

# 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

## **Applicazione del Quality by Design alla liofilizzazione di biofarmaci**



### **Relatori**

Prof. Roberto Pisano

Dott. Andrea Arsiccio

### **Candidato**

Livio Marengo

Dicembre 2019



# Indice

<b>CAPITOLO I.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduzione .....</b>	<b>1</b>
1.1. Liofilizzazione .....	2
1.1.1. Congelamento.....	4
1.1.2. Essiccamento primario .....	6
1.1.3. Essiccamento secondario.....	7
1.2. Stabilità di formulazioni proteiche durante e dopo la liofilizzazione.....	8
1.2.1. Basse temperature: denaturazione a freddo.....	9
1.2.2. Crioconcentrazione.....	10
1.2.3. Cristallizzazione del soluto .....	11
1.2.4. Separazione di fase.....	12
1.2.5. Disidratazione.....	12
1.2.6. Formazione di interfaccia acqua-ghiaccio.....	12
1.2.7. Variazione di pH .....	13
1.3. Il problema della formulazione di farmaci proteici .....	14
1.3.1. Zuccheri e polioli .....	15
1.3.2. Polimeri .....	16
1.3.3. Proteine.....	16
1.3.4. Tensioattivi.....	16
1.4. Obiettivo della tesi.....	17
<b>CAPITOLO II .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Metodi teorici .....</b>	<b>19</b>
2.1. Modellazione dei profili termici durante le fasi di congelamento/scongelo.....	19
2.1.1. Congelamento.....	19
2.1.2. Scongelo .....	21
2.2. Calcolo della dimensione dei cristalli di ghiaccio .....	22
2.3. Modello cinetico reversibile .....	24
2.4. Calcolo del design space.....	26
2.5. Modello cinetico irreversibile.....	29
2.6. Caso di studio e programmazione delle simulazioni .....	30
<b>CAPITOLO III.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Materiali e metodi sperimentali.....</b>	<b>33</b>
3.1. Criomicroscopio (FDM).....	33

3.2.	Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	36
3.3.	Studio della denaturazione a freddo della Mioglobina.....	38
3.4.	Stabilità della Mioglobina a seguito di cicli di congelamento-scongelo.....	39
3.5.	Stabilità della Mioglobina a seguito di liofilizzazione.....	43
<b>CAPITOLO IV.....</b>		<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>Risultati.....</b>	<b>47</b>
4.1.	Design Space.....	47
4.1.1.	Congelamento.....	47
4.1.2.	Scongelo.....	53
4.2.	Caratterizzazione termica delle formulazioni da liofilizzare.....	59
4.2.1.	FDM.....	60
4.2.2.	DSC.....	62
4.3.	Studio della stabilità della Mioglobina a basse temperature.....	67
4.4.	Studio della stabilità della Mioglobina durante congelamento e scongelamento.....	68
4.4.1.	Effetto della velocità di raffreddamento.....	70
4.4.2.	Effetto del tensioattivo.....	70
4.4.3.	Effetto della concentrazione di mioglobina.....	71
4.4.4.	Effetto dello scongelamento.....	71
4.5.	Stabilità della Mioglobina dopo liofilizzazione.....	73
<b>CAPITOLO V.....</b>		<b>77</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>77</b>
<b>Lista dei simboli.....</b>		<b>79</b>
<b>Abbreviazioni.....</b>		<b>83</b>
<b>Elenco delle figure.....</b>		<b>85</b>
<b>Elenco delle tabelle.....</b>		<b>89</b>
<b>Bibliografia.....</b>		<b>91</b>
<b>Ringraziamenti.....</b>		<b>97</b>

# CAPITOLO I

## 1. Introduzione

Negli ultimi anni, la produzione di biofarmaci è cresciuta in maniera esponenziale; questi agenti terapeutici stanno diventando sempre più importanti nel trattamento di moltissime malattie, e la loro produzione ha assunto un ruolo chiave nell'industria farmaceutica. I biofarmaci contengono al loro interno diverse sostanze biologicamente attive: amminoacidi, proteine, enzimi, acidi nucleici, ormoni, ecc. Le proteine, come anche le altre sostanze sopracitate, sono molecole molto grandi e complesse, che all'interno dell'organismo umano ricoprono innumerevoli ruoli, alcuni dei quali estremamente importanti. Esse ricoprono infatti funzioni di tipo strutturale, enzimatico, di trasporto, di sintesi, di difesa immunitaria e molte altre.

Complessa, però, è anche la loro gestione; queste macromolecole risultano spesso instabili e sensibili agli stress ambientali, soprattutto se mantenute in soluzione acquosa: le reazioni degradative sono infatti strettamente dipendenti dalla quantità di acqua disponibile. Nel tempo i biofarmaci tendono a ridurre la loro efficacia terapeutica a causa della perdita di attività biologica dei principi attivi al loro interno.

Diventa quindi di cruciale importanza preservare questi prodotto in una forma anidra che risulti stabile nel tempo. Per questo motivo la maggior parte delle tecniche per la conservazione dei prodotti biologicamente attivi si basa sulla disidratazione/allontanamento dell'acqua. Una prima opzione è l'essiccamento termico, ovvero l'allontanamento del solvente attraverso l'aumento della temperatura. Purtroppo, questa tecnica risulta molto deleteria per sostanze termolabili come le proteine, le quali idrolizzano a temperature superiori a 50/60 °C.

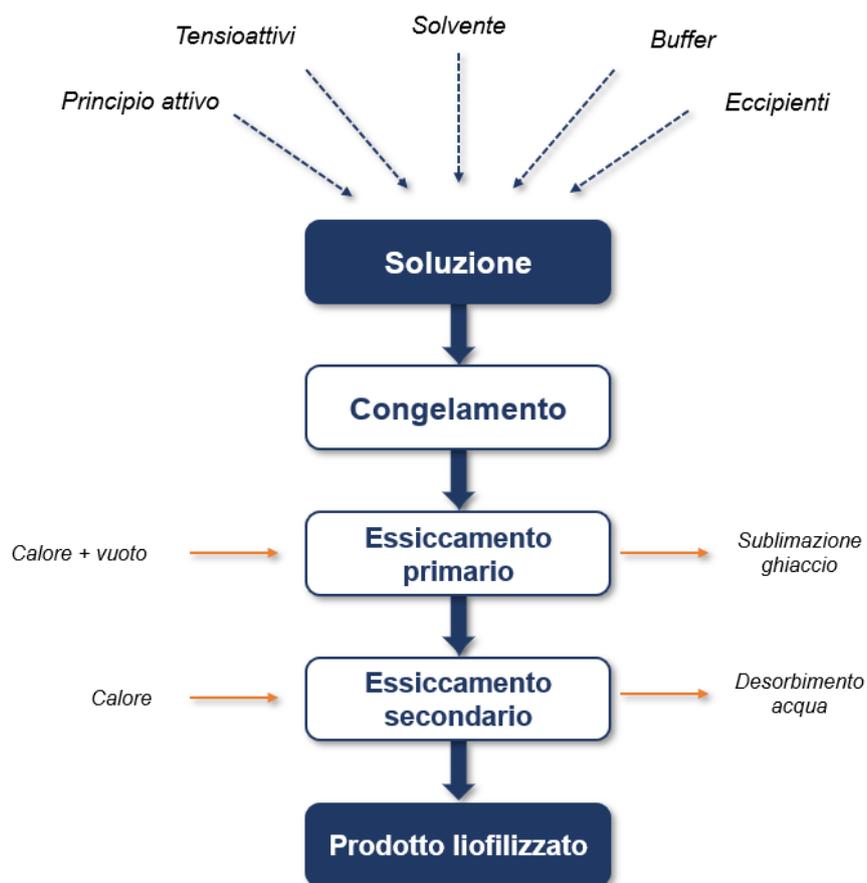
La tecnica quindi più utilizzata per ottenere prodotti anidri e stabili nel tempo è la liofilizzazione. Durante questo procedimento le proteine sono comunque esposte ad innumerevoli stress che impattano sulla qualità del prodotto finale (Wang, 2000). Risulta quindi fondamentale riuscire ad ottimizzare il processo, così come le formulazioni, al fine di preservare il più possibile l'attività biologica del principio attivo.

In passato, nell'industria farmaceutica, le condizioni di processo venivano selezionate principalmente in base alle esperienze pregresse. Ciò, tuttavia, si traduceva in un controllo poco robusto, ed in un elevato rischio di scarsa efficienza del processo o qualità del prodotto non ottimale. Nell'ambito del Quality by Design, invece, l'approccio è diverso: la scelta delle condizioni operative è basata su una reale conoscenza del processo (Arsiccio & Pisano, 2018a; Pisano et al., 2013). A questo scopo, è conveniente ricorrere alla modellazione matematica, e usare i risultati del modello per individuare le condizioni operative ottimali. In questo contesto, il Design Space è un tool fondamentale; si tratta di una rappresentazione grafica che permette di osservare come i parametri critici del processo influenzano la qualità del prodotto, agevolando quindi la scelta delle condizioni più adatte.

In questo lavoro di Tesi, l'approccio Quality by Design verrà applicato al processo di liofilizzazione di biofarmaci. In particolare, in questo primo Capitolo si fornirà una panoramica del contesto scientifico in cui il lavoro si colloca, evidenziando le problematiche che sono state l'oggetto del presente studio.

## 1.1. Liofilizzazione

La liofilizzazione, in inglese freeze-drying, è un processo nel quale il solvente (tipicamente acqua) viene prima congelato e, successivamente, allontanato per sublimazione mediante l'applicazione di un certo grado di vuoto (si veda la Figura 1.1). Viene tipicamente effettuato su prodotti contenenti sostanze biologiche termolabili oppure instabili in soluzione acquosa, che è necessario conservare per periodi prolungati (Nireesha et al., 2013). Trova quindi le sue principali applicazioni nell'industria farmaceutica ed in quella alimentare. Il termine liofilizzazione descrive la caratteristica del prodotto finito, il quale risulta essere *liofilo*, ovvero "affine al solvente".



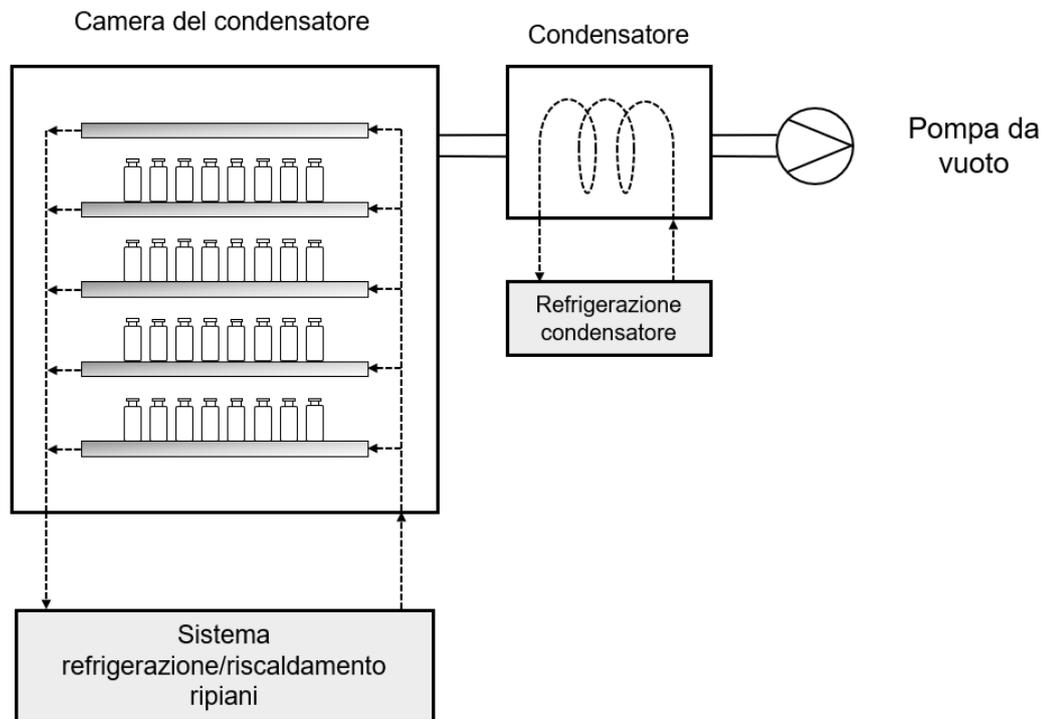
*Figura 1.1 - Schema generale del processo di liofilizzazione.*

Un tipico impianto di liofilizzazione è composto dalle seguenti componenti:

- Una camera mantenuta ad una temperatura controllata contenente dei ripiani inter-refrigerati sui quali vengono riposti i prodotti;
- Un condensatore nel quale viene fatto condensare il vapore acqueo sublimato;
- Un gruppo frigorifero per la refrigerazione dei ripiani;
- Un gruppo di riscaldamento delle piastre;
- Una pompa a vuoto

Uno schema rappresentante le componentistiche è raffigurato in Figura 1.2.

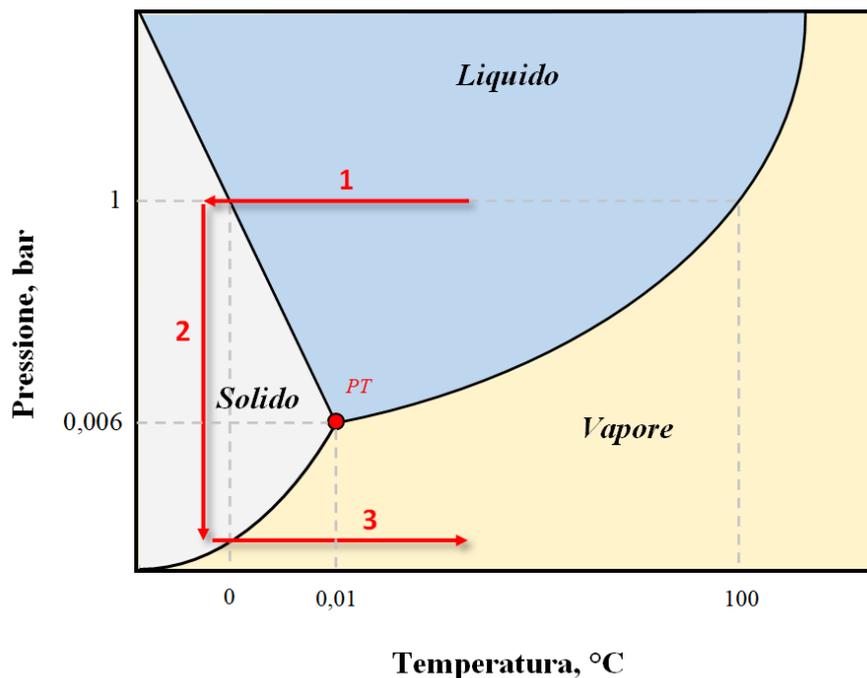
La camera del liofilizzatore deve essere in grado di sopportare le basse pressioni che si registrano durante la fase di essiccamento primario e secondario, che possono arrivare anche a poche decine di microbar.



*Figura 1.2 - Schema di un liofilizzatore.*

Il processo è composto da tre fasi: congelamento, essiccamento primario, ed essiccamento secondario. Il congelamento (freccia 1 in Figura 1.3) prevede la riduzione della temperatura al fine di indurre la cristallizzazione del solvente. L'essiccamento primario (freccia 2 in Figura 1.3) prevede la riduzione della pressione al di sotto del punto triplo e l'applicazione di calore al fine di indurre la sublimazione dell'acqua precedentemente cristallizzata. L'ultima fase, l'essiccamento secondario (freccia 3 in Figura 1.3), serve ad allontanare per desorbimento l'umidità residua rimasta all'interno del prodotto, dovuta ad una piccola percentuale di solvente non cristallizzata.

In Figura 1.3 sono rappresentate in linea generale le tre fasi sul diagramma di fase dell'acqua.



*Figura 1.3 - Diagramma di fase dell'acqua con indicato il percorso delle tre fasi della liofilizzazione.*

### **1.1.1. Congelamento**

Il congelamento è il primo step della liofilizzazione, ed è anche il più critico poiché sottopone le biomolecole ad innumerevoli stress.

La maggior parte della disidratazione del prodotto avviene durante questa fase, dove il solvente acquoso viene separato dalla formulazione liquida sotto forma di cristalli di ghiaccio, portando ad un incremento della concentrazione dei soluti (Kasper et al., 2011).

Durante il congelamento viene definita la morfologia e perciò la qualità del prodotto finito. In base al protocollo di congelamento, inoltre, possono cambiare le caratteristiche degli altri stadi del processo, come per esempio le tempistiche dell'essiccamento primario. Velocità di raffreddamento elevate portano ad avere cristalli di ghiaccio più piccoli e numerosi. Questi cristalli, una volta sublimati durante l'essiccamento primario, generano pori di dimensioni analoghe. Questi ultimi genereranno quindi una elevata resistenza allo scambio di materia date le loro dimensioni ridotte, ed il prodotto risulterà più difficile da essiccare. Al contrario, basse velocità di raffreddamento si traducono in cristalli di dimensione maggiore e, di conseguenza, in una dimensione maggiore dei pori che rende più agevole la fuoriuscita del vapor d'acqua dal prodotto.

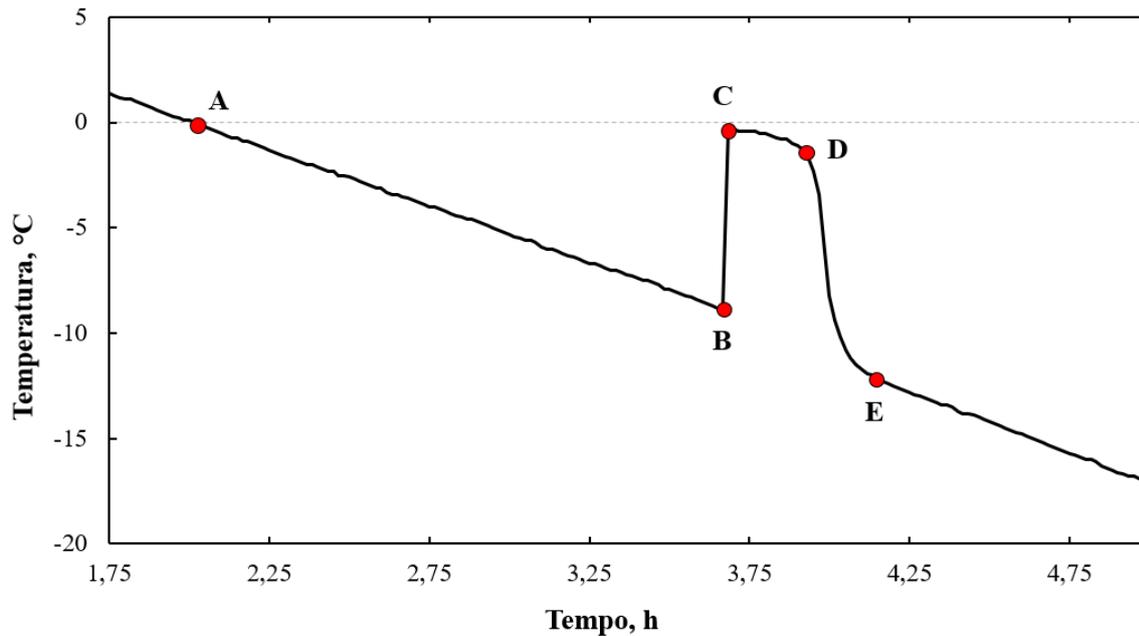
È quindi molto importante entrare più nel dettaglio e comprendere al meglio quali sono i fenomeni chimici e fisici che avvengono durante il congelamento.

I prodotti farmaceutici possono congelare in due modi, a seconda delle sostanze che compongono la formulazione. Molti dei composti sottoposti a liofilizzazione sono miscele eutettiche, cioè miscele di sostanze che cristallizzano, tipicamente ad una temperatura inferiore

rispetto all'acqua. Al diminuire della temperatura l'acqua si separa andando a formare cristalli di ghiaccio, e lasciando dietro di sé una miscela sempre più concentrata nei soluti, la quale possiede una temperatura di cristallizzazione inferiore rispetto a quella dell'acqua. Solamente quando tutte le sostanze solidificano il prodotto può considerarsi congelato, e ciò avviene ad una temperatura chiamata "temperatura eutettica". È molto importante raffreddare al di sotto di questa temperatura prima di iniziare l'essiccamento: piccole quantità di materiale non congelato potrebbero compromettere la stabilità dell'intero prodotto (Khairnar et al., 2013). Altre soluzioni, invece, si comportano da solidi amorfi; invece di formare un eutettico, la sospensione contenente il soluto aumenta la propria viscosità man mano che l'acqua passa in fase cristallina, fino a quando solidifica diventando un solido vetroso ad una temperatura detta appunto "temperatura di transizione vetrosa".

Durante il congelamento si possono distinguere diversi eventi che sono evidenziati in Figura 1.4:

- Sotto-raffreddamento (tratto A-B): quando raffreddata a pressione atmosferica, una soluzione acquosa non congela a 0°C ma bensì a temperature a volte anche molto inferiori. In questo "range" termico al di sotto della temperatura di equilibrio, l'acqua liquida si trova in uno stato metastabile nel quale, a causa delle fluttuazioni di densità legate al moto Browniano, tende a formare dei *cluster* di molecole con conformazione simile a quella del ghiaccio solido (Franks et al., 2007). Questi aggregati, che fungono come centri di cristallizzazione, hanno però vita molto breve poiché il processo risulta essere energeticamente sfavorito (Kasper et al., 2011). La formazione di nuclei stabili è un evento raro, e la probabilità che essi crescano in numero e dimensione aumenta all'aumentare del grado di sotto-raffreddamento, che è definito come la differenza tra la temperatura di congelamento nominale (0°C) e quella alla quale si formano i primi cristalli di ghiaccio (Kasper et al., 2011);
- Nucleazione (tratto B-C): una volta che i cluster di molecole superano la dimensione critica, la nucleazione avviene rapidamente in tutto il sistema (punto B), e la temperatura aumenta repentinamente in quanto si tratta di un processo esotermico. La temperatura alla quale avviene la nucleazione influenza il numero e la dimensione dei cristalli di ghiaccio che si formeranno. È necessario distinguere tra due tipi di nucleazione: omogenea ed eterogenea. La nucleazione omogenea ha una barriera energetica da superare che è maggiore rispetto a quella eterogenea: per esempio, l'acqua forma i primi nuclei stabili in maniera omogenea ad una temperatura intorno ai -40°C (Kasper et al., 2011). Se sono presenti impurezze all'interno della soluzione, esse fungeranno però da centri di nucleazione, portando ad una nucleazione detta eterogenea che può avvenire a temperature notevolmente superiori (-10 ÷ -20°C). Queste impurezze possono essere contaminanti esterni, solidi sospesi, le pareti del contenitore o anche alcune macromolecole come le proteine.
- Accrescimento dei cristalli (tratto C-D): le molecole di acqua rimanenti vanno a depositarsi sui cristalli appena formatasi, facendoli crescere in dimensione. Una volta terminata questa fase, il congelamento è completo ed il prodotto risulta completamente solido. Durante la crescita la temperatura rimane circa costante;
- Raffreddamento (Tratto D-E): la temperatura del prodotto congelato decresce velocemente fino a raggiungere quella di mantenimento impostata.



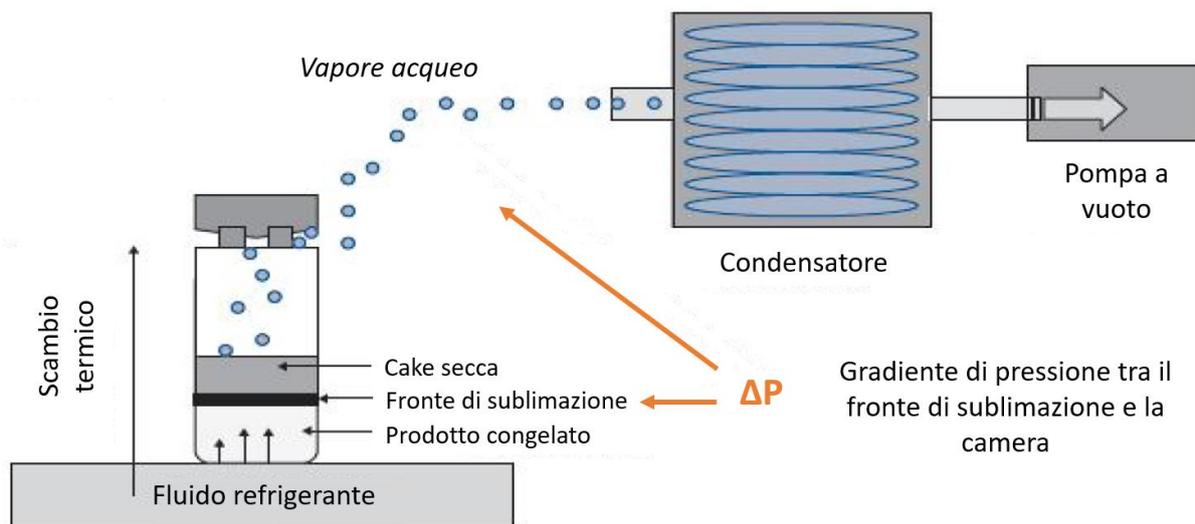
**Figura 1.4** - Profilo termico tipico di un congelamento di una formulazione farmaceutica attraverso un raffreddamento controllato ad una velocità di 0.1K/min.

### 1.1.2. Essiccamento primario

Dopo aver completato la fase di congelamento, la pressione all'interno del liofilizzatore viene ridotta attraverso l'utilizzo di una pompa a vuoto allo scopo di promuovere la sublimazione del ghiaccio formatosi nella fase precedente. La pressione della camera deve essere inferiore al valore di tensione di vapore del ghiaccio in modo tale da permettere la sublimazione e favorire il trasporto del vapore generato fino al condensatore dove, a contatto con le pareti ad una temperatura molto inferiore, si depositerà nuovamente sotto forma di ghiaccio (Figura 1.5). Tipicamente la pressione in camera durante la fase di essiccamento primario di farmaci è in un intervallo tra i 4 ed i 40 Pa (Khairnar et al., 2013). Più la pressione è bassa e maggiore sarà la forza spingente per il trasporto di materia; pressioni eccessivamente basse (inferiori a 6-7 Pa) risultano però controproducenti poiché limitano lo scambio termico e portano ad un allungamento dei tempi dell'essiccamento primario.

Durante l'essiccamento primario anche la temperatura del prodotto svolge un ruolo fondamentale. Essa, infatti, viene incrementata per favorire la sublimazione e quindi velocizzare i tempi di essiccamento. Un incremento della temperatura del prodotto di 1°C può ridurre i tempi di essiccamento primario del 13% (Tang & Pikal, 2004). La sublimazione, inoltre, è un processo endotermico ed in quanto tale tende a raffreddare il prodotto (richiede mediamente circa 670 cal/g). L'energia richiesta per la sublimazione viene quindi fornita incrementando la temperatura della camera. Allo stesso tempo, tuttavia, bisogna prestare attenzione a non superare quella che viene chiamata "temperatura di collasso" della formulazione ( $T_c$ ). La temperatura di collasso è una temperatura al di sopra della quale il prodotto liofilizzato perde la propria struttura macroscopica e, appunto, collassa. La  $T_c$  è tipicamente 2-3°C al di sopra della temperatura di transizione vetrosa per le formulazioni amorfe, mentre corrisponde alla temperatura eutettica per i materiali cristallini. Un collasso

della struttura porta ad avere un prodotto finale dall'aspetto poco gradevole, oltre ad una elevata umidità residua. La temperatura di collasso può essere molto diversa a seconda della formulazione utilizzata: ad eccipienti diversi corrispondono diverse temperature di collasso. Si può incrementare la  $T_c$  attraverso l'utilizzo di eccipienti cristallini come ad esempio il mannitolo e la glicina, definiti per questa loro funzione 'bulking agent'.



**Figura 1.5** - Schema dell'essiccamento primario. Immagine tratta da (Khairnar et al. 2013), riprodotta con modifiche.

L'essiccamento primario rimuove la maggior parte dell'acqua presente nelle formulazioni (tutta quella che ha congelato), risultando la fase di maggiore durata. Per questo motivo è importante scegliere al meglio parametri come pressione e temperatura al fine di velocizzare il più possibile il processo e accelerare al massimo la sublimazione, senza però danneggiare il prodotto.

### 1.1.3. Essiccamento secondario

L'ultima fase della liofilizzazione è l'essiccamento secondario. In questa fase viene allontanata l'acqua che non è cristallizzata durante il congelamento.

Successivamente all'essiccamento primario, un prodotto amorfo contiene ancora una percentuale di acqua residua, all'incirca pari al 5-20% in peso, a seconda della formulazione (Tang & Pikal, 2004). L'obiettivo dell'essiccamento secondario è ridurre l'umidità residua del prodotto ad un valore consono alla conservazione dei prodotti biologici, tipicamente inferiore all'1%. Il livello di umidità, difatti, ha un impatto importante sulla  $T_g$  del prodotto: l'acqua agisce da plasticizzante, riducendo la temperatura di transizione vetrosa ed aumentando così la mobilità all'interno della matrice. Come conseguenza si ha che le reazioni di degradazione vengono accelerate data la maggiore mobilità, o addirittura il prodotto può ritrovarsi al di sopra della propria  $T_g$  (Mensink et al., 2017). Si cerca quindi di disidratare il più possibile e come regola generale, per formulazioni proteiche, si dovrebbe rimanere al di sotto del 2% di umidità residua (Wang, 2000). Valori troppo bassi di umidità residua, comunque, non sono sempre favorevoli alla stabilità proteica. Molteplici studi hanno dimostrato infatti che quando

formulazioni proteiche vengono disidratate oltre un punto critico (per esempio <1% di umidità), le reazioni di degradazione accelerano nuovamente (Lai et al., 1999). Questo fenomeno, detto *over-drying*, può così risultare in un potenziale rischio per lo sviluppo di formulazioni farmaceutiche stabili.

Per raggiungere la disidratazione voluta durante l'essiccamento secondario, si innalza la temperatura all'interno del liofilizzatore e la si mantiene ad un valore, spesso compreso tra i 20°C e i 40°C, per diverse ore. In questo modo viene favorito il desorbimento dell'acqua dalla fase contenente il soluto. È spesso necessario comunque aumentare la temperatura in maniera graduale, per evitare un eventuale collasso della struttura, soprattutto di prodotti amorfi.

La velocità di desorbimento e la percentuale di umidità ottenibile dipendono, oltre che dalla temperatura, anche dalle dimensioni dei pori e dalla superficie specifica del prodotto secco. Questi ultimi due parametri sono direttamente correlati, se il prodotto ha struttura amorfa, e inversamente proporzionali e vengono definiti durante la fase di congelamento. Infatti, la dimensione dei pori coincide con la dimensione dei cristalli di ghiaccio, fatto salvo i casi in cui ci sia contrazione della matrice essiccata, *shrinkage*, o collasso della struttura. Questo significa che se, per esempio, il prodotto presenta pori di grandi dimensioni che favoriscono la sublimazione, la scarsa superficie specifica limiterà la velocità di desorbimento del solvente.

Per quanto riguarda la pressione, invece, essa è generalmente mantenuta allo stesso valore utilizzato durante l'essiccamento primario.

## **1.2. Stabilità di formulazioni proteiche durante e dopo la liofilizzazione**

In ambito proteico, il termine *stabilità* possiede due significati differenti. È importante infatti distinguere tra “stabilità proteica” e “stabilità farmaceutica”.

Il termine stabilità farmaceutica fa riferimento alla capacità di una proteina di essere processata, distribuita ed utilizzata senza modificazioni irreversibili alla propria struttura primaria, conformazione o stato di aggregazione. Con il termine stabilità proteica, invece, si fa riferimento alla posizione di equilibrio di una proteina tra la propria conformazione nativa e quella denaturata. Se una proteina richiede una elevata temperatura o una grande quantità di denaturante per passare dal proprio stato nativo a quello denaturato, la proteina è detta stabile. Questo tipo di stabilità è di tipo termodinamico (Pikal, 2004). L'instabilità termodinamica coinvolge cambiamenti di stato di tipo fisico, reversibili, e pertanto analoghi ad un cambiamento di stato termodinamico. L'instabilità farmaceutica può essere il risultato di un cambiamento di stato fisico (per esempio aggregazione) ma può anche comprendere variazioni irreversibili nella struttura primaria della proteina, ad esempio attraverso degradazione chimica (Pikal, 2004).

I principali meccanismi di degradazione ai quali una proteina va incontro sono la denaturazione e l'aggregazione. La denaturazione è la perdita della struttura tridimensionale della proteina (*unfolding*), e può avvenire anche allo stato solido, ma è molto più comune quando essa è disciolta in un liquido oppure durante l'essiccamento. Generalmente, nella conformazione nativa, la proteina è ripiegata in modo tale da avere i suoi gruppi idrofobi rivolti verso l'interno della struttura. Quando la proteina si denatura, e questa conformazione viene a mancare, questi gruppi apolari si rivolgono verso l'esterno (Mensink et al., 2017). Questo processo è reversibile,

ovvero una proteina può tornare alla propria struttura nativa, ripiegandosi (*folding*). Può succedere, però, che due o più proteine denaturate interagiscano tra di loro attraverso le parti idrofobe ora esposte, aggregandosi. L'aggregazione, al contrario della denaturazione, è un processo irreversibile.

Nonostante la liofilizzazione sia il processo maggiormente utilizzato per ottenere prodotti biologici stabili nel tempo, essa può comunque sottoporre le proteine ad innumerevoli stress che si traducono in perdita di attività biologica. Questi stress possono derivare dalle basse temperature, da variazioni di concentrazione di eccipiente, da variazioni di pH, dalla formazione di interfaccia tra acqua e ghiaccio, da separazione di fase durante il congelamento o dalla disidratazione stessa. Risulta quindi di estremo interesse conoscere più nel dettaglio quali siano questi meccanismi deleteri e come minimizzarli.

In questo paragrafo vengono riassunti i principali stress a cui vanno incontro le proteine durante un ciclo di liofilizzazione. La maggior parte di essi si incontrano durante la fase di congelamento, rendendola per l'appunto la fase più critica dell'intero processo. Per questo motivo i cicli di congelamento e scongelamento (detti in inglese *freeze-thawing*) sono ampiamente utilizzati come strumento per definire protocolli di lavoro su di un determinato prodotto.

### **1.2.1. Basse temperature: denaturazione a freddo**

È ben noto che le proteine siano sensibili alle alte temperature (denaturazione a caldo); allo stesso modo lo sono verso le basse temperature. Questo fenomeno è chiamato denaturazione a freddo.

Ad una data temperatura, la differenza di energia libera di Gibbs tra lo stato nativo e quello denaturato è data dall'equazione (1):

$$\Delta G_D^0(T) = \Delta H_D^0 \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_p \left[ (T - T_m) - T \ln \left(\frac{T}{T_m}\right) \right] \quad (1.1)$$

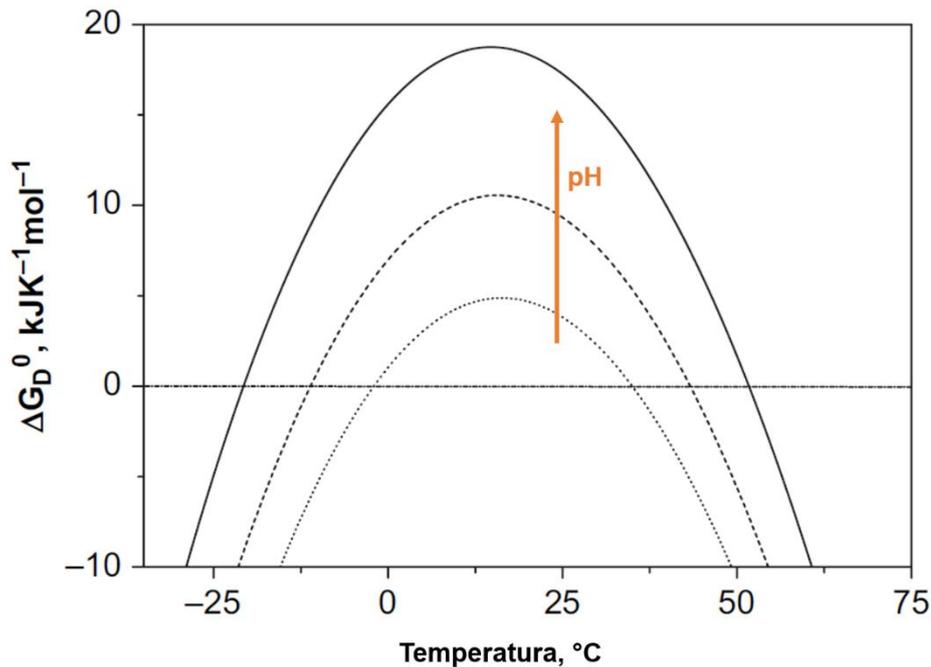
dove  $T_m$  è la temperatura media di denaturazione,  $\Delta H$  la variazione di entalpia e  $\Delta C_p$  la variazione di calore specifico.

Il  $\Delta G_D^0$  ha un andamento parabolico inverso con la temperatura, come mostrato in Figura 1.6, dove è rappresentato per l'enzima stafilococco nucleasi. Ciò significa che la sostanza diventa sempre meno stabile all'allontanarsi dal massimo della curva. Questo avviene sia spostandosi verso le alte che verso le basse temperature: il  $\Delta G_D^0$  diminuisce fino ad assumere valori negativi, i quali indicano che il processo di denaturazione è favorito su quello inverso.

La denaturazione a freddo è probabilmente dovuta ad un aumento della solubilità dei gruppi apolari quando la temperatura si abbassa, ed è anche influenzata dal pH della soluzione, come è possibile vedere in Figura 1.6.

Alcuni studi effettuati sulla denaturazione a freddo, ad ogni modo, suggeriscono che essa sia meno rilevante rispetto ad altri meccanismi di denaturazione presenti in un ciclo di liofilizzazione (come per esempio la formazione di ghiaccio e l'aumento della concentrazione). Questo accade poiché la temperatura alla quale avviene la denaturazione a freddo – spesso più bassa rispetto alle temperature tipiche di una liofilizzazione – viene ulteriormente abbassata da

fattori quali pH e presenza di additivi come gli zuccheri, che agiscono appunto come stabilizzanti (Bhatnagar et al., 2007).



**Figura 1.6** - Andamento dell'energia libera di Gibbs al variare della temperatura per diversi valori di pH per l'enzima stafilococco nucleasi. La linea continua si riferisce ad un pH pari a 7.0, quella tratteggiata ad un pH pari a 4.5, quella puntata ad un pH pari a 4.0. Figura tratta da (Bhatnagar et al., 2007) con modifiche.

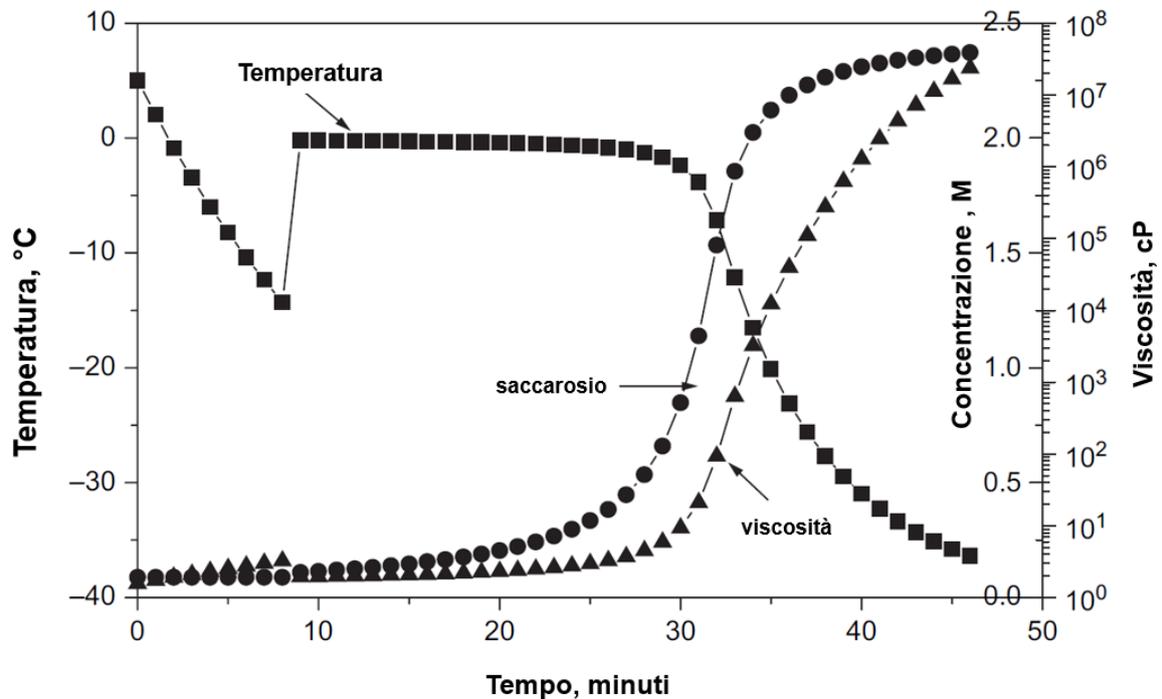
### 1.2.2. Crioconcentrazione

Durante il congelamento, la formazione di cristalli di ghiaccio porta ad un aumento della concentrazione di soluto nella fase liquida rimanente. Per questo motivo, alcune proprietà legate alla concentrazione possono variare notevolmente, come per esempio la viscosità e la forza ionica della soluzione. Questi cambiamenti possono potenzialmente destabilizzare la proteina (Wang, 2000).

In Figura 1.7, sono riportati i profili di temperatura, viscosità e concentrazione di una soluzione al 3% in saccarosio durante il congelamento.

Inizialmente, la soluzione viene sottoraffreddata fino a  $-15^{\circ}\text{C}$ , dove avviene la nucleazione e si osserva un repentino aumento della temperatura. Dopo di ciò, la temperatura rimane quasi costante siccome il calore sottratto alla formulazione è bilanciato dal calore rilasciato dalla cristallizzazione dell'acqua. In questa fase la concentrazione del saccarosio nella fase liquida aumenta, seguendo quello che è l'equilibrio di fase tra saccarosio ed acqua. Una volta finita la cristallizzazione, la temperatura decresce in modo repentino e la concentrazione di saccarosio aumenta ulteriormente. Questi due effetti portano ad un incremento della viscosità della soluzione concentrata che può arrivare ad essere anche sette ordini di grandezza maggiore rispetto alla viscosità della soluzione iniziale (Bhatnagar et al., 2007). Eventuali proteine presenti nella soluzione, così come qualsiasi altro soluto, sarebbero sottoposte ad un analogo incremento di concentrazione. Ciò potrebbe causare un aumento delle velocità delle reazioni in cui le proteine stesse sono coinvolte, come per esempio quelle di denaturazione, spostandone

l'equilibrio. La diminuzione della temperatura tenderebbe, secondo la legge di Arrhenius, a decelerare la reazione, ma l'aumento della concentrazione risulta talmente preponderante da renderne completamente trascurabile l'effetto (Pikal, 2004).



**Figura 1.7** - Profili di temperatura (curva con indicatori quadrati), viscosità (curva con indicatori triangolari) e concentrazione di saccarosio (curva con indicatori rotondi) in funzione del tempo durante il congelamento di una formulazione al 3% in saccarosio.

Figura tratta da (Bhatnagar et al., 2007) con modifiche.

### 1.2.3. Cristallizzazione del soluto

L'aumento di concentrazione durante il congelamento può portare ad un'ulteriore conseguenza: la cristallizzazione del soluto. Mentre il saccarosio, il trealosio e molte altre sostanze non cristallizzano durante il processo di liofilizzazione, altri eccipienti come mannitolo, glicina, cloruro di sodio e buffer fosfato possono cristallizzare durante la fase di congelamento se l'aumento di concentrazione fornisce un adeguato grado di sovrasaturazione (Pikal, 2004). Questo fenomeno impone uno stress aggiuntivo ad un'eventuale proteina presente in soluzione, ovvero la formazione di una superficie aggiuntiva su cui potrebbero verificarsi adsorbimento e denaturazione. La situazione peggiora se il soluto in questione è un buffer, in quanto ciò comporterebbe anche una variazione significativa di pH.

Allo stesso tempo, però, la presenza di soluti cristallini permette di eseguire l'essiccamento primario ad una temperatura che è nettamente superiore a quella di collasso delle sostanze amorfe, rendendolo notevolmente più veloce.

#### **1.2.4. Separazione di fase**

Un incremento della concentrazione di soluto può aumentare la possibilità di una separazione di fase nel liquido. Di conseguenza possono venire a crearsi due o più fasi amorfe durante il congelamento. Questo fenomeno è stato riportato per formulazioni contenenti sostanze come elettroliti, polimeri, polisaccaridi, tensioattivi o proteine (Bhatnagar et al., 2007). In queste condizioni la proteina può ripartirsi tra le diverse fasi; come conseguenza di ciò gran parte di essa può ritrovarsi priva di eventuali crioprotettori o stabilizzanti e quindi più vulnerabile a fattori di stress. Infatti, è stato osservato come l'emoglobina ricombinante liofilizzata in una formulazione contenente glicole polietilenico (PEG) e destrano mostri una perdita di struttura primaria proprio a causa della separazione tra le due fasi (Heller et al., 1997).

Il fenomeno risulterebbe influenzato sia dalla velocità di raffreddamento che dalla presenza di altre sostanze. Un incremento della denaturazione proteica sarebbe infatti collegato con una diminuzione della velocità di raffreddamento. Il mannitolo sembrerebbe minimizzare la separazione tra le fasi, mentre ciò non si osserva per saccarosio, trealosio e tensioattivi come il polisorbato 80. L'ottimizzazione delle formulazioni, accoppiata ad una accurata selezione delle condizioni di processo, permetterebbe quindi di minimizzare gli stress dovuti alla separazione di fase.

#### **1.2.5. Disidratazione**

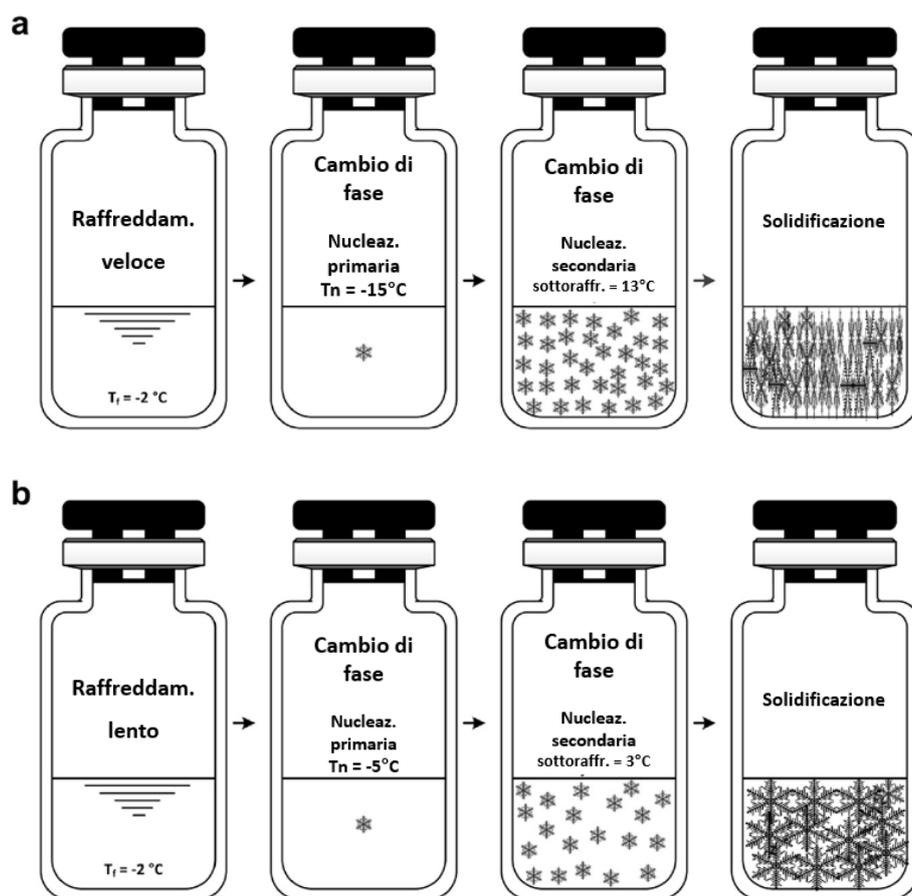
Le proteine in soluzione acquosa sono completamente idratate, ovvero possiedono uno strato di molecole di acqua che le ricopre e che stabilizza la loro struttura secondaria attraverso una rete di legami idrogeno. La quantità di acqua per avere completa idratazione è pari a circa 0.3-0.35 grammi per ogni grammo di proteina (Kuhlman et al., 1997; Rupley et al., 1991; Wang, 2000). L'umidità presente in un prodotto liofilizzato è solitamente inferiore al 10% rispetto alla massa di prodotto essiccato e, per forza di cose, questo monostrato di molecole di acqua viene a mancare. Ciò destabilizza la struttura secondaria e può portare a denaturazione la proteina. La presenza di eccipienti, tuttavia, annulla gli effetti della disidratazione secondo la teoria del "water replacement". Secondo questa teoria gli eccipienti andrebbero a sostituirsi alle molecole d'acqua nella formazione dei legami idrogeno con i gruppi polari sulla superficie della proteina, preservandone la struttura secondaria.

Inoltre, la disidratazione può causare anche aggregazione. Una proteina idratata, quando esposta ad un ambiente secco, può trasferire protoni ai gruppi carbossilici e di conseguenza annullare gran parte delle cariche presenti sulla propria superficie. Questo può facilitare l'interazione idrofobica con altre proteine, favorendone l'aggregazione (Wang, 2000).

#### **1.2.6. Formazione di interfaccia acqua-ghiaccio**

Durante il congelamento di una soluzione acquosa, viene a crearsi un'interfaccia tra i cristalli di ghiaccio e l'acqua non ancora congelata. Le proteine possono interagire con questa interfaccia, e queste interazioni possono promuoverne la denaturazione.

Generalmente velocità di raffreddamento elevate (*quench*) si traducono in aree superficiali di interfaccia acqua-ghiaccio elevate. Al contrario, raffreddamenti lenti portano ad avere meno cristalli, ma di dimensione maggiore (Figura 1.8).



**Figura 1.8** - Illustrazione del processo di congelamento, e degli effetti della velocità di raffreddamento. (a) congelamento con raffreddamento veloce e bassa temperatura di nucleazione. (b) congelamento con raffreddamento lento e temperatura di nucleazione maggiore. Figura tratta da (Assegehegn et al., 2019) con modifiche.

È stata dimostrata una correlazione tra velocità di raffreddamento e grado di denaturazione delle proteine: un singolo ciclo di congelamento in azoto liquido può portare ad una denaturazione maggiore rispetto ad 11 cicli eseguiti con un protocollo di congelamento lento (Chang et al., 1996). Appare così evidente che la maggiore area superficiale prodotta dal raffreddamento rapido genera stress maggiori alle proteine. La denaturazione legata all'interfaccia può risultare quindi uno dei maggiori fattori di stress durante il processo di liofilizzazione.

Oltre ad ottimizzare il protocollo di congelamento, esistono altri strumenti per prevenire questo meccanismo. L'aggiunta di sostanze tensioattive, ad esempio, riduce notevolmente l'effetto denaturante della superficie acqua-ghiaccio, in quanto esse impediscono stericamente l'avvicinamento delle proteine alle interfacce. I tensioattivi, sotto questo punto di vista, possono essere quindi utilizzati come crioprotettori.

### 1.2.7. Variazione di pH

Molte proteine sono stabili solo per piccoli intervalli di pH: valori troppo bassi o troppo elevati possono incrementare la repulsione elettrostatica tra le proteine o aumentare la velocità delle reazioni chimiche degradative, portando ad aggregazione e denaturazione.

Durante il congelamento alcune specie di buffer possono cristallizzare in maniera selettiva, causando anche notevoli variazioni di pH all'interno della formulazione. Per esempio, il buffer fosfato di sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) può passare da pH 7.5 a pH 4 durante il congelamento, a causa della cristallizzazione selettiva del  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Wang, 2000). Più bassa è la concentrazione del buffer, e meno importante sarà la variazione di pH (Pikal, 2004).

### 1.3. Il problema della formulazione di farmaci proteici

Come visto nel precedente paragrafo, durante un ciclo di liofilizzazione sono presenti molti fattori di stress che possono portare alla perdita dell'attività di una sostanza biologica. È quindi prassi nell'industria farmaceutica, oltre all'ottimizzazione dei parametri di processo, prevedere l'utilizzo di eccipienti in grado di stabilizzare le proteine e mitigare gli effetti deleteri della liofilizzazione. Questi possono proteggere una proteina durante il congelamento (crioprotettori) o durante la disidratazione (lioprotettori) (Wang, 2000). All'interno di una formulazione possono essere presenti più eccipienti, in quanto un crioprotettore potrebbe non essere efficace durante la fase di essiccamento, e viceversa.

Generalmente, i meccanismi di stabilizzazione concernenti le proteine vengono divisi in due categorie: "meccanismi termodinamici" e "meccanismi cinetici".

Una sostanza che agisce incrementando l'energia libera di denaturazione, cioè spostando l'equilibrio dalla conformazione denaturata a quella nativa, opera attraverso un meccanismo di stabilizzazione di tipo termodinamico. Le teorie del "soluto escluso" e del "water replacement", spesso usate per spiegare gli effetti stabilizzanti dei saccaridi durante l'essiccamento, sono esempi di meccanismi di stabilizzazione termodinamica (Pikal, 2004).

La teoria del soluto escluso, originariamente utilizzata per spiegare la stabilizzazione proteica principalmente durante il congelamento, afferma che i crioprotettori sono esclusi preferenzialmente dalla superficie della proteina, incrementandone l'energia libera di Gibbs (potenziale chimico) allo stato nativo. La denaturazione comporta un aumento della superficie di contatto tra proteina e solvente ed una maggiore esclusione preferenziale. Di conseguenza, l'energia libera aumenta maggiormente nello stato denaturato rispetto a quello nativo: il processo di denaturazione risulta quindi termodinamicamente sfavorito ( $\Delta G > 0$ ).

La teoria della sostituzione dell'acqua, o *water replacement*, è spesso utilizzata per descrivere la stabilizzazione di un prodotto disidratato. Anch'essa descrive la stabilizzazione da un punto di vista termodinamico. Si basa sul concetto che durante l'essiccamento i gruppi ossidrilici degli zuccheri formano legami idrogeno con la proteina, sostituendo quelli formati dall'acqua (Mensink et al., 2017). Attraverso questa sostituzione di legami idrogeno, la proteina è in grado di mantenere la sua conformazione nativa. Se ciò non avvenisse, oltre alla perdita della struttura secondaria e terziaria della proteina, la parte idrofobica (ripiegata verso l'interno) si esporrebbe verso l'esterno. In questa maniera essa si renderebbe disponibile ad interazioni idrofobiche con altre proteine e conseguente aggregazione, fenomeno irreversibile.

La teoria della vetrificazione, invece, fa parte dei meccanismi di tipo cinetico. Secondo questa teoria, la stabilità di una proteina è il risultato di una diluizione all'interno di un rigido ed inerte solido vetroso (Chang et al., 2009). La diluizione separa e distanzia le proteine, mentre la matrice solida ne previene il movimento. Siccome la denaturazione è un processo che richiede mobilità molecolare, esso viene fermato dalla vetrificazione, indipendentemente dal fatto che sia termodinamicamente favorito o meno. Per questo motivo questo meccanismo risulta essere

di tipo cinetico. Buoni stabilizzanti sono quindi quelli in grado di formare un solido vetroso. Alcuni zuccheri, come il saccarosio, in grado di formare un solido amorfo, afferiscono quindi a questo meccanismo. Una volta scesi al di sotto della temperatura di transizione vetrosa, la viscosità della soluzione risulta talmente elevata da essere considerata un solido, e questo impedisce la mobilità delle proteine al suo interno.

### 1.3.1. Zuccheri e polioli

È stato dimostrato come sostanze quali zuccheri e polioli possano essere aggiunte ad una formulazione al fine di proteggere le proteine dalla denaturazione durante il processo di liofilizzazione. Essi risultano essere sia ottimi crioprotettori che lioprotettori, ed agiscono secondo gli stessi meccanismi in quanto possiedono gli stessi gruppi funzionali (ossidrili). Il livello di stabilizzazione raggiungibile con queste sostanze dipende dalla loro concentrazione. Una concentrazione pari a 0.3 M è suggerita come quella minima per ottenere una stabilizzazione significativa (Arakawa et al., 2001). Nella maggior parte dei casi, gli stabilizzanti più efficaci tra zuccheri e polioli risultano essere i disaccaridi (Carpenter et al., 1997; Wang, 2000). In particolare, saccarosio e trealosio sono i più utilizzati in quanto possiedono temperature di transizione più elevate. Il trealosio sembra essere un miglior lioprotettore per le biomolecole rispetto al saccarosio, in quanto possiede una più alta temperatura di transizione vetrosa (Crowe, 1992; Crowe et al., 1996).

I più comuni zuccheri e polioli utilizzati come eccipienti nell'industria farmaceutica sono riportati in Tabella 1.1, assieme alle loro temperature di transizione vetrosa e di collasso.

**Tabella 1.1** – Principali saccaridi utilizzati nella liofilizzazione di proteine

(Liu et al., 2015).

Tipo	Nome	Formula	PM (g/mol)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)		
<i>Monosaccaridi</i>	Glucosio	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180.16	-43	-41		
	Galattosio			-41			
	Mannosio			-41			
	Fruttosio			-42			
	Ribosio			C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>		150.13	-47
	Xilosio						-48
<i>Oligosaccaridi</i>	Saccarosio	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342.30	-32	-31		
	Lattosio					30.5	
	Maltosio monoidrato	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O	360.32	-30			
	Trealosio diidrato	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·2H <sub>2</sub> O	378.34		-29		
	Raffinosio pentaidrato	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub> ·5H <sub>2</sub> O	594.53		-26		

<i>Polisaccaridi</i>	Mannitolo	$C_6 H_{14} O_6$	182.17	-27	
	Glicerolo	$C_3 H_8 O_3$	92.09	-65	
	Sorbitolo	$C_6 H_{14} O_6$	182.17	-44	-54
	Xilitolo	$C_5 H_{12} O_5$	152.15	-47	
	Inositolo	$C_6 H_{12} O_6$	180.16		

---

### **1.3.2. Polimeri**

I polimeri sono utilizzati come stabilizzanti principalmente poiché possono aumentare la temperatura di transizione vetrosa della soluzione. Possono inoltre agire producendo ingombro sterico, impedendo le interazioni tra le proteine, limitando la cristallizzazione degli eccipienti presenti in soluzione (per esempio il mannitolo) (Barresi et al., 2009), mantenendo stabile il pH ed incrementando la viscosità della soluzione (Liu et al., 2015).

I polimeri utilizzati da soli possono però risultare deleteri in quanto favoriscono fenomeni di separazione di fase e non sempre garantiscono una efficace funzione di water replacement. Per questo motivo sono spesso utilizzati insieme agli zuccheri, per ottenere una migliore stabilizzazione. Uno dei polimeri maggiormente utilizzati nello sviluppo di formulazioni farmaceutiche è il destrano (Wang, 2000).

### **1.3.3. Proteine**

Generalmente l'aggregazione delle proteine in soluzione è dipendente dalla loro concentrazione. Un incremento di quest'ultima all'interno di un determinato intervallo porta ad un aumento dell'aggregazione. Superato un certo valore, però, le proteine sembrerebbero essere più resistenti agli stress indotti dal congelamento e dall'essiccamento. (Wang, 2000). Non è ancora chiaro quali siano i meccanismi che portano a questa auto-stabilizzazione. Le proteine sono dei polimeri, ed in quanto tali potrebbero afferire ad alcuni dei meccanismi citati nel paragrafo precedente. Negli anni sono stati proposti vari meccanismi utili a spiegare questo fenomeno. Una prima ipotesi è quella che vede la denaturazione, sotto forma di spiegamento della struttura secondaria, inibita ad alte concentrazioni per via della repulsione sterica prodotta dalle proteine vicine. Un'altra ipotesi invece si basa sul fatto che la superficie dell'interfaccia tra acqua e ghiaccio ha una estensione finita, e di conseguenza la quantità di proteine che vi si può adsorbire, e denaturarsi, è limitata (Wang, 2000).

### **1.3.4. Tensioattivi**

L'adsorbimento delle proteine all'interfaccia acqua-ghiaccio risulta essere uno dei meccanismi principali di denaturazione durante il congelamento. Una caratteristica dei tensioattivi è quella di potersi posizionare all'interfaccia tra due fasi: acqua-olio, acqua-aria o acqua-ghiaccio che sia. In questo modo essi impediscono alla proteina stessa di adsorbirsi, eliminando, o comunque inibendo, questo tipo di stress.

Il Tween 80 è uno dei principali tensioattivi utilizzati come stabilizzante. È stato dimostrato come una concentrazione maggiore dello 0.01% di Tween 80 protegga gli enzimi LDH (lattato deidrogenasi) e GDH (glutammato deidrogenasi) dalla denaturazione durante cicli di

congelamento e scongelamento (Chang et al., 1996). Una lista dei tensioattivi più diffusi è comunque fornita in Tabella 1.2.

**Tabella 1.2 - Principali tensioattivi utilizzati nella liofilizzazione di proteine**  
(Liu et al., 2015).

Nome	Formula bruta	PM (g/mol)	CMC
Tween 80	$C_{64}H_{124}O_{26}$	1310	13-15 mg/l
Triton X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ , $n=9-10$	~625	0.22-0.24 mM
Monoesteri del saccarosio	$C_{12}H_{22}O_{11}-(OH)_7-$ OCOR		
CHAPS (tensioattivo zwitterionico)	$C_{32}H_{58}N_2O_7S$	614.88	8-10 mM
Idrossipropil- $\beta$ -ciclodestrine	$C_{63}H_{112}O_{42}$	1541.5	5% (w/w)
Sodio dodecilsolfato (SDS)	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	288.372	8.2 mM
Brij 35	$C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$ , $n\sim 23$	1199.54	0.09 mM
Lubrol-px	$C_{14}H_{30}O_2$		0.16 mM
Pluronic F127	$C_3H_3O[C_2H_4O]_x[C_3H_6O]_y[C_2H_4O]_zC_3H_3O_2$	12500 (medio)	0.8% (w/w)

## 1.4. Obiettivo della tesi

Tra gli innumerevoli prodotti dell'industria farmaceutica, ve ne sono alcuni molto difficili da trattare per via della loro instabilità e/o sensibilità a fattori esterni, come per esempio i biofarmaci. Per prodotti di questo tipo, il processo di liofilizzazione risulta estremamente delicato, e l'ottimizzazione dei parametri ancor più cruciale. Siccome alcuni di questi principi attivi risultano anche estremamente costosi, è utile sviluppare un modello capace di predire gli effetti del protocollo di processo sugli attributi critici del prodotto.

L'obiettivo di questa tesi è quindi quello di studiare sperimentalmente le conseguenze della liofilizzazione su una classe di prodotti particolarmente instabili con particolare riferimento alla fase di congelamento. A questo scopo, si userà una molecola modello, la mioglobina (Mb), e la si studierà in condizioni di elevata instabilità (pH 3.7).

Ci si propone in particolare di valutare gli effetti di alcuni parametri del processo sulla preservazione dell'attività terapeutica, di derivare e convalidare un modello teorico che sia capace di predire la denaturazione proteica durante il congelamento e di crearne uno per lo scongelamento. Lo studio mira a concentrarsi principalmente sugli effetti del congelamento e dello scongelamento, in quanto è noto come essi siano le fasi di maggiore criticità per una proteina, ma sono stati eseguiti anche cicli di liofilizzazione completa.

L'approccio utilizzato sarà del tipo Quality by Design. In particolare, si costruiranno dei grafici del tipo Design Space per visualizzare graficamente l'effetto dei parametri di processo considerati.

# CAPITOLO II

## 2. Metodi teorici

Quando si tratta di sviluppare un protocollo di liofilizzazione per un nuovo principio attivo esistono regole di base per l'ottimizzazione del processo, ma queste vanno adattate al caso specifico considerato, in quanto ogni sostanza è diversa dalle altre. In questo contesto, i cicli di congelamento e scongelamento sono spesso usati come strumento per indagare l'effetto combinato di diversi stress su di una proteina. Questo è molto importante per definire un protocollo ed una formulazione ottimali per un determinato prodotto.

Negli anni molti studi hanno cercato di capire a fondo tutti i meccanismi di denaturazione proteica durante la liofilizzazione ed hanno provato a tracciare delle linee guida sulla preparazione delle formulazioni. Nonostante questo, l'approccio è sempre stato di tipo empirico.

Negli ultimi anni, tuttavia, si è visto un cambiamento verso un approccio razionale alla formulazione ed al design di processi per la liofilizzazione di proteine. La motivazione è semplice: un'ottimizzazione più efficace velocizza la fase di sviluppo di nuovi prodotti farmaceutici, rendendola inoltre meno costosa (Bhatnagar et al., 2007).

In questo capitolo è presentato un esempio di questo tipo di approccio, che ha come obiettivo simulare il comportamento di una proteina durante le fasi di congelamento e scongelamento, notoriamente le più critiche.

### 2.1. Modellazione dei profili termici durante le fasi di congelamento/scongelamento

Durante le simulazioni si è considerato un tipico processo farmaceutico di liofilizzazione, dove la formulazione è inserita all'interno di flaconi e caricata nella camera di un liofilizzatore. Si è considerato un modello monodimensionale semplificato, in cui il tempo è l'unica variabile indipendente.

#### 2.1.1. Congelamento

La fase di congelamento è stata modellata al fine di ricavare i profili termici all'interno del prodotto. La fase di raffreddamento, del liquido prima della nucleazione, o del solido al termine dell'accrescimento, può essere descritta da:

$$mc_p \frac{dT}{dt} = K_v A (T_{shelf} - T) \quad (2.1)$$

dove  $c_p$  è il calore specifico,  $K_v$  è il coefficiente di scambio globale tra il prodotto e la camera del liofilizzatore,  $m$  è la massa di campione,  $A$  è la superficie del flacone a contatto con il ripiano e  $T_{shelf}$  è la temperatura del ripiano. La  $T_{shelf}$  viene fatta variare linearmente durante il congelamento, da 293 a 233 K.

Alla nucleazione si assume che la temperatura del prodotto si porti al valore di equilibrio termodinamico. Successivamente, nella fase di accrescimento dei cristalli, la (2.1) si modifica in

$$mc_p \frac{dT}{dt} = K_v A (T_{shelf} - T) + \dot{Q}_c \quad (2.2)$$

dove  $\dot{Q}_c$  è un termine di generazione corrispondente al calore generato durante l'accrescimento dei cristalli.

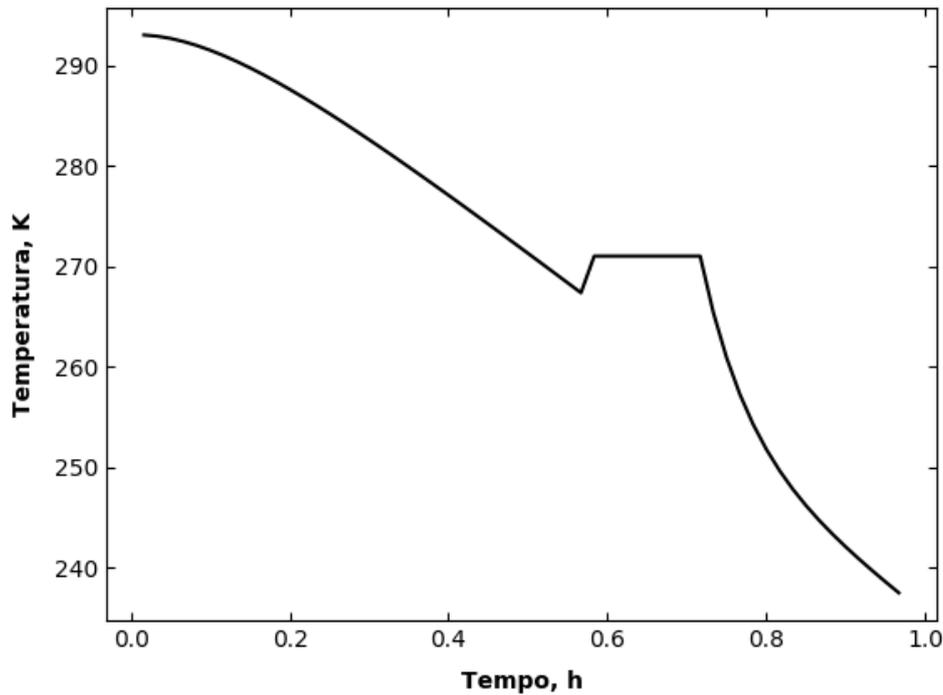
Il termine  $\dot{Q}_c$  può essere espresso come

$$\dot{Q}_c = \Delta H_f \frac{d(mX_{ice})}{dt} = -\Delta H_f m \frac{\Delta X_{ice}}{\Delta T} \frac{dT}{dt} \quad (2.3)$$

dove  $X_{ice}$  è la frazione in massa di ghiaccio e  $\Delta H_f$  il calore latente di cristallizzazione. Scrivendo questa equazione, si assume che la variazione nella frazione di ghiaccio sia lineare con il variare della temperatura (Pisano et al., 2017).

Come si può intuire, la temperatura di nucleazione risulta essere un parametro fondamentale richiesto come input, assieme alla velocità di raffreddamento (Nakagawa et al., 2007).

Un esempio di profilo termico calcolato durante il congelamento è riportato in Figura 2.1.



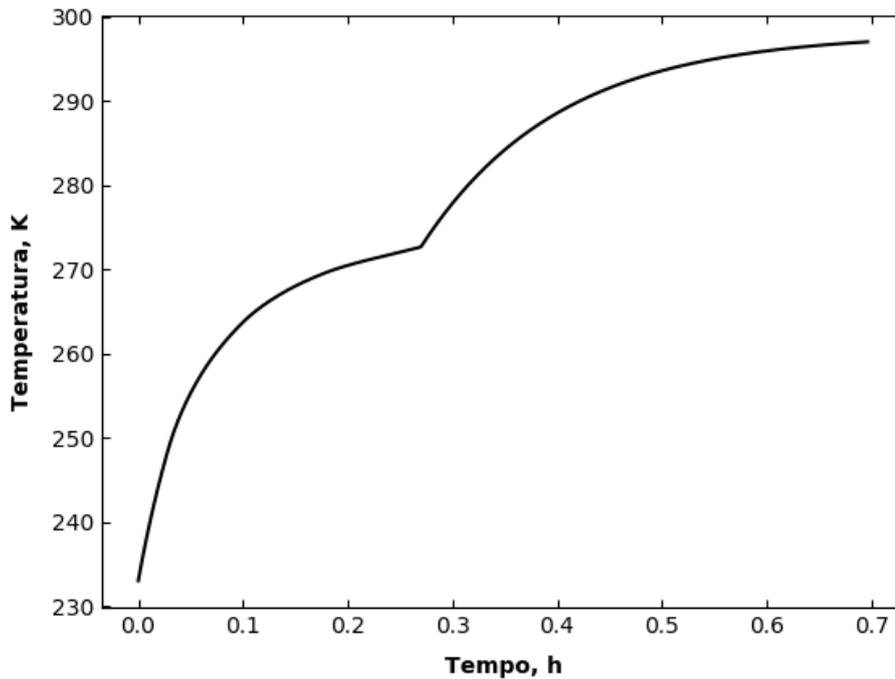
**Figura 2.1** - Profilo termico calcolato implementando il modello sopracitato in Matlab. Per questa simulazione è stata utilizzata una temperatura di nucleazione pari a 268 K ed una velocità di raffreddamento pari a 1 K/min.

### 2.1.2. Scongelamento

Durante la fase di scongelamento non sono presenti periodi di metastabilità, e la temperatura del prodotto segue un andamento monotono. Di conseguenza, è possibile scrivere un'unica equazione valida per tutto il processo,

$$m c_p \frac{dT}{dt} = K_v A (T_{ext} - T) - \Delta H_f m \frac{\Delta X_{ice}}{\Delta T} \frac{dT}{dt} \quad (2.4)$$

nella quale  $T_{ext}$  è la temperatura dell'ambiente in cui si trova il prodotto. Sono state considerate una temperatura di partenza dello scongelamento pari a 233 K, ed una temperatura esterna di 293 K. L'equazione (2.4) viene così integrata numericamente al fine di ottenere il profilo termico del prodotto. In Figura 2.2 è riportato un esempio di profilo termico calcolato durante lo scongelamento.



**Figura 2.2** - Profilo termico per uno scongelamento in aria a temperatura ambiente ottenuto implementando il modello sopracitato in Matlab.

## 2.2. Calcolo della dimensione dei cristalli di ghiaccio

Nel caso del congelamento, è anche necessario calcolare la dimensione dei cristalli di ghiaccio formatisi. La procedura, tratta da (Arsiccio et al., 2018), è composta di diversi step di seguito riassunti:

1. L'altezza del campione viene discretizzata in  $n$  strati aventi altezza  $\Delta z$  ed indentificati dall'indice  $i = 1, 2, 3 \dots n$ .
2. Il diametro medio dei cristalli di ghiaccio  $d_{p,i}$  dello strato  $i$ -esimo viene ipotizzato.
3. Il numero di cristalli di ghiaccio  $N_i$  dello strato  $i$ -esimo viene calcolato attraverso l'equazione:

$$\varepsilon \frac{\pi D^2}{4} = N_i \frac{\pi d_{p,i}^2}{4} \tau \quad (2.5)$$

nella quale  $D$  è il diametro del flacone contenente il campione,  $\tau$  è la tortuosità e  $\varepsilon$  è il rapporto tra il volume di ghiaccio ed il volume totale del sistema;

4. Noti  $N_p$  e  $d_{p,i}$  si calcola il calore generato dalla cristallizzazione  $Q_v$

$$Q_v = \Delta H_f N_i \frac{\pi d_{p,i}^2}{4} \rho_{ice} \tau \Delta z \quad (2.6)$$

dove  $\rho_{ice}$  è la densità del ghiaccio.

È possibile anche valutare la variazione di entalpia legata alla generazione di nuova interfaccia ghiaccio-soluzione attraverso la relazione:

$$Q_s = \Delta H_f N_i \pi d_{p,i} \gamma a_{s,i} \tau \Delta z \quad (2.7)$$

dove  $\gamma$  è la tensione interfacciale tra il ghiaccio e la soluzione concentrata,  $a_{s,i}$  è il rapporto tra la superficie reale dei cristalli e quella fittizia calcolata considerando i cristalli come dei cilindri di altezza  $\Delta z$ .

$$a_{s,i} = \frac{\text{area reale superficie cristalli}}{N_i \pi d_{p,i} \tau \Delta z} \quad (2.8)$$

Il valore di  $\gamma$  può essere stimato attraverso fitting dei dati sperimentali. In questo lavoro, è stato utilizzato il valore riportato in letteratura (Arsiccio et al., 2017).

5. L'intervallo di tempo  $\Delta t_i$  richiesto per avere un avanzamento del fronte di sublimazione di  $\Delta z$  viene calcolato attraverso la seguente equazione di bilancio di energia

$$Q_v - Q_s = K_{v,e} (T_{eq} - \bar{T}_{shelf}) A \Delta t_i \quad (2.9)$$

dove  $\bar{T}_{shelf}$  è la temperatura media del liofilizzatore durante l'intervallo di tempo  $\Delta t_i$ .  $K_{v,e}$  viene ricavato a partire dal coefficiente di scambio tra la base del flacone ed il ripiano  $K_v$

$$K_{v,e} = \frac{1}{\frac{1}{K_v} + \frac{i \Delta z}{k}} \quad (2.10)$$

dove  $k$  è la conducibilità termica della zona congelata.

6. Calcolo della velocità di congelamento  $v_i$

$$v_i = \frac{\Delta z}{\Delta t_i} \quad (2.11)$$

7. Calcolo del gradiente termico nella zona congelata  $\theta_i$ , imponendo la seguente equivalenza

$$k\theta_i = K_{v,e}(T_{eq} - \bar{T}_{shell}) \quad (2.12)$$

8. Calcolo di  $d_{p,i}$  utilizzando l'equazione presente in (Arsiccio et al., 2017) che è valida per soluzioni diluite:

$$d_{p,i} \approx \frac{4\varepsilon\gamma a_{s,i}v_i}{\varepsilon\rho\Delta H_f v_i - k\theta_i} \quad (2.13)$$

9. Il valore di  $d_{p,i}$  appena calcolato viene utilizzato come stima iniziale al punto 2 durante la successiva iterazione. Si ripetono quindi i punti 2-8 fino a quando la differenza tra i due valori di  $d_{p,i}$  (quello ipotizzato al punto 2 e quello calcolato al punto 8) è inferiore ad un valore di tolleranza preimpostato.
10. A questo punto si ripetono i punti dal 2 al 9 per ogni valore di  $i$ , ottenendo così una distribuzione di dimensione di cristalli di ghiaccio lungo l'asse verticale. Questo permette di calcolare un valore medio all'interno di tutto il campione:

$$d_p = \frac{\sum_{i=1}^n d_{p,i}}{n} \quad (2.14)$$

### 2.3. Modello cinetico reversibile

È stato considerato un modello riguardante un principio attivo proteico, nel quale viene ipotizzato un processo di denaturazione *a due stadi*, ovvero l'esistenza di due sole conformazioni proteiche: stato nativo (N) e stato denaturato (U).

In un processo a due stadi, la frazione molare di proteina nello stato denaturato, all'equilibrio termodinamico, può essere espressa nel seguente modo,

$$f_u = \frac{[U]}{[N] + [U]} = \frac{K}{1 + K} \quad (2.15)$$

dove la costante di equilibrio dipende dalla variazione di energia libera di unfolding  $\Delta G$  secondo l'equazione:

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (2.16)$$

dove  $R$  è la costante universale dei gas e  $T$  è la temperatura assoluta.

La variazione di energia libera dipende dalla temperatura e dalla concentrazione  $c_e$  di eccipiente, in accordo con l'equazione (2.17).

$$\Delta G = \Delta H_0 - T\Delta S_0 + \Delta c_p[T - T_0 - T \ln T/T_0] + m'c_e \quad (2.17)$$

$\Delta H_0$ ,  $\Delta S_0$  e  $\Delta C_p$  sono le variazioni rispettivamente di entalpia, entropia e calore specifico durante il processo di denaturazione, ad una temperatura di riferimento  $T_0$ . Il valore del coefficiente  $m'$  dipende dall'eccipiente preso in considerazione.

Solitamente, l'equilibrio termodinamico non viene raggiunto. Conviene quindi utilizzare un approccio di tipo cinetico.

Per un processo a due stadi reversibile è possibile scrivere quindi il seguente sistema di equazioni:

$$\frac{d[U]}{dt} = -k_f[U] + k_u[N] \quad (2.18)$$

$$\frac{d[N]}{dt} = +k_f[U] - k_u[N] \quad (2.19)$$

nel quale  $k_f$  e  $k_u$  sono le costanti cinetiche rispettivamente delle reazioni di *folding* e di *unfolding*. Esse dipendono dalla viscosità della soluzione e dalla temperatura, come mostrato nelle equazioni (2.20) e (2.21).

$$k_f(T, c, \mu) = A_f \frac{\mu_0}{\mu_s + \mu_i} e^{-\frac{\Delta G^{U-TS}}{RT}} \quad (2.20)$$

$$k_u(T, c, \mu) = A_u \frac{\mu_0}{\mu_s + \mu_i} e^{-\frac{\Delta G^{N-TS}}{RT}} \quad (2.21)$$

$A_f$  è una costante,  $\mu_0$  è la viscosità ad una data condizione di riferimento,  $\mu_s$  è la viscosità del solvente e  $\mu_i$  è la viscosità interna della proteina (Plaxco et al., 1998).

Si è scelto di descrivere la dinamica conformazionale in una soluzione viscosa attraverso la teoria di Kramer, dove il contributo dato dall'attrito interno alla proteina viene considerato trascurabile (Ansari et al., 1992; Haas et al., 1978; Kleinert et al., 1998; Plaxco et al., 1998).

Nella teoria di Kramer si tiene conto sia della viscosità relativa al solvente  $\mu_s$ , che di quella interna alla proteina  $\mu_i$ . In questo lavoro,  $\mu_i$  viene trascurato. Questa assunzione è giustificata nel caso di un processo di congelamento/scongelo, dove la frizione con il solvente è quella dominante a causa degli elevati valori di viscosità raggiunti per via dell'aumento di concentrazione.

La variazione di energia libera associata al passaggio dallo stato nativo o denaturato allo stato di transizione (TS), è dato da:

$$\Delta G^{X-TS}(T, c_e) = \Delta H_0^{X-TS} - T\Delta S_0^{X-TS} + \Delta c_p^{X-TS}[T - T_0 - T \ln T/T_0] + m^{X-TS}c_e \quad (2.22)$$

con  $X = N, U$ . In un processo a due stadi abbiamo anche che  $\Delta G = \Delta G^{N-TS} - \Delta G^{U-TS}$ .

In questo lavoro sono stati utilizzati valori verosimili per tutti i parametri che descrivono la stabilità proteica (come  $\Delta H_0$ ,  $\Delta S_0$  e  $\Delta C_p$ ), ma di carattere generale, ovvero senza fare riferimento ad una specifica proteina. Questi parametri sono inoltre stati fatti variare tra le varie simulazioni allo scopo di simulare più situazioni di stabilità proteica. I risultati ottenuti, di conseguenza, hanno validità di carattere generale e possono dare una descrizione qualitativa di ciò che avviene durante il congelamento/scongelo di una formulazione proteica.

## 2.4. Calcolo del design space

Durante le simulazioni della fase di congelamento, la temperatura all'interno della camera del liofilizzatore  $T_{shelf}$  viene fatta decrescere linearmente da 293 a 233 K, utilizzando 8 differenti velocità di raffreddamento comprese tra 0.1 e 1 K min<sup>-1</sup>. Viene inoltre fatta variare anche la temperatura di nucleazione nel range 248-265 K, di nuovo selezionando 8 valori intermedi. In questo modo è stato possibile creare una matrice 8x8 dove ad ogni punto della stessa corrisponde una coppia di valori di  $T_n$  e velocità di raffreddamento (Arsiccio & Pisano, 2018a). Per ogni punto della matrice è stata poi eseguita la seguente procedura di calcolo:

1. Inizializzazione di tutti i parametri alla condizione iniziale;
2. Calcolo della temperatura del prodotto risolvendo l'equazione (2.3);
3. Calcolo della concentrazione di eccipiente in funzione della temperatura  $c(T)$ ;
4. Calcolo della viscosità  $\mu(T, c)$  della soluzione non congelata, la quale è funzione sia della temperatura che della concentrazione dell'eccipiente. È stato fatto uso dell'equazione di Arrhenius:

$$\log_{10} \frac{\mu}{\mu_0} = a + b \left( \frac{T_g}{T} \right) + c \left( \frac{T_g}{T} \right)^2 \quad (2.23)$$

dove  $T_g$  è la temperatura di transizione vetrosa della soluzione crioconcentrata, ed  $a, b$  e  $c$  sono coefficienti relativi all'eccipiente utilizzato. In Figura 2.4 si riportano a titolo di esempio gli andamenti di concentrazione di eccipiente e di viscosità della soluzione.

5. Calcolo del  $\Delta G(T, c)$ , funzione sia della temperatura che della concentrazione di eccipiente, attraverso l'equazione (2.17);
6. Calcolo delle costanti cinetiche  $k_f(T, c, \mu)$  e  $k_u(T, c, \mu)$  attraverso le (2.20) e (2.21), assumendo che:

$$\Delta G^{N-TS} = 1.5\Delta G(T, c) \quad (2.24)$$

$$\Delta G^{U-TS} = 0.5\Delta G(T, c) \quad (2.25)$$

7. Calcolo della dimensione media dei cristalli di ghiaccio  $d_p$  attraverso l'utilizzo di un modello meccanicistico proposto da (Arsiccio et al., 2017), e descritto nel paragrafo 2.2;
8. Attraverso il valore di  $d_p$ , calcolo dell'area di interfaccia acqua-ghiaccio, assumendo come ipotesi che i cristalli di ghiaccio siano di forma cilindrica

$$S = \frac{4m_w}{d_p \rho_{ice}} \quad (2.26)$$

Nella (2.23)  $m_w$  è la massa di acqua presente inizialmente all'interno della formulazione.

9. Calcolo dei valori di  $U$  e  $N$ , attraverso l'integrazione delle equazioni cinetiche (2.18) e (2.19).
10. Calcolo del contributo alla denaturazione fornito dall'interfaccia acqua-ghiaccio. Dall'equazione (2.23) viene ricavato il valore di superficie di interfaccia  $S$  alla fine del congelamento, mentre il suo valore "istantaneo" viene calcolato attraverso la formula:

$$S_i(t) = S \frac{c_{w,cryo}}{c_w(t)} \quad (2.27)$$

nella quale  $c_{w,cryo}$  è la frazione in massa di acqua nella soluzione massimamente crioconcentrata, mentre  $c_w(t)$  è il suo valore corrente. In Figura 2.5 si riportano a titolo di esempio gli andamenti di area interfacciale e percentuale di molecole di proteina adsorbite all'interfaccia. A questo punto è possibile calcolare la percentuale di proteina

che si denatura all'interfaccia, assumendo che ciò avvenga quando essa si trova ad una distanza  $d_i$  inferiore a 4 nm dalla superficie. È stato scelto questo valore come soglia in base ai risultati ottenuti da (Arsiccio et al., 2018) attraverso simulazioni di dinamica molecolare effettuate sul peptide GB1. In queste simulazioni è stato osservato come la molecola in questione non si adsorba direttamente all'interfaccia, ma si posizioni ad una certa distanza da essa (4nm), mostrando una denaturazione parziale a lungo raggio. Per ricavare il numero di molecole di proteina  $n_p$  adsorbite (aventi massa molecolare  $M_p$  e volume molare  $V_p$ ) viene risolto il seguente sistema di due equazioni:

$$n_w M_w = c_w (n_w M_w + n_p M_p + n_s M_s) \quad (2.28)$$

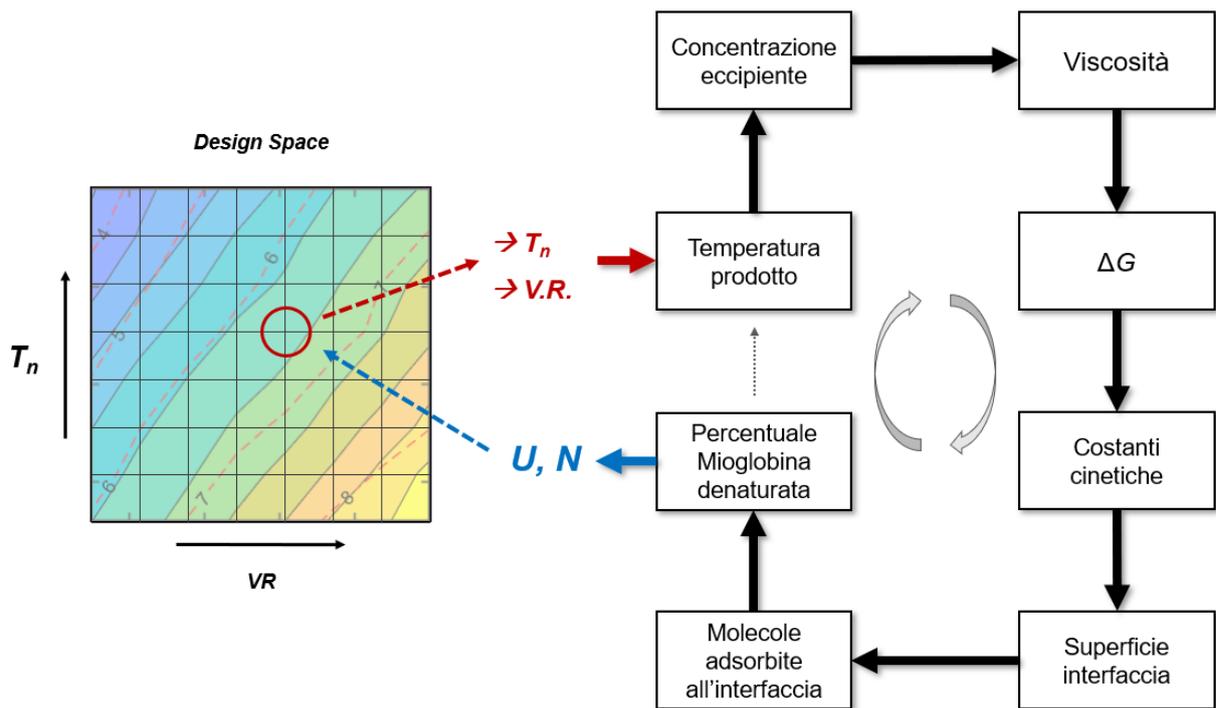
$$S_i d_i = V_w n_w + V_p n_p + V_s n_s \quad (2.29)$$

nel quale  $n_s$  e  $n_w$  sono il numero di molecole adsorbite rispettivamente di saccarosio e acqua, mentre  $M_w$ ,  $M_s$  e  $V_w$ ,  $V_s$  sono i loro pesi molecolari e volumi molari. Viene assunto che il rapporto tra molecole di saccarosio e di proteina  $n_s/n_p$  sia uguale a quello in bulk, e cioè pari a 150.

Al termine della procedura, iterata tra il punto 2 al punto 10 con una discretizzazione temporale  $\Delta t$  di 0.1 secondi, viene quindi ottenuto il valore di  $U$  a fine congelamento. Si ottengono allora 64 valori di percentuale di denaturazione proteica che vanno a comporre la matrice del design space.

Per le simulazioni dello scongelamento si assume che il prodotto si trovi in un ambiente alla temperatura  $T_{ext} = 293$  K, mentre il coefficiente di scambio  $K_v$  viene fatto variare nel range 5-60  $W m^{-2} K^{-1}$ . Il secondo parametro utilizzato per la costruzione del design space è l'area della superficie acqua-ghiaccio. Di questa variabile vengono presi 8 valori ricavati dalle simulazioni del congelamento effettuate a 8 diverse velocità di raffreddamento, tra 0.1 e 1  $K min^{-1}$ , mantenendo una temperatura di nucleazione fissa a 263 K.

In Figura 2.3 è riportato un diagramma di flusso che riassume il procedimento iterativo per il calcolo del design space. Per ognuno dei 64 punti della matrice, data una coppia di valori di valori di  $T_n$  e velocità di raffreddamento (V.R.), viene ricavata la percentuale di proteina denaturata alla fine del congelamento. Questa percentuale tiene conto sia del contributo di denaturazione in bulk, ricavato tramite la valutazione delle costanti cinetiche, sia del contributo di denaturazione all'interfaccia. L'algoritmo viene ripetuto in loop fino al termine del processo, e ad ogni iterazione vengono aggiornati tutti i valori.



**Figura 2.3** - Rappresentazione semplificata dell'algoritmo utilizzato per il calcolo della denaturazione proteica e per la costruzione del design space.

## 2.5. Modello cinetico irreversibile

È stato considerato anche un modello cinetico di tipo irreversibile. Il procedimento è analogo al caso reversibile riportato nel paragrafo 2.3, ma nelle equazioni (2.18) e (2.19) scompaiono i termini relativi al *refolding* della proteina, ed il sistema di equazioni da risolvere rimane:

$$\frac{d[U]}{dt} = +k_u[N] \quad (2.30)$$

$$\frac{d[N]}{dt} = -k_u[N] \quad (2.31)$$

La condizione di irreversibilità corrisponde, ad esempio, alla situazione in cui le proteine aggregano una volta persa la struttura secondaria. In questo caso formano aggregati che si separano dalla soluzione per precipitazione e, quindi, non hanno più la possibilità di ritornare allo stato nativo.

## 2.6. Caso di studio e programmazione delle simulazioni

Il campione considerato per le simulazioni contiene Mioglobina e saccarosio al 5% in peso, con un rapporto molare di 150 a 1 con la proteina. In Tabella 2.1 sono riportati i valori dei parametri utilizzati per le diverse simulazioni. Sono stati considerati diversi valori di  $\Delta H_0$ ,  $A_f$  ed  $m'$ , a seconda della condizione di stabilità che si intendeva simulare. Per il  $\Delta S_0$ ,  $\Delta C_p$  e  $T_0$  sono stati utilizzati valori pari a  $0.2 \text{ kJ kmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $3 \text{ kJ kmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  e  $295 \text{ K}$ . Il fattore pre-esponenziale  $A_f$  presente nelle equazioni (2.20) e (2.21) è stato anch'esso fatto variare da simulazione a simulazione. L'intento è stato quello di descrivere 4 differenti situazioni:

- Scenario 1: proteina stabile, meccanismo di denaturazione reversibile;
- Scenario 2: proteina instabile, meccanismo di denaturazione reversibile;
- Scenario 3: proteina stabile, meccanismo di denaturazione irreversibile;
- Scenario 4: proteina instabile, meccanismo di denaturazione irreversibile.

*Tabella 2.1 - Riepilogo delle simulazioni effettuate, con i parametri utilizzati per ciascuna di esse.*

Simulazione	$\Delta H_0$ (kJ/mol)	$m'$ (kJ/mol/M)	$A_f$ (1/s)	Reversibile	Stabilità
<i>Congelamento</i>					
1	80	4	200	sì	stabile
2	60	1	200	sì	instabile
3	90	4	20	no	stabile
4	70	4	20	no	instabile
<i>Scongelamento</i>					
1	80	4	200	sì	stabile
2	60	1	200	sì	instabile
3	90	4	20	no	stabile
4	70	4	20	no	instabile

Per quanto riguarda l'eccipiente, è stato considerato il saccarosio. I parametri riguardanti questo saccaride, e necessari per il calcolo di alcune proprietà della soluzione, sono riportati nelle tabelle 2.2 e 2.3. Per il calcolo della viscosità della soluzione (punto 4 della procedura descritta nel paragrafo 2.4), sono stati utilizzati i coefficienti  $a$ ,  $b$  e  $c$  ricavati da (Longinotti et al., 2008) validi per il saccarosio, e riportati in Tabella 2.2.

**Tabella 2.2** - Valori dei parametri *a*, *b* e *c* utilizzati per il calcolo della viscosità.

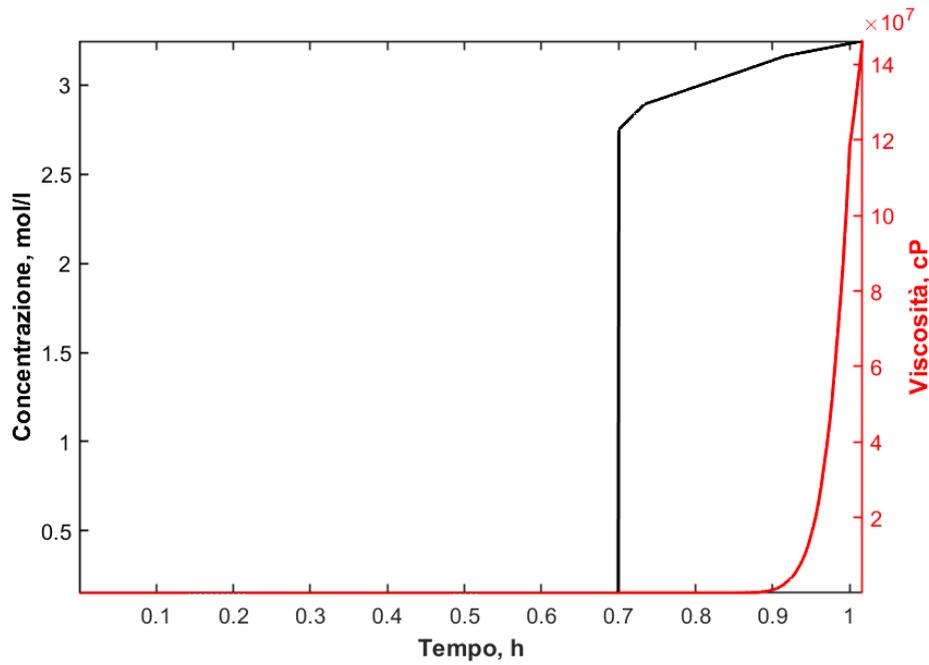
<b>Parametro</b>	<b>Valore</b>
<i>a</i>	9.668
<i>b</i>	-35.881
<i>c</i>	37.421

Per il calcolo della concentrazione di saccarosio al variare della temperatura sono stati utilizzati i dati tratti da (Young et al., 1949) e riportati in Tabella 2.3.

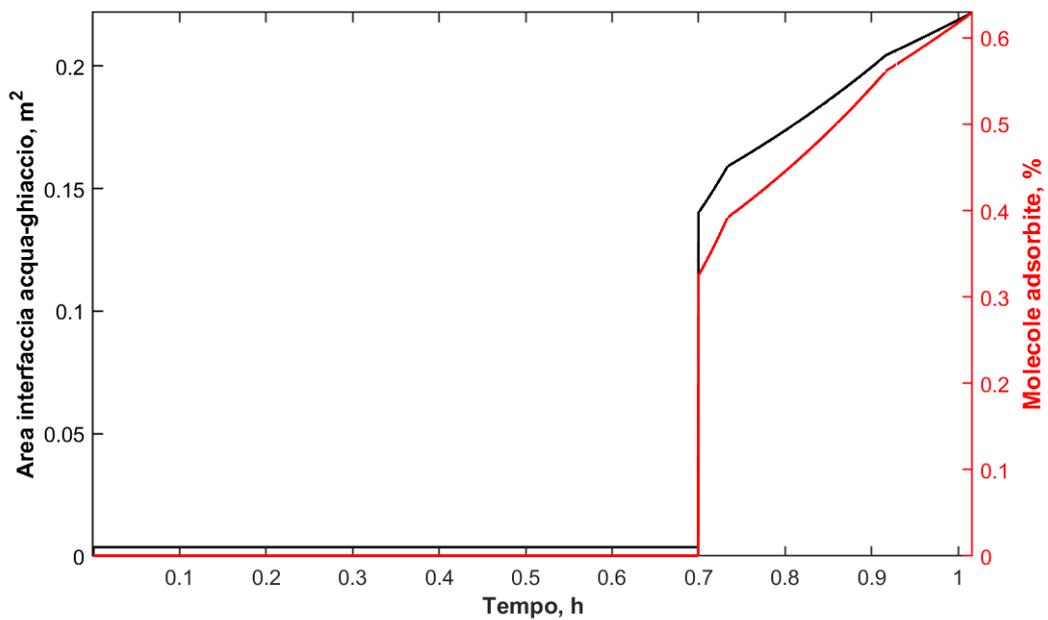
**Tabella 2.3** - Valori di percentuale in massa di saccarosio nella soluzione crioconcentrata al variare della temperatura. Dati tratti da (Young et al., 1949).

<b>Temperatura (K)</b>	<b>Conc. saccarosio (% w/w)</b>
273	0
272.4	10
271.5	20
270.4	30
268.6	40
266.0	50
261.4	60
254.0	70
243.0	75
223.0	80

Nelle Figure 2.4 e 2.5 sono riportati esempi di profili di viscosità, concentrazione di saccarosio, area di interfaccia acqua-ghiaccio e molecole adsorbite ottenuti utilizzando i parametri riportati in questo paragrafo.



**Figura 2.4** - Andamento della concentrazione di saccarosio (in nero) e della viscosità della soluzione concentrata (in rosso) durante una simulazione di congelamento.



**Figura 2.5** – Esempio di andamenti di area superficiale acqua-ghiaccio (in nero) e percentuale di molecole adsorbite (in rosso), ricavati dalle simulazioni della fase di congelamento

## 3. Materiali e metodi sperimentali

In questo capitolo si descriveranno i materiali, le tecniche di caratterizzazione e gli strumenti utilizzati per la conduzione delle varie prove i cui risultati saranno descritti nel Capitolo IV. Tutte le attività di laboratorio, e quindi l'intera parte sperimentale svolta per lo sviluppo di questa tesi, sono state effettuate nei laboratori del gruppo di ricerca Molecular Engineering Laboratory, Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT), del Politecnico di Torino. La proteina modello selezionata per le prove sperimentali è la Mioglobina (Mb) estratta da cuore di cavallo (Sigma Aldrich, Milano, Italia) avente una temperatura di denaturazione a freddo di 10°C a pH 3.7 (Oddone et al., 2014; Privalov, 1997). Tutte le soluzioni sono state preparate in buffer citrato 10 mM, al fine di mantenere costante il pH durante gli esperimenti ad un valore di 3.7.

### 3.1. Criomicroscopio (FDM)

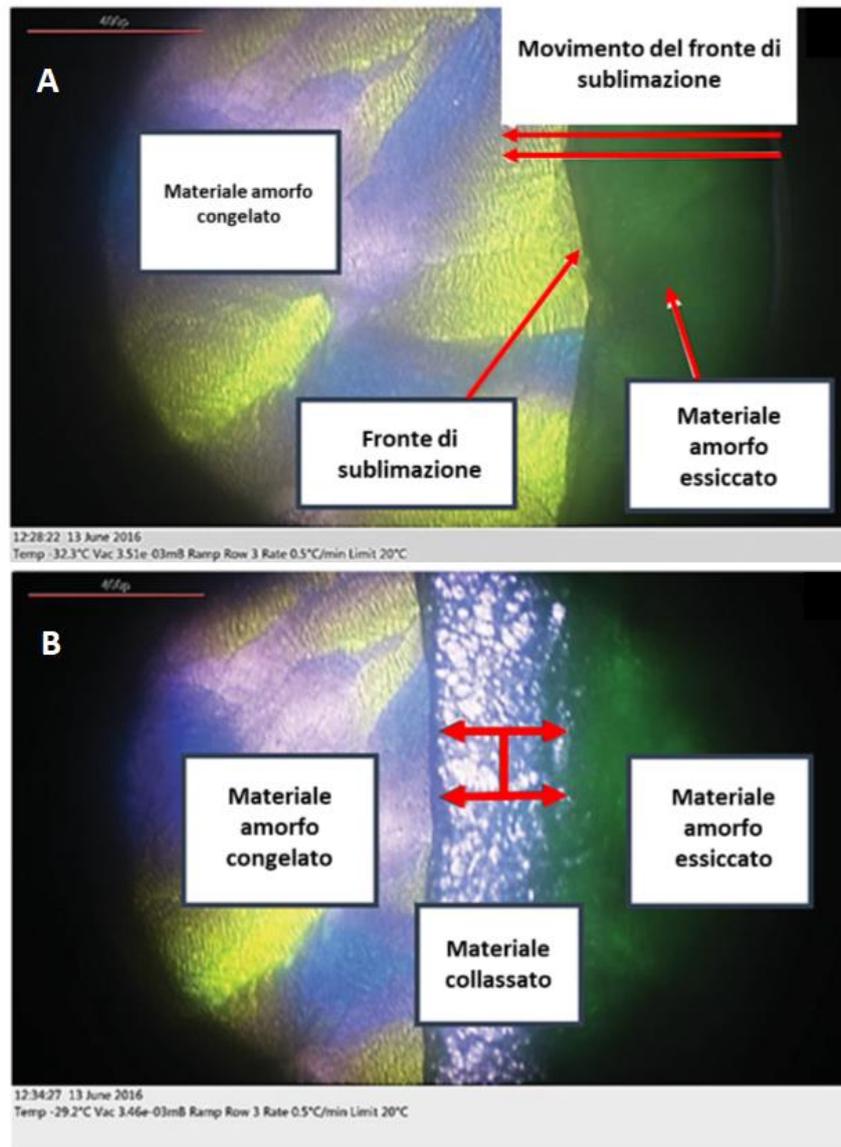
Il criomicroscopio, o *Freeze-Drying Microscope* (FDM), è un importante strumento largamente utilizzato nell'ambito farmaceutico per estrarre le informazioni necessarie per lo sviluppo delle formulazioni. Questa tecnica ha il vantaggio di operare in condizioni di temperatura e pressione simili a quelle presenti durante un ciclo di liofilizzazione. Durante l'analisi il campione viene fatto congelare attraverso un raffreddamento controllato secondo una rampa decisa dall'utilizzatore. Successivamente, attraverso l'utilizzo di una pompa a vuoto, viene abbassata la pressione all'interno della camera al fine di simulare la fase di essiccamento primario.

Con l'osservazione diretta attraverso il microscopio ottico in dotazione è possibile esaminare alcuni dei fenomeni che occorrono durante il processo, e valutare diverse proprietà del campione, tra cui:

- Temperatura di fusione eutettica ( $T_{eu}$ ) nel caso di formulazioni cristalline;
- Temperatura di collasso ( $T_c$ ) nel caso di formulazioni amorfe;
- Fronte di sublimazione;
- Nucleazione del campione;
- Informazioni sulla formazione di croste superficiali dove il soluto concentrato è forzato durante la formazione del ghiaccio (Rey et al., 2010).

Il criomicroscopio è l'unica tecnica che permette di valutare la temperatura di collasso. Spesso questa temperatura è pochi gradi al di sopra della temperatura di transizione vetrosa, ma non sempre ciò è verificato. Il termine "collasso" viene spesso utilizzato per descrivere una perdita

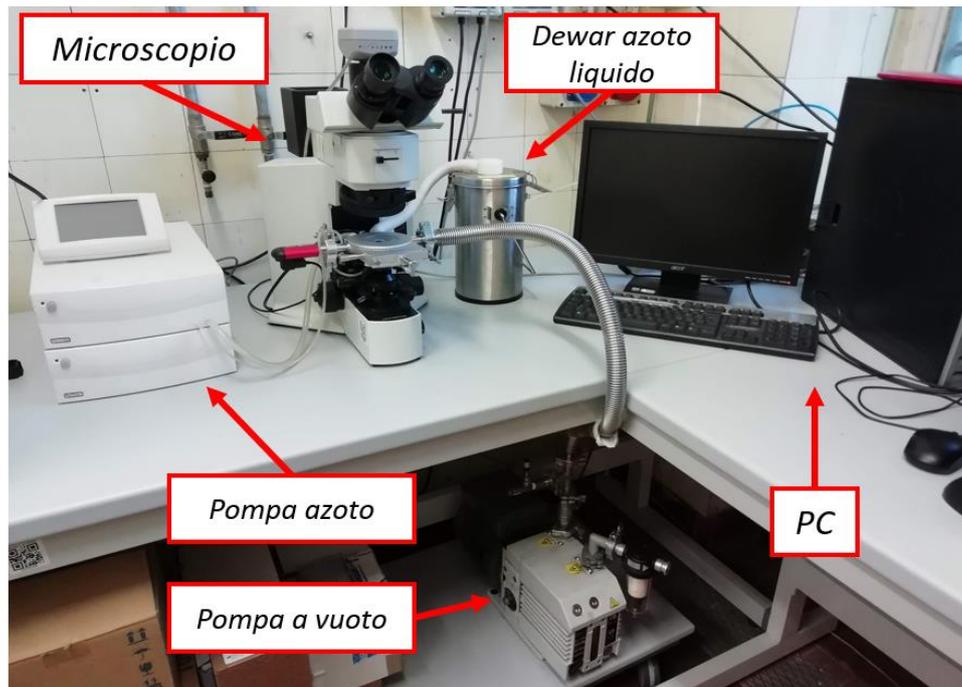
di struttura macroscopica nel materiale amorfo sottoposto a liofilizzazione. In realtà, ad essere precisi, si riferisce ad un moto viscoso presente in un materiale amorfo, simile alla fusione eutettica che avviene in un solido cristallino (Ward et al., 2019). È importante conoscere esattamente il valore di questa temperatura per ottimizzare il processo. Se è vero che temperature maggiori permettono di avere un essiccamento primario più veloce, il superamento della temperatura di collasso provocherebbe il cedimento della struttura della formulazione, con restringimenti nel passaggio del vapor d'acqua impedendo l'ottenimento di una adeguata disidratazione del prodotto. In Figura 3.1 sono riportate delle immagini di esempio di un campione contenente saccarosio sottoposto a FDM.



**Figura 3.1** – Esempi di immagini prodotte da un FDM, relative ad un campione contenente un disaccaride. (A) Immediatamente prima del collasso del campione, è possibile vedere distintamente il fronte di sublimazione. (B) Lo stesso campione pochi minuti dopo, successivamente al collasso. Immagine tratta da (Ward et al., 2019) con modifiche.

Durante questo lavoro sperimentale, è stato utilizzato un criomicroscopio con le seguenti componentistiche (visibili in Figura 3.2):

- Microscopio (BX51, Olympus Europa, Hamburg, Germany);
- Pompa a vuoto;
- Dewar contenente azoto liquido;
- Computer collegato al sistema, con installato un software per il controllo del processo e collezione dei dati e delle immagini (PE95-T95, Linkam, Scientific Instruments, Tadworth, Surrey, UK);



*Figura 3.2 - Foto del FDM utilizzato per le analisi al Politecnico di Torino, con indicate le varie componenti.*

Sono state eseguite due prove al criomicroscopio, al fine di ottenere informazioni sulla temperatura di collasso dei due eccipienti amorfi utilizzati durante i cicli di liofilizzazione: saccarosio e trealosio. I campioni analizzati sono i seguenti:

- 3  $\mu$ l soluzione al 5% in peso di saccarosio in buffer citrato 10mM (pH 3.7);
- 3  $\mu$ l soluzione al 5% in peso di trealosio in buffer citrato 10mM (pH 3.7).

Nelle Tabelle 3.1 e 3.2 sono riassunti i protocolli utilizzati per ciascuna delle due caratterizzazioni.

**Tabella 3.1** - Protocollo eseguito per la prova al FDM su una soluzione di saccarosio.

Step	Temperatura	Rampa termica	Pressione
1	-50°C	2K/min	
2			11 Pa
3	-38°C	5K/min	
4	-30°C	1K/min	
5	20°C	10K/min	

**Tabella 3.2** - Protocollo eseguito per la prova al FDM su di una soluzione di trealosio.

Step	Temperatura	Rampa termica	Pressione
1	-50°C	2K/min	
2			10 Pa
3	-36°C	5K/min	
4	-28°C	1K/min	
5	20°C	10K/min	

### 3.2. Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La DSC (*Calorimetria a Scansione Differenziale*) è una delle tecniche di caratterizzazione termica maggiormente utilizzate. Viene utilizzata per studiare il comportamento di un materiale e per individuare le diverse trasformazioni fisiche che esso subisce al variare della temperatura.

Con la DSC vengono misurate delle variazioni entalpiche di un campione, durante una variazione controllata di temperatura. La tecnica consiste nel monitoraggio della differenza di calore richiesto da due campioni (quello da analizzare ed uno di riferimento che non subisce trasformazioni fisiche) per essere mantenuti alla stessa temperatura. Quando un prodotto subisce una trasformazione fisica, il calore necessario per mantenerlo alla temperatura target cambia, e con esso anche la differenza con il flusso termico del riferimento.

Al contrario del FDM, l'analisi tramite DSC si svolge a pressione atmosferica, e non viene condotto nessun tipo di essiccamento sul campione.

Alcune delle proprietà che è possibile valutare attraverso l'utilizzo di questa metodica sono:

- Temperatura di transizione vetrosa  $T_g$ ;
- Temperatura eutettica  $T_{eu}$ ;
- Temperatura di cristallizzazione  $T_{cr}$ ;
- Grado di cristallizzazione di un composto.

Durante questo lavoro di tesi si sono compiute alcune caratterizzazioni termiche al fine di individuare la temperatura di transizione vetrosa e la temperatura eutettica degli eccipienti utilizzati. Le prove sono state eseguite sia in assenza che in presenza di tensioattivo, al fine di verificare che quest'ultimo non abbia influenze su tali fenomeni fisici.

Le prove sono state eseguite utilizzando una DSC Q200 (TA Instruments, New Castle, DE, USA), con l'utilizzo di un'atmosfera inerte ottenuta introducendo 50 ml/min di azoto all'interno della cella di misura. Una quantità misurata di campione (intorno ai 30-40 mg) è stata introdotta all'interno di porta campioni di alluminio (TZERO pan).

Sono state preparate 3 soluzioni: una di saccarosio, una di mannitolo ed una di trealosio. Ogni soluzione è poi stata divisa in due aliquote; ad una delle due aliquote è stato aggiunto il tensioattivo Tween 80. In definitiva sono state create un totale di 6 formulazioni, riassunte in Tabella 3.3. Tutte le formulazioni sono state preparate in buffer citrato 10mM (pH 3.7) e contengono la stessa concentrazione di eccipienti utilizzata per le prove di liofilizzazione: 5% in peso.

**Tabella 3.3** - Riassunto delle formulazioni utilizzate per le prove alla DSC.

Nome	Formulazione	Peso
A	Saccarosio 5% in peso	35.2 mg
A*	Saccarosio 5% in peso + Tween 80 0.01% in peso	39.1 mg
B	Mannitolo 5% in peso	37.4 mg
B*	Mannitolo 5% in peso + Tween 80 0.01% in peso	41.2 mg
C	Trealosio 5% in peso	35.9 mg
C*	Trealosio 5% in peso + Tween 80 0.01% in peso	35.9 mg

Su ognuna delle formulazioni sopra descritte è stato eseguito il protocollo riportato in Tabella 3.4.

**Tabella 3.4 - Protocollo utilizzato per l'analisi alla DSC**

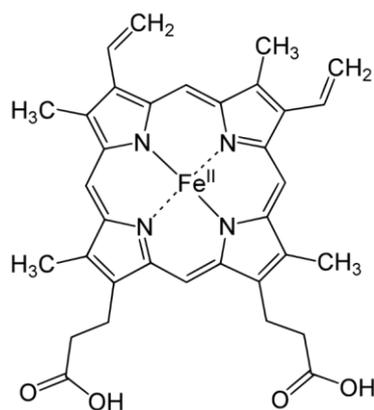
<b>Step</b>	<b>Info</b>	
1	Equilibratura @ 25 °C	1 min
2	A -60 °C	1 K/min
3	-60 °C	1 min
4	To 20 °C	5 K/min
5	Equilibratura @ 25 °C	

### **3.3. Studio della denaturazione a freddo della Mioglobina**

Sono state eseguite delle prove di mantenimento a bassa temperatura, al fine di valutare la perdita di attività della proteina nel tempo. La molecola utilizzata (Mioglobina da cuore di cavallo, Sigma Aldrich, Milano, Italia) risulta infatti instabile se posta in un ambiente a pH acido. Sono state quindi preparate due soluzioni:

- A, contenente 0.1mg/ml mioglobina in buffer citrato 10mM pH 3.7.
- B, contenente 0.1mg/ml mioglobina e 0.01% in peso di Tween 80 in buffer citrato 10mM pH 3.7.

Ognuna delle soluzioni è stata divisa in 8 aliquote da 2 ml poste all'interno di flaconi 4R (16x45 mm, Nuova Ompi glass division, Stevanato Group, Piombino Dese, Italia). Le formulazioni sono state quindi poste all'interno del liofilizzatore REVO® Freeze Dryer (Millrock Technology, Kingston, USA) preventivamente portato alla temperatura di -5°C, ed è stata fatta partire la prova. Allo stesso tempo, è stata eseguita un'analisi spettrofotometrica sulle due formulazioni al fine di ricavare l'attività proteica prima del mantenimento a bassa temperatura. Per le analisi di attività proteica della mioglobina è stato utilizzato uno spettrofotometro UV/visibile (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), con il quale è stata misurata l'assorbanza dei campioni ad una lunghezza d'onda pari a 410nm. Prima di effettuare le misurazioni i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 5 minuti (Heraeu Megafug 8 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). Il picco di assorbanza a 410 nm è dovuto al gruppo eme (Figura 3.3) presente all'interno della mioglobina, ed è quindi correlato sia alla sua concentrazione che alla sua conformazione. La perdita della struttura nativa della proteina causa un notevole abbassamento dell'assorbanza in questa zona dello spettro (Anderson et al., 1995).



**Figura 3.3** - Gruppo eme presente in proteine come la mioglobina e l'emoglobina, è il responsabile della colorazione bruna di queste sostanze.

Sono quindi stati estratti dal liofilizzatore due flaconi per formulazione dopo 1, 3, 6 e 24 ore dall'inizio della prova. Su ognuno di essi è stata rieseguita l'analisi spettrofotometrica sopra descritta.

### 3.4. Stabilità della Mioglobina a seguito di cicli di congelamento-scongelo

Si è valutata anche la stabilità proteica a seguito di congelamento/scongelo. Per questa analisi sono state utilizzate delle soluzioni di mioglobina in buffer citrato 10mM a pH 3.7, e a due diverse concentrazioni: 0.1 e 0.2 mg/ml. Alcune di esse contenevano anche Tween 80 (Sigma Aldrich, Milano, Italia) ad una concentrazione dello 0.01% in peso, al fine di valutare gli effetti del tensioattivo. Per valutare un diverso stato di stabilità della mioglobina, alcune soluzioni sono state preparate utilizzando buffer citrato a pH 6.5 anziché 3.7 (in queste condizioni, la proteina risulta essere decisamente meno soggetta a denaturazione). Tutte le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua ultra-pura per iniezioni (Fresenius Kaby, Verona, Italia), e filtrate utilizzando filtri da 0.2 µm.

Sono state eseguite due prove di congelamento-scongelo (indicate nel seguito con i numeri 1 e 2), con diverse combinazioni tra formulazioni e protocolli di lavoro, come dettagliato in Tabelle 3.5 e 3.6. Nella prima prova (Figura 3.4) è stato studiato l'effetto di più cicli di congelamento e scongelamento, mentre nella seconda è stato studiato l'effetto di due diversi protocolli di scongelamento. Per ognuna delle prove, al fine di valutare l'effetto dell'interfaccia acqua-ghiaccio, della presenza di tensioattivo, della velocità di congelamento e della velocità di scongelamento sulla stabilità proteica, sono stati utilizzati diversi protocolli di lavoro, come dettagliato in Tabella 3.6.



*Figura 3.4 – Fotografia delle quattro formulazioni della prova 1, dopo il congelamento.*

Le formulazioni utilizzate nelle due prove sono riassunte in Tabella 3.5.

*Tabella 3.5 - Riassunto delle formulazioni utilizzate nelle prove di congelamento-scongelo.*

	Nome	Concentrazione Mioglobina	Tween 80	pH
<i>Prova 1</i>	A <sub>1</sub>	0.1 mg/ml	no	3.7
	B <sub>1</sub>	0.2 mg/ml	no	3.7
	C <sub>1</sub>	0.1 mg/ml	sì	3.7
	D <sub>1</sub>	0.2 mg/ml	sì	3.7
<i>Prova 2</i>	A <sub>2</sub>	0.1 mg/ml	no	3.7
	B <sub>2</sub>	0.1 mg/ml	sì	3.7
	C <sub>2</sub>	0.1 mg/ml	no	6.5
	D <sub>2</sub>	0.1 mg/ml	sì	6.5

I protocolli utilizzati per ciascuna prova sono riassunti in Tabella 3.6.

**Tabella 3.6 - Protocolli di congelamento e scongelamento utilizzati nelle due prove effettuate**

	<b>Campioni</b>	<b>Congelamento</b>	<b>Scongelo</b>	<b>N° cicli</b>
<i>Prova 1</i>	3x (A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> , C <sub>1</sub> , D <sub>1</sub> )	0.1 K/min	Aria	1
	3x (A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> , C <sub>1</sub> , D <sub>1</sub> )	0.1 K/min	Aria	3
	3x (A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> , C <sub>1</sub> , D <sub>1</sub> )	1 K/min	Aria	1
	3x (A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> , C <sub>1</sub> , D <sub>1</sub> )	1 K/min	Aria	3
	3x (A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> , C <sub>1</sub> , D <sub>1</sub> )	Quench	Aria	1
	3x (A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> , C <sub>1</sub> , D <sub>1</sub> )	Quench	Aria	3
<i>Prova 2</i>	3x (A <sub>2</sub> , B <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> )	0.1 K/min	0.5 K/min	1
	3x (A <sub>2</sub> , B <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> )	0.1 K/min	Bagno acqua 20°C	1
	3x (A <sub>2</sub> , B <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> )	Quench	0.5 K/min	1
	3x (A <sub>2</sub> , B <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> )	Quench	Bagno acqua 20°C	1

Per i congelamenti a velocità controllata sono stati utilizzati il liofilizzatore REVO® Freeze Dryer (Millrock Technology, Kingston, USA), ed il liofilizzatore LyoBeta 25TM Telstar (Terrassa, Spagna), presenti nei laboratori del DISAT del Politecnico di Torino.

Il liofilizzatore REVO è composto dalle seguenti componenti:

- Camera avente 4 ripiani, per un'area totale di circa 1 m<sup>2</sup>;
- Condensatore esterno, che opera approssimativamente a -80°C;
- Pompa a vuoto tipo Leybold (Leybold GmbH, Colonia, Germania);
- Misuratore di pressione capacitivo (Baratron type 626A, MKS Instruments, Andover, MA, USA, fondo scala 10 mbar);
- Misuratore di pressione a conducibilità termica (Pirani type PSG-101-S, Inficon, Bad Ragaz, Switzerland);
- Sistema di refrigerazione che permette un raffreddamento massimo di 2 K/min;
- Termocoppie di tipo T, per la misura della temperatura dei prodotti;
- Termoresistenza al platino di tipo Pt 100, meglio nota come resistance *Temperature Detector (RTD)*, per la misura della temperatura dei ripiani;
- Sistema computerizzato Optidry® PC/PLC (MCS software), per la gestione del liofilizzatore.

Mentre il liofilizzatore LyoBeta è composto da:

- Camera da 0.2 m<sup>3</sup> equipaggiata con 4 scaffali di area 0.16 m<sup>2</sup>;
- Pompa a vuoto (Agilent Variant DS402; Agilent Technologies, Santa Clara, California, Stati Uniti);

- Condensatore esterno e pompa a vuoto;
- Misuratore di pressione capacitivo (Baratron type 626A, MKS Instruments, Andover, MA, USA, fondo scala 10 mbar);
- Misuratore di pressione a conducibilità termica (Pirani type PSG-101-S, Inficon, Bad Ragaz, Switserland);
- Termocoppie di tipo T, per la misura della temperatura dei prodotti;
- Sistema di refrigerazione.

Un'immagine dei suddetti liofilizzatori, utilizzati per la conduzione delle prove sperimentali, è riportata in Figura 3.5.



*Figura 3.5 -Liofilizzatori utilizzati per le prove sperimentali. A sinistra il Telstar LyoBeta 25, a destra il REVO® Freeze Dryer.*

Per i congelamenti quench, i campioni sono stati congelati immergendo i flaconi (0.5 ml Screw Cap GeNunc Storage Vials, HDPE, Sterili, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) in azoto liquido per 5 minuti. Nel caso invece dei congelamenti a velocità controllata, 2 ml di ogni formulazione sono stati inseriti in flaconi 4R (16x45 mm, Nuova Ompi glass division, Stevanato Group, Piombino Dese, Italia), tappati con tappi in silicone (West Pharmaceutical Services, Milan, Italia), caricati nella camera del liofilizzatore e portati ad una temperatura di -40°C con velocità di raffreddamento di 0.1 o 1 K/min. Un protocollo simile è stato usato per lo scongelamento a velocità controllata (0.5 K/min).

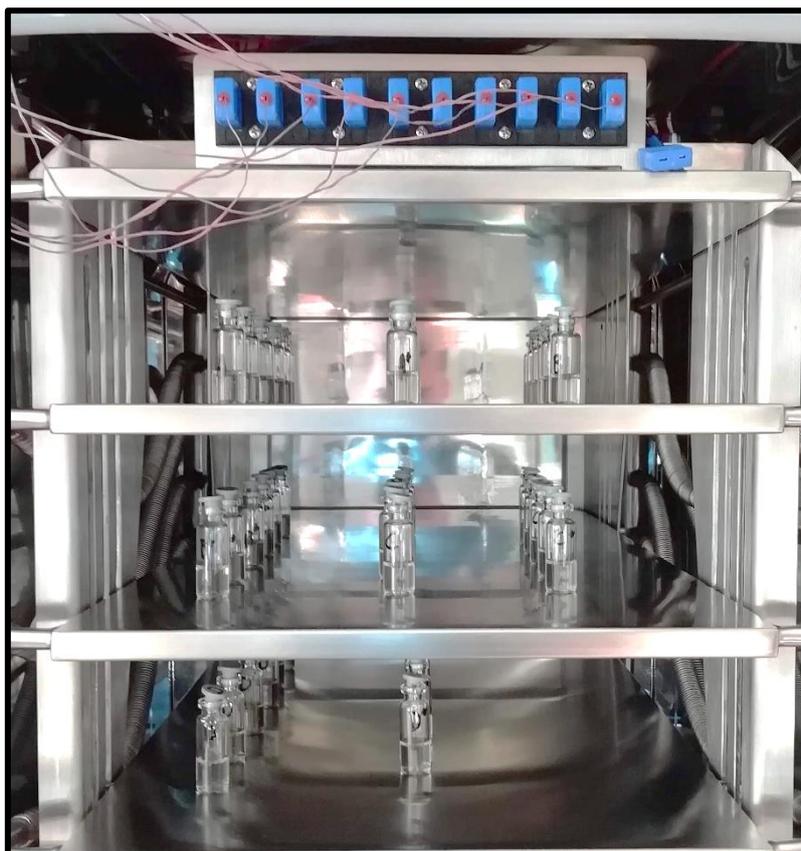
Alla fine di ogni protocollo di prova, è stata eseguita l'analisi spettrofotometrica per verificarne l'attività proteica residua. I campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 5 minuti (Heraeus Megafuge 8 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), in flaconi da 1.5 ml (AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Germania). Sono poi stati prelevati 100 µL per campione ed è stata misurata l'assorbanza a 410 nm (6850 UV/VIS Spectrophotometer; Jenway, Stone, Staffordshire, UK). Nel caso della prima delle due prove, è stata valutata anche l'assorbanza a 280 nm. L'assorbimento a questa lunghezza d'onda è dovuto ai residui aromatici,

e quindi è comune a tutte le proteine ed è indice di concentrazione delle stesse. Un abbassamento del valore di assorbanza a 280 nm dopo centrifugazione è indice di aggregazione e precipitazione.

### **3.5. Stabilità della Mioglobina a seguito di liofilizzazione**

Le prove di liofilizzazione completa sono state effettuate utilizzando il liofilizzatore LyoBeta 25TM Telstar (Terrassa, Spagna).

Per queste prove sono state preparate delle soluzioni di mioglobina alla concentrazione di 0.1 mg/ml, ed in buffer citrato 10 mM a pH 3.7. Sono state preparate 8 formulazioni diverse (6 flaconi per formulazione, e 2 ml di soluzione per flacone), a seconda dell'eccipiente utilizzato e della presenza di tensioattivo (Tabella 3.7). Per la prova sono stati utilizzati flaconi 4R (16x45 mm, Nuova Ompi glass division, Stevanato Group, Piombino Dese, Italia), tappati con tappi in silicone (West Pharmaceutical Services, Milan, Italia). I flaconi sono stati inseriti nel liofilizzatore REVO, appoggiati ai ripiani ad una temperatura iniziale di 20°C, e disposti come mostrato in Figura 3.6. Tutte le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua ultra-pura per iniezioni (Fresenius Kaby, Verona, Italia), e filtrate utilizzando filtri da 0.2 µm. Tutte le formulazioni sono state analizzate allo spettrofotometro a 410 nm (analogamente a quanto fatto per le prove di congelamento-scongelo) prima di essere caricate nel liofilizzatore, per avere un valore di riferimento.



*Figura 3.6 - Fotografia dei flaconi inseriti all'interno del REVO.*

*Tabella 3.7 - Formulazioni utilizzate per la prova di liofilizzazione.*

<b>Nome</b>	<b>Concentrazione Mioglobina</b>	<b>Tween 80</b>	<b>Eccipiente</b>
A	0.1 mg/ml	no	nessun eccipiente
A*	0.1 mg/ml	0.01% in peso	nessun eccipiente
B	0.1 mg/ml	no	Saccarosio 5%
B*	0.1 mg/ml	0.01% in peso	Saccarosio 5%
C	0.1 mg/ml	no	Mannitolo 5%
C*	0.1 mg/ml	0.01% in peso	Mannitolo 5%
D	0.1 mg/ml	no	Trealosio 5%
D*	0.1 mg/ml	0.01% in peso	Trealosio 5%

Il protocollo utilizzato per la prova è riportato in Tabella 3.8. Dopo aver completato la fase di congelamento, il liofilizzatore è stato aperto e sono stati estratti 3 flaconi per ogni formulazione. Essi sono stati lasciati scongelare in aria e successivamente sottoposti all'analisi di assorbanza a 410 nm. I restanti flaconi, invece, sono stati estratti ed analizzati solo a liofilizzazione completata (Figura 3.7). Per monitorare la fine dell'essiccamento primario si è osservato il rapporto tra le misurazioni di pressione fornite dal Pirani e dal Baratron. Il Pirani è un sensore di vuoto termoconduttivo tarato in azoto, e quindi sensibile alla presenza del vapore acqueo, mentre il Baratron è in grado di misurare il valore assoluto di pressione, indipendentemente dai gas componenti l'atmosfera della camera. Questo significa che, finché è presente del vapore acqueo sublimante dalle formulazioni, i due manometri segneranno valori di pressione differenti. Quando entrambi indicano la stessa pressione, l'essiccamento primario può considerarsi completato. Di tutte le formulazioni è stata misurata l'assorbanza a 410 nm, per verificarne l'attività proteica residua dopo liofilizzazione, utilizzando la stessa procedura descritta nel paragrafo precedente. Per fare le analisi, i campioni sono stati ricostituiti utilizzando 2 ml di acqua ultra-pura per iniezioni (Fresenius Kaby, Verona, Italia) a temperatura ambiente.



*Figura 3.7 - Fotografia dei campioni liofilizzati.*

**Tabella 3.8** - Protocollo utilizzato per la prova di liofilizzazione.

<b>Step</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Velocità/Tempo</b>	<b>Pressione</b>
1	Congelamento-rampa a -45°C	1 K/min	
2	Congelamento-holding 45 °C	2h	
2	Estrazione 3 flaconi per formulazione mantenuta a -45°C	-	
3	Essiccamento primario-rampa a -27 °C	2 K/min	10 Pa
4	Essiccamento primario-holding -27 °C	in base al rapporto Pirani/Baratron	10 Pa
5	Essiccamento secondario-rampa a 20 °C	Rampa di 4 h	10 Pa
6	Essiccamento secondario-holding 20 °C	5 h	10 Pa

## 4. Risultati

In questo capitolo vengono riassunti i risultati delle simulazioni effettuate su Matlab e delle prove sperimentali. Sono riportate dunque le prove sperimentali volte a valutare l'effetto delle condizioni operative di congelamento (e scongelamento) di una proteina instabile in bulk ed il ruolo complessivo di queste nel processo di liofilizzazione. Viene valutato anche l'effetto dell'aggiunta di stabilizzanti e tensioattivi, e le formulazioni vengono caratterizzate dal punto di vista termico.

### 4.1. Design Space

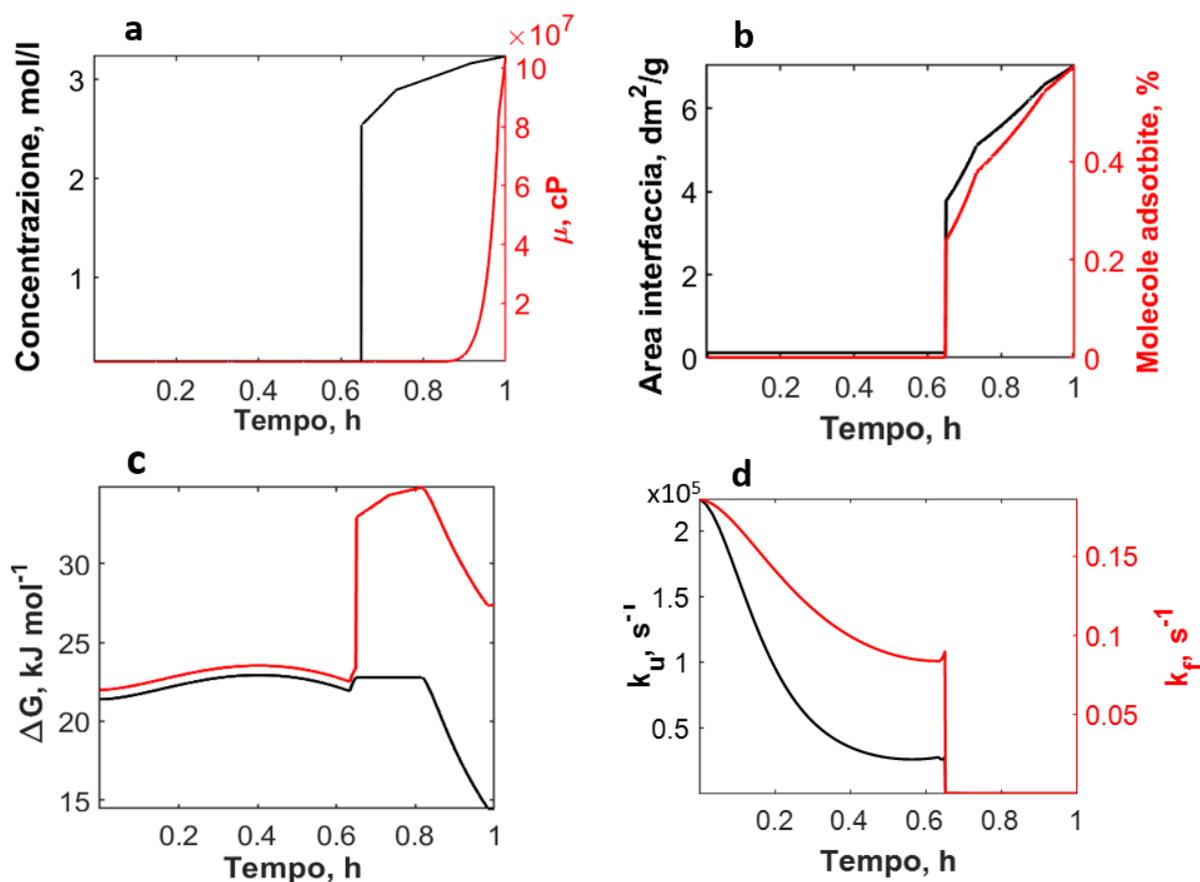
#### 4.1.1. Congelamento

È stato innanzitutto simulato il comportamento di una proteina modello durante il processo di congelamento, facendo utilizzo del modello discusso nel capitolo 2. Un esempio di output di una simulazione è mostrato in Figura 4.1, dove sono riportati i risultati della simulazione 1 di Tabella 2.3.

Prima della nucleazione, la viscosità della soluzione risulta troppo bassa per ostacolare significativamente la cinetica di denaturazione, ed infatti nelle prime fasi del congelamento le costanti cinetiche mostrano valori relativamente elevati (Figura 4.1d). Successivamente alla nucleazione, che si presenta attorno alle 0.65 h in questa simulazione, la concentrazione dell'eccipiente cresce repentinamente per via della formazione dei cristalli di ghiaccio (Figura 4.1a) (Arsiccio et al., 2019). Questo comporta un incremento della stabilità della proteina: in Figura 4.1c si può osservare infatti come il  $\Delta G$  comprendente l'effetto dell'eccipiente (curva rossa) assuma valori notevolmente superiori proprio per l'effetto dello stabilizzante (valori positivi di  $m'$ ). Senza invece tenere conto della sua presenza, la variazione di energia libera si attesta a valori notevolmente più bassi (curva nera).

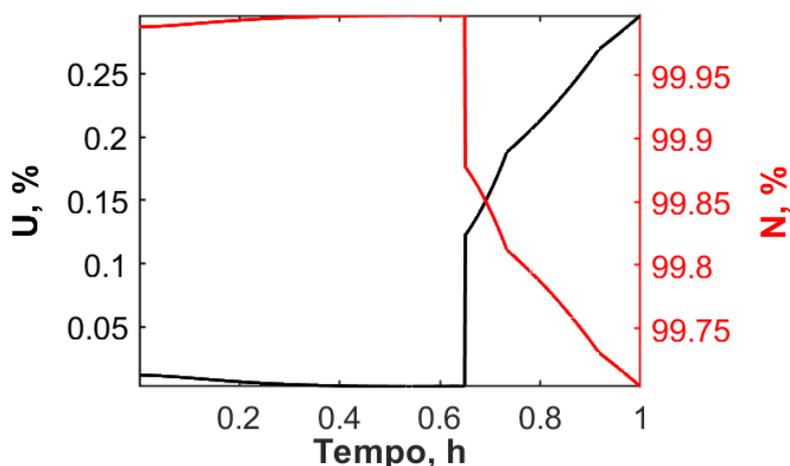
Una volta avvenuta la nucleazione, anche la viscosità  $\mu$  della soluzione subisce un importante incremento, di diversi ordini di grandezza (Figura 4.1a). Si può così osservare un effetto di vetrificazione: le proteine sono ostacolate nel loro movimento, ed il valore delle costanti cinetiche  $k_u$  e  $k_f$ , di conseguenza, decresce drammaticamente (Figura 4.1d). A questo punto diventa maggiormente rilevante la denaturazione provocata dall'interfaccia acqua-ghiaccio. Come si può notare in Figura 4.1b, la superficie dell'interfaccia cresce repentinamente alla nucleazione, ed aumenta successivamente in maniera più graduale per via dell'accrescimento

dei cristalli. La percentuale di proteine adsorbite su di questa interfaccia ha un profilo analogo, traducendosi in una potenziale denaturazione di queste ultime.



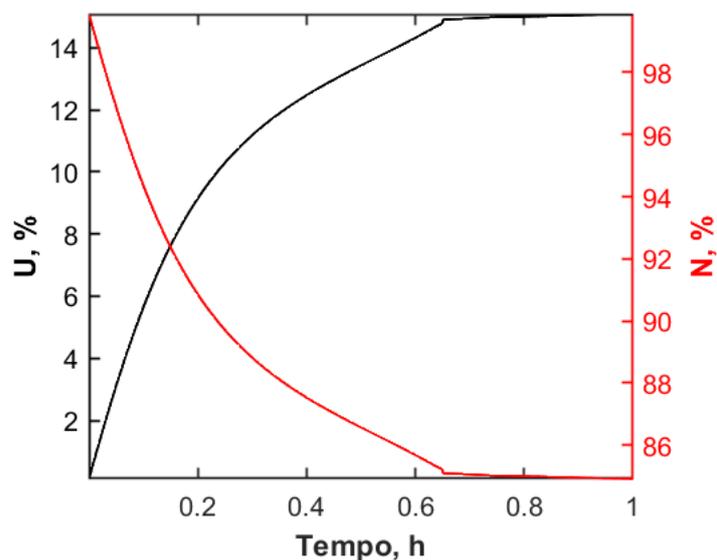
**Figura 4.1** – Profili di (a) concentrazione di saccarosio e viscosità, (b) superficie di interfaccia acqua-ghiaccio e percentuale di molecole adsorbite su di essa, (c) variazione di energia libera escludendo (curva nera) ed includendo (curva rossa) il contributo dell'eccipiente, (d) costanti cinetiche di folding ed unfolding della proteina. Profili relativi alla simulazione numero 1 riportata in Tabella 2.3 ed ottenuti con una velocità di raffreddamento di 1 K/min, ed una temperatura di nucleazione pari a 263 K.

Le percentuali di proteine allo stato nativo e denaturato durante il processo (utilizzando i parametri della simulazione 1 di Tabella 2.3) sono riportate in Figura 4.2. Non si osserva alcuna denaturazione rilevante prima della nucleazione, mentre una volta che questa avviene, la percentuale di proteine denaturate segue un andamento analogo a quello delle molecole adsorbite, a conferma che per una biomolecola stabile, la denaturazione all'interfaccia è la principale causa di perdita di attività durante il processo di liofilizzazione.



**Figura 4.2** - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante il congelamento. Profili relativi alla simulazione 1 di Tabella 3.2, con una velocità di raffreddamento pari a 1 K/min ed una temperatura di nucleazione di 263 K.

In Figura 4.3 è stata considerata una proteina instabile in bulk, ed è stato simulato un processo irreversibile nel quale non avviene il refolding (simulazione 4 di Tabella 2.3). Come si può notare, la proteina subisce la maggior parte della denaturazione prima della nucleazione, mentre l'interfaccia ha un ruolo più marginale.

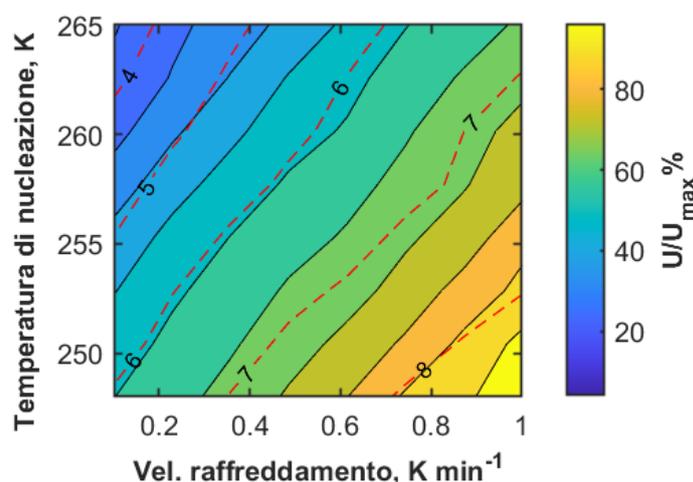


**Figura 4.3** - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante il congelamento. Profili relativi alla simulazione 4 di Tabella 2.3, con una velocità di raffreddamento pari a 1 K/min ed una temperatura di nucleazione di 263 K.

Come detto, l'obiettivo di questo lavoro è quello di individuare i parametri responsabili della perdita di attività terapeutica, e studiarne la loro influenza sul processo. Per farlo vengono costruiti dei design space nei quali si fanno variare i parametri di processo ritenuti fondamentali, ovvero velocità di raffreddamento e temperatura di nucleazione nel caso del congelamento, e si diagramma la percentuale di proteina denaturata per ogni coppia di valori considerata. Per permettere una migliore visualizzazione dei grafici ed una più facile comparazione tra di essi, si è scelto di diagrammare la percentuale di molecole denaturate ( $U$ ) normalizzata rispetto al massimo valore presente in ogni grafico ( $U_{max}$ ).

Si considererà dapprima il caso di una proteina estremamente stabile in bulk (simulazione 1 in Tabella 2.3). Il design space in questo caso (Figura 4.4) mostra come la condizione migliore per la stabilità proteica corrisponda ad una regione avente basse velocità di raffreddamento ed alte temperature di nucleazione. Come spiegato nel paragrafo 1.2.6, nel caso di basse velocità di raffreddamento, si ottengono cristalli più grossi ed una minore superficie di interfaccia tra acqua e ghiaccio, la quale è influenzata anche dalla temperatura di nucleazione. Una alta temperatura di nucleazione promuove la formazione di pochi cristalli di dimensione maggiore, stabilizzando ancor di più il principio attivo. Tutto ciò permette quindi di minimizzare la denaturazione, in quanto una proteina stabile subisce denaturazione prevalentemente per via dell'adsorbimento sulla superficie. La condizione peggiore ( $U/U_{max}=100\%$ ) risulta invece essere quella che combina congelamenti veloci e basse temperature di nucleazione. In queste condizioni vengono a formarsi cristalli più piccoli ed una maggiore area superficiale, come è possibile vedere dalle isocurve in rosso mostrate nel design space.

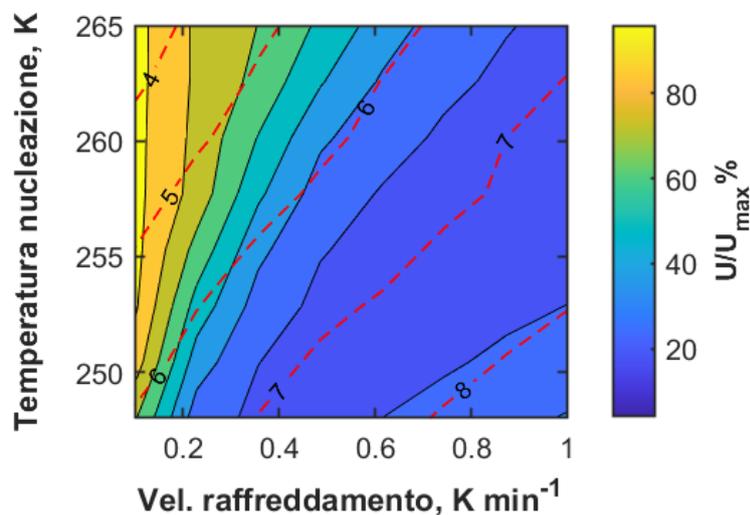
Nel trattamento di questo tipo di prodotti l'obiettivo è quindi quello di massimizzare la dimensione dei cristalli di ghiaccio, attraverso un attento controllo del processo sotto il punto di vista di velocità di congelamento e di temperatura di nucleazione. Alternativamente, come si potrà vedere dalle prove sperimentali, è possibile ricorrere all'utilizzo di tensioattivi in modo da minimizzare l'interazione tra proteina ed interfaccia.



**Figura 4.4** - Design space della simulazione 1. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in  $dm^2/g$ .

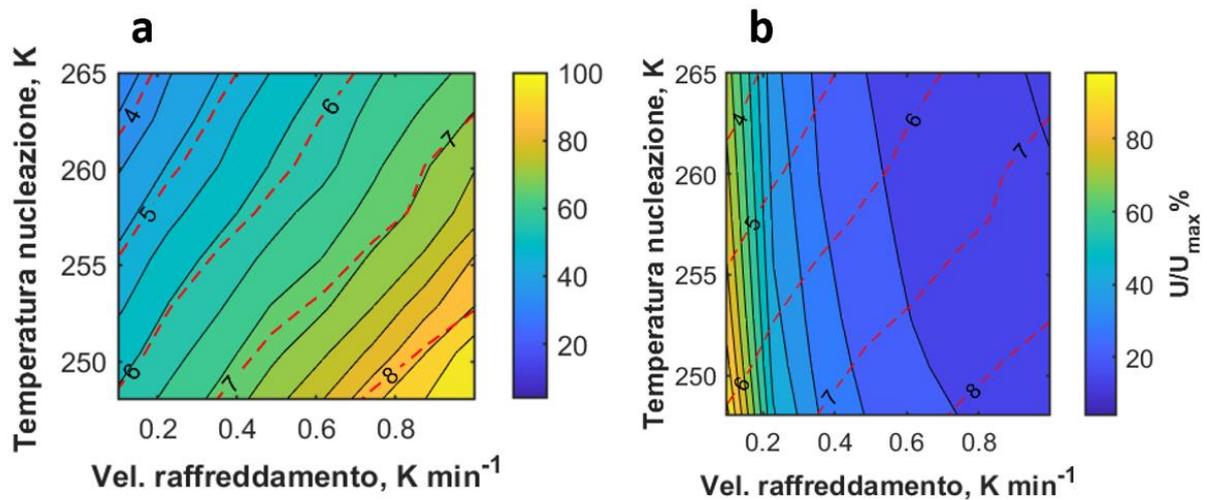
Al contrario, per una proteina instabile in bulk (simulazione 2 di Tabella 2.3), la denaturazione indotta dalla superficie diventa molto meno importante. In questo caso è necessario minimizzare il più possibile il tempo di congelamento. Queste molecole, infatti, sono

maggiormente sensibili alla denaturazione a freddo e, di conseguenza, è necessario esporre per il minor tempo possibile la proteina alle basse temperature mentre la soluzione è ancora allo stato liquido. Una volta avvenuta la nucleazione, la viscosità aumenta ed il processo di denaturazione rallenta drasticamente (Figura 4.3). Questo comportamento si vede chiaramente nel design space relativo a queste condizioni di stabilità proteica (Figura 4.5), dove si può osservare come la stabilità aumenti all'aumentare della velocità di raffreddamento ed al diminuire della temperatura di nucleazione. L'effetto della denaturazione all'interfaccia è comunque presente, ma in questa simulazione risulta trascurabile rispetto alla denaturazione a freddo: lo si vede chiaramente confrontando le Figure 4.3 e 4.2. In questo caso l'obiettivo è quindi velocizzare il più possibile il processo. Vedremo più avanti, nella sezione dei risultati sperimentali, come un congelamento estremamente veloce come il *quench* in azoto liquido, sia l'approccio migliore in situazioni come queste. Un raffreddamento di questo tipo, infatti, porta ad un congelamento quasi istantaneo, minimizzando il tempo trascorso in fase liquida.



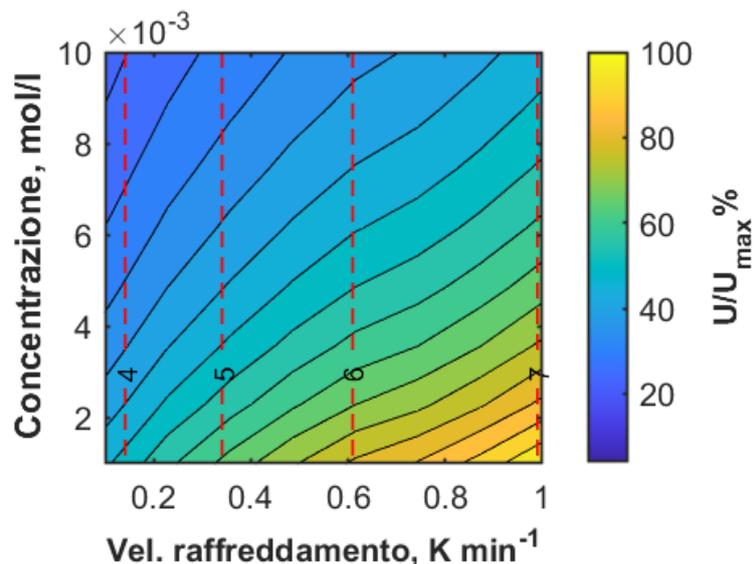
**Figura 4.5** - Design space della simulazione numero 2 di Tabella 2.3. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in  $dm^2/g$ .

È possibile fare considerazioni simili nel caso di un processo irreversibile (simulazioni 3 e 4 di Tabella 2.3). Nel caso della simulazione 3 (figura 4.6a), dove la denaturazione all'interfaccia è dominante, è di nuovo preferibile operare a basse velocità di raffreddamento ed alte temperature di nucleazione. D'altra parte, per la simulazione 4 (figura 4.6b), l'estensione dell'interfaccia non risulta essere un parametro influente, ed il tempo di congelamento deve essere minimizzato per formare un solido amorfo il più velocemente possibile.



**Figura 4.6** - Design space delle simulazioni numero 3 (a) e 4 (b) di Tabella 2.3. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in  $\text{dm}^2/\text{g}$ .

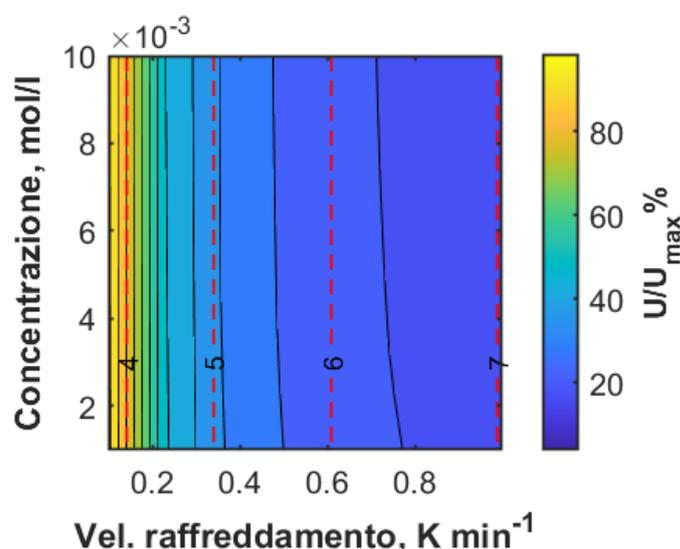
Successivamente è stato valutato l'effetto della concentrazione di proteina (Figure 4.7 e 4.8). In questo caso è stata fissata la temperatura di nucleazione a 263 K. Si è costruito il design space facendo variare la concentrazione molare di proteina tra 0.001 e 0.01 mol/l, mentre la velocità di raffreddamento è stata fatta variare nel range 0.1 - 1 K/min. La concentrazione di eccipiente è sempre stata mantenuta al 5% in peso.



**Figura 4.7** - Design space per la simulazione 3 di Tabella 2.3, nel quale si mostra l'effetto della concentrazione di proteina sull'attività residua della stessa. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in  $\text{dm}^2/\text{g}$ .

Nel caso di proteina stabile (simulazione 3 di Tabella 2.3, Figura 4.7), dove la denaturazione all'interfaccia è il meccanismo dominante, un aumento della concentrazione della proteina ha un effetto benefico. Questo è dato dal fatto che, a parità di area interfacciale, solamente un dato numero di molecole possono adsorbirsi su di essa. Di conseguenza un aumento della concentrazione (e quindi di moli di proteina per unità di volume) non comporta nessun ulteriore adsorbimento, facendo diminuire la relativa percentuale di proteine denaturate.

Al contrario, non si nota alcun effetto della concentrazione di proteina nel caso della simulazione 4, ovvero quando il meccanismo dominante è la denaturazione in bulk (Figura 4.8). In realtà, come si vedrà dalle prove sperimentali, anche una proteina sensibile a denaturazione a freddo tende a stabilizzarsi all'aumentare della propria concentrazione. Ciò è legato a fenomeni di tipo sterico (una proteina denaturata aumenta di volume, impedendo a quelle vicine di fare altrettanto), che non vengono tenuti in conto nel modello matematico.



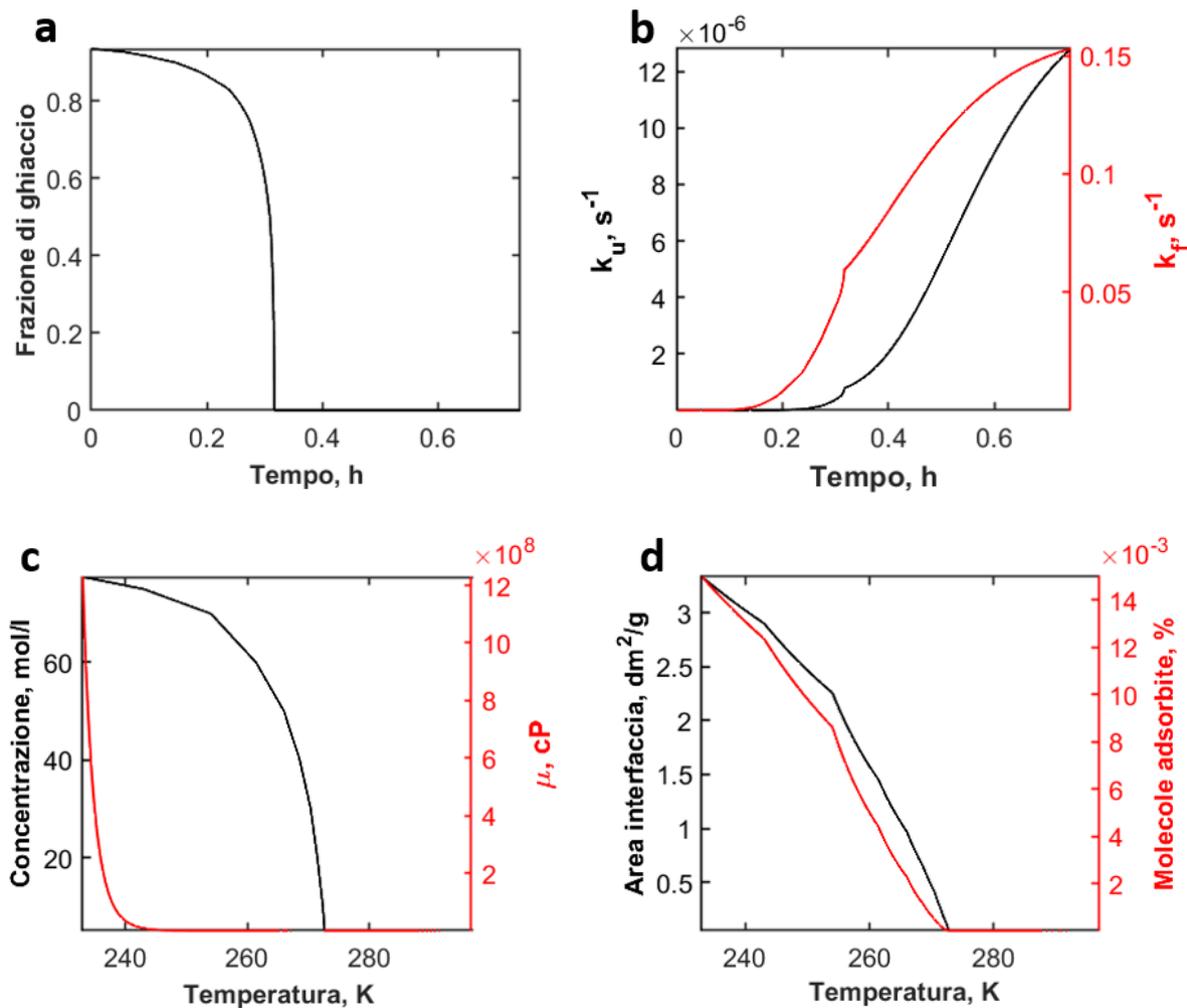
*Figura 4.8 - Design space per la simulazione 4 di Tabella 2.3, nel quale si mostra l'effetto della concentrazione di proteina sull'attività residua della stessa. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in  $dm^2/g$ .*

#### 4.1.2. Scongellamento

Molto spesso nell'industria farmaceutica i prodotti vengono congelati per essere conservati per più o meno brevi periodi, anche prima del processo di liofilizzazione stesso. È possibile quindi che subiscano cicli completi di congelamento-scongellamento. Risulta interessante quindi comprendere quali siano gli effetti anche della fase di scongelamento. Per questo motivo si è deciso di simulare il comportamento di una proteina che subisce questo processo. A tal fine è stato modellato lo scongelamento (paragrafo 2.1.2) ed è stato implementato in Matlab un modello simile a quello per il congelamento. Tutte le simulazioni hanno come punto di partenza i dati ottenuti alla fine del congelamento, ovvero superficie finale dell'interfaccia acqua-ghiaccio, percentuale di molecole adsorbite, e percentuale di principio attivo denaturato.

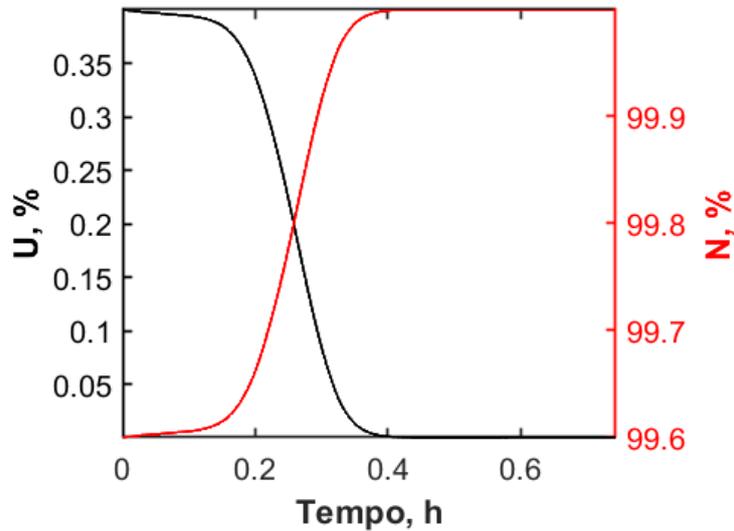
In Figura 4.9 sono riportati i profili di alcune variabili rilevanti durante il processo di scongelamento. I grafici sono relativi ad una simulazione effettuata con un coefficiente di scambio termico globale  $K_v$  pari a  $15 \text{ Wm}^{-2}\text{K}^{-1}$ , a partire da una temperatura di 233 K fino a 293 K. È stata utilizzata una concentrazione di proteina pari a 0.001 mol/l, ed una concentrazione di saccarosio pari al 5% in peso. In tutti i casi la temperatura dell'ambiente esterno in cui si immagina di effettuare lo scongelamento, e che determina quindi la forza spingente, è stata considerata pari a 293 K.

Nella 4.9a si può vedere l'andamento della frazione in peso di ghiaccio, che diminuisce con il passare del tempo, fino ad arrivare a zero dopo circa 0.3 ore. In corrispondenza di questo punto, le costanti cinetiche (Figura 4.9b) presentano una discontinuità, ma in generale seguono un profilo monotono crescente sia a causa dell'aumento della temperatura, che della diminuzione di viscosità (Figura 4.9c). A mano a mano che i cristalli si sciolgono, invece, la concentrazione di saccarosio nella fase concentrata (Figura 4.9c) diminuisce, fino a tornare al valore di partenza (5%). In Figura 4.9d, invece, sono mostrati i profili di superficie di interfaccia acqua-ghiaccio e molecole adsorbite. I due profili hanno un andamento quasi identico: con lo sciogliersi dei cristalli, l'area diminuisce, e con essa il quantitativo di molecole che interagiscono con l'interfaccia acqua-ghiaccio.



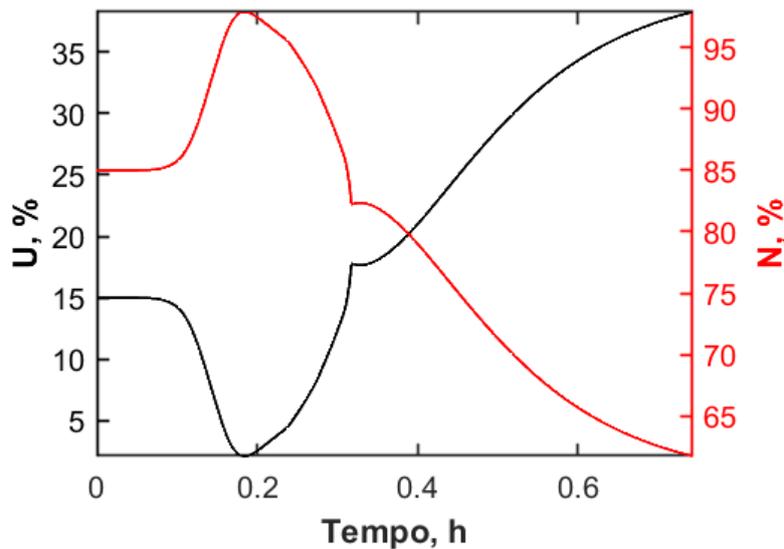
**Figura 4.9** – (a) Andamento della frazione in massa di ghiaccio nel tempo. (b) Profili delle costanti cinetiche di folding (in rosso) ed unfolding (in nero). (c) Andamento della viscosità (in rosso) e della concentrazione di saccarosio nella fase concentrata (in nero). (d) Andamento dell'area di interfaccia (in nero) e di molecole adsorbite (in rosso). Tutti i profili sono relativi alla simulazione numero 3 riportata in Tabella 2.3, ed ottenuti con un valore di  $K_v$  pari a  $15 W/m^2/K$ .

In Figura 4.10 è invece riportato il comportamento della proteina durante lo scongelamento. La figura fa riferimento alla simulazione 1 della Tabella 2.3, ovvero al caso di una proteina estremamente stabile in bulk, e riporta le percentuali di proteina denaturata e nativa. Queste due variabili partono dai valori ottenuti al termine della stessa simulazione 1 durante il congelamento ad 1 K/min. Non si nota nessun tipo di effetto deleterio da parte dell'interfaccia, anzi si osserva un incremento dell'attività proteica. Questo è dato dal fatto che stiamo considerando un processo reversibile. Durante il congelamento, infatti, si è ipotizzato che la metà delle molecole adsorbite si denaturasse; allo stesso modo, nel simulare lo scongelamento, si è ipotizzato che le molecole desorbite dalla superficie siano in grado di ricomporre la propria struttura. In questo modo, la proteina della simulazione 1 è in grado di recuperare interamente la propria struttura nativa.



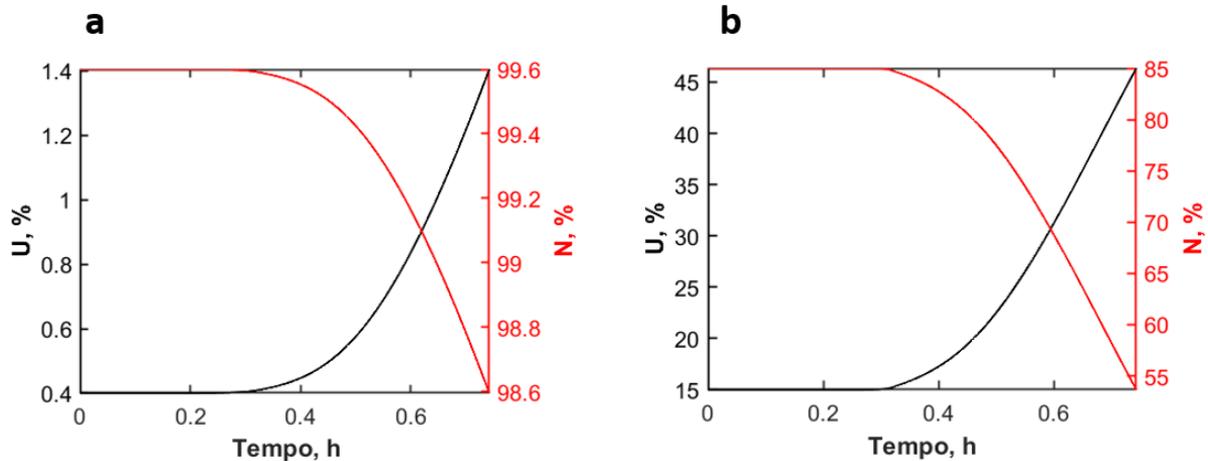
**Figura 4.10** - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante lo scongelamento. Profili relativi alla simulazione numero 1 di Tabella 2.3, eseguita con un coefficiente globale di scambio pari a  $15 \text{ W/m}^2/\text{K}$ .

Lo stesso andamento lo si riconosce nel caso della simulazione numero 2 (Figura 4.11): anche in questo caso è possibile osservare reversibilità del processo di denaturazione durante lo scioglimento dei cristalli di ghiaccio. Siccome in questo caso la proteina è altamente instabile in bulk, quello che si osserva è una perdita dell'attività proteica in fase liquida, per via della denaturazione a freddo.



**Figura 4.11** - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante lo scongelamento. Profili relativi alla simulazione numero 2 di Tabella 2.3, eseguita con un coefficiente globale di scambio pari a  $15 \text{ W/m}^2/\text{K}$ .

Al contrario, se si considera un processo irreversibile, non è possibile vedere nessun tipo di recupero della forma nativa della proteina. Una volta che la viscosità della soluzione diminuisce sensibilmente, le proteine vanno incontro a denaturazione a freddo, proporzionalmente alla loro instabilità (Figura 4.12).



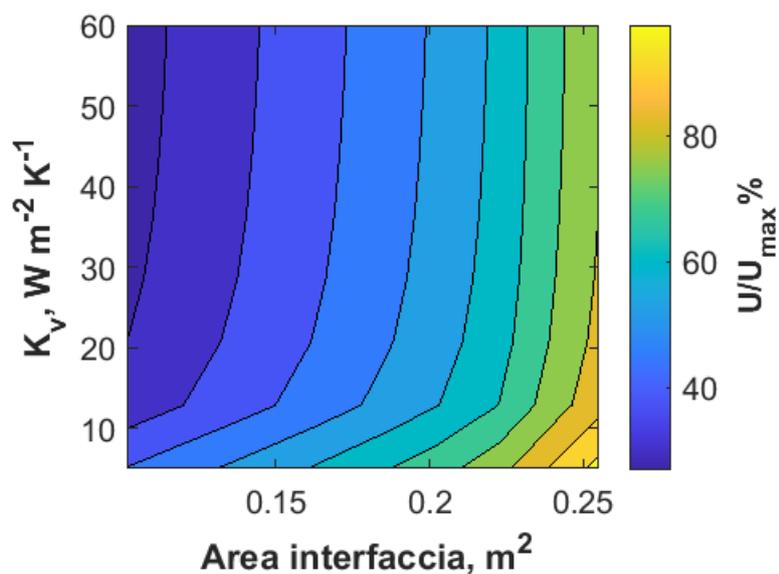
**Figura 4.12** - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante lo scongelamento. Profili relativi alla simulazione numero 3 (proteina stabile in bulk, riportata nel riquadro a) e numero 4 (proteina instabile in bulk, riportata nel riquadro b) di Tabella 2.3, eseguite con un coefficiente globale di scambio pari a 15 W/m<sup>2</sup>/K.

Per studiare più a fondo il processo di scongelamento, si è deciso di creare un design space facendo variare il coefficiente globale di scambio termico  $K_v$ , influenzante il tempo di scongelamento, tra 5 e 60 W/m<sup>2</sup>/K. Un  $K_v$  maggiore permette scongelamenti più veloci, mentre un  $K_v$  piccolo rende necessari tempi più lunghi. Insieme a  $K_v$  è stata fatta variare l'area superficiale di interfaccia acqua-ghiaccio all'inizio dello scongelamento, indice di quanto velocemente è stato effettuato il congelamento. In Tabella 4.1 sono riportati i valori di interfaccia utilizzati, e le relative velocità di congelamento ed essi collegate. In ogni caso, si è assunto che la temperatura di nucleazione fosse pari a 263 K. Dalle simulazioni del congelamento sono stati inoltre estratti i valori finali di percentuale di proteina nativa e denaturata, utilizzati poi come punto di partenza per le simulazioni del *thawing*.

**Tabella 4.1** - Valori di velocità di raffreddamento durante il congelamento a cui corrispondono diverse estensioni della superficie di interfaccia tra acqua e ghiaccio. In ogni caso, si è assunto che la temperatura di nucleazione fosse pari a 263 K.

Velocità raffreddamento (K min <sup>-1</sup> )	Area superficie acqua-ghiaccio (m <sup>2</sup> )
0.1	0.103
0.229	0.136
0.357	0.161
0.486	0.184
0.614	0.203
0.743	0.223
0.871	0.241
1	0.255

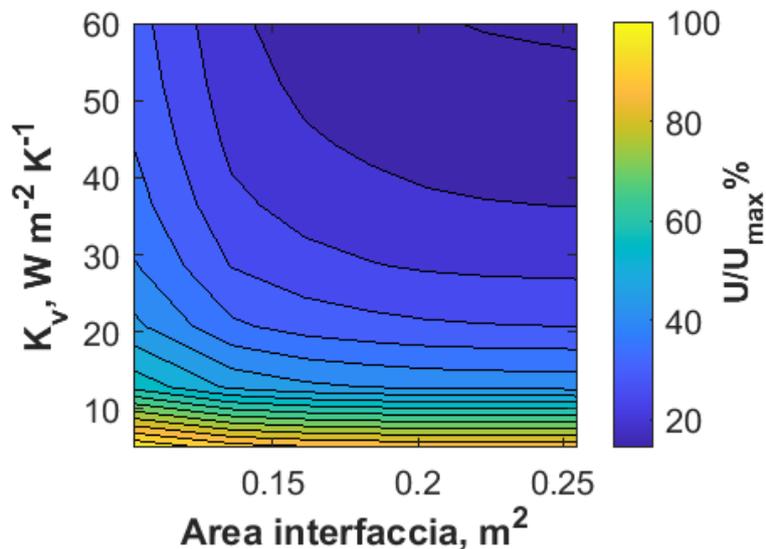
Per quanto riguarda la simulazione numero 3 (proteina stabile in bulk), il design space è riportato in Figura 4.13. Come si può osservare, l'effetto della denaturazione all'interfaccia è preponderante sull'effetto della velocità di scongelamento. Solamente per scongelamenti molto lenti (per valori di  $K_v$  inferiori ai 10 W/m<sup>2</sup>/K) si osserva un peggioramento dell'attività proteica.



**Figura 4.13** - Design space della simulazione numero 3 in Tabella 2.3 (proteina stabile in bulk), durante lo scongelamento. Viene mostrato l'effetto della velocità di tale processo, e dell'estensione iniziale della superficie acqua-ghiaccio, sulla proteina.

Nel caso di una proteina instabile a basse temperature (Figura 4.14), lo scongelamento svolge un ruolo molto più importante. I risultati migliori si ottengono quando entrambi i processi (congelamento e scongelamento) vengono svolti il più velocemente possibile, ovvero sottoponendo la proteina il meno tempo possibile alle basse temperature. La condizione peggiore, al contrario, risulta essere quella che combina basse aree di interfaccia (ovvero congelamento lento) e bassi valori di  $K_v$ . In particolare, bisognerebbe evitare di scendere sotto i  $15 \text{ W/m}^2/\text{K}$ , a prescindere da come è stato svolto il congelamento. Tipicamente, per uno scongelamento effettuato in aria a temperatura ambiente, il valore di  $K_v$  si aggira attorno ai  $5\text{-}10 \text{ W/m}^2/\text{K}$ . Da questi risultati si evince come, per massimizzare l'attività residua di un principio attivo instabile, sia necessario prestare attenzione anche ad un'eventuale fase di scongelamento.

Nel seguito si discuteranno le prove sperimentali che sono state usate per la verifica dei risultati di simulazione presentati in questa prima sezione.



**Figura 4.14** - Design space della simulazione numero 4 in Tabella 2.3 (proteina instabile in bulk), durante lo scongelamento. Viene mostrato l'effetto della velocità di tale processo, e dell'estensione iniziale della superficie acqua-ghiaccio, sulla proteina.

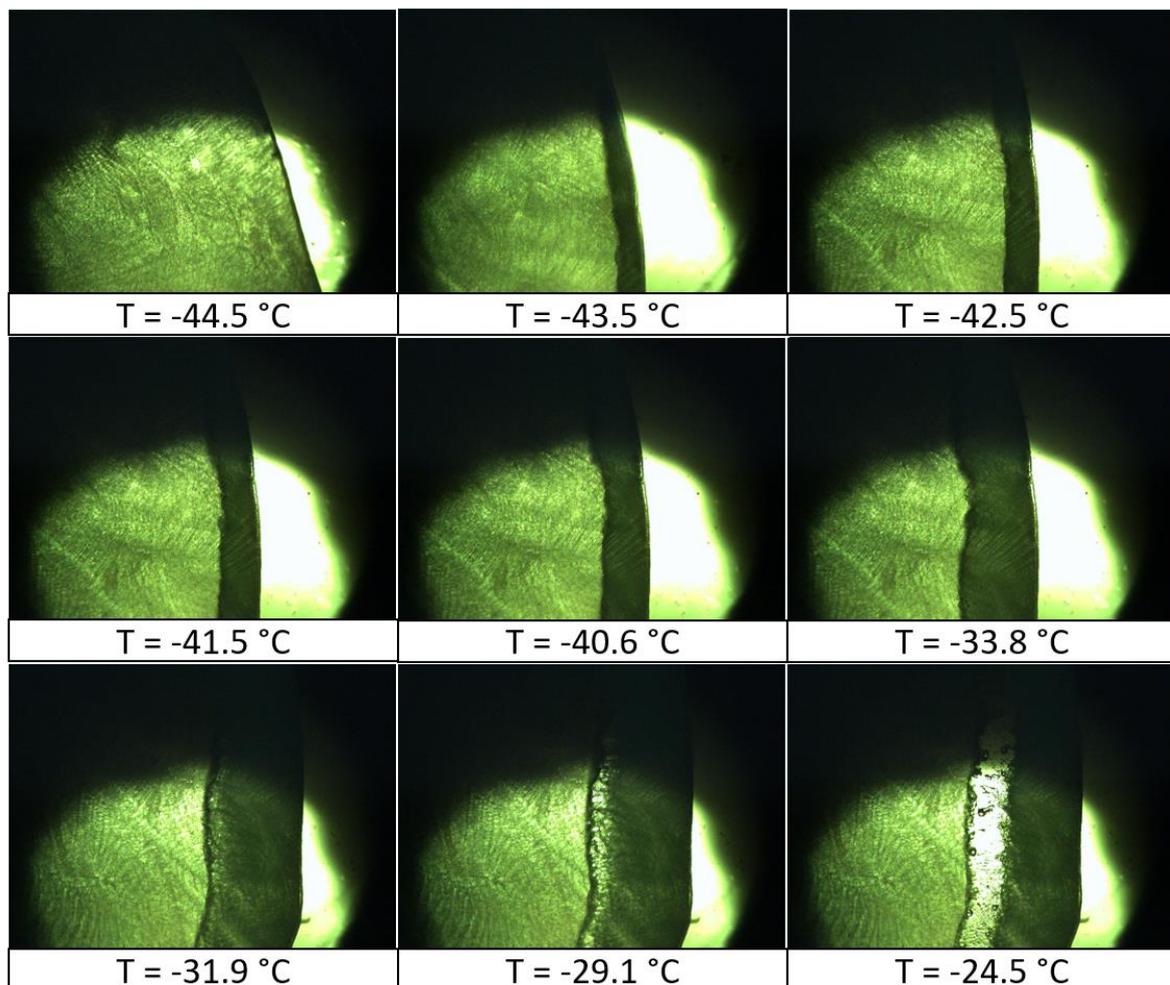
## 4.2. Caratterizzazione termica delle formulazioni da liofilizzare

Prima di poter effettuare delle prove di liofilizzazione completa, è stato necessario eseguire alcune caratterizzazioni termiche sulle formulazioni, al fine di poter impostare correttamente i cicli. Qui di seguito sono riportate le prove effettuate.

#### 4.2.1. FDM

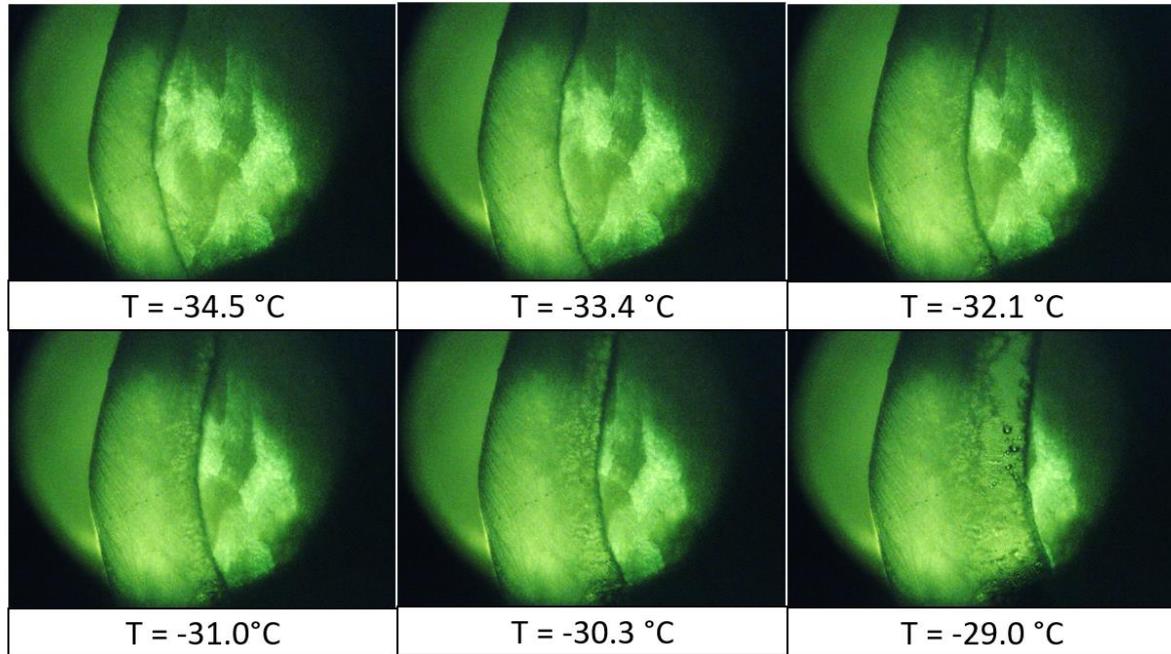
Figura 4.15 riporta alcune immagini estratte dalla prova al FDM eseguita su di un campione contenente saccarosio, dalle quali è possibile osservare l'avanzamento del fronte di sublimazione ed il collasso della struttura. Le immagini sono state catturate a differenti temperature, indicate al di sotto di ciascuna fotografia.

Come mostrano le immagini, il fronte di sublimazione parte dal bordo della goccia congelata, ed avanza verso l'interno della stessa. Quando la temperatura raggiunge la  $T_c$  del saccarosio ( $-32\text{ }^\circ\text{C}$ ), si possono osservare delle piccole fratture in corrispondenza del fronte di sublimazione, ma la zona essiccata mantiene la propria struttura. Una volta superata la  $T_c$ , l'intera porzione disidratata comincia a perdere struttura, per via dei moti viscosi, fino a raggiungere un collasso totale. A titolo di esempio si veda il fotogramma estratto alla temperatura  $-29.1\text{ }^\circ\text{C}$  in cui si osserva la formazione di numerose macchie bianche che coinvolgono tutto lo strato essiccato in prossimità del fronte di sublimazione. Il protocollo utilizzato è riportato in Tabella 3.1.



**Figura 4.15** - Avanzamento del fronte di sublimazione di un campione al 5% in peso di saccarosio in buffer citrato a pH 3.7. La porzione scura fa riferimento allo strato essiccato, mentre quella chiara al prodotto congelato.

Per quanto riguarda la formulazione contenente trealosio (5% in peso), le immagini estratte dalla prova al FDM sono riportate in Figura 4.16, mentre i dettagli della procedura sono riassunti in Tabella 3.2.



**Figura 4.16** - Avanzamento del fronte di sublimazione di un campione al 5% in peso di trealosio in buffer citrato a pH 3.7. La porzione scura fa riferimento allo strato essiccato, mentre quella chiara al prodotto congelato.

È stata inoltre eseguita una prova su di un campione contenente il 5% in peso di mannitolo. Purtroppo, però, non è stato possibile distinguere in maniera netta la fusione del mannitolo da quella del ghiaccio. Questo poiché il mannitolo possiede una  $T_{eu}$  di circa  $-1.5\text{ °C}$  (Kim et al., 1998), molto vicina alla temperatura di fusione del ghiaccio, rendendo così difficile catturare in maniera distinta i due eventi.

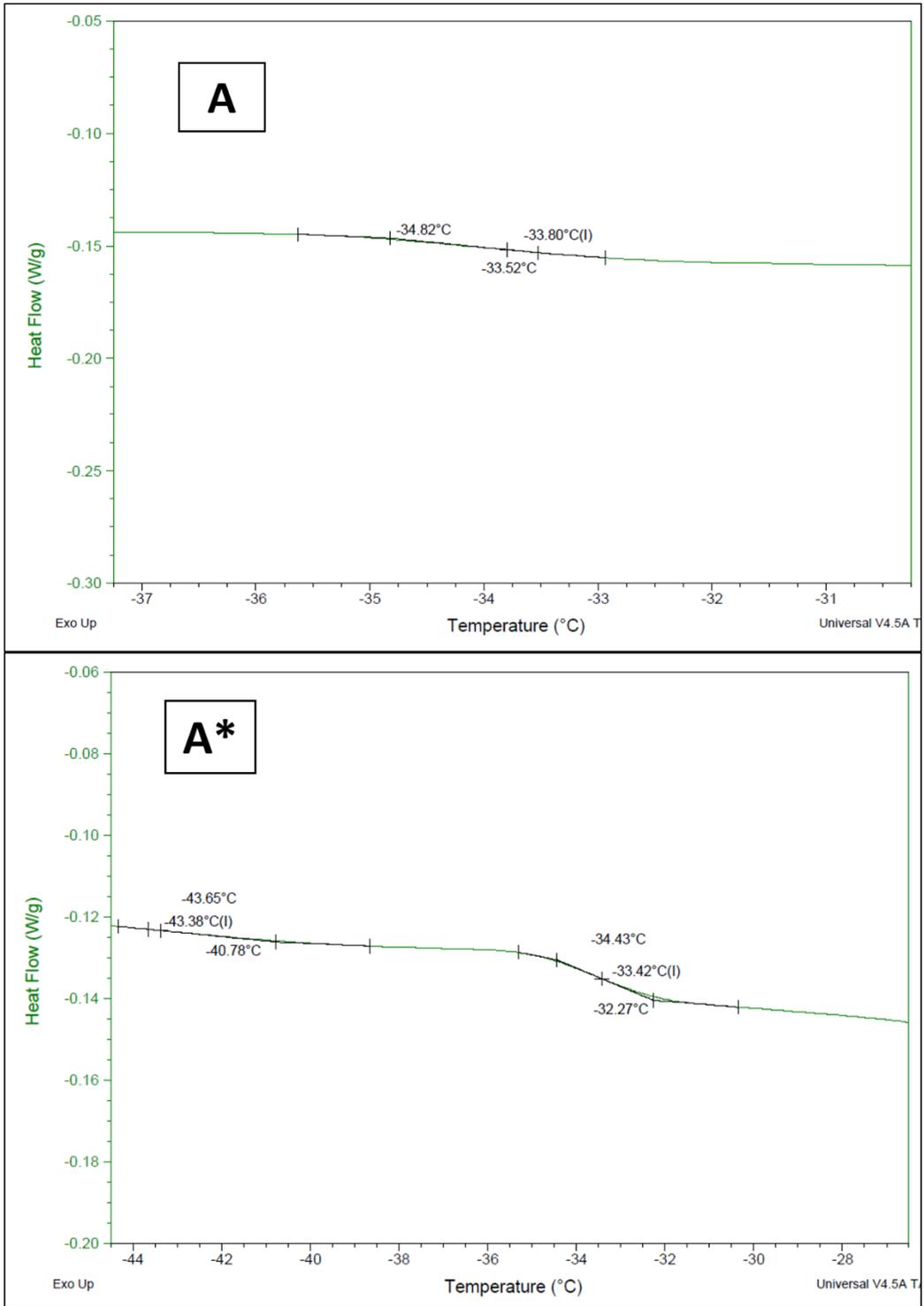
I valori di temperatura critica per le formulazioni analizzate sono riportati in Tabella 4.2, assieme ad i valori trovati in letteratura. Si precisa che i risultati tratti dalla letteratura non tengono tuttavia conto della presenza del buffer citrato, e sono quindi elencati a puro scopo indicativo.

**Tabella 4.2 - Riassunto delle prove al FDM.**

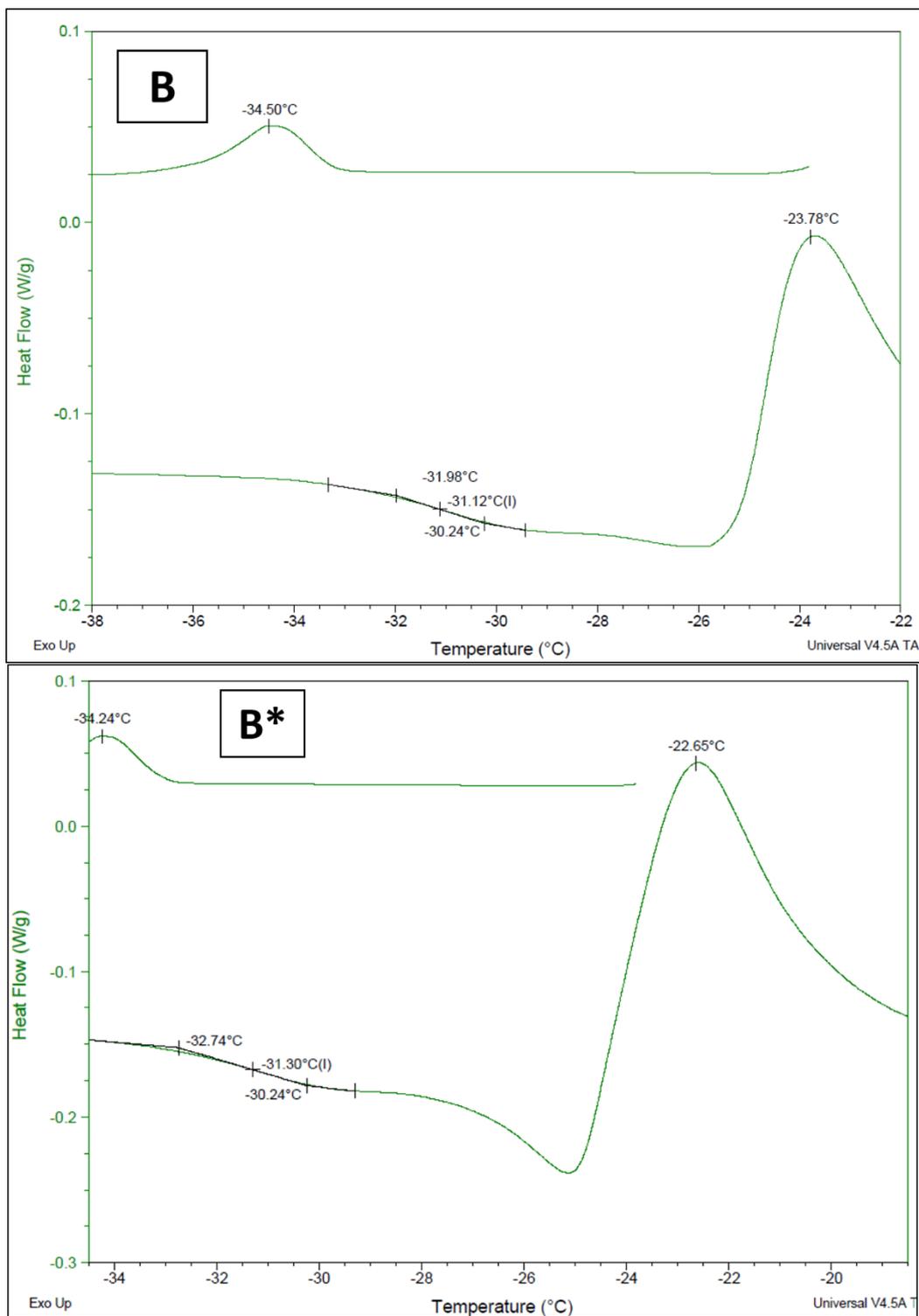
<b>Formulazione</b>	<b>Valore misurato (°C)</b>	<b>Valore da letteratura (°C)</b>
Saccarosio 5%	-31.9	-32.0 (Ward et al., 2019)
Trealosio 5%	-32.1	-28.5 (Adams et al., 1996)
Mannitolo 5%	-	-1.5 (Kim et al., 1998)

#### **4.2.2. DSC**

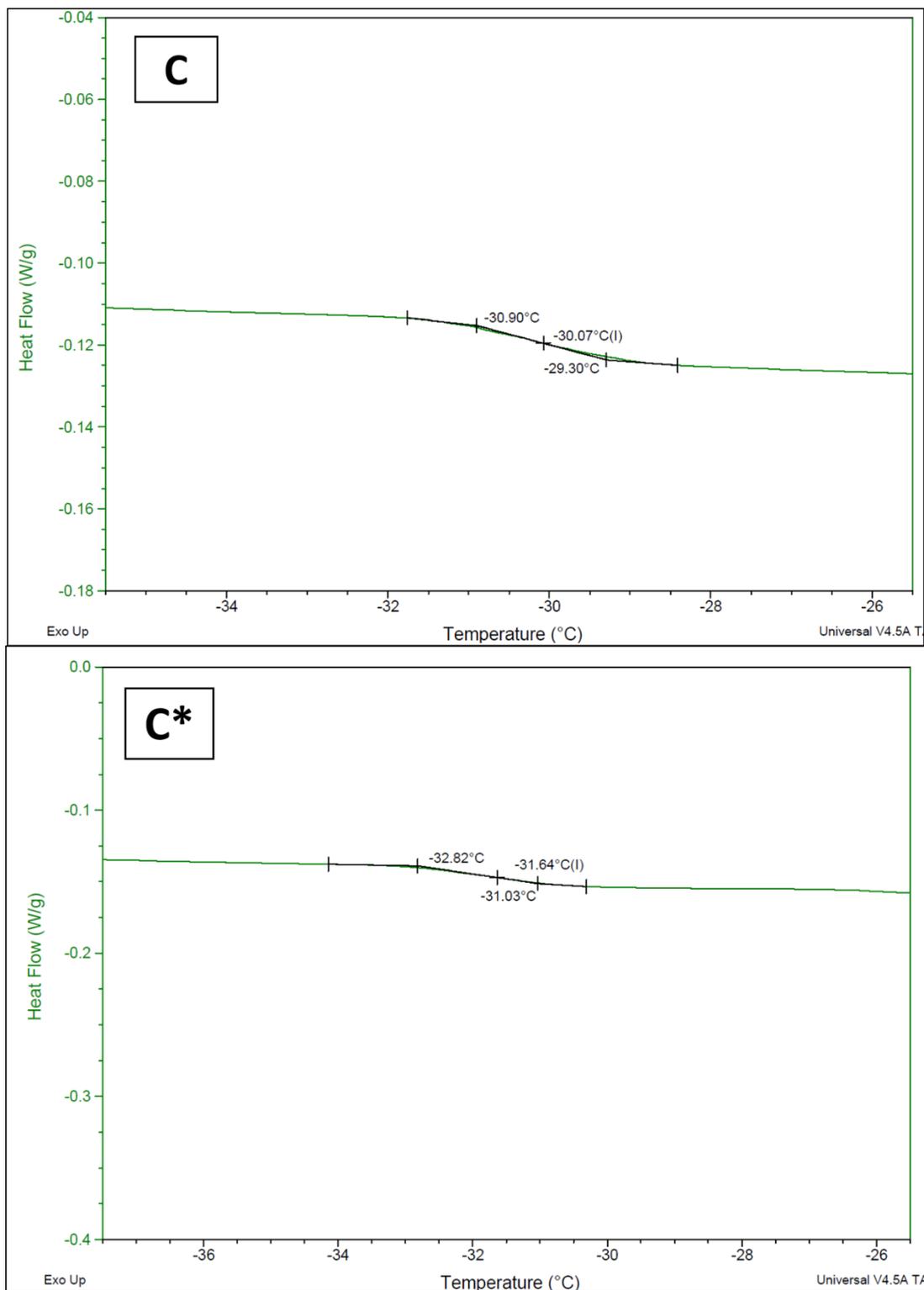
Lo scopo di queste analisi è di individuare le temperature di transizione vetrosa e di fusione degli eccipienti utilizzati, e verificare eventuali transizioni/cambi di fase relativi alla presenza del tensioattivo o del buffer citrato. Nelle sottostanti Figure 4.17, 4.18 e 4.19 sono riportate le sei prove effettuate sulle formulazioni di Tabella 3.3.



*Figura 4.17 - Risultati delle analisi DSC per i campioni A (sopra) ed A\* (sotto).*



**Figura 4.18** - Risultati delle analisi DSC per i campioni B (sopra) e B\* (sotto)



**Figura 4.19** - Risultati delle analisi DSC per i campioni C (sopra) e C\* (sotto).

In Figura 4.17 sono visualizzati i termogrammi DSC delle soluzioni di saccarosio al 5% in peso senza e con Tween 80. Dalla figura in alto è visibile un flesso ad una temperatura pari a  $-33.5^{\circ}\text{C}$ , riconducibile alla  $T_g$  del saccarosio, il cui valore riportato in letteratura è di  $-32^{\circ}\text{C}$  (Kasraian et al., 1998). Nella figura in basso è di nuovo presente il medesimo flesso, ma è inoltre visibile un'ulteriore transizione, attorno ai  $-43^{\circ}\text{C}$ . Questo evento è riconducibile alla transizione vetrosa

del citrato di sodio, buffer utilizzato per le prove, avente appunto una  $T_g$  di circa  $-41\text{ }^\circ\text{C}$  (B. S. Chang et al., 1992).

Per quanto riguarda le soluzioni B e B\* (Figura 4.18) il termogramma si presenta assai diverso. Si osserva un primo picco esotermico durante la fase di raffreddamento a  $-34.5\text{ }^\circ\text{C}$ , relativo alla cristallizzazione del mannitolo. Successivamente, durante il riscaldamento, si osserva un flesso a  $-31.3\text{ }^\circ\text{C}$ , riconducibile ad una transizione vetrosa del mannitolo rimasto amorfo, valore non dissimile dal dato pari a  $-33\text{ }^\circ\text{C}$  riportato in letteratura (Meredith et al., 1996). Infine, intorno ai  $-22\text{ }^\circ\text{C}$  è presente un secondo picco esotermico molto pronunciato, probabilmente dovuto alla cristallizzazione del mannitolo rimasto amorfo durante congelamento oppure alla conversione di una forma cristallina metastabile ad una più stabile che in genere si osserva  $-25\text{ }^\circ\text{C}$ . Questo avviene poiché, scongelando, l'eccipiente ritrova la mobilità necessaria per riorganizzarsi in maniera ordinata e cristallizzare nuovamente. L'estensione del picco suggerisce che la quantità di mannitolo cristallizzante sia notevolmente maggiore durante la seconda cristallizzazione rispetto alla prima.

In Figura 4.19, infine, sono riportati i termogrammi per le soluzioni contenenti trealosio. In questo caso i risultati sono simili a quelli di Figura 4.17, in quanto saccarosio e trealosio formano entrambi solidi amorfi in soluzione acquosa. In entrambi i casi (campione C e C\*) è stato osservato un unico flesso a circa  $-30\text{ }^\circ\text{C}$ , riconducibile alla  $T_g$  del trealosio.

In linea generale non si è osservata alcuna influenza da parte del tensioattivo sui fenomeni fisici sopracitati.

In definitiva, in Tabella 4.3 sono riassunti i risultati delle prove effettuate alla DSC.

*Tabella 4.3 - Riepilogo dei risultati delle formulazioni analizzate.*

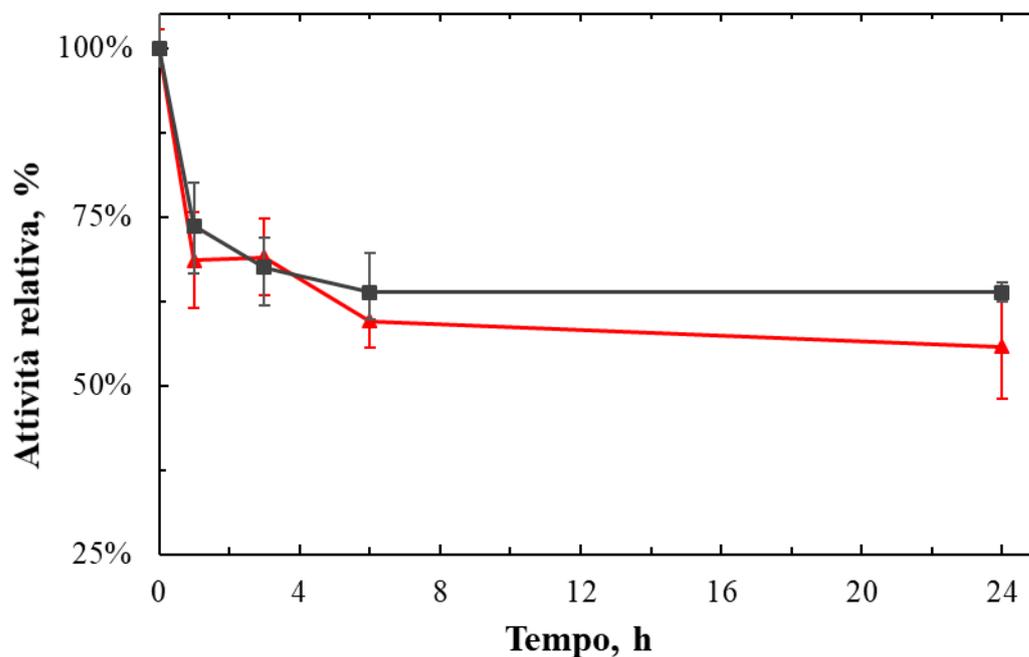
<b>Formulazione</b>	<b><math>T_g</math> (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>	<b><math>T_{cr1}</math> (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>	<b><math>T_{cr2}</math> (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>
A	-33.52	-	-
A*	-33.42	-	-
B	-31.12	-34.50 (cong.)	-23.78 (scong.)
B*	-31.30	-34.24 (cong.)	-22.65 (scong.)
C	-30.07	-	-
C*	-31.03	-	-

### 4.3. Studio della stabilità della Mioglobina a basse temperature.

Al fine di comprendere meglio i risultati sperimentali mostrati nei successivi paragrafi, è stata effettuata una prova di mantenimento a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (268 K). Questo tipo di prova ha permesso di valutare la stabilità a bassa temperatura della proteina campione utilizzata, durante un arco di tempo di 24 ore. Come mostrato in Figura 4.20, l'attività della proteina è stata misurata prima di effettuare la prova (valore usato come riferimento), e dopo 1, 3, 6, 24 ore, attraverso la procedura descritta nel Capitolo 2. Le formulazioni sottoposte all'esperienza contengono mioglobina ad una concentrazione di 0.1 mg/ml disciolta in buffer citrato a pH 3.7. Si differenziano tra di loro solo per la presenza o meno del tensioattivo Tween 80 (0.01% in peso).

Durante le prove non è stato osservato congelamento della soluzione, e di conseguenza ogni perdita di attività proteica è riconducibile solamente alla denaturazione a freddo. Già dopo solamente 1 ora dall'inizio della prova si è osservata una importante perdita di attività, mentre soltanto il 64% (o il 56% nel caso della formulazione contenente tensioattivo) dell'attività proteica è stata recuperata dopo 24 ore.

Questi risultati confermano che la proteina campione scelta, al contrario di altre proteine comunemente utilizzate per questo tipo di prova, risulta sensibile alla denaturazione a freddo soprattutto a bassi valori di pH (Shosheva et al., 2003), e che questa denaturazione avviene anche molto in fretta. I risultati della prova confermano inoltre che il tensioattivo ha un effetto deleterio per la mioglobina a bassi pH, in quanto tende a promuoverne la denaturazione.



*Figura 4.20 - Attività proteica residua in funzione del tempo di campioni liquidi mantenuti ad una temperatura di 268 K. Per questa prova sono state considerate due formulazioni: 0.1 mg/ml di mioglobina in buffer citrato a pH 3.7 senza (linea nera) e con (linea rossa) tensioattivo.*

#### 4.4. Studio della stabilità della Mioglobina durante congelamento e scongelamento

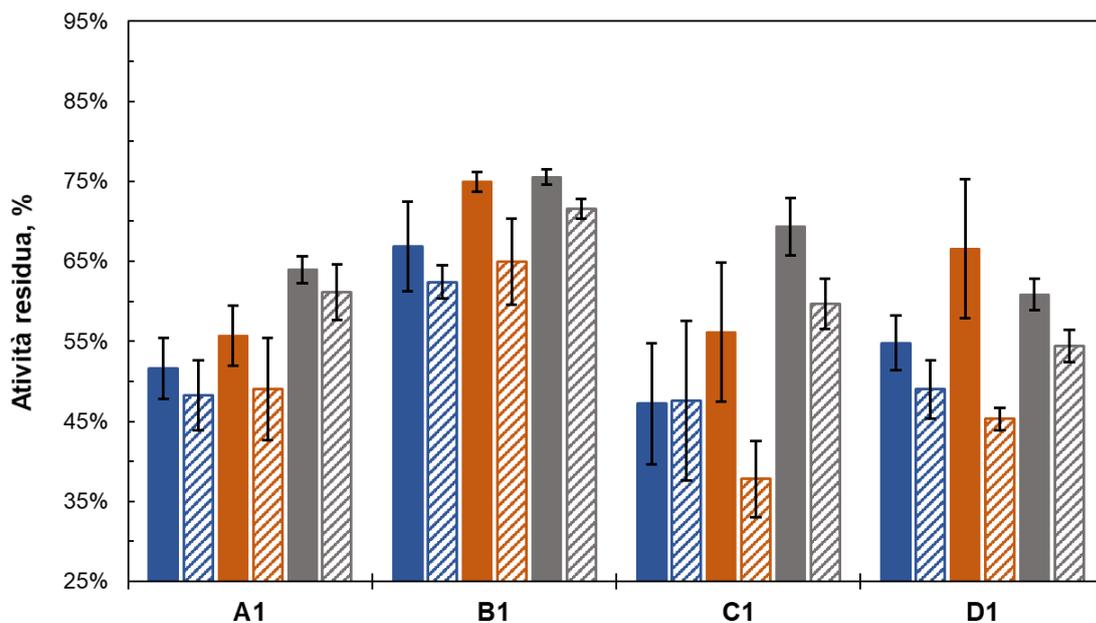
Come spiegato nella sezione 3.4, nella prima prova di congelamento-scongelamento si è cercato di valutare l'effetto dell'interfaccia, della concentrazione di proteina e della presenza di tensioattivo sulla stabilità della proteina campione. In particolare, per quanto riguarda la velocità di congelamento, ci si è posizionati nei punti più estremi del design space elaborato nel paragrafo precedente: sono stati considerati un protocollo molto lento (estrema sinistra del design space) ed uno veloce (estrema destra nel design space). È stato inoltre effettuato un congelamento in azoto liquido (rappresentante un protocollo di congelamento molto veloce), con l'obiettivo di massimizzare l'interfaccia acqua-ghiaccio e dimostrare che l'effetto di quest'ultima è trascurabile nel caso di un prodotto instabile in bulk.

Per questa prova sono state utilizzate 4 differenti formulazioni:

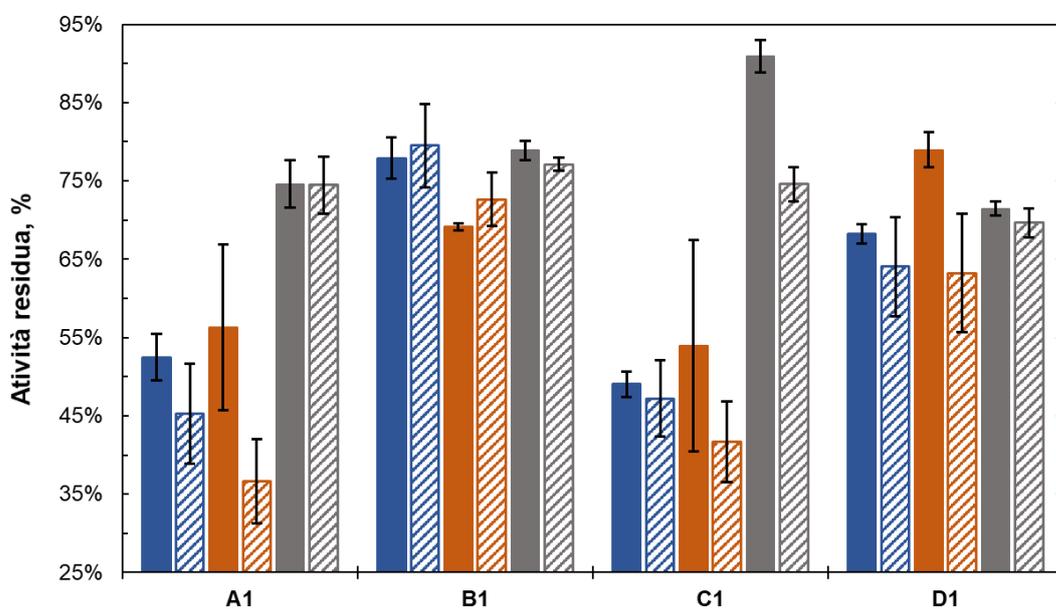
- A<sub>1</sub>: 0.1 mg/ml Mb in buffer citrato 10mM (pH 3.7);
- B<sub>1</sub>: 0.2 mg/ml Mb in buffer citrato 10mM (pH 3.7);
- C<sub>1</sub>: 0.1 mg/ml Mb in buffer citrato 10mM (pH 3.7) + Tween 80 0.01% in peso;
- D<sub>1</sub>: 0.2 mg/ml Mb in buffer citrato 10mM (pH 3.7) + Tween 80 0.01% in peso.

In tutti i casi, lo scongelamento è stato effettuato in aria.

Nelle figure sottostanti, sono riportati i valori di assorbanza a 410 nm (Figura 4.21) ed a 280 nm (Figura 4.22), espressi come percentuale relativa al valore misurato prima di eseguire l'esperimento. L'assorbanza a 280 nm è relativa alla concentrazione di proteina, a prescindere che essa sia nella propria struttura nativa o meno. Un decremento del valore misurato in questo punto dello spettro dopo congelamento-scongelamento e centrifugazione, è indice di aggregazione. L'assorbanza a 410 nm, invece, è legata non solo alla concentrazione, ma anche a variazioni di conformazione della proteina. Per esempio, è stato osservato che la perdita di struttura secondaria e terziaria della mioglobina attraverso l'aggiunta di urea 8 M causa una riduzione del coefficiente di assorbimento a 410 nm, ma non a 280 nm (Anderson et al., 1995). Questo avviene perché, quando la proteina perde la propria struttura, il gruppo eme viene esposto all'ambiente esterno e perde la sua conformazione. Il diverso significato delle misure a 280 nm (aggregazione) e 410 nm (aggregazione + denaturazione), si riverbera nei risultati sperimentali osservati: i valori di assorbanza a 410 nm sono generalmente più bassi, proprio perché tengono conto anche dell'unfolding.



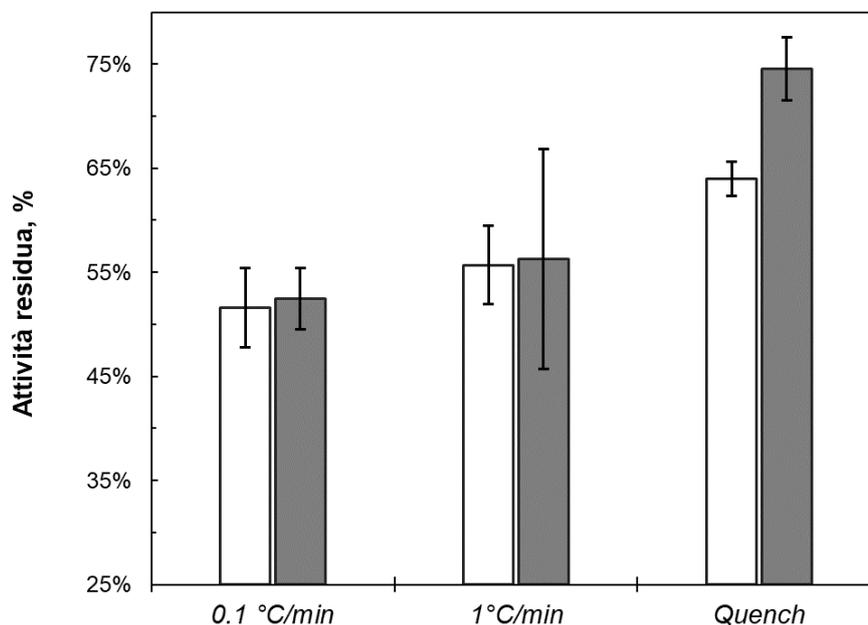
**Figura 4.21** - Risultati della prova numero 1 di congelamento. È riportata la percentuale di attività residua dopo 1 (barre piene) e 3 (barre tratteggiate) cicli di congelamento, ricavata come diminuzione di assorbanza a 410 nm. Sono riportati i risultati di diversi protocolli di congelamento: 0.1 K/min (barre blu), 1 K/min (barre arancioni) e quench in azoto liquido (barre grigie).



**Figura 4.22** - Risultati della prova numero 1 di congelamento. È riportata la percentuale di attività residua dopo 1 (barre piene) e 3 (barre tratteggiate) cicli di congelamento, ricavata come diminuzione di assorbanza a 280 nm. Sono riportati i risultati di diversi protocolli di congelamento: 0.1 K/min (barre blu), 1 K/min (barre arancioni) e quench in azoto liquido (barre grigie).

#### 4.4.1. Effetto della velocità di raffreddamento

Come si può osservare nella Figura 4.23, riportante a titolo di esempio i dati relativi al solo campione A<sub>1</sub>, il congelamento a 0.1 K/min si è tradotto nei risultati peggiori, il congelamento quench ha preservato maggiormente l'attività proteica, mentre il congelamento ad 1 K/min mostra risultati intermedi. In generale questo indica che la denaturazione all'interfaccia non è il principale fattore di stress per questo prodotto, come ci si aspettava. Infatti, il protocollo che genera un'area superficiale maggiore (congelamento quench) è anche quello che preserva meglio la proteina. Al contrario, questi risultati sono in linea con l'assunzione che la denaturazione in bulk sia il meccanismo dominante. Questi risultati sono pertanto concordi con quanto estratto dalle simulazioni teoriche: lo scenario osservato in Figura 4.5 è stato qui osservato anche sperimentalmente. Questo significa che l'approccio modellistico può essere un valido strumento per capire, in linea generale, il comportamento delle proteine durante il congelamento.



**Figura 4.23** - Estratto dei dati presenti nelle Figure 4.21 e 4.22. I dati sono relativi al solo campione A<sub>1</sub>. Le barre bianche sono relative alle misurazioni a 410 nm, quelle grigie a 280 nm.

#### 4.4.2. Effetto del tensioattivo

La generale predisposizione della mioglobina a pH 3.7 a subire denaturazione in bulk, è evidente anche osservando l'effetto del tensioattivo. Quando il meccanismo principale è la denaturazione all'interfaccia, l'aggiunta di Polisorbato 80 alle formulazioni risulta in un miglioramento della stabilità proteica (Bam et al., 1998; B. S. Chang et al., 1996; Chou et al., 2005; Lee et al., 2011). In questo esperimento, invece, l'aggiunta del tensioattivo ha portato ad un peggioramento dell'attività residua, molto evidente nelle misurazioni a 410 nm (Figura 4.21). Ciò può essere spiegato assumendo che i tensioattivi tendano ad alterare la conformazione della mioglobina, soprattutto a pH acidi. Questo comportamento risulta ad ogni modo interessante, dato che la letteratura scientifica risulta essere divisa su questo punto. Sebbene alcuni autori suggeriscano che il polisorbato abbia un effetto sulla struttura secondaria

delle proteine (Arsiccio & Pisano, 2018b; Deechongkit et al., 2009), altri affermano che il suo contributo sia trascurabile (Bam et al., 1996; Jones et al., 2001). Questa controversia nasce anche dal fatto che spesso gli effetti della denaturazione in bulk e all'interfaccia sono difficili da separare quanto si trattano formulazioni proteiche. Per questo motivo risulta di nuovo utile l'utilizzo di un modello teorico in grado di considerare in maniera separata i due meccanismi.

#### **4.4.3. Effetto della concentrazione di mioglobina**

Un altro effetto che è stato valutato durante questa prova di congelamento-scongelo è quello relativo alla concentrazione di mioglobina. Raddoppiando la concentrazione da 0.1 mg/ml a 0.2 mg/ml, si è visto un miglioramento dell'attività residua. Questo non è stato osservato nelle simulazioni effettuate (Figure 4.7 e 4.8), nelle quali l'effetto della concentrazione risulta significativo solamente quando lo stress principale è la denaturazione all'interfaccia. In quest'ultimo caso, l'effetto è stato spiegato ipotizzando che un aumento di concentrazione faccia diminuire la percentuale di molecole adsorbite, riducendo la relativa perdita di attività. Dalle prove sperimentali, tuttavia, è stato riscontrato un netto miglioramento anche per un prodotto instabile. Questo può avere due spiegazioni:

- Anche se, per la mioglobina a pH 3.7, il meccanismo controllante risulta essere la denaturazione in bulk, è possibile che il contributo della denaturazione all'interfaccia non sia comunque trascurabile. Se questa ipotesi fosse vera, l'aggiunta di tensioattivo, che previene l'interazione con l'interfaccia, dovrebbe ridurre l'effetto benefico osservato aumentando la concentrazione. Effettivamente, i risultati sperimentali mostrano che il miglioramento di stabilità tra le formulazioni C<sub>1</sub> e D<sub>1</sub> è molto limitato, decisamente inferiore al caso in cui si confrontino le formulazioni A<sub>1</sub> e B<sub>1</sub>.
- Un'altra ipotesi è che questa stabilizzazione sia correlata ad un maggiore ingombro sterico tra le proteine a concentrazioni maggiori. Questo causerebbe una inibizione del processo di unfolding, per via della repulsione che le une esercitano sulle altre. Questo meccanismo non è tenuto in conto nel modello teorico, il che spiegherebbe l'impossibilità di prevedere questo fenomeno nel design space (Figura 4.8). Questa spiegazione è stata proposta in letteratura (Tang & Pikal, 2005), dove si è osservata una diminuzione della temperatura di denaturazione a freddo della  $\beta$ -lattoglobulina, all'aumentare della concentrazione della proteina.

#### **4.4.4. Effetto dello scongelamento**

Come già accennato, spesso le proteine vengono conservate allo stato congelato prima di essere sottoposte a liofilizzazione, andando incontro quindi anche ad una fase di scongelamento. Per questo motivo si è deciso di effettuare una seconda prova di congelamento-scongelo con l'obiettivo di valutare eventuali effetti di diverse velocità di scongelamento, ed individuare la migliore combinazione di protocolli per l'intero processo.

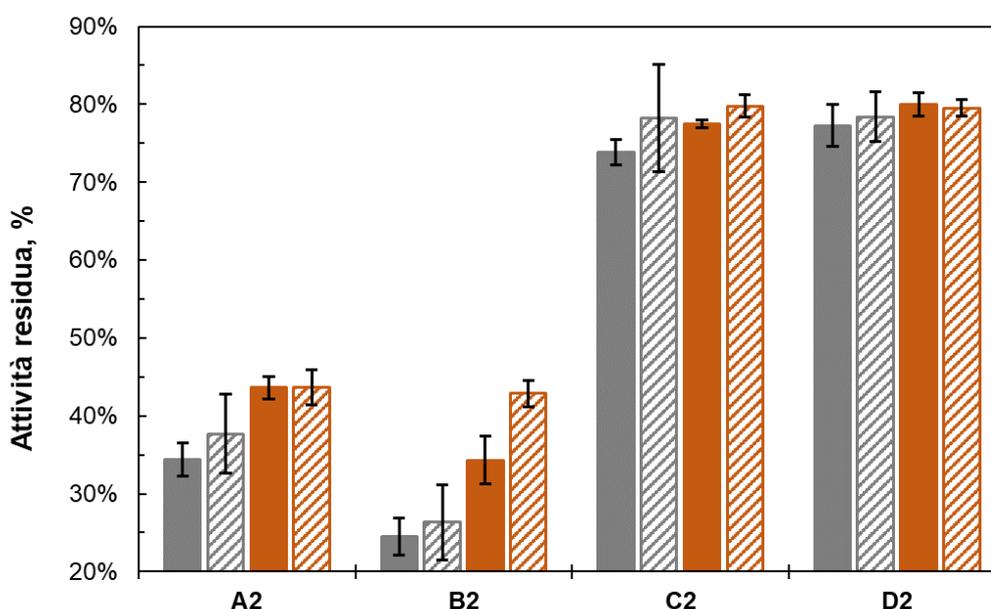
Sono state considerate 4 formulazioni (Tabella 3.5): due stabili (pH 6.5) e due instabili (pH 3.7), due senza e due con tensioattivo. I risultati sono riportati in Figura 4.24, nella quale:

- A<sub>2</sub>: 0.1 mg/ml Mb in buffer citrato 10mM (pH 3.7);
- B<sub>2</sub>: 0.1 mg/ml Mb in buffer citrato 10mM (pH 3.7) + Tween 80 0.01% in peso;
- C<sub>2</sub>: 0.1 mg/ml Mb in buffer citrato 10mM (pH 6.5);
- D<sub>2</sub>: 0.1 mg/ml Mb in buffer citrato 10mM (pH 6.5) + Tween 80 0.01% in peso.

Mentre, per quanto riguarda i protocolli, ne sono stati utilizzati 4 differenti:

- Protocollo 1: congelamento a 0.1K/min + scongelamento a 0.5 K/min;
- Protocollo 2: congelamento a 0.1K/min + scongelamento in bagno d'acqua a ~20°C;
- Protocollo 3: congelamento quench + scongelamento a 0.5 K/min;
- Protocollo 4: congelamento quench + scongelamento in bagno acqua a ~20°C.

Dal grafico si può immediatamente intuire quanto le formulazioni a pH 3.7 mostrino, a fine prova, molta meno attività residua rispetto alle controparti a pH 6.5, le quali risentono in minima parte dell'effetto di diversi protocolli di scongelamento, soprattutto in presenza di Tween 80. Per quanto riguarda la mioglobina a pH 3.7, si possono fare alcune osservazioni. In linea generale valgono gli stessi ragionamenti già fatti in precedenza: i risultati migliori si ottengono in ogni caso operando il più velocemente possibile, mentre utilizzando il protocollo 1 si riscontra una maggiore perdita di attività. I valori più elevati di attività residua, infatti, si riscontrano per il protocollo 4, composto da congelamento quench in azoto liquido e scongelamento in bagno d'acqua, a conferma del fatto che il parametro discriminante risulta essere il tempo che la soluzione passa a basse temperature ed allo stato liquido. Risulta interessante confrontare anche i risultati dei protocolli intermedi: il protocollo 3 ottiene risultati sempre migliori del protocollo 2, a verifica del fatto che il congelamento risulta essere più stressante dello scongelamento.



**Figura 4.24** - Risultati della prova numero 2 di congelamento. Vengono mostrate le attività residue della mioglobina sottoposta a congelamento molto lento (barre grigie) e molto veloce (barre arancioni). Le barre piene fanno riferimento a scongelamento lento, mentre quelle tratteggiate a scongelamento veloce.

Analogamente alla prima prova, anche in questa è stato valutato l'effetto del tensioattivo. In generale la presenza di polisorbato riduce la stabilità proteica, tranne nel protocollo 4 con il quale si ottengono valori simili alla formulazione priva di Tween 80. Inoltre, sono stati osservati differenti comportamenti al variare dei protocolli:

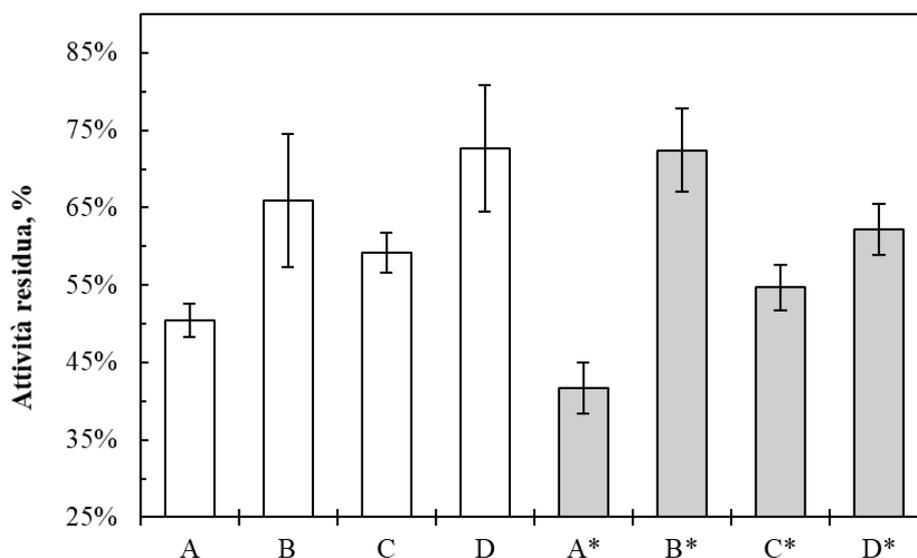
- In assenza di Tween 80, lo scongelamento sembra avere meno peso sulla stabilità della proteina, soprattutto per il congelamento quench, mentre operando un congelamento a 0.1 K/min risulta migliore uno scongelamento veloce.
- Al contrario, in presenza del polisorbato, il protocollo di scongelamento sembra avere un'influenza maggiore sulla stabilità proteica. Più nel dettaglio, applicando un congelamento lento si osserva una differenza di pochi punti percentuali, mentre operando tramite quench la differenza è molto più marcata. Questo è ancora una volta in linea con i risultati ottenuti dalle simulazioni (Figura 4.14).

## 4.5. Stabilità della Mioglobina dopo liofilizzazione

Dopo aver studiato la stabilità della Mioglobina alle basse temperature e durante i cicli di congelamento, è stata effettuata una prova di liofilizzazione completa. Lo scopo di questa prova è stato quello di osservare il comportamento della proteina accoppiata a diversi eccipienti, e di valutarne la stabilità sia durante il congelamento, che durante l'essiccamento.

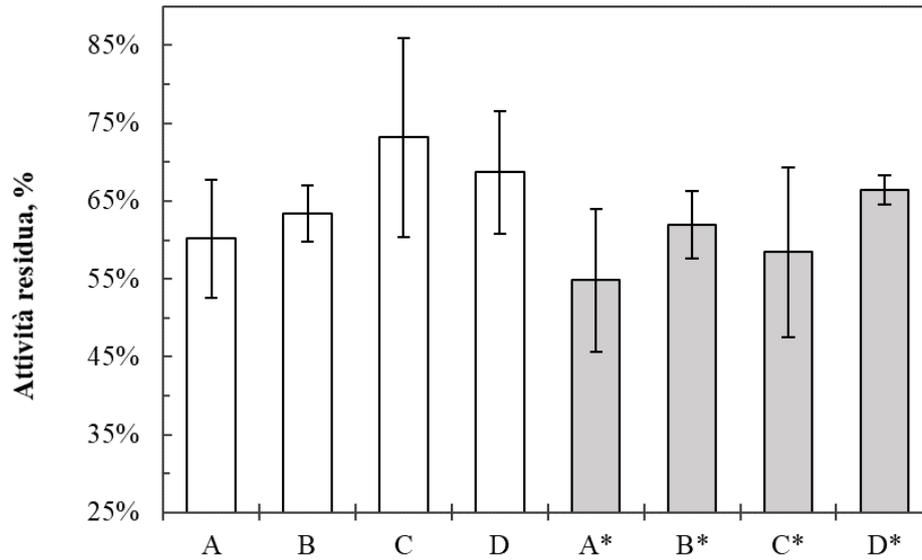
A seguito della caratterizzazione termica dei campioni (paragrafo 4.2), è stato effettuato un ciclo di liofilizzazione sulle formulazioni precedentemente analizzate, utilizzando il protocollo descritto in Tabella 3.8.

In Figura 4.25 sono riportati i risultati delle analisi di stabilità proteica effettuate prima dell'essiccamento, ovvero dopo il solo congelamento. Per effettuare le analisi, i campioni sono stati scongelati in aria a temperatura ambiente. I risultati peggiori, come ci si aspettava, sono stati ottenuti per le formulazioni A ed A\*, prive di crioprotettori. In particolare, A\* risulta la più instabile, in quanto la presenza di tensioattivo, accoppiata ad un congelamento lento, enfatizzano la denaturazione della mioglobina. Tra le formulazioni contenenti eccipienti, i risultati peggiori sono stati ottenuti dai campioni contenenti mannitolo, in quanto, cristallizzando, esso genera una ulteriore interfaccia sulla quale la proteina può adsorbirsi e, di conseguenza, denaturarsi. Saccarosio e trealosio, invece, hanno dimostrato di essere i crioprotettori più efficaci durante la prova. Il saccarosio, in particolare, è l'unico che ha mostrato una stabilità maggiore in presenza di Tween 80.



**Figura 4.25** - Valori di attività residua della mioglobina dopo congelamento senza eccipiente (A,A\*), con saccarosio (B,B\*), con mannitolo (C,C\*) e con trealosio (D,D\*). Le barre bianche sono relative alle formulazioni senza tensioattivo, mentre quelle in grigio con tensioattivo.

In Figura 4.26 sono invece riportati i risultati di attività residua della mioglobina dopo il processo completo di liofilizzazione. Per effettuare le analisi i campioni sono stati reidratati con 2 mL di acqua ultrapura. È interessante notare come la stabilità proteica dopo essiccamento sia decisamente superiore rispetto a quella ottenuta dopo congelamento. Questo è a conferma del fatto che lo scongelamento è in grado di apportare notevoli stress denaturativi alla mioglobina in queste condizioni, soprattutto se effettuato molto lentamente, in accordo con i risultati teorici (Figura 4.14). Per questo motivo l'essiccamento è meno deleterio rispetto allo scongelamento per la proteina in esame. Anche in questo caso le formulazioni prive di protettori risultano le meno stabili, mentre il risultato migliore è stato sorprendentemente fornito dalla formulazione C, contenente mannitolo senza tensioattivo. Il campione C\*, invece, non è stato in grado di fornire altrettanta protezione. Per quanto riguarda saccarosio e trealosio, il secondo sembra essere più efficace durante l'essiccamento rispetto al primo, anche in presenza di Tween 80.



**Figura 4.26** - Valori di attività residua della mioglobina dopo essiccamento senza eccipiente (A, A\*), con saccarosio (B, B\*), con mannitolo (C, C\*) e con trealosio (D, D\*). Le barre bianche sono relative alle formulazioni senza tensioattivo, mentre quelle in grigio con tensioattivo.



## 5. Conclusioni

In questo lavoro di tesi si è studiato il comportamento della Mioglobina (proteina campione) durante la liofilizzazione, con particolare attenzione alla fase di congelamento. Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare in generale gli effetti del processo su biomolecole instabili, cercando di individuare le migliori condizioni operative e di dimostrare che la denaturazione all'interfaccia acqua-ghiaccio non è il meccanismo dominante in questi casi. Si è cercato inoltre di dimostrare che un approccio teorico può essere utilizzato per la progettazione di un processo di liofilizzazione, così come per le formulazioni.

Sono stati utilizzati due tipi di approcci: uno teorico, al fine di prevedere il comportamento della Mioglobina, ed uno empirico, per verificarne i risultati. Per il primo, si è applicato il concetto di Quality by Design, facendo utilizzo di uno strumento denominato Design Space, nel quale vengono studiati gli effetti della variazione di alcuni parametri di processo sulla stabilità di una proteina generica. In questo contesto sono state modellate sia la fase di congelamento che quella di scongelamento, al fine di conoscere i profili termici e di altre proprietà fisiche del prodotto studiato. È stato utilizzato un modello reperito in letteratura (Arsiccio et al., 2018) in grado di calcolare la dimensione dei cristalli di ghiaccio formati durante il processo di congelamento, al fine di valutare l'area della superficie di interfaccia acqua-ghiaccio. È stato infine implementato un modello cinetico in grado di descrivere sia la denaturazione a freddo che quella interfacciale, ottenendo una stima della perdita di attività della proteina. Una volta implementato il codice in Matlab, sono stati creati i Design Space, valutando l'effetto delle velocità di congelamento e scongelamento, della temperatura di nucleazione, e della concentrazione di proteina. Nelle simulazioni sono stati considerati vari scenari di stabilità proteica e di reversibilità del processo di denaturazione. Quello che è emerso dalle simulazioni porta a pensare che il principale meccanismo sia la denaturazione in bulk, e che la denaturazione all'interfaccia ricopra un ruolo marginale. Di conseguenza, si è osservato come congelamenti troppo lenti siano deleteri per una proteina instabile, così come delle alte temperature di nucleazione (esse incrementano la dimensione dei cristalli, diminuendo la superficie di interfaccia). La concentrazione di proteina sembra avere un effetto stabilizzante nel caso di in cui la denaturazione all'interfaccia sia dominante, mentre non mostra alcun effetto per una proteina instabile in bulk. Questo porterebbe a pensare che l'effetto della concentrazione sia in qualche modo collegato al quantitativo di molecole disponibili all'adsorbimento all'interfaccia acqua-ghiaccio. Per le velocità di congelamento e scongelamento, in generale l'approccio migliore prevede l'utilizzo di protocolli di volte a minimizzare i tempi di congelamento e scongelamento. Dalle valutazioni teoriche si può quindi concludere che la variabile discriminante nel trattamento di biomolecole instabili non sia l'interfaccia acqua-ghiaccio ma piuttosto il tempo che il prodotto passa a basse temperature, prima di formare una matrice solida in grado di rallentare la cinetica di denaturazione. È inoltre emerso come lo scongelamento contribuisca in maniera non trascurabile alla denaturazione proteica, quasi quanto il congelamento.

Per quanto riguarda l'approccio sperimentale, invece, si è fatto uso della Mioglobina come proteina campione, messa in condizioni di instabilità tramite l'utilizzo di buffer citrato (10 mM) a pH 3.7. Lo scopo delle prove è stato quello di validare il modello, studiando l'effetto degli stessi parametri da esso considerati, e di valutare l'effetto di altre variabili, come la presenza di un tensioattivo e di eccipienti (saccarosio, mannitolo e trealosio). Sono state eseguite due prove di cicli di congelamento: nella prima sono stati valutati gli effetti di differenti velocità di congelamento (0.1 K min<sup>-1</sup>, 1 K min<sup>-1</sup> e quench in azoto liquido), di differenti concentrazioni di Mioglobina (0.1 mg ml<sup>-1</sup> e 0.2 mg ml<sup>-1</sup>) e della presenza di tensioattivo (Tween 80, 0.01% in peso). Nella seconda prova sono state utilizzate diverse combinazioni di protocolli di congelamento (0.1 K min<sup>-1</sup> e quench) e scongelamento a temperatura ambiente (in aria ed in bagno d'acqua). Quello che è emerso sembra confermare i risultati del modello teorico: la strategia migliore per ottenere la più alta attività residua prevede congelamenti e scongelamenti veloci. Il tensioattivo non ha effetto benefico, al contrario porta a maggiore instabilità, a dimostrazione del fatto che la denaturazione all'interfaccia è trascurabile. Dalle prove sperimentali si è osservato inoltre un aumento della stabilità della Mioglobina all'aumentare della concentrazione della stessa, anche per una formulazione instabile dove la denaturazione principale avviene in bulk. Questo non era stato osservato nelle prove modellistiche, e porta a pensare che la spiegazione di questo fenomeno risieda in un qualcosa che dal modello non era stato considerato: una stabilizzazione di tipo sterico tra le proteine, in grado di inibire il dispiegamento della struttura della Mioglobina, impedendone la denaturazione.

È stata poi effettuata una prova di liofilizzazione completa, al fine di valutare il contributo delle fasi di essiccamento sulla stabilità proteica, confrontandolo con il contributo dato dal congelamento. Per le prove è stato considerato anche l'uso di eccipienti quali saccarosio, mannitolo e trealosio (tutti al 5% in peso). Ciò che è emerso dimostra come il congelamento risulti la fase più critica del processo. Si sono inoltre osservati valori di stabilità proteica maggiori dopo l'essiccamento, rispetto a quelli misurati dopo scongelamento: questo conferma quanto visto attraverso il modello teorico, ovvero come la fase di scongelamento sia a sua volta un processo molto stressante. Poiché molte formulazioni vengono conservate allo stato congelato anche prima della liofilizzazione stessa, questo può essere un risultato apprezzabile. L'effetto degli eccipienti è, come ci si aspettava, benefico. L'utilizzo di disaccaridi in grado di formare matrici amorfe (saccarosio e trealosio) porta ad una maggiore attività residua a valle del processo. Il mannitolo, al contrario, si mostra meno efficace per via del fatto che cristallizza, creando una ulteriore superficie di interfaccia sulla quale la proteina può denaturarsi.

In definitiva, da questo lavoro di tesi sono emersi alcuni risultati interessanti. In primis si è dimostrato come l'utilizzo di un approccio più teorico sia possibile nell'ambito della progettazione di formulazioni proteiche. Attraverso il Quality by Design è infatti possibile prevedere, seppur in linea generale, il comportamento di una proteina durante il congelamento. Sono stati ricavati inoltre risultati sperimentali riguardanti la risposta di biomolecole instabili alla liofilizzazione, ed informazioni concernenti i protocolli e le formulazioni più adeguati al loro trattamento. Studi futuri potrebbero riguardare un affinamento del modello teorico, con riferimento soprattutto all'implementazione di effetti riguardanti i tensioattivi, la concentrazione proteica e gli eccipienti.

## Lista dei simboli

$A$	Superficie del flacone a contatto con lo scaffale del liofilizzatore
$a$	Coefficiente per il calcolo della viscosità
$A_f$	Costante di frequenza
$a_s$	Rapporto tra superficie reale e fittizia dei cristalli di ghiaccio
$b$	Coefficiente per il calcolo della viscosità
$c$	Coefficiente per il calcolo della viscosità
$c_e$	Concentrazione eccipiente
$c_p$	Calore specifico del prodotto
$c_w$	Frazione in massa di acqua
$c_{w,cryo}$	Frazione in massa di acqua nella soluzione crioconcentrata
$D$	Diametro flacone
$d_p$	Diametro cristalli di ghiaccio
$\Delta c_p$	Variazione di calore specifico
$\Delta G$	Variazione di energia libera di Gibbs
$\Delta G_D^0$	Variazione di energia libera di Gibbs durante la denaturazione, ad una condizione di riferimento
$\Delta H_0$	Variazione di entalpia molare
$\Delta H_D^0$	Variazione di entalpia durante la denaturazione, ad una condizione di riferimento
$\Delta H_f$	Calore latente di cristallizzazione
$\Delta S_0$	Variazione di entropia molare

$\Delta t_i$	Intervallo di tempo
$\Delta z$	Altezza strati campione
$\varepsilon$	Rapporto volume ghiaccio / volume sistema
$\gamma$	Tensione interfacciale ghiaccio-soluzione concentrata
$k$	Conducibilità termica della soluzione congelata
$K$	Costante di equilibrio
$k_f$	Costante cinetica della reazione di folding
$k_u$	Costante cinetica della reazione di unfolding
$K_v$	Coefficiente di scambio globale tra prodotto e ambiente
$m$	Massa del prodotto
$m_w$	Massa di acqua iniziale nel campione
$\mu$	Viscosità
$\mu_0$	Viscosità ad una condizione di riferimento
$\mu_i$	Viscosità interna della proteina
$\mu_s$	Viscosità del solvente
$m'$	Coefficiente eccipiente
$M_p$	Peso molecolare proteina
$M_s$	Peso molecolare saccarosio
$M_w$	Peso molecolare acqua
$n$	Numero strati in cui è diviso il campione

$n_p$	Numero molecole di proteina
$n_s$	Numero molecole di saccarosio
$n_w$	Numero molecole di acqua
$N$	Stato nativo
$N_i$	Numero di cristalli dello strato $i$ -esimo
$PM$	Peso molecolare
$\dot{Q}_c$	Calore generato dall'accrescimento dei cristalli di ghiaccio
$\dot{Q}_v$	Calore generato dall'accrescimento dalla cristallizzazione
$R$	Costante universale dei gas
$\rho_{ice}$	Densità ghiaccio
$S$	Superficie di interfaccia tra acqua e ghiaccio
$\tau$	Tortuosità
$T_0$	Temperatura di riferimento
$T_c$	Temperatura di collasso
$T_{cr}$	Temperatura di cristallizzazione
$T_{cr1}$	Temperatura cristallizzazione del mannitolo durante congelamento
$T_{cr2}$	Temperatura cristallizzazione del mannitolo durante scongelamento
$T_{eu}$	Temperatura eutettica
$T_{ext}$	Temperatura ambiente durante lo scongelamento
$T_g$	Temperatura di transizione vetrosa

$T_m$	Temperatura media di denaturazione
$T_{shelf}$	Temperatura del ripiano del liofilizzatore
$\bar{T}_{shelf}$	Temperatura media camera
$\theta_i$	Gradiente termico zona congelata
$U$	Stato denaturato
$v_i$	Velocità congelamento
$V_p$	Volume molare proteina
$V_s$	Volume molare saccarosio
$V_w$	Volume molare acqua
$X_{ice}$	Frazione massica di ghiaccio

## Abbreviazioni

DSC	Differential Scanning Calorimetry
FDM	Freeze-Drying Microscope
GDH	Glutammato deidrogenasi
LDH	Lattato deidrogenasi
Mb	Mioglobina
PEG	Glicole polietilenico
SDS	Sodio dodecilsolfato



# Elenco delle figure

<b>Figura 1.1</b> - Schema generale del processo di liofilizzazione. ....	2
<b>Figura 1.2</b> - Schema di un liofilizzatore. ....	3
<b>Figura 1.3</b> - Diagramma di fase dell'acqua con indicato il percorso delle tre fasi della liofilizzazione. ....	4
<b>Figura 1.4</b> - Profilo termico tipico di un congelamento di una formulazione farmaceutica attraverso un raffreddamento controllato ad una velocità di 0.1K/min. ....	6
<b>Figura 1.5</b> - Schema dell'essiccamento primario. Immagine tratta da (Khairnar et al. 2013), riprodotta con modifiche. ....	7
<b>Figura 1.6</b> - Andamento dell'energia libera di Gibbs al variare della temperatura per diversi valori di pH per l'enzima stafilococco nucleasi. La linea continua si riferisce ad un pH pari a 7.0, quella tratteggiata ad un pH pari a 4.5, quella puntata ad un pH pari a 4.0. Figura tratta da (Bhatnagar et al., 2007) con modifiche. ....	10
<b>Figura 1.7</b> - Profili di temperatura (curva con indicatori quadrati), viscosità (curva con indicatori triangolari) e concentrazione di saccarosio (curva con indicatori rotondi) in funzione del tempo durante il congelamento di una formulazione al 3% in saccarosio. Figura tratta da (Bhatnagar et al., 2007) con modifiche. ....	11
<b>Figura 1.8</b> - Illustrazione del processo di congelamento, e degli effetti della velocità di raffreddamento. (a) congelamento con raffreddamento veloce e bassa temperatura di nucleazione. (b) congelamento con raffreddamento lento e temperatura di nucleazione maggiore. Figura tratta da (Assegehegn et al., 2019) con modifiche. ....	13
<b>Figura 2.1</b> - Profilo termico calcolato implementando il modello sopracitato in Matlab. Per questa simulazione è stata utilizzata una temperatura di nucleazione pari a 268 K ed una velocità di raffreddamento pari a 1 K/min. ....	21
<b>Figura 2.2</b> - Profilo termico per uno scongelamento in aria a temperatura ambiente ottenuto implementando il modello sopracitato in Matlab. ....	22
<b>Figura 2.3</b> - Rappresentazione semplificata dell'algoritmo utilizzato per il calcolo della denaturazione proteica e per la costruzione del design space. ....	29
<b>Figura 2.4</b> - Andamento della concentrazione di saccarosio (in nero) e della viscosità della soluzione concentrata (in rosso) durante una simulazione di congelamento. ....	32
<b>Figura 2.5</b> – Esempio di andamenti di area superficiale acqua-ghiaccio (in nero) e percentuale di molecole adsorbite (in rosso), ricavati dalle simulazioni della fase di congelamento .....	32
<b>Figura 3.1</b> – Esempi di immagini prodotte da un FDM, relative ad un campione contenente un disaccaride. (A) Immediatamente prima del collasso del campione, è possibile vedere distintamente il fronte di sublimazione. (B) Lo stesso campione pochi minuti dopo,	

successivamente al collasso. Immagine tratta da (Ward & Matejtschuk, 2019) con modifiche. .....	34
<b>Figura 3.2</b> - Foto del FDM utilizzato per le analisi al Politecnico di Torino, con indicate le varie componenti. ....	35
<b>Figura 3.3</b> - Gruppo eme presente in proteine come la mioglobina e l'emoglobina, è il responsabile della colorazione bruna di queste sostanze. ....	39
<b>Figura 3.4</b> – Fotografia delle quattro formulazioni della prova 1, dopo il congelamento. ....	40
<b>Figura 3.5</b> -Liofilizzatori utilizzati per le prove sperimentali. A sinistra il Telstar LyoBeta 25, a destra il REVO® Freeze Dryer. ....	42
<b>Figura 3.6</b> - Fotografia dei flaconi inseriti all'interno del REVO. ....	44
<b>Figura 3.7</b> - Fotografia dei campioni liofilizzati. ....	45
<b>Figura 4.1</b> – Profili di (a) concentrazione di saccarosio e viscosità, (b) superficie di interfaccia acqua-ghiaccio e percentuale di molecole adsorbite su di essa, (c) variazione di energia libera escludendo (curva nera) ed includendo (curva rossa) il contributo dell'eccipiente, (d) costanti cinetiche di folding ed unfolding della proteina. Profili relativi alla simulazione numero 1 riportata in Tabella 2.3 ed ottenuti con una velocità di raffreddamento di 1 K/min, ed una temperatura di nucleazione pari a 263 K. ....	48
<b>Figura 4.2</b> - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante il congelamento. Profili relativi alla simulazione 1 di Tabella 3.2, con una velocità di raffreddamento pari a 1 K/min ed una temperatura di nucleazione di 263 K. ....	49
<b>Figura 4.3</b> - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante il congelamento. Profili relativi alla simulazione 4 di Tabella 2.3, con una velocità di raffreddamento pari a 1 K/min ed una temperatura di nucleazione di 263 K. ....	49
<b>Figura 4.4</b> - Design space della simulazione 1. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in $\text{dm}^2/\text{g}$ . ....	50
<b>Figura 4.5</b> - Design space della simulazione numero 2 di Tabella 2.3. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in $\text{dm}^2/\text{g}$ . ....	51
<b>Figura 4.6</b> - Design space delle simulazioni numero 3 (a) e 4 (b) di Tabella 2.3. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in $\text{dm}^2/\text{g}$ . ....	52
<b>Figura 4.7</b> - Design space per la simulazione 3 di Tabella 2.3, nel quale si mostra l'effetto della concentrazione di proteina sull'attività residua della stessa. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in $\text{dm}^2/\text{g}$ . ....	52
<b>Figura 4.8</b> - Design space per la simulazione 4 di Tabella 2.3, nel quale si mostra l'effetto della concentrazione di proteina sull'attività residua della stessa. Le isocurve tratteggiate in rosso indicano le condizioni risultanti nello stesso valore di area interfacciale, in $\text{dm}^2/\text{g}$ . ....	53

<b>Figura 4.9</b> – (a) Andamento della frazione in massa di ghiaccio nel tempo. (b) Profili delle costanti cinetiche di folding (in rosso) ed unfolding (in nero). (c) Andamento della viscosità (in rosso) e della concentrazione di saccarosio nella fase concentrata (in nero). (d) Andamento dell'area di interfaccia (in nero) e di molecole adsorbite (in rosso). Tutti i profili sono relativi alla simulazione numero 3 riportata in Tabella 2.3, ed ottenuti con un valore di $K_v$ pari a $15 \text{ W/m}^2/\text{K}$ .	55
<b>Figura 4.10</b> - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante lo scongelamento. Profili relativi alla simulazione numero 1 di Tabella 2.3, eseguita con un coefficiente globale di scambio pari a $15 \text{ W/m}^2/\text{K}$ .	56
<b>Figura 4.11</b> - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante lo scongelamento. Profili relativi alla simulazione numero 2 di Tabella 2.3, eseguita con un coefficiente globale di scambio pari a $15 \text{ W/m}^2/\text{K}$ .	56
<b>Figura 4.12</b> - Percentuale di proteina allo stato nativo (N) e denaturato (U) durante lo scongelamento. Profili relativi alla simulazione numero 3 (proteina stabile in bulk, riportata nel riquadro a) e numero 4 (proteina instabile in bulk, riportata nel riquadro b) di Tabella 2.3, eseguite con un coefficiente globale di scambio pari a $15 \text{ W/m}^2/\text{K}$ .	57
<b>Figura 4.13</b> - Design space della simulazione numero 3 in Tabella 2.3 (proteina stabile in bulk), durante lo scongelamento. Viene mostrato l'effetto della velocità di tale processo, e dell'estensione iniziale della superficie acqua-ghiaccio, sulla proteina.	58
<b>Figura 4.14</b> - Design space della simulazione numero 4 in Tabella 2.3 (proteina instabile in bulk), durante lo scongelamento. Viene mostrato l'effetto della velocità di tale processo, e dell'estensione iniziale della superficie acqua-ghiaccio, sulla proteina.	59
<b>Figura 4.15</b> - Avanzamento del fronte di sublimazione di un campione al 5% in peso di saccarosio in buffer citrato a pH 3.7. La porzione scura fa riferimento allo strato essiccato, mentre quella chiara al prodotto congelato.	60
<b>Figura 4.16</b> - Avanzamento del fronte di sublimazione di un campione al 5% in peso di trealosio in buffer citrato a pH 3.7. La porzione scura fa riferimento allo strato essiccato, mentre quella chiara al prodotto congelato.	61
<b>Figura 4.17</b> - Risultati delle analisi DSC per i campioni A (sopra) ed A* (sotto).	63
<b>Figura 4.18</b> - Risultati delle analisi DSC per i campioni B (sopra) e B* (sotto)	64
<b>Figura 4.19</b> - Risultati delle analisi DSC per i campioni C (sopra) e C* (sotto).	65
<b>Figura 4.20</b> - Attività proteica residua in funzione del tempo di campioni liquidi mantenuti ad una temperatura di 268 K. Per questa prova sono state considerate due formulazioni: 0.1 mg/ml di mioglobina in buffer citrato a pH 3.7 senza (linea nera) e con (linea rossa) tensioattivo.	67
<b>Figura 4.21</b> - Risultati della prova numero 1 di congelamento. È riportata la percentuale di attività residua dopo 1 (barre piene) e 3 (barre tratteggiate) cicli di congelamento, ricavata come diminuzione di assorbanza a 410 nm. Sono riportati i risultati di diversi protocolli di congelamento: 0.1 K/min (barre blu), 1 K/min (barre arancioni) e quench in azoto liquido (barre grigie).	69

**Figura 4.22** - Risultati della prova numero 1 di congelamento. È riportata la percentuale di attività residua dopo 1 (barre piene) e 3 (barre tratteggiate) cicli di congelamento, ricavata come diminuzione di assorbanza a 280 nm. Sono riportati i risultati di diversi protocolli di congelamento: 0.1 K/min (barre blu), 1 K/min (barre arancioni) e quench in azoto liquido (barre grigie). ..... 69

**Figura 4.23** - Estratto dei dati presenti nelle Figure 4.16 e 4.17. I dati sono relativi al solo campione A<sub>1</sub>. Le barre bianche sono relative alle misurazioni a 410 nm, quelle grigie a 280 nm. .... 70

**Figura 4.24** - Risultati della prova numero 2 di congelamento. Vengono mostrate le attività residue della mioglobina sottoposta a congelamento molto lento (barre grigie) e molto veloce (barre arancioni). Le barre piene fanno riferimento a scongelamento lento, mentre quelle tratteggiate a scongelamento veloce..... 72

**Figura 4.25** - Valori di attività residua della mioglobina dopo congelamento senza eccipiente (A,A\*), con saccarosio (B,B\*), con mannitolo (C,C\*) e con trealosio (D,D\*). Le barre bianche sono relative alle formulazioni senza tensioattivo, mentre quelle in grigio con tensioattivo. . 74

**Figura 4.26** - Valori di attività residua della mioglobina dopo essiccamento senza eccipiente (A, A\*), con saccarosio (B, B\*), con mannitolo (C, C\*) e con trealosio (D, D\*). Le barre bianche sono relative alle formulazioni senza tensioattivo, mentre quelle in grigio con tensioattivo. .... 75

## Elenco delle tabelle

<b>Tabella 1.1</b> – Principali saccaridi utilizzati nella liofilizzazione di proteine .....	15
<b>Tabella 1.2</b> - Principali tensioattivi utilizzati nella liofilizzazione di proteine .....	17
<b>Tabella 2.1</b> - Riepilogo delle simulazioni effettuate, con i parametri utilizzati per ciascuna di esse. ....	30
<b>Tabella 2.2</b> - Valori dei parametri a, b e c utilizzati per il calcolo della viscosità. ....	31
<b>Tabella 2.3</b> - Valori di percentuale in massa di saccarosio nella soluzione crioconcentrata al variare della temperatura. Dati tratti da (Young & Jones, 1949). ....	31
<b>Tabella 3.1</b> - Protocollo eseguito per la prova al FDM su una soluzione di saccarosio.....	36
<b>Tabella 3.2</b> - Protocollo eseguito per la prova al FDM su di una soluzione di trealosio. ....	36
<b>Tabella 3.3</b> - Riassunto delle formulazioni utilizzate per le prove alla DSC. ....	37
<b>Tabella 3.4</b> - Protocollo utilizzato per l'analisi alla DSC .....	38
<b>Tabella 3.5</b> - Riassunto delle formulazioni utilizzate nelle prove di congelamento-scongelo.....	40
<b>Tabella 3.6</b> - Protocolli di congelamento e scongelamento utilizzati nelle due prove effettuate .....	41
<b>Tabella 3.7</b> - Formulazioni utilizzate per la prova di liofilizzazione. ....	44
<b>Tabella 3.8</b> - Protocollo utilizzato per la prova di liofilizzazione. ....	46
<b>Tabella 4.1</b> - Valori di velocità di raffreddamento durante il congelamento a cui corrispondono diverse estensioni della superficie di interfaccia tra acqua e ghiaccio. In ogni caso, si è assunto che la temperatura di nucleazione fosse pari a 263 K. ....	58
<b>Tabella 4.2</b> - Riassunto delle prove al FDM. ....	62
<b>Tabella 4.3</b> - Riepilogo dei risultati delle formulazioni analizzate. ....	66



# Bibliografia

- Adams, G. D. J., & Ramsay, J. R. (1996). Optimizing the lyophilization cycle and the consequences of collapse on the pharmaceutical acceptability of Erwinia L-asparaginase. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(12), 1301–1305. <https://doi.org/10.1021/js960146p>
- Anderson, A. B., & Robertson, C. R. (1995). Absorption spectra indicate conformational alteration of myoglobin adsorbed on polydimethylsiloxane. *Biophysical Journal*, 68(5), 2091–2097. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80388-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80388-7)
- Ansari, A., Jones, C. M., Henry, E. R., Hofrichter, J., & Eaton, W. A. (1992). The role of solvent viscosity in the dynamics of protein conformational changes. *Science*, 256(5065), 1796–1798.
- Arakawa, T., Prestrelski, S. J., Kenney, W. C., & Carpenter, J. F. (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 307–326.
- Arsiccio, A., Barresi, A., Beer, T. De, Oddone, I., Bockstal, V., & Pisano, R. (2018). Vacuum induced surface freezing as an effective method for improved inter- and intra-vial product homogeneity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 128(1), 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.04.002>
- Arsiccio, A., Barresi, A., & Pisano, R. (2017). Prediction of ice crystal size distribution after freezing of pharmaceutical solutions. *Crystal Growth & Design*, 17(9), 4573–4581. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00319>
- Arsiccio, A., Giorsello, P., Marengo, L., & Pisano, R. (2019). Considerations on Protein Stability during Freezing and its Impact on the Freeze Drying Cycle: A Design Space Approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.022>
- Arsiccio, A., McCarty, J., Pisano, R., & Shea, J. E. (2018). Effect of surfactants on surface-induced denaturation of proteins: evidence of an orientation-dependent mechanism. *Journal of Physical Chemistry B*, 122(49), 11390–11399. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b07368>
- Arsiccio, A., & Pisano, R. (2018a). Application of the quality by design approach to the freezing step of freeze-drying: building the design space. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(6), 1586–1596. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.02.003>
- Arsiccio, A., & Pisano, R. (2018b). Surfactants as stabilizers for biopharmaceuticals: an insight into the molecular mechanisms for inhibition of protein aggregation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 128(1), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.04.005>
- Assegehegn, G., Brito-de la Fuente, E., Franco, J. M., & Gallegos, C. (2019). The importance

- of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(4), 1378–1395. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>
- Bam, N. B., Cleland, J. L., & Randolph, T. W. (1996). Molten Globule Intermediate of Recombinant Human Growth Hormone: Stabilization with Surfactants. *Biotechnology Progress*, 12(6), 801–809. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.19>
- Bam, N. B., Cleland, J. L., Yang, J., Manning, M. C., Carpenter, J. F., Kelley, R. F., & Randolph, T. W. (1998). Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(12), 1554–1559. <https://doi.org/10.1021/js980175v>
- Barresi, A., Ghio, S., Fissore, D., & Pisano, R. (2009). Freeze drying of pharmaceutical excipients close to collapse temperature: Influence of the process conditions on process time and product quality. *Drying Technology*, 27(6), 805–816. <https://doi.org/10.1080/07373930902901646>
- Bhatnagar, B. S., Bogner, R. H., & Pikal, M. J. (2007). Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology*, 12(5), 505–523. <https://doi.org/10.1080/10837450701481157>
- Carpenter, J. F., Pikal, M. J., Chang, B. S., & Randolph, T. W. (1997). Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice. *Pharmaceutical Research*, Vol. 14, pp. 969–975. <https://doi.org/10.1023/A:1012180707283>
- Chang, B. S., Kendrick, B. S., & Carpenter, J. F. (1996). Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(12), 1325–1330. <https://doi.org/10.1021/js960080y>
- Chang, B. S., & Randall, C. S. (1992). Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology*, 29(5), 632–656. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90067-C](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90067-C)
- Chang, L., & Pikal, M. J. (2009). Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 2886–2908. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Chou, D. K., Krishnamurthy, R., Randolph, T. W., Carpenter, J. F., & Manning, M. C. (2005). Effects of Tween 20® and Tween 80® on the stability of Albutropin during agitation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(6), 1368–1381. <https://doi.org/10.1002/jps.20365>
- Crowe, J. H. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 579–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.54.1.579>
- Crowe, L. M., Reid, D. S., & Crowe, J. H. (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal*, 71(4), 2087–2093. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)
- Deechongkit, S., Wen, J., Narhi, L. O., Jiang, Y., Park, S. S., Kim, J., & Kerwin, B. A. (2009). Physical and biophysical effects of polysorbate 20 and 80 on darbepoetin alfa. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 3200–3217. <https://doi.org/10.1002/jps.21740>

- Franks, F., & Auffret, T. (2007). Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals. In *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*. <https://doi.org/10.1039/9781847557704>
- Haas, E., Katchalski-katzir, E., Steinberg, Z., & Weizmann, T. (1978). Brownian motion of the ends of oligopeptide chains in solution as estimated by energy transfer between the chain ends. *Biopolymers*, *17*(1), 11–31.
- Heller, M. C., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W. (1997). Manipulation of lyophilization-induced phase separation: implications for pharmaceutical proteins. *Biotechnology Progress*, *7*(97), 590–596.
- Jones, L. S., Randolph, T. W., Kohnert, U., Papadimitriou, A., Winter, G., Hagmann, M. L., ... Carpenter, J. F. (2001). The effects of Tween 20 and sucrose on the stability of anti-L-selectin during lyophilization and reconstitution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *90*(10), 1466–1477. <https://doi.org/10.1002/jps.1098>
- Kasper, J. C., & Friess, W. (2011). The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *78*(2), 248–263. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>
- Kasraian, K., Spitznagel, T. M., Juneau, J. A., & Yim, K. (1998). Characterization of the sucrose/glycine/water system by differential scanning calorimetry and freeze-drying microscopy. *Pharmaceutical Development and Technology*, *3*(2), 233–239. <https://doi.org/10.3109/10837459809028500>
- Khairnar, S., Kini, R., Harwalker, M., Slaunkhe, K., & Chaudhari, S. (2013). A review on freeze drying process and pharmaceuticals. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, *4*(3), 76–94.
- Kim, A. I., Akers, M. J., & Nail, S. L. (1998). The physical state of mannitol after freeze-drying: Effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *87*(8), 931–935. <https://doi.org/10.1021/js980001d>
- Kleinert, T., Doster, W., Leyser, H., Petry, W., Schwarz, V., & Settles, M. (1998). Solvent composition and viscosity effects on the kinetics of co binding to horse myoglobin. *Biochemistry*, *37*(2), 717–733.
- Kuhlman, B., Yang, H. Y., Boice, J. A., Fairman, R., & Raleigh, D. P. (1997). An exceptionally stable helix from the ribosomal protein L9: Implications for protein folding and stability. *Journal of Molecular Biology*, *270*(1), 640–647.
- Lai, M. C., & Topp, E. M. (1999). Solid-state chemical stability of proteins and peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *88*(5), 489–500.
- Lee, H. J., McAuley, A., Schilke, K. F., & McGuire, J. (2011). Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of protein drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *63*(13), 1160–1171. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.015>
- Liu, B., & Zhou, X. (2015). Freeze-drying of proteins. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1257, pp. 459–476).

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5>

- Longinotti, M. P., & Corti, H. R. (2008). Viscosity of concentrated sucrose and trehalose aqueous solutions including the supercooled regime. *Journal of Physical and Chemical Reference*, 37(3), 1503–1515. <https://doi.org/10.1063/1.2932114>
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2017). How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114(1), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.024>
- Meredith, P., Donald, A. M., & Payne, R. S. (1996). Freeze-drying: In situ observations using cryoenvironmental scanning electron microscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(6), 631–637. <https://doi.org/10.1021/js950324z>
- Nakagawa, K., Hottot, A., Vessot, S., & Andrieu, J. (2007). Modeling and simulation of the polymeric nanocapsule formation process. *AIChE Journal*, 53(5), 1362–1372. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Babu, M. N., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization / freeze drying - an review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 87–98.
- Oddone, I., Pisano, R., Bullich, R., & Stewart, P. (2014). Vacuum-induced nucleation as a method for freeze-drying cycle optimization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(47), 18236–18244. <https://doi.org/10.1021/ie502420f>
- Pikal, M. J. (2004). Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics. In *Freeze Drying / Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Pisano, R., & Capozzi, L. C. (2017). Prediction of product morphology of lyophilized drugs in the case of Vacuum Induced Surface Freezing. *Chemical Engineering Research and Design*, 125(1), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.07.004>
- Pisano, R., Fissore, D., Barresi, A. A., Brayard, P., Chouvenc, P., & Woinet, B. (2013). Quality by design: Optimization of a freeze-drying cycle via design space in case of heterogeneous drying behavior and influence of the freezing protocol. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(1), 280–295. <https://doi.org/10.3109/10837450.2012.734512>
- Plaxco, K. W., & Baker, D. (1998). Limited internal friction in the rate-limiting step of a two-state protein folding reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(23), 13591–13596.
- Privalov, P. L. (1997). Thermodynamics of protein folding. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 29(4), 447–474. <https://doi.org/10.1006/jcht.1996.0178>
- Rey, L., & May, J. C. (2010). *Freeze drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products* (Vol. 206). Informa Healthcare, Telephone House, 69-77 Paul Street, London EC2A 4LQ, UK.
- Rupley, J. A., & Careri, G. (1991). Protein hydration and function. *Advances in Protein*

*Chemistry*, 41(1), 37–173.

- Shosheva, A., Miteva, M., Christova, P., & Atanasov, B. (2003). pH-dependent stability of sperm whale myoglobin in water-guanidine hydrochloride solutions. *European Biophysics Journal*, 31(8), 617–625. <https://doi.org/10.1007/s00249-002-0259-6>
- Tang, X. C., & Pikal, M. J. (2004). Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 191–200.
- Tang, X., & Pikal, M. J. (2005). The effect of stabilizers and denaturants on the cold denaturation temperatures of proteins and implications for freeze-drying. *Pharmaceutical Research*, 22(7), 1167–1175. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-6035-4>
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1–2), 1–60. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00423-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00423-3)
- Ward, K. R., & Matejtschuk, P. (2019). Lyophilization of pharmaceuticals and biologicals new technologies and approaches. In K. R. Ward, B. P. S. Ltd., & U. Winchester (Eds.), *Methods in Pharmacology and Toxicology*. Retrieved from <http://www.springer.com/series/7653>
- Young, F. E., & Jones, F. T. (1949). Sucrose hydrates. The sucrose-water phase diagram. *J. Phys. Chem.*, 53(9), 1334–1350.



# Ringraziamenti

La fine di questo lavoro di tesi corrisponde anche al termine di un lungo periodo di studi, nonché ad un periodo della mia vita, che non avrei mai potuto affrontare da solo, senza il supporto di molte persone che vorrei qui di seguito ringraziare.

Ringrazio innanzitutto il mio relatore, il Prof. Roberto Pisano, per la sua disponibilità e professionalità dimostratemi, e per avermi dato la possibilità di lavorare a questo progetto di tesi. Vorrei ringraziare particolarmente il mio co-relatore, il Dott. Andrea Arsiccio, per l'immensa disponibilità e gentilezza che ha dimostrato nei miei confronti e per la precisione e l'attenzione con cui mi ha seguito in questi mesi, mettendo a disposizione la sua passione e la sua grande conoscenza in questo campo.

Un ringraziamento alla mia famiglia, per avermi sempre supportato e per avermi permesso di portare a termine i miei studi. A mia madre, a Didi, Isi, ai miei nonni. A Nico, per essere stato sempre un esempio per me.

Ai miei carissimi amici e colleghi di studio, Kita e Giuseppe, per i bellissimi momenti passati insieme, per aver condiviso con me ogni gioia ed ogni dolore di questa laurea magistrale, e per avermi sempre supportato e *sopportato*: vi voglio bene.

A tutti gli amici incontrati durante questi anni: Elena, Luca, Fede, Ted, Oana, Irene, Ambra, Nicola, Adriana, Giordano, Mirko, Oussama, al Gruppo 1 (Claudia, Lorenzo, Mariagrazia, Federica e Carlo), ed in generale ad ogni altra persona che con me ha condiviso anche solo un pezzetto di questo percorso, e che mi sono colpevolmente dimenticato di citare.

Grazie a tutti,

Fino alla fine.