	D			lattosio	
	E			/	
(2)	A*	Mb	citrato (pH 6,5)	saccarosio	Tween 80
	B*			mannitolo	
	C*			trealosio	
	D*			lattosio	
	E*			/	
(3)	<u>A</u>	LDH	citrato (pH 6,5)	saccarosio	/
	<u>B</u>			mannitolo	
	<u>C</u>			trealosio	
	<u>D</u>			lattosio	
	<u>E</u>			/	
(4)	<u>A</u> *	LDH	citrato (pH 6,5)	saccarosio	Tween 80
	<u>B</u> *			mannitolo	
	<u>C</u> *			trealosio	
	<u>D</u> *			lattosio	
	<u>E</u> *			/	

Con l'intento d'individuare la concentrazione ottimale di tensioattivo, sono state preparate formulazioni a diversa concentrazione di Tween 80.

Per tali formulazioni non è stata investigata l'influenza di crio-protettori, ma unicamente l'effetto del tensioattivo sulla denaturazione dovuta alla presenza dell'interfaccia acqua-ghiaccio. A tal proposito le formulazioni contenevano unicamente Mb e Tween 80. In Tabella 2.2, si riportano le varie combinazioni investigate in questo studio.

Tabella 2.2 Tabella delle formulazioni al variare della concentrazione di Tween 80

Gruppo	Formulazione	API (0,1 mg/ml)	Buffer (10 mM)	Tween 80 (mg/ml)
(5)	a	Mb	citrato (pH 6,5)	0,05
	b			0,1
	c			0,2
	d			0,5
	e			1

2.4 Programmazione degli esperimenti

Per valutare l'effetto di denaturazione proteica sono state condotte tre differenti modalità di congelamento e scongelamento:

- quenching in azoto liquido;
- shelf ramped con flaconi appoggiati;
- suspended.

Per ognuno degli esperimenti è stata valutata l'attività proteica dopo un numero di cicli fissato di freeze-thawing (*FT*). Ogni ciclo è composto da un'operazione di congelamento ed una di scongelamento in un intervallo di temperatura compreso tra 233 K e 283 K.

Successivamente, sono stati condotti test a diverse velocità di scongelamento al fine di determinare l'incidenza del fenomeno di ricristallizzazione sul tasso di denaturazione.

In Tabella 2.3 sono sintetizzati gli esperimenti condotti in laboratorio indicando le modalità di congelamento utilizzate:

- intervallo di congelamento/scongelamento (*CR*);
- velocità di congelamento (*FR*);
- velocità di scongelamento (*TR*).

Tabella 2.3 Tabella esperimenti freeze-thawing.

Test	Gruppo	Processo	Configurazione	Cicli	CR (K)	FR (K/min)	TR (K/min)
n.1	(1)	FT	shelf ramped	9	283/233	1	1
	(2)						
	(3)						
	(4)						
n.2	(1)	FT	suspended	9	283/233	1	1
	(2)						
	(3)						
	(4)						
n.3	(1)	FT	quenching	3	/	/	in aria
	(2)						
	(3)						
	(4)						
n.4	(1)	FT	quenching	3	/	/	1
	(2)						
	(3)						
	(4)						
	(5)						
n.5	(1)	FT	quenching	9	/	/	1
	(2)						
	(3)						
	(4)						
n.6	(5)	FT	suspended	3	283/233	1	1

Per completezza allo studio è stato condotto un ciclo di liofilizzazione completo (FD) i cui parametri sono mostrati in Tabella 2.4.

Tabella 2.4. Tabella esperimenti freeze-drying.

Test	Formulazione	Configurazione	Operazione	Temperatura	Pressione
n.8	A	quenching	congelamento	233 K	/
	A*		ess. Primario	253 K	5 Pa
	E		ess. secondario	293 K	5 Pa
	E*				
n.9	A	shelf ramped	congelamento	233 K	/
	A*		ess. Primario	253 K	5 Pa
	E		ess. secondario	293 K	5 Pa
	E*				
n.10	A	suspended	congelamento	233 K	/
	A*		ess. Primario	253 K	5 Pa
	E		ess. Secondario	253 K	5 Pa
	E*				

2.4.1 Quenching in azoto liquido

In tale protocollo, i flaconi aventi capacità di 0,5 ml (Screw Cap GeNunc Storage Vials, HDPE, Sterile, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) contenenti la soluzione e il principio attivo (gruppo 1, 2, 3, 4, 5) sono stati congelati per immersione in azoto liquido per una durata di 5 minuti. Successivamente, i flaconi hanno seguito diversi protocolli di scongelamento:

- Test n.4 e n.5: i flaconi sono stati caricati nel liofilizzatore REVO (Millrock Technology, Kingston, NY, USA) a diretto contatto con i ripiani, mantenuti a 233 K per 30 minuti e successivamente riscaldati a 283 K con velocità 1 K/min.
- Test n.3: i flaconi sono stati scongelati in aria a temperatura ambiente.

La Figura 2.7 mostra l'attrezzatura utilizzata per l'esecuzione delle prove di quenching in azoto liquido.



Figura 2.7 a) Da sinistra a destra rispettivamente: contenitore per il carico dei flaconi e contenitore azoto liquido. b) Vista dall'alto del contenitore per il carico dei flaconi. c) Immagine della prova d'immersione dei flaconi in azoto liquido.

2.4.2 Congelamento shelframped

In questo protocollo, i flaconi 4R 16x45 mm (Nuova Ompi glass division, Stevanato Group, Piombino Dese, Italia) sono stati riempiti con 1 ml di soluzione (gruppo 1, 2, 3, 4) e coperti con tappi in silicone (West Pharmaceutical Services, Milano, Italia).

Successivamente, i flaconi sono stati caricati nel liofilizzatore REVO (Millrock Technology, Kingston, NY, USA) a diretto contatto con i ripiani e congelati a 233 K con una velocità di 1 K/min.

Una volta raggiunti i 233 K, i flaconi sono stati condizionati a tale temperatura per 30 minuti e successivamente scongelati a 283 K con velocità 1K/min.

Durante l'interno processo la temperatura del prodotto è stata monitorata attraverso l'uso di termocoppie introdotte direttamente in flaconi modello contenenti il solo buffer.

2.4.3 Congelamento di flaconi sospesi

Per l'implementazione del metodo dei flaconi sospesi, sono stati riempiti flaconi 4R 16x45 mm (Nuova Ompi glass division, Stevanato Group, Piombino Dese, Italia) con 1 ml di soluzione (gruppo 1, 2, 3, 4, 5) e parzialmente chiusi con tappi in silicone (West Pharmaceutical Services, Milano, Italia). I flaconi sono stati caricati sull'apposito supporto in Plexiglass, mostrato in Figura 2.8, al fine di sospenderli all'interno della camera del liofilizzatore REVO (Millrock Technology, Kingston, NY, USA). In Figura 2.8 e Figura 2.9 si mostra il sistema utilizzato per sospendere i flaconi e la sua disposizione una volta caricato nella camera di liofilizzazione. Successivamente il protocollo prevede:

- congelamento a 233 K con velocità 1 K/min;
- condizionamento a 233 K per 30 minuti al fine di garantire il completo congelamento;
- scongelamento a 283 K con velocità 1 K/min;
- condizionamento a 283 K per 30 minuti al fine di garantire il completo scongelamento.

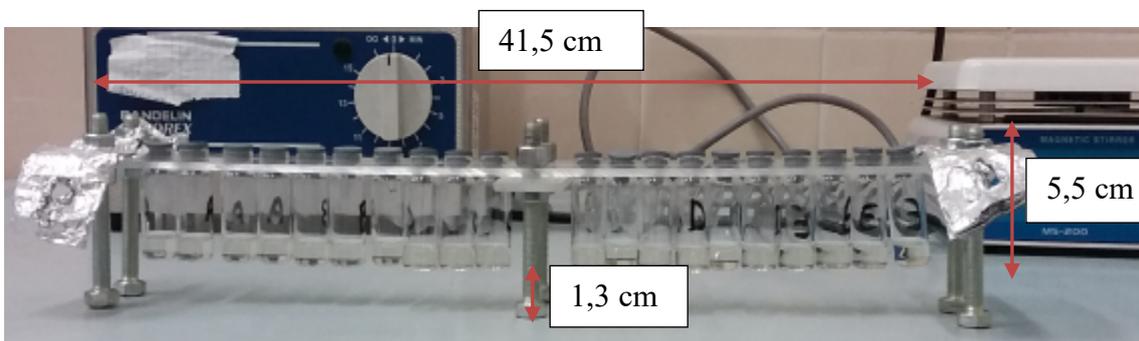


Figura 2.8 Supporto in Plexiglass utilizzato per la sospensione dei flaconi.



Figura 2.9 Posizionamento del supporto in Plexiglass sullo scaffale della camera di liofilizzazione.

2.4.4 Prove di liofilizzazione

Flaconi 4R 16x45 mm (Nuova Ompi glass division, Stevanato Group, Piombino Dese, Italia) sono stati riempiti con 1 ml di soluzione (formulazioni A, A*, E, E*) e parzialmente coperti con tappi in silicone (West Pharmaceutical Services, Milano, Italia). I flaconi sono stati congelati nelle seguenti modalità:

- test n.8 quenching;
- test n.9 shelf ramped in REVO con velocità di congelamento 1 K/min;
- test n.10 flaconi sospesi in REVO con velocità di congelamento 1 K/min.

A valle del congelamento, è stato eseguito un essiccamento primario alla temperatura di 253 K e pressione 5 Pa durato circa 24 ore. La temperatura di processo è stata selezionata da una ricerca in letteratura al fine di evitare il collasso della struttura solida formatasi nel congelamento (Figura 2.10).

Per l'essiccamento secondario, la temperatura è stata impostata a 293 K e la pressione mantenuta a 5 Pa. Tale processo è durato circa 6 ore.

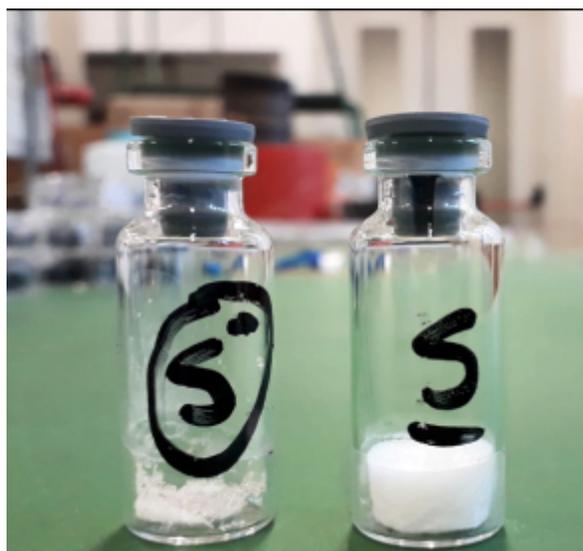


Figura 2.10 Formulazioni contenenti Mb e saccarosio al 5% p/p dopo il ciclo di liofilizzazione. A sinistra struttura collassata. A destra struttura non collassata.

2.5 Misure di attività biologica

Per l'analisi di attività biologica post-congelamento o post-essiccamento, si è scelto di condurre una misura UV-visibile (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) sia per Mb che per LDH.

Lo spettro di assorbimento di Mb in buffer citrato pH 6,5 è caratterizzato da due bande di assorbimento nella regione UV e diverse bande, più deboli, nella regione del visibile. Al fine dello studio si è deciso di investigare unicamente l'assorbimento di Mb nel campo UV perché più marcato.

Nella regione UV il picco di assorbanza a 280 nm è associato alla presenza di amminoacidi aromatici (triptofano e tirosina) nella catena polipeptidica e nel gruppo *eme*. L'assorbimento a questa lunghezza d'onda è tipica di molte proteine. Differentemente il picco di assorbanza a 410 nm è dovuto interamente al gruppo *eme* della proteina. Conosciuto meglio come *Soret band*, il valore di tale picco dà un'indicazione sullo stato di ossidazione del ferro. La sua alterazione è conseguenza di un possibile cambiamento dello stato fisico del gruppo *eme* provocato dal dispiegamento della struttura proteica (Anderson e Robertson, 1995).

Nella caso delle formulazioni contenenti Mb, i campioni dopo freeze-thawing sono stati centrifugati a 13000 rpm per 5 minuti (Heraeus Megafuge 8 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) e successivamente analizzati allo spettrofotometro UV-visibile monitorando il picco di assorbanza a 410 nm. I campioni sottoposti a liofilizzazione sono stati precedentemente reidratati con acqua per soluzioni iniettabili (Fresenius Kabi, Verona, Italia).

Queste analisi non forniscono informazioni dettagliate sulla struttura secondaria e terziaria della proteina o sull'attività biologica della stessa in soluzione, ma permettono indirettamente di misurare il tasso di denaturazione proteica e la presenza di aggregati che sono in genere conseguenza della denaturazione proteica e perdita della struttura secondaria.

Per l'LDH, non è stata eseguita centrifugazione post congelamento ed essiccamento; i campioni sono stati direttamente analizzati con lo spettrofotometro UV-visibile misurando la loro assorbanza a 500 nm. Il picco di assorbanza da una misura della torbidità e quindi della concentrazione di proteina aggregata all'interno di ogni soluzione; maggiore è il suo valore e più alta è la concentrazione della proteina denaturata.

L'attività enzimatica di LDH è stata ulteriormente misurata mediante un test di attività enzimatica (Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Il kit misura la quantità di NAD ridotta a NADH monitorando l'incremento del valore di assorbanza a 450 nm conseguente la reazione di riduzione. Per calcolare la quantità di NADH generata in ogni pozzetto è stata costruita una retta di taratura utilizzando NADH 1,25 mM.

2.6 Misure di umidità residua nei campioni liofilizzati

Con l'intento di misurare il contenuto di acqua residua presente nei campioni liofilizzati, si è utilizzata la tecnica della titolazione Karl Fisher (Karl Fisher Moisture Meter CA-31, Mitsubishi, Giappone). Questo metodo si basa sulla reazione di *Bunsen* in cui acqua, anidride solforosa e iodio reagiscono per formare acido solforico e acido iodidrico. La reazione di *Bunsen* può essere modificata al fine di determinare il valore di umidità in sistemi a basso contenuto d'acqua, contenenti un eccesso di anidride solforosa. Nella reazione di Fisher viene utilizzato un alcool come solvente liquido e una base come agente di buffer.

Come primo step della reazione l'alcool, l'anidride solforosa e la base reagiscono per formare un sale alchilsolfato. Successivamente il sale viene ossidato, mediante l'utilizzo di iodio, a sale alchilsolfato. La quantità di sale che viene ossidata dipende dal contenuto di acqua. In tale reazione lo iodio e l'acqua sono consumati in rapporto molare 1:1. Una volta che tutta l'acqua è stata consumata, l'eccesso di iodio viene misurato dagli elettrodi presenti in soluzione. Ciò determina la fine della titolazione. In base all'eccesso di iodio presente nel reagente di reazione il macchinario restituisce il contenuto di umidità.

Per tale misura sono stati utilizzati campioni soggetti ai test 8, 9, 10 contenenti buffer citrato 10 mM e saccarosio al 5% p/p ed è stata implementata la seguente procedura:

- La massa di ogni flacone (A), contenente il prodotto essiccato, è stata pesata dopo l'intero ciclo di liofilizzazione.
- Mediante una siringa è stata prelevata una certa massa (B) di solvente Hydranal (Sigma Aldrich, Milano, Italia) dalla cella di titolazione Karl Fisher ed iniettata all'interno dei flaconi contenenti il prodotto essiccato. Tale operazione è stata effettuata con l'ausilio di un adsorbente, al fine di evitare la contaminazione del prodotto con l'umidità esterna.
- Successivamente è stata prelevata la soluzione, composta da solvente e prodotto essiccato, da ogni flacone ed iniettata una certa massa (C) nella cella di titolazione Karl Fisher per la misura di umidità. Il macchinario restituisce il contenuto di umidità (D) della soluzione espresso in μg .
- Infine, la massa del flacone (E) è stata pesata dopo aver lavato, con acqua distillata, e asciugato il flacone.

Per il calcolo dell'umidità% è stata calcolata la massa di prodotto essiccato (g_{solido}) presente nei flaconi al termine del ciclo di liofilizzazione con l'equazione 2.1:

$$g_{solido} = A - E \quad (2.1)$$

Successivamente è stata calcolata la massa di acqua contenuta nei flaconi con l'equazione 2.2:

$$g_{H_2O} = \frac{D \cdot 10^{-6} \cdot (B + g_{solido})}{C} \quad (2.2)$$

Ed infine, è stata calcolata l'umidità% con l'equazione 2.3:

$$Umidità\% = \frac{g_{H_2O} \cdot 100}{g_{solido} - g_{H_2O}} \quad (2.3)$$

CAPITOLO 3

Risultati

In questo capitolo si presenteranno i principali risultati sperimentali ottenuti in questo lavoro di tesi. Inizialmente sarà mostrata l'azione crio-protettiva esercitata da vari eccipienti quali saccarosio, mannitolo, trealosio e lattosio. Questo studio ambisce ad identificare il crio-protettore più adatto per le due proteine modello investigate, Mb e LDH, in modo da minimizzare una loro eventuale denaturazione promossa dagli stress a cui vanno incontro durante il congelamento. Inoltre, sarà mostrata anche l'azione del tensioattivo nel prevenire la denaturazione dovuta a fenomeni di interazione tra la proteina e l'interfaccia acqua-ghiaccio. Si valuterà, quindi, l'attività biologica residua a valle di trattamenti congelamento/scongelo in presenza ed assenza di un tensioattivo.

Successivamente si confronteranno differenti protocolli di congelamento variandone la modalità e la velocità di raffreddamento. Questo studio permetterà di comprendere come la velocità di congelamento influenza l'estensione dell'interfaccia acqua-ghiaccio e di identificare le condizioni operative ottimali al fine di ridurre la denaturazione proteica.

3.1 Mioglobina

Nel seguito si riporteranno tutti i risultati ottenuti sulle formulazioni contenenti Mioglobina (Mb).

3.1.1 Scelta della concentrazione ottimale di tensioattivo (Tween 80)

La mioglobina è stata scelta come proteina modello nella determinazione della concentrazione ottimale di tensioattivo, da utilizzare durante le prove in laboratorio. Per tale prova l'efficienza di recupero ($E_{f,t0}$) di ogni formulazione è stata calcolata con l'equazione (3.1):

$$E_{f,t0} = \frac{A_{t0}}{A_f} \% \quad (3.1)$$

dove A_{t0} è il valore di assorbanza a 410 nm della formulazione E (Tabella 2.1) prima del trattamento di congelamento mentre A_f è il valore di assorbanza a 410 nm della formulazione in esame post-trattamento. In Figura 3.1 si evince che ogni formulazione ha una diversa efficienza di recupero proteico.

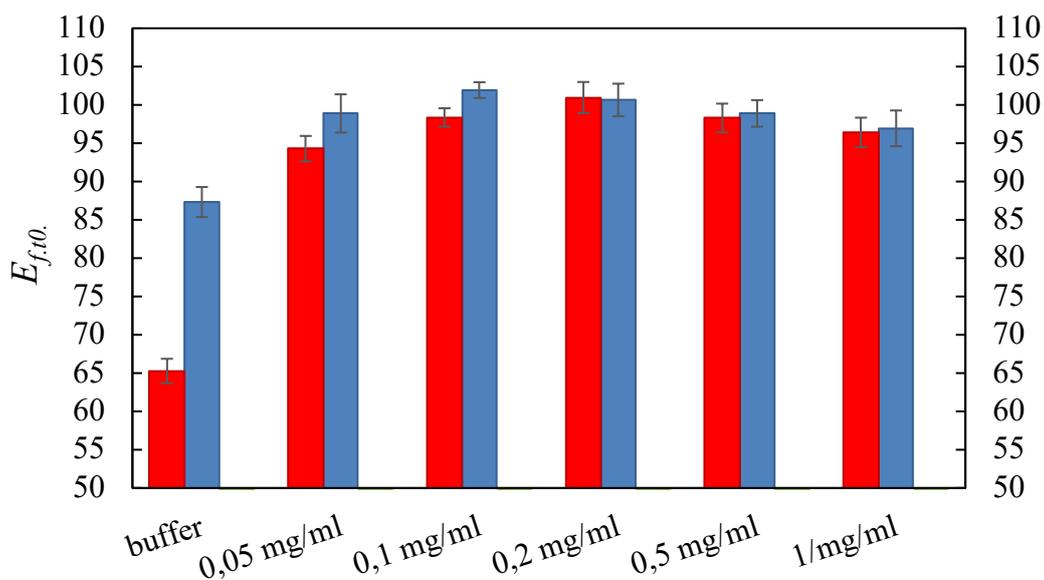


Figura 3.1. Effetto della concentrazione di Tween 80 sul recupero di attività proteica di Mb. Sull'asse orizzontale del grafico è mostrata la concentrazione di tensioattivo presente nelle formulazioni (Tabella 2.2), mentre la barra denominata buffer è rappresentativa della formulazione E (Tabella 2.1). I risultati fanno riferimento a formulazioni soggette a 3 cicli di congelamento/scongelo nella modalità (rosso) immersione in azoto liquido (test 6 in Tabella 2.3) e (blu) flaconi sospesi su ripiano (test 7 in Tabella 2.3).

Nello specifico si confrontano due protocolli di congelamento: quenching in azoto liquido (test 6 in Tabella 2.3) e flaconi sospesi (test 7 in Tabella 2.3).

Appare evidente che l'aggiunta del tensioattivo riduce il tasso di denaturazione durante il congelamento. Utilizzando una concentrazione di Tween 80 di 0,05 mg/ml si ha un aumento marcato dell'efficienza di recupero per un congelamento veloce come il quenching rispetto all'utilizzo del solo tampone citrato. Per la formulazione a (vedi Tabella 2.2) l'aumento di efficienza è circa del 30% nel caso di quenching in azoto liquido, mentre solo del 12% per i flaconi sospesi. Questa differenza è dovuta proprio alla diversa velocità di congelamento condotta nei due protocolli. Nel caso di un congelamento veloce, come il quenching in azoto liquido, la formazione di un'interfaccia acqua-ghiaccio più estesa incrementa il fenomeno di denaturazione proteica indotta dall'interfaccia acqua-ghiaccio. Per tali motivi risulta più marcata l'azione del Tween 80 nel deprimere i fenomeni di denaturazione proteica promessa dall'interfaccia acqua-ghiaccio. Lo stesso comportamento è presente anche nel caso di congelamento di flaconi sospesi, ma risulta meno evidente perché le velocità di raffreddamento più ridotte portano alla formazione di una meno estesa interfaccia acqua-ghiaccio e, quindi, una meno marcata denaturazione delle proteine in soluzione.

Aumentando la concentrazione di Tween 80 a 0,1 mg/ml (formulazione b in Tabella 2.2) si nota, per entrambi i protocolli, un ulteriore aumento dell'efficienza di recupero. Tale incremento risulta però molto lieve, prossimo al 5%. Questo denota che è sufficiente una concentrazione di tensioattivo di 0,05 mg/ml, superiore alla concentrazione minima micellare (0,015 mg/ml per Tween 80), per garantire un'adeguata crio-protezione verso l'interfaccia acqua-ghiaccio. Inoltre alla concentrazione di 0,1 mg/ml di Tween 80, il congelamento con

flaconi sospesi risulta essere la tecnologia più efficiente nel prevenire la denaturazione proteica con un'efficienza di recupero prossima al 100%.

In Figura 3.1, si osserva inoltre che un eccessivo aumento della concentrazione di tensioattivo produce un decremento dell'efficienza di recupero. Utilizzando una concentrazione di Tween 80 di 1 mg/ml (formulazione E in Tabella 2.2) l'efficienza di recupero, per entrambi i protocolli di congelamento/scongelo esaminati in Figura 3.1, diminuisce ad un valore prossimo al 95%. Tale fenomeno, già osservato per l'LDH da Hilgren et al. (2002), si pensa sia dovuto alla tendenza del tensioattivo, a concentrazioni elevate, di organizzarsi in strutture micellari piuttosto che porsi in prossimità dell'interfaccia acqua-ghiaccio. Si può quindi concludere che un aumento eccessivo della concentrazione di Tween 80 potrebbe spostare l'equilibrio del sistema verso la formazione di micelle in soluzione, piuttosto che il ricoprimento da parte dei singoli monomeri dell'interfaccia acqua-ghiaccio. Per tali motivi si è scelto di lavorare nelle prove a seguire con una concentrazione intermedia di 0,1 mg/ml.

3.1.2 Effetto delle condizioni di congelamento

In questa sezione si confronteranno diversi metodi di congelamento (test 1, 2, 5 in Tabella 2.3) che sono caratterizzati da diverse velocità di raffreddamento. Successivamente verrà presa in esame anche la velocità di scongelamento (test 3, 4 in Tabella 2.3) con l'obiettivo di verificare quanto questa incida sulla denaturazione proteica.

In Figura 3.2, 3.3, 3.4 è mostrata l'efficienza di recupero ($E_{f.f.}$) al variare del metodo di congelamento: quenching in azoto liquido, raffreddamento su ripiano e con flaconi sospesi. L'efficienza di recupero è stata così calcolata:

$$E_{f.f.} = \frac{A_f}{A_b} \% \quad (3.2)$$

dove A_f e A_b indicano rispettivamente il valore di assorbanza della soluzione contenente i crioprotettori e la formulazione E (vedi Tabella 2.1) contenente il solo buffer. In questo modo, possiamo valutare l'efficienza dei crioprotettori nell'ostacolare la denaturazione proteica promossa dai processi di congelamento e scongelamento. Sull'asse orizzontale dei grafici a seguire sono riportati gli eccipienti utilizzati nella formulazione di mioglobina, mentre la barra denominata "buffer*" indica la formulazione E contenente Tween 80 come unico eccipiente.

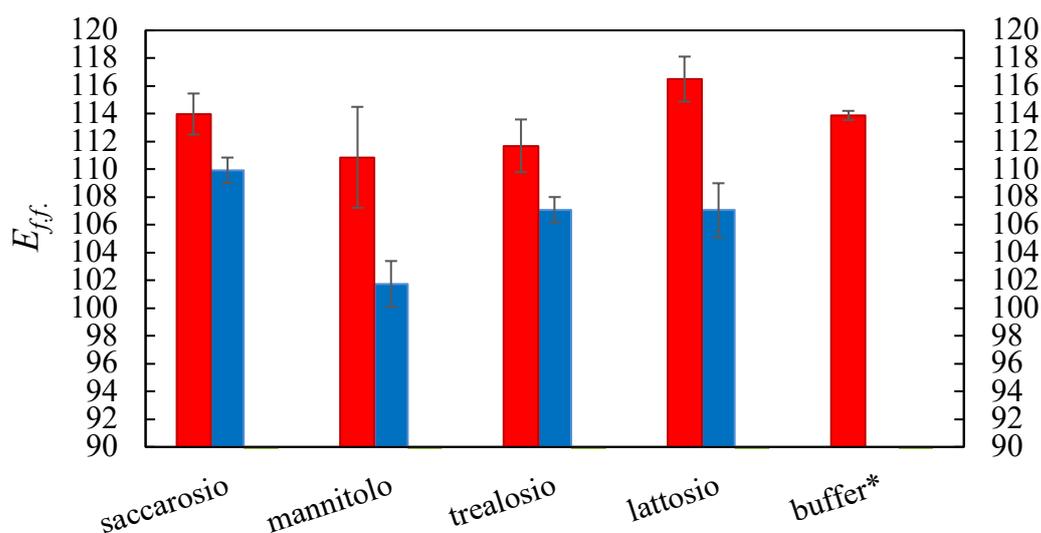


Figura 3.2. Effetto crio-protettori sul recupero di attività di Mb dopo quenching in azoto liquido (test 5 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento a formulazioni contenenti (rosso) Tween 80 (0,1 mg/ml) e (blu) senza tensioattivo.

In Figura 3.2 si può notare l'azione crio-protettiva esplicata dagli eccipienti nel prevenire la denaturazione proteica conseguente il quenching in azoto liquido. La formulazione A (vedi Tabella 2.1), contenente saccarosio, mostra un'efficienza di recupero del 110%. L'alta efficienza è dovuta all'azione protettiva compiuta dal disaccaride. A basse temperature, gli zuccheri impediscono il dispiegamento della struttura proteica e la conseguente interazione dei gruppi idrofobi con le molecole d'acqua in soluzione (Wang, 2000; Bhatnagar et al., 2007).

L'attuale conoscenza sulla crio-protezione suggerisce l'esistenza di due classi di meccanismi di stabilizzazione: termodinamica e cinetica. Un crio-protettore che sposta l'equilibrio da una forma proteica denaturata ad una forma nativa stabile agisce attraverso un meccanismo termodinamico. Diversamente un crio-protettore che rallenta il tasso di denaturazione, ma non agisce sulla barriera energetica tra stato nativo e denaturato, si direbbe agire con un meccanismo puramente cinetico.

Il meccanismo termodinamico maggiormente supportato è l'ipotesi di esclusione preferenziale dei soluti. Secondo tale meccanismo, i soluti sono preferibilmente esclusi dalla superficie proteica e presenti in concentrazione maggiore nel *bulk* della soluzione. Ciò incrementa l'energia libera della proteina.

Il grado di esclusione dei soluti e l'incremento dell'energia libera della proteina sono proporzionali all'area superficiale della struttura proteica. Maggiore è l'area superficiale e maggiore è l'incremento dell'energia libera. Dal momento che la proteina denaturata presenta una superficie maggiore, a causa del dispiegamento della struttura, la presenza di eccipienti incrementa maggiormente l'energia libera della proteina denaturata, rispetto alla sua forma nativa. Ne risulta quindi un incremento della barriera energetica tra le due forme, nativa e denaturata, e la conseguente stabilizzazione della proteina nativa.

Nello studio del meccanismo cinetico la teoria più discussa è l'ipotesi della vetrificazione (Franks, 1985). Secondo tale meccanismo, durante il congelamento, quando il sistema si trova

in prossimità del suo stato vetroso, l'aumento di viscosità causa l'immobilizzazione della proteina ed impedisce il dispiegamento della struttura proteica. Tuttavia, a causa dei diversi stress, che agiscono sulle proteine durante il congelamento, è difficile identificare nello specifico il meccanismo di crio-protezione dominante. Inoltre, il meccanismo di esclusione preferenziale dei soluti non considera fenomeni di denaturazione dovuti alla presenza dell'interfaccia acqua-ghiaccio e quindi, non spiega l'azione protettiva dei tensioattivi (Bathnagar et al., 2007).

L'aggiunta del Tween 80 ha incrementato notevolmente l'efficienza di recupero. La formulazione E*, contenente il solo tensioattivo mostra un'efficienza prossima al 115%, maggiore delle formulazioni contenenti i disaccaridi ma prive di Tween 80. Inoltre, i risultati mostrano una crescita di efficienza più marcata per mannitolo e lattosio con l'utilizzo del tensioattivo.

Questo suggerisce che, per protocolli di congelamento veloci come il quenching in azoto liquido, il contributo maggiore di denaturazione è determinato dall'estensione dell'interfaccia acqua-ghiaccio. L'azione del tensioattivo, nel predisporre in prossimità dei cristalli formatosi durante il congelamento, permette di ottenere una formulazione più efficiente. Ciò è confermato dall'alta efficienza di recupero della formulazione E*.

L'aggiunta di Tween 80 alla formulazione contenente saccarosio ha incrementato l'efficienza di recupero in misura minore rispetto agli altri eccipienti, circa quattro punti percentuale. Questo suggerisce che, oltre all'azione crio-protettiva alla denaturazione a freddo, il saccarosio potrebbe esplicare anche un'azione di protezione dall'interfaccia acqua-ghiaccio.

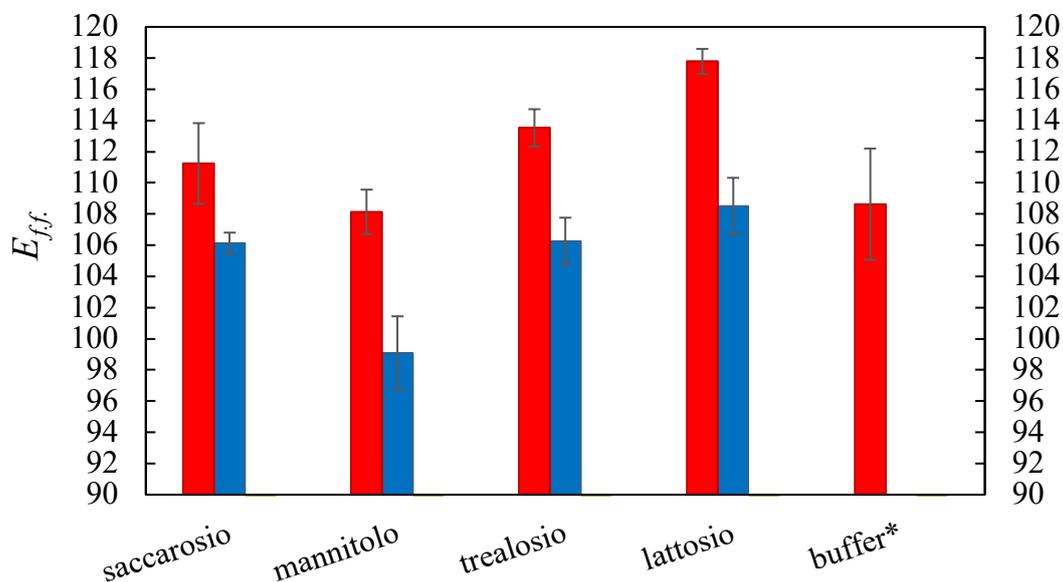


Figura 3.3. Effetto dei crio-protettori sul recupero di attività di Mb dopo congelamento su ripiani a temperatura controllata (test 1 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento alle formulazioni (rosso) contenenti Tween 80 (0,1 mg/ml) e (blu) senza tensioattivo.

La Figura 3.3 mostra invece l'azione crio-protettiva dei disaccaridi nel caso di congelamento su ripiani. Si nota immediatamente una diminuzione di efficienza della formulazione E* rispetto al congelamento in azoto liquido, 108% vs. 115%. Questo è correlato alla diversa velocità di

congelamento condotta nei due protocolli. La velocità di raffreddamento è minore nel raffreddamento su di un ripiano a temperatura controllata, rispetto al quenching in azoto liquido, e questo produce una minore estensione dell'interfaccia acqua-ghiaccio. L'effetto del tensioattivo sarà, quindi, meno marcato nel congelamento su di un ripiano raffreddato.

Analogamente a quanto osservato per il congelamento per immersione in azoto liquido, il saccarosio sembra esplicare un'azione di protezione all'interfaccia acqua-ghiaccio dato che mostra la minor differenza di efficienza tra la formulazione con e senza tensioattivo, cinque punti percentuale.

Infine, il mannitolo risulta essere l'eccezione meno efficiente nello svolgere il ruolo di crio-protettore con un'efficienza di recupero inferiore al 100%. Questo risultato è confermato da quanto osservato da Wang (2000) ed è attribuito alla possibilità da parte del mannitolo di cristallizzare durante il congelamento.

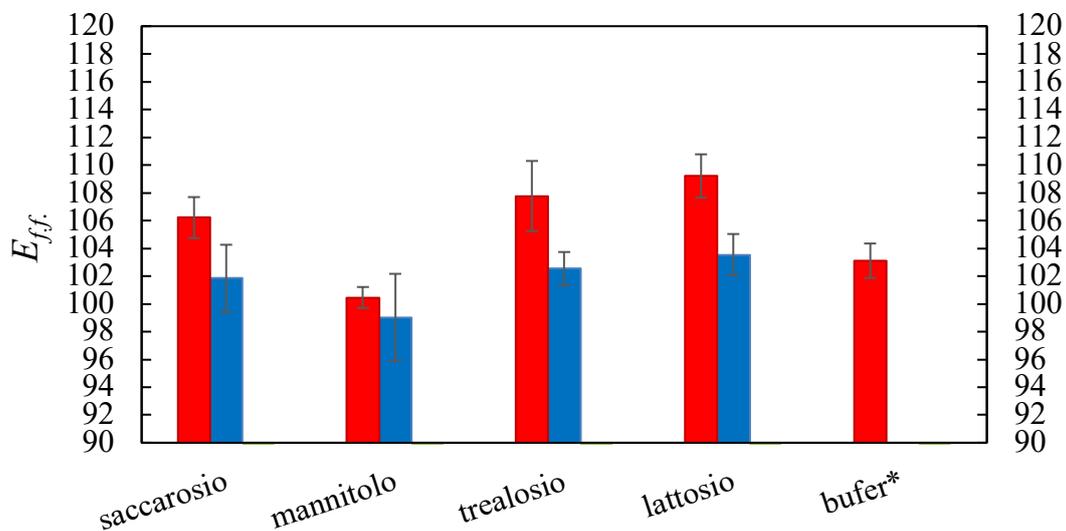


Figura 3.4. Effetto dei crio-protettori sul recupero di attività di Mb dopo il congelamento con flaconi sospesi su un ripiano (test 2 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento alle formulazioni (rosso) contenenti Tween 80 (0,1 mg/ml) e (blu) senza tensioattivo.

La Figura 3.4 mostra l'efficienza di recupero espressa dai vari eccipienti nel caso di congelamento su ripiano con flaconi sospesi. Appare evidente che l'efficienza di recupero delle varie formulazioni è inferiore rispetto a quanto prima osservato nel caso di congelamento per quenching in azoto liquido e su ripiano con flaconi appoggiati (vedi Figura 3.1 e 3.2). Nello specifico, la formulazione A, contenete saccarosio, passa da un'efficienza del 110% nel congelamento per immersione in azoto liquido (vedi Figura 3.2) al 102% con quello su ripiano con flaconi sospesi (vedi Figura 3.4). Questo denota che la sospensione dei flaconi, e la conseguente maggiore uniformità del prodotto osservata da Capozzi et al. (2019), fa sì che l'azione dei vari crio-protettori sia meno marcata rispetto ai protocolli sopra citati. Inoltre, data la minore velocità di congelamento, l'efficienza di recupero risulta poco influenzata dalla presenza del Tween 80. Anche per il congelamento di flaconi sospesi, la formulazione contenente mannitolo risulta essere la peggiore in termini di crio-conservazione per gli stessi motivi menzionati per il congelamento su ripiano con flaconi appoggiati.

Nel seguito si confronteranno i vari metodi di congelamento in termini dell'efficienza di recupero $E_{f.p}$ così definita:

$$E_{f.p.} = \frac{A_f}{A_{bs}} \% \quad (3.3)$$

dove A_f e A_{bs} indicano rispettivamente il valore di assorbanza a 410 nm della formulazione in esame e quello della formulazione E (vedi Tabella 2.1) nel test 2 (vedi Tabella 2.3). La figura 3.5 mostra un confronto diretto tra il congelamento per immersione in azoto liquido e flaconi appoggiati su un ripiano raffreddato.

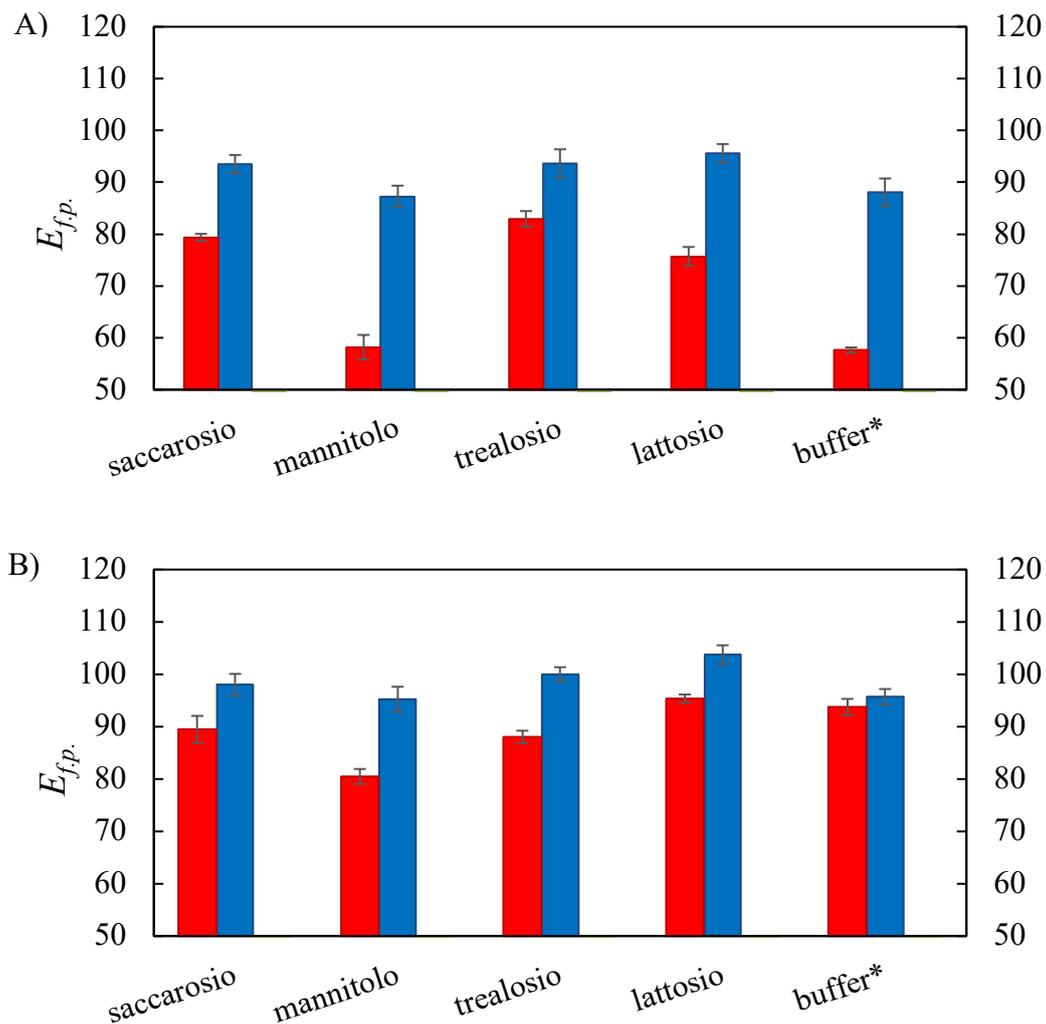


Figura 3.5. Recupero dell'attività di Mb al variare della formulazione nel caso di (rosso) immersione in azoto liquido (test 5 in Tabella 2.3) e (blu) flaconi appoggiati su un ripiano (test 1 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento a formulazioni (A) senza tensioattivo e (B) con aggiunta di tensioattivo.

In Figura 3.5, si nota che il congelamento in azoto liquido mostra una minore efficienza di recupero dell'attività proteica, con una perdita di efficienza maggiore del 40% rispetto alla formulazione buffer che è priva di eccipienti (grafico A). Il congelamento di flaconi appoggiati

su di un ripiano raffreddato è meno efficiente rispetto alla tecnologia in sospeso ma presenta un'efficienza di recupero maggiore rispetto al congelamento in azoto liquido; infatti, esso mantiene dei valori di efficienza superiori al 90% per tutte le formulazioni.

Con l'aggiunta del Tween 80 (vedi Figura 3.5, grafico B) la situazione sembra migliorare anche per il congelamento in azoto liquido. Ad eccezione del mannitolo, tutte le formulazioni assumono un valore di efficienza in prossimità o superiore al 90%. L'impiego del Tween 80 riduce quindi la differenza di efficienza tra i due metodi di congelamento. D'altro canto, il metodo maggiormente influenzato dalla presenza del Tween 80 è quello per immersione in azoto liquido che promuove la formazione di una più estesa interfaccia acqua-ghiaccio.

Le Figure 3.6 e 3.7 confermano infine i risultati presentati precedentemente e la miglior efficienza di recupero del congelamento di flaconi sospesi rispetto agli altri due metodi.

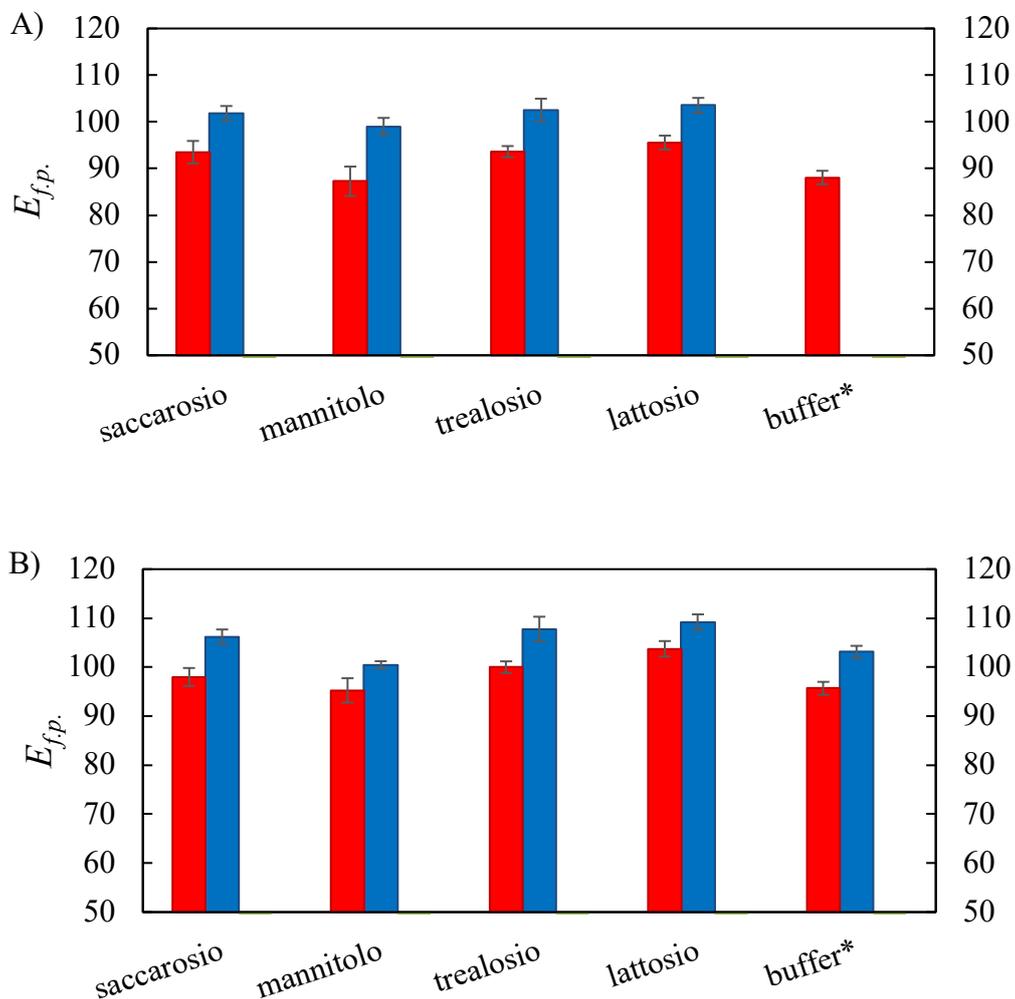


Figura 3.6. Recupero dell'attività di Mb al variare della formulazione nel caso di (rosso) flaconi appoggiati su un ripiano (test 1 in Tabella 2.3) e (blu) flaconi sospesi su un ripiano (test 2 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento a formulazioni (A) senza tensioattivo e (B) con aggiunta di tensioattivo.

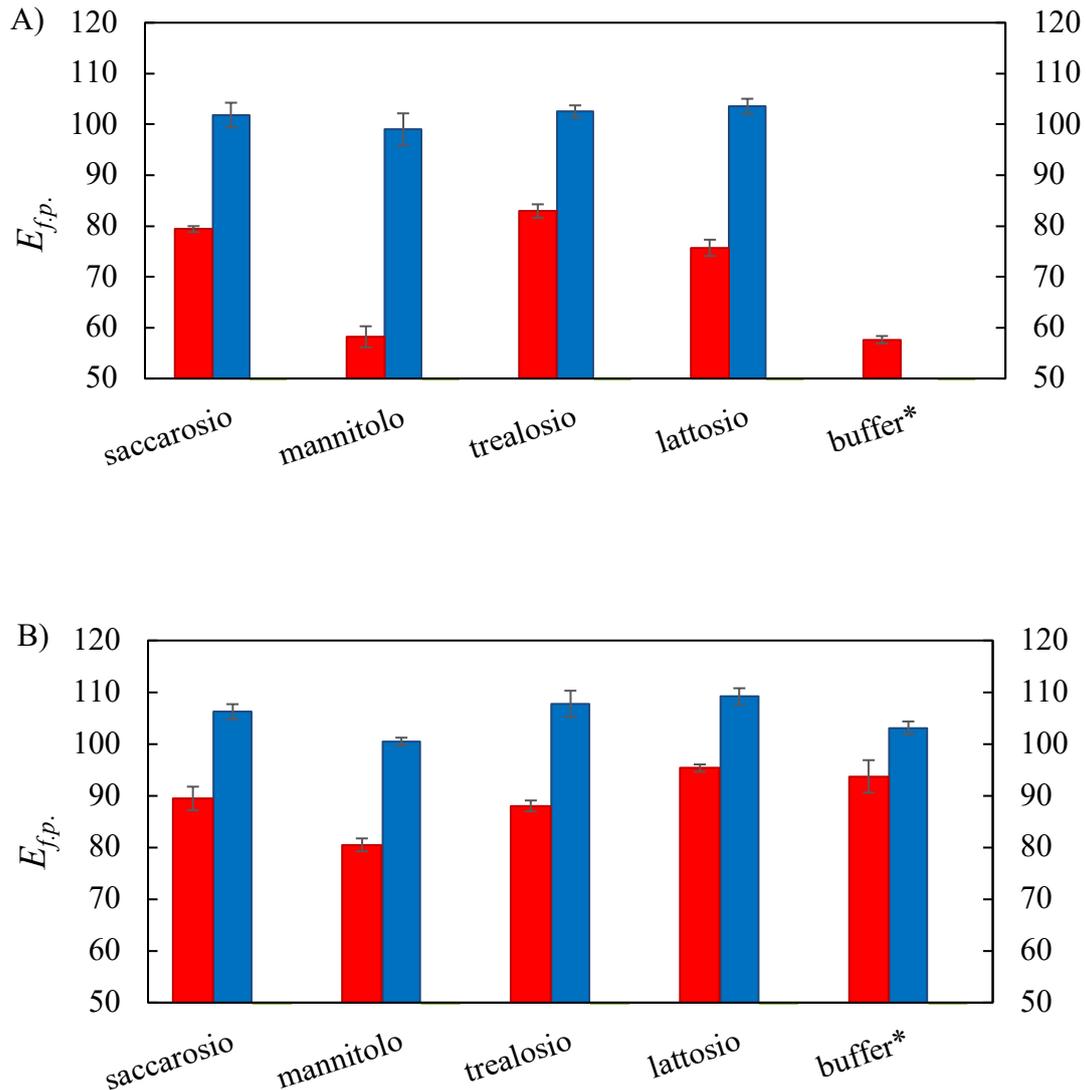


Figura 3.7. Recupero dell'attività di Mb al variare della formulazione nel caso di (rosso) immersione in azoto liquido (test 5 in Tabella 2.3) e (blu) flaconi sospesi su un ripiano (test 2 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento a formulazioni (A) senza tensioattivo e (B) con aggiunta di tensioattivo.

Alla luce di questi risultati si può concludere che:

- L'aggiunta del tensioattivo ha portato maggiori benefici per quei metodi che hanno velocità di congelamento elevate come l'immersione in azoto liquido. Questo è connesso direttamente all'interazione tra la proteina e l'interfaccia acqua-ghiaccio.
- Il quenching in azoto liquido è il peggiore in quanto presenta l'efficienza di recupero minore (vedi Figura 3.7) mentre il congelamento su ripiano è più efficiente (vedi Figura 3.6).

- Il congelamento di flaconi sospesi è poco influenzato dalla presenza del tensioattivo (vedi Figure 3.6 e 3.7) e risulta il metodo di congelamento meno deleterio per l'attività di Mb.

Come citato in precedenza, è stata investigato anche l'effetto della velocità di scongelamento sulla perdita di attività di Mb. I risultati di questa prova sono mostrati in Figura 3.8.

Cao et al. (2003) hanno investigato l'incidenza della velocità di scongelamento sul tasso di denaturazione, riscontrando che lo scongelamento lento produce una maggiore perdita di attività proteica. Tale fenomeno è dovuto alla fusione e successiva ricristallizzazione dei cristalli di ghiaccio in soluzione, durante lo scongelamento.

Durante il congelamento rapido, di una soluzione proteica, si ha la formazione di un sistema solido composto da minuscoli cristalli. Inoltre, tale sistema non è in equilibrio termodinamico e perciò sensibile alle condizioni esterne.

Una piccola variazione della temperatura, nell'ambiente circostante, potrebbe comportare un cambiamento della struttura solida congelata al fine di ridurre l'energia del sistema.

Tali variazioni, nella struttura solida, consistono in una simultanea fusione e formazione di piccoli cristalli all'interno di cristali più grandi. Il processo viene denominato ricristallizzazione e produce ulteriori stress sulle proteine. Tuttavia, operando con scongelamento rapido non si fornisce il tempo sufficiente per la fusione e ricristallizzazione dei cristalli di ghiaccio e ne consegue un tasso di denaturazione minore.

I campioni congelati con velocità di raffreddamento inferiori sono meno esposti alla denaturazione provocata dallo scongelamento, in quanto la soluzione durante il congelamento mantiene l'equilibrio termodinamico e, quindi, è meno soggetta alla ricristallizzazione.

La Figura 3.8 mostra l'efficienza di recupero ($E_{f.thawing}$) delle formulazioni nei test 3 e 4 (vedi Tabella 2.3). Il valore di efficienza è stato calcolato mediante l'equazione (3.4):

$$E_{f.thawing} = \frac{A_{st}}{A_{ft}} \% \quad (3.4)$$

dove A_{st} e A_{ft} rappresentano rispettivamente il valore di assorbanza della formulazione in esame e della formulazione E nel test 3. Si è scelto di presentare i risultati in tale modalità al fine di valutare quanto lo scongelamento lento è peggiorativo rispetto allo scongelamento veloce e come la perdita di attività proteica può essere limitata mediante l'utilizzo di eccipienti.

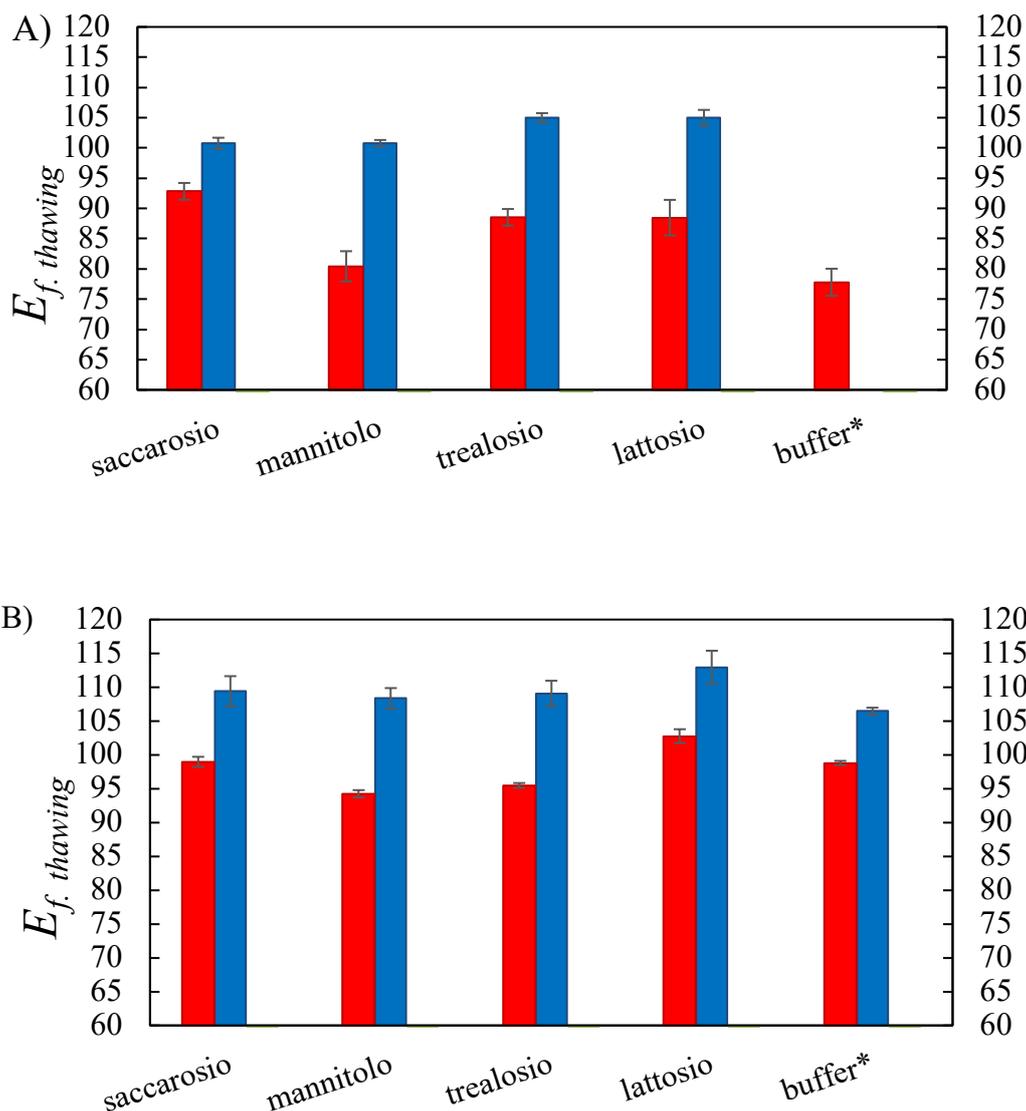


Figura 3.8. Recupero dell'attività di Mb al variare della formulazione nel caso di (rosso) immersione in azoto liquido e scongelamento 1 °C/min (test 4 in Tabella 2.3) e (blu) immersione in azoto liquido e scongelamento in aria (test 3 Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento a formulazioni (A) senza tensioattivo e (B) con aggiunta di tensioattivo

Come si nota in Figura 3.8 l'utilizzo degli zuccheri non permette di eliminare il contributo di denaturazione provocato dalla ricristallizzazione. Tutte le formulazioni soggette allo scongelamento 1 °C/min (test 4 in Tabella 2.3) presentano un valore di efficienza di recupero inferiore al 100% .

Con l'aggiunta del Tween 80 (vedi grafico B) si ha un aumento dell'efficienza di recupero delle formulazioni ed un minore divario tra i test 3 e 4. Tale comportamento potrebbe essere dovuto all'azione del tensioattivo che, ponendosi in prossimità dei cristalli in fusione, non ne permette l'adsorbimento da parte delle proteine. I valori di efficienza delle formulazioni nelle prove del test 4 rimangono però inferiori al 100%.

Si può, quindi, concludere che al diminuire della velocità di scongelamento incrementa il tasso di denaturazione e l'impiego di crio-protettori non permette di eliminare del tutto il divario di efficienza di tra i due protocolli di congelamento/scongelamento

3.1.3 Freeze-drying

In questa sezione saranno presentati i risultati relativi alle prove di liofilizzazione di Mb (test 8, 9 e 10 in Tabella 2.4). Queste prove ambiscono a valutare il comportamento della liofilizzazione di flaconi sospesi ed, in particolare, dell'effetto di questa configurazione sulla attività della Mb.

La Figura 3.9 mostra l'efficienza di recupero della Mb per le varie formulazioni utilizzate in questa tesi e descritte in Tabella 3.1.

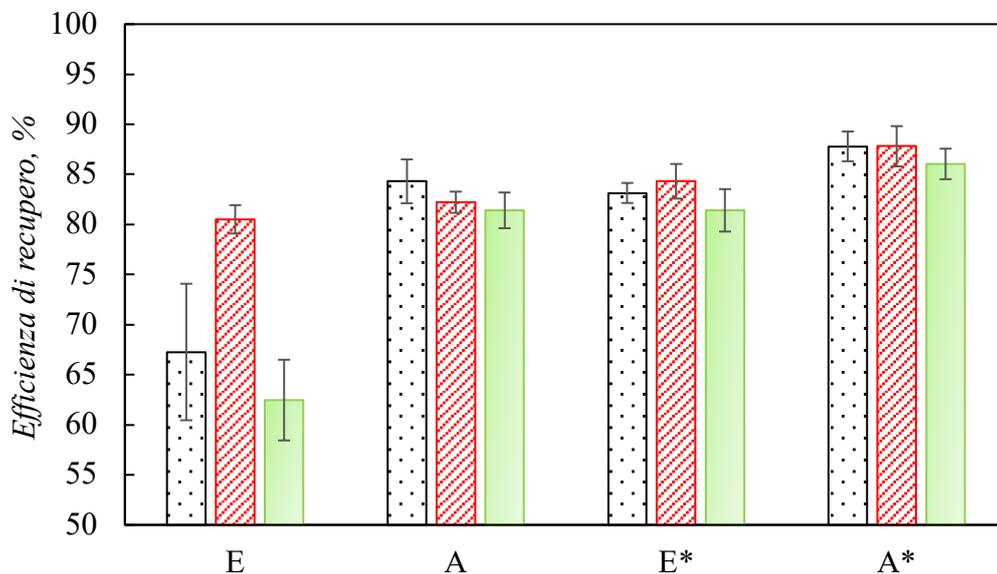


Figura 3.9. Attività residua della Mb dopo liofilizzazione per le varie formulazioni descritte in Tabella 3.1 e al variare del metodo di congelamento: (nero, punti) flaconi sospesi (test 10), (rosso, tratteggiata) flaconi appoggiati (test 9) e (verde, piena) immersione in azoto liquido (test 8).

Tabella 3.1. Composizione delle varie formulazioni sottoposte a liofilizzazione.

Formulazione	Eccipiente
E	Buffer citrato di sodio 10 mM
A	Buffer citrato di sodio 10 mM + Saccarosio 5% p/p
E*	Buffer citrato di sodio 10 mM + Tween 80 0,1 mg/ml
A*	Buffer citrato di sodio 10 mM + Saccarosio 5% p/p + Tween 80 0,1 mg/ml

In Figura 3.9, si osserva che la formulazione con più alta efficienza di recupero, prossima al 90%, è quella contenente saccarosio e Tween 80 (formulazione A*). Questo è probabilmente il risultato dell'azione crio-protettiva esplicita dal Tween 80 e dall'azione concomitante crio e

lio-protettiva del saccarosio. Tale comportamento trova una conferma nello studio di Hatley (1997) e ribadito da Wang (2000), i quali hanno osservato che il saccarosio è tra i migliori lio-protettori.

Dal confronto tra i tre metodi di congelamento si può notare che la tecnologia dei flaconi sospesi risulta avere un'efficienza di recupero sistematicamente superiore al congelamento ad immersione ed in competizione con la tecnologia dei flaconi appoggiati.

Si evince però un comportamento inatteso per la formulazione E: il congelamento con flaconi appoggiati risulta essere largamente più efficiente rispetto a quello sospeso. Questo non trova un riscontro con studi presenti in letteratura (Capozzi et al., 2019) e si consiglia un'indagine più approfondita.

La Figura 3.10 mostra l'andamento della temperatura durante il congelamento, misurata mediante l'inserimento diretto delle termocoppie all'interno di alcuni flaconi. Nel caso del congelamento di flaconi appoggiati, si è deciso di misurare la temperatura di due flaconi, posti in posizione diversa sul ripiano del liofilizzatore. Questo permette di valutare eventuali eterogeneità nel trasferimento di calore durante le fasi di congelamento e di essiccamento.

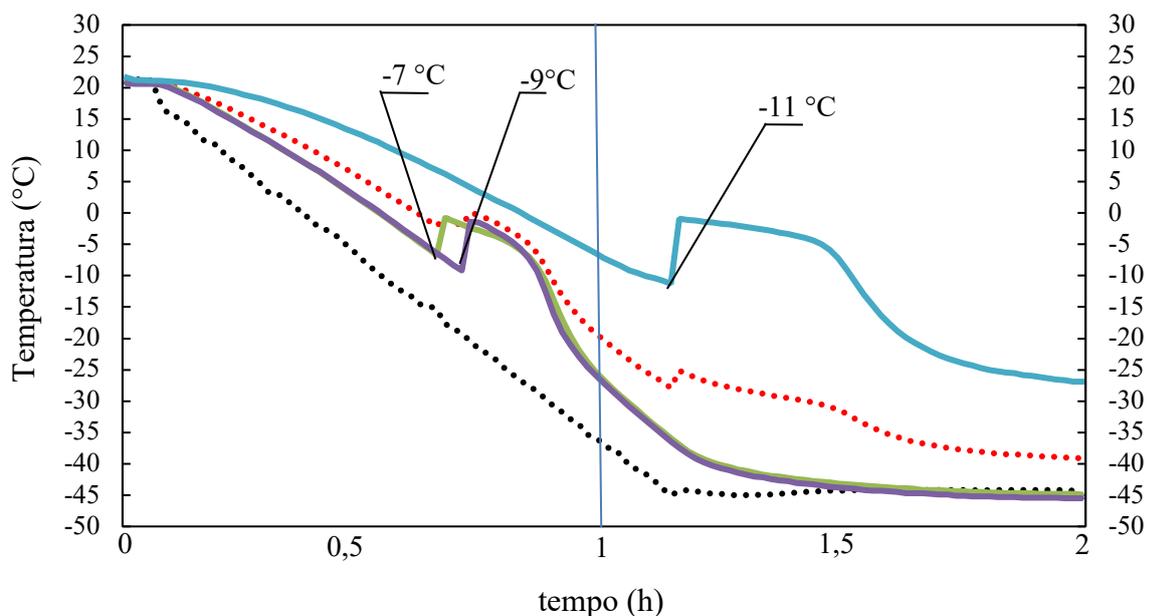


Figura 3.10. Andamento della temperatura del prodotto durante la fase di congelamento nel caso di (linea verde) flacone centrale appoggiato, (linea viola) flacone laterale appoggiato e (linea blu chiaro) flacone sospeso. La misura della temperatura è stata effettuata tramite l'inserimento delle termocoppie all'interno dei flaconi. Il grafico riporta anche la temperatura di nucleazione (evidenziando il valore numerico), quella del fluido termovettore che scorre nel ripiano (linea tratteggiata nera) e quella del gas in camera (linea tratteggiata rossa).

Come si denota dallo studio in Figura 3.10, i flaconi appoggiati sul ripiano del liofilizzatore (test 9) assumono un valore di temperatura compreso tra quello dell'ambiente circostante e il ripiano. Ciò comporta la formazione di gradienti di temperatura all'interno del prodotto in

quanto il calore viene sottratto dal ripiano dal fondo del flacone ed è fornito dall'ambiente circostante. Inoltre, i due flaconi hanno mostrato una temperatura di nucleazione diversa con deviazione standard del 15%. Questo aspetto andrebbe approfondito per tutte le configurazioni, aumentando il numero di campioni osservato e usando un sistema non invasivo per la misura della temperatura.

Dai vari profili di temperatura si è poi calcolata la velocità di raffreddamento per le varie configurazioni. Nonostante la velocità di raffreddamento per il fluido termovettore sia di 1 °C/min, la velocità di raffreddamento del prodotto osservata per i flaconi sospesi è inferiore rispetto alla configurazione con i flaconi appoggiati. La velocità di raffreddamento dei flaconi appoggiati sui ripiani risulta pressoché uguale alla velocità di raffreddamento del fluido termovettore che scorre nei ripiani. Dopo circa un'ora dall'inizio del congelamento, la temperatura dei flaconi sospesi risulta essere superiore ai -10 °C e non è ancora avvenuto il fenomeno di nucleazione, mentre i flaconi appoggiati presentano una temperatura prossima a -40 °C e simile a quella del ripiano.

La Figura 3.11 confronta l'andamento della temperatura del prodotto durante l'intero ciclo di liofilizzazione. Dal grafico si possono distinguere le tre fasi del processo.

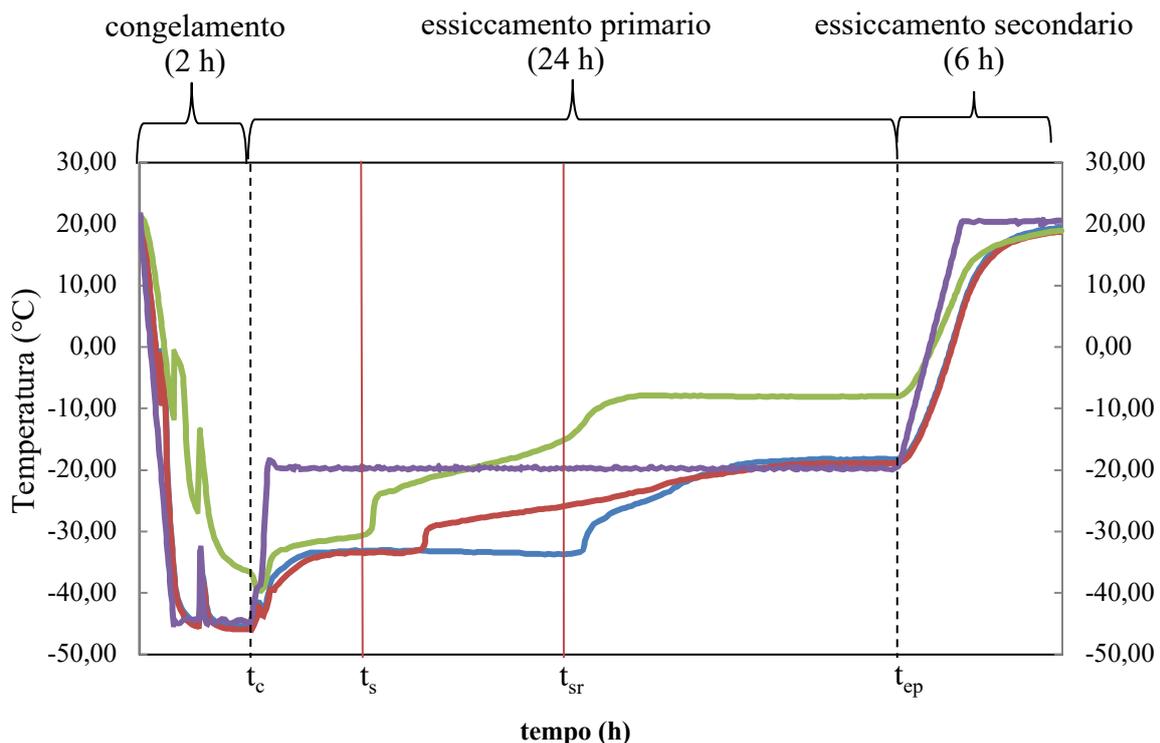


Figura 3.11. Andamento della temperatura del prodotto durante la prova di liofilizzazione nel caso di (linea verde) flacone sospeso sul ripiano, (linea rossa) flacone laterale appoggiato e (linea blu) flacone centrale appoggiato. Si riporta anche la temperatura del fluido termovettore che scorre nel ripiano (linea viola).

Al tempo t_c termina la fase di congelamento. L'evidente incremento della temperatura indica l'inizio dell'essiccamento primario e poi secondario al tempo t_{ep} . Al termine dell'essiccamento

primario, la temperatura dei flaconi appoggiati corrisponde a quella del fluido termovettore che scorre nel ripiano. Diversamente i flaconi sospesi mostrano una temperatura maggiore e superiore ai $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tale comportamento è dovuto all'assenza di contatto tra flacone e ripiano e alla riduzione del contributo conduttivo del gas al trasferimento di calore complessivo (Capozzi et al., 2019). Nella configurazione sospesa, il contributo al trasferimento di calore dominante è il meccanismo radiante, perciò i flaconi sono riscaldati dalle pareti della camera di liofilizzazione per irraggiamento. Per tali motivi, la temperatura raggiunta al termine dell'essiccamento primario potrebbe corrispondere a quella delle pareti della camera di liofilizzazione.

Continuando nell'analisi del grafico, si nota, al tempo t_s , un rapido innalzamento della temperatura dei flaconi sospesi, dopodiché, come precedentemente discusso, i flaconi terminano l'essiccamento primario ad una temperatura superiore ai $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tale comportamento si riscontra anche nei flaconi appoggiati, ma a tempi ritardati t_{sr} . Il brusco innalzamento della temperatura potrebbe essere provocato dal raggiungimento del fondo del flacone, dove è posto il sensore della termocoppia, da parte del fronte di sublimazione. Per tali motivi, al tempo t_s , la gran parte del ghiaccio all'interno del flacone sospeso si pensa essere sublimata e questa condizione potrebbe rappresentare la fine dell'essiccamento primario. La configurazione con i flaconi sospesi mostra, quindi, tempi di essiccamento minori rispetto ai flaconi appoggiati grazie alla maggiore dimensione dei pori formatasi durante il congelamento (Capozzi et al., 2019). Inoltre, i due flaconi appoggiati presentano tempi di essiccamento diversi. Questa differenza potrebbe essere dovuta al fatto che il flacone laterale riceve calore per irraggiamento dalla camera di essiccamento.

In Figura 3.12 si riportano i valori di umidità residua, ottenuti attraverso la titolazione Karl Fisher, dei campioni liofilizzati per le varie configurazioni di congelamento.

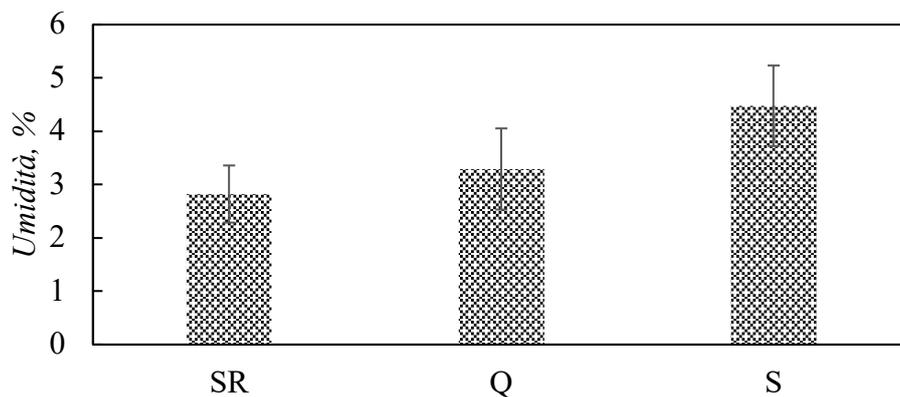


Figura 3.12. Misura di umidità dei campioni dopo la liofilizzazione nel caso di (SR) flaconi appoggiati sul ripiano (test 9 in Tabella 2.4), (Q) flaconi congelati per immersione in azoto liquido e poi caricati in REVO con modalità SR (test 8 in Tabella 2.4) e (S) flaconi sospesi sul ripiano (test 10 in Tabella 2.4).

Il congelamento per immersione in azoto liquido (test 8) ha portato ad un contenuto di acqua maggiore rispetto ai flaconi sospesi, in quanto la velocità di congelamento elevata ha prodotto una matrice solida con una minore dimensione dei pori. Questo ostacola il trasporto del vapore d'acqua durante l'essiccamento primario.

Contrariamente ai risultati presenti in letteratura (Capozzi et al, 2019), il metodo dei flaconi sospesi ha portato un contenuto maggiore di umidità rispetto agli altri metodi di liofilizzazione in esame. Questo risultato è però conseguenza del fatto che le condizioni operative, temperatura della superficie raggianti e pressione, sono state scelte in modo non appropriato, o comunque sfavorendo la configurazione dei flaconi sospesi. Infatti, in quest'ultimo caso l'essiccamento potrebbe essere condotto ad un valore di pressione più basso di quello utilizzato, senza ridurre l'efficienza di scambio termico e massimizzando la forza spingente per il trasporto di materia. Capozzi et al. (2019) hanno dimostrato che queste condizioni permettono di ridurre i tempi di essiccamento di un fattore di 4-5 volte.

Nel corso della sperimentazione si è inoltre notato che il numero di flaconi contenenti una struttura solida collassata era maggiore nella configurazione con flaconi sospesi. Se ne deduce che le condizioni operative scelte non solo penalizzano la configurazione dei flaconi sospesi, ma sono controproducenti perché portano ad un riscaldamento eccessivo del prodotto che promuove il collasso della struttura ed un ulteriore rallentamento della fase di essiccamento. In conclusione il confronto delle prestazioni tra queste configurazioni non è attendibile dal punto di vista dei tempi di essiccamento.

3.2 LDH

In tale sezione verranno presentati i risultati relativi ai protocolli congelamento e scongelamento su formulazioni contenenti l'enzima lattato deidrogenasi (LDH). Lo studio di due diverse proteine mira a comprendere se la struttura proteica incide sul tasso di denaturazione provocato dal congelamento e l'importanza del design della formulazione.

3.2.1 Effetto delle condizioni di congelamento

Le Figure 3.13, 3.14 e 3.15 mostrano i valori di efficienza di recupero ($E_{f.f.}$) delle formulazioni calcolate mediante l'equazione (3.5):

$$E_{f.f.} = \frac{A_b}{A_f} \% \quad (3.5)$$

dove A_b e A_f rappresentano rispettivamente l'assorbanza della formulazione E (vedi Tabella 2.1) e quella della formulazione in esame a parità di condizioni di congelamento.

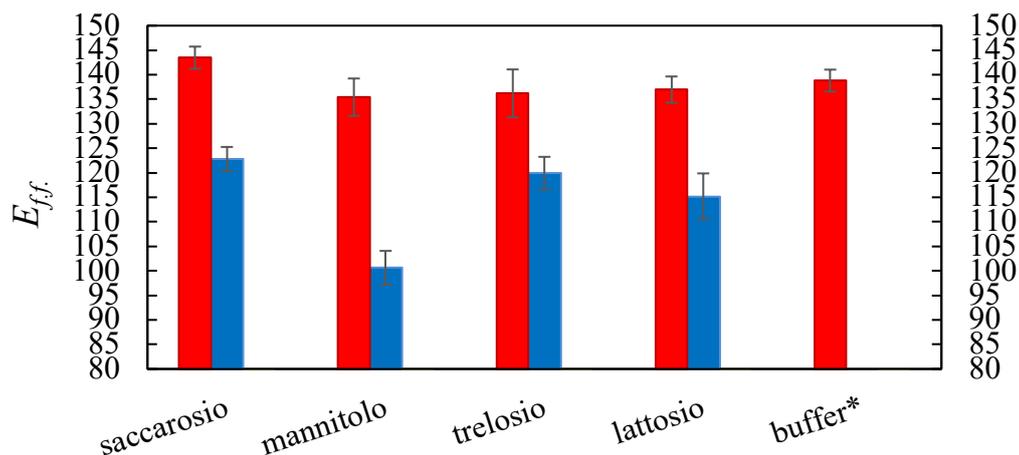


Figura 3.13. Effetto dei crio-protettori sul recupero di attività di LDH dopo il congelamento per immersione in azoto liquido (test 5 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento alle formulazioni (rosso) contenenti Tween 80 (0,1 mg/ml) e (blu) senza tensioattivo.

In Figura 3.13 si nota che l'utilizzo di crio-protettori incrementa notevolmente l'efficienza di recupero delle formulazioni. L'utilizzo della formulazione A*, contenente saccarosio e Tween 80, permette di ottenere un valore di efficienza superiore al 140%. L'elevata efficienza delle formulazioni contenenti Tween 80, e il notevole divario tra le formulazioni con e senza tensioattivo, indica la maggiore sensibilità dell'LDH ad interagire con l'interfaccia acqua-ghiaccio. La proteina in questione tende ad interagire con l'interfaccia acqua-ghiaccia in misura maggiore rispetto alla Mb. Infine, anche per l'LDH, la formulazione contenente mannitolo presenta l'efficienza minore che potrebbe essere imputata alla cristallizzazione del mannitolo durante la fase di crio-concentrazione.

D'altro canto, come mostrato in Figura 3.14, l'azione dei crio-protettori risulta meno evidente nel caso di congelamento di flaconi appoggiati su di un ripiano raffreddato.

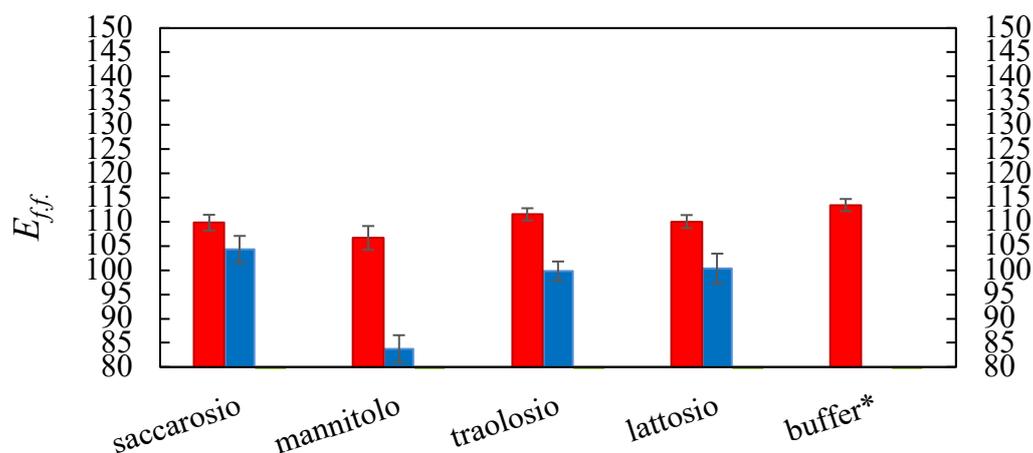


Figura 3.14. Effetto dei crio-protettori sul recupero di attività di LDH dopo il congelamento di flaconi appoggiati su ripiani a temperatura controllata (test 1 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento alle formulazioni (rosso) contenenti Tween 80 (0,1 mg/ml) e (blu) senza tensioattivo.

Si osserva una riduzione dell'efficienza di recupero delle formulazioni prive di Tween 80 (barra blu). Il trend potrebbe essere connesso alle minori temperature raggiunte in questa configurazione rispetto al congelamento per immersione in azoto liquido e ciò rende meno evidente l'azione crio-protettiva esplicata dagli zuccheri in soluzione. Inoltre, diminuisce il tasso di denaturazione dovuto all'interazione con l'interfaccia acqua-ghiaccio, che rimane comunque la componente predominante, in quanto l'azione del Tween 80 nella formulazione E^* produce un'efficienza di recupero maggiore rispetto l'utilizzo dei soli zuccheri.

L'efficienza di recupero della formulazione contenente mannitolo diminuisce notevolmente rispetto al caso di immersione dei flaconi direttamente in azoto liquido (vedi Figura 3.13) con un valore di efficienza minore del 85%. Alla luce di questo risultato, se ne deduce che è sconsigliabile usare la formulazione a base di mannitolo per la liofilizzazione dell'LDH.

Infine, in Figura 3.15, si presentano i risultati ottenuti per il congelamento di flaconi sospesi.

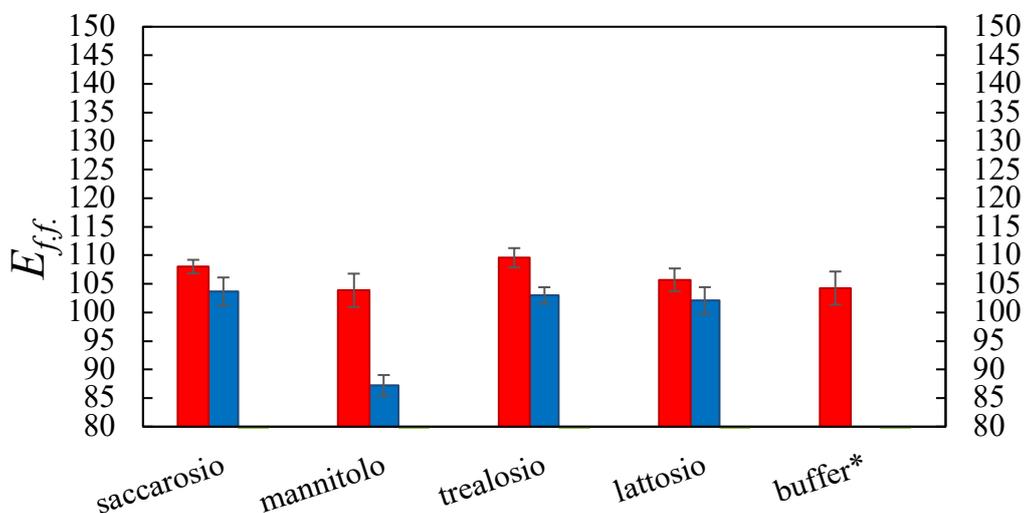


Figura 3.15. Effetto crio-protettori sul recupero di attività di LDH dopo il congelamento di flaconi sospesi sul ripiano (test 2 in Tabella 3.2). I risultati fanno riferimento alle formulazioni (rosso) contenenti Tween 80 (0,1 mg/ml) e (blu) senza tensioattivo.

La Figura 3.15 mostra valori di efficienza simili a quelli osservati per il congelamento di flaconi appoggiati su di un ripiano raffreddato (vedi Figura 3.14). Si può notare comunque un'ulteriore diminuzione dell'interazione con l'interfaccia acqua-ghiaccio, che è confermata dal grafico in Figura 3.15 poiché il divario tra la formulazione con e senza Tween 80 risulta minore rispetto a quanto osservato i flaconi appoggiati. Le due configurazioni mostrano però risultati simili per la formulazione contenente mannitolo, che risulta essere la meno efficiente nel prevenire la denaturazione proteica.

In analogia con la Mb, anche per l'LDH è stato condotto un ulteriore confronto tra le varie configurazioni di congelamento. Nelle Figure 3.16, 3.17 e 3.18 sono illustrati i valori di efficienza di recupero ($E_{f.p.}$) per varie formulazioni (3.6) :

$$E_{f.p.} = \frac{A_{bs}}{A_f} \% \quad (3.6)$$

dove A_{bs} e A_f rappresentano rispettivamente l'assorbanza della formulazione \underline{E} (vedi Tabella 2.1) in test 2 (Tabella 2.3) e quella della formulazione nel protocollo di congelamento in esame.

La figura 3.16 mostra un confronto tra il congelamento per immersione in azoto liquido e flaconi appoggiati su un ripiano raffreddato.

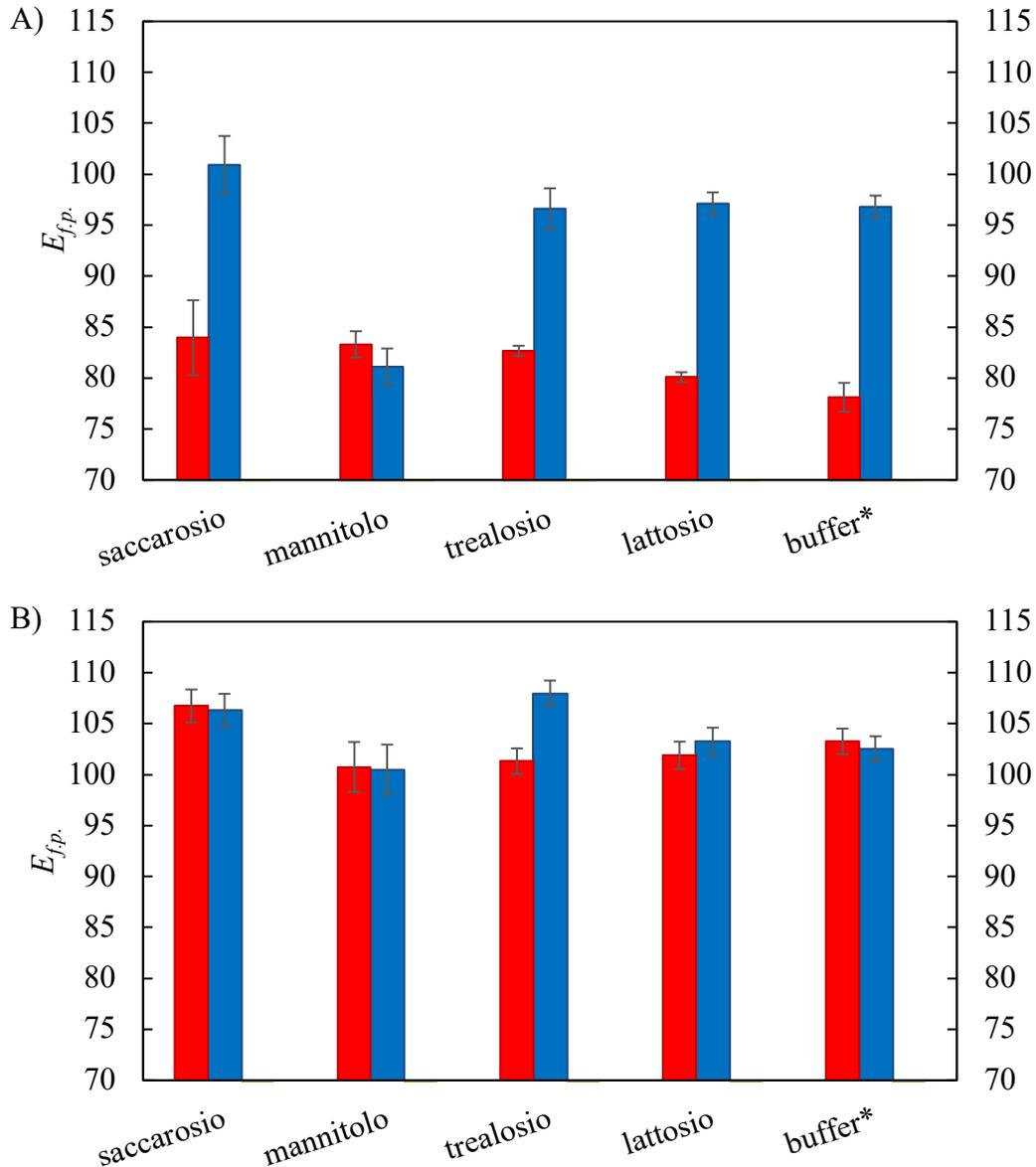


Figura 3.16. Recupero dell'attività di LDH al variare della formulazione nel caso di (rosso) immersione in azoto liquido (test 5 in Tabella 2.3) e (blu) flaconi appoggiati su un ripiano (test 1 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento a formulazioni (A) senza tensioattivo e (B) con aggiunta di tensioattivo.

Come mostrato in Figura 3.16 anche per l'LDH la configurazione peggiore in termini di denaturazione proteica è l'immersione in azoto liquido (test 5). Tale protocollo risulta essere maggiormente sfavorevole nei confronti dell'LDH rispetto al caso di Mb, data l'alta sensibilità all'interfaccia acqua-ghiaccio.

D'altro canto, con l'aggiunta di Tween 80 (Figura 3.16 B) si nota un netto miglioramento della tecnologia di congelamento per immersione con un conseguente incremento di efficienza delle varie formulazioni. Inoltre, ad eccezione della formulazione contenente trealosio, si può notare che il divario tra i due protocolli risulta totalmente colmato nel caso di LDH rispetto a Mb. Questo potrebbe essere spunto per studi futuri, al fine di investigare come la stessa concentrazione di tensioattivo potrebbe produrre effetti diversi a seconda della proteina formulata.

Il trend sopra descritto è confermato dalle Figure 3.17 e 3.18 che mostrano un ulteriore confronto tra i protocolli di congelamento.

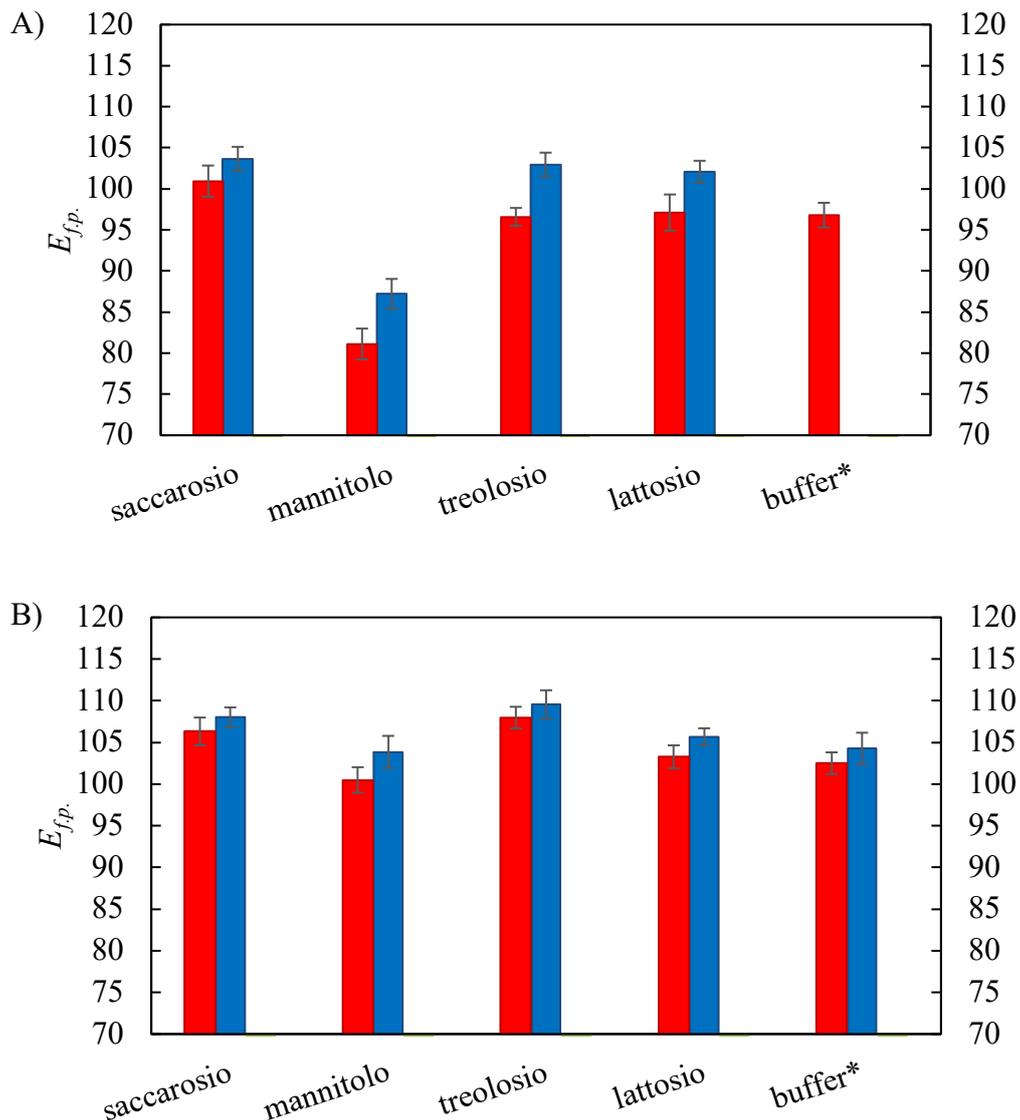


Figura 3.17. Recupero dell'attività di LDH al variare della formulazione nel caso di (rosso) flaconi appoggiati su un ripiano (test 1 in Tabella 2.3) e (blu) flaconi sospesi su un ripiano (test 2 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento a formulazioni (A) senza tensioattivo e (B) con aggiunta di tensioattivo.

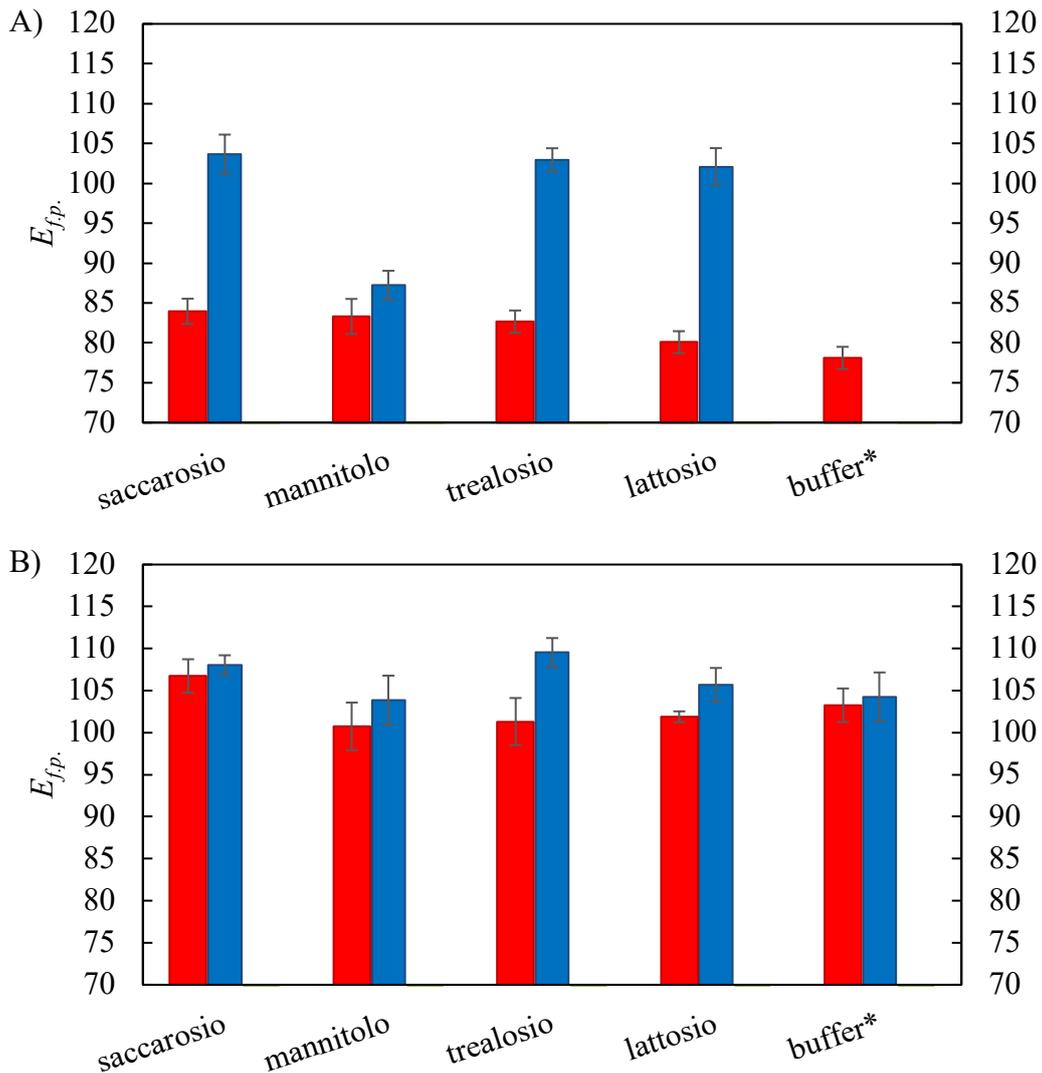


Figura 3.18. Recupero dell'attività di LDH al variare della formulazione nel caso di (rosso) immersione in azoto liquido (test 5 in Tabella 2.3) e (blu) flaconi sospesi su un ripiano (test 2 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento a formulazioni (A) senza tensioattivo e (B) con aggiunta di tensioattivo.

In conclusione, dal confronto si evince che:

- L'LDH risulta essere più sensibile di Mb all'adsorbimento all'interfaccia acqua-ghiaccio durante il congelamento.
- Il congelamento per immersione in azoto liquido è il peggiore in termini di denaturazione proteica, comportando un notevole incremento del tasso di denaturazione a causa della maggiore estensione dell'interfaccia acqua-ghiaccio. D'altro canto, con l'aggiunta del Tween 80 le prestazioni dei due metodi di congelamento: congelamento di flaconi appoggiati ed immersione in azoto liquido, sono simili.
- La metodologia dei flaconi sospesi ha permesso di ottenere, anche per l'LDH, le più alte efficienze di recupero.

Questi risultati sono confermati dai test di attività enzimatica che sono mostrati in Figura 3.19 e 3.20. Le misure di attività enzimatica confermano che la migliore efficienza di conservazione dell'attività proteica è data dal congelamento di flaconi sospesi.

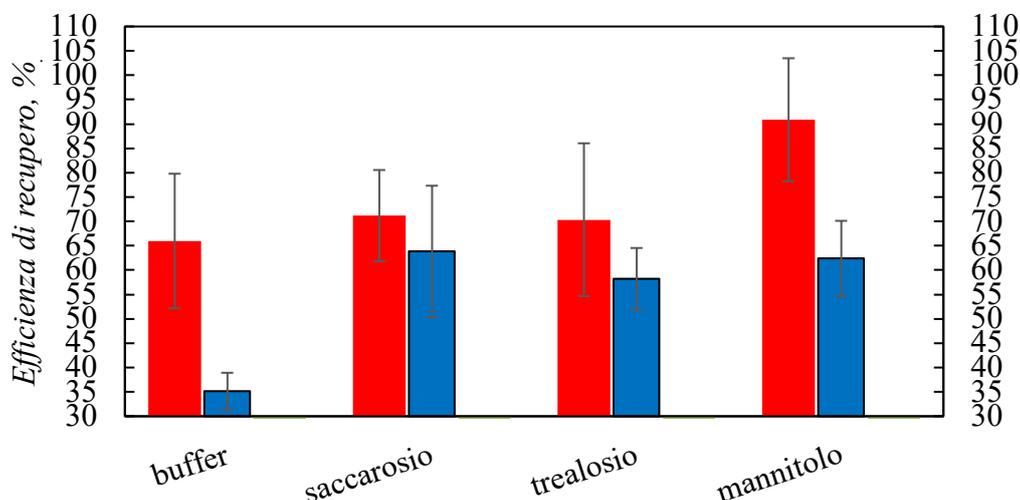


Figura 3.19. Effetto dei crio-protettori sul recupero di attività di LDH dopo il congelamento per immersione in azoto liquido (test 5 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento alle formulazioni (rosso) contenenti Tween 80 (0,1 mg/ml) e (blu) senza tensioattivi. Misura di attività condotta con test di attività enzimatica (Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

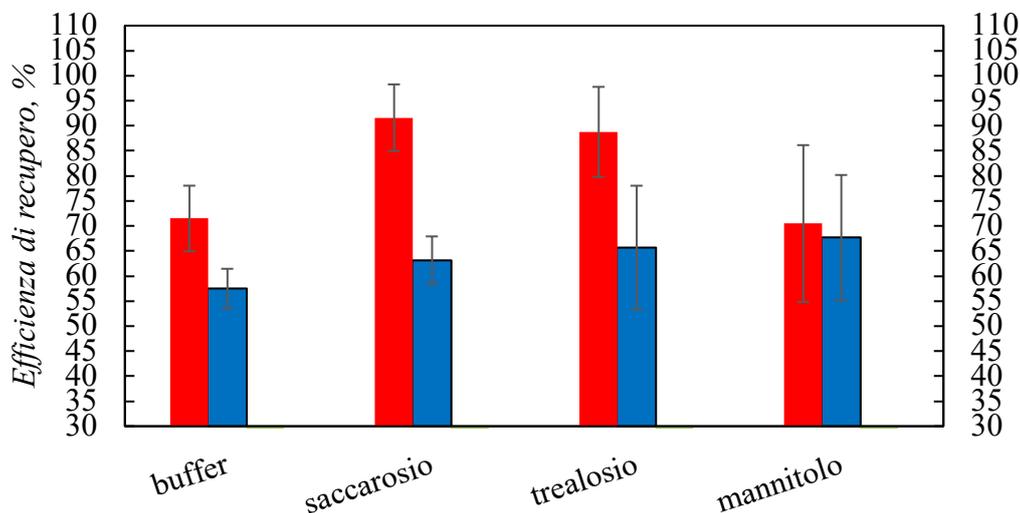


Figura 3.20. Effetto crio-protettori sul recupero di attività di LDH dopo il congelamento di flaconi sospesi sul ripiano (test 2 in Tabella 3.2). I risultati fanno riferimento alle formulazioni (rosso) contenenti Tween 80 (0,1 mg/ml) e (blu) senza tensioattivi. Misura di attività condotta con test di attività enzimatica (Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Si è infine studiato l'impatto della velocità di scongelamento sull'attività residua dell'LDH. La Figura 3.21 mostra l'efficienza di recupero $E_{f,thawing}$ delle formulazioni in test 3, 4 (vedi Tabella 2.3) calcolata mediante l'equazione 3.7:

$$E_{f,thawing} = \frac{A_{ft}}{A_{st}} \% \quad (3.7)$$

dove A_{st} e A_{ft} rappresentano rispettivamente il valore di assorbanza della formulazione in esame e la formulazione \underline{E} in test 3.

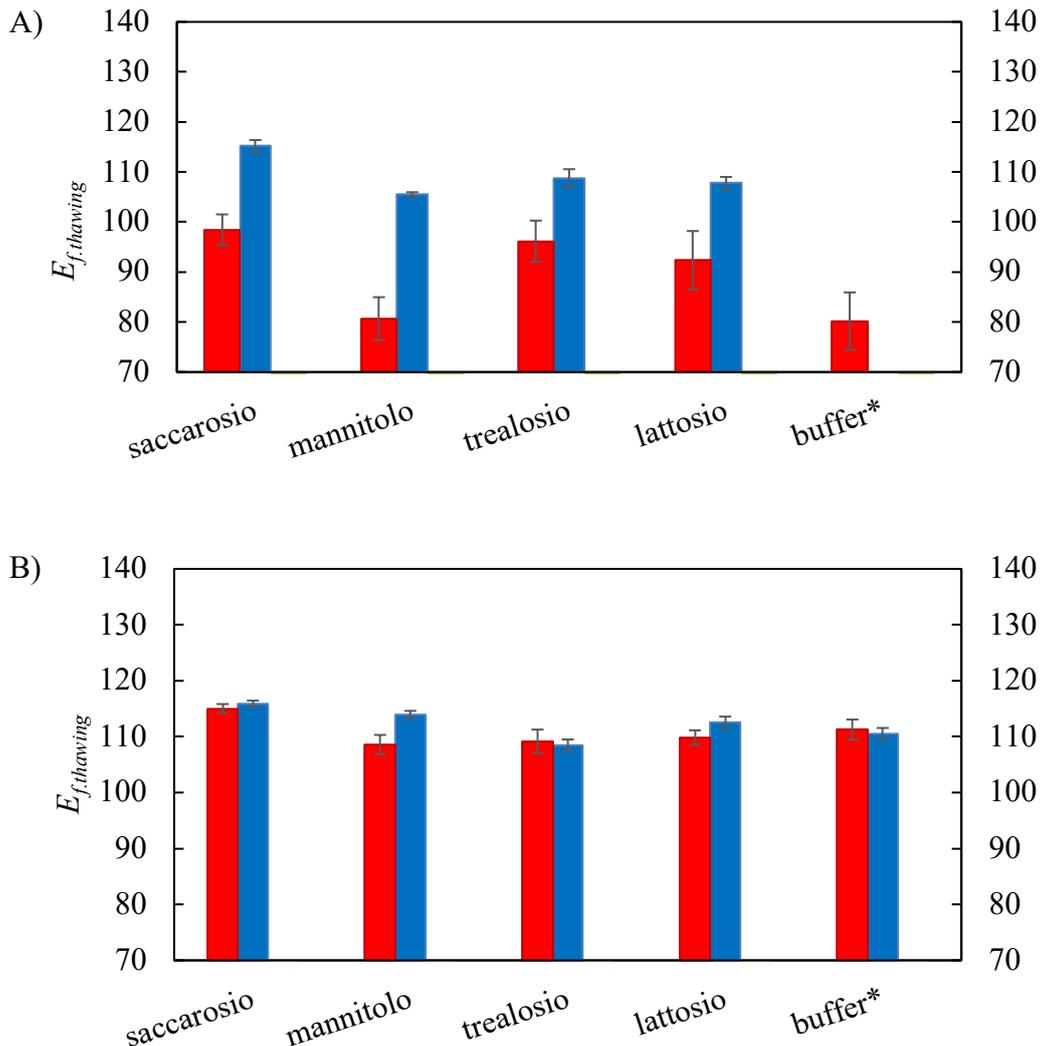


Figura 3.21. Recupero dell'attività di LDH al variare della formulazione nel caso di (rosso) immersione in azoto liquido e scongelamento 1 °C/min (test 4 in Tabella 2.3) e (blu) immersione in azoto liquido e scongelamento in aria (test 3 in Tabella 2.3). I risultati fanno riferimento a formulazioni (A) senza tensioattivo e (B) con aggiunta di tensioattivo.

Anche l'LDH risente del fenomeno di ricristallizzazione provocato dallo scongelamento lento. Le formulazioni in test 4 non contenenti il Tween 80 (Figura 3.21 A) mostrano un'efficienza di recupero inferiore al 100%.

A differenza della Mb con la quale non era sufficiente l'utilizzo del Tween 80 al fine di eliminare il contributo di ricristallizzazione (vedi Figura 3.8 B), nel caso dell'LDH l'azione del Tween 80 sembra portare alla diminuzione di tale fenomeno riducendo il divario tra i due protocolli (Figura 3.21 B).

Inoltre, le formulazioni mostrate in Figura 3.21 evidenziano un'efficienza di recupero maggiore al 100% con l'aggiunta del Tween 80. Questo non si è verificato con l'utilizzo della Mb. I risultati presentati potrebbero essere un'ulteriore conferma che l'azione del tensioattivo nel ruolo di crio-protettore è funzione della proteina impiegata.

Conclusioni

A valle di un processo farmaceutico, la liofilizzazione è un trattamento largamente utilizzato per la conservazione di enzimi e molecole biologiche, al fine di migliorarne la stabilità durante il trasporto e lo stoccaggio. Il processo in questione permette di essiccare e, quindi, conservare nel tempo quei prodotti termolabili che non potrebbero essere disidratati ad alte temperature. Per tali motivi la liofilizzazione è ampiamente utilizzata nel trattamento delle proteine.

L'intero ciclo di lavoro consiste in un congelamento spinto a temperature molto basse, al fine di trasformare l'acqua presente in soluzione in ghiaccio. In seguito, vi è la fase di essiccamento vero e proprio che si compone di due sottofasi: essiccamento primario nel quale viene indotta la sublimazione del ghiaccio ed essiccamento secondario il cui obiettivo è il desorbimento dell'acqua liquida rimasta intrappolata nella matrice solida durante il congelamento.

La configurazione tecnologica presente nelle industrie odierne assume per lo più una forma discontinua. Per tali motivi, la liofilizzazione è soggetta a numerosi svantaggi quali: tempi morti, ridotta flessibilità alle esigenze di mercato, bassi standard di qualità del prodotto e pericolo di contaminazione. L'innovazione tecnologica sta portando l'industria farmaceutica nell'implementazione dei processi in continuo. Tuttavia, la grande preoccupazione per quanto riguarda gli investimenti è la mancanza di conoscenza dei reparti di R&D e ciò rende difficoltoso l'implementazione di tali processi.

Lo standard di qualità del prodotto è il principale obiettivo dell'industria farmaceutica. Il raggiungimento di elevati gradi di purezza è però limitato dalle tecnologie e dalla difficoltà di controllare in modo adeguato le variabili del processo. Disomogeneità nel trasferimento di calore possono causare gradienti di temperatura nel prodotto rendendolo inadeguato o comunque non uniforme.

L'obiettivo di questa tesi è lo studio della configurazione tecnologica denominata liofilizzazione di flaconi sospesi. Grazie alla sospensione dei flaconi all'interno della camera di liofilizzazione durante il congelamento e l'essiccamento, è possibile eliminare quelle disomogeneità tipiche della tecnologia discontinua, ottenendo un prodotto finale dagli standard di qualità più elevati.

Nella campagna sperimentale sono state esaminate tre differenti soluzioni tecnologiche: (1) flaconi appoggiati e (2) sospesi su di un ripiano a temperatura controllata, (3) congelamento per immersione in azoto liquido e successivo essiccamento utilizzando la prima configurazione. Inizialmente il lavoro si è concentrato maggiormente sulla fase di congelamento, utilizzando mioglobina (Mb) e lattato deidrogenasi (LDH) come proteine modello. Nello specifico, si è dapprima sottoposto le varie formulazioni contenenti Mb e LDH a cicli ripetuti di congelamento e scongelamento e si è misurato il conseguente tasso di denaturazione. Nella seconda parte dello studio ci si è invece concentrati sulla liofilizzazione delle anzidette formulazioni. Questo ha permesso di

scorporare i contributi del congelamento e dell'essiccamento alla denaturazione delle varie formulazioni.

Nella fase di congelamento numerosi sono i parametri che possono influenzare il tasso di denaturazione, quali temperatura e velocità di congelamento. Il raggiungimento di temperature prossime a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ causa un riarrangiamento della proteina, che si dispone promuovendo l'esposizione dei gruppi idrofobi normalmente interni alla struttura proteica. Questo fenomeno è noto come denaturazione a freddo. Nel caso della Mb il fenomeno compromette la stabilità proteica a causa di un cambiamento dello stato fisico del gruppo *eme* e la conseguente perdita della struttura terziaria. La temperatura raggiunta durante il congelamento gioca quindi un ruolo fondamentale nel preservare la struttura nativa della proteina.

Nella fase di congelamento, giunti in prossimità della temperatura di nucleazione, si ha la formazione di cristalli di una certa dimensione che contribuiscono alla formazione dell'interfaccia acqua-ghiaccio. Il fronte di congelamento è spesso causa di denaturazione in quanto predispone un'interfaccia con la quale le proteine possono interagire. Velocità di congelamento elevate favoriscono la formazione di cristalli di ghiaccio più piccoli ed un'estensione dell'interfaccia acqua-ghiaccio maggiore e quindi promuovono maggiore denaturazione in quelle proteine sensibili a questo fenomeno.

Al fine di limitare gli stress provocati dalla liofilizzazione, le proteine sono state formulate mediante l'utilizzo di crio e lio-protettori. Saccarosio, mannitolo, trealosio e lattosio hanno svolto la funzione protettiva durante il congelamento e l'essiccamento, riducendo la disattivazione proteica conseguente i protocolli. In aggiunta, l'impiego del Tween 80 nella preparazione delle formulazioni ha portato ad una diminuzione del tasso di denaturazione provocato dall'interazione della proteina con l'interfaccia acqua-ghiaccio.

Il confronto tra i vari metodi di congelamento e l'impiego di eccipienti nella formulazione delle proteine hanno permesso le seguenti considerazioni finali:

- I. Alte velocità di congelamento hanno provocato un tasso di denaturazione maggiore causato dall'estensione dell'interfaccia acqua-ghiaccio. La formazione, durante il congelamento, di cristalli più piccoli incrementa notevolmente la superficie sulla quale possono adsorbirsi le proteine. Il congelamento per immersione è risultato il metodo peggiore per entrambe le proteine e particolarmente nel caso di LDH. D'altro canto, l'utilizzo del Tween 80 ha incrementato notevolmente l'efficienza di recupero delle formulazioni contenenti l'LDH, riducendo il divario tra i vari metodi di congelamento.
- II. La tecnologia con i flaconi in sospenso ha mostrato un'alta efficienza di recupero grazie al congelamento lento.
- III. Contrariamente al congelamento, lo scongelamento lento influenza negativamente la salvaguardia della struttura proteica. La perdita di attività sembra essere connessa al fenomeno di ricristallizzazione durante lo scongelamento.
- IV. L'azione crio-protettiva degli zuccheri ha incrementato in modo sistematico l'efficienza di recupero proteica per ognuno dei protocolli impiegati. Oltre a

limitare la denaturazione a freddo delle proteine, il saccarosio sembra ostacolare ulteriormente l'interazione della proteina con l'interfaccia acqua-ghiaccio.

- V. Il Tween 80 ha incrementato notevolmente l'efficienza della formulazione grazie al ricoprimento dell'interfaccia acqua-ghiaccio e la conseguente esclusione della proteina. Protocolli con velocità di congelamento elevate richiedono concentrazioni maggiori di Tween 80. D'altro canto, un eccessivo impiego di tensioattivo riduce l'efficienza della formulazione a causa della tendenza dei monomeri a porsi sotto forma di micelle piuttosto che all'interfaccia.

Durante lo studio è emerso che il congelamento di flaconi sospesi generi meno stress alle proteine. Tale tecnologia è quindi la migliore per preservarne l'attività. L'obiettivo per il futuro potrebbe essere l'implementazione in continuo di tale tecnologia al fine d'incrementarne l'efficienza produttiva. Inoltre, l'automazione potrebbe ridurre quei problemi tipici di un processo discontinuo legati ai tempi morti e rendere la liofilizzazione flessibile e rapida nel rispondere all'esigenza del mercato. Infine, la continuità del processo minimizzerebbe l'interazione tra operatore e prodotto riducendo il pericolo di possibile contaminazione dovuta all'errore umano.

Bibliografia

- Allison G., Cain Y., Cooney C., Garcia T., Bizjak T., Holte O., Jagota N., Komar B., Korakianiti E., Kourti D., Madurawe R., Morefield E., Montgomery F., Nasr M., Randolph W., Robert J., Rudd D., Zezza D. (2015). Regulatory and quality considerations for continuous manufacturing. Continuous manufacturing symposium. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **104**, 803-812.
- Altmann R. (1894). Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen, Veit, Leipzig.
- Anchordoquy T.J., Carpenter J.F. (1996). Polymers protect lactate dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **332**, 231-238.
- Anderson A., Robertson C. (1995). Absorption spectra indicate conformational alteration of myoglobin adsorbed on polydimethylsiloxane. *Biophysical Journal* **68**, 2091-2097.
- Anfinsen C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
- Badman C., Trout B. (2015). Achieving continuous manufacturing. Continuous manufacturing symposium. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **104**, 779-780.
- Becker W. (1957). Gefriertrocknungsverfahren. Patent DE 967120 C.
- Bhatnagar B., Bogner R., Pikal M. (2007). Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology* **12**, 505-523.
- Broadwin S.M. (1965). Centrifugal freeze drying apparatus. Patent US 3203108.
- Bronshteyn V.L., Steponkus P.L. (1995). Nucleation and growth of ice crystals in concentrated solutions of ethylene glycol. *Cryobiology* **32**, 1-22.
- Cao E., Chen Y., Cui Z., Foster P. (2003). Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnology and Bioengineering* **82**, 684-690.
- Capozzi L., Trout B., Pisano R. (2019). From batch to continuous: freeze-drying of suspended vials for pharmaceuticals in unit-doses. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **58**, 1635-1649.
- Chang B., Randall C. (1992). Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology* **29**, 632-656.
- Chang B., Kendrick B., Carpenter J. (1996). Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **85**, 1325-1330.

- Corver J. (2012). Method and system for freeze-drying injectable compositions, in particular pharmaceutical compositions. Patent US 2014/0215845
- De Meyer L., Van Bockstal P., Corver J., Vervaet C., Remon J., De Beer T. (2015). Evaluation of spin freezing versus conventional freezing as part of a continuous pharmaceutical freeze-drying concept for unit doses. *International Journal of Pharmaceutics* **496**, 75-85.
- Dias C., Ala-Nissila T., Wong-ekkabut J., Vattulainen I., Grant M., Karttunen M. (2010). The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. *Cryobiology* **60**, 91-99.
- Dill K.A., Alonso D.O.V., Hutchinson K. (1989). Thermal stabilities of globular proteins. *Biochemistry* **28**, 5439-5449.
- Franks F. (1985). *Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures*. Cambridge University, Cambridge.
- Franks F. (2007). *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*. The Royal Society of Chemistry, London.
- Graziano G., Catanzano F., Riccio A., Barone G. (1997). A reassessment of the molecular origin of cold denaturation. *The Journal of Biochemistry* **122**, 395-401.
- Hatley R. (1997). Glass fragility and the stability of pharmaceutical preparations—excipient selection. *Pharmaceutical Development and Technology* **2**, 257-264.
- Hillgren A., Lindgren J., Aldén M. (2002). Protection mechanism of Tween 80 during freeze–thawing of a model protein, LDH. *International Journal of Pharmaceutics* **237**, 57-69.
- Jaenicke R. (1990). Protein structure and function at low temperatures. *Philosophical Transaction of the Royal Society B: Biological Sciences* **326**, 535-551.
- Kristjansson M.M., Kinsella J.E. (1991). *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press Inc., Cambridge.
- Micheltore R.W., Franks F. (1982). Nucleation rates of ice in undercooled water and aqueous solutions of polyethylene glycol. *Cryobiology* **19**, 163-171.
- Nema S., Avis K.E. (1992). Freeze-thaw studies of a model protein, lactate dehydrogenase, in the presence of cryoprotectants. *Journal of Parenteral Science and Technology* **47**, 76-83.
- Oddone I., Pisano R., Bullich R., Stewart P. (2014). Vacuum-induced nucleation as a method for freeze-drying cycle optimization. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **53**, 18236-18244.
- Oughton D.M.A., Smith P.R.J., MacMichael D.B.A. (1999). Freeze-drying process and apparatus. Patent US 5964043.

- Pisano R. (2019). *Lyophilization of Pharmaceuticals and Biologicals*. Humana Press inc., New York.
- Pisano R., Capozzi L. (2017). Prediction of product morphology of lyophilized drugs in the case of vacuum induced surface freezing. *Chemical Engineering Research and Design* **125**, 119-129.
- Pisano R., Arsiccio A., Capozzi L., Trout B. (2019). Achieving continuous manufacturing in lyophilization: technologies and approaches. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **142**, 265-279.
- Poechlauer P., Manley J., Broxterman R., Gregertsen B., Ridemark M. (2012). Continuous processing in the manufacture of active pharmaceutical ingredients and finished dosage forms: an industry perspective. *Organic Process Research & Development* **16**, 1586-1590.
- Rutter A. (2011). Continuous processing-how do we make it succeed in the pharmaceutical industry? Royal Society of Chemistry Symposium: Continuous Flow Technology, Switzerland.
- Searles J., Carpenter J., Randolph T. (2001). The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **90**, 860-871.
- Sebastião I., Bhatnagar B., Tchessalov S., Ohtake S., Plitzko M., Luy B., Alexeenko A. (2019). Bulk dynamic spray freeze-drying part 1: modeling of droplet cooling and phase change. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **108**, 2063-2074.
- Shikama K., Yamazaki T. (1961). Denaturation of catalase by freezing and thawing. *Nature* **190**, 83-84.
- Strambini G.B., Gabellieri E. (1996). Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophysical Journal* **70**, 971-976.
- Van den Berg L., Rose D. (1959). Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **81**, 319-329.
- Van der Wel P.-G.-J. (2015). Active freeze drying, proceedings of 5th european drying conference, Budapest.
- Vrkljan M., Foster T.M., Powers M.E., Henkin J., Porter W.R., Staack H., Carpenter J.F., Manning M.C. (1994). Thermal stability of low molecular weight urokinase during heat treatment. Effect of polymeric additives. *Pharmaceutical Research* **11**, 1004-1008.
- Wang W. (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* **185**, 129-188.

Wang W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.
International Journal of Pharmaceutics **203**, 1-60.