

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

Sintesi di nanoparticelle per veicolare RNA



Relatori

Prof. Davide Fissore
Prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Colombo Laura

Ottobre 2021

Indice

1. Introduzione	5
1.1 Nanocarriers	5
1.1.1 <i>Processo di formazione delle nanoparticelle</i>	5
1.1.2 <i>Tipologie di nanoparticelle</i>	6
1.1.3 <i>Nanoparticelle per la veicolazione di farmaci (drug delivery)</i>	7
1.1.4 <i>Metodi di sintesi delle nanoparticelle</i>	8
1.2 Nanoparticelle polimeriche	9
1.2.1 <i>Chitosano</i>	9
1.2.2 <i>Metodi di sintesi delle nanoparticelle di chitosano</i>	10
1.3 Nanoparticelle lipidiche	13
1.3.1 <i>Classificazione delle nanoparticelle lipidiche</i>	13
1.3.2 <i>Metodi di sintesi delle nanoparticelle lipidiche</i>	15
1.4 Metodi di sintesi di nanoparticelle	15
1.4.1 <i>Agitatore vortex</i>	16
1.4.2 <i>Confined Impinging Jets Mixer</i>	17
1.5 Applicazioni delle nanoparticelle lipidiche	17
1.5.1 <i>Vaccini genetici</i>	18
1.5.2 <i>Sviluppo di vaccini Covid-19</i>	20
1.5.3 <i>Confronto composizioni dei vaccini Moderna e Pfizer</i>	20
1.6 Tecniche di conservazione dei liposomi	21
1.6.1 <i>Conservazione dei vaccini a mRNA</i>	21
1.6.2 <i>Liofilizzazione</i>	22
1.6.3 <i>Fase di congelamento</i>	23
1.6.4 <i>Fase di essiccamento primario</i>	24
1.6.5 <i>Fase di essiccamento secondario</i>	25
1.6.6 <i>Liofilizzazione di liposomi</i>	25
1.7 Scopo della Tesi	25
2. Materiali e Metodologie sperimentali	26
2.1 Coltura di Saccharomyces cerevisiae	26
2.2 Procedura di estrazione di RNA	26
2.3 Nanoparticelle di chitosano	29
2.3.1 <i>Chitosano</i>	29
2.3.2 <i>Sodium acetate buffer</i>	29
2.3.3 <i>Sodium sulphate buffer</i>	30
2.3.4 <i>Acqua Nuclease free</i>	30

2.3.5 Metodo di sintesi delle nanoparticelle di chitosano	30
2.3.6 Quench ratio	31
2.4 Sintesi delle nanoparticelle lipidiche	31
2.4.1 Lipidi	31
2.4.2 Etanolo e Terbutanolo	32
2.4.3 Sodium acetate buffer	32
2.4.4 Metodo di sintesi delle nanoparticelle lipidiche	32
2.5 Apparato sperimentale e metodologia di sintesi delle nanoparticelle	33
2.5.1 Agitatore Vortex	34
2.5.2 Confined Impinging Jets Mixer (CIJM)	34
2.6 Metodi di separazione delle nanoparticelle dal solvente	35
2.6.1 La dialisi	35
2.6.2 La centrifugazione	36
2.6.3 Confronto tra dialisi e centrifugazione	36
2.7 Tecniche di caratterizzazione	36
2.7.1 La tecnica del Dynamic Light Scattering (DLS)	37
2.8 Spettrofotometria	38
2.8.1 Quantificazione spettrofotometrica di RNA	39
2.8.2 Quantificazione della purezza del RNA	40
2.9 Apparato sperimentale e metodologia per la liofilizzazione delle nanoparticelle	40
3. Sintesi di nanoparticelle di chitosano	42
3.1 Studio della sintesi delle nanoparticelle di chitosano	42
3.1.1 Studio dell'effetto della concentrazione di chitosano sulla sintesi delle nanoparticelle di chitosano	42
3.1.2 Studio dell'effetto del quench sulla sintesi delle nanoparticelle di chitosano	43
3.1.3 Studio dell'effetto del microreattore CIJM sulla sintesi delle nanoparticelle di chitosano	44
3.1.4 Studio dell'effetto della variazione di portata al microreattore CIJM sulla sintesi delle nanoparticelle di chitosano	48
3.2 Studio della centrifugazione della sospensione di nanoparticelle di chitosano	49
3.2.1 Studio dell'effetto della centrifugazione sulle nanoparticelle sintetizzate con diverse concentrazioni di chitosano	50
3.2.2 Studio dell'effetto della centrifugazione sulle nanoparticelle sintetizzate con CIJM	50
3.3 Studio della stabilità delle nanoparticelle di chitosano	52
3.4 Analisi dei risultati delle nanoparticelle di chitosano con RNA	53
4. Sintesi di nanoparticelle lipidiche	55
4.1 Sintesi di nanoparticelle lipidiche	55
4.1.1 Studio dell'effetto del quench sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche	55
4.1.2 Studio dell'effetto della concentrazione di lipidi sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche	56

4.1.3 Studio dell'effetto del terbutanolo sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche	59
4.1.4 Studio dell'effetto del Confined Impinging Jets Mixer sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche	61
4.2 Studio della separazione delle nanoparticelle lipidiche	62
4.2.1 La centrifugazione	62
4.2.2 Studio dell'effetto della centrifugazione delle nanoparticelle lipidiche prodotte con concentrazione di differenti di lipidi	63
4.2.3 Studio dell'effetto della centrifugazione sulle nanoparticelle lipidiche sintetizzate con terbutanolo	64
4.2.4 Studio dell'effetto della centrifugazione delle nanoparticelle lipidiche sintetizzate con CIJM	65
4.3 La dialisi	65
4.3 Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche	67
4.3.1 Studio dell'effetto del quench sulla stabilità delle nanoparticelle lipidiche	67
4.3.2 Studio dell'effetto del terbutanolo sulla stabilità delle nanoparticelle lipidiche	68
4.3.3 Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche sintetizzate con CIJM	69
4.4 Sintesi di nanoparticelle lipidiche con RNA	70
4.4.1 Studio dell'effetto del quench sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato	70
4.4.2 Studio dell'effetto della concentrazione di lipidi sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato	71
4.4.3 Studio dell'effetto del terbutanolo sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato	73
4.4.4 Studio dell'effetto della centrifugazione delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato	74
4.4.5 Studio dell'effetto della dialisi delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato	75
4.4.6 Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato	76
4.4.7 Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato sintetizzate con terbutanolo	77
5. Analisi delle prove di liofilizzazione	79
5.1 Congelamento	79
5.2 Essiccamento primario	79
5.3 Liofilizzazione di nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato	81
6. Conclusioni	85
7. Abbreviazioni	87
8. Bibliografia	88
9. Sitografia	91
Appendice	92

1. Introduzione

1.1 Nanocarriers

Le nanotecnologie rappresentano l'incontro tra diversi campi di ricerca, tra cui la fisica, la chimica, la biologia e l'ingegneria. Dal momento che vengono messe in gioco tante aree diverse, anche i domini applicativi risultano essere molteplici, sia nella scienza che nella vita umana. In questo contesto, uno dei prodotti di maggior rilievo è costituito dalle nanoparticelle, ovvero dispersioni di particelle che presentano una dimensione tra 10 e 1000 nm (Nikam *et al.*, 2014). Grazie a queste caratteristiche le nanoparticelle possono essere utilizzate come *nanocarriers* in particolare per le applicazioni in campo biomedico, ad esempio per la veicolazione di farmaci. Oltre alla dimensione, presentano proprietà chimico fisiche uniche come la specifica reattività e permeabilità in cellule e tessuti.

1.1.1 Processo di formazione delle nanoparticelle

La formazione delle nanoparticelle avviene tramite un processo a step. Il primo step consiste nella nucleazione, che corrisponde alla formazione di un aggregato di molecole ed alla sua crescita fino ad una dimensione critica sopra alla quale può essere chiamato nucleo. Questa fase dipende fortemente dal grado di sovrasaturazione, ovvero dal rapporto tra la concentrazione di soluto e la solubilità di quest'ultimo in quel solvente ad una certa temperatura. Questo parametro risulta avere anche un'influenza sulla dimensione delle nanoparticelle: infatti se questo aumenta, allora anche la velocità di nucleazione incrementa esponenzialmente. Se il sistema permane nelle condizioni di sovrasaturazione per tempi lunghi, si ottengono molte particelle caratterizzate da piccole dimensioni; al contrario, se l'intervallo di tempo è breve la sospensione presenterà poche particelle, ma grandi.

Superata la dimensione critica possono avvenire due fenomeni caratteristici: la crescita e l'aggregazione delle nanoparticelle. Nel primo caso avviene un aumento continuo delle dimensioni della particella grazie ad un trasferimento di materia dalla fase liquida. La forza spingente che permette il processo è la differenza di concentrazione che si ha tra il *bulk* di liquido e l'interfaccia liquido – solido.

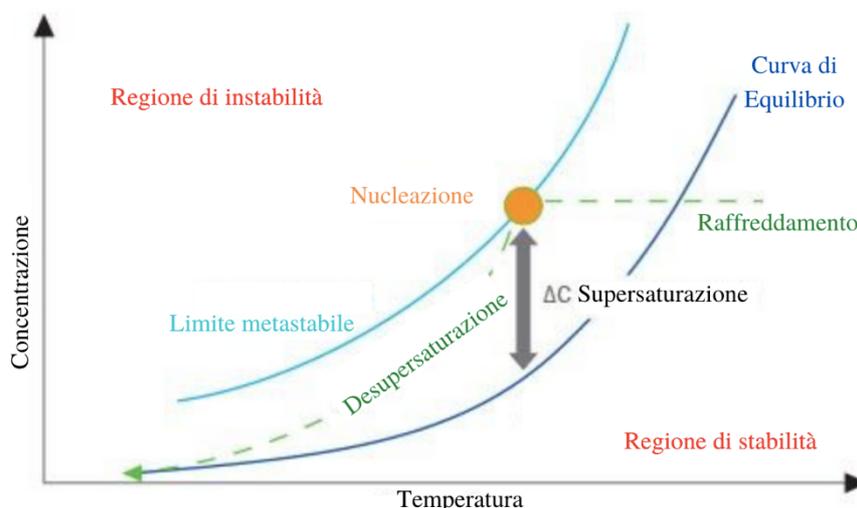


Figura 1: Rappresentazione delle regioni di stabilità, meta stabilità e instabilità in funzione della concentrazione di soluto e della temperatura – Figura tratta da [2] con modifiche

La nucleazione si verifica quando il sistema si porta in condizioni instabili, per cui dal momento in cui ci si allontana dall'equilibrio si può ottenere la formazione di particelle. Nella regione di instabilità, in prossimità dell'equilibrio, è possibile andare ad individuare un'area definita *metastabile*

caratterizzata da un grado di sovrasaturazione tale per cui la nucleazione risulta essere sfavorita, ma la crescita può continuare fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico.

Le equazioni 1 e 2 permettono di ricavare le velocità di crescita e di nucleazione in funzione del grado di supersaturazione:

$$G = k_g \Delta C^g \quad (1)$$

$$B = k_B \Delta C^b \quad (2)$$

G e B corrispondono rispettivamente alla velocità di crescita e di nucleazione, ΔC corrisponde al grado di supersaturazione e k_g e k_B sono le costanti cinetiche dei due fenomeni. Quello che si può notare è che la velocità in entrambi casi aumenta all'aumentare di ΔC . I parametri riportati come b e g fanno riferimento all'ordine di nucleazione e di crescita.

L'aggregazione è un fenomeno che porta ad una crescita di tipo discontinuo delle particelle e avviene a seguito delle collisioni tra esse. La probabilità di ottenere una collisione dipende dal quadrato del numero di particelle presenti in sospensione; tuttavia, non tutte le collisioni portano ad aggregazione, bensì solo quelle in cui le forze attrattive prevalgono su quelle repulsive. La presenza di un doppio strato elettrico che si instaura sulla superficie delle nanoparticelle, ed il conseguente potenziale elettrico che si può rilevare, detto potenziale zeta, fornisce un'indicazione dell'entità delle forze presenti tra particelle. Qualora il potenziale zeta fosse sufficientemente elevato, le forze repulsive prevarrebbero su quelle attrattive permettendo alla sospensione di rimanere stabile (Aubry *et al.*, 2009; Lepeltier *et al.*, 2014).

1.1.2 Tipologie di nanoparticelle

Considerando nanoparticelle per veicolare un farmaco, in funzione del metodo di sintesi si possono ottenere conformazioni differenti: a) Nanoparticelle costituite dalle molecole del farmaco, b) Nanosfere, che presentano una matrice in cui il farmaco è uniformemente disperso, c) Nanocapsule, in cui il farmaco è confinato all'interno di una cavità circondata da un'unica membrana polimerica.

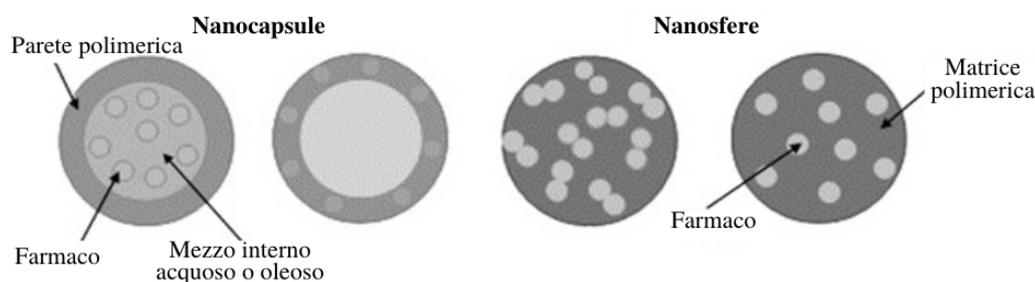


Figura 2: Confronto a livello strutturale tra nanocapsule e nanosfere – Figura tratta da Reis *et al.*, 2006 con modifiche

Attualmente sono state sviluppate molte configurazioni di *nanocarriers*; in Figura 3 sono riportate alcuni esempi: a) Nanotubi: tubi lipidici auto-assemblanti. (b) Liposomi: vescicole concentriche a doppio strato in cui un volume acquoso è interamente racchiuso da uno strato lipidico. (c) Nanoparticelle lipidiche solide (SLN): vettori colloidali submicronici fatti da lipidi solidi. (d) Micelle polimeriche: copolimeri a blocchi anfifilici che si autoassociano in soluzione acquosa. (e) Dendrimeri: composti macromolecolari che consistono in una serie di rami attorno a un nucleo interno. (f) Nanoparticelle funzionalizzate: particelle monodisperse di forma uniforme con una composizione superficiale ben definita (Rewat *et al.*, 2006).

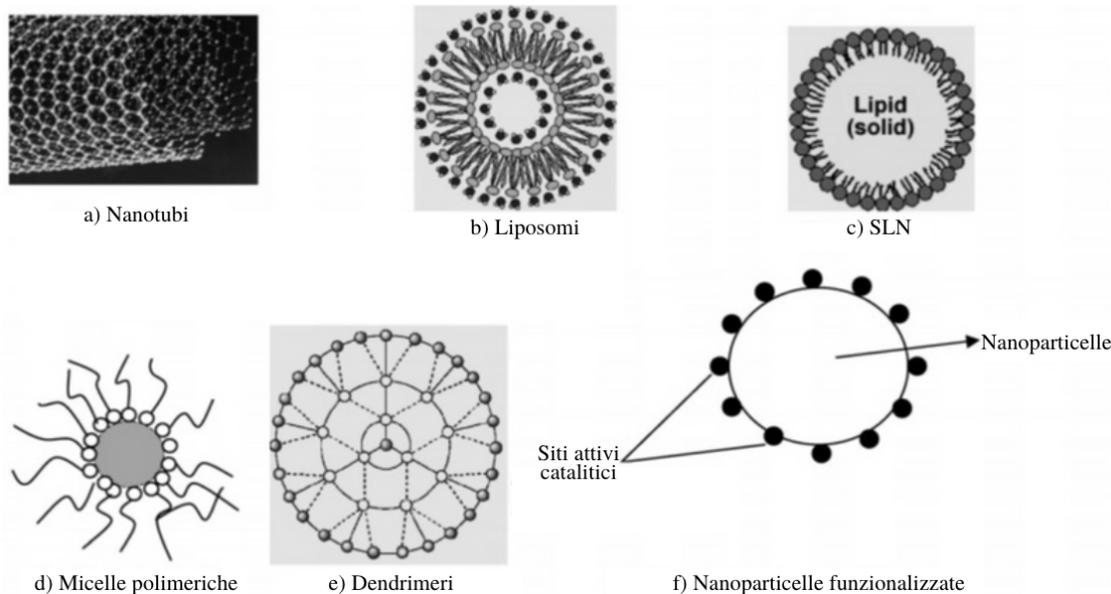


Figura 3: Tipologie di nanocarrier – Figura tratta da Rewat et al., 2006 con modifiche

1.1.3 Nanoparticelle per la veicolazione di farmaci (drug delivery)

I principali vantaggi relativi all'impiego di nanoparticelle come sistema per il *drug delivery* sono:

- La versatilità di applicazioni: manipolando le dimensioni e le caratteristiche superficiali è possibile definire target diversi per la somministrazione del farmaco.
- Il rilascio controllato del farmaco durante il trasporto e nel sito di localizzazione, in modo da ottenere un'elevata efficacia terapeutica del farmaco e una riduzione degli effetti collaterali.
- L'incapsulamento del farmaco, generalmente, non dipende da reazioni chimiche, ma da interazioni elettrostatiche, cosa che permette di limitare le alterazioni dei principi attivi.
- Le vie di somministrazione sono molteplici: orale, nasale, parenterale, intra-oculare ecc.

I limiti dei *nanocarriers* sono legati all'interazione tra le nanoparticelle che comportano fenomeni di aggregazione e che rendono difficile la veicolazione del farmaco.

Per garantire l'efficienza del *drug delivery* e rispettare gli obiettivi dell'applicazione è necessario conoscere quali sono i tessuti e i fluidi corporei con i quali i *nanocarriers* vanno a contatto in modo tale da identificare i materiali più adatti (Bucca, 2019). I criteri di selezione dipendono da diversi fattori come: a) La dimensione delle nanoparticelle; b) Le proprietà intrinseche del farmaco, come la solubilità; c) Le caratteristiche di superficie come carica e permeabilità; d) Il grado di biodegradabilità, biocompatibilità e tossicità; e) Il profilo di rilascio del farmaco desiderato; e f) L'antigenicità del prodotto finale (Nikam et al., 2014). Inoltre, stimoli esterni alla nanoparticella, come variazione di temperatura e di pH, possono alterare il tempo medio di circolazione, le modalità di rilascio e la struttura della NP.

In funzione dei materiali utilizzati per la sintesi, è possibile suddividere le nanoparticelle in diverse categorie. Le principali tipologie impiegate per la veicolazione di acidi nucleici sono le seguenti (Lee et al., 2019)

- Nanoparticelle polimeriche sintetiche*: sono caratterizzate da un efficiente rilascio dell'acido nucleico all'interno del citoplasma cellulare, della loro facilità di produzione e funzionalizzazione con molecole bersaglio. Tra i polimeri sintetici, i poli(etilene immina) (PEI), PLGA, il poli(ϵ -caprolattone) (PCL) e i poliuretani (PU) sono stati utilizzati per la veicolazione di RNA.

- b. *Nanoparticelle polimeriche naturali*: i materiali che possono essere ottenuti da fonti animali o vegetali, Chitosano (CS) e Acido ialuronico (HA), sono vettori promettenti per gli acidi nucleici.
- c. *Nanoparticelle inorganiche*: oro, fosfato di calcio, silice e ossidi di ferro sono stati proposti in nanomedicina per la loro biocompatibilità, dimensione e morfologia controllabili. La combinazione di NP magnetiche con composti cationici è necessaria per ottenere un elevato incapsulamento di RNA.
- d. *Nanoparticelle a base di lipidi*: I lipidi sono i componenti principali della membrana cellulare, rendendo così le NP a base lipidica (LNP) in grado di interagire con la membrana, promuovendo l'assorbimento cellulare del loro contenuto. L'interazione elettrostatica spontanea tra lipidi cationici e l'RNA caricato negativamente permette l'incapsulamento. Tuttavia, questi tipi di *nanocarriers* sono associati ad una tossicità cellulare.

1.1.4 Metodi di sintesi delle nanoparticelle

I quattro metodi più frequenti per la sintesi di nanoparticelle sono (Lee *et al.*, 2019):

1. *La dispersione di polimeri preformati*: è una tecnica comunemente usata per preparare nanoparticelle biodegradabili come PLA, PLGA, PCA e PLG; può essere adoperata utilizzando vie differenti, una delle principali è il metodo dell'evaporazione del solvente. Questa tecnica prevede che il polimero venga disciolto in un solvente organico come il cloroformio, usato anche come solvente per dissolvere il farmaco idrofobico. La miscela di polimero e la soluzione di farmaco vengono emulsionate in una soluzione acquosa contenente un tensioattivo fino ad ottenere un'emulsione stabile. Il solvente organico poi viene allontanato per evaporazione tramite diminuzione della pressione o riscaldamento, eventualmente agitando. Per il controllo delle dimensioni delle particelle si può effettuare un'omogeneizzazione ad alta velocità o con ultrasuoni;
2. *La polimerizzazione di monomeri*: Le nanoparticelle vengono sintetizzate in soluzione acquosa utilizzando dei monomeri. Il farmaco disciolto nella soluzione viene incapsulato sia durante la fase di polimerizzazione sia successivamente per adsorbimento. La separazione delle nanoparticelle viene generalmente eseguita tramite ultracentrifugazione;
3. *La gelificazione ionica*: La preparazione delle nanoparticelle viene effettuata utilizzando polimeri idrofili biodegradabili come chitosano, gelatina e alginato di sodio. La sintesi avviene per interazione tra gruppi anionici e cationici delle molecole.
4. *La tecnologia dei fluidi supercritici*: questo metodo risulta essere vantaggioso dal punto di vista ambientale dal momento che non vengono utilizzati solventi tossici, tuttavia sono richieste delle attrezzature molto più costose. Le principali tecniche di lavorazione coinvolgono fluidi supercritici sono l'antisolvente supercritico (SAS) e l'espansione rapida della soluzione critica (RESS)

Per caratterizzare le nanoparticelle sintetizzate gli aspetti che vengono maggiormente indagati sono:

- a. La carica superficiale misurata come potenziale zeta, che corrisponde al potenziale elettrico della nanoparticella e dipende sia dalla sua composizione che dal mezzo in cui è dispersa;
- b. La dimensione media e la distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle, la cui misura può essere eseguita tramite SEM o DLS;
- c. L'efficienza di intrappolamento del farmaco, che viene valutata andando a misurare il quantitativo rimasto in soluzione e, per differenza dal valore iniziale, si ottiene il quantitativo incapsulato.

1.1.5 Applicazioni delle nanoparticelle

Attualmente, le nanoparticelle vengono ampiamente impiegate nel campo biomedico. I nanomedicinali vengono principalmente adoperati per la cura di malattie come il cancro, l'AIDS, il diabete, la malaria e la tubercolosi. Inoltre, permettono anche di ricercare cellule tumorali durante le fasi di screening della malattia. Come detto in precedenza, sono numerosi i vantaggi di questi farmaci e sono dovuti ad aspetti intrinseci delle nanoparticelle. Infatti, è grazie alle dimensioni ridotte che risultano avere una buona capacità di *targeting* e di penetrazione all'interno dei tessuti e dei fluidi. Invece la carica superficiale, generalmente cationica, determina la possibilità di aggregazione delle nanoparticelle o la possibile interazione con le cellule.

Inoltre, la superficie viene spesso funzionalizzata per conferire maggiore stabilità una volta che la nanoparticella si trova all'interno dell'organismo: in questo modo è possibile andare ad aumentare il tempo di circolazione. Queste modifiche superficiali aiutano anche al rilascio in vivo del farmaco, che può anche essere modulato variando il peso molecolare del materiale utilizzato per la nanoparticella. Infatti, come è emerso dalle prove effettuate da Kumari (2010) maggiore è il peso molecolare, più lento risulta essere il rilascio.

1.2 Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche (PNP) hanno molte applicazioni nel campo della veicolazione dei farmaci, in particolare molecole a basso peso molecolare, proteine, DNA e RNA. L'incapsulamento avviene in genere in soluzione acquosa ed è grazie ai legami idrogeno che si formano tra i gruppi idrofilici del farmaco e delle micelle. Il farmaco intrappolato nel nucleo idrofobico sarà ben protetto contro la degradazione (Amoabediny *et al.*, 2018).

I principali polimeri naturali utilizzati sono chitosano, gelatina, alginato di sodio e albumina; tra quelli sintetici i più comuni sono: polilattidi (PLA), poliglicolidi, poli(ϵ -caprolattone) (PCL), poli(lattide-co-glicolidi) (PLGA), polianidridi, poliortoesteri, policianacrilati, policaprolattone, acido poligluttammico, poli (acido maleico), poli (N-vinil pirrolidone), poli (metacrilato di metile), poli (vinile alcol), poli (acido acrilico), poliacrilammide, poli (etilene glicole) e poli (acido metacrilico).

1.2.1 Chitosano

Il chitosano è un polimero naturale che si ottiene da una parziale N-deacetilazione della chitina naturale derivata dall'esoscheletro dei crostacei, molluschi, insetti, funghi, ecc. Dal punto di vista chimico può essere descritto come un poli- β -(1,4)- 2-amino-2-deossi-D-glucopiranosio, o più semplicemente poli- β -(1,4) glucosamina ($C_6H_{11}O_4N$)_n, con un contenuto variabile di gruppi N-acetile (Figura 13).

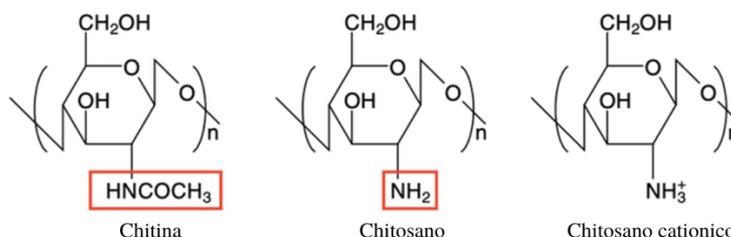


Figura 4: Formula di struttura della chitina, del chitosano e del chitosano cationico. In evidenza il gruppo $NHCOCH_3$ della chitina che, a seguito della deacetilazione, diventa un gruppo NH_2 nel chitosano. (Figura tratta da Hassan *et al.*, 2017, con modifiche)

I gruppi amminici presenti sulla catena sono quelli che influenzano la solubilità del chitosano in acqua e nelle soluzioni acide a partire da un pH < 6,5. Le proprietà di solubilità del chitosano dipendono dai

seguenti parametri: il grado medio di acetilazione (DA), il peso molecolare e la distribuzione dei gruppi acetilici lungo la catena (Caruso, 2019).

I gruppi amminici presenti sulla catena del chitosano possono essere protonati e questo fa sì che questo polimero possa essere identificato come vettore cationico. Infatti, è in grado di interagire velocemente con molecole di carica opposta, tra cui RNA e DNA e garantire un'elevata efficienza di incapsulamento. La principale criticità è proprio dovuta a questa alta interazione che rende difficile il controllo del rilascio dell'oligonucleotide. Per questa ragione, spesso in fase di sintesi vengono addizionati composti idrofobici che in parte limitano l'interazione polimero / acido nucleico (Bravo *et al.*, 2016).

Grazie alle proprietà descritte sopra, il chitosano è stato ampiamente studiato per una varietà di forme farmaceutiche microparticolate. Inoltre, è anche un candidato per potenziali applicazioni nella veicolazione di radiofarmaci, geni e peptidi, soprattutto grazie alle sue proprietà che permettono di rilasciare lentamente la sostanza incapsulata (Fini *et al.*, 2003).

Per cui il chitosano e tutti gli altri polimeri da esso derivati sono stati riconosciuti come vettori cationici sicuri, efficienti e che presentano un'alta biodegradabilità, biocompatibilità, non tossicità e basso costo. Inoltre, tra le sue proprietà il chitosano presenta anche un'azione antimicrobica che si presenta con tre differenti meccanismi (Caruso, 2019):

- a. Distruzione delle pareti cellulari dei microrganismi patogeni: queste sono cariche negativamente, invece il chitosano ha un potenziale superficiale positivo per cui l'interazione tra i due porta alla morte dei microrganismi;
- b. Azione chelante da parte del film di chitosano che si può formare attorno ad un microrganismo patogeno e che impedisce l'afflusso di micro/macronutrienti per la cellula;
- c. Inibizione della sintesi di mRNA e quindi delle proteine del microrganismo patogeno dovuta all'interazione tra le cariche positive del chitosano e quelle negative dell'acido nucleico.

1.2.2 Metodi di sintesi delle nanoparticelle di chitosano

Le nanoparticelle di chitosano, e in generale quelle polimeriche, possono essere ottenute tramite differenti meccanismi e la scelta di una certa via rispetto ad un'altra dipende dall'applicazione prevista. I metodi di polimerizzazione generalmente prevedono l'utilizzo di polimeri preformati poiché la sintesi a partire da monomeri comporta la presenza di molti residui che possono portare a reazioni e prodotti indesiderati.

Le tecniche maggiormente impiegate per la sintesi di nanoparticelle di chitosano a partire da polimeri preformati sono (Amoabediny *et al.*, 2018):

- a. *Evaporazione del solvente*: Il chitosano è disciolto in un solvente organico volatile come il diclorometano, cloroformio o acetato di metile insieme al farmaco che si vuole incapsulare; a questa soluzione viene addizionata acqua con all'interno di uno stabilizzatore di nanoparticelle. Successivamente il solvente viene rimosso per evaporazione con agitazione a bassa pressione e questo promuove la formazione di nanoparticelle; i residui vengono eliminati per centrifugazione o tramite lavaggi.
- b. *Emulsificazione/diffusione con solvente (ESD)*: Il principio attivo e il polimero preformato vengono posti in soluzione con un solvente parzialmente miscibile con acqua; viene addizionata lentamente dell'acqua alla soluzione fino a raggiungere una condizione di supersaturazione che porta alla formazione delle nanoparticelle. Le PNP possono essere recuperate tramite filtrazione o evaporazione del solvente.

- c. *Omogeneizzazione ad alta pressione*: Si adopera un omogeneizzatore ad alta pressione nel quale vengono fatti passare più volte i polimeri preformati e i farmaci sciolti all'interno di un solvente acquoso; ad ogni ciclo la pressione viene aumentata per ottimizzare il passaggio. Queste condizioni permettono la formazione delle nanoparticelle.

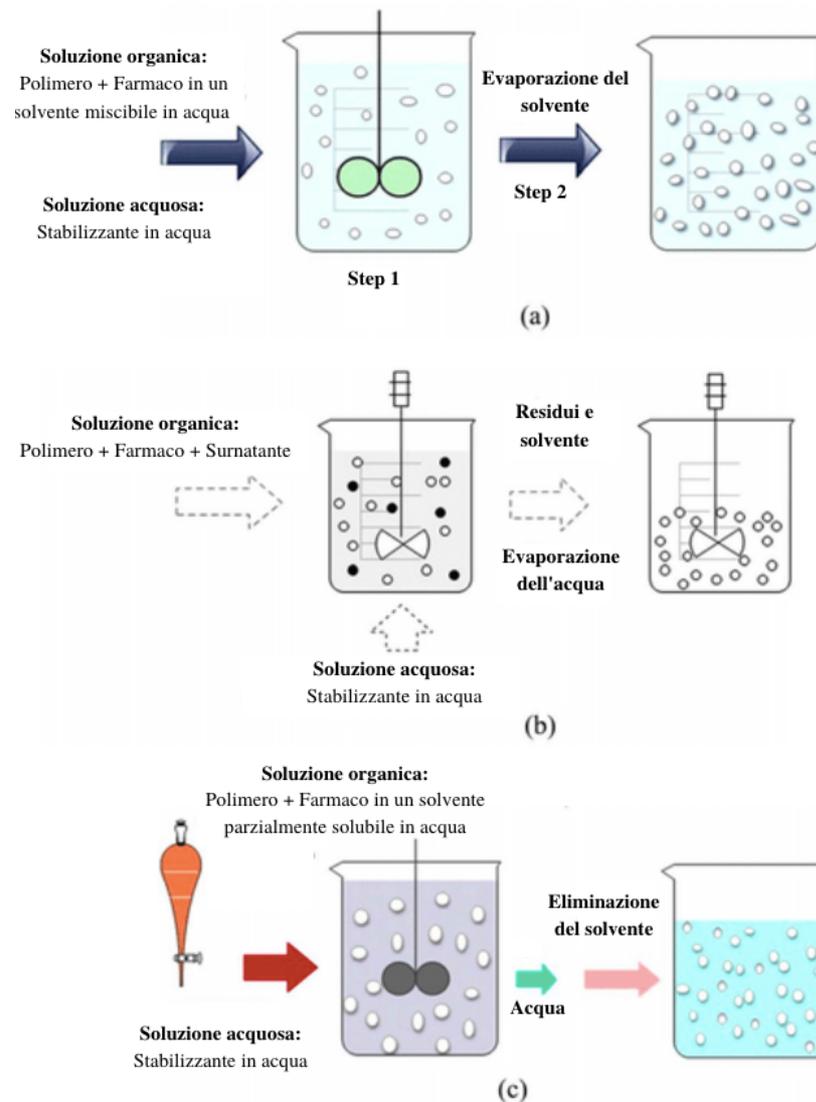


Figura 5: (a) schema del metodo di evaporazione con solvente, (b) schema del metodo di nanoprecipitazione, (c) schema della tecnica di emulsione/diffusione con solvente. Figura tratta da Amoabediny et al. (2018) e riprodotta con modifiche.

- d. *Salting-out*: È una tecnica alternativa alla ESD e prevede due step consecutivi: nel primo il chitosano e il farmaco sono sciolti in un solvente organico miscibile in acqua, nel secondo la soluzione viene aggiunta ad una fase acquosa con agenti stabilizzanti elettrolitici e non che inducono il salting – out. Grazie all'aggiunta di acqua si porta il sistema in una condizione di instabilità e la diffusione che ne consegue porta alla formazione delle nanoparticelle. Il recupero può avvenire tramite filtrazione.
- e. *Dialisi*: Il chitosano e il farmaco vengono sciolti in un solvente organico e posizionati all'interno di una membrana di dialisi; questa poi viene immersa in un contro-solvente miscibile con il primo. Il movimento del contro-solvente porta alla formazione di nanoparticelle.
- f. *Essiccazione spray*: Il chitosano e il farmaco sono disciolti in acqua e vengono essiccati con lo spray a seguito della filtrazione con una siringa. Questo porta all'evaporazione del solvente e ne consegue la precipitazione delle PNP.

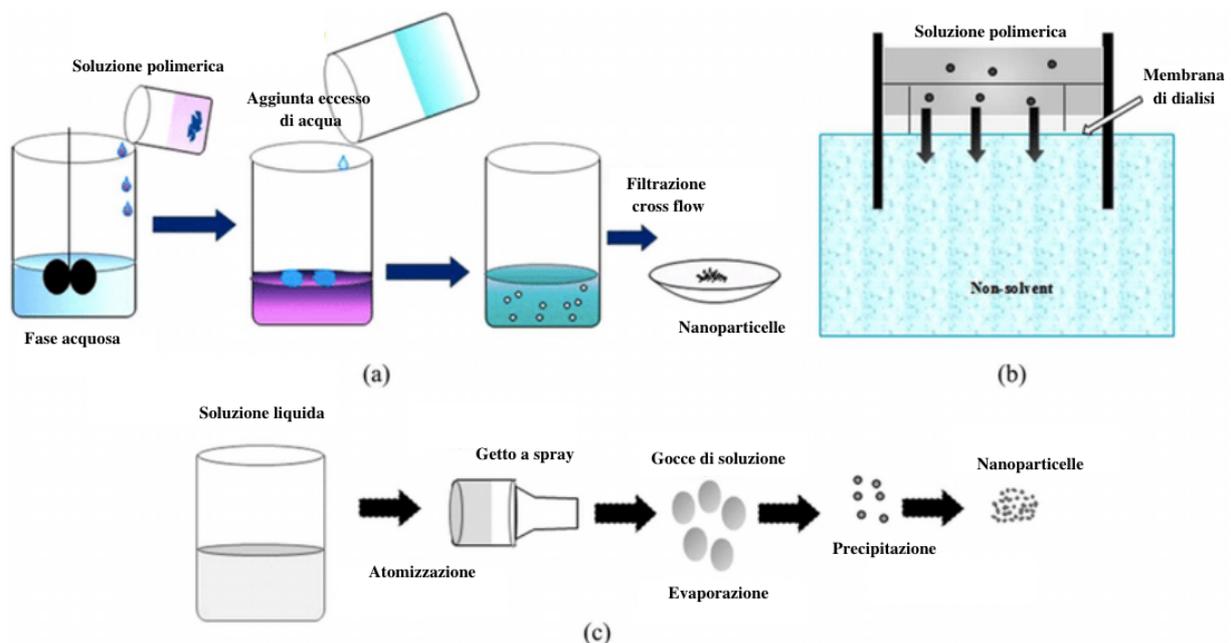


Figura 6: (a) Schema della tecnica di salting-out, (b) schema della tecnica di dialisi, (c) schema dell'essiccazione a spray. Figura tratta da Amoabediny et al. (2018) e riprodotta con modifiche.

- g. **Tecnologia dei fluidi supercritici (SCF):** Il chitosano e il farmaco sono miscelati con un fluido supercritico, successivamente vengono eseguite una espansione isobarica e una depressione con un ugello capillare. Questi due step portano alla formazione delle microparticelle. Per diminuire ulteriormente le dimensioni è possibile accoppiare questa tecnica con ESD; il grande vantaggio di questo metodo è l'assenza di solventi organici per cui risulta essere più sostenibile dal punto di vista ambientale.
- h. **Nanoprecipitazione:** Il principio attivo e il polimero preformato chitosano vengono sciolti in un solvente organico (totalmente miscibile in acqua) e miscelato con una soluzione acquosa (antisolvente) in un agitatore ad alta velocità. All'interfaccia tra il solvente organico e l'acqua il polimero si accumula e il rapido spostamento del solvente dal polimero verso l'antisolvente causa una riduzione del valore di solubilità e, quindi, la formazione quasi istantanea di nanoparticelle (Amoabediny et al., 2018).

Il principale vantaggio della nanoprecipitazione risiede nel fatto che non necessita processi di emulsione o l'utilizzo di tensioattivi; inoltre, la sospensione di nanoparticelle risulta essere monodispersa. (Lepeltier *et al.*, 2014). Per ottenere le PNP nelle condizioni desiderate è possibile andare a modulare la velocità di agitazione e la concentrazione di chitosano (Caruso, 2019). Le condizioni ottimali sono quelle descritte dal "Ouzo effect" (Figura 7) in cui si mostra che è necessario avere una bassa concentrazione di biopolimero e un alto quantitativo di antisolvente. Inoltre, per minimizzare le dimensioni è fondamentale mantenere un'intensa miscelazione, quindi riducendo il tempo caratteristico di mixing.

Come detto sopra, questa tecnica prevede l'interazione diretta tra una soluzione di solvente contenente il biopolimero e un antisolvente. È fondamentale che le due soluzioni siano completamente miscibili al fine di ottenere le nanoparticelle. Come detto in precedenza il chitosano si scioglie in ambiente acido per cui il solvente scelto è il *sodium acetate buffer* composto da 0.1M acido acetico e 0.1M acetato di sodio a pH 4.5, mentre l'antisolvente è costituito da *sodium sulphate buffer* 50 mM a pH 7.5, nel quale verrà sciolto l'RNA (Zhang *et al.*, 2010).

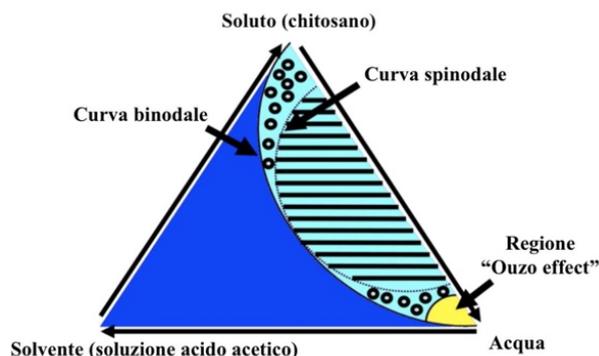


Figura 7: Diagramma di fase ternario di soluto (chitosano), solvente (soluzione di acido acetico) e acqua che evidenzia la regione all'interno della quale si osserva il cosiddetto "Ouzo effect", ovvero la spontanea e pressoché immediata formazione di nanoparticelle monodisperse. Ciò avviene quando si ha un elevato contenuto d'acqua e una piccola quantità di soluto. (Figura tratta da Lepeltier et al., 2014, con modifiche).

1.3 Nanoparticelle lipidiche

Nel campo delle nanoparticelle, quelle lipidiche sono ampiamente studiate ed impiegate nell'ambito medico per la veicolazione dei farmaci. In particolare, gli LNP sono utilizzati per terapie geniche, proteiche e per vaccini a base di RNA sviluppati contro malattie infettive e cancro (Aldosari et al., 2021).

1.3.1 Classificazione delle nanoparticelle lipidiche

Tra le nanostrutture lipidiche, le più utilizzate sono i liposomi, che sono vescicole caratterizzate da un nucleo acquoso racchiuso da un doppio strato lipidico composto da fosfolipidi sintetici o naturali. Questi presentano una testa polare in grado di interagire con legami idrogeno con l'ambiente acquoso, e una coda idrofobica che porta alla formazione del doppio strato mediante forze di Van der Waals. Nella fase di sintesi delle nanoparticelle, il farmaco solubile in acqua viene sempre intrappolato nel volume acquoso centrale, invece la struttura dello strato lipidico può essere differente. Infatti, si possono ottenere configurazioni con più doppi strati concentrici separati da compartimenti acquosi oppure con un doppio strato lipidico esterno contenente altri doppi strati sempre più piccoli separati da cavità d'acqua, come una struttura a cipolla. In funzione della struttura che si va a creare, è possibile definire vescicole multilamellari o piccole/grandi vescicole unilamellari. A seconda della configurazione si ottengono nanoparticelle lipidiche con dimensioni e cariche superficiali molto diverse (Barba et al., 2019; Amoabediny et al., 2018)

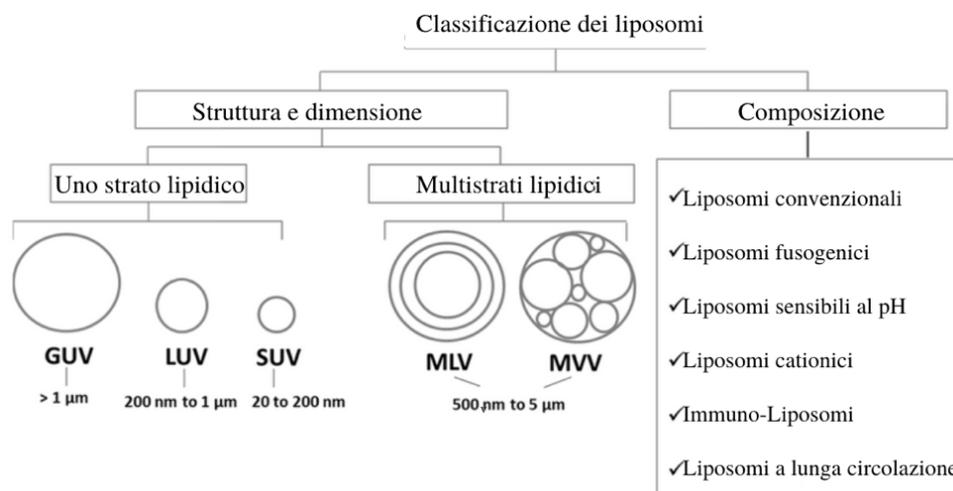


Figura 8 Classificazione dei liposomi per struttura/dimensione e composizione lipidica. – Figura tratta da Barba et al., 2019 con modifiche

I principali vantaggi legati all'utilizzo di nanoparticelle lipidiche sono la facilità di sintesi, l'elevata biocompatibilità soprattutto per la affinità con le membrane biologiche, l'alta biodegradabilità. Inoltre, possono essere utilizzate per un gran numero di farmaci differenti e prodotti in larga scala.

Al fine di ottimizzare aspetti come la stabilità, il *targeting* e il rilascio è possibile andare a funzionalizzare il liposoma utilizzando, in fase di sintesi, un insieme di composti (Amoabediny et al., 2018). In particolare, per le nanoparticelle lipidiche utilizzate per i vaccini a RNA vengono seguite delle proporzioni precise tra lipidi cationici/ionizzabili, lipidi ausiliari, colesterolo e lipidi PEGilati.

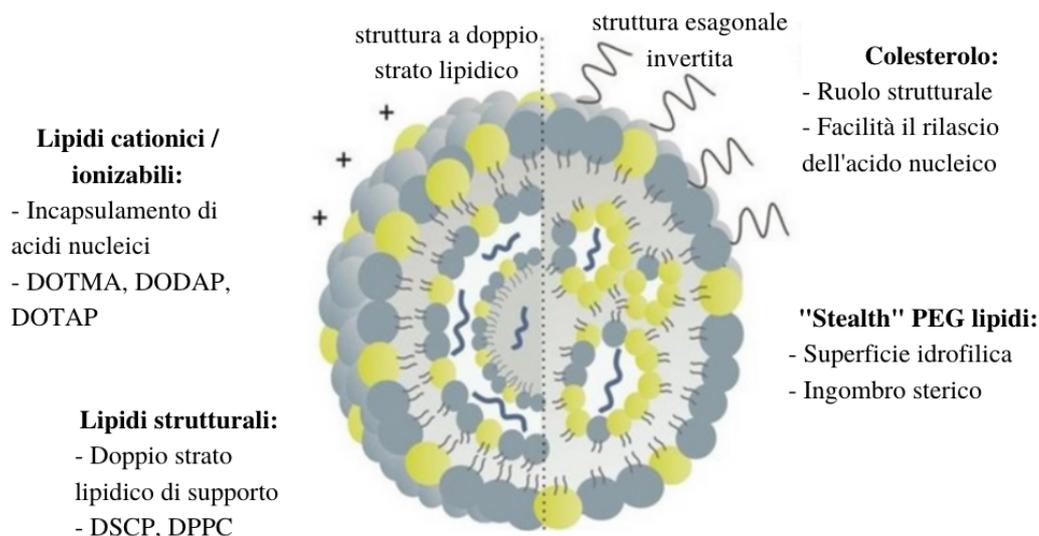


Figura 9: Rappresentazione schematica delle diverse tipologie di nanoparticelle lipidiche a mRNA Figura tratta Aldosari et al., 2021 con modifiche

- Lipidi cationici/ionizzabili:** I lipidi cationici apportano un grande contributo in termini di efficienza di incapsulamento grazie alle interazioni elettrostatiche che si vengono a creare tra il lipide positivo e gli acidi nucleici negativi. Tuttavia, sempre a causa della forte reattività, risultano essere instabili soprattutto nei fluidi fisiologici come il sangue ed è per questa ragione che si è optato per l'impiego di lipidi ionizzabili (Semple *et al.*, 2001). La carica di questi lipidi può essere modulata in funzione del pH: quando è acido risultano avere una carica superficiale positiva per cui sono in grado di interagire con l'RNA, invece risultano essere neutri a pH fisiologico e questo permette di ottenere un tempo più lungo di circolazione. Da prove svolte è emerso che i lipidi ionizzabili risultano avere una migliore resistenza rispetto a quelli cationici, che mostrano maggiore tossicità cellulare. Inoltre, quelli cationici hanno un'elevata tendenza all'aggregazione in capillari fini e questo può provocare effetti indesiderati. Di questa categoria di lipidi fanno parte DOTMA, DODAP, DOTAP.
- Lipidi helper:** Nella classe di lipidi *helper* fanno parti i PEGilati, il colesterolo e la fosfatidilcolina, tutti questi apportano proprietà funzionali per migliorare la stabilità delle nanoparticelle e l'efficienza di rilascio dell'RNA.
 - PEG – Lipidi:** Sono componenti superficiali costituiti da una componente idrofila (PEG) e una idrofoba (lipide), la prima è legata alla superficie del LNP, l'altra invece si inserisce nel doppio stato fosfolipidico. L'impiego di questi composti permette di andare ad aumentare il tempo di circolazione poiché aumenta l'ostacolo sterico che porta alla diminuzione dell'agglomerazione delle particelle. Come riportato da Semple

- (2001) è necessario introdurre un quantitativo adeguato di PEG – lipide, in modo tale da evitare effetti indesiderati come ad esempio l'inibizione al rilascio dell'RNA.
- ii. *Colesterolo*: L'incorporazione del colesterolo dona un effetto stabilizzante alla nanoparticella e svolge anche un ruolo strutturale, conferendo maggiore resistenza alla membrana lipidica. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che aumenta anche l'efficienza di rilascio dell'acido nucleico, principalmente dovuto ad una migliore affinità con la membrana.
 - iii. *Fosfatidilcolina*: Ricopre un ruolo principalmente strutturale all'interno della membrana lipidica, infatti si occupa della formazione del doppio strato lipidico, di conseguenza prende anche parte alla fase di rilascio del farmaco. Infatti, data la loro alta stabilità a temperature fisiologiche, difficilmente sono in grado di rilasciare l'RNA e, per questo motivo, necessitano l'accoppiamento con altre sostanze come il colesterolo.

1.3.2 Metodi di sintesi delle nanoparticelle lipidiche

I metodi di sintesi delle nanoparticelle lipidiche sono differenti, i principali impiegati soprattutto in ambito industriale sono:

- a. *Flusso di aerosol*: il farmaco viene disperso insieme a dei solventi organici volatili su cui vengono spruzzati dei gas inerti ad alta temperatura.
- b. *Tecnologia dei fluidi supercritici*: il farmaco viene solubilizzato in un fluido supercritico come la CO₂ e la sintesi viene effettuata tramite espansione veloce.
- c. *Metodo di precipitazione continua*: il farmaco viene sciolto in un solvente solubile in acqua; l'acqua viene aggiunta in eccesso e la sintesi si verifica portando la soluzione in una condizione di instabilità.
- d. *Micromiscelazione*.

Quest'ultima tecnica è quella adoperata maggiormente, dal momento che è facilmente scalabile, riproducibile e con un'alta efficienza di incapsulamento dell'acido nucleico. Questo metodo prevede che i lipidi vengono sciolti in etanolo, alcol che risulta essere miscibile con acqua. La sintesi si effettua miscelando la soluzione alcolica di lipidi con una acquosa acida in cui è disciolto l'acido nucleico. L'agitazione permette di ridurre la solubilità dei lipidi e grazie alla differenza di carica tra questi ultimi (positivi) e l'RNA (negativo) si effettua la sintesi delle nanoparticelle lipidiche con oligonucleotide incapsulato. Successivamente è necessario che l'etanolo venga allontanato in modo tale da mantenere stabile la soluzione e riportarla ad un pH neutro.

I mixer che possono essere utilizzati durante questa fase di sintesi sono due: il Vortex reactor e il Confined Impinging Jets Mixer (CIJM). In questo lavoro di tesi la soluzione acquosa acida adoperata (antisolvente) è il *sodium acetate buffer* composto da 0.1M acido acetico e 0.1M acetato di sodio a pH 4.5. L'etanolo con i lipidi ricopre il ruolo di solvente durante la sintesi delle nanoparticelle.

1.4 Metodi di sintesi di nanoparticelle

La nanoprecipitazione, già descritta nel paragrafo 1.2.2, risulta essere molto semplice da realizzare e versatile. Infatti la sintesi dipende dalla combinazione delle condizioni operative (tempo di miscelazione e temperatura), ma anche dalle diverse soluzioni che vengono ad essere impiegate.

Questo metodo, principalmente impiegato per l'incapsulamento di farmaci idrofobici (Miladi *et al*, 2015) in nanosfere o nanocapsule, prevede che vi sia un solvente e un antisolvente completamente miscibili tra loro così che avvenga un'istantanea formazione delle nanoparticelle. La soluzione definita come solvente è quella in cui è presente un materiale filmogeno in grado di formare la

struttura della nanoparticella; l'antisolvente contiene il farmaco, o in questo caso l'RNA, che deve essere intrappolato. I principali solventi che vengono impiegati in questo tipo di sintesi sono: acetone, etanolo, cloruro di metile (Rivas *et al.*, 2017).

La sintesi delle nanoparticelle tramite nanoprecipitazione prevede che il solvente venga miscelato con l'antisolvente e questo provoca una rapida desolvatazione del polimero (lipide o chitosano). Quest'ultimo diffonde nel mezzo disperdente e precipita rapidamente intrappolando così il farmaco (o RNA) presente nella soluzione. A seguito di questo processo, generalmente, si ottengono nanoparticelle di diametro medio compreso tra i 100 e i 300 nm con distribuzione dimensionale monomodale. Le caratteristiche come dimensione e carica superficiale dipendono dal tipo di polimero che viene impiegato e dalle soluzioni. Il grande vantaggio di questa tecnica risiede nell'assenza di grandi sforzi di taglio, alte temperature o altri fenomeni che possono danneggiare la struttura della nanoparticella e del farmaco (Bilati *et al.*, 2005).

La tecnica di sintesi di nanoprecipitazione sviluppata da Fessi (1989) è stata ampiamente adoperata per la sintesi di nanoparticelle che impiegano polimeri per l'incapsulamento di farmaci e la loro veicolazione. Tra i biopolimeri impiegati fanno parte i polisaccaridi tra cui il chitosano e l'amido, le proteine e i poliesteri come PLA e PCL (Rivas *et al.*, 2017).

I tipi di reattori impiegati per effettuare la sintesi delle nanoparticelle in questo lavoro di Tesi sono

- Reattore Vortex
- Microreattore Confined Impinging Jets Mixer (CIJM)

1.4.1 Agitatore vortex

L'agitatore Vortex è uno degli strumenti maggiormente utilizzati in laboratorio per effettuare la sintesi per nanoprecipitazione. Questo strumento risulta essere notevolmente semplice da adoperare e molto versatile. L'agitazione è dovuta alla presenza di un motore elettrico che mette in agitazione un piatto attraverso un albero verticale. Grazie al motore elettrico l'albero compie delle oscillazioni circolari e il moto viene trasmesso al contenuto delle provette. Questo piatto può presentare dei supporti che possono essere sostituiti in modo da potersi adattare a diversi tipi di contenitori.



Figura 10: Reattore Vortex e supporti per provette

I campioni possono essere sintetizzati all'interno di provette *Eppendorf* da 1.5 mL in cui vengono inseriti pari volumi di solvente e antisolvente. Successivamente vengono posti in agitazione alla massima potenza per un certo intervallo di tempo. Eseguire la sintesi direttamente all'interno della provetta permette di evitare di effettuare trasferimenti che comporterebbero perdita e contaminazione del campione. A valle della sintesi, la sospensione viene spesso sottoposta ad un processo di evaporazione in modo tale da separare le nanoparticelle dai solventi in cui sono immerse (Alshamsan, 2014).

Semple (2001) per eseguire la sintesi delle nanoparticelle lipidiche effettua l'aggiunta del solvente, etanolo con lipidi, goccia a goccia all'interno di pari volume di antisolvente composto dalla soluzione

acida con RNA. Anche in altri lavori (Alshamsan, 2014; Rivas *et al.*, 2017) viene citata la medesima operazione a cui segue la miscelazione ad alta velocità.

1.4.2 Confined Impinging Jets Mixer

Una via alternativa risulta essere l'utilizzo di *mixer* più complessi che permettono di ottenere una maggiore turbolenza, per cui una più intima miscelazione. I principali microreattori che vengono impiegati per la sintesi delle nanoparticelle sono (Caruso, 2019):

- Multi Inlet Vortex Mixer: questo tipo di microreattore è caratterizzato da una camera cilindrica a cui si accede con 2 o 4 ingressi posti in direzione tangenziale (Figura 11.a).
- Tee Mixer e Y-Mixer: i due sistemi sono molto simili, l'unica differenza è che nel primo caso gli ingressi sono posti a 180° uno dall'altro, nel secondo caso, Y-mixer, l'angolo risulta essere inferiore (Figura 11.b).
- Confined Impinging Jets Mixer (CIJM): in questo microreattore è presente una camera di miscelazione cilindrica che viene alimentata da due ingressi posti a 180°. Questa camera risulta sufficientemente piccola così da ottenere un'elevata efficienza di *mixing*, ovvero avviene una rapida dissipazione dell'energia cinetica turbolenta (Figura 11.c).

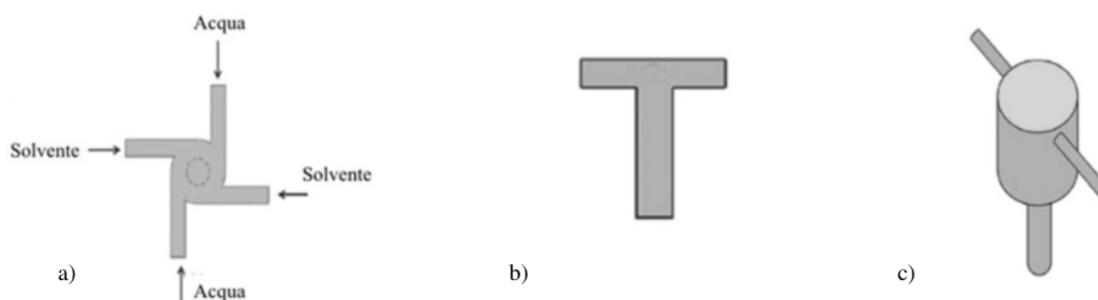


Figura 11: Rappresentazione schematica dei miscelatori che permettono di ottenere una miscelazione più efficiente grazie alla generazione di una intensa turbolenza: (a) Multi Inlet Vortex Mixer e (b) Tee Mixer; (c) Confined Impinging Jets Mixer (CIJM);

La sintesi tramite CIJM avviene a seguito della collisione di solvente e antisolvente all'interno della camera. Come detto in precedenza, l'interazione determina una velocissima dissipazione dell'energia cinetica turbolenta, permettendo così una miscelazione intensa e la conseguente sintesi delle nanoparticelle. Dalle prove effettuate da Johnson (2003) è emerso che la fluidodinamica svolge un ruolo fondamentale per l'ottenimento delle nanoparticelle e le dinamiche che caratterizzano il processo sono state indagate sia sperimentalmente da Gavi (2010) che attraverso simulazioni CFD da Marchisio (2006). Da questi lavori è emerso che la dimensione finale delle nanoparticelle che si ottengono è strettamente legata alla dimensione della camera di miscelazione. Inoltre, gli studi effettuati da Valente (2012) ha fatto emergere che il numero di Damköhler, definito dal rapporto tra tempo di miscelazione caratteristico e tempo di sintesi delle nanoparticelle, può esprimere l'interazione tra la miscelazione e la concentrazione di polimero presente in soluzione. In questo modo è possibile relazionare una variabile adimensionata con le grandezze del processo, per cui il numero di Da si può utilizzare come parametro per lo scale-up.

1.5 Applicazioni delle nanoparticelle lipidiche

In Tabella 1 sono stati raccolti i principali vantaggi e le criticità legate all'impiego dei liposomi.

Tabella 1: Vantaggi e svantaggi dei liposomi – Tabella tratta da Akbarzadeh et al., 2013 con modifiche

Vantaggi dei liposomi	Svantaggi dei liposomi
I liposomi aumentano l'efficacia e l'indice terapeutico del farmaco	Bassa solubilità
I liposomi sono atossici, flessibili, biocompatibili, completamente biodegradabili e non immunogenici per somministrazioni sistemiche e non sistemiche	Breve stabilità
I liposomi riducono la tossicità dell'agente incapsulato	A volte il fosfolipide subisce una reazione di ossidazione e idrolisi
I liposomi aiutano a ridurre l'esposizione dei tessuti sensibili ai farmaci tossici	Perdita e fusione di farmaci/molecole incapsulate
Flessibilità di accoppiare con ligandi sito-specifici per ottenere un <i>targeting</i> attivo	Il costo di produzione è elevato

In precedenza, si è accennato al fatto che i liposomi hanno una vasta gamma di applicazioni sia nel campo della diagnostica che in quello terapeutico. In particolare, nell'ultimo anno la ricerca ha compiuto un grande passo in avanti dal momento che le nanoparticelle lipidiche sono state scelte come mezzo per veicolare RNA per i vaccini contro SARS-CoV-2. Infatti, a partire dal 2018, anno in cui è stato approvato l'utilizzo di *nanocarriers* con acidi nucleici, le nanoparticelle lipidiche risultano essere uno dei mezzi maggiormente studiati per la veicolazione e la somministrazione in vivo dei vaccini a base di acido nucleico (Aldosari *et al.*, 2021).

1.5.1 Vaccini genetici

I vaccini genetici risultano essere un'alternativa a quelli ricombinanti o ai tradizionali; essendo i più recenti, presentano con una serie di aspetti che devono essere ancora indagati. Tramite l'utilizzo di vaccini genetici si introduce l'acido nucleico all'interno dell'organismo mediante sia vettori virali o liposomi, sia senza nessun *carrier*. A seconda della modalità in cui viene effettuata la somministrazione il metodo può risultare più o meno diretto.

Generalmente, la somministrazione risulta essere intramuscolare, per cui il gene viene iniettato direttamente nella cellula muscolare ed espresso subito, in modo tale che a seguito dei processi di trascrizione e traduzione si ottenga una proteina in grado di generare un'adeguata risposta immunitaria.

Perciò in questo tipo di vaccini non viene iniettato un microrganismo o una proteina, ma direttamente il materiale genico che codifica la proteina di interesse. A seconda della via di sintesi viene utilizzata la sequenza genica desiderata, in altri casi si adopera un vettore ricombinante che contiene il gene che codifica per l'antigene desiderato. In questo modo si combinano i vantaggi dei vaccini ricombinanti con subunità e quelli vivi; infatti, non si inietta il microrganismo completo, ma allo stesso tempo la proteina è sintetizzata dall'ospite.

Uno dei principali benefici legati all'utilizzo dei vaccini genetici risiede nel fatto che l'estrazione del gene corrispondente alla proteina di interesse risulta essere molto più veloce rispetto alla coltura di un virus per produrre l'antigene di interesse. In particolare, il vantaggio è evidente quando vi sono dei virus emergenti e non si conoscono le condizioni ottimali di coltura; per cui una volta nota la sequenza genica di interesse è possibile ottenere i vaccini molto rapidamente. Inoltre, dallo studio delle risposte immunitarie di alcuni organismi, è emerso che questa risulta essere molto più forte quando viene iniettato il gene anziché la proteina (Aldosari *et al.*, 2021).

Le principali criticità sono legate alla bassa immunogenicità intrinseca. Infatti, se il vaccino è a DNA, questo si può ricombinare con altre regioni del genoma dell'ospite per cui può accadere che vengano prodotti anticorpi anti DNA. Se invece il vaccino è a RNA allora è necessario che la risposta immunitaria venga generata velocemente dal momento che la molecola di RNA si degrada velocemente.

I vaccini a mRNA risultano essere più adeguati sotto diversi punti di vista, perché è possibile esprimere l'antigene senza che l'acido nucleico entri nella membrana del nucleo; nel caso questo accadesse, l'RNA non si integra o modifica in alcun modo il genoma della cellula ospite (Verbeke *et al.*, 2021).

Per la veicolazione di questi vaccini genetici è possibile utilizzare vettori virali e non; i secondi sono preferiti perché si possono impiegare molti più materiali per effettuare la sintesi. Inoltre, possono essere considerati più sicuri dal momento che risultano essere meno immunogenici e mostrano una minore capacità di trasfezione. Infine, l'incapsulamento all'interno di vettori non virali, come nanoparticelle lipidiche, permette di proteggere la molecola di mRNA e riduce la prematura degradazione a seguito della somministrazione.

Metodo	Vettore	Facilità di utilizzo/preparazione	Immunogenicità	Efficienza	Dimensione del transgene	Integrazione	Svantaggi
Chimico	Liposomi	+++	Scarsa	Scarsa	Elevata	No; scarsa	Espressione transiente del transgene
Trasduzione virale	Retrovirus	++	Scarsa	Elevata	Limitata	Sì, solo in cellule in divisione; stabile nel tempo	Possibile mutagenesi inserzionale
	Lentivirus	++	Scarsa	Elevata	Limitata	Sì	Possibile mutagenesi inserzionale
	Adenovirus	+	Elevata	Elevata	Buona	No	Espressione transiente del transgene
	Virus adenoassociato	+	Scarsa	Elevata	Limitata	Sì	Possibile mutagenesi inserzionale
	Herpesvirus	+	Possibile	Elevata	Alta	No	Difficoltà di manipolazione

Figura 12: Metodi e vettori in uso per approcci di terapia genica – Figura tratta da Vegeto *et al.*, 2020 con modifiche

In realtà questi metodi e vettori sono usati anche in terapia genica. Per quanto riguarda i vaccini a DNA e RNA sono state esportate tecnologie applicate nelle terapie geniche.

Dalla Figura 12 è possibile notare che sono molte le vie che possono essere utilizzate per veicolare acidi nucleici all'interno dell'organismo. Nella categoria dei vettori virali fanno parte i retrovirus, i lentivirus, adenovirus (Ad), i virus adenoassociati (AAV) e *Herpes simplex virus*: questi sono maggiormente impiegati per terapie geniche, ma si potrebbe estendere l'impiego anche nel campo dei vaccini. Gli adenovirus ad oggi sono quelli utilizzati per la produzione di vaccini contro SARS-CoV-2. Questi presentano un genoma costituito da un doppio filamento di DNA di circa 35 kb, 30 dei quali possono essere rimpiazzati dal gene di interesse. Possono quindi portare un grande quantitativo di oligonucleotidi esogeni. Una volta all'interno della cellula, l'adenovirus non si integra nel genoma della cellula ma si replica nel nucleo come un episoma.

1.5.2 Sviluppo di vaccini Covid-19

Dei molti vaccini contro SARS-CoV-2 in fase di sviluppo, i due vaccini che hanno mostrato i risultati più promettenti nella prevenzione dell'infezione da COVID-19 rappresentano una nuova classe di prodotti vaccinali: sono composti da filamenti di acido ribonucleico messaggero (mRNA) incapsulati in nanoparticelle lipidiche (LNP). L'efficacia di questi vaccini a mRNA sviluppati da BioNTech/Pfizer e Moderna è di circa il 95% e sono stati i primi vaccini a mRNA a ricevere "l'autorizzazione all'uso di emergenza" (dalla FDA che poi ha concesso l'autorizzazione definitiva in agosto 2021) e "approvazione condizionata" da parte dell'EMA (Linde *et al.*, 2021). Le LNP non erano del tutto nuove al mondo della medicina, ma grazie allo sviluppo dei vaccini contro il COVID-19 e alla loro approvazione, si prevede per i prossimi anni una diffusione su larga scala.

La tecnica di sintesi dei vaccini a mRNA impiegata dalle case farmaceutiche Pfizer-BionTech e Moderna viene definita metodo chimico che prevede l'uso di liposomi, all'interno dei quali viene incapsulato l'acido nucleico.

Una via alternativa è quella che propone l'utilizzo di vettori virali in cui è inserito il gene di interesse; questo meccanismo viene chiamato trasduzione virale. Nei vaccini prodotti da AstraZeneca e Johnson & Johnson si impiega l'adenovirus come vettore per veicolare l'RNA.

Come detto in precedenza, i liposomi risultano essere più semplici da sintetizzare, ma presentano una scarsa immunogenicità ed efficienza rispetto agli adenovirus. In nessuno dei due metodi di sintesi si presenta il pericolo di integrazione del materiale genico all'interno del DNA della cellula ospite; per cui si può affermare che in entrambi i casi la risposta del gene risulta essere transiente.

L'mRNA che viene incapsulato è a singolo filamento e a polarità positiva, caratterizzato da replicazione citoplasmatica con quattro proteine strutturali: spike (S), involucro (E), membrana (M) e nucleocapside (N). La proteina S è quella che viene utilizzata dal virus per entrare all'interno delle cellule mediante l'interazione con il recettore ACE. Nella fase di sviluppo dei vaccini è stato preso come principale antigene bersaglio la proteina S poiché svolge un ruolo cruciale nella stimolazione della risposta immunitaria.. (Dong *et al.*, 2020; Dutta *et al.*, 2020).

Per svolgere le due azioni è necessario che la proteina spike del SARS-CoV-2, espressa e legata alla membrana, venga riconosciuta dalle cellule immunitarie come antigene estraneo. Ciò induce una risposta sia delle cellule T che delle cellule B che generano anticorpi neutralizzanti, i quali possono contribuire alla protezione contro COVID-19 (Dutta *et al.*, 2020).

1.5.3 Confronto composizioni dei vaccini Moderna e Pfizer

I vaccini prodotti da Pfizer-BionTech e Moderna veicolano l'RNA attraverso nanoparticelle lipidiche. La miscela dei lipidi utilizzati nelle due sintesi non risulta essere del tutto uguale e le sottili differenze sulle composizioni dei diversi lipidi causano variazioni sull'efficienza di somministrazione e di immunogenicità (Verbeke *et al.*, 2021).

Come viene riportato dai comunicati dell'EMA (2020; 2021) gli LNP di BioNTech e Moderna contengono gli stessi lipidi ausiliari; ciò che cambia sono i rapporti tra i vari componenti, poiché come è stato descritto sopra, ognuno ha una funzione ben specifica e la variazione di concentrazione di uno rispetto all'altro può comportare effetti non trascurabili. In Tabella 2 sono state riportate le composizioni dei due vaccini che impiegano nanoparticelle lipidiche in fase di sintesi.

Tabella 2: Confronto tra le composizioni dei vaccini tra Pfizer-BioNTech (FDA, a, 2021) e Moderna (FDA, b, 2021)

Composizione Pfizer-BioNTech	Composizione Moderna
mRNA	mRNA
Lipidi ((4-hydroxybutyl)azanediyl)bis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate), 2 [(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide [PED-DTA], 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [DSCP] cholesterol)	Lipidi (SM-102, polyethylene glycol 2000 dimyristoyl glycerol [PEG-DMG], cholesterol, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [DSPC])
Cloruro di Potassio	Trometamina
Potassio monobasico	Trometamina cloridrato
Fosfato di sodio	Acido acetico
Cloruro di sodio	Sodio acetato triidrato
Fosfato di sodio dibasico diidrato	Saccarosio
Saccarosio	

1.6 Tecniche di conservazione dei liposomi

Nonostante la presenza di PEG, i liposomi in soluzione presentano una certa instabilità in fase di conservazione; infatti, si possono verificare dei processi di denaturazione e/o aggregazione dei liposomi. Questi fenomeni comportano poi delle conseguenze in fase di prestazioni in termini di veicolazione e rilascio dell'RNA. Il congelamento e la liofilizzazione risultano essere due delle principali soluzioni adottate per la conservazione, però presentano entrambi delle criticità:

- Stress meccanico: possono verificarsi danni alle membrane dei liposomi a causa della formazione di cristalli di ghiaccio durante la fase di congelamento.
- Rottura chimica dei liposomi: a causa della disidratazione, e conseguentemente incremento della concentrazione di soluto, si potrebbe verificare la rottura della nano particella.

Una soluzione per limitare questi due effetti può essere quella di impiegare dei crioprotettori al fine di ottenere risultati soddisfacenti nelle diverse fasi di processo (Bucca, 2019; Locatelli *et al.*, 2012; Stark *et al.*, 2010).

1.6.1 Conservazione dei vaccini a mRNA

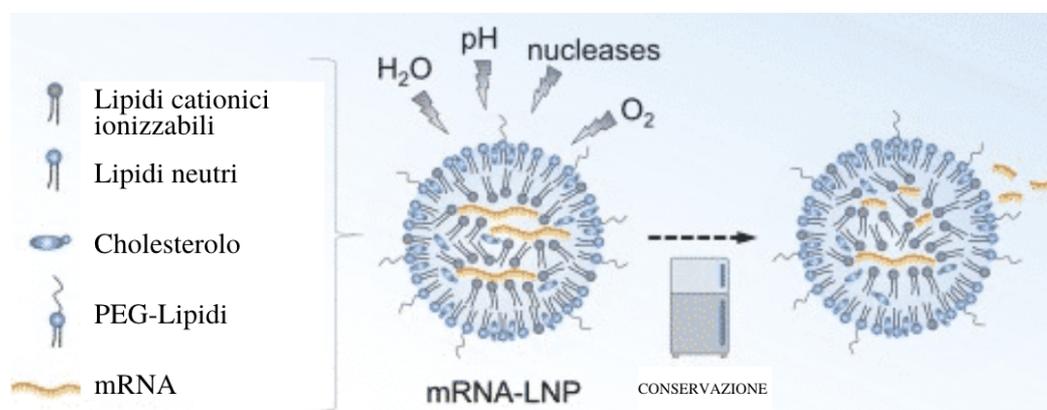


Figura 13: Effetti della conservazione in ambiente freddo – Figura tratta da Linde *et al.*, 2021 con modifiche

La liofilizzazione potrebbe essere una soluzione per la conservazione dei prodotti di Pfizer-BioNTech e Moderna. Attualmente, non si hanno dati certi su quali siano gli effetti sulle nanoparticelle una volta trascorsi lunghi periodi dalla sintesi. Gli aspetti maggiormente critici da dover studiare è se l'attività del vaccino viene inibita o se l'RNA subisce delle alterazioni.

Fino ad ora sono state seguite le indicazioni fornite dall'EMA (2020; 2021), che prevedono di conservare i lotti a temperature molto basse, tra i -60 e i -90°C, cosa che risulta essere un grande limite soprattutto per la distribuzione (Linde *et al.*, 2021). Infatti, l'obiettivo è quello di andare a definire una procedura che permetta di conservare i vaccini a partire da -2°C in modo da facilitare il trasporto e la conservazione.

1.6.2 Liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo che si pone come obiettivo la stabilizzazione del biofarmaco a temperatura ambiente durante tutto il periodo di tempo che intercorre tra la produzione e la somministrazione. (Pisano, 2021)

La presenza di acqua è una delle principali cause di instabilità per le nanoparticelle poiché porta a fenomeni di idrolisi e ossidazione; inoltre, in presenza di una soluzione si può avere una perdita di solidi incapsulati e/o la formazione di aggregati. Per cui, l'obiettivo del processo è separare solvente da soluzione tramite l'essiccamento a bassa temperatura, adatto per i prodotti termolabili. Infatti, viene condotto a bassissima temperatura e bassa pressione. La liofilizzazione è inoltre compatibile con le condizioni di sterilità. Un altro vantaggio sta nel fatto che il prodotto è dosato in fase liquida e poi liofilizzato. Non c'è quindi una polvere da dosare con più difficoltà successivamente. (Pisano, 2021)

Esistono ovviamente anche svantaggi legati al processo di liofilizzazione. Dal punto di vista energetico risulta essere estremamente poco efficiente, questo perché i tempi sono molto lunghi e per mantenere le temperature e le pressioni richieste è necessario un grande dispendio di energia. Per questa ragione i prodotti che subiscono il processo di liofilizzazione sono quelli che sono ad alto valore aggiunto come farmaci o alimenti per bambini.

Un'altra criticità è legata al difficile recupero dell'attività biologica dal momento che durante il processo il prodotto risulta essere sottoposto a stress termici e legati dalla formazione dei cristalli; per ovviare a questo problema vengono introdotti dei protettori in fase di sintesi.

Infine, il prodotto liofilizzato non è immediatamente disponibile, ma prima di essere utilizzato necessita una fase di ri-sospensione. (Pisano, 2021)

Il processo di liofilizzazione prevede una prima fase di congelamento a cui segue un abbassamento di pressione e due successivi riscaldamenti, definiti essiccamento primario e secondario, sempre sottovuoto. La fase di congelamento è, in un certo senso, la prima fase di essiccamento in quanto sono separati progressivamente solvente e soluto tramite la cristallizzazione del solvente. Il congelamento, come illustrato nel seguito, possiede dei parametri caratteristici a cui prestare attenzione: velocità di congelamento, temperatura di nucleazione e fase di "ricottura". L'essiccamento primario, come quello secondario, anche possiede parametri caratteristici di cui tenere conto: la massima temperatura consentita per il prodotto rappresenta il valore di temperatura che non bisogna superare. Se tale temperatura venisse superata si andrebbe incontro a fenomeni indesiderati come il collasso della struttura o la degradazione della molecola. In generale passare questa temperatura porta ad avere un prodotto che non rispetta i requisiti di qualità richiesti. (Pisano, 2021).

1.6.3 Fase di congelamento

Nella fase di congelamento viene determinato il comportamento del prodotto che si avrà durante l'essiccamento primario e secondario, quindi in sostanza viene definita la morfologia del prodotto liofilizzato.

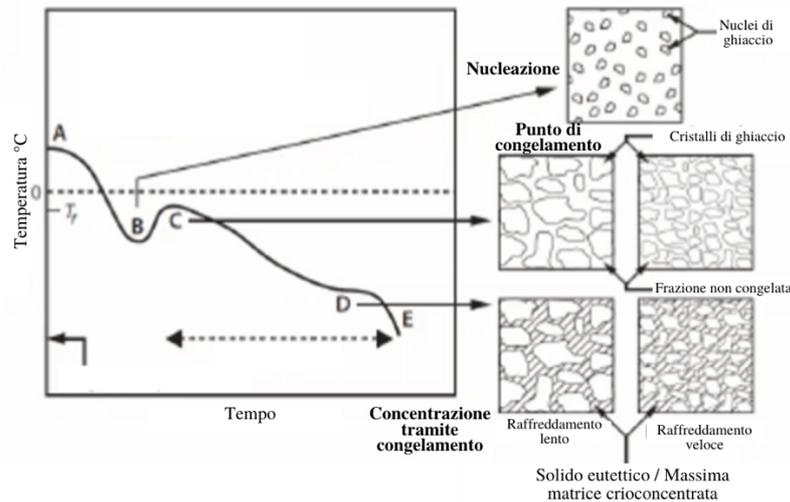


Figura 14: Da temperatura ambiente si effettua un sotto raffreddamento del liquido fino alla nucleazione che porta ad un riscaldamento fino alla temperatura di fusione termodinamica. Viene mantenuta quella temperatura fino a completa cristallizzazione del solvente per poi avere una diminuzione di temperatura fino a quella del ripiano. Questo ultimo step avviene solo quando tutto il prodotto solvente è ghiacciato e si è separato dal soluto – Figura tratta da Pisano, 2021 con modifiche

I parametri di processo manipolabili al fine di modificare le caratteristiche del prodotto congelato sono: il grado di sotto raffreddamento (quindi la temperatura di nucleazione) e la velocità di raffreddamento.

La temperatura di nucleazione è quella in corrispondenza della quale si generano dei *cluster* di solvente stabili, i primi nuclei di ghiaccio nel caso di acqua. Il grado di sotto raffreddamento è la differenza tra la temperatura di nucleazione e quella di congelamento termodinamica. I nuclei stabili non sono nient'altro che i germi di cristallizzazione e quindi quelle entità che poi crescendo si trasformano in cristalli di ghiaccio. Quanto minore è la temperatura di nucleazione, tanto più è elevato il numero di nuclei stabili che si formano in quella condizione per cui avranno dimensioni minori e questo ha conseguenze sulla morfologia finale. (Pisano, 2021)

Per controllare la dimensione dei cristalli di ghiaccio, è possibile agire sulla temperatura di nucleazione e, in misura minore, sulla velocità di raffreddamento. Più è alto il grado di sotto raffreddamento, più piccoli saranno i cristalli di ghiaccio che si formano nel prodotto congelato in quanto si avrà un numero di nuclei formato maggiore. Più è elevata la velocità di raffreddamento, più piccoli saranno i cristalli di ghiaccio formati. Viceversa, più bassa è la velocità, più grandi saranno i cristalli finali. Tra i due parametri il più influente è la temperatura di nucleazione. (Pisano, 2021)

Nell'ultimo decennio sono state portate avanti sperimentazioni che si ponevano come obiettivo quello di andare a diminuire l'eterogeneità presente tra un flacone ed un altro, in modo da poter uniformare il processo, essendo la nucleazione un fenomeno stocastico e, quindi, portando ad un prodotto con struttura differente da flacone a flacone.

Per questa ragione sono state sviluppate tecniche che permettono di portare i flaconi alla medesima temperatura e forzando la nucleazione, questa dovrebbe avvenire contemporaneamente in tutti. Solitamente le tecniche impiegate effettuano un sottoraffreddamento iniziale tra -3 e -10°C, una temperatura inferiore rispetto al punto di congelamento, ma alla quale non avviene ancora la nucleazione spontanea. I principali metodi di congelamento controllato sono:

1. *Ice fog technique*: tecnica della nebbia congelata. Questa tecnica si basa sul processo di *seeding*: alla soluzione sovrasatura si aggiunge un cristallo della stessa specie che si vuole far cristallizzare. Nel momento in cui il cristallo è inserito, questo innesca la nucleazione. I problemi di questa tecnica sono legati principalmente al fatto che non tutti i cristalli introdotti raggiungono la superficie del liquido nei flaconi (Bucca, 2019).
2. *VERISEQ®*: questa tecnica prevede che avvenga una miscelazione tra azoto freddo e vapore caldo in modo da ottenere cristalli di ghiaccio di dimensioni microscopiche da mandare all'interno dei flaconi; quello che si ottiene è una nucleazione rapida e uniforme (Wexler *et al.*, 2015).
3. *Pressurizzazione*: sfrutta la tecnologia *ControLyo®* (di Praxair), per cui la nucleazione avviene dopo la omogeneizzazione tra i -3 e i -10°C e a pressioni maggiori di quella atmosferica. I cristalli di ghiaccio si formano quando viene ripristinata la pressione atmosferica (Siew, 2013).
4. *Vibrazioni ultrasoniche*: vengono impiegate frequenze superiori a 10kHz che causano formazioni di piccole bolle di gas che ingrandendosi e rompendosi causano aumenti di temperatura e pressione. Queste variazioni localizzate provocano la nucleazione all'interno dei flaconi.

Le tecniche descritte sopra possono essere accoppiate ad una procedura chiamata *annealing* che favorisce ulteriormente l'uniformità del prodotto finale. Questo metodo prevede di effettuare un'operazione di ricottura aumentando la temperatura della soluzione crioconcentrata; per cui si fa passare la temperatura del prodotto da -50°C a valori superiori, ad es. -20°C. Questa seconda temperatura risulta essere superiore a quella di transizione vetrosa, ma inferiore a quella dell'eutettico. Questo incremento consente la crescita di cristalli più grandi a scapito di quelli più piccoli ed è fondamentale applicarlo quando i campioni sono congelati troppo velocemente e l'acqua capace di cristallizzare è bloccata come acqua amorfa nella matrice vetrosa (Pisano, 2019).

1.6.4 Fase di essiccamento primario

Durante la fase di essiccamento primario viene separato il solvente, in forma di cristalli di ghiaccio, dal soluto tramite sublimazione ed il vapore è allontanato grazie al condensatore e alla pompa da vuoto. La fase di essiccamento primario è la più critica e lunga del processo: la fase di congelamento richiede dalle 4 alle 5 ore, quella di essiccamento primario può durare anche giorni.

Bisogna evitare di superare la temperatura critica dettata dal prodotto stesso, che dipende anche dal tipo di eccipiente aggiunto; il corretto monitoraggio della temperatura risulta essere l'aspetto più critico. La scelta della temperatura del ripiano e della pressione in camera deve essere fatta in modo tale che il prodotto rimanga sotto questa temperatura "critica". (Pisano, 2021)

Il punto di fine dell'essiccamento primario è un parametro fondamentale da controllare e corrisponde all'istante di tempo in cui tutto il solvente libero in forma di ghiaccio è stato allontanato per sublimazione. Esistono tecniche dirette e indirette per misurare questo parametro, una delle più efficaci è quella del *comparative pressure measurement* che consiste nel monitorare il rapporto tra il valore di pressione misurato da un sensore termoconduttivo e il valore misurato da un sensore capacitivo.

Si è visto, dal punto di vista sperimentale, che il rapporto di pressione tra i sensori Pirani (a termoconducibilità) e Baraton (capacitivo) rimane circa costante ad un valore superiore ad uno fino a che un numero significativo di flaconi non ha terminato il processo di sublimazione. Questo è legato al fatto che anche solo pochi flaconi generano un flusso di sublimazione sufficiente per mantenere la composizione in camera 100% acqua. Il rapporto di pressione rimane maggiore di uno durante la fase di essiccamento primario, in quanto la conducibilità del vapore d'acqua è maggiore e poi scende

ad uno nel momento in cui tutta l'acqua è evaporata e ci si trova in condizioni di atmosfera 100% azoto. (Pisano, 2021)

Un altro metodo in grado di indicare la fine dell'essiccamento primario consiste nell'analizzare l'andamento della temperatura del prodotto. Molto spesso per monitorare la temperatura del prodotto, all'interno di alcuni flaconi vengono inserite termocoppie in prossimità del fondo del campione. Quel che accade è che, fintanto che l'elemento sensibile è a contatto con il ghiaccio, la sua temperatura rimane costante. All'inizio della fase di essiccamento, la temperatura del prodotto sale fino a raggiungere un valore circa costante che manterrà fino alla fine dell'essiccamento primario. Nel momento in cui la zona di prodotto che avvolge il sensore di temperatura diventa essiccata, la temperatura sale fino ad approssimare quella del ripiano. (Pisano, 2021)

1.6.5 Fase di essiccamento secondario

La fase di essiccamento secondario si occupa della separazione del solvente legato che non è congelato durante la fase di congelamento e che quindi è intimamente legato alle molecole di soluto o adsorbito sulle pareti del solido poroso. La rimozione del solvente avviene con un meccanismo di desorbimento e per permetterlo è necessario scaldare il prodotto a temperature molto maggiori di quelle usate durante la fase di essiccamento primario: si passa da temperature come -20, -30 °C a temperature prossime a quelle ambiente. (Pisano, 2021)

1.6.6 Liofilizzazione di liposomi

Come è stato descritto in precedenza, l'eliminazione dell'acqua tramite liofilizzazione può essere una buona strategia per allungare il tempo di conservazione di queste nanoparticelle.

Quando i liposomi vengono liofilizzati, è necessario andare a garantire che la membrana lipidica rimanga integra andando a modulare la velocità e la temperatura di congelamento, in modo tale da evitare che i cristalli di ghiaccio vadano a rompere il doppio strato lipidico. Una buona scelta di lioprotettori/crioprotettori e delle condizioni operative può ovviare a questo problema, come anche proteggere le nanoparticelle dall'aggregazione (Cheng *et al.*, 2010; Bucca, 2019).

Da prove svolte (Bucca, 2019) è stato mostrato che in assenza di un crioprotettore avviene un significativo aumento del diametro medio e una diminuzione dell'omogeneità delle dimensioni delle nanoparticelle. Questo è un chiaro effetto del fenomeno di aggregazione. Una possibile soluzione per diminuire l'eterogeneità è l'*annealing* post congelamento al di sopra della temperatura di transizione vetrosa. Inoltre, in questo modo si aumenta la velocità di essiccamento primario.

1.7 Scopo della Tesi

Lo scopo di questo lavoro di Tesi è lo studio della sintesi di nanoparticelle di chitosano e lipidiche per la veicolazione di RNA. Le attività sperimentali sono state suddivise in cinque fasi principali; inizialmente si è proceduto con la coltura di lieviti *Saccharomyces cerevisiae* così da poter poi effettuare l'estrazione di RNA dalle cellule di quest'ultimi mediante "RiboPure™ – Yeast Kit". Successivamente si è proceduto con la sintesi delle nanoparticelle di chitosano e lipidiche effettuando prima delle prove senza oligonucleotide così da identificare le condizioni ottimali. Alla luce dei risultati preliminari è stata condotta la fase di incapsulamento dell'RNA nelle nanoparticelle e una parte di queste è stata sottoposta a processi di dialisi ed infine liofilizzazione.

La sintesi delle nanoparticelle viene eseguita impiegando il metodo di nanoprecipitazione tramite l'utilizzo di due differenti microreattori: Vortex Mixer e Confined Impinging Jets Mixer (CIJM). Le

prove effettuate mirano ad andare a variare le condizioni operative e i confronti sono stati eseguiti in termini di dimensione media, polidispersità, carica superficiale e efficienza di incapsulamento.

2. Materiali e Metodologie sperimentali

2.1 Coltura di *Saccharomyces cerevisiae*

L'RNA che è stato utilizzato nelle prove di incapsulamento descritte in questo lavoro di Tesi è stato estratto da cellule di *Saccharomyces cerevisiae* (MUCL number: 38902) mantenuto su un terreno *Malt Extract Agar* (MEA: 20% Estratto di malto, 20% Glucosio, 20% Agar 2% Peptone).

Il lievito è stato coltivato su terreno MEA per 20 ore alla temperatura di 37°C ed è stato successivamente inoculato in 25 mL di terreno *Malt Extract Broth* (MEB: 20% Estratto di malto, 20% Glucosio e 2% Peptone), all'interno di una provetta Falcon da 50 mL, per 20 ore alla temperatura di 37°C, in agitazione a 120 rpm.

2.2 Procedura di estrazione di RNA

L'estrazione dell'RNA a partire da cellule di *Saccharomyces cerevisiae* viene effettuata mediante l'utilizzo di un kit commerciale "RiboPure™ – Yeast Kit" (Ambion, Life technologies). Questo permette l'ottenimento dell'RNA totale del lievito tramite tre step principali: rottura delle cellule di lievito mediante sfere di zirconio, estrazione dell'RNA dal prodotto della lisi con una miscela di fenolo, cloroformio ed alcol isoamilico e purificazione con un filtro in fibra di vetro. Per effettuare queste operazioni si utilizzano un agitatore vortex e una centrifuga; inoltre, tutti i reagenti, filtri e contenitori necessari per eseguire l'estrazione vengono forniti nel Kit.

Il Kit utilizzato prevede che il quantitativo massimo di cellule per le quali è possibile effettuare l'estrazione è di 3×10^8 ; per stabilire la quantità unità formante colonia per ogni mL è stata impiegata una retta di taratura trovata in letteratura (Apex Scientific) [3]. Questa permette di relazionare l'OD₆₀₀ misurato allo spettrofotometro con la concentrazione di cellule. L'equazione ricavata dalla retta di taratura è la seguente:

$$OD_{600} = 0.064 \times \text{Cellule} \left[10^6 \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right] + 0.018$$

Una volta svolta la valutazione della concentrazione di cellule e definita la diluizione necessaria per ottenere 3×10^8 CFU/mL, è possibile procedere con l'estrazione. Questa si suddivide in diverse fasi ed in ognuna si esegue una successione di operazioni.

1. Fase 1 : Lisi cellulare

1. Raccogliere tramite centrifugazione (3 minuti – 12000 x g – temperatura costante 20°C) i pellet di cellule di lievito all'interno di Eppendorf da 2 mL.
2. Aggiungere a ciascun pellet che deve essere posto in estrazione la miscela di lisi:
 - a. Lysis Buffer : 480 µL;
 - b. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS): 48 µL;
 - c. Fenolo : cloroformio : alcol isoamilico 480 µL;Miscelare il contenuto delle Eppendorf per 15 secondi mediante agitatore vortex; i reagenti vengano inseriti nell'ordine con cui vengono citati.
3. Trasferire la miscela di lisi preparata all'interno di provette contenenti sfere di zirconio precedentemente inserite; la sospensione è di circa 1060 µL. Le sfere di zirconio vanno inserite all'interno delle Eppendorf con tappo a vite da 1.5 mL fornite insieme al kit;

il volume di sfere deve essere circa 750 μL che può essere ottenuto andando a riempire la provetta fino ad un'altezza di 2.5 cm partendo dal fondo (Figura 15):

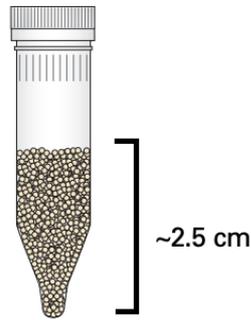


Figura 15: Indicazioni per la quantificazione delle sfere di zirconio – Figura tratta dal Protocollo RiboPure™ – Yeast Kit

4. Miscelazione delle provette mediante agitatore vortex per 16 minuti; queste vengono posizionate con i tappi rivolti verso il centro e bloccate tramite nastro adesivo di carta. Durante questa fase avviene la lisi cellulare.
5. Centrifugazione delle provette a 16100 x g per 15 minuti; al termine dell'operazione si ottengono due fasi separate da un disco bianco.



Figura 16: Separazione tra surnatante con RNA dalle sfere di zirconia come descritto dal punto 5

II. Fase 2: Preparazione alla purificazione su filtro

1. Recupero della fase acquosa superiore contenente RNA (circa 530 μL) e inserimento all'interno di una provetta della capacità di 15 mL.
2. Aggiungere i reagenti per eseguire la purificazione:
 - a. Binding Buffer: 1900 μL
 - b. Etanolo 100%: 1250 μL

Dopo aver aggiunto ogni reagente è necessario miscelare mediante micropipetta (il volume complessivo ottenuto è di circa 3680 μL).

3. Assemblare all'interno di una provetta Eppendorf fornita una cartuccia contenente un filtro a fibre di vetro.
4. Vengono dispensati 700 μL per volta della miscela ottenuta al punto II.2 sulla cartuccia fino ad esaurimento del materiale da trattare. Per ogni caricamento occorre centrifugare a 16000 x g per 1 minuto; al termine di ogni centrifugazione il materiale filtrato deve essere raccolto.

III. Fase 3: Lavaggio del filtro

1. Primo lavaggio del filtro mediante 700 μL di Wash solution 1 che viene dispersa sopra la cartuccia e poi la provetta viene centrifugata a 16000 x g per 1 minuto; al termine viene raccolto il filtrato.

2. Secondo lavaggio del filtro mediante 500 μL di Wash solution 2/3 che viene dispersa sopra la cartuccia e poi la provetta viene centrifugata a 16000 x g per 1 minuto; al termine viene raccolto il filtrato. Questa operazione viene ripetuta due volte, per cui viene utilizzato un totale di 1000 μL della soluzione di lavaggio.
3. Centrifugazione a 16000 x g per 1 minuto del filtro all'interno della provetta Eppendorf in modo da eliminare i residui di lavaggio.

IV. Fase 4: Eluizione degli acidi nucleici

1. Il filtro viene inserito all'interno di una nuova provetta Eppendorf fornita e vengono dispersi 50 μL di Elution solution precedentemente riscaldata a 95°C. La provetta viene centrifugata a 16000 x g per 1 minuto; al termine viene raccolto il filtrato contenente gli acidi nucleici. Questa operazione viene eseguita 2 volte per garantire il distacco dell'estratto dal filtro. In totale si ottengono 100 μL di sospensione di acidi nucleici.

La valutazione della concentrazione di estratto si effettua eseguendo una lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 260 nm e 280 nm; la prima corrisponde alla λ a cui si possono leggere gli acidi nucleici, la seconda corrisponde a quella delle proteine. In funzione dei valori ottenuti viene stimata la concentrazione di acido nucleico e la purezza; le equazioni utilizzate per questa analisi sono descritte nel paragrafo 2.8.

La procedura descritta sopra permette di ottenere una miscela di acidi nucleici; in questo lavoro di Tesi l'obiettivo è quello di utilizzare unicamente RNA, per cui si procede con una seconda purificazione che comporta l'eliminazione di DNA mediante un trattamento con l'enzima DNasi:

1. Aggiungere i reagenti per eseguire la purificazione della sospensione ottenuta (100 μL):
 - a. 10X DNase 1 Buffer: 10 μL (1/10 del volume da trattare)
 - b. DNase I: 4 μL
2. Incubare il campione sottoposto alla digestione del DNA a 37°C per 30 minuti.
3. Risospendere DNase Inactivation Reagent mediante agitazione e, una volta ottenuta una fase omogenea, inserire 11 μL al campione, in modo tale da inibire l'attività dell'enzima DNasi.
4. Miscelare il campione mediante agitatore vortex e poi attendere 5 minuti.
5. Centrifugare a 10000 x g per 2.30 minuti e al termine recuperare il surnatante che contiene l'RNA.

Al termine di queste operazioni viene eseguita l'analisi allo spettrofotometro per valutare nuovamente la concentrazione di RNA e la purezza del campione. Le letture vanno nuovamente eseguite a 260 nm e 280 nm così da valutare la quantità di RNA e di proteine. Una volta effettuate queste valutazioni è possibile riporre l'estratto a -20°C e conservarlo.

Ogni volta che l'RNA deve essere utilizzato, occorre ripetere le misure allo spettrofotometro in modo tale da valutare nuovamente la concentrazione, così da avere un valore di riferimento iniziale per poi stimare l'efficienza di incapsulamento.

2.3 Nanoparticelle di chitosano

2.3.1 Chitosano

Dal punto di vista chimico, il chitosano è un poli- β -(1,4)- 2-amino-2-deossi-D-glucopiranosio, o più semplicemente poli- β -(1,4) glucosamina ($C_6H_{11}O_4N$)_n, con un contenuto variabile di gruppi N-acetile (Figura 17). Strutturalmente, la chitina è un omopolimero non ramificato con una configurazione tridimensionale ad α -elica.

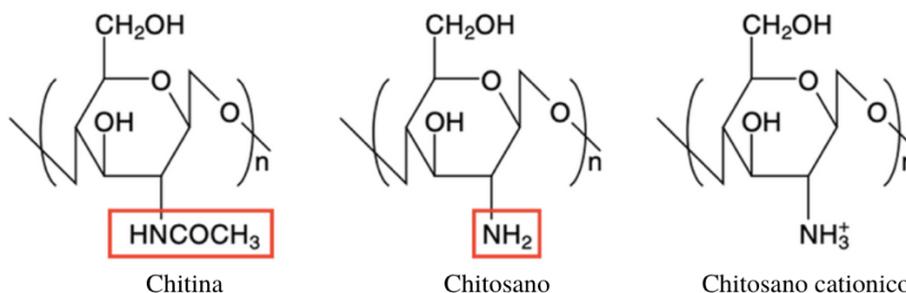


Figura 17: Formula di struttura della chitina, del chitosano e del chitosano cationico. In evidenza il gruppo $NHCOCH_3$ della chitina che, a seguito della deacetilazione, diventa un gruppo NH_2 nel chitosano. (Figura tratta da Hassan e Chang, 2017, con modifiche)

Il chitosano è solubile a pH acido ($pH < 6,5$), ma la solubilità dipende anche dalle seguenti variabili (Caruso, 2019):

- Il grado medio di acetilazione (DA),
- Il peso molecolare,
- La distribuzione dei gruppi acetilici lungo la catena.

2.3.2 Sodium acetate buffer

La soluzione acquosa di acetato di sodio e acido acetico (0.5 M $C_2H_3NaO_2$ – 0.1 M CH_3COOH), pH 4.5) (Figura 18) viene impiegata per sciogliere il chitosano, ovvero come solvente nel processo di sintesi dei *nanocarriers*. Si riporta in (Tabella 3) la composizione. Il pH di questa soluzione deve essere circa 4.5.

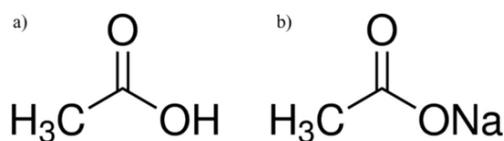


Figura 18: Formule di struttura dell'acido acetico (a) e dell'acetato di sodio (b) – Figura tratta da Caruso, 2019, con modifiche.

Tabella 3: Composizione per ottenere 40 mL della soluzione acida

	ml	M	mol	Quantità prelevate	
Acetato di sodio	25	0.1	0.0025	0.205	g
Acido acetico	15	0.1	0.0015	85.867	μ L

2.3.3 Sodium sulphate buffer

Il solfato di sodio (Figura 19) è stato aggiunto all'acqua usata come antisolvente in modo da ottenere una soluzione 50 mM (Tabella 4) con pH circa 6.5

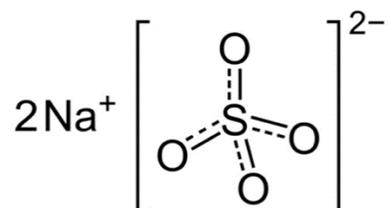


Figura 19: :Formula di struttura del solfato di sodio.

Tabella 4: Composizione per ottenere 40 mL di soluzione di solfato di sodio

	ml	M	moli	Quantità prelevate	
Solfato di sodio	40	0.05	0.002	0.299	g

2.3.4 Acqua Nuclease free

L'acqua nuclease free è impiegata in tutte le sintesi in cui prendono parte gli acidi nucleici. Questa è un'acqua che è stata specificatamente trattata al fine di eliminare e/o inibire gli enzimi che possono andare a degradare l'RNA o il DNA. Perciò è necessario che questa venga utilizzata per la sintesi delle nanoparticelle in modo tale da evitare la degradazione degli acidi nucleici da parte delle nucleasi.

2.3.5 Metodo di sintesi delle nanoparticelle di chitosano

La procedura di sintesi descritta da Sarathi (2008) è stata presa come riferimento per effettuare la sintesi delle nanoparticelle di chitosano. Successivamente sono state introdotte alcune modifiche per ottimizzare la sintesi, come ad esempio una diluizione post miscelazione. Come detto in precedenza per ottenere le NP è necessario portarsi in condizione di veloce dissipazione di energia cinetica turbolenta (Caruso, 2019). Il metodo di sintesi si può riassumere nelle seguenti fasi:

1. Preparazione della soluzione solvente (*sodium acetate buffer*) e antisolvente (*sodium sulphate buffer*). Nel solvente viene disciolto il chitosano a basso peso molecolare con una concentrazione del 0.05% w/v; Nell'antisolvente viene aggiunto l'RNA con concentrazione pari al 0.03%.
2. Pari volumi di entrambe le soluzioni vengono riscaldati all'interno di un bagno termostato a 55°C per 2-3 minuti.
3. Immediatamente dopo il riscaldamento si procede con la miscelazione che può avvenire con due metodi
 - a. Vortex Mixer: 250 mL di ogni soluzione vengono inseriti all'interno di una Eppendorf da 1.5 mL e posti in agitazione per 30 secondi alla massima velocità realizzabile nel sistema.
 - b. Confined Impinging Jets Mixer (CIJM): 250 mL di entrambe le soluzioni vengono alimentati attraverso due siringhe da 10 mL (diametro 15.9 mm) e caricate su una pompa ad infusione (KDS200, KD Scientific, USA). Questa permette immettere nel CIJM i reagenti con portata costante di 36 mL/min. La sospensione ottenuta viene raccolta all'interno di un beker posto al di sotto del *mixer*.

4. A seguito della sintesi si procede alla separazione delle nanoparticelle mediante centrifugazione a 16000 rpm per 15 minuti, alla temperatura costante di 20°C all'interno della centrifuga

Come è descritto negli step sopra, la sintesi può essere effettuata utilizzando due metodi diversi in funzione del miscelatore adoperato. Dalle prove in letteratura la concentrazione di chitosano nel *sodium acetate buffer* è di 0.5 mg/mL, ma le prove sono state condotte anche con altre quantità: 0.02, 0.03, 0.1 mg/mL e diversi rapporti di biopolimero e acido nucleico.

Nella prima fase di questo lavoro di Tesi sono state sintetizzate nanoparticelle prive di RNA, con lo scopo di andare ad individuare le condizioni operative ottimali. L'incapsulamento è stato fatto quando oramai erano state definite le condizioni più interessanti da investigare.

2.3.6 *Quench ratio*

Un altro aspetto della sintesi che è stato indagato è quello legato alla diluizione della sospensione ottenuta, processo comunemente chiamato *quench*. Con il termine *quench ratio* si indica il volume dell'aliquota di acqua che viene aggiunta rispetto al volume della sospensione: i valori utilizzati nelle prove sono 1:1, 2:1, 3:1, 4:1. L'aggiunta di un certo quantitativo di acqua permette di ottenere una sospensione più diluita, per cui viene diminuita la frequenza degli urti, perciò risulta essere sfavorita l'aggregazione tra le nanoparticelle sintetizzate.

2.4 *Sintesi delle nanoparticelle lipidiche*

In questo lavoro di Tesi è stato preso come riferimento il lavoro svolto da Semple (2001) in cui è stato impiegato il 1,2-dioleil-3-dimetilammonio propano (DODAP) come lipide cationico, N-palmitoyl- sfingosina-1- {succinil [metossi (polietilene glicol)2000]} (PEG-Cer₁₆) come PEG – lipide e il disteroilfosfatidilcolina (DSCP) come fosfatidilcolina.

2.4.1 *Lipidi*

- A. *1,2-dioleil-3-dimetilammonio propano (DODAP)*: Il DODAP (Figura 20.a) è un lipide ionizzabile che conferisce carica positiva alla nanoparticella a seguito della sintesi; grazie a questo è possibile l'interazione tra LNP e l'RNA, che porta poi all'incapsulamento.
- B. *N-palmitoyl- sfingosina-1-{succinil[metossi(polietilene glicol)2000]}* (PEG-Cer₁₆): Le nanoparticelle PEGilate (Figura 20.b) presentano una maggiore resistenza nei fluidi fisiologici e questo effetto stabilizzante si presenta anche a valle della sintesi, poiché viene inibita l'aggregazione.
- C. *disteroilfosfatidilcolina (DSCP)*: Il DSCP (Figura 20.c) ricopre un ruolo principalmente strutturale all'interno della nanoparticella, diventa infatti parte integrante del doppio strato lipidico e regola anche il rilascio dell'RNA.
- D. *colesterolo (CHOL)*: Il colesterolo (Figura 20.d) ricopre un ruolo di tipo strutturale, ma anche stabilizzante.

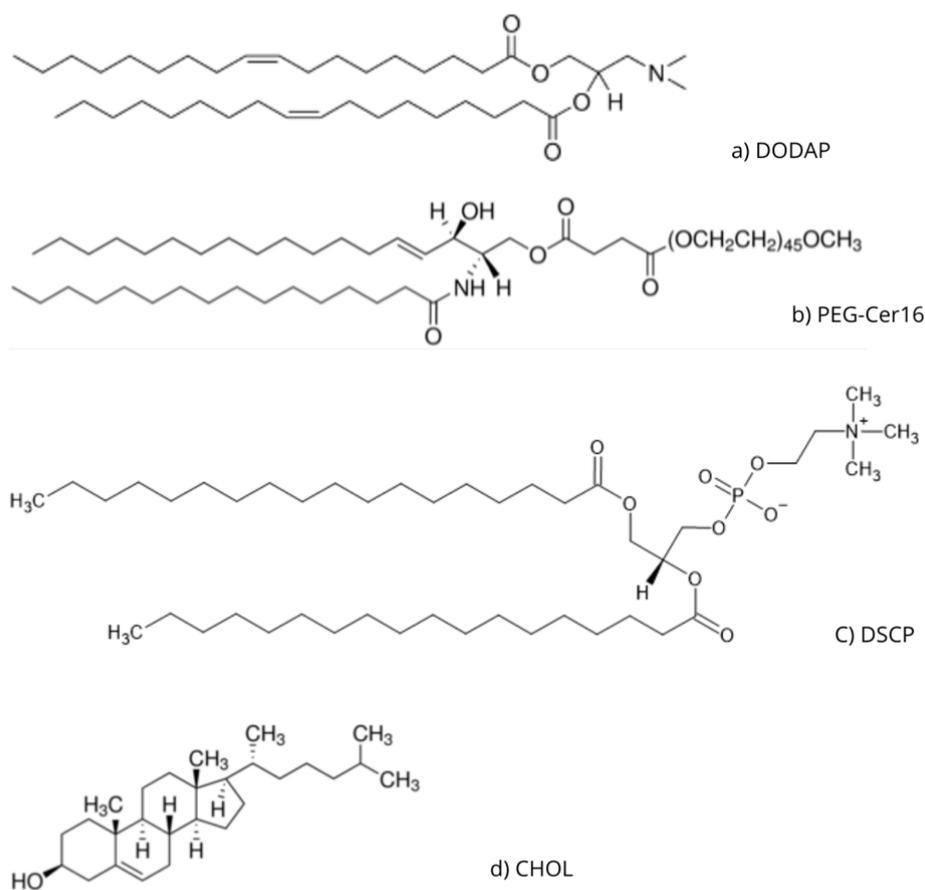


Figura 20: Struttura molecolare dei lipidi impiegati nella sintesi delle nanoparticelle: a) DODAP [1.a] b) PEG-Cer16 [1.b] c) DSCP (Puri et al., 2009) d) CHOL [1.c]

2.4.2 Etanolo e Terbutanolo

Etanolo è l'alcol che viene impiegato maggiormente per la sintesi delle nanoparticelle lipidiche. Questo necessita poi di essere allontanato dalla sospensione tramite dialisi o centrifugazione poiché non deve essere assolutamente presente durante la liofilizzazione. Il Terbutanolo è un solvente alternativo in cui poter sciogliere i lipidi e grazie alle sue proprietà chimico-fisiche è possibile utilizzarlo all'interno del liofilizzatore.

2.4.3 Sodium acetate buffer

All'interno della soluzione acquosa di acetato di sodio e acido acetico (0.5 M $C_2H_3NaO_2$ – 0.1 M CH_3COOH), pH 4.5) viene disciolto l'RNA.

2.4.4 Metodo di sintesi delle nanoparticelle lipidiche

Nella prima fase di questo lavoro di Tesi sono state sintetizzate nanoparticelle prive di RNA; durante queste prove sperimentali sono state indagate condizioni differenti rispetto a quelle descritte negli step precedenti. In particolare, si è provato a variare la concentrazione di lipidi, l'alcol utilizzato per la sintesi e il quench ratio. Inoltre, è stata effettuata anche la sintesi utilizzando il Confined Impinging Jets Mixer (CIJM); in questo caso sono stati prelevati 250 mL di entrambe le soluzioni vengono alimentati attraverso due siringhe da 10 mL (diametro 15.9 mm) e caricate su una pompa ad infusione (KDS200, KD Scientific, USA). Questa ci permette immettere nel CIJM i reagenti con portata

costante di 36 mL/min; la sospensione ottenuta viene raccolta all'interno di un beker posto al di sotto del mixer.

Per la sintesi di nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato si è deciso di utilizzare solo il metodo con il Vortex Mixer dal momento che i volumi in gioco erano minori e la disponibilità di acido nucleico era limitata.

La procedura di sintesi descritta da Semple (2001) è stata presa come riferimento per effettuare la sintesi delle nanoparticelle di lipidiche con RNA incapsulato; anche in questo caso viene impiegata l'*acqua nuclease free* descritta al paragrafo 2.1.4. Il metodo di sintesi si può riassumere nelle seguenti fasi:

1. Preparazione della soluzione solvente (Etanolo con lipidi) e antisolvente (*sodium acetate buffer*). In etanolo viene sciolta una quantità di 1 mg/mL di lipidi DSPC/CHOL/DODAP/PEG-Cer16 (25/45/20/10, mol/mol/mol/mol); l'RNA si trova in concentrazione pari a 0.03% nel *sodium acetate buffer*.
2. Pari volumi di entrambe le soluzioni vengono riscaldati all'interno di un bagno termostato a 65°C per 1 minuto.
3. Immediatamente dopo il riscaldamento si procede con la sintesi tramite l'utilizzo del reattore Vortex: 250 mL di ogni soluzione vengono inseriti all'interno di una Eppendorf da 1.5 mL e posti in agitazione per 30 secondi alla massima velocità ottenibile nel sistema.
4. A seguito della sintesi, si eseguono processi di separazione delle nanoparticelle dal solvente (etanolo e acido acetico). I metodi utilizzati sono:
 - a. Centrifugazione a 16000 rpm per 15 minuti, alla temperatura costante di 20°C all'interno della centrifuga;
 - b. Dialisi, utilizzando le membrane Float-A-Lyzer G2 composta da una membrana di estere di cellulosa caratterizzata da un cut off point: 3.5 - 5 kDa

2.5 Apparato sperimentale e metodologia di sintesi delle nanoparticelle

Nel capitolo precedente (1.4) è stata descritta la tecnica di nanoprecipitazione che permette l'ottenimento di nanoparticelle sia lipidiche che di chitosano. In questo lavoro di Tesi, sono stati impiegati il Vortex Mixer e il Confined Impinging Jets Mixer (CIJM); la procedura di sintesi non risente di particolari differenze a seconda che venga impiegato un metodo o l'altro.

Come già anticipato, nella prima fase sono state prodotte nanoparticelle prive di RNA in modo tale da definire le condizioni operative ottimali per sintetizzare i *nanocarriers*. Solo dopo aver confrontato i risultati ottenuti si è proceduto all'incapsulamento dell'RNA all'interno dei vettori lipidici e di chitosano. In questo caso tutte le sintesi vengono eseguite con RNA totale estratto da *S. cerevisiae* e con *acqua nuclease free* in modo tale da evitare qualsiasi tipo di contaminazione da parte di enzimi RNAsi.

2.5.1 Agitatore Vortex

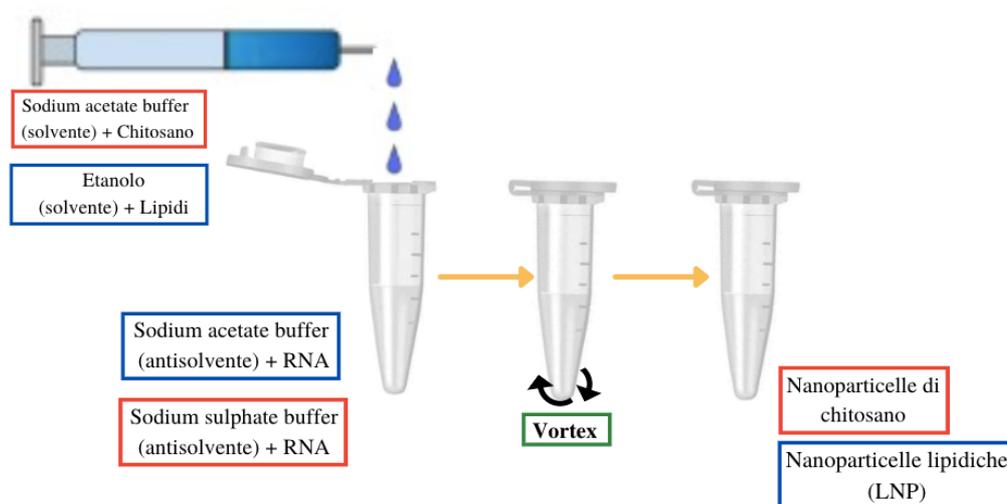


Figura 21: Schematizzazione del processo di sintesi con vortex per la produzione di nanoparticelle di chitosano e lipidiche veicolanti RNA.

Per eseguire la sintesi tramite miscelatore vortex è necessario che il solvente venga aggiunto lentamente all'interno dell'antisolvente già presente all'interno della provetta *Eppendorf* (1.5 mL). Come detto in precedenza, il vantaggio di effettuare la sintesi direttamente nelle provette è legato al fatto che questa può essere direttamente inserita all'interno della centrifuga evitando così trasferimenti che potrebbero comportare perdita di materiale.

2.5.2 Confined Impinging Jets Mixer (CIJM)

La sintesi per nanoprecipitazione si può effettuare anche tramite il microreattore CIJM alimentato con pari volumi di solvente antisolvente tramite la pompa ad infusione KDS200, KD Scientific, USA che permette di regolare la portata e mantenerla costante. Le due soluzioni vengono caricate all'interno di siringhe da 10 mL e collegate al microreattore tramite tubi di plastica di lunghezza tale da minimizzare il tragitto e ottimizzare la sintesi.

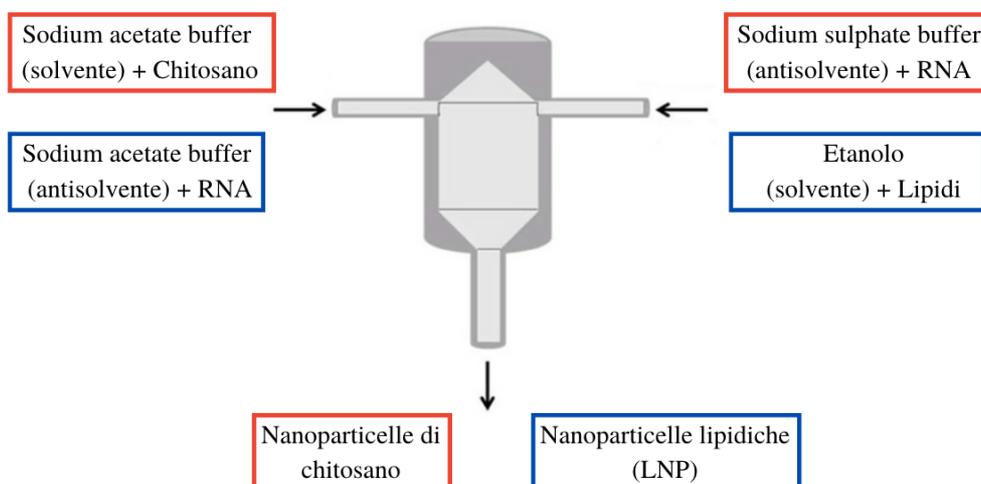


Figura 22: Schematizzazione di un CIJM impiegato per la produzione di nanoparticelle di chitosano e lipidiche veicolanti RNA.

La sospensione ottenuta viene raccolta all'interno di un beker sottostante il microreattore all'interno del quale può essere presente un'aliquota d'acqua necessaria ad effettuare il *quench* (2.1.6).

2.6 Metodi di separazione delle nanoparticelle dal solvente

I metodi utilizzati per eseguire la separazione tra le nanoparticelle e il solvente sono due: la centrifugazione e la dialisi.

2.6.1 La dialisi

La dialisi viene realizzata utilizzando delle membrane di estere di cellulosa Float – A – Lyzer G2 che vengono riempite con 1 mL di liquido e presentano un cut off point tra 3.5 e 5 kD. La procedura utilizzata è la seguente:

1. È necessario rimuovere il dispositivo dalla scatola con cautela, prestando soprattutto attenzione al tubo: infatti bisogna evitare di piegare la membrana ed è per questo che è necessario maneggiarlo solo dalla parte superiore.
2. Per attivare la membrana bisogna procedere con l'operazione di pre-bagnatura, per cui si rimuove la glicerina e la membrana viene immersa prima in alcol al 10%, poi risciacquato accuratamente e immerso in acqua deionizzata prima della dialisi:
 - a. Riempire la membrana con etanolo al 10% e re-immersione nella stessa soluzione alcolica per 10 minuti;
 - b. Rimuovere la membrana dalla soluzione, svitare il tappo ed aspirare l'alcol all'interno del dispositivo; è necessario anche capovolgere e scuotere delicatamente per eliminare le gocce rimanenti;
 - c. Sciacquare accuratamente la membrana con acqua deionizzata, riempirla con acqua deionizzata, sostituire il tappo e quindi immergere il dispositivo in acqua deionizzata per 15-20 minuti.
 - d. Rimuovere l'acqua di risciacquo e scuotere le gocce; una volta bagnata, non lasciare che la membrana si asciughi.
3. Utilizzando una pipetta è possibile caricare il campione all'interno della membrana poi avvitare il tappo di chiusura in modo da creare una chiusura a tenuta.
4. Infilare il corpo del Float-A-Lyzer G2 nell'anello di galleggiamento e tirare l'anello sotto il collare della parte superiore. Far galleggiare verticalmente il Float-A-Lyzer nel beker di dialisi contenente viene posto in agitazione mediante una ancoretta magnetica così da creare una leggera corrente rotante. Bisogna fare attenzione a non creare un forte vortice che può tirare il dispositivo verso il basso e interferire con l'ancoretta.
5. Solitamente i campioni vengono dializzati a temperatura ambiente durante la notte (12-20 ore) e con 3-4 cambi tampone completi (dopo 2-4, 6-8 e 10-14 ore); durante i lavaggi è possibile fare delle prove allo spettrofotometro e al DLS in modo da monitorare tramite il primo la concentrazione di etanolo e con il secondo la presenza di nanoparticelle.
6. Terminato il tempo di dialisi, si apre il tappo e si recupera il volume totale aspirando lentamente inserendo la pipetta sul fondo della membrana.

Al fine di monitorare la concentrazione di etanolo che viene allontanata durante la dialisi, è stata ricavata una correlazione tra la concentrazione di etanolo in una soluzione acquosa e il grado Brix misurato con un rifrattometro (Figura 23): è stato misurato il grado Brix di soluzioni a concentrazioni note di etanolo e acqua, dal quale è stato poi associato un valore di indice di rifrazione misurato con tabelle di letteratura.

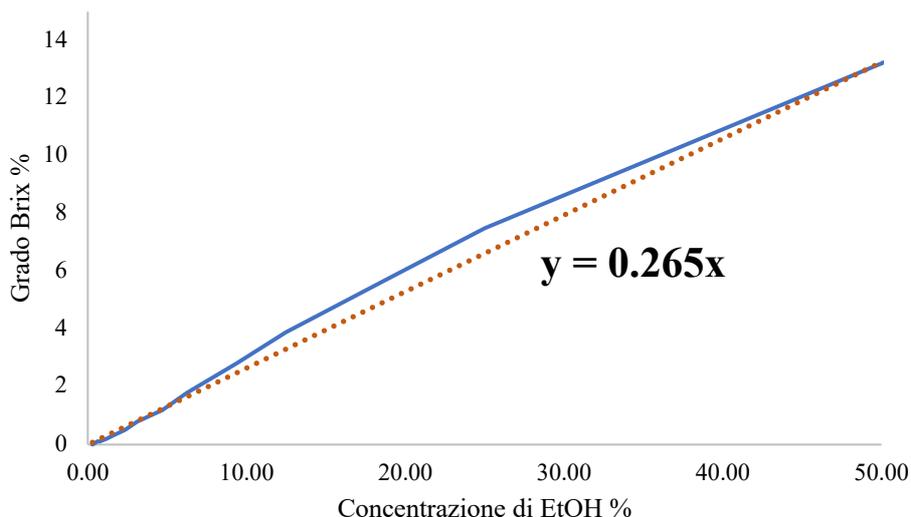


Figura 23: Retta di taratura per convertire il valore di grado Brix letto dal rifrattometro, in una concentrazione

2.6.2 La centrifugazione

Il processo di centrifugazione può essere eseguito per due motivi: il primo è che permette l'allontanamento del solvente nel quale sono immerse le nanoparticelle, poiché quelle lipidiche non possono essere conservate in una miscela di etanolo e soluzione acida per lunghi tempi senza subire modifiche; analogamente anche quelle di chitosano necessitano di essere separate dal solvente acido di sintesi. In secondo luogo, l'analisi del surnatante estratto dopo la precipitazione permette di valutare la quantità di RNA che è stato effettivamente incapsulato.

Come è stato detto sopra, questa operazione viene svolta ad una velocità pari a 16000 rpm per 15 minuti. Per evitare un effetto termico legato allo sviluppo di calore, si è deciso di eseguire la centrifugazione con una temperatura pari a 20°C. Al termine dei 15 minuti, le nanoparticelle sono depositate sul fondo della Eppendorf sovrastate dal surnatante che deve essere prelevato e analizzato. Invece le LNP vengono risospese in acqua o con una soluzione zuccherina e conservate, per essere poi destinate alla liofilizzazione.

2.6.3 Confronto tra dialisi e centrifugazione

La principale differenza tra i due metodi di separazione risiede nel fatto che durante la dialisi le nanoparticelle risultano essere sottoposte a minori stress fisici rispetto alla centrifugazione e questo può comportare dei vantaggi dal punto di vista dell'incapsulamento e delle dimensioni delle nanoparticelle. Tuttavia, i tempi per eseguire la dialisi sono molto più lunghi.

2.7 Tecniche di caratterizzazione

Al fine di caratterizzare le nanoparticelle ottenute, si vanno ad indagare principalmente tre aspetti: la dimensione media, la polidispersità e la carica superficiale, anche definita come potenziale ζ . In funzione di questi parametri sono stati studiati i cambiamenti delle NP nel tempo così da studiarne la stabilità, gli effetti della centrifugazione e di tutte le diverse condizioni operative che sono state variate. Inoltre, un altro aspetto molto importante da misurare è l'efficienza di incapsulamento di acido nucleico all'interno delle nanoparticelle.

2.7.1 La tecnica del Dynamic Light Scattering (DLS)

Questo strumento risulta essere molto versatile dal momento che può essere utilizzato per effettuare la misura di tutti i parametri citati sopra.

Dimensione delle nanoparticelle

La dimensione media delle nanoparticelle viene misurata in termini di diametro medio utilizzando il metodo del DLS mediante lo strumento Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA) che è dotato di laser a diodi da 4,5 mW come sorgente di luce a 670 nm. La temperatura impostata per le prove è di 25°C e tutti i parametri inseriti, viscosità, indice di rifrazione e conducibilità, fanno riferimento a questa condizione.

Per seguire l'analisi il campione viene inserito all'interno di una cuvette di polistirene e la misura viene fatta grazie al rilevamento da parte dello strumento dei fotoni dispersi dalle nanoparticelle. Il laser che viene inviato descrive un angolo di 173° rispetto alla cuvette e illumina le nanoparticelle; dalla misura della frequenza delle fluttuazioni dell'intensità della luce diffusa è possibile correlare la dimensione delle NP utilizzando l'equazione di Stokes-Einstein (Bucca, 2019).

$$d_H = \frac{k T}{3 \pi \eta D}$$

In questa equazione il diametro idrodinamico di una sfera viene valutato andando a correlarlo con il coefficiente traslazionale D ; nella formula sono anche presenti: k è la costante di Boltzmann, T la temperatura assoluta, η la viscosità.

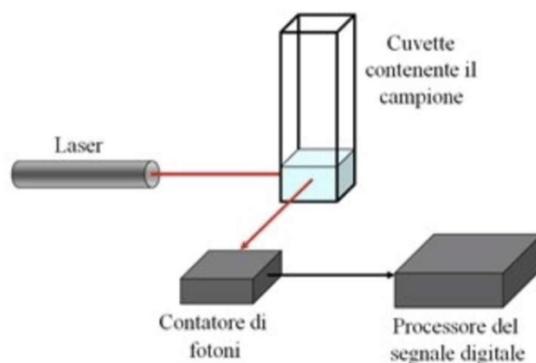


Figura 24: Tecnica del Dynamic Light Scattering (DLS) – Figura tratta da Caruso, 2019, con modifiche

Misura del Potenziale Zeta

Il potenziale ζ viene sempre misurato tramite l'utilizzo della tecnica del DLS con lo strumento Nano Zetasizer, in questo caso però viene impiegato un differente tipo di cuvette, le DTS1070 (Malvern). Infatti, queste sono dotate di elettrodi che inducono la generazione di un campo elettrico in grado di attraversare il campione. Anche in questo caso si considera come temperatura di riferimento 25°C.

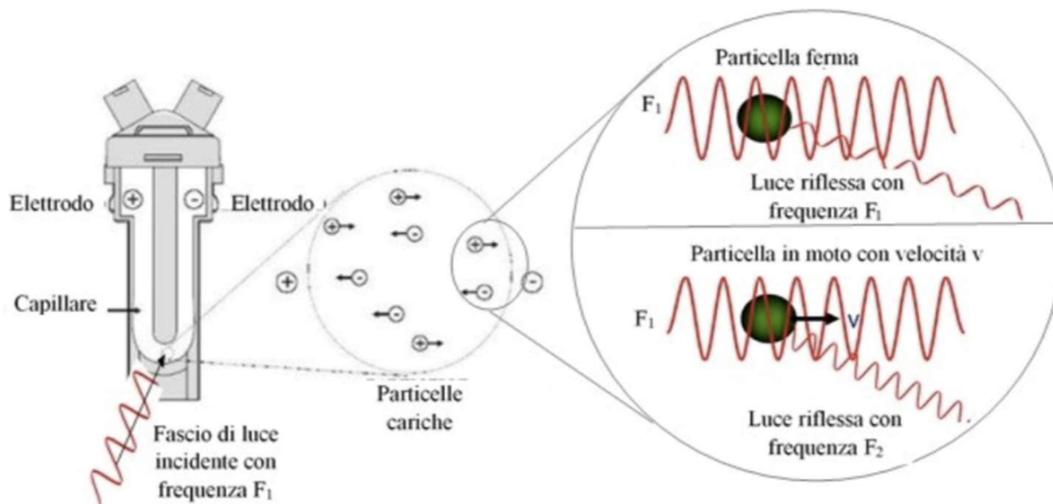


Figura 25: Rappresentazione schematica dell'effetto Doppler e del suo impiego nella tecnica del Laser Doppler Micro-electrophoresis. – Figura tratta da Caruso, 2019, con modifiche

La misura della carica superficiale la si ottiene andando a valutare la mobilità elettroforetica, che si ottiene impiegando la tecnica del Laser Doppler Micro-electrophoresis. Le nanoparticelle presentano una carica netta superficiale che promuove la concentrazione di ioni nell'area tra l'interfaccia soluzione – NP e questo provoca una differente distribuzione di cariche rispetto al *bulk* del solvente. Se si analizza la zona vicino all'interfaccia è possibile notare che si genera un doppio strato elettrico all'interno del quale è possibile definire una regione in cui gli ioni e la nanoparticella risultano essere stabili e questa può essere chiamata taglio idrodinamico. Il potenziale che si valuta in questo punto è quello che viene preso come riferimento, ovvero definito come potenziale ζ .

Questo parametro può essere correlato con il concetto di stabilità delle nanoparticelle, per cui è possibile delineare degli intervalli di valori in cui queste tenderanno maggiormente ad aggregare. Inoltre, la carica superficiale ha un effetto anche sull'efficienza di incapsulamento; infatti, questo avviene a seguito dell'attrazione tra la carica positiva della nanoparticella e quella negativa dell'RNA, perciò è necessario che il potenziale ζ rimanga all'interno di un certo range (solitamente tra 5 e 12 mV) (Chibowski *et al.*, 2016; Bucca, 2019).

Il pH della soluzione in cui sono immerse le nanoparticelle risulta avere un effetto rilevante in termini carica superficiale; da prove effettuate da Prasanthan (2019) è emerso che più si porta il solvente in condizioni acide, più aumenta la carica delle nanoparticelle.

Come accennato prima per eseguire la misura è necessaria la generazione di un campo elettrico e questo provoca dei fenomeni elettrocinetici; infatti, le nanoparticelle cariche sospese si muovono in direzione dell'elettrodo di carica opposta. Una volta superato il transitorio e raggiunto lo stato stazionario, si misura il potenziale tra i due elettrodi e la velocità di movimento in termini di intensità di campo tramite un Laser Doppler Velocimetry (Chibowski *et al.*, 2016).

2.8 Spettrofotometria

La spettrofotometria ad assorbimento studia l'interazione tra la luce e la materia, in termini di riflessione o trasmissione in funzione della lunghezza d'onda. Grazie all'analisi di questi parametri è possibile quantificare la concentrazione di una sostanza "colorata" immersa in un solvente "trasparente" (Morris, 2015). Per effettuare la misurazione è necessario per prima cosa andare a definire quale lunghezza d'onda viene assorbita dalla sostanza che viene ricercata: in questo lavoro

di Tesi si tratta di RNA per cui $\lambda = 260 \text{ nm}$. In secondo luogo, prima di analizzare il campione è fondamentale effettuare il bianco, ovvero misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di interesse del solvente senza altri componenti. Il valore ottenuto verrà sottratto a quello misurato nelle prove in cui vi è la sospensione; in questo modo il solvente risulta essere effettivamente trasparente.

L'assorbanza viene misurata facendo attraversare la cuvette contenente il campione da un fascio di luce con una certa lunghezza d'onda λ . Per ottenere la scomposizione della luce bianca emessa da una lampada, al fine di ottenere la λ desiderata, è necessario che questa passi attraverso dei filtri fino ad arrivare ad un monocromatore che permette il passaggio del raggio avente la lunghezza d'onda inserita (Caruso, 2019). La valutazione viene effettuata andando a misurare la differenza di intensità della luce prima e dopo l'attraversamento del campione; a seguito del passaggio questa sarà minore dal momento che parte dell'energia luminosa viene assorbita dalle molecole del campione.

Dalla valutazione dell'intensità luminosa è possibile ricondursi ad un valore di assorbanza mediante la legge di Lambert – Beer. Questa afferma che “l'assorbanza ottica di un cromoforo in un solvente trasparente varia linearmente con la lunghezza del percorso della cella del campione e la concentrazione del cromoforo”. Questo vale quando le soluzioni analizzate risultano essere infinitamente diluite (Morris, 2015).

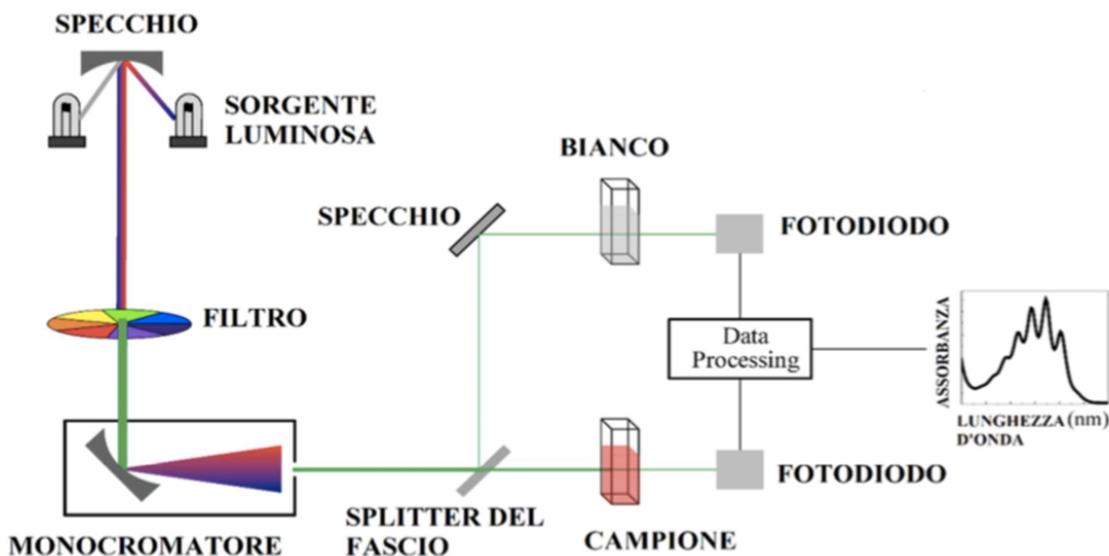


Figura 26: Rappresentazione del funzionamento dello spettrofotometro - Figura tratta da Caruso, 2019, con modifiche

2.8.1 Quantificazione spettrofotometrica di RNA

Per valutare la quantità di RNA estratto e, quindi, l'efficienza di incapsulamento, si effettua un'analisi allo spettrofotometro in cui si va a determinare la misura di assorbanza del campione a 260 nm. Per garantire una certa accuratezza della misura e quindi rimanere nel campo della linearità per Lambert – Beer, può risultare necessario diluire il campione e per valutare la concentrazione di RNA è fondamentale tenere in considerazione il fattore di diluizione (Qiagen, 2019)

Per ottenere un valore di concentrazione viene impiegata questa espressione:

$$C_{\text{RNA}} = A_{260} \times \text{fattore di diluizione} \times 40 \mu\text{g/mL}$$

L'ultimo termine dell'equazione indica che l'assorbanza di una unità a 260 nm, corrisponde a 40 µg di RNA per ml ($A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$) solo nel caso in cui l'acido nucleico è presente in acqua. Grazie a questa correlazione è possibile ricondursi alla concentrazione di RNA. (Qiagen. 2019).

2.8.2 Quantificazione della purezza del RNA

Una stima della purezza di RNA si ottiene andando ad effettuare delle letture allo spettrofotometro a 260 e a 280 nm del campione estratto e poi facendone il rapporto:

$$\text{Purezza} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Questo valore risulta essere notevolmente influenzato dal pH, per cui è fondamentale che l'analisi venga effettuata in condizioni controllate. Infatti, in condizioni acide il rapporto risulta essere basso e il campione può essere soggetto ad una maggiore contaminazione proteica (Qiagen. 2019). Infatti, la purezza del campione contenente acidi nucleici può essere stimata in funzione dell'assenza di contaminanti come le proteine assorbono la luce a 280 nm.

Per effettuare le analisi dei campioni di RNA che si ottengono dall'estrazione, si utilizzano delle cuvette che permettono di analizzare un volume minimo di campione. In Figura 27 è riportata la cuvette impiegata; il minimo volume che può essere analizzato è 650 µL.



Figura 27: Micro-Cuvette per spettrofotometro

2.9 Apparato sperimentale e metodologia per la liofilizzazione delle nanoparticelle

Lo strumento utilizzato per effettuare le prove di liofilizzazione per questo lavoro di Tesi è il MicroFD brevettato dalla Millrock Technology. L'innovazione di questo strumento rispetto ai precedenti è la presenza di un anello termo-controllato, chiamato LyoSim che circonda la camera in modo da limitare gli effetti di bordo così da ottenere una velocità di sublimazione uguale per ogni flacone. La temperatura dell'anello viene modulata in funzione di quella che viene misurata dalle termocoppie presenti all'interno dei flaconi e quella del piano su cui essi sono appoggiati. Questa tecnologia si basa sul fatto che viene misurato costantemente il coefficiente di scambio termico tra i flaconi e il ripiano e in questo modo viene ottimizzato il processo. Il MicroFD confrontato con i liofilizzatori industriali, presenta dimensioni molto più contenute e questo permette di occupare molto meno spazio, oltre che di processare un minor quantitativo di prodotto.



Figura 28: MicroFD®. Dimensioni 30" x 20" x 67". Peso di circa 136 kg.

In ogni flacone vengono inseriti 3 mL di sospensioni delle nanoparticelle e soluzione acqua e saccarosio a 10%.

In questo lavoro di Tesi sono state seguite quattro differenti procedure di congelamento, in primo luogo eseguite unicamente su acqua e saccarosio, senza nanoparticelle. Successivamente in funzione dei risultati ottenuti si è proceduto anche con le NP. Lo scopo di quale operazione era quello di verificare l'effetto sul processo (durata e temperatura del prodotto). Le modalità sono le seguenti:

1. *Non controllata*: durante questa prova viene effettuato il congelamento in un unico step andando a portare la temperatura dei campioni da 20°C a - 50°C, variando con un grado al minuto la temperatura del fluido refrigerante;
2. *Omogenea*: viene effettuato un primo raffreddamento a - 3°C in modo tale da uniformare i diversi flaconi e permettere che abbassate le temperature, la nucleazione avvenga in modo più controllato. Questa temperatura viene mantenuta per 90 minuti e successivamente si procede con il congelamento portando la camera a - 50°C.
3. *Annealing*: I campioni nei flaconi vengono uniformati mantenendoli a - 3° per 90 minuti, successivamente vengono portati a - 50°C; una volta raggiunta questa temperatura la camera si riscalda a - 20°C e viene mantenuta questa temperatura per 60 minuti. Trascorso questo tempo si effettua nuovamente il raffreddamento a - 50°C. Il riscaldamento a - 20°C dovrebbe permettere di ottenere una dimensione di cristalli più uniforme: infatti vengono sciolti i cristalli più piccoli e rimangono quelli con le dimensioni maggiori.
4. *Ice fog*: questo metodo permette di effettuare la nucleazione controllata; per prima cosa si portano i flaconi in condizioni di uniformità mantenendoli a - 5° per 60 minuti, trascorso questo tempo viene fatto partire il processo di nucleazione mandando cristalli di ghiaccio con aria compressa. Terminato questo processo, automaticamente il sistema si porta a - 50°C per far avvenire il congelamento.

Durante il processo di nucleazione spontanea i cristalli di ghiaccio si generano nella parte bassa del flacone e si propagano verso l'alto e questo causa un rallentamento della velocità di formazione del ghiaccio. Invece, la tecnica di *ice fog* induce la nucleazione a partire dalla superficie superiore del flacone e procede verso il basso; in questo modo si evita la formazione di cristalli piccoli in alto e grandi al fondo come avviene per la non controllata (Dragà, 2019).

3. Sintesi di nanoparticelle di chitosano

3.1 Studio della sintesi delle nanoparticelle di chitosano

Nella prima fase di questo lavoro di Tesi sono state svolte prove allo scopo di delineare una metodologia di sintesi delle nanoparticelle di chitosano di dimensioni tra i 250 e i 600 nm e carica superficiale positiva.

La distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle a seguito del processo di sintesi con Vortex descritto nel paragrafo 2.1.4 è riportata in Figura 29:

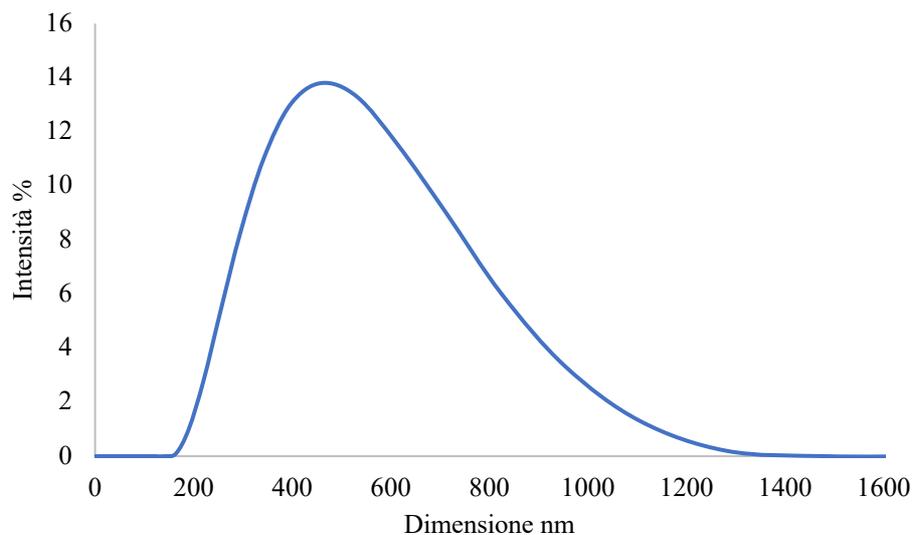


Figura 29: Distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle di chitosano con concentrazione 0.05% w/v ottenuta tramite agitatore vortex (30 secondi) e senza effettuare il quench

La dimensione media delle nanoparticelle di chitosano è di 458 nm e il potenziale ζ è 8.01 mV.

Dopo aver replicato la procedura sperimentale descritta da Zhang (2010) sono state variate singole variabili operative per identificare quali avessero maggior influenza nella fase di sintesi delle nanoparticelle. Per cui sono state svolte delle prove variando:

- La diluizione (*quench*) a valle della sintesi
- La concentrazione del chitosano

Inoltre, si è seguito un secondo metodo di sintesi utilizzando il microreattore Confined Impinging Jets Mixer con il quale sono stati indagati gli effetti di:

- La diluizione (*quench*) a valle della sintesi
- La concentrazione del chitosano
- La velocità di miscelazione

3.1.1 Studio dell'effetto della concentrazione di chitosano sulla sintesi delle nanoparticelle di chitosano

In letteratura, la concentrazione di chitosano presa come riferimento è pari a 0.05% w/v. Dal momento che la quantità di chitosano in soluzione ha un effetto sull'efficienza di incapsulamento di RNA, si è

deciso di andare ad indagare che effetto avesse la variazione di concentrazione in termini di dimensioni delle nanoparticelle in assenza dell'oligonucleotide.

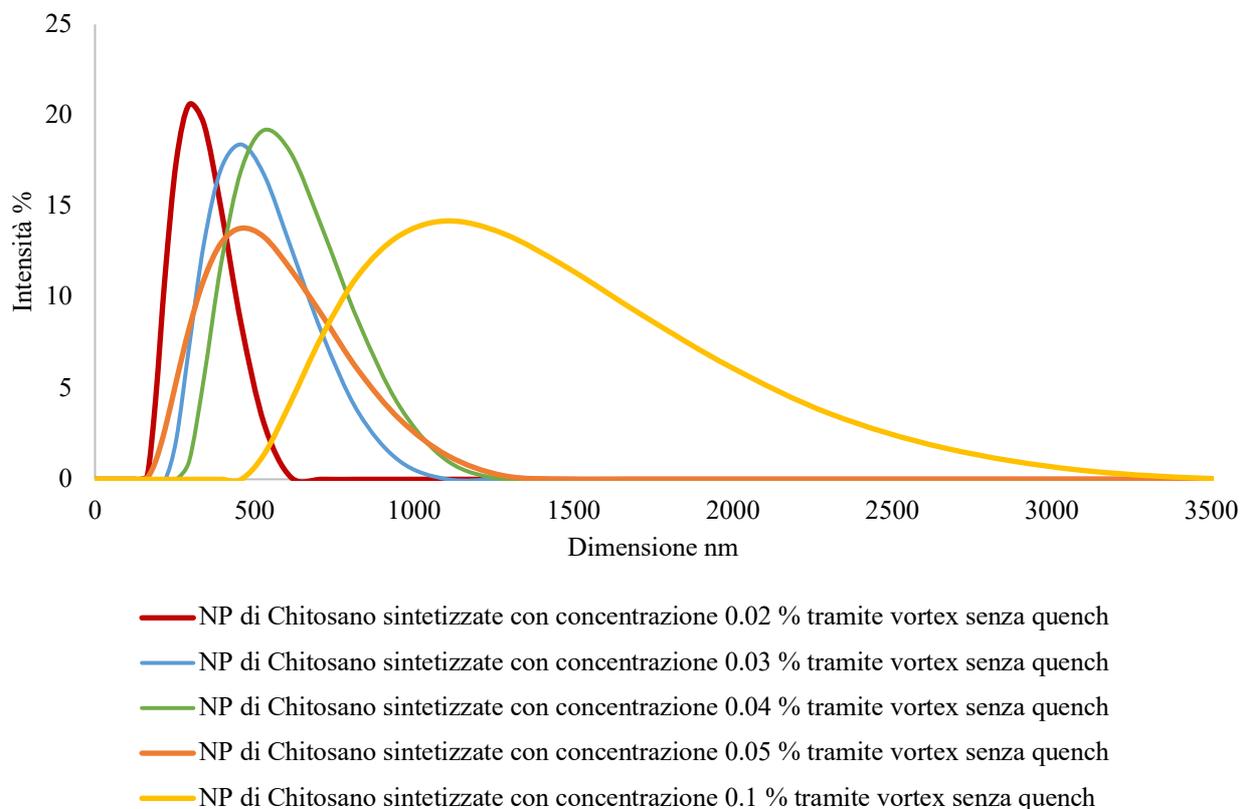


Figura 30: Confronto delle PSD delle NP di chitosano sintetizzate con concentrazioni differenti di CS tramite vortex (30 secondi) e senza quench

Da Figura 30 è possibile notare che aumentando la concentrazione di chitosano le nanoparticelle tendono ad aumentare le loro dimensioni. I risultati maggiormente significativi sono quelli con concentrazione pari a 0.02%, 0.05% e 0.1%; infatti, è possibile individuare un trend di dimensioni crescenti: 321, 458 e 1372 nm.

Gli altri due casi, 0.03% e 0.04% sono stati trascurati per le prove di stabilità e centrifugazione poiché hanno mostrato un andamento confrontabile a quello ottenuto con concentrazione pari a 0.05 %.

3.1.2 Studio dell'effetto del quench sulla sintesi delle nanoparticelle di chitosano

Come descritto in precedenza, il *quench* risulta essere una diluizione della sospensione di nanoparticelle a seguito della sintesi. L'aggiunta di una aliquota d'acqua permette di diminuire la frequenza degli urti, per cui risulta essere sfavorita l'aggregazione tra le NP. Ciò che si ottiene è un effetto stabilizzante che permette di avere nanoparticelle di dimensioni medie più piccole. Inoltre, il chitosano è solubile in ambiente acido che corrisponde a quello in cui si trova dopo la sintesi, per questo motivo possono avvenire dei fenomeni che alterano la stabilità della sospensione. Andando ad aggiungere un'aliquota di acqua, il pH del solvente aumenta diminuendo di fatto la solubilità del polisaccaride.

In Figura 31, sono riportate le distribuzioni delle dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate seguendo la procedura descritta in precedenza, ma utilizzando rapporti di diluizioni differenti.

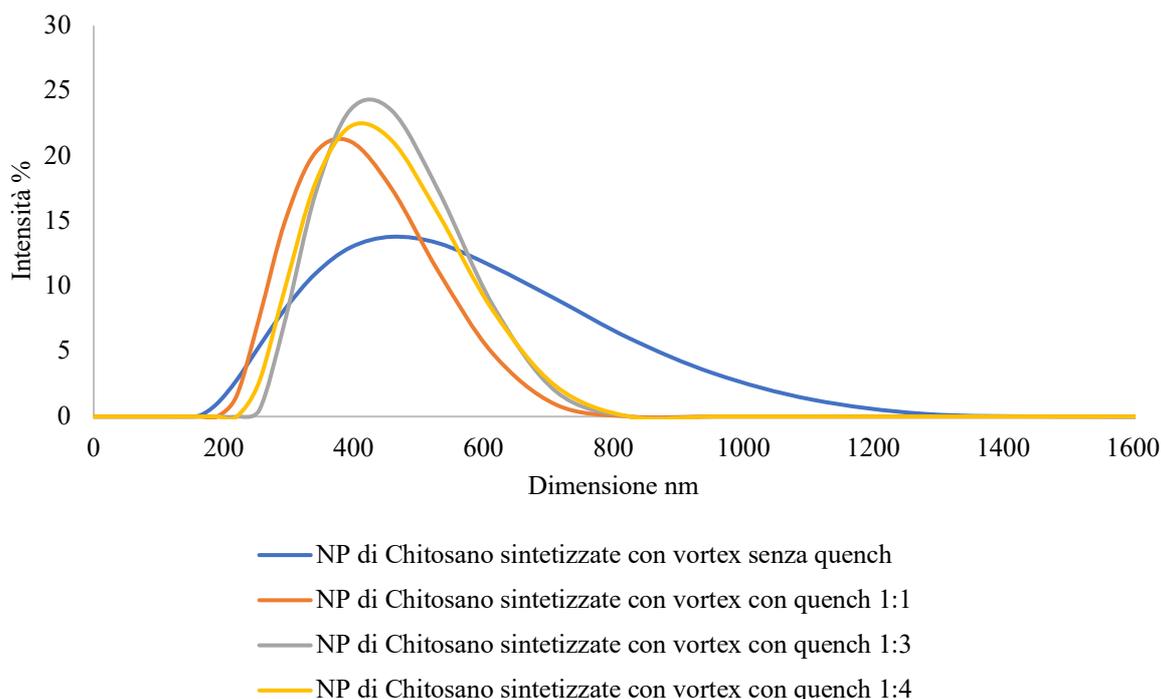


Figura 31: Confronto delle PSD delle NP di chitosano (0.05% w/v) ottenute tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Dal grafico in Figura 31, è possibile notare che l'aggiunta di un'aliquota di acqua permette di ottenere una distribuzione delle dimensioni all'interno di un intervallo più piccolo, da 184 a 800 nm. Infatti, nel caso senza *quench* la curva risulta essere più spostata verso destra e inoltre la base della curva risulta essere più grande, da 156 a 1350 nm. Per quanto riguarda un confronto tra i risultati ottenuti in presenza di diversi rapporti, si può notare che non vi sono particolari differenze per cui si è preso come riferimento il *quench ratio* pari a 1:1.

3.1.3 Studio dell'effetto del microreattore CIJM sulla sintesi delle nanoparticelle di chitosano

Come descritto nel capitolo precedente, utilizzando il Confined Impinging Jets Mixer vengono miscelati pari volumi del solvente e dell'antisolvente. La procedura di preparazione risulta essere analoga a quella con il Vortex Mixer, ma la miscelazione viene eseguita con il CIJM e il valore di portata preso come riferimento risulta essere 36 mL/min. Il principale vantaggio legato all'impiego di questa tecnica è legato al fatto che risulta essere maggiormente scalabile e quindi permette di avere un maggior impiego a livello industriale.

La distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate con concentrazione pari a 0.05% (w/v) di chitosano è riportata in Figura 32:

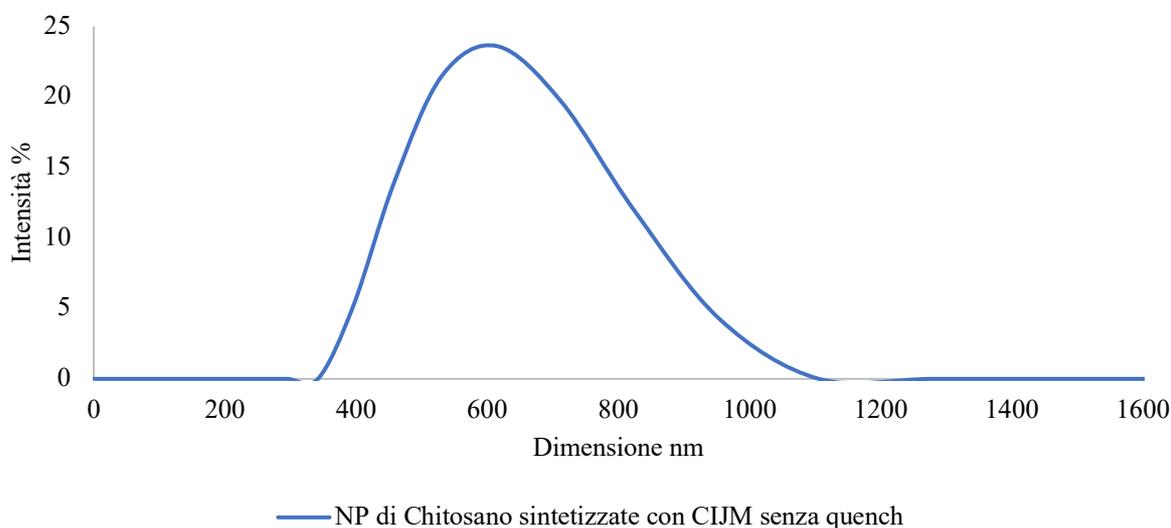


Figura 32: Distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle di chitosano con concentrazione 0.05% w/v ottenuta tramite microreattore CIJM (36 mL/min) e senza effettuare il quench

La dimensione media delle nanoparticelle di chitosano ottenuta tramite CIJM è 615 nm e il potenziale ζ è 8.25 mV. Confrontando questi valori con quelli ottenuti mediante sintesi con Vortex, si evince che in questo caso le NP risultano essere circa il 30% più grandi, tuttavia la carica superficiale risulta essere non influenzata dal metodo di sintesi.

Analogamente alla sintesi tramite reattore Vortex mixer sono state eseguite delle prove che miravano l'andare a studiare gli effetti del *quench* sulla distribuzione dimensionale delle nanoparticelle.

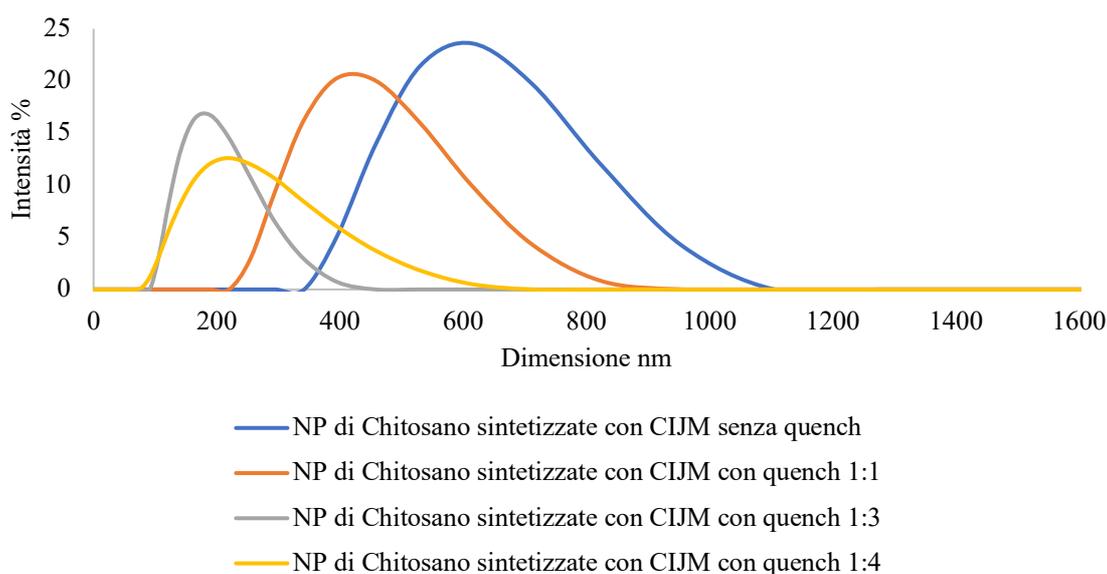


Figura 33: Distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle di chitosano con concentrazione 0.05% w/v ottenuta tramite microreattore CIJM (36 mL/min) e rapporti di diluizione differenti

Come era stato già notato con l'altro metodo di sintesi, anche in questo caso si può vedere che l'aggiunta di un'aliquota di acqua diminuisce notevolmente le dimensioni delle nanoparticelle ottenute.

Confrontando le dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute con rapporti di *quench* differenti e con i due metodi di sintesi, si può notare che quelle ottenute con CIJM risultano essere più grandi nel caso non diluito; infatti, il diametro medio è pari a 615 nm contro i 458 nm di quelle miscelate con vortex. Allo stesso tempo però sono sempre quelle sintetizzate con CIJM che risentono maggiormente dell'effetto stabilizzante del *quench*; infatti, diminuiscono drasticamente le dimensioni. Risultano essere circa l'80% più piccole quelle sottoposte a *quench* 1:3.

Le nanoparticelle sintetizzate con Vortex invece risultano avere una variazione meno significativa al variare del *quench ratio*, come illustrato in Figura 28; infatti, il diametro medio risulta essere sempre nell'intorno di 450 nm. Perciò, se per quest'ultime risultava essere irrilevante il rapporto tra sospensione e aliquota d'acqua, nel caso delle NP ottenute mediante CIJM questo non è più vero.

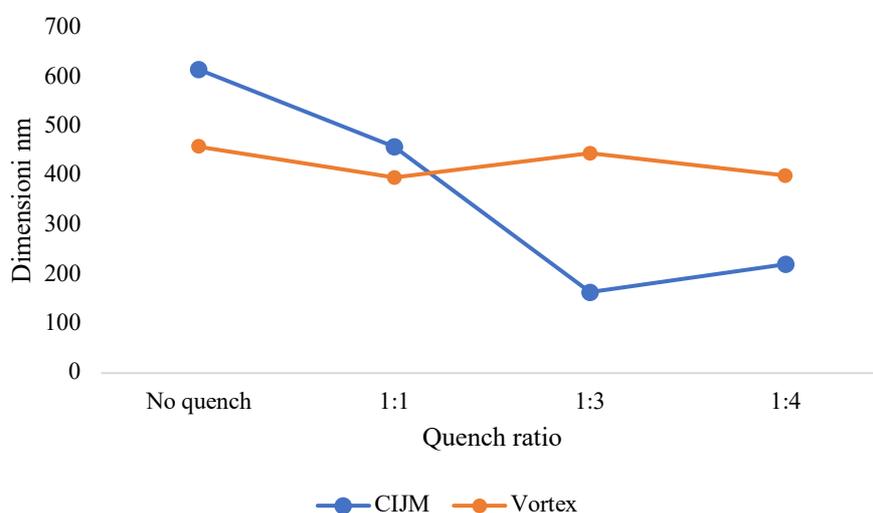


Figura 34: Confronto delle dimensioni medie delle nanoparticelle in funzione del metodo di sintesi Vortex (30 secondi) e CIJM (36 mL/min) e del rapporto di diluizione

Alla luce di questi risultati è possibile affermare che in media le dimensioni delle NP ottenute con il Vortex risultano essere minori rispetto a quelle sintetizzate con CIJM in assenza di *quench*.

Tuttavia, se vengono adoperati rapporti di diluizioni come 1:3 o 1:4 alle nanoparticelle ottenute con i getti collidenti confinati, è possibile raggiungere dimensioni notevolmente minori rispetto a quelle ottenute con il Vortex.

In Figura 35, sono state riportate le distribuzioni delle dimensioni medie delle nanoparticelle in funzione della concentrazione di chitosano. Dall'analisi delle curve si può notare che non risultano esserci particolari variazioni, per cui si è pensato di continuare lo studio con la concentrazione proposta in letteratura, 0.05%.

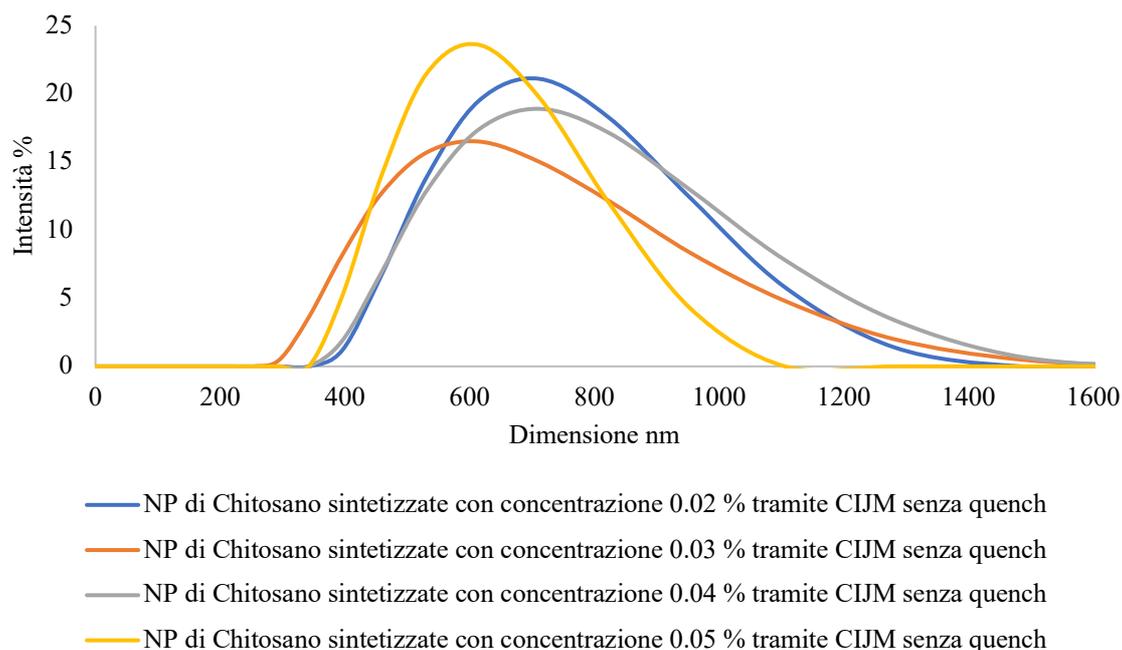


Figura 35: Confronto delle PSD delle NP di chitosano sintetizzate con concentrazioni differenti di CS tramite microreattore CIJM (36 mL/min) e senza quench

Dai valori riportati in Figura 36 è possibile notare che le nanoparticelle ottenute con il Vortex mixer risultano essere più piccole rispetto alle altre, a pari concentrazione del polisaccaride.

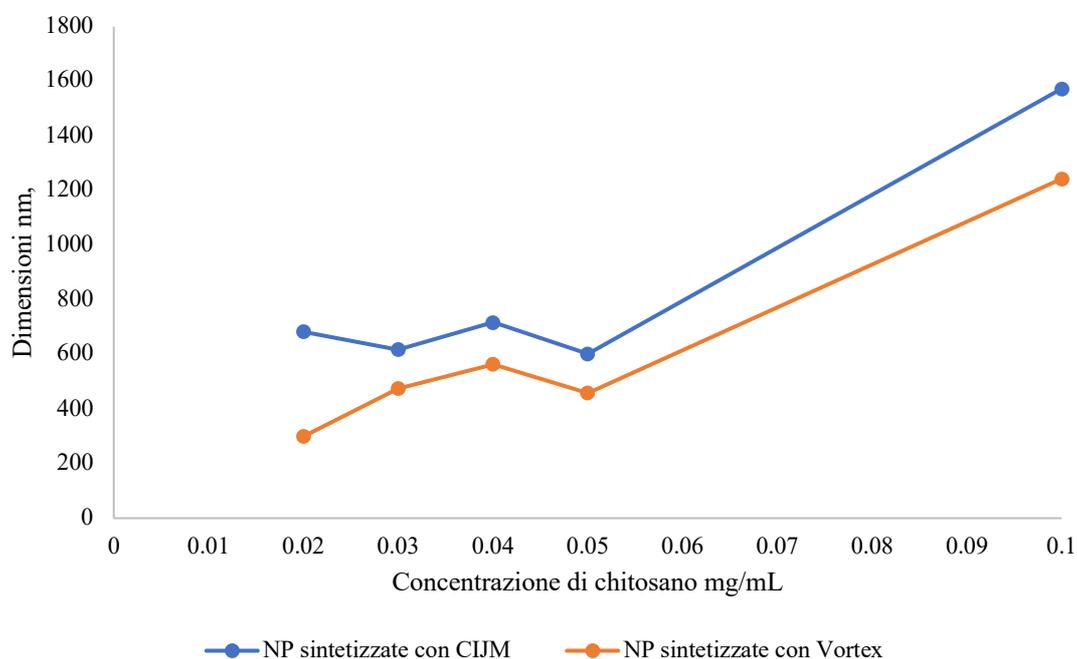


Figura 36: Confronto delle dimensioni medie delle nanoparticelle in funzione del metodo di sintesi: Vortex mixer (30 secondi) e CIJM (36 mL/min) e della concentrazione di chitosano – senza quench

Il potenziale ζ non risente particolarmente della variazione di concentrazione di chitosano e neanche del metodo di sintesi: infatti, analizzando la Tabella 5 è possibile notare che i valori sono molto simili tra di loro e sono all'interno dell'intervallo desiderato (5 – 12 mV)

Tabella 5: Confronto della carica superficiale delle nanoparticelle in funzione del metodo di sintesi Vortex(30 secondi) e CIJM (36 mL/min) e della concentrazione di chitosano – senza quench

Concentrazione di chitosano, mg/mL	Potenziale ζ NP sintetizzate con CIJM, mV	Potenziale ζ NP sintetizzate con Vortex, mV
0.2	7.89	8.01
0.3	8.77	7.96
0.4	9.33	9.54
0.5	8.25	8.74

3.1.4 Studio dell'effetto della variazione di portata al microreattore CIJM sulla sintesi delle nanoparticelle di chitosano

Infine, si è valutato l'effetto della velocità di miscelazione sulle dimensioni delle nanoparticelle di chitosano sintetizzate con CIJM, andando a variare la portata alimentata. Dalle curve riportate in Figura 37 è possibile notare che la portata con la quale vengono iniettati solvente e antisolvente risulta essere poco significativa per la distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle.

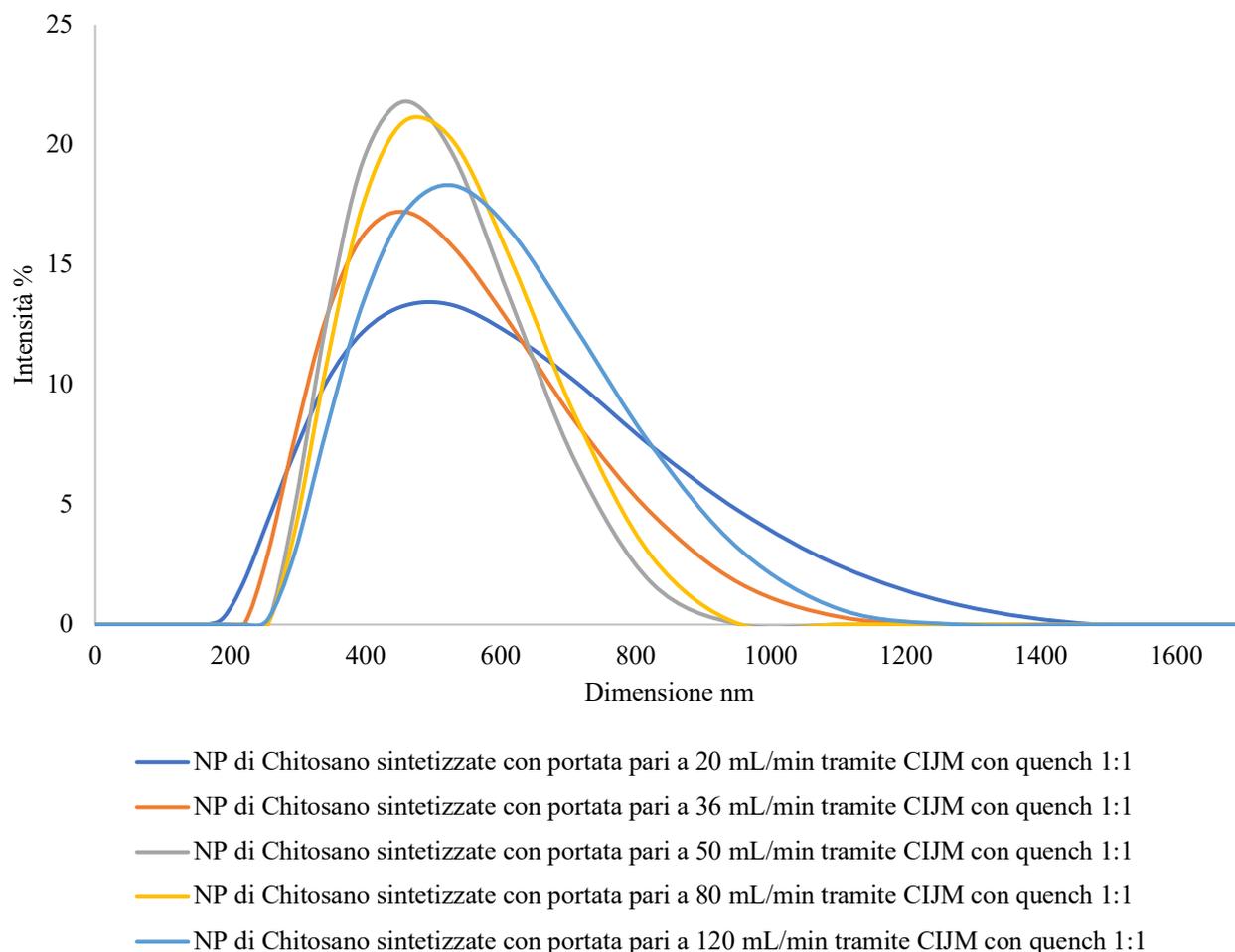


Figura 37: Confronto delle PSD delle NP di chitosano sintetizzate con concentrazione di CS 0.05% w/v tramite microreattore CIJM e con quench 1:1

Anche dal punto di vista della carica superficiale non sembrano esserci particolari differenze: infatti, i valori di potenziale ζ rientrano nell'intervallo di interesse tra 8 e 12 mV (Tabella 6).

Tabella 6: Confronto delle cariche superficiali delle NP di chitosano sintetizzate con concentrazione di CS 0.05% w/v tramite microreattore CIJM e con quench 1:1

Portata mL/min	Potenziale ζ mV
20	9.16
36	8.25
50	9.97
80	9.92
120	11.5

3.2 Studio della centrifugazione della sospensione di nanoparticelle di chitosano

Il processo di centrifugazione permette di separare il liquido (*fase superiore*) dalle nanoparticelle sedimentate, che possono essere successivamente re-disperse in un piccolo volume di acqua. A partire dalle indicazioni di letteratura, si è adottata una velocità di centrifugazione pari a 16000 rpm per un tempo di 15 minuti. La temperatura durante questa fase è stata mantenuta costante e pari a 20°C; la scelta di operare con una centrifuga refrigerata è legata alla necessità di eliminare la variabilità legata allo sviluppo di calore. La centrifugazione è uno *step* fondamentale per andare a valutare l'efficacia di incapsulamento; per questa ragione è necessario definire quali siano le condizioni ottimali.

La precipitazione è risultata efficace quando le sospensioni erano maggiormente concentrate, per cui difficilmente si è riusciti a far precipitare le nanoparticelle che a seguito della sintesi avevano subito l'operazione di *quench* o nel caso di basse concentrazioni di chitosano, come 0.2 mg/mL. Per questa ragione tutti i risultati presentati nel seguito fanno riferimento a sospensioni ottenute senza *quench*.

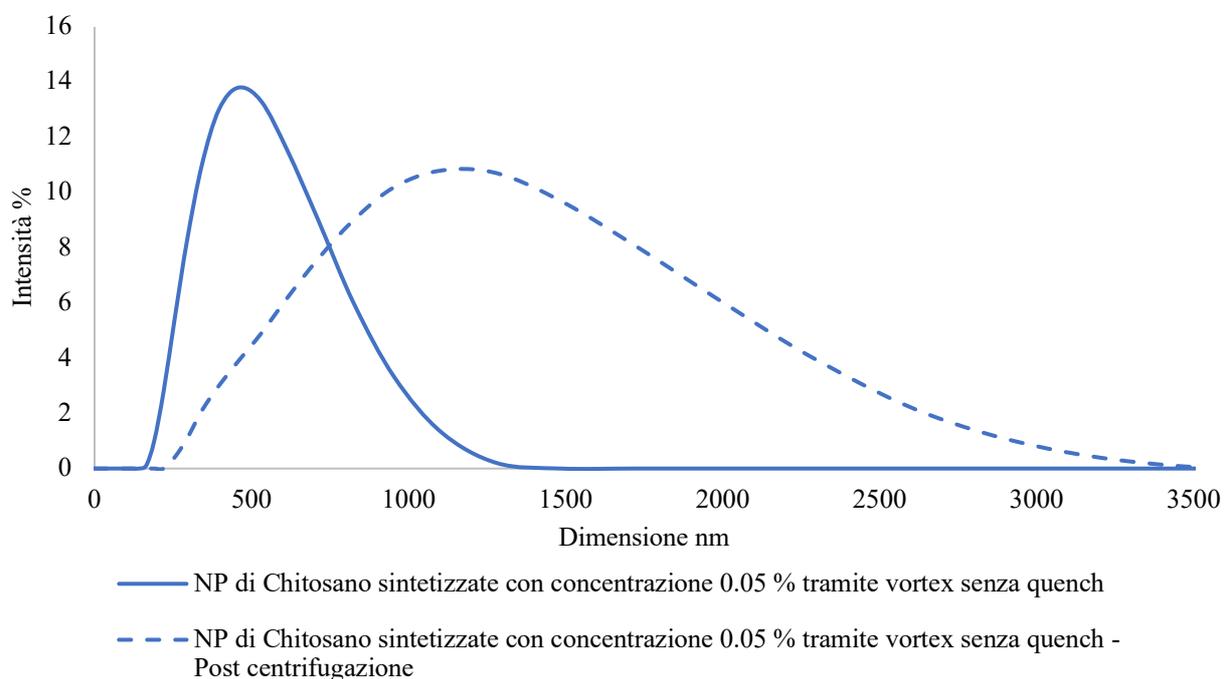


Figura 38: Confronto delle PSD prima e dopo centrifugazione delle NP di chitosano sintetizzate tramite vortex (30 secondi) e senza quench

Dalla Figura 38 è possibile notare che durante la fase di centrifugazione avvengono dei fenomeni di aggregazione che comportano un aumento delle dimensioni medie delle nanoparticelle di chitosano che passano da 458 a 1173 nm. Inoltre, una variazione la si ha anche dal punto di vista della carica superficiale, infatti questa varia da 8.74 mV a 27 mV.

3.2.1 Studio dell'effetto della centrifugazione sulle nanoparticelle sintetizzate con diverse concentrazioni di chitosano

Dai risultati preliminari, si è deciso di provare a sintetizzare le nanoparticelle ottenute con concentrazione di chitosano pari a 0.02%, 0.05%, 0.1%. In tutti e tre i casi si osserva che sono avvenuti dei fenomeni di aggregazione. Infatti, come si può vedere da Figura 39 tutte le curve che descrivono la distribuzione post centrifugazione si vanno a posizionare su un intervallo di dimensione più grande che esce dalla scala nanometrica, da 500 a 3500 nm.

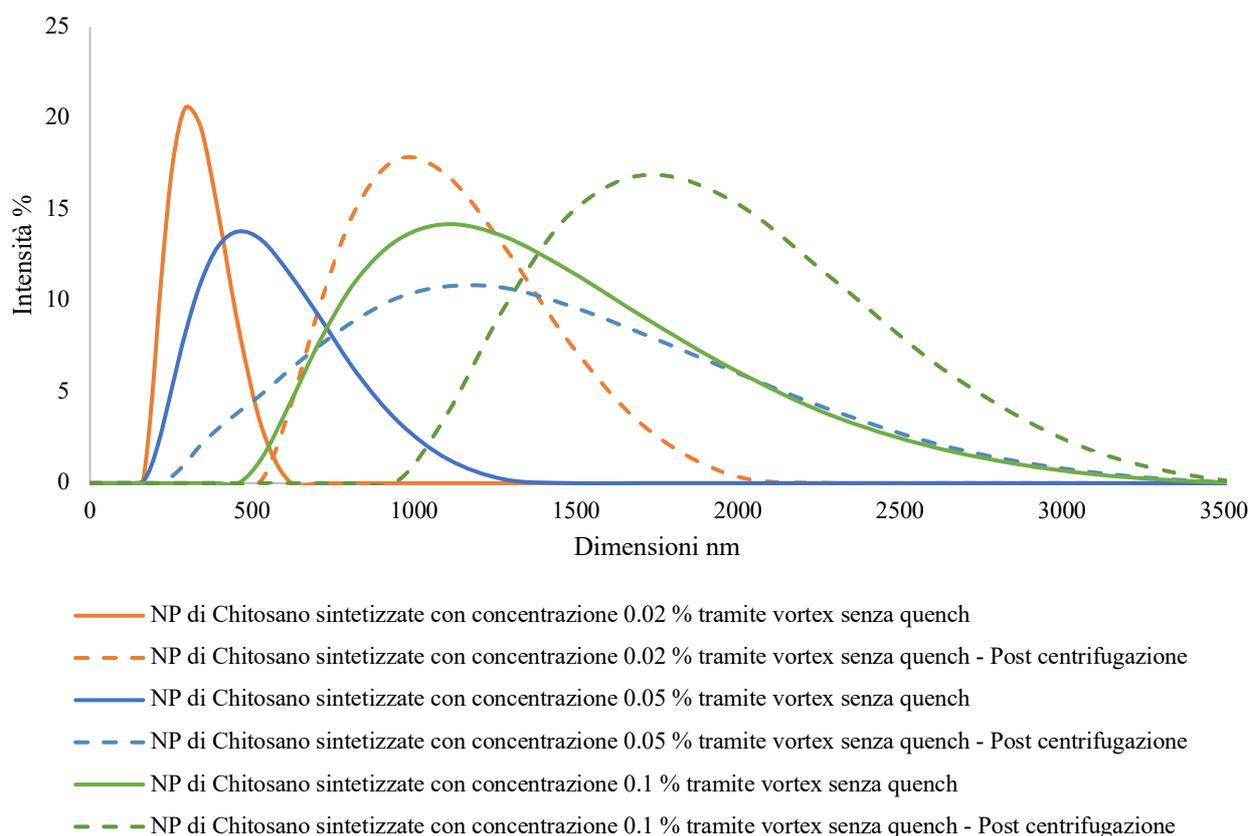


Figura 39: Confronto delle PSD prima e dopo centrifugazione delle NP sintetizzate con concentrazioni differenti di chitosano tramite vortex (30 secondi) e senza quench

3.2.2 Studio dell'effetto della centrifugazione sulle nanoparticelle sintetizzate con CIJM

Le nanoparticelle sintetizzate tramite microreattore CIJM risultano essere soggette agli stessi fenomeni di aggregazione che colpiscono le NP ottenute con Vortex mixer. In Figura 40, si può notare che il diametro medio raddoppia e aumenta anche l'intervallo di dimensioni in cui si distribuiscono le NP, da 500 a 2000 nm.

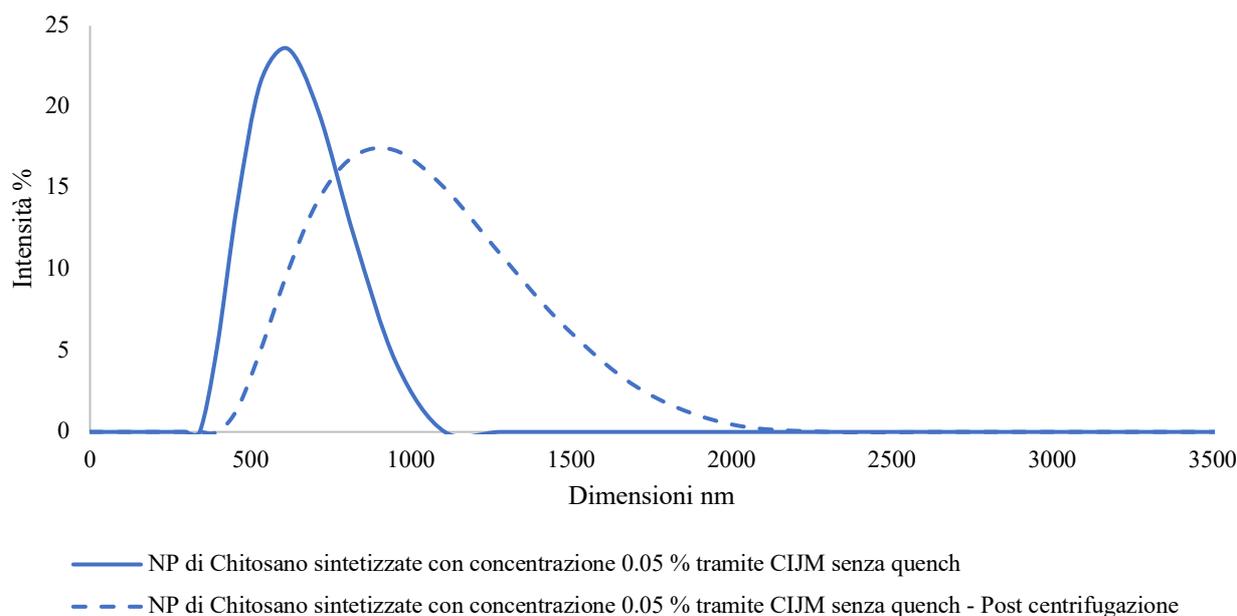


Figura 40: Confronto delle PSD prima e dopo centrifugazione delle NP di chitosano sintetizzate tramite CIJM (36 mL/min) e senza quench

Il fenomeno di aumento delle dimensioni delle nanoparticelle si ripropone anche quelle ottenute con concentrazioni differenti di chitosano; maggiori informazioni vengono fornite in appendice Figura A. 1.

Alla luce delle prove effettuate, è emerso che la centrifugazione provoca fenomeni di aggregazione che comportano un aumento delle dimensioni medie delle nanoparticelle, indipendentemente dal metodo di sintesi. Come detto in precedenza, questa operazione ha principalmente lo scopo di andare a separare il surnatante e permettere la valutazione dell'incapsulamento di RNA. In questo lavoro di Tesi, in primo luogo si vuole ottenere un efficiente intrappolamento dell'acido nucleico. Tuttavia, se si vogliono ottenere nanoparticelle sufficientemente piccole anche a seguito della centrifugazione, una soluzione è quella di effettuare la sintesi con concentrazioni minori di chitosano. Infatti, in questo caso generalmente si ottengono NP più piccole, le quali anche post centrifugazione risultano rientrare nel range dimensionale di interesse. Allo stesso modo, è necessario eseguire una valutazione a monte della sintesi per quanto riguarda il *quench*; infatti, se questa operazione viene eseguita per controllare la dimensione delle nanoparticelle, non sarà poi possibile separare il surnatante per centrifugazione.

Per concludere, se lo scopo della prova è la valutazione dell'incapsulamento allora è sufficiente eseguire la centrifugazione e trascurare i fenomeni che hanno effetti dimensionali. Invece, se si vogliono ottenere nanoparticelle che rimangano nel range della *nanoscala*, allora è necessario operare con il *quench* o impiegando concentrazioni minori di chitosano.

3.3 Studio della stabilità delle nanoparticelle di chitosano

L'analisi della stabilità delle nanoparticelle sintetizzate con chitosano è stata eseguita dopo aver mantenuto all'interno di un frigorifero a 4°C per 24 ore le NP risospese in acqua.

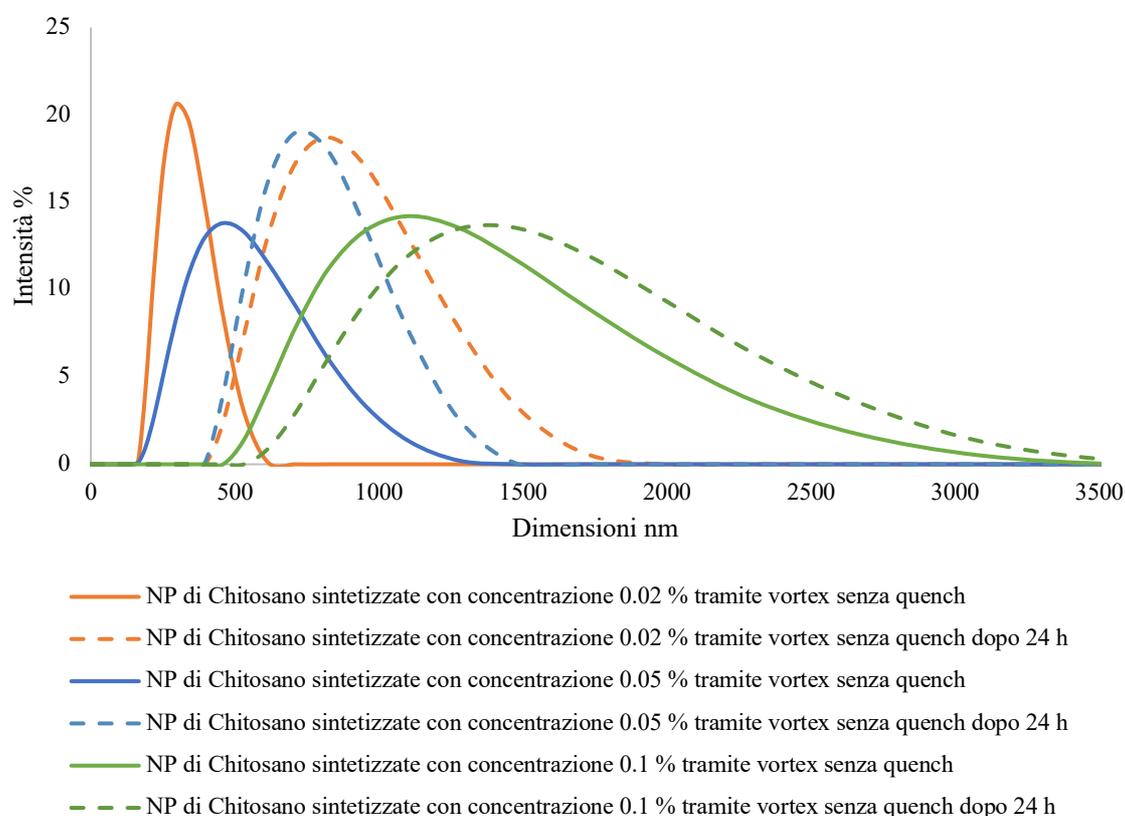


Figura 41: Studio della stabilità nel tempo delle nanoparticelle di chitosano ottenute con concentrazioni differenti tramite vortex (30 secondi) – Frigorifero per 24 h.

Dalla Figura 41 si può notare che gli effetti maggiormente rilevanti sono quelli di aggregazione che portano ad uno scostamento della distribuzione delle dimensioni verso destra, indipendentemente dalla concentrazione del polisaccaride. In tutti i tre casi considerati si verifica quasi un raddoppio di tutti i diametri medi; le NP con concentrazione pari a 0.05% di chitosano passano da un diametro di 458 nm a 876 nm.

Inoltre, è stato anche studiato l'effetto della stabilità nel tempo sulle nanoparticelle di chitosano sintetizzate con CIJM; maggiori informazioni sono state riportate in appendice Figura A. 2.

Per ovviare ai fenomeni di aggregazione che portano ad un aumento delle dimensioni medie, una possibile soluzione è quello di andare a liofilizzare le nanoparticelle di chitosano. In questo modo viene allontanata l'acqua e le nanoparticelle sarebbero mantenute in un ambiente più stabile. Questa via di conservazione può essere impiegata sia per le NP sintetizzate con Vortex che con CIJM.

Dalle prove preliminari effettuate, è stato possibile definire quali sono le condizioni operative ottimali per la sintesi di nanoparticelle di chitosano da seguire poi per effettuare l'incapsulamento di RNA:

- Riscaldamento del solvente e dell'antisolvente per un minuto a 55°C;
- Sintesi mediante reattore Vortex per 30 secondi alla massima velocità;
- Non effettuare il *quench*;
- Centrifugazione per 15 minuti a 16000 rpm a 20°C.

3.4 Analisi dei risultati delle nanoparticelle di chitosano con RNA

La sintesi delle nanoparticelle con RNA viene eseguita unicamente con il Vortex dal momento che dai risultati delle prove preliminari queste mostravano avere dimensioni minori rispetto a quelle ottenute senza RNA e una migliore stabilità. Inoltre, i volumi richiesti per eseguire la sintesi con CIJM sono molto maggiori rispetto all'altro.

La sintesi delle nanoparticelle di chitosano con RNA incapsulato segue il medesimo procedimento descritto in precedenza e viene sempre eseguita con agitatore Vortex per 30 secondi alla massima velocità. In questo caso però al *buffer sodium sulphate* viene aggiunto l'oligonucleotide in una quantità tale da avere una concentrazione pari a 0.03%.

La sintesi è stata eseguita senza *quench* poiché si è voluto ottimizzare il processo di separazione tra surnatante e particelle in sospensione. Questo perché tramite l'analisi spettrofotometrica UV-vis ($\lambda=260$ nm) del surnatante è possibile stimare l'efficienza di incapsulamento.

Le prove di incapsulamento sono state eseguite utilizzando tre valori di concentrazione di chitosano: 0.02, 0.05 e 0.1 mg/mL, le nanoparticelle ottenute a partire dalla concentrazione minore non sono precipitate in fase di centrifugazione, per cui è risultato impossibile prelevare il surnatante e valutare l'efficienza di incapsulamento. I risultati ottenuti per gli altri due casi sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7: Efficienza di incapsulamento di RNA all'interno di nanoparticelle di chitosano sintetizzate con concentrazioni differenti ottenute con reattore vortex (30 secondi)

Concentrazione di chitosano mg/mL	Efficienza di incapsulamento
0.05	98.69%
0.1	99.24%

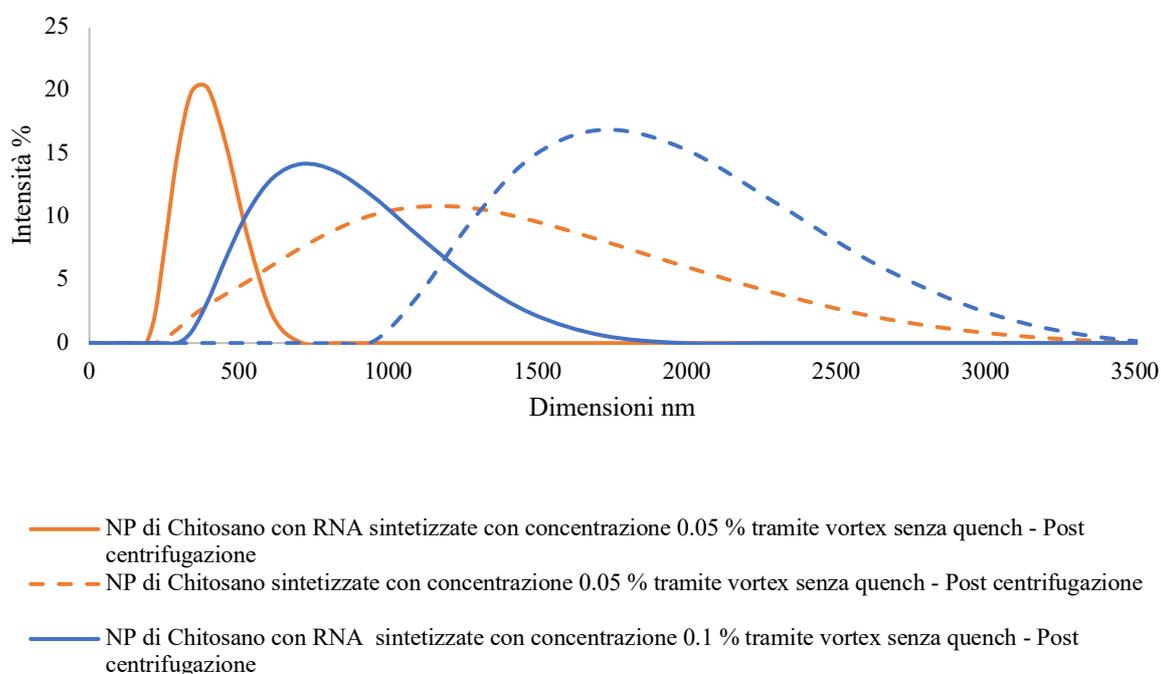


Figura 42: Confronto delle PSD delle NP di chitosano con RNA incapsulato e senza sintetizzate post centrifugazione con concentrazioni differenti tramite vortex (30 secondi) e senza quench

In Figura 42, viene riportato il confronto delle distribuzioni delle dimensioni delle nanoparticelle di chitosano con RNA incapsulato e senza a seguito della centrifugazione. È possibile notare che la

presenza dell'oligonucleotide diminuisce notevolmente i fenomeni di aggregazione tra le nanoparticelle. Infatti, il diametro medio a seguito della centrifugazione passa da 1237 nm a 412 nm nel caso di NP con concentrazione 0.05% di chitosano. Anche nell'altra prova la riduzione del diametro è di circa il 50% e in media le nanoparticelle con RNA hanno dimensioni pari a 732 nm. Inoltre, la presenza dell'RNA provoca anche un aumento della carica superficiale delle nanoparticelle, infatti il potenziale ζ passa da circa 8 mV in assenza dell'oligonucleotide, a circa 20 mV in presenza di RNA.

4. Sintesi di nanoparticelle lipidiche

4.1 Sintesi di nanoparticelle lipidiche

In questa fase preliminare del lavoro di Tesi, le prove sperimentali che sono state svolte hanno l'obiettivo di definire una metodologia per la sintesi delle nanoparticelle lipidiche tramite l'agitatore Vortex. I parametri presi in considerazione sono la dimensione media delle particelle e il potenziale ζ ; lo scopo è quello di ottenere un diametro medio nella scala dei nanometri e una carica superficiale positiva intorno ai 5-12 mV.

Seguendo la procedura descritta nella sezione 2.2.4, la distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle ottenute è mostrata in Figura 43.

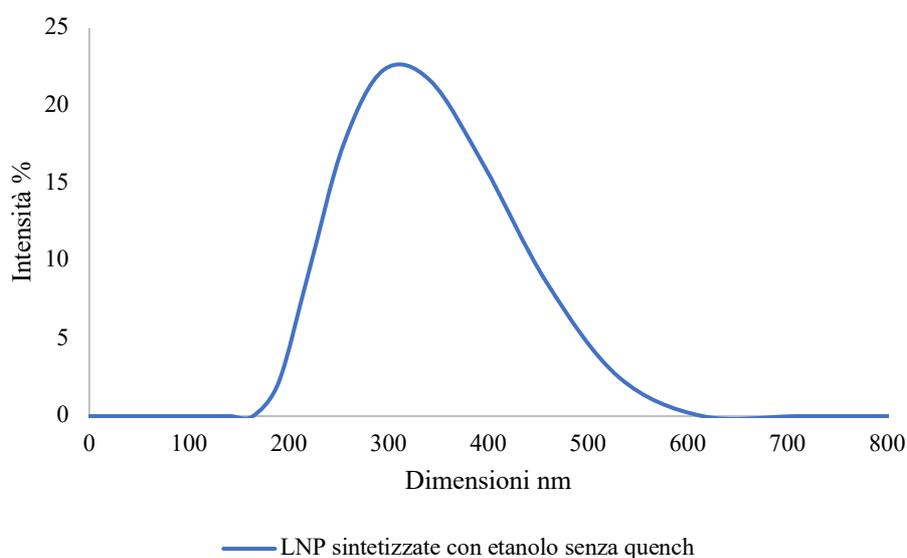


Figura 43: Distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle lipidiche ottenuta tramite agitatore vortex (30 secondi) e senza effettuare il quench

La dimensione media è pari a 346 nm e il potenziale ζ è 7.01 mV.

Dopo aver replicato la procedura sperimentale descritta da Semple (2001), sono state variate singole variabili operative, per identificare quali avessero maggior influenza sulle dimensioni delle nanoparticelle. Sono quindi state svolte delle prove variando:

- La diluizione (*quench*) a valle della sintesi
- La concentrazione dei lipidi
- L'alcol utilizzato per la sintesi
- Il metodo di miscelazione, utilizzando il Confined Impinging Jets Mixer

4.1.1 Studio dell'effetto del quench sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche

Il *quench* consiste nell'aggiunta di una aliquota di acqua a seguito della sintesi delle nanoparticelle; questo tipo di operazione è comune quando vengono utilizzati metodi di miscelazione come il vortex e il Confined Impinging Jets Mixer (CIJM).

Le prove effettuate confermano le previsioni sull'effetto del *quench*: infatti in Figura 44 è possibile notare che le distribuzioni medie delle nanoparticelle lipidiche che hanno subito questa diluizione risultano essere minori.

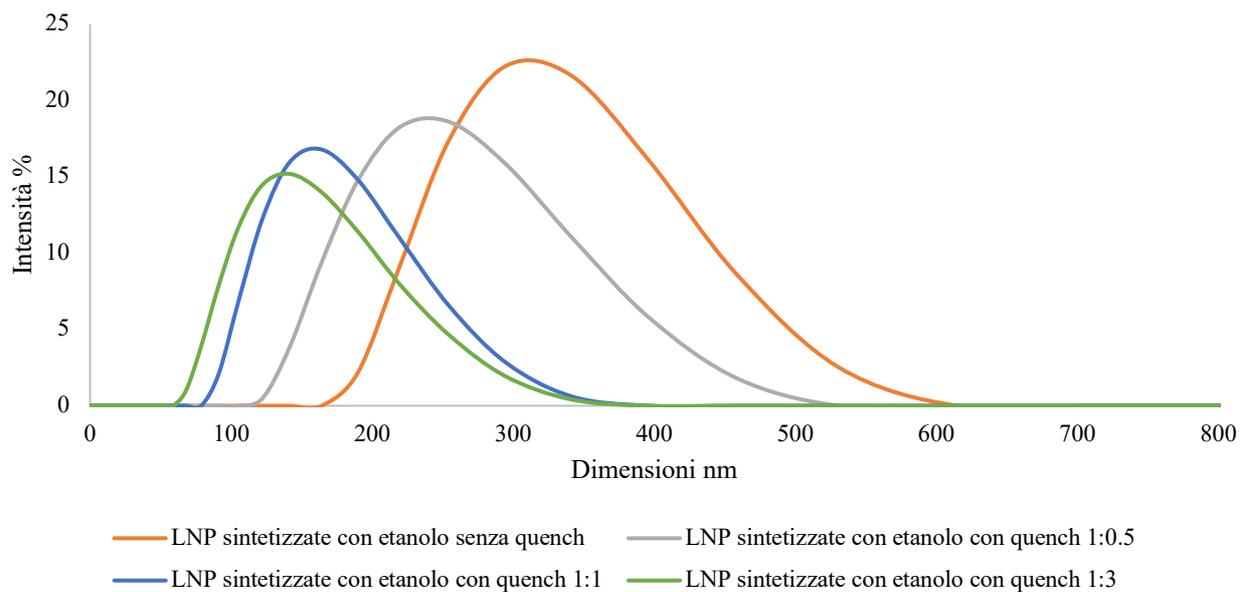


Figura 44: Confronto delle PSD delle LNP ottenute tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Le prove sono state eseguite utilizzando diversi *quench ratio* per andare a studiarne l'effetto e alla luce dei risultati ottenuti la scelta migliore è quella di utilizzare un rapporto 1:1. In questo modo, infatti, le dimensioni medie risultano essere dimezzate rispetto al caso con nessuna diluizione, si passa infatti da 346 nm a 172 nm. Una riduzione ulteriore delle dimensioni, fino a 125 nm, si otterrebbe andando ad utilizzare un *quench ratio* 1:3, la maggiore diluizione della sospensione potrebbe causare problemi in sede di centrifugazione e, pertanto, il valore 1:1 appare adeguato.

A differenza delle dimensioni medie, il potenziale ζ non pare essere significativamente influenzato dall'operazione di *quench*, come emerge dai valori mostrati in Tabella 8.

Tabella 8: Variazione della carica superficiale delle nanoparticelle con rapporti di diluizione differenti ottenute con agitatore vortex (30 secondi)

Quench ratio	Potenziale ζ mV	Dimensioni medie, nm
No quench	7.51	346.2
Quench 1:0.5	5.67	322.4
Quench 1:1	11.6	172.3
Quench 1:3	10.9	125.3

4.1.2 Studio dell'effetto della concentrazione di lipidi sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche

La sintesi delle nanoparticelle lipidiche viene ottenuta mediante l'utilizzo di 4 lipidi differenti: DSPC/CHOL/DODAP/PEG-Cer₁₆ che sono in rapporto tra di loro in questo modo: 25/45/20/10, mol/mol/mol/mol (Semple et al., 2001). Inoltre, la concentrazione di lipidi totali in etanolo è pari a 1 mg/mL. Questi sono i valori che sono stati presi come riferimento per le prove sperimentali: per valutare il contributo di questi componenti e l'effetto sulle nanoparticelle si è deciso di eseguire tre tipi di prove:

- Variazione del rapporto ON/lipidi;
- Variazione di concentrazione di DODAP;
- Variazione di concentrazione di CHOL.

La **concentrazione di lipidi totali** in alcol è stata variata tra 0.5 mg/mL e 2 mg/mL, per cui il rapporto di concentrazione con l'RNA varia tra 1:15 e 1:60. Studiare l'effetto di concentrazioni diverse può essere utile per poi andare a ottimizzare il processo di incapsulamento. Per questa ragione si è deciso in fase preliminare di andare ad analizzare le distribuzioni delle dimensioni e l'effetto della centrifugazione (16000 rpm per 15 minuti a 20°C). Tutte le prove sono state condotte tramite agitatore Vortex (30 secondi) e senza eseguire il *quench* in modo da favorire la precipitazione in fase di centrifugazione.

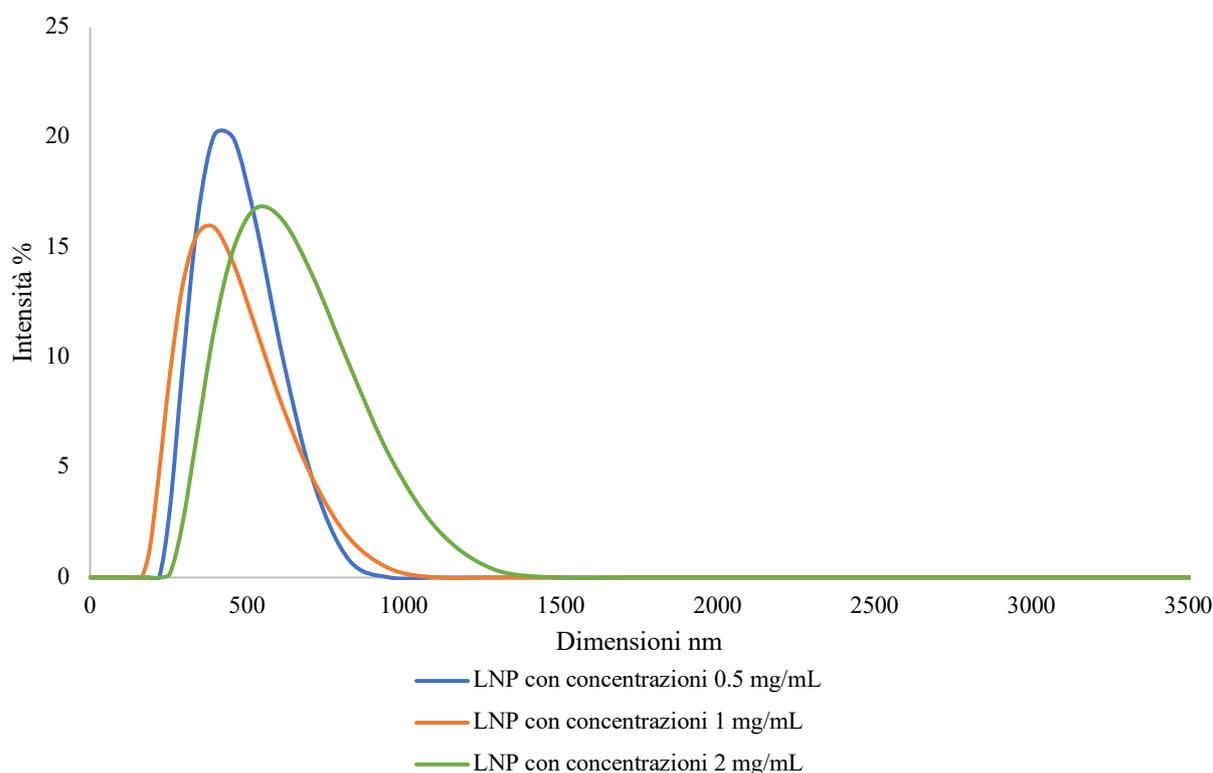


Figura 45: Confronto delle PSD delle LNP sintetizzate con concentrazioni differenti di lipidi tramite vortex (30 secondi) e senza quench

Dalla Figura 45 è possibile notare che la concentrazione di lipidi ha un effetto modesto sulla distribuzione delle dimensioni; infatti, sono stati ottenuti come diametri medi 423nm, 346 nm e 591 nm rispettivamente per le concentrazioni 0.5, 1 e 2 mg/mL.

L'incapsulamento dell'RNA verrà eseguito in LNP sintetizzate con concentrazioni differenti di lipidi, per cui queste prove preliminari hanno l'obiettivo di andare ad indagare quali fenomeni sono maggiormente rilevanti. Dal momento che in tutti i tre i casi analizzati: 0.5, 1, 2 mg/mL le distribuzioni sono risultate accettabili, allora si è deciso di procedere con tutte e tre le concentrazioni.

Il **DODAP** (1,2-Dioleoyl-3-dimethylammonium-propane) è un lipide cationico ionizzabile ed è per questa sua natura che a pH neutro è in grado di acquistare una carica positiva e quindi migliora l'efficienza di incapsulamento di RNA. Inoltre, grazie alla sua struttura è in grado di interagire con le membrane cellulari e favorire il rilascio dell'acido nucleico all'interno della cellula.

Prima di andare a valutare gli effetti sull'incapsulamento dell'oligonucleotide, si è deciso di andare a valutare che differenze si presentano in termini di distribuzione delle dimensioni in funzione di tre diverse concentrazioni di DODAP: 0%, 20% e 40%.

Dalla Figura 46 è possibile vedere che in assenza di DODAP si formano nanoparticelle di dimensione particolarmente elevata. Per questa ragione si è deciso di non incapsulare RNA in questa condizione: infatti sarebbe stato probabile ottenere LNP fuori dal range dei nanometri.

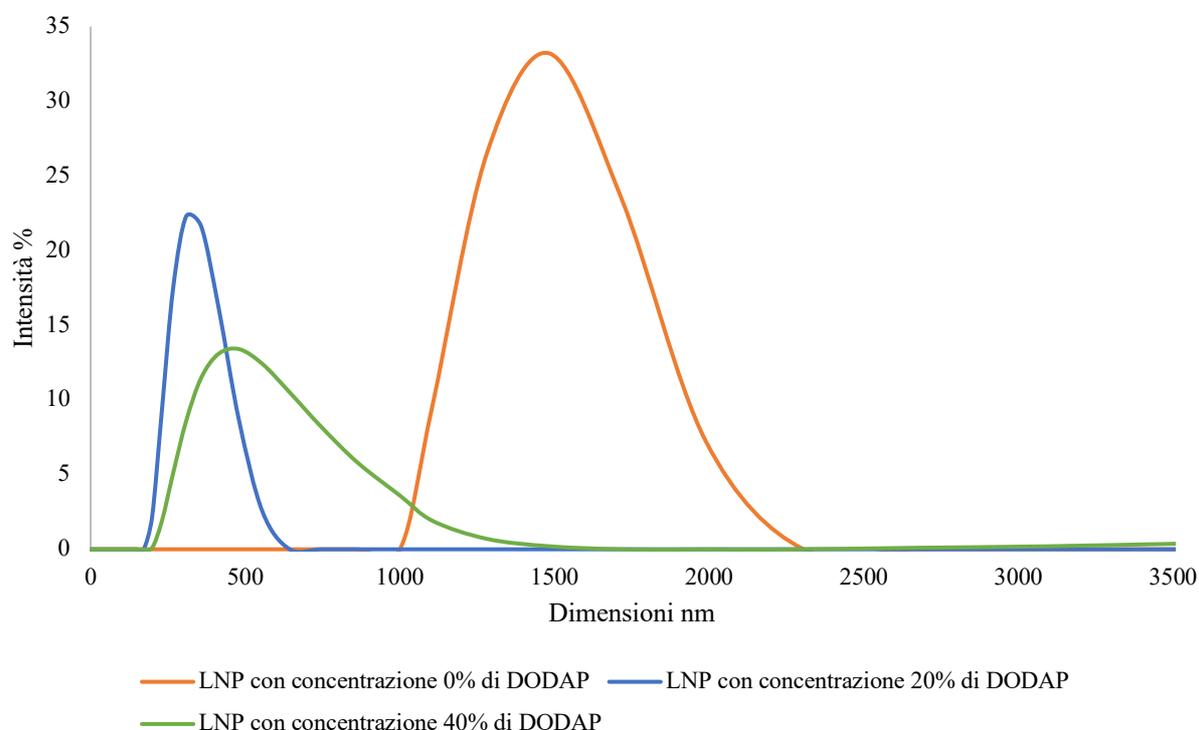


Figura 46: Confronto delle PSD delle LNP sintetizzate con concentrazioni differenti di DODAP tramite vortex (30 secondi) e senza quench

Il **colesterolo** (CHOL) ricopre un ruolo legato soprattutto alla veicolazione della nanoparticella: infatti, per la sua struttura è in grado di interagire con le membrane cellulari e favorire il rilascio dell'RNA. Inoltre, ha un ruolo di tipo strutturale all'interno della membrana e conferisce maggiore stabilità alla nanoparticella sfavorendo i fenomeni di aggregazione. Nelle prove effettuate è stata fatta variare la concentrazione del lipide: 0%, 45%, 75%, 90%.

Le prove sperimentali (Figura A. 3 e Figura A. 4) hanno confermato che l'assenza di colesterolo nella miscela lipidica utilizzata nella sintesi, provoca maggiori effetti di aggregazione tra le nanoparticelle, per cui le dimensioni media che si ottengono escono dall'intervallo della *nanoscala*.

Per quanto riguarda le altre concentrazioni è possibile notare che tra le percentuali di colesterolo 45% e il 75% non vi sono particolari differenze ed è per questa ragione che si è deciso che in fase di incapsulamento venisse utilizzato unicamente 45% di CHOL. A differenza dalle altre, la curva delle dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate con una percentuale di colesterolo pari a 90% si distribuisce su un intervallo più ampio e questo può essere dovuto a fenomeni di instabilità legati ad un eccesso del lipide.

Alla luce dei risultati ottenuti si è pensato di procedere eseguendo l'incapsulamento con RNA in nanoparticelle sintetizzate con colesterolo al 45% e al 90%. Da queste prove preliminari è emerso che sarebbe stato poco vantaggioso eliminare il colesterolo dalla miscela di lipidi poiché la sua presenza previene i fenomeni di crescita/aggregazione delle NP.

4.1.3 Studio dell'effetto del terbutanolo sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche

La procedura di sintesi presa come riferimento prevede l'utilizzo di etanolo in cui solubilizzare i lipidi; un'alternativa è quella che prevede l'impiego del terbutanolo. Il metodo di sintesi è analogo a quello descritto nel paragrafo 2.2.4, ma viene unicamente sostituito l'alcol.

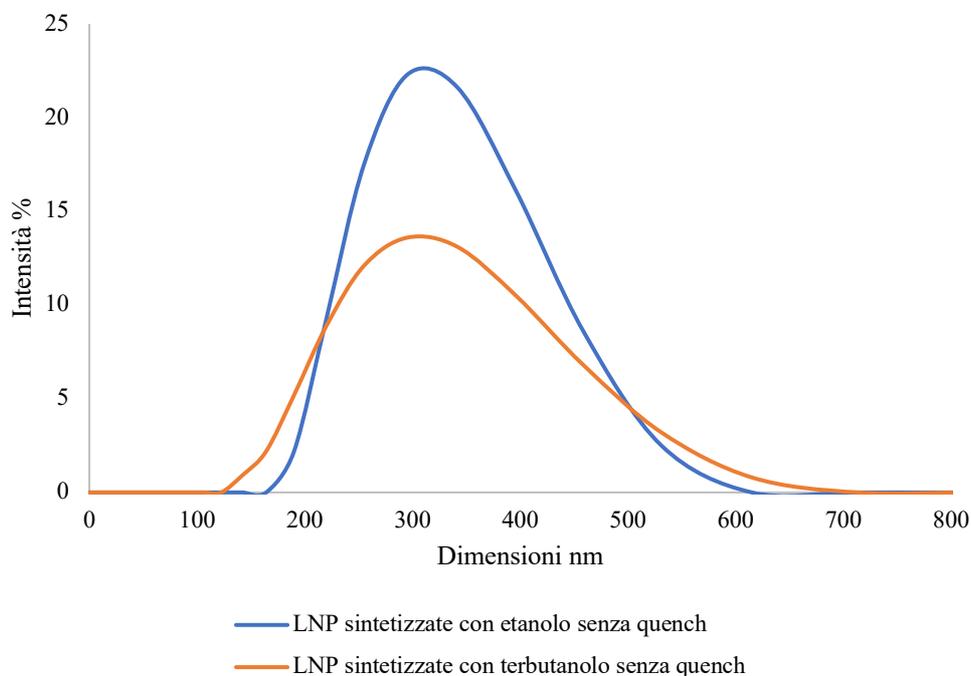


Figura 47: Confronto delle distribuzioni delle dimensioni delle nanoparticelle lipidiche ottenute tramite agitatore vortex (30 secondi) e senza effettuare il quench con etanolo e terbutanolo

Dalla Figura 47 emerge che non vi sono particolari differenze in termini di diametro medio: nel caso con il terbutanolo il diametro risulta essere pari a 342 nm contro i 346 nm delle NP sintetizzate con etanolo. Inoltre, anche le curve delle distribuzioni delle dimensioni delle nanoparticelle risultano essere entrambe monomodali e ricadono all'interno dello stesso intervallo, tra i 150 e i 650 nm. Per cui da questo punto di vista l'impiego del terbutanolo può essere considerata una valida opzione.

Inoltre, anche in termini di carica superficiale non risultano esserci differenze significative, infatti le nanoparticelle sintetizzate con terbutanolo risultano avere un potenziale zeta pari a 6.53 mV a fronte di 7.51 mV di quelle con etanolo.

In Figura 48, sono riportate le distribuzioni delle dimensioni delle LNP sintetizzate usando terbutanolo come solvente per i lipidi effettuando diversi rapporti di diluizione.

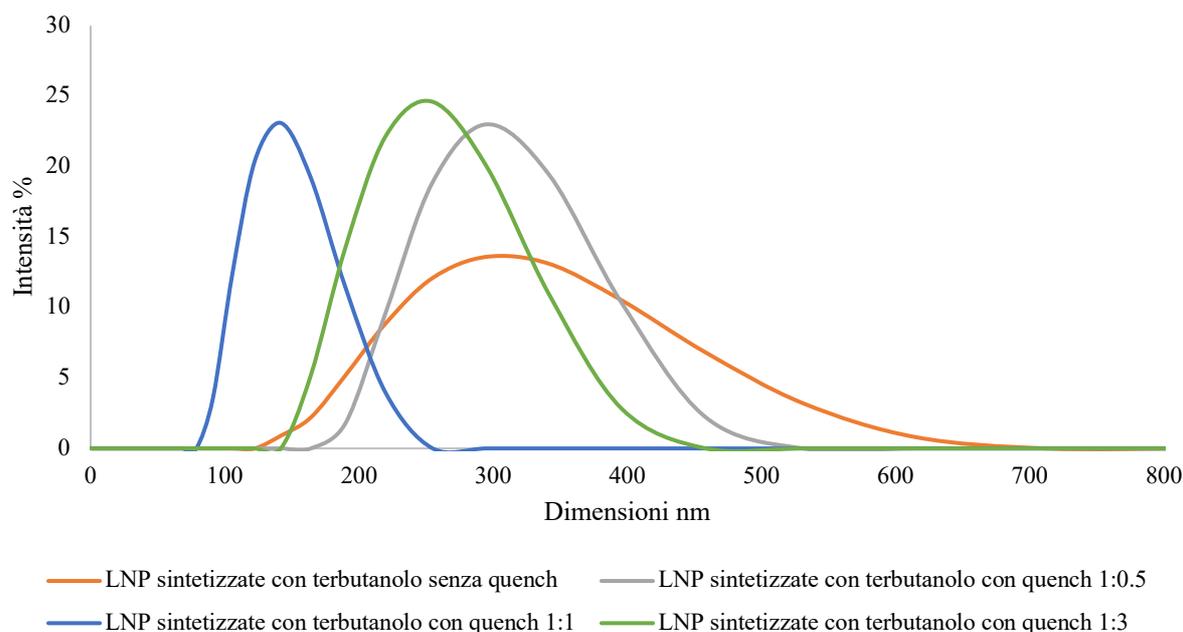


Figura 48: Confronto delle PSD delle LNP sintetizzate con terbutanolo tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Confrontando l'andamento delle dimensioni delle nanoparticelle lipidiche ottenute con i due differenti alcol è possibile notare che quelle ottenute con terbutanolo risultano essere maggiormente influenzate dalla diluizione. Infatti, anche in questo caso è possibile notare che le migliori prestazioni si ottengono andando ad utilizzare un *quench ratio* pari a 1:1.

Inoltre, come è possibile notare da Figura 49 l'effetto della diluizione della sospensione di etanolo, risulta avere un andamento lineare, per cui aumentando l'aliquota di acqua, diminuiscono le dimensioni delle LNP. Per le nanoparticelle sintetizzate con il terbutanolo non si riesce a riprodurre lo stesso andamento, anzi nei casi 1:0.5 e 1:3 si ottiene l'effetto opposto rispetto a quello desiderato.

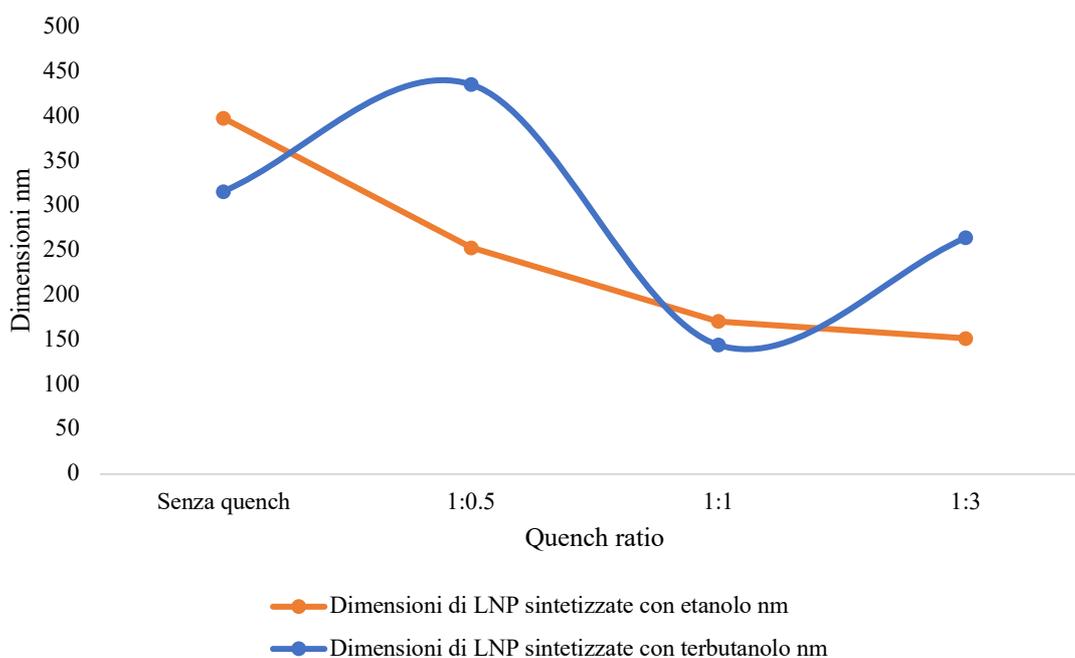


Figura 49: Confronto della variazione delle dimensioni delle LNP sintetizzate con etanolo e con terbutanolo in funzione del quench ottenute con vortex (30 secondi)

In termini di potenziale ζ non vi sono significative differenze in funzione dell'alcol utilizzato:

Tabella 9: Confronto tra le cariche superficiali delle LNP sintetizzate con etanolo e con terbutanolo con rapporti di diluizione differenti tramite agitatore vortex (30 secondi)

Quench ratio	Potenziale ζ mV - Etanolo	Potenziale ζ mV - Terbutanolo
No quench	7.51	6.53
Quench 1:0.5	5.67	7.08
Quench 1:1	11.6	8.45
Quench 1:3	10.9	13.4

4.1.4 Studio dell'effetto del Confined Impinging Jets Mixer sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche

La sintesi nei casi descritti precedentemente è stata sempre effettuata tramite agitatore Vortex; un'alternativa è quella di utilizzare il metodo dei getti confinati collidenti. In questo caso i volumi in gioco delle soluzioni sono più alti ed è per questa ragione che si è preferito utilizzare l'altra via per eseguire la maggior parte delle prove.

Gli aspetti che sono stati indagati in questo caso sono l'effetto del *quench* nei due casi di maggior interesse, per cui senza diluizione e con un rapporto pari a 1:1; inoltre sono state valutate le variazioni in termini dimensioni medie a seguito della centrifugazione.

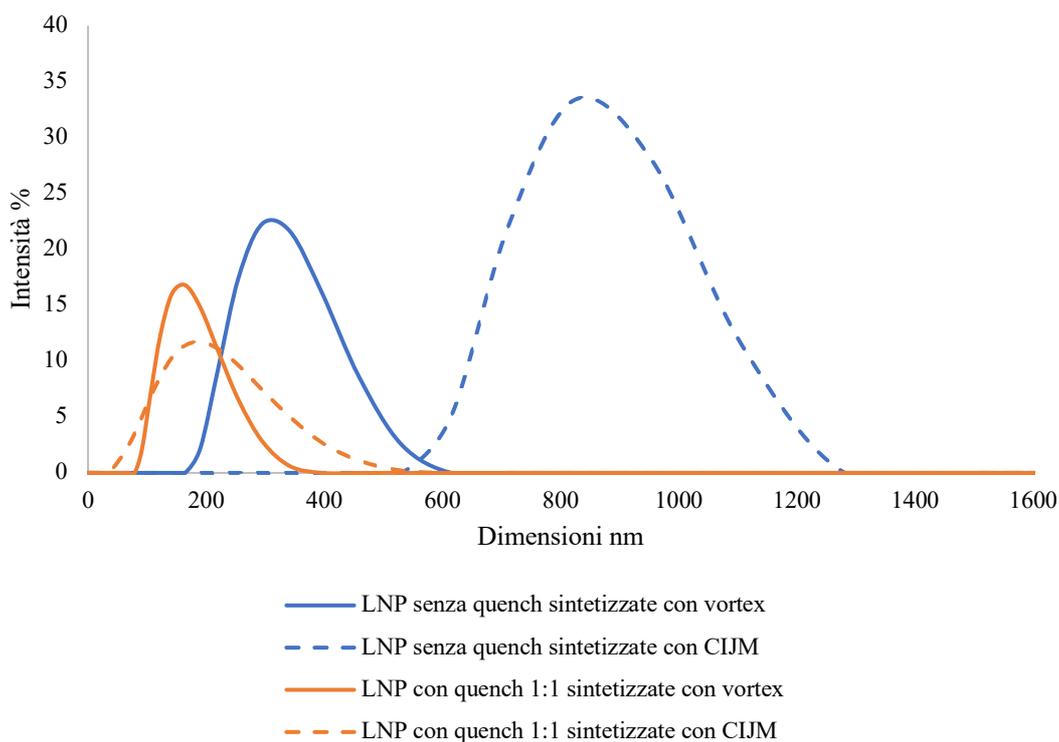


Figura 50: Confronto delle PSD delle LNP sintetizzate con agitatore vortex (30 secondi) e CIJM (36 mL/min) e con rapporti di diluizioni differenti

Utilizzando come metodo di sintesi l'agitatore Vortex si ottengono nanoparticelle in media più piccole come viene mostrato in Figura 50; inoltre gli effetti del *quench* sono analoghi nei due casi analizzati: infatti, se viene eseguita una diluizione, anche a seguito della sintesi tramite CIJM, le dimensioni risultano essere notevolmente ridotte.

4.2 Studio della separazione delle nanoparticelle lipidiche

I metodi utilizzati per eseguire la separazione delle nanoparticelle dal solvente in cui sono immerse sono due:

- Centrifugazione
- Dialisi

In questa parte del lavoro di Tesi vengono analizzati entrambi e valutati i principali effetti sulle nanoparticelle in termini di dimensione e potenziale ζ .

4.2.1 La centrifugazione

La centrifugazione è stata condotta seguendo le indicazioni riportate in letteratura, per cui la velocità è stata posta pari a 16000 rpm e condotta per un tempo pari a 15 minuti. Per evitare un effetto dei fenomeni termici legati allo sviluppo di calore, si è deciso di operare con una refrigerazione che permettesse di mantenere la temperatura costante e pari a 20°C. Una volta eseguita la separazione del surnatante, le LNP vengono risospese in acqua.

In una prima fase sono state posti in centrifuga i campioni ottenuti con rapporti di *quench* differenti e uno senza. Il risultato è che unicamente le sospensioni più concentrate hanno presentato una precipitazione delle nanoparticelle e quindi hanno permesso di separare il surnatante, che risulta essere l'obiettivo di questa operazione.

Per cui dei campioni che sono stati centrifugati solo quelli senza *quench* e quelli con *quench* 1:0.5 sono riusciti a produrre un precipitato. Le distribuzioni di dimensioni ottenute sono bimodali e un gruppo di nanoparticelle esce dal range nanometrico di interesse. In Figura 51 è evidenziato il *range* di dimensioni che cade nella scala d'interesse, da cui si può notare che il diametro medio delle nanoparticelle senza *quench* diminuisce del 30% raggiungendo i 289 nm a causa dei fenomeni di rottura. Maggiori dettagli sugli effetti della centrifugazione sono riportati in Figura A. 5.

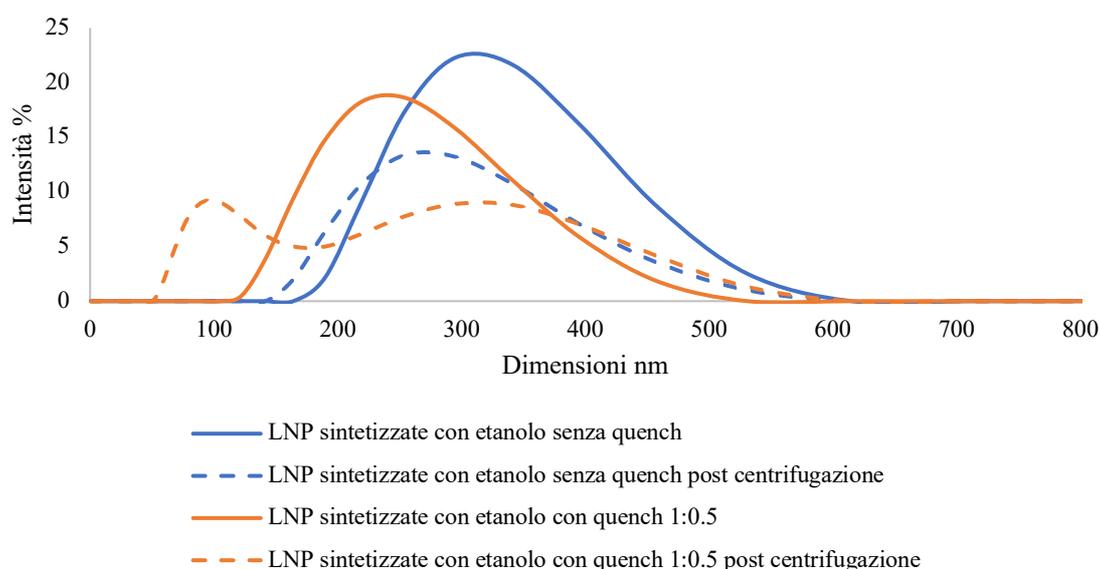


Figura 51: Confronto delle PSD prima e dopo la centrifugazione delle LNP ottenute tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti – Dettaglio di Figura A. 5 nel range delle dimensioni tra 0 e 700 nm

Il potenziale ζ presenta un significativo aumento a seguito della centrifugazione; infatti, come riportato in Tabella 10, è possibile notare che aumenta di circa 4 volte rispetto al valore misurato inizialmente.

Tabella 10: Variazione della carica superficiale prima e dopo la centrifugazione delle nanoparticelle con rapporti di diluizione differenti ottenute con agitatore vortex (30 secondi)

Quench ratio	Potenziale ζ mV	Potenziale ζ mV – Post centrifugazione
LNP senza <i>quench</i>	7.01	27.3
LNP con <i>quench</i> 1:0.5	5.6	28.4

Dalle prove preliminari effettuate studiando *quench* e centrifugazione è emerso che non è possibile ottenere particelle più piccole e poi riuscire a farle precipitare. Per questo motivo è necessario definire una scala di priorità tra la dimensione e la separazione del surnatante.

In questo lavoro di Tesi l'obiettivo principale è quello di riuscire a poter valutare l'efficienza di incapsulamento di RNA per cui è fondamentale riuscire ad eseguire una buona centrifugazione in modo tale da analizzare il contenuto di RNA nel surnatante.

4.2.2 Studio dell'effetto della centrifugazione delle nanoparticelle lipidiche prodotte con concentrazione di differenti di lipidi

Come detto in precedenza uno *step* importante è quello della centrifugazione, per cui si è andati a studiare l'effetto nel caso in cui le nanoparticelle venissero sintetizzate con concentrazioni differenti di lipidi. Il valore di riferimento preso dalla letteratura risulta essere 1 mg/mL, ma sono state testate concentrazioni totali pari a 0.5 mg/mL e 2 mg/mL. Le nanoparticelle sintetizzate nel campione con concentrazione inferiore non sono riuscite a precipitare dal momento che la sospensione risultava essere eccessivamente diluita. Per cui, anche se in questo caso non veniva condotto il *quench*, le problematiche che si sono verificate sono risultate analoghe.

Le nanoparticelle sintetizzate con una concentrazione totale di lipidi pari a 2 mg/mL risultano essere soggette a fenomeni di aggregazione e rottura; infatti, si passa da una distribuzione monomodale prima della centrifugazione, ad una distribuzione bimodale a valle della centrifugazione (Figura 52).

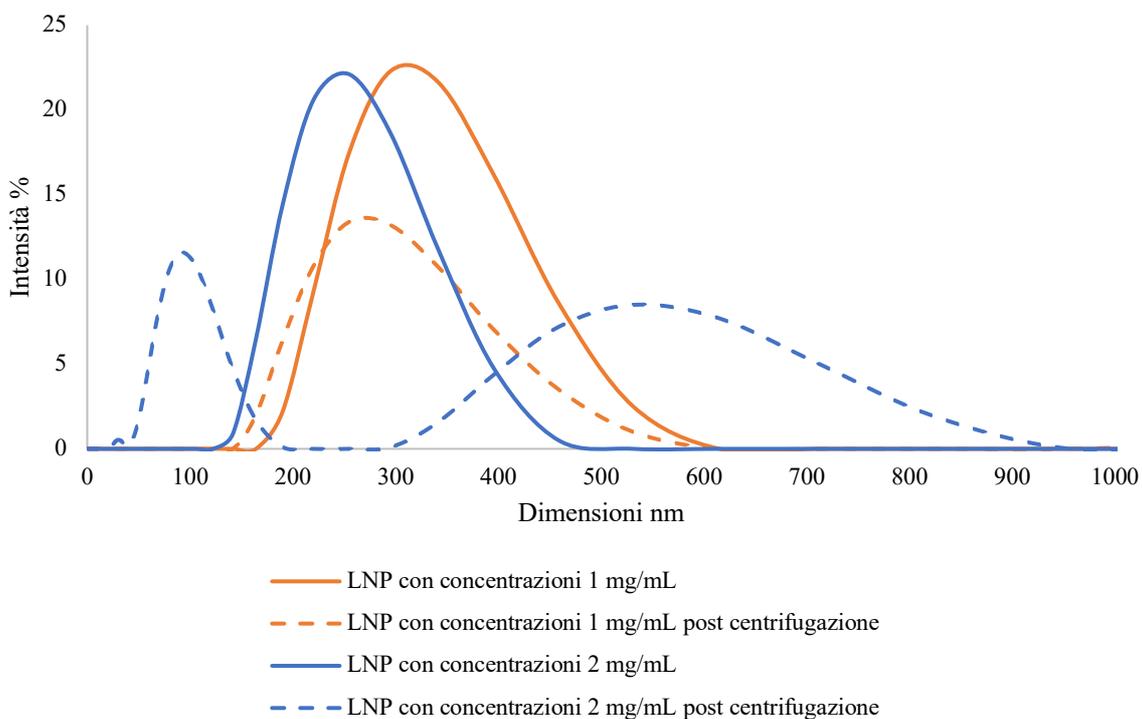


Figura 52: Confronto delle PSD prima e dopo centrifugazione delle LNP sintetizzate con concentrazioni differenti di lipidi tramite vortex (30 secondi) e senza *quench*

Successivamente, si è studiato l'effetto della centrifugazione sulle LNP ottenute con concentrazioni differenti di DODAP: 0%, 20% e 40%. In tutti e tre i casi analizzati le LNP sono precipitate, ma sono diversi gli effetti che si sono verificati. Infatti, le nanoparticelle ottenute in assenza di DODAP hanno subito prevalentemente fenomeni di rottura, per cui le dimensioni risultano essere notevolmente ridotte. Invece, le LNP sintetizzate con concentrazioni di lipide maggiori rispetto a quella base, sono state soggette sia a fenomeni di rottura che di aggregazione (Figura A. 6).

Analogamente al DODAP, è stato studiato l'effetto della centrifugazione anche sulle LNP sintetizzate con concentrazioni differenti di CHOL: 0%, 45%, 90%. La distribuzione delle dimensioni riportata in appendice Figura A. 7 mostra che in tutti i casi si verificano sia dei fenomeni di aggregazione che portano ad un aumento considerevole delle dimensioni delle nanoparticelle lipidiche, sia di rottura. Infatti, la curva di distribuzione delle dimensioni presenta due picchi che stanno proprio ad indicare i due effetti.

A seguito della centrifugazione, la maggior parte delle LNP che nel caso senza colesterolo erano fuori dal range nanometrico si sono rotte e riformate in dimensioni più piccole, infatti si aggirano attorno ad una dimensione di circa 500 nm. Al contrario per quanto riguarda il caso con il colesterolo pari al 90% i fenomeni di aggregazione hanno avuto il sopravvento e le dimensioni sono quasi raddoppiate.

4.2.3 Studio dell'effetto della centrifugazione sulle nanoparticelle lipidiche sintetizzate con terbutanolo

In precedenza è stata descritta la possibilità di adoperare il terbutanolo come alcol di sintesi delle LNP; si è deciso quindi di valutare anche l'effetto della centrifugazione per queste nanoparticelle. Dalla Figura 53 è possibile notare che tutte le nanoparticelle sono state soggette a fenomeni di aggregazione in fase di centrifugazione: quelle che risultano essere soggette alla maggiore variazione sono quelle che hanno subito una diluizione minore, *quench* 1:0.5.

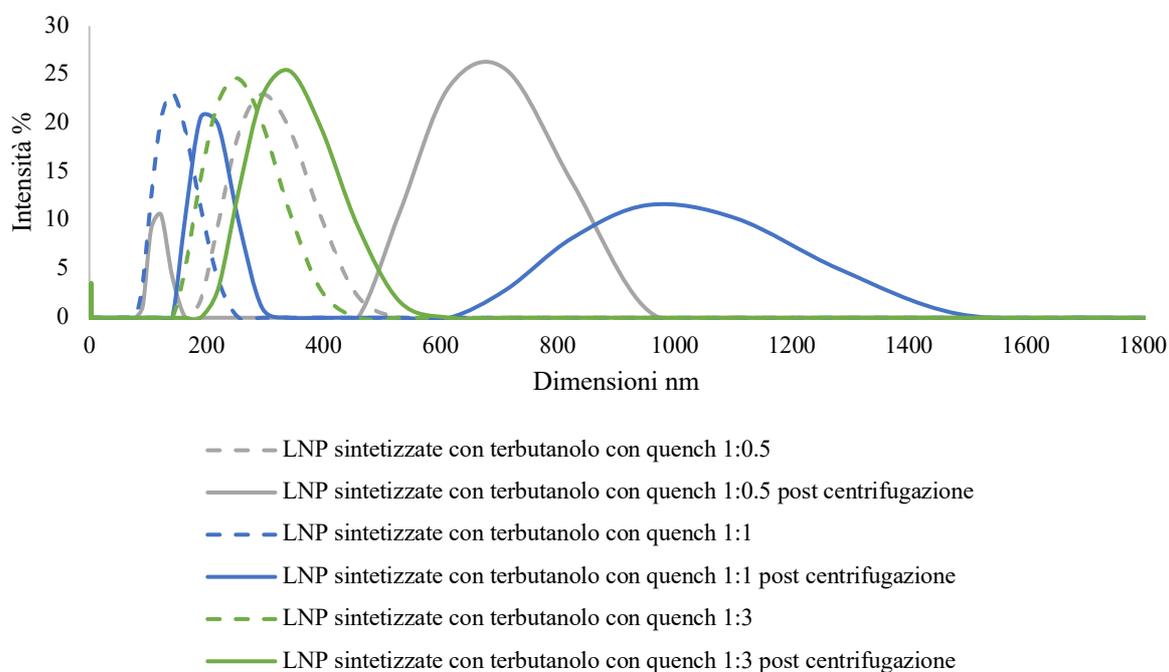


Figura 53: Confronto delle PSD prima e dopo la centrifugazione delle nanoparticelle lipidiche ottenute con terbutanolo tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Al contrario del *quench*, la centrifugazione delle LNP sintetizzate con terbutanolo presenta un effetto differente da quelle con etanolo. Infatti, in questo caso quelle non diluite non precipitano e questo è una caratteristica fondamentale da tenere in considerazione per poi eseguire l'incapsulamento

dell'oligonucleotide. Negli altri casi le distribuzioni delle dimensioni che prima della centrifugazione risultavano essere monomodali, successivamente sono diventate bimodali e soggette ad un aumento delle dei diametri medi. Il caso in cui gli effetti della centrifugazione risultano essere più limitati è quello più diluiti, *quench* 1:3, in cui si è passati da un diametro di 341 nm a 395 nm.

Alla luce dei risultati ottenuti, si è deciso di eseguire la sintesi di LNP con RNA incapsulato con e senza *quench*, in modo tale da valutare se la presenza dell'acido nucleico possa avere effetti sulla precipitazione in centrifuga.

4.2.4 Studio dell'effetto della centrifugazione delle nanoparticelle lipidiche sintetizzate con CIJM

Come descritto in precedenza, i metodi di sintesi possono essere due: Vortex mixer e CIJM. Nei casi precedenti si è deciso di utilizzare sempre il vortex mixer, in funzione dei vantaggi che sono stati descritti nei paragrafi precedenti. In questo caso si è voluto però anche studiare l'effetto della centrifugazione sulle LNP sintetizzate con il CIJM.

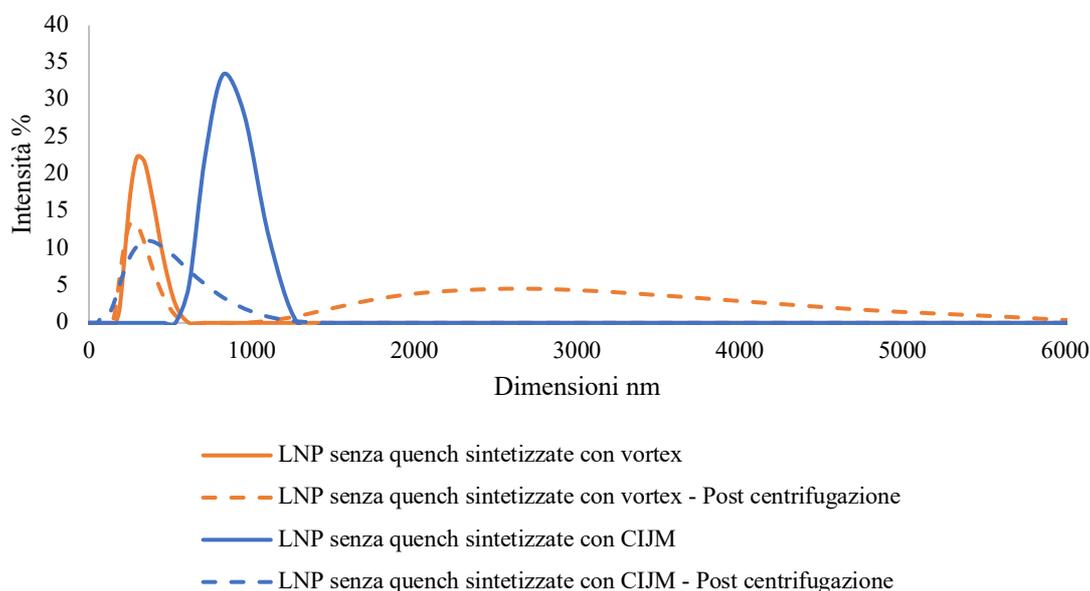


Figura 54: Confronto delle PSD delle LNP prima e dopo centrifugazione sintetizzate con agitatore vortex (30 secondi) e CIJM (36 mL/min) e senza *quench*

Il metodo di miscelazione non risulta avere effetti rilevanti sulla centrifugazione: infatti, se si confrontano le distribuzioni delle dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate con le due differenti vie, si osserva che in entrambi i casi risultano essere monomodali. Inoltre, le uniche LNP che sono riuscite a precipitare sono quelle che sono state sintetizzate senza *quench*, quindi quelle più concentrate.

4.3 La dialisi

Come detto in precedenza, uno *step* necessario in questo processo è quello dell'allontanamento dell'etanolo e una via adottata è quella della centrifugazione che però causa variazioni in termini di dimensioni e carica superficiale. Una via alternativa è quella della dialisi che prevede l'utilizzo di membrane in estere di cellulosa (Float-A-Lyzer G2y) con un cutoff point compreso tra 3.5 e 5 kD.

La dialisi delle nanoparticelle lipidiche è stata effettuata in 20 ore, eseguendo nelle prime 4 ore due lavaggi che prevedevano il cambio dell'acqua in cui veniva eseguita la dialisi e poi un terzo lavaggio è stato eseguito due ore prima della fine del processo. Ad ogni risciacquo veniva prelevata una parte

del volume interno, analizzata al DLS e poi reinserita all'interno della membrana. In questo modo è stato possibile monitorare la presenza delle nanoparticelle e l'effetto della dialisi sulle dimensioni.

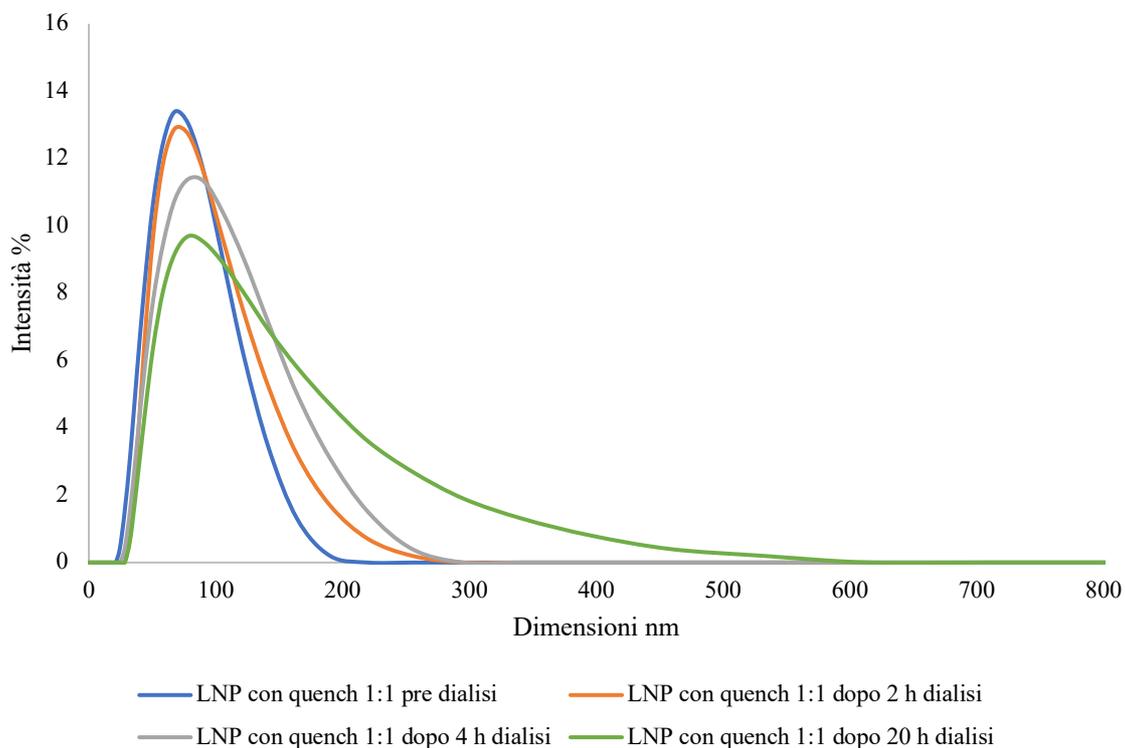


Figura 55: Curve PSD delle nanoparticelle durante le 20 ore di dialisi ottenuta tramite agitatore vortex (30 secondi) con quench pari a 1:1

Sulla base delle curve presenti in Figura 55, è possibile fare un'importante considerazione sulla stabilità di queste nanoparticelle: infatti, pur non essendo presenti degli stabilizzanti, le dimensioni risultano essere non significativamente variabili nel tempo, infatti pur avvenendo delle aggregazioni, la maggior parte delle particelle resta sempre nello stesso range dimensionale.

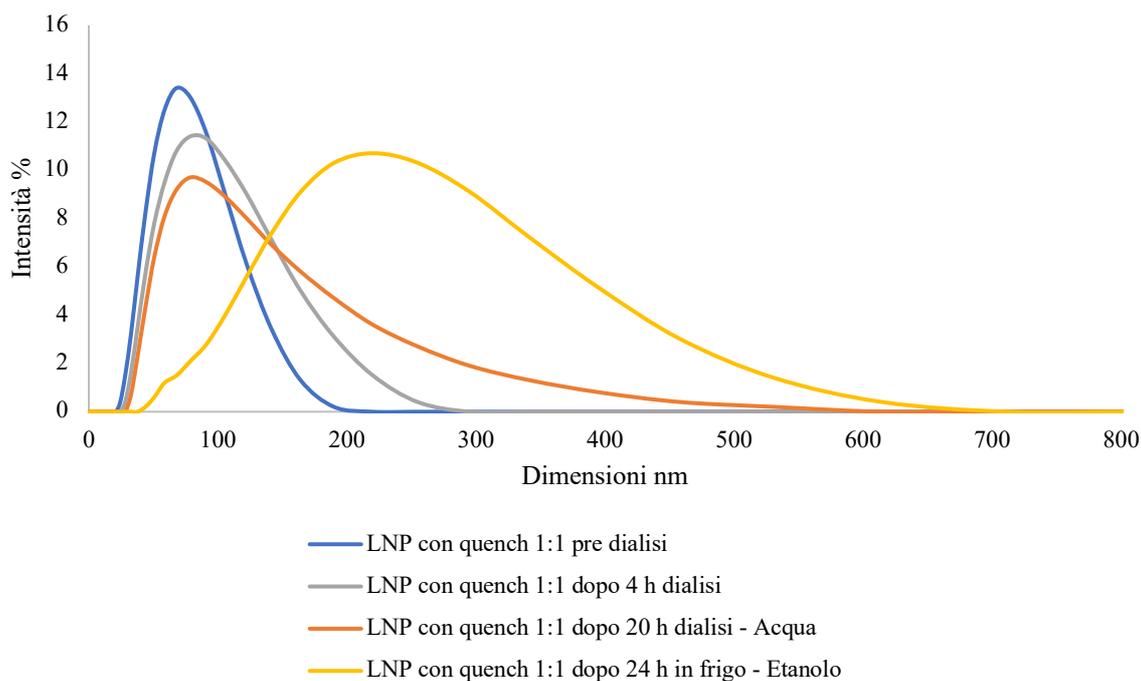


Figura 56: Confronto tra le PSD delle nanoparticelle lipidiche conservate in etanolo e in acqua a seguito della dialisi rispetto alla curva iniziale

Gli aspetti che possono aver principalmente influenzato la stabilità possono essere la dispersione delle nanoparticelle all'interno di un volume grande di acqua che ha sfavorito l'aggregazione. Per studiare questo effetto si è deciso di confrontare in Figura 56 la stabilità delle particelle a seguito della dialisi rispetto a quelle che sono rimaste 24 ore in soluzione alcolica.

Il diametro medio delle nanoparticelle dopo 4 e 20 ore di dialisi risulta rimanere circa costante intorno a 90 nm, tuttavia con il tempo aumenta il numero di NP con dimensioni maggiori di 300 nm. Invece, quelle conservate nella soluzione di sintesi sono soggette ad un aumento delle dimensioni, il diametro medio infatti risulta essere raddoppiato rispetto alle condizioni iniziali, raggiungendo 282 nm. In questo caso è evidente che le LNP risultano essere maggiormente stabili quando viene allontanato l'etanolo e conservate in acqua.

4.3 Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche

4.3.1 Studio dell'effetto del quench sulla stabilità delle nanoparticelle lipidiche

A seguito della sintesi, è stata verificata la stabilità delle nanoparticelle nel tempo, andando a valutare la variazione delle dimensioni. Per queste prove le LNP sono rimaste immerse nella soluzione di sintesi e mantenute in frigorifero per 24 ore.

Dalla Figura 57, è possibile notare che le nanoparticelle che hanno subito un *quench* sono state caratterizzate da fenomeni di aggregazione che hanno prodotto LNP di dimensioni fuori della scala nanometrica.

La stabilità nel tempo delle nanoparticelle centrifugate è stata valutata mantenendole in frigorifero a 4°C per 24 h.

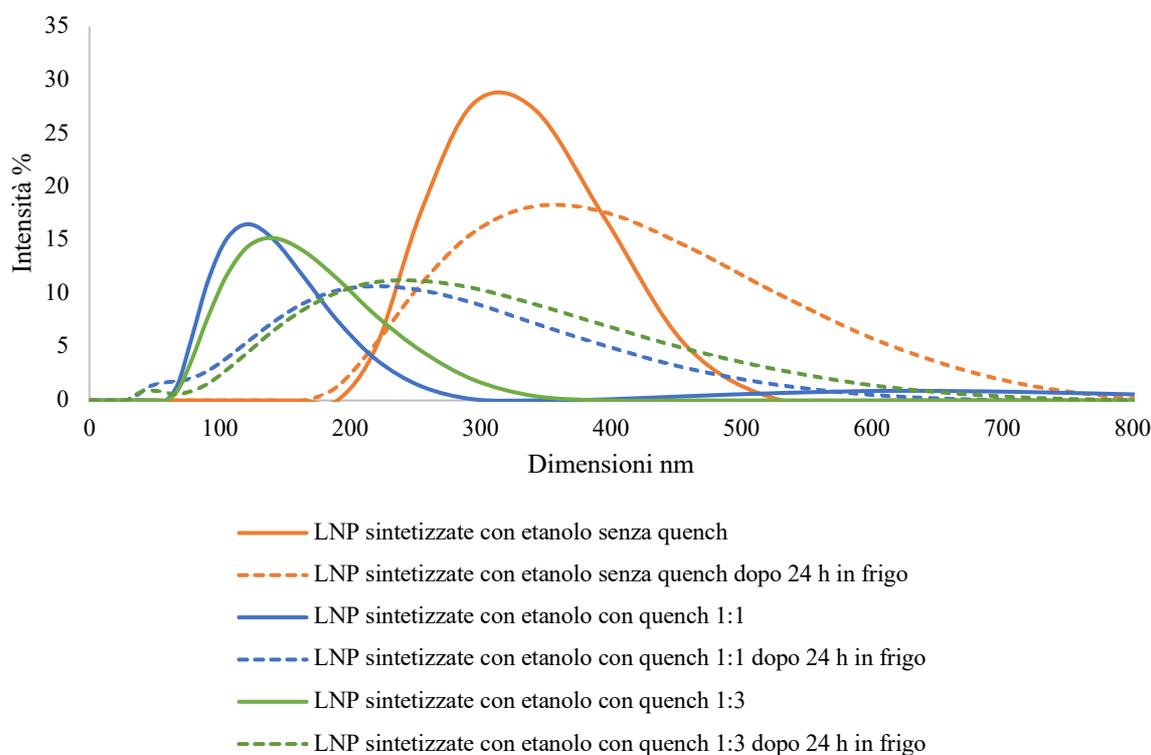


Figura 57: Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche dopo 24 h in frigorifero, ottenute tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Dal grafico di Figura 57 è possibile notare che a distanza di 24 ore dalla sintesi tutte le LNP risultano aumentare le proprie dimensioni, probabilmente a causa dei fenomeni di aggregazione. L'entità della

variazione risulta essere indipendente dalla presenza di *quench* a valle della sintesi. In Tabella 11 sono riportati i diametri medi delle nanoparticelle in funzione del tempo trascorso dalla sintesi e si può notare che la variazione avviene soprattutto nelle prime ore a seguito della sintesi per le NP che non sono state soggette a *quench* e quelle diluite con rapporto 1:1. Infatti, vi è una maggiore differenza tra le prime 6 ore rispetto alle 18 successive. Tuttavia, le nanoparticelle che hanno subito un *quench* 1:3 hanno presentato un aumento del diametro medio più tardi rispetto alle altre.

Tabella 11: Variazione nel tempo delle dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute con agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Ore trascorse dalla sintesi h	Dimensioni delle LNP senza quench nm	Dimensioni medie delle LNP con quench 1:1 nm	Dimensioni medie delle LNP con quench 1:3 nm
0	346	155	173.1
6	370	185	186
24	381	195	225

Il potenziale ζ non presenta variazioni significative con il tempo, non presentando significative variazioni all'interno del range desiderato.

Tabella 12: Variazione nel tempo della carica superficiale delle nanoparticelle ottenute con agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Ore trascorse dalla sintesi h	Potenziale ζ delle LNP senza quench mV	Potenziale ζ delle LNP con quench 1:1 mV	Potenziale ζ delle LNP con quench 1:3 mV
0	7.51	11.6	10.9
6	8.26	10.3	9.71
24	8.95	9.13	8.89

Sono state svolte anche delle valutazioni della stabilità delle nanoparticelle che vengono conservate in acqua anziché nella soluzione acquosa di etanolo in cui vengono sintetizzate. Analogamente ai casi trattati sopra, anche in questo caso avvengono fenomeni di aggregazione che causano un aumento delle dimensioni delle nanoparticelle. Maggiori dettagli sui risultati ottenuti sono riportati in Figura A. 8 e Figura A. 9.

4.3.2 Studio dell'effetto del terbutanolo sulla stabilità delle nanoparticelle lipidiche

Come visto nei precedenti paragrafi, la sintesi delle LNP può essere effettuata utilizzando come solvente per i lipidi il terbutanolo. La stabilità è stata studiata per le nanoparticelle che hanno subito la centrifugazione che sono state poi risospese in acqua e mantenute in frigorifero per 24 h.

Utilizzando questo metodo di sintesi, soltanto le nanoparticelle diluite riuscivano a precipitare, contrariamente a quanto accade per quelle in etanolo, per cui si è studiata la stabilità nel tempo solo di queste.

Da Figura 58 si può notare che le LNP sintetizzate con rapporti di *quench ratio* maggiori (1:3) presentano la minore variazione di dimensione. Negli altri due casi, i fenomeni di aggregazione risultano essere maggiormente significativi. In particolare, aumenta il numero di nanoparticelle che presentano un diametro maggiore di 1000 nm, uscendo così dalla scala dimensionale desiderata ed inoltre la distribuzione non risulta essere omogenea, ma è possibile identificare due picchi.

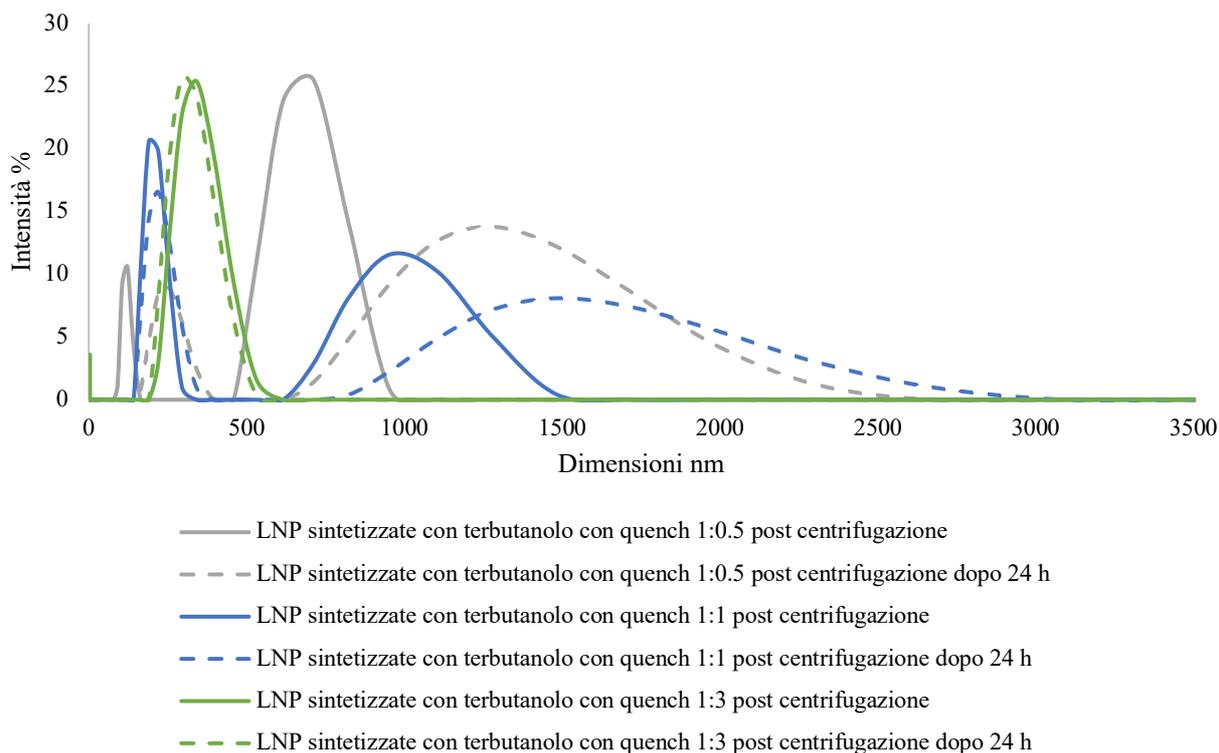


Figura 58: Confronto delle PSD dopo la centrifugazione e trascorse 24 ore in frigorifero delle nanoparticelle lipidiche sintetizzate con terbutanolo tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

4.3.3 Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche sintetizzate con CIJM

Come visto in precedenza, la sintesi può essere eseguita anche con il metodo dei getti collidenti confinati; anche in questo caso si è studiata la stabilità nel tempo delle nanoparticelle lipidiche dopo essere state centrifugate, risospese con acqua e mantenute in frigorifero a 4°C per 24 h.

Analogamente da quanto è emerso nelle prove precedenti, anche per le nanoparticelle sintetizzate con CIJM dopo 24 ore tendono ad aumentare le dimensioni; per cui è possibile concludere che la stabilità nel tempo non risulta essere influenzata dal metodo di sintesi adoperato. Maggiori informazioni vengono fornite in appendice Figura A. 10.

Alla luce dei risultati ottenuti è possibile definire le condizioni ottimali della sintesi da dover adottare nel momento in cui viene incapsulato l'RNA. La *nanoprecipitazione* continua ad essere il metodo impiegato, usando come solvente l'etanolo in cui viene disciolto 1 mg/mL di lipidi: DSPC/CHOL/DODAP/PEG-Cer16 (25/45/20/10, mol/mol/mol/mol). L'antisolvente utilizzato è il *buffer sodium acetate* in cui verrà inserito l'RNA; per tutte le preparazioni è necessario impiegare *water nuclease free*.

A valle della sintesi, non viene eseguito il *quench* e si procede con le operazioni per l'allontanamento dell'etanolo, per cui le nanoparticelle vengono dializzate contro 70 mL di *water nuclease free* per 20 ore seguendo la procedura descritta al punto 2.6.1. Al termine di questo processo le nanoparticelle devono essere sottoposte a due successive centrifugazioni (16000 rpm, 15 minuti, 20°C) così da eliminare eventuali tracce di etanolo dalle nanoparticelle.

Le LNP risospese in *water nuclease free* vengono miscelate con rapporto 1:2 con una soluzione acqua/saccarosio al 12.5% in modo tale da ottenere una concentrazione complessiva di zucchero nel flacone pari a 10%. Infine, vengono poste nel liofilizzatore.

4.4 Sintesi di nanoparticelle lipidiche con RNA

La sintesi delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato segue il medesimo procedimento descritto in precedenza. In questo caso però al *buffer sodium acetate* viene aggiunto l'oligonucleotide in una quantità tale da avere una concentrazione pari a 0.03%, come descritto da Semple (2001).

Alla luce dei risultati ottenuti dalle prove senza RNA, si è deciso di effettuare delle prove che mirassero a studiare l'efficienza di incapsulamento in funzione di questi parametri:

- Il *quench ratio*
- La concentrazione di lipidi
- Il tipo di alcol utilizzato nella sintesi

4.4.1 Studio dell'effetto del quench sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato

In Figura 59, è possibile notare che in termini di distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle non risultano esserci significative variazioni tra quelle con RNA e quelle senza.

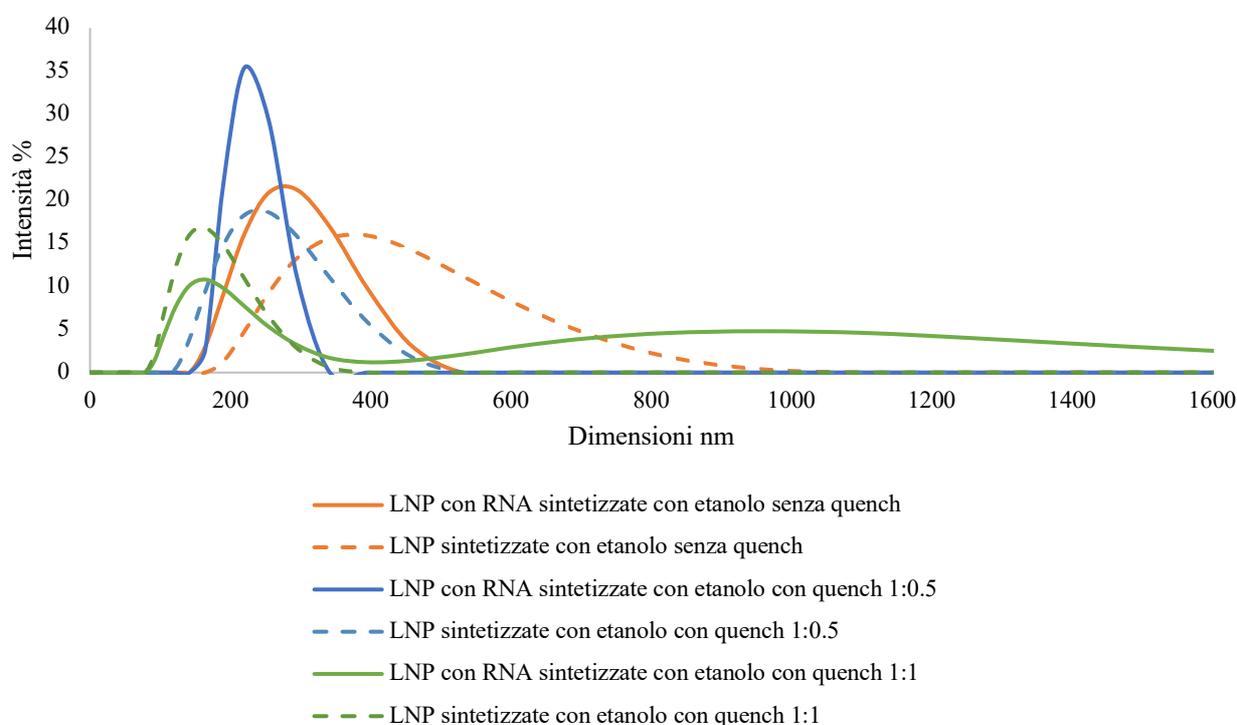


Figura 59: Confronto delle PSD delle LNP con RNA incapsulato e senza sintetizzate tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti – Dettaglio di Figura A. 11

In particolare, come era prevedibile, le nanoparticelle che non sono state soggette a *quench* risultano essere quelle con le dimensioni maggiori rispetto alle altre tuttavia, la presenza di RNA permette di ottenere una distribuzione di LNP in un intervallo di dimensioni minori, infatti si parte da 200 nm e si arriva fino a 600 nm (contro i 1000 nm raggiunti nel caso senza acido nucleico). Sia nel caso appena descritto, che in quelli in cui è stato eseguito il *quench*, il diametro medio risulta essere circa uguale nei due casi, con e senza RNA: circa 350 nm per le nanoparticelle non diluite, 220 nm per quelle con diluizione 1:0.5 e 160 nm per 1:1.

In termini del potenziale ζ , i valori delle cariche superficiali che si ottengono con l'RNA sono riportati nella Tabella 13.

Tabella 13: Variazione della carica superficiale delle nanoparticelle con RNA incapsulato con rapporti di diluizione differenti sintetizzate con agitatore vortex (30 secondi)

	Potenziale ζ senza RNA mV	Potenziale ζ con RNA mV
No quench	7.01	8.93
Rapporto quench 1:0.5	5.6	4.4
Rapporto quench 1:1	5.7	4.3

In Tabella 14, viene riportata l'efficienza di incapsulamento che si è ottenuta nei tre casi analizzati:

Tabella 14: Efficienza di incapsulamento di RNA all'interno di nanoparticelle lipidiche sintetizzate con rapporti di diluizione differenti ottenute con agitatore vortex (30 secondi)

	Efficienza di incapsulamento
No quench	98.67%
Rapporto quench 1:0.5	99.02%
Rapporto quench 1:1	99.61%

4.4.2 Studio dell'effetto della concentrazione di lipidi sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato

Vi è una stretta correlazione tra la concentrazione di lipidi e l'efficienza di incapsulamento. Per questa ragione sono state condotte delle prove dimezzando e raddoppiando la concentrazione di lipidi mantenendo costante la concentrazione di RNA utilizzata. Le prove sono state eseguite senza eseguire nessuna diluizione a valle della sintesi.

In Tabella 15 sono riportati i risultati che sono stati ottenuti. Dai valori è possibile notare che diminuendo la concentrazione di lipidi rispetto a quella di RNA, l'efficienza non risulta essere significativamente influenzata.

Tabella 15: Efficienza di incapsulamento di RNA all'interno di nanoparticelle lipidiche sintetizzate con rapporti differenti lipidi/RNA sintetizzate senza quench e con agitatore vortex (30 secondi)

	Efficienza di incapsulamento	Dimensioni nm
Concentrazione di lipidi 0.5 mg/mL	97.53%	330.3
Concentrazione di lipidi 1 mg/mL	95.73%	364.7
Concentrazione di lipidi 2 mg/mL	91.57%	409.5

La quantità di RNA intrappolato risulta essere inversamente proporzionale alla quantità di lipidi che sono presenti in soluzione. Infatti, il caso ottimale risulta essere quello in cui il rapporto tra lipidi e RNA è pari a 1:15. Alla luce dei risultati ottenuti, si è deciso di sottoporre a dialisi e a liofilizzazione i due campioni che hanno riportato i risultati migliori in termini di efficienza di incapsulamento, quindi: 0.5 e 1 mg/mL

Dai risultati raccolti in Figura 60 è possibile evincere che generalmente le nanoparticelle che intrappolano RNA risultano essere più piccole rispetto a quelle senza acido nucleico, infatti i diametri medi risultano essere circa la metà degli altri. Inoltre, aumentando la concentrazione di lipidi totali anche le dimensioni aumentano: il diametro medio minore si ottiene con 0.5 mg/mL e corrisponde a 330 nm.

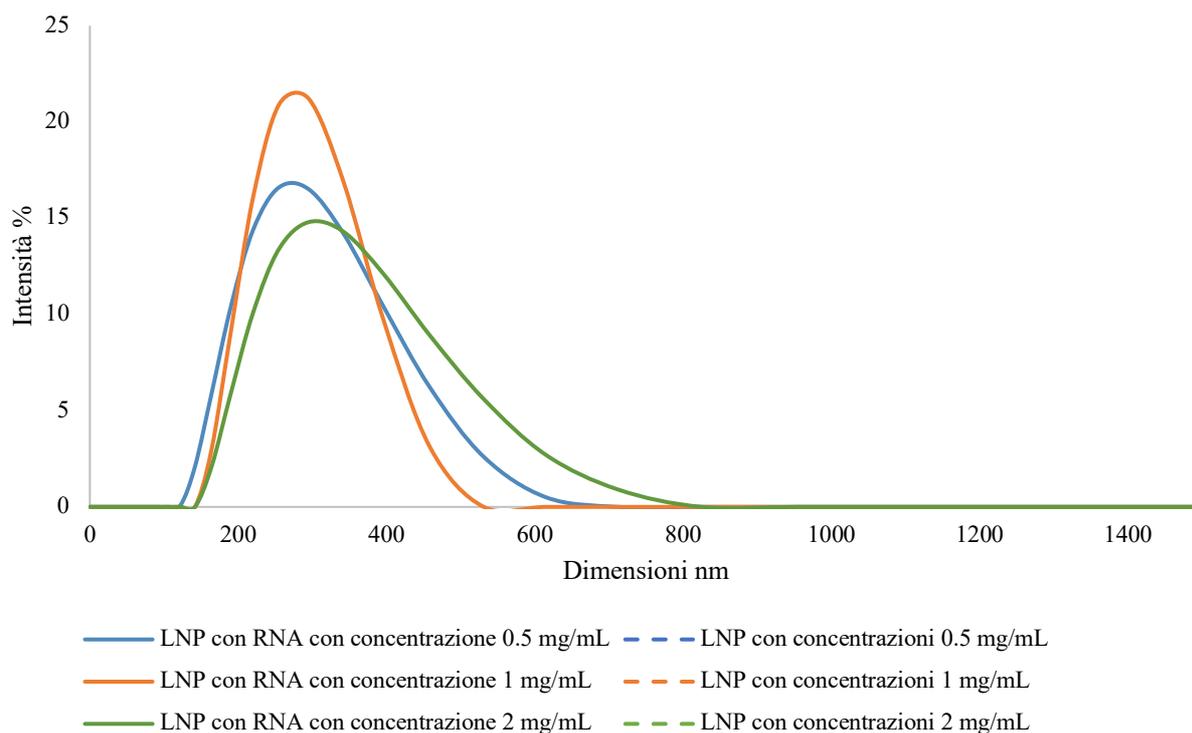


Figura 60: Confronto delle PSD delle LNP con RNA incapsulato e senza sintetizzate con concentrazioni differenti di lipidi tramite vortex (30 secondi) e senza quench

Nelle prove preliminari era stato analizzato anche l'effetto della variazione della concentrazione di DODAP (1,2-Dioleoyl-3-dimethylammonium-propane) sulle nanoparticelle lipidiche; è stata ripetuta la prova anche con l'RNA, ma in questo caso sono stati indagati unicamente i casi con il 20% (caso base) e il 40% del lipide.

L'efficienza di incapsulamento è mostrata in Tabella 16.

Tabella 16: Efficienza di incapsulamento di RNA all'interno di nanoparticelle lipidiche sintetizzate con concentrazioni differenti di DODAP senza quench e con agitatore vortex (30 secondi)

	Efficienza di incapsulamento	Dimensioni nm
LNP con RNA con concentrazione 40% di DODAP	98.55%	523.4
LNP con RNA con concentrazione 20% di DODAP	98.67%	385.3

I valori riportati in Tabella 16 dimostrano che l'efficienza di incapsulamento non risulta essere particolarmente influenzata dalla concentrazione di DODAP. Inoltre, anche le distribuzioni delle dimensioni non mostrano significative differenze in funzione della presenza o assenza di RNA in fase di sintesi.

L'ultima variabile ad essere investigata analisi è stata la concentrazione di colesterolo all'interno della soluzione alcolica. Nelle prove preliminari, in assenza di RNA, erano state valutate le seguenti concentrazioni di colesterolo: 0%, 45%, 75%, 90%. In queste nuove prove si è deciso di trascurare il caso con il 75% di colesterolo poiché non vi erano significative differenze rispetto al caso base preso come riferimento con il 45% del lipide.

Tabella 17: Efficienza di incapsulamento di RNA all'interno di nanoparticelle lipidiche sintetizzate con concentrazioni differenti di CHOL senza quench e con agitatore vortex (30 secondi)

	Efficienza di incapsulamento %	Dimensioni nm
LNP con RNA con concentrazione 0% di CHOL	95.74%	653.4
LNP con RNA con concentrazione 40% di CHOL	98.67%	1123/5730
LNP con RNA con concentrazione 90% di CHOL	98.51%	2000

L'assenza di colesterolo riduce significativamente l'efficienza di incapsulamento, una ragione è legata alla differente distribuzione di cariche sulla superficie della nanoparticella. Infatti, uno dei principali ruoli del colesterolo è quello di organizzare la struttura della parete cellulare, andando a mancare il colesterolo questa tenderà ad essere più disordinata. Inoltre, dal confronto delle distribuzioni delle dimensioni è possibile notare che le nanoparticelle sintetizzate con concentrazioni differenti da quella di riferimento risultano essere soggette a fenomeni di aggregazione che tendono a far aumentare le dimensioni delle nanoparticelle fino ad uscire dalla scala nanometrica. In Tabella 17 sono riportati i valori dei diametri medi ottenuti e si può notare che nel caso del 40 % di colesterolo si hanno due grandezze poiché la curva ottenuta risulta essere bimodale.

A seguito della centrifugazione, le dimensioni delle nanoparticelle risultano uniformarsi su valori più bassi è questo è dovuto soprattutto ai fenomeni di rottura che possono avvenire. Maggiori dettagli vengono forniti in Figura A. 12 e Figura A. 13.

4.4.3 Studio dell'effetto del terbutanolo sulla sintesi delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato

Il terbutanolo può essere utilizzato come alternativa all'etanolo; dalle prove preliminari si è visto che è possibile ottenere risultati confrontabili ed in più si ha il vantaggio di poter mantenere questo alcol in fase di liofilizzazione. Per queste ragioni si è deciso di provare ad incapsulare RNA in nanoparticelle lipidiche sintetizzate con terbutanolo, valutando anche l'effetto del *quench* e la stabilità nel tempo.

Tabella 18: Confronto dell'efficienza di incapsulamento di RNA all'interno di nanoparticelle lipidiche sintetizzate con terbutanolo e etanolo - con rapporti di diluizione differenti tramite agitatore vortex (30 secondi)

	Efficienza di incapsulamento - Etanolo	Efficienza di incapsulamento - Terbutanolo
No quench	98.67%	98.73%
Rapporto quench 1:0.5	99.02%	99.30%
Rapporto quench 1:1	99.61%	99.69%

In termini di efficienza di incapsulamento non risultano esserci significative differenze tra la sintesi con etanolo e quella con terbutanolo. Inoltre anche il *quench ratio* non risulta influenzare la quantità di RNA intrappolato all'interno delle nanoparticelle lipidiche. Tuttavia, il tipo di alcol impiegato nella sintesi influisce sulla distribuzione delle dimensioni delle LNP. Infatti come si può vedere dalla Figura 61, le nanoparticelle ottenute con il terbutanolo risultano essere meno soggette a fenomeni di aggregazione a valle della sintesi, indipendentemente dalla diluizione utilizzata.

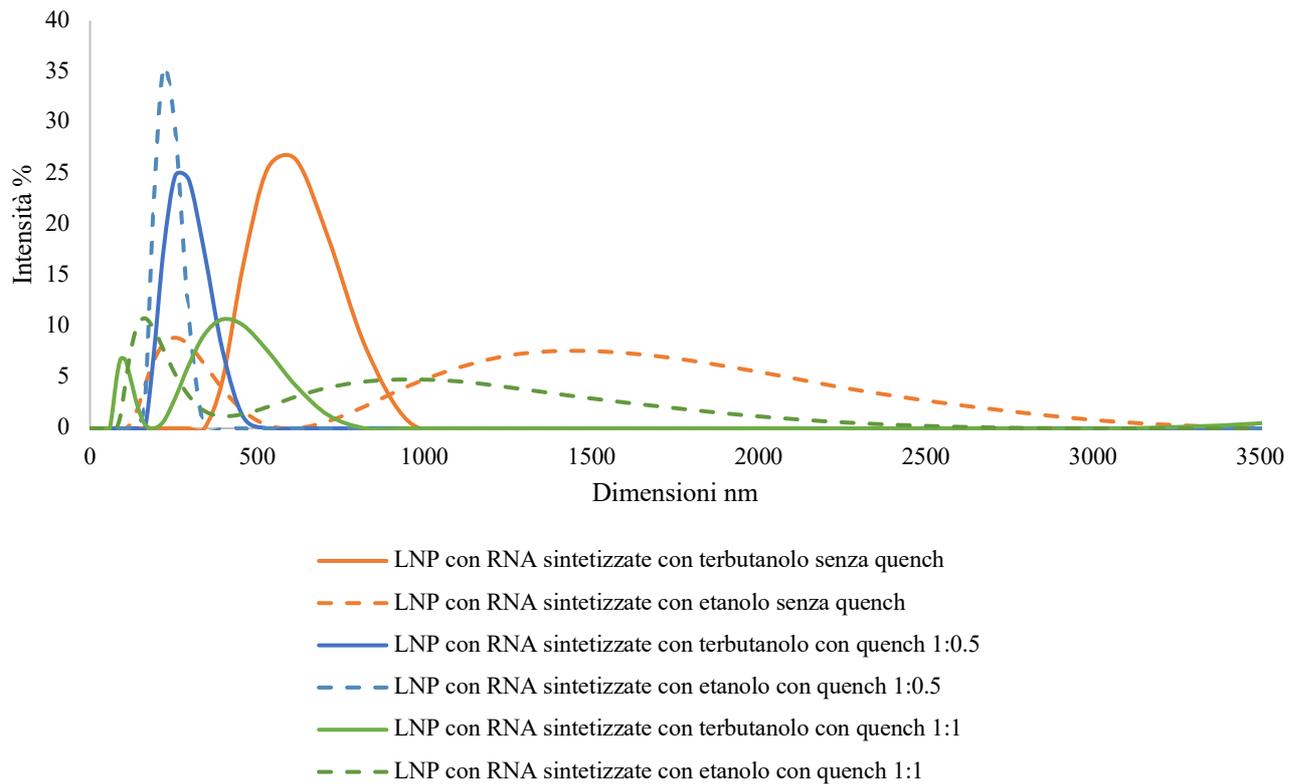


Figura 61: Confronto delle PSD delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato sintetizzate con terbutanolo ed etanolo tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

4.4.4 Studio dell'effetto della centrifugazione delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato

Durante la centrifugazione le nanoparticelle contenenti RNA sono soggette sia a fenomeni di aggregazione che di rottura, che permettono di ottenere una distribuzione monomodale. Infatti, come è possibile vedere dalla Figura 62, la a seguito della centrifugazione non sono presenti più due picchi per i casi senza *quench* e *quench* 1:1, ma uno unico.

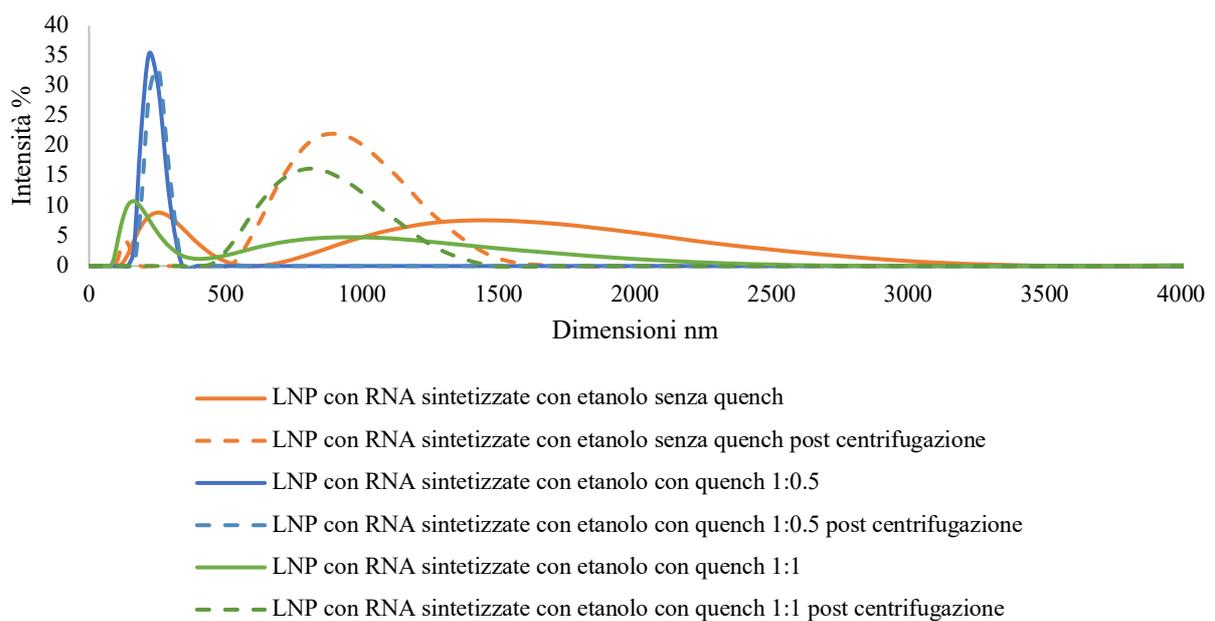


Figura 62: Confronto delle PSD prima e dopo centrifugazione delle LNP con RNA incapsulato sintetizzate tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Dal confronto dei risultati ottenuti con e senza RNA incapsulato è emerso che la presenza dell'oligonucleotide aumenta la tendenza a precipitare delle nanoparticelle. Infatti, studiando il caso delle LNP sintetizzate con etanolo, si può vedere che in questo caso sono precipitate anche quelle hanno subito un *quench ratio* pari a 1:1 a seguito della sintesi. Questo non avveniva nel caso di nanoparticelle vuote. Una possibile spiegazione può essere legata ad un aumento del peso delle nanoparticelle dovuto alla presenza di RNA.

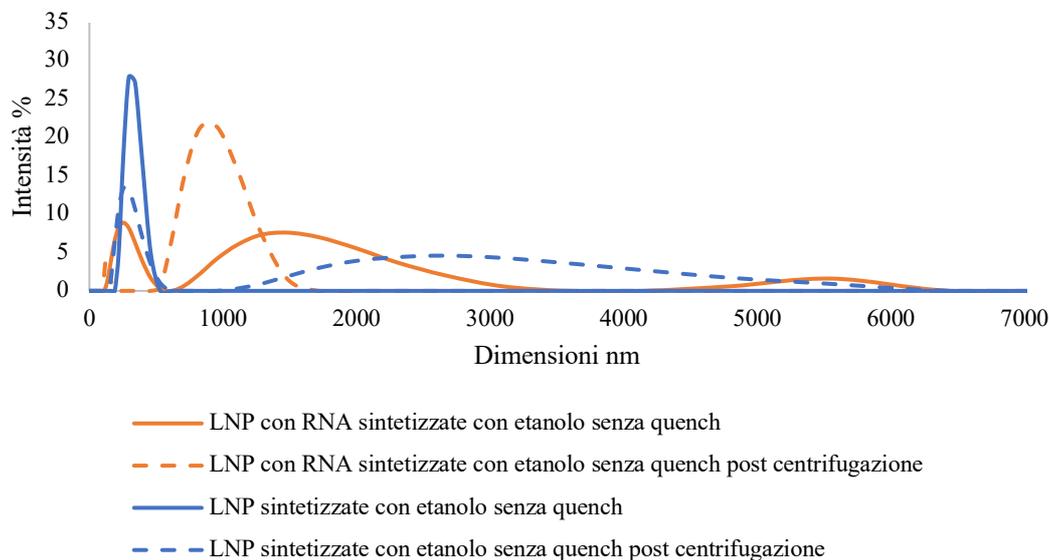


Figura 63 : Confronto PSD dell'effetto della centrifugazione sulle LNP sintetizzate senza quench con vortex (30 secondi) con e senza RNA incapsulato

Dalla Figura 63, è possibile notare che se viene incapsulato RNA, le nanoparticelle passano da una distribuzione monomodale a una bimodale a seguito della centrifugazione. Infatti, studiando la distribuzione delle curve si evince che seppur le dimensioni tendano ad aumentare a seguito della centrifugazione, queste risultano essere all'incirca attorno ai 700 nm.

L'effetto della centrifugazione è stato indagato anche nel caso di nanoparticelle sintetizzate con il terbutanolo. Si verificano nuovamente dei fenomeni di aggregazione e rottura che portano ad uniformare le dimensioni delle nanoparticelle.

Analogamente all'etanolo, anche nel caso del terbutanolo si notano delle differenze; infatti, nelle prove senza RNA le nanoparticelle che precipitavano erano unicamente quelle diluite con acqua. Invece, la presenza dell'oligonucleotide favorisce anche la precipitazione di quelle sintetizzate senza *quench*. In Figura A. 14 vengono riportati maggiori dettagli.

4.4.5 Studio dell'effetto della dialisi delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato

Come detto in precedenza, per effettuare la liofilizzazione delle nanoparticelle lipidiche con RNA è necessario allontanare l'etanolo per cui viene svolta prima una dialisi e poi due lavaggi con centrifugazione.

La dialisi mediante membrane di estere di cellulosa Float-A-Lyzer G2 con un cut off point tra 3.5 e 5 kD, è stata svolta contro 70 mL di *water nuclease free* per 20 ore effettuando dei lavaggi dopo due e quattro ore. Al termine di questo processo le nanoparticelle sono state sottoposte a due successive centrifugazioni così da eliminare eventuali tracce di etanolo dalle nanoparticelle.

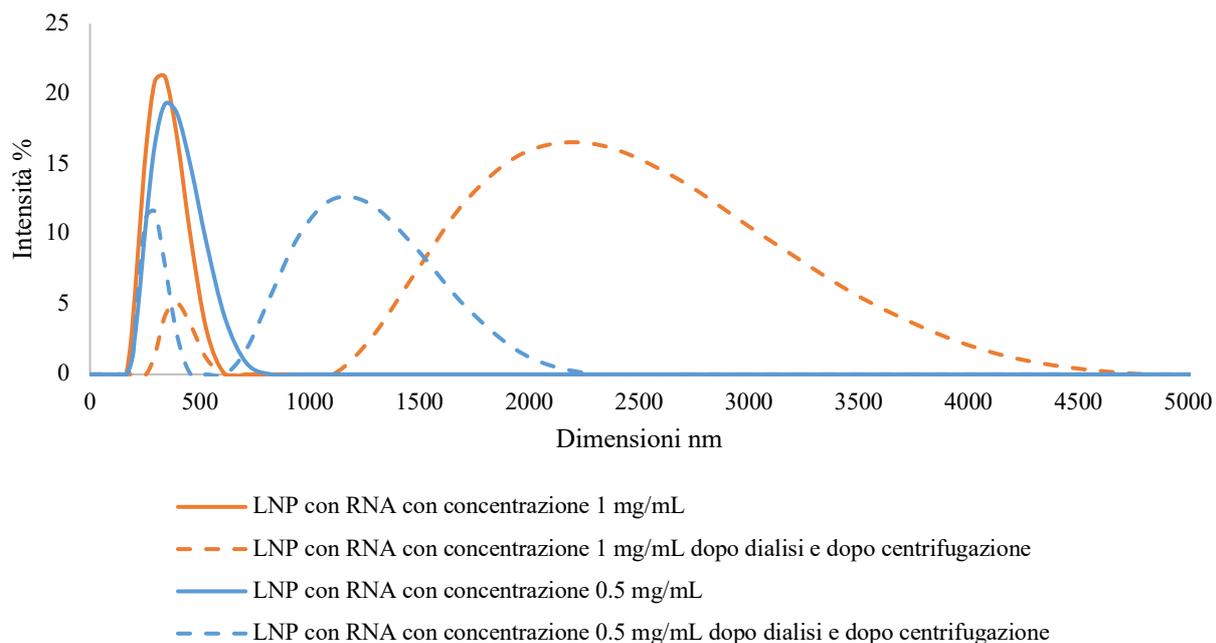


Figura 64: Confronto delle PSD delle LNP con RNA prima e dopo la dialisi e centrifugazione, con concentrazioni differenti di lipidi sintetizzate tramite vortex (30 secondi) e senza quench

Queste operazioni hanno portato ad un significativo aumento delle dimensioni delle nanoparticelle; come si è potuto osservare dai risultati precedenti, si può assumere che l'effetto più rilevante è legato alla centrifugazione.

4.4.6 Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato

Un altro aspetto fondamentale che necessita di essere indagato è quello della stabilità nel tempo. La condizione ottimale per la conservazione è il congelamento, ma per farlo è necessario diluire la sospensione in una soluzione di acqua/saccarosio al 10%. Sono state eseguite delle prove che avevano lo scopo di confrontare gli effetti della conservazione in frigorifero rispetto a quella nel freezer, una volta trascorse 24 ore.

Dalle prove effettuate è emerso che la scelta migliore risulta essere quella di conservare le nanoparticelle in freezer all'interno della soluzione zuccherina. Nell'appendice, Figura A. 15, vengono riportate maggiori informazioni.

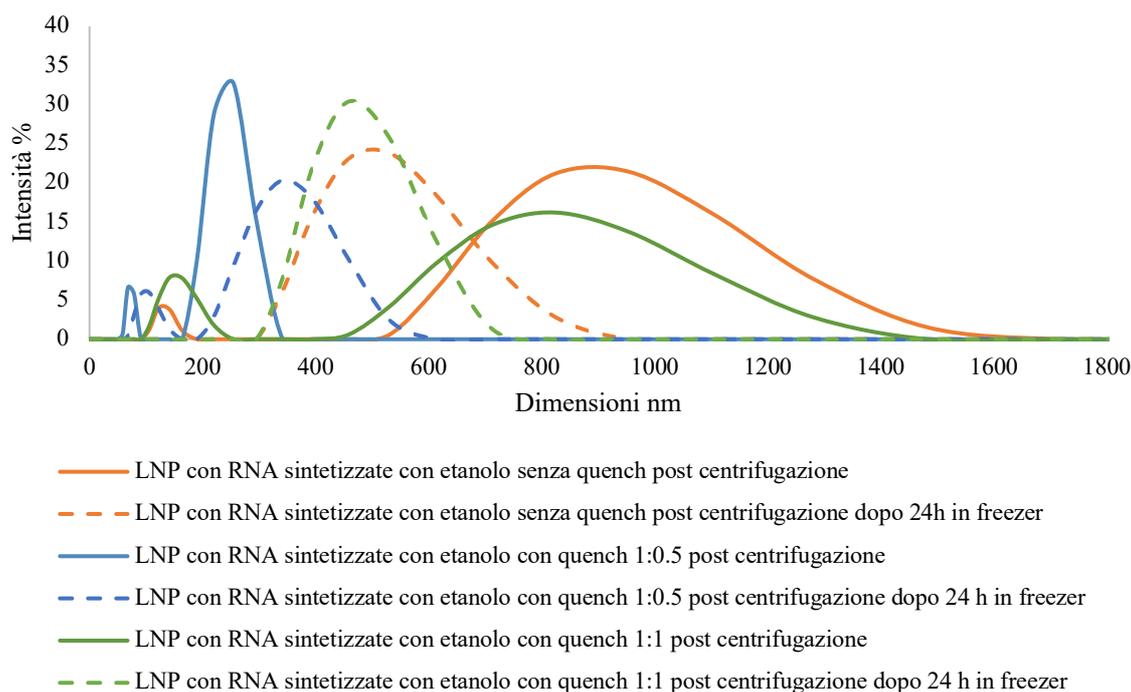


Figura 65: Confronto delle PSD delle LNP con RNA incapsulato post centrifugazione e conservate per 24 ore in freezer (disciolte in una soluzione acqua/saccarosio al 10%) sintetizzate tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Le dimensioni medie delle nanoparticelle a seguito di 24 ore in freezer risultano diminuire, per cui sembrerebbe che avvengano effetti di rottura delle nanocapsule e questo può comportare una perdita di RNA. Per valutare l'entità della perdita, il campione è stato centrifugato e analizzato allo spettrofotometro il surnatante. Dalla lettura a 260 nm è emerso che in media si è verificata una perdita del 9% di RNA incapsulato.

4.4.7 Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato sintetizzate con terbutanolo

La stabilità nel tempo delle LNP sintetizzate con terbutanolo è stata valutata e confrontata con quella di etanolo. Anche in questo caso sono state condotte due prove, la prima che prevedeva di solubilizzare le nanoparticelle in una soluzione acqua/saccarosio al 10% e porla in congelatore, la seconda mantenendo la sospensione di nanoparticelle in frigorifero.

Come già visto in precedenza, il risultato migliore si ha andando a congelare le nanoparticelle nella soluzione zuccherina; maggiori dettagli in Figura A. 16.

In Figura 66, vengono messe a confronto le distribuzioni delle dimensioni delle nanoparticelle dopo la centrifugazione con quelle conservate 24 ore in freezer. Si può notare che la variazione maggiore, in termini di dimensioni, è stata quella delle nanoparticelle ottenute con una diluizione maggiore, invece negli altri due casi le LNP sono rimaste abbastanza stabili nel tempo.

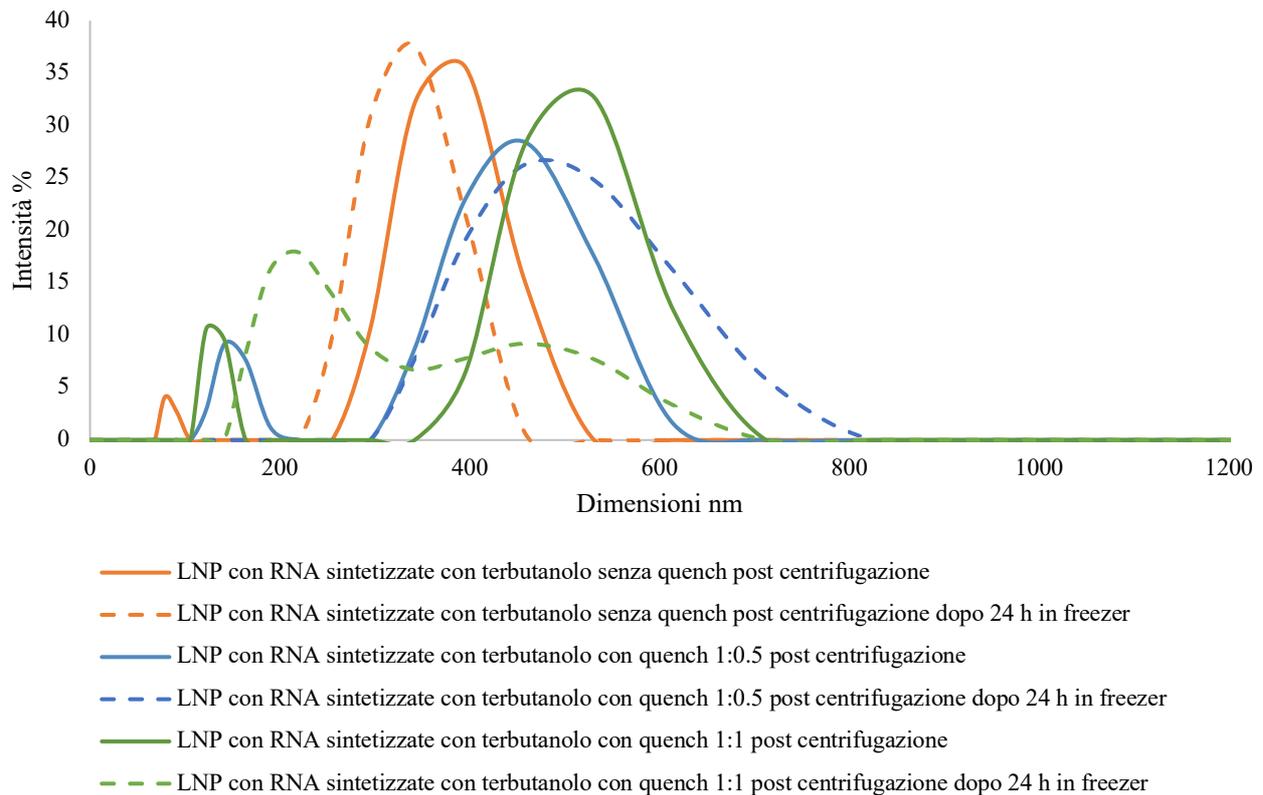


Figura 66: Confronto delle PSD delle LNP con RNA incapsulato post centrifugazione e conservate per 24 ore in freezer (disciolte in una soluzione acqua/saccarosio al 10%) sintetizzate con terbutanolo tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

In Figura 67, si confrontano le dimensioni medie delle nanoparticelle lipidiche ottenute con terbutanolo e etanolo a seguito delle ore trascorse in freezer; è possibile notare che in media quelle con terbutanolo tendono ad aumentare le dimensioni rispetto alle altre.

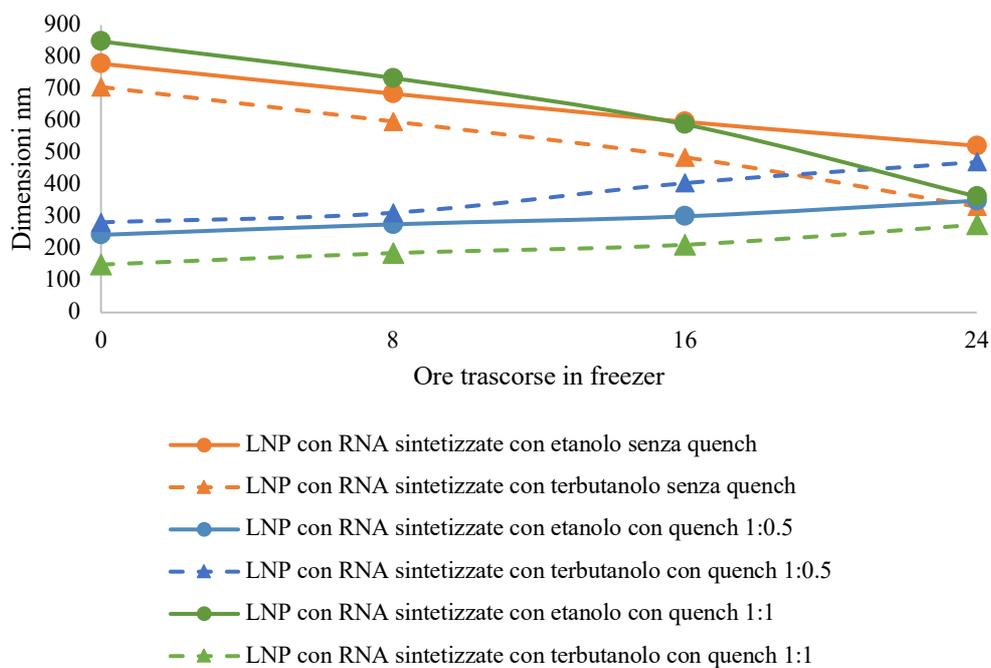


Figura 67: Confronto delle variazioni nel tempo (24 ore) delle dimensioni medie delle nanoparticelle sintetizzate con etanolo e terbutanolo tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

5. Analisi delle prove di liofilizzazione

Per andare a caratterizzare il processo sono state svolte delle prove senza nanoparticelle, per cui è stata effettuata la liofilizzazione di flaconi contenenti una soluzione acquosa di saccarosio al 10% w/v. Lo scopo di queste prove era quello di indagare l'effetto sul processo delle differenti modalità con le quali è possibile condurre il congelamento.

5.1 Congelamento

In Figura 68 vengono confrontati gli andamenti delle temperature nelle fasi di congelamento.

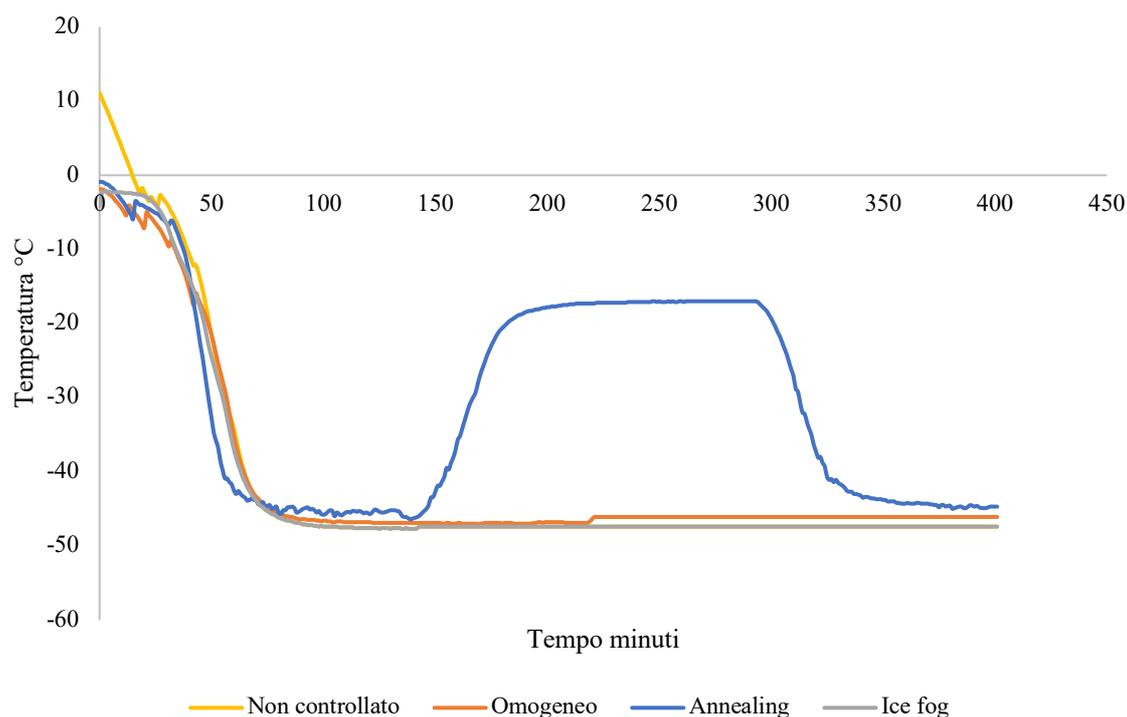


Figura 68: Confronto temperature medie dei campioni nella fase di congelamento

Dal momento che tutte le tecniche di congelamento considerate arrivano alla temperatura desiderata quasi contemporaneamente, si è deciso di procedere con le LNP con il metodo senza controllo. Per cui si è fatto unicamente variare un grado al minuto passando da 20°C a -50°C.

5.2 Essiccamento primario

Una volta trascorso il tempo di congelamento viene eseguito l'essiccamento primario sottovuoto portando la camera da -50°C a -10°C alla pressione di 60 mTorr. Come detto in precedenza, per considerare conclusa questa fase è necessario prendere visione dell'andamento della curva di pressione del sensore Pirani. Una volta raggiunta la pressione di obiettivo allora si può considerare concluso l'essiccamento primario.

In Figura 69 e Figura 70 vengono riportati rispettivamente gli andamenti delle temperature medie del prodotto e della pressione in camera durante la fase di essiccamento primario. Vengono poste a confronto le curve ottenute seguendo differenti vie di congelamento, ma impiegando la medesima tecnica di essiccamento.

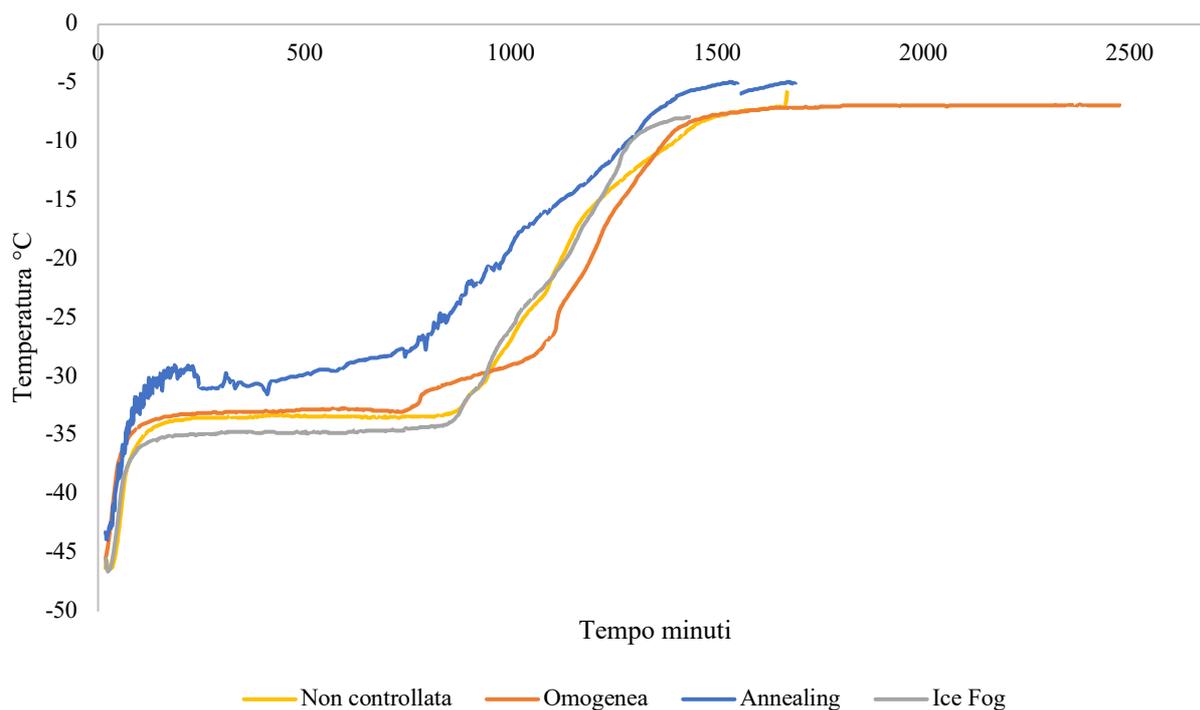


Figura 69: Confronto temperature medie dei campioni nella fase di essiccamento primario

Dai grafici ottenuti si evince che sia dal punto di vista delle temperature che da quello della pressione, i diversi metodi di congelamento non influenzano in modo significativo la fase di essiccamento primario. Per cui la morfologia della nucleazione risulta essere non influenzata, nell'apparecchiatura considerata, da come avviene la fase di congelamento.

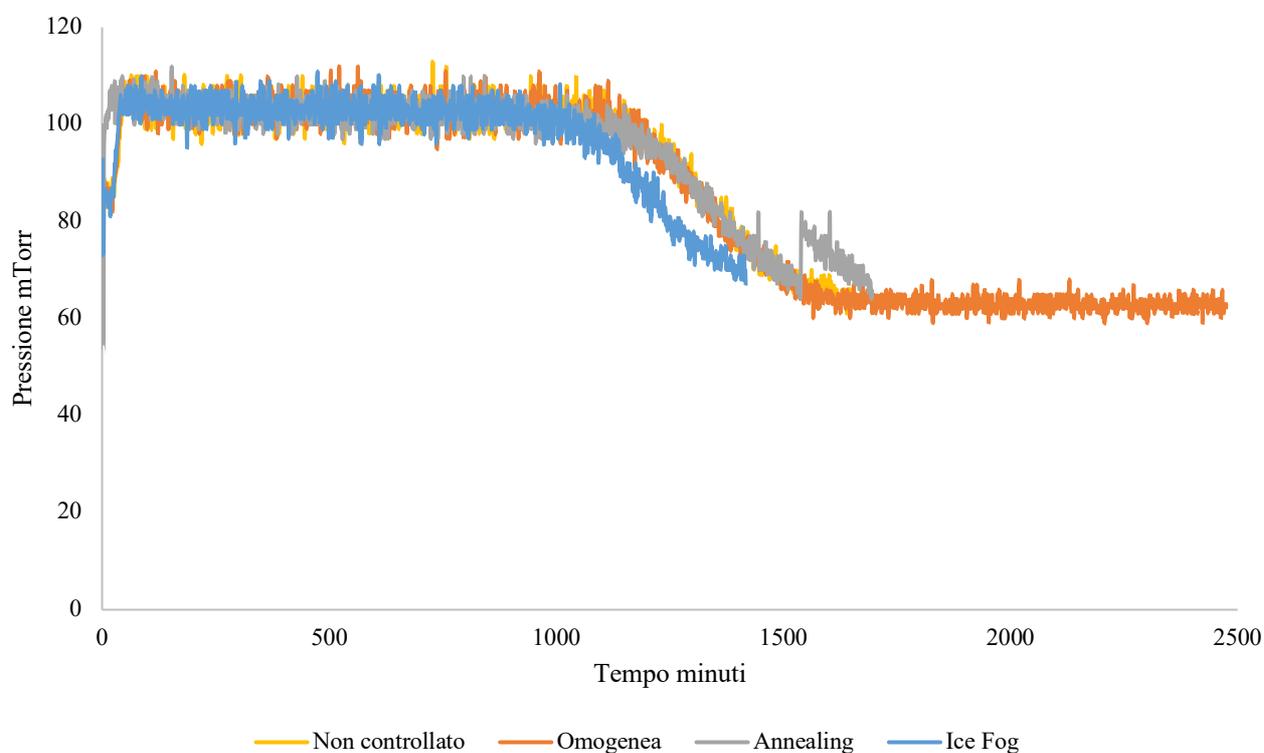


Figura 70: Confronto dell'andamento della pressione nel tempo durante la fase di essiccamento primario

5.3 Liofilizzazione di nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato

Alla luce dei risultati ottenuti si è deciso di procedere con la liofilizzazione delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato eseguendo un congelamento non controllato e poi un essiccamento a -10°C a 60 mT.

Prima di eseguire queste operazioni è necessario preparare le LNP al processo, per cui a valle della dialisi e dei due lavaggi in centrifuga, queste vengono risospese in *water nuclease free*. Successivamente vengono miscelate con rapporto 1:2 con una soluzione acqua/saccarosio al 12.5% in modo tale da ottenere una concentrazione complessiva di zucchero pari a 10% all'interno del flacone.

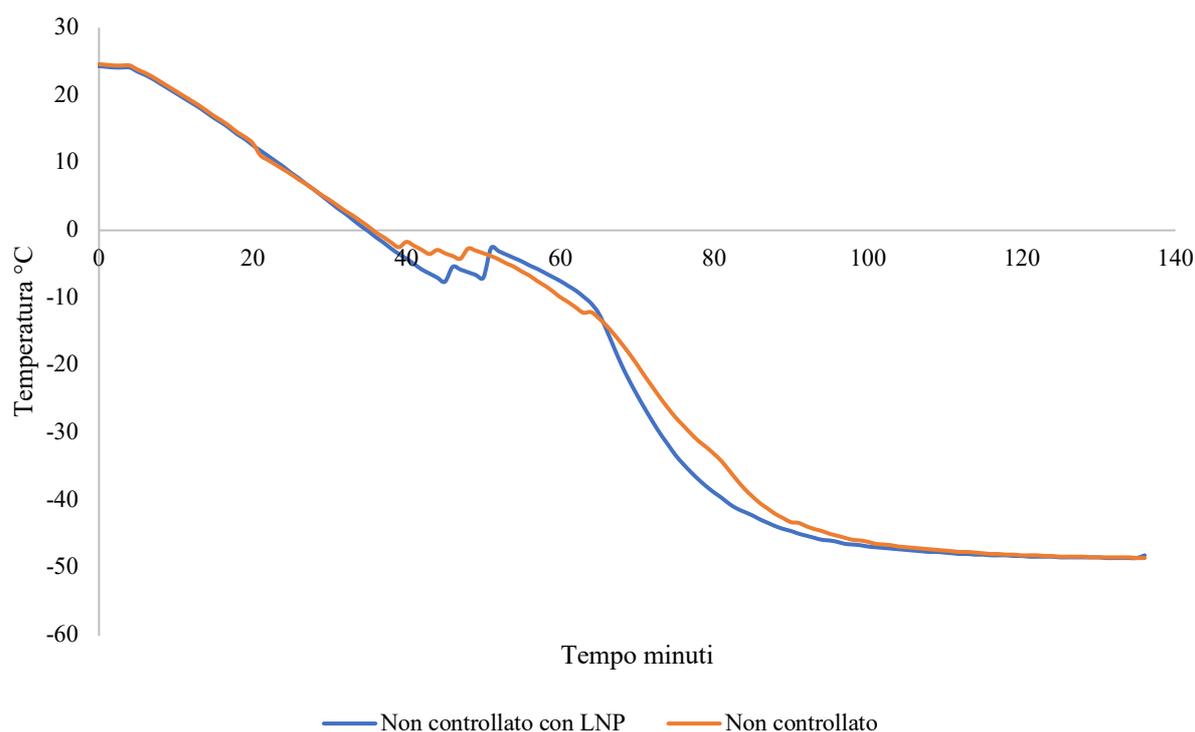


Figura 71: Confronto tra gli andamenti delle temperature nella fase di congelamento nel caso con LNP e senza

Dopo circa due ore e mezza questa fase risulta essere terminata e si procede con l'essiccamento primario. Anche in questo caso la temperatura viene cambiata all'incirca un grado al minuto facendola variare da -50°C a -10°C . L'operazione viene eseguita sottovuoto e si fa diminuire la pressione fino a 60 mT.

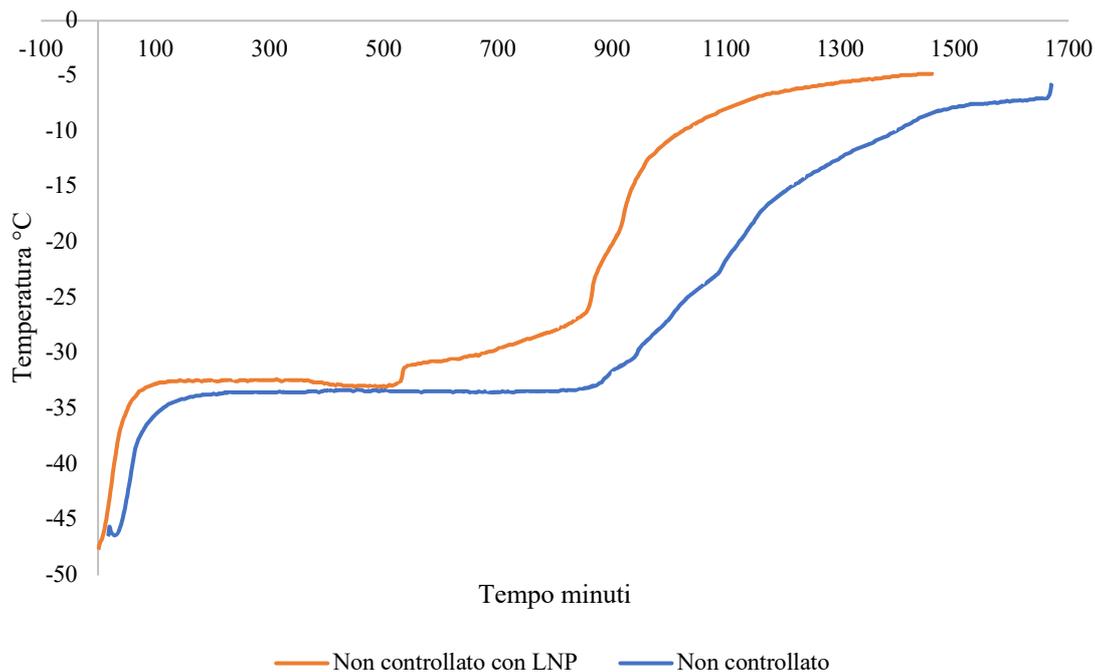


Figura 72: Confronto tra gli andamenti delle temperature nella fase di essiccamento primario nel caso con LNP e senza.

Dalle curve riportate in Figura 72 e Figura 73 è possibile notare che nella prova in cui sono state liofilizzate le nanoparticelle lipidiche l'essiccamento primario risulta concludersi prima.

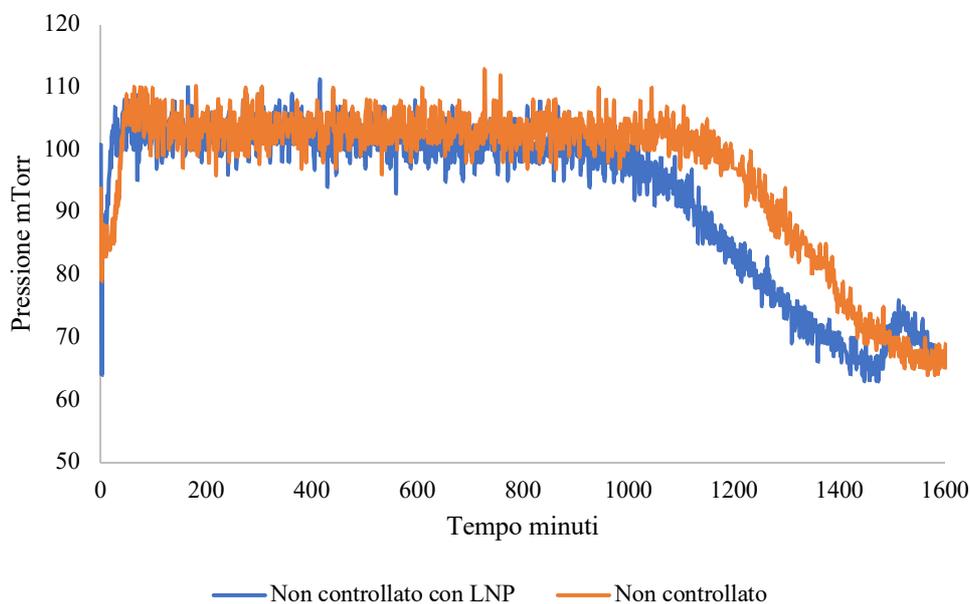


Figura 73: Confronto tra gli andamenti delle pressioni nella fase di essiccamento primario e secondario nel caso con LNP e senza.

Dopo circa 23 ore è stato eseguito l'essiccamento secondario, sempre sottovuoto, che ha permesso di portare la camera da -10°C a 20°C così da estrarre i flaconi.

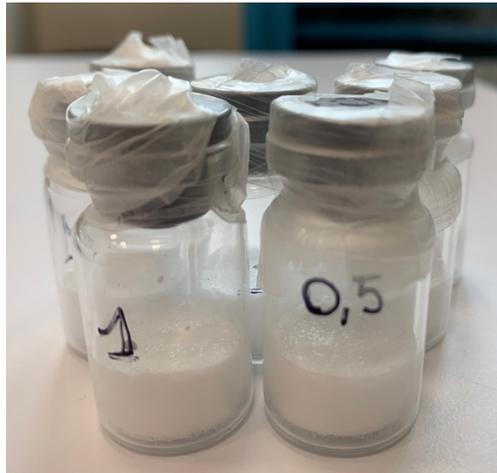


Figura 74: Flaconi contenenti la sospensione di LNP in soluzione di acqua/saccarosio 12.5% dopo la liofilizzazione

Il contenuto di alcuni è stato risospeso con 1 mL di *water nuclease free* così da effettuare un'analisi al DLS e stimare la dimensione delle nanoparticelle. Inoltre, una parte dei campioni risospesi è stata centrifugata così da far precipitare le LNP ed analizzare il surnatante; lo scopo di quest'operazione era quello di andare a valutare la quantità di RNA persa dalle nanoparticelle durante la liofilizzazione.

Tabella 19: Percentuale di RNA dalle LNP durante la liofilizzazione

Perdita di RNA dopo liofilizzazione	
0.5 mg/mL	0.99%
1 mg/mL	0.29%

Dai risultati ottenuti si può affermare che risulta essere minima la perdita di oligonucleotidi. Inoltre, un altro risultato confortante viene fornito dall'analisi dimensionale al DLS:

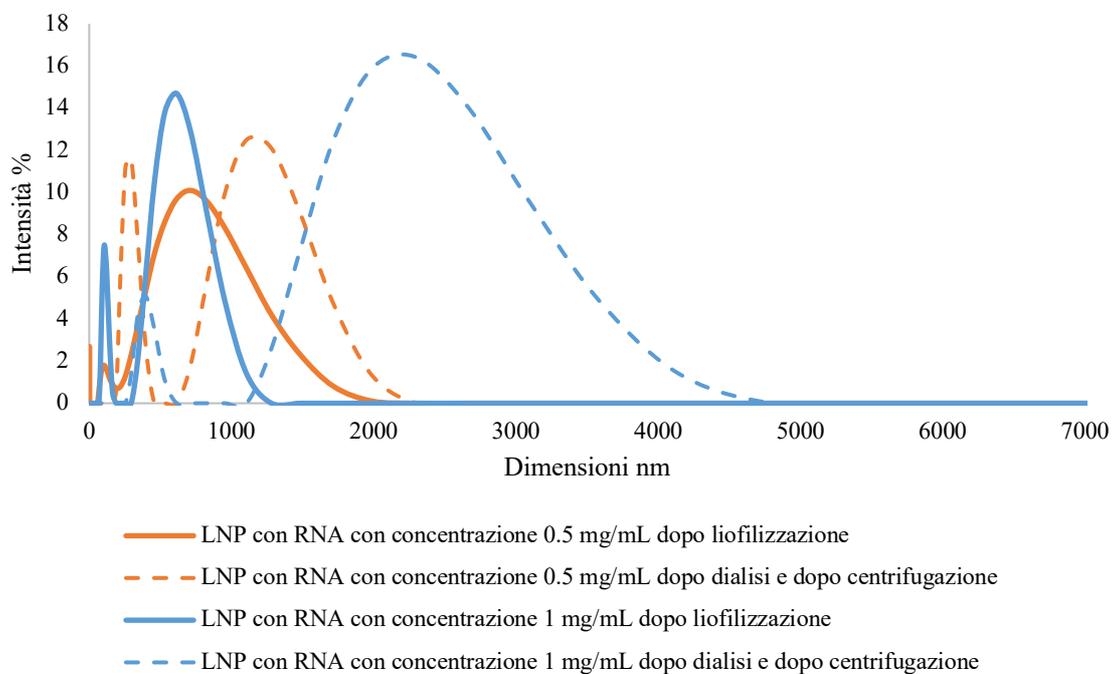


Figura 75: Confronto delle PSD delle LNP con RNA dopo la dialisi e centrifugazione e dopo liofilizzazione, con concentrazioni differenti di lipidi sintetizzate tramite vortex (30 secondi) e senza quench

Infatti, le LNP che si ottengono rientrano nel *range* di dimensioni nanometriche di interesse. Si ripropongono gli andamenti bimodali che si erano già ottenuti a valle della dialisi, tuttavia risultano essere meno accentuati e si vanno a collocare su dimensioni più piccole.

Sono state poste a confronto le curve di distribuzione dimensionali delle nanoparticelle conservate con tecniche differenti (Figura 76).

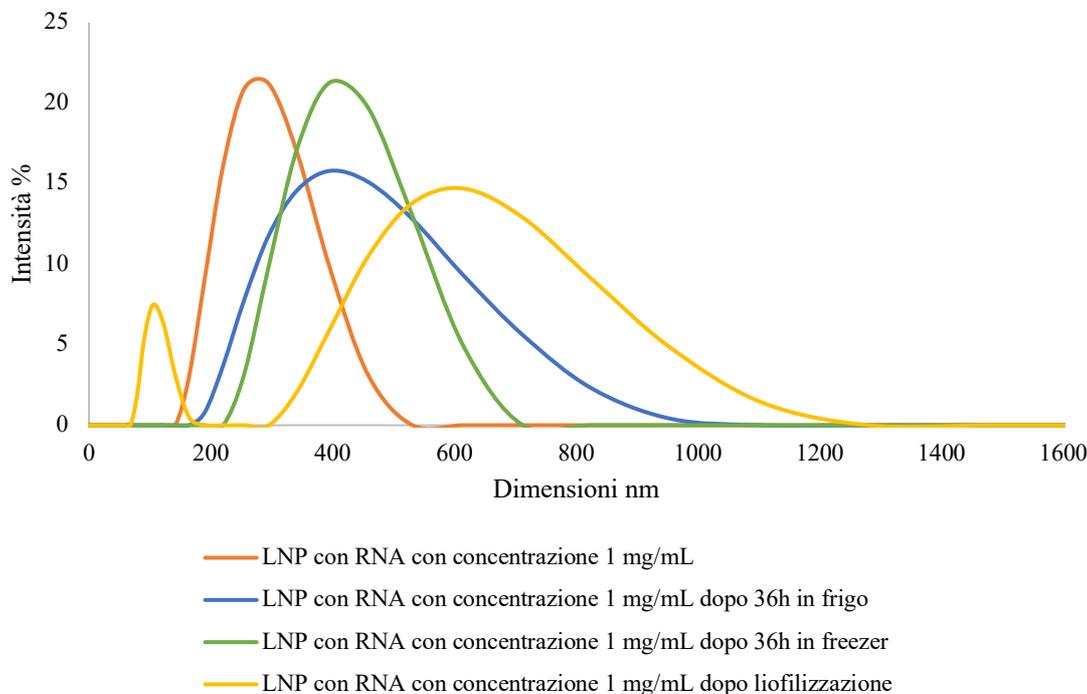


Figura 76: Confronto delle PSD delle LNP con RNA sottoposte a metodi di conservazione differenti – in tutti i casi le LNP sono state miscelate con rapporto 1:2 con soluzioni di acqua e saccarosio al 12.5%

A distanza di 36 ore dalla sintesi, le nanoparticelle che hanno subito una minore alterazione sono quelle conservate in freezer; infatti, la curva mantiene lo stesso andamento monomodale e la dimensione media passa da circa 356 nm a 442 nm, per cui si verifica un aumento di circa il 22%. Negli altri due casi le curve distributive mostrano la presenza di nanoparticelle più grandi e si possono avere LNP con dimensioni raddoppiate rispetto a quelle di sintesi. Perciò, la liofilizzazione comporta un aumento del diametro medio, tuttavia permette di conservare più a lungo le nanoparticelle. A distanza di 5 giorni dalla liofilizzazione, un altro flacone è stato analizzato e i risultati ottenuti sono i medesimi, per cui il sistema è rimasto immutato.

6. Conclusioni

Le nanotecnologie rappresentano l'incontro tra diversi campi di ricerca, tra cui la fisica, la chimica, la biologia e l'ingegneria. Tra le molteplici scoperte effettuate in questo ambito, le nanoparticelle ricoprono un ruolo di rilievo, in particolare per quanto riguarda le innovazioni biomediche. Grazie alle dimensioni caratteristiche e alle proprietà chimico fisiche, le nanoparticelle possono essere impiegate come *nanocarriers*, in particolare per la veicolazione di farmaci contenenti RNA. Nell'ultimo anno, la ricerca in questo campo ha compiuto un grande passo in avanti dal momento che le nanoparticelle sono state scelte come mezzo per veicolare mRNA per i vaccini contro SARS-CoV-2.

In questo lavoro di Tesi, è stato studiato il processo di sintesi di nanoparticelle mediante nanoprecipitazione, prima considerando nanoparticelle lipidiche (LPN) e poi nanoparticelle di chitosano, usando due sistemi: l'agitatore Vortex e il Confined Impinging Jets Mixer (CIJM). Per entrambe le tipologie di nanoparticelle, sono state eseguite prima delle prove preliminari senza RNA, così da mettere a punto una procedura operativa che potesse essere seguita in fase di incapsulamento. Le valutazioni sulle nanoparticelle sintetizzate sono state fatte in termini di dimensione media, polidispersità, carica superficiale e efficienza di incapsulamento mediante *Dynamic Light Scattering* (DLS). L'efficienza di incapsulamento è stata valutata analizzando mediante spettrofotometria UV-vis ($\lambda=260$ nm) il surnatante separato dalle nanoparticelle per centrifugazione.

L'RNA adoperato per l'incapsulamento è stato ottenuto mediante estrazione da cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* mediante l'utilizzo di un kit commerciale "RiboPure™ – Yeast Kit". Questo processo permette di ottenere RNA seguendo diverse fasi: lisi cellulare mediante solventi e sfere di zirconio a cui succede un'estrazione di acidi nucleici dai prodotti della lisi mediante una miscela di fenolo e cloroformio. Una volta effettuata questa separazione, si procede con due purificazioni; la prima mediante un filtro in fibra di vetro che permette di andare ad allontanare tutte le biomolecole che non sono acidi nucleici. La seconda elimina il DNA tramite un trattamento DNasi così da avere solo RNA al termine del processo. In media partendo da una quantità di cellule di *S. cerevisiae* pari a 3×10^8 CFU/mL, la concentrazione di RNA che si estrae è di circa 650 $\mu\text{g/mL}$.

I *nanocarriers* maggiormente studiati in questo lavoro sono LNP: nanoparticelle lipidiche ottenute mediante l'impiego di quattro diversi tipi di lipidi: DODAP, PEG-Cer₁₆, DSCP, CHOL. Il primo, essendo ionizzabile, conferisce carica positiva alla molecola permettendo l'interazione con l'RNA; gli altri hanno principalmente funzioni strutturali e stabilizzanti. Nella letteratura scientifica sono presenti molte procedure per la sintesi e quella impiegata in questo progetto di Tesi, prevede che si utilizzi etanolo come solvente in cui disciogliere di lipidi e *sodium acetate buffer* con RNA come antisolvente. La sintesi delle LNP è stata effettuata andando a indagare l'effetto della tipologia di mixer, della variazione della concentrazione di lipidi, del tipo di solvente e del *quench ratio*, ovvero il rapporto di diluizione finale usato nel processo di sintesi per stabilizzare la nanosospensione prodotta bloccando i fenomeni di crescita e/o aggregazione.

Dai risultati ottenuti è emerso il microreattore che consente di ottenere le dimensioni minori è l'agitatore Vortex, inoltre, questo permette di utilizzare volumi più ridotti di solvente e antisolvente. La concentrazione di lipidi che si è presa come riferimento è 1 mg/mL e per questa è stato poi valutato l'effetto del *quench ratio*: aumentando il rapporto di diluizione diminuiscono le dimensioni medie delle LNP. Tuttavia, questa operazione non è sempre applicabile dal momento che la diluizione ostacola la precipitazione mediante centrifugazione delle nanoparticelle, operazione necessaria se si vuole valutare l'efficienza di incapsulamento di RNA e allontanare il solvente. In secondo luogo, la centrifugazione provoca una variazione significativa delle dimensioni delle LNP, i diametri medi raddoppiano rispetto al valore iniziale. Per questa ragione si è percorsa anche la via della dialisi

mediante membrane di estere di cellulosa Float-A-Lyzer G2 con un cut off point tra 3.5 e 5 kD, questa procedura impiega 20 ore, ma altera di poco le dimensioni. Infatti, come hanno anche dimostrato altre prove, la conservazione delle nanoparticelle in acqua e non nel solvente di sintesi, risulta essere preferibile.

Quindi, le prove preliminari hanno permesso di definire le condizioni di sintesi ottimali per procedere all'incapsulamento di RNA nelle nanoparticelle lipidiche. Queste sono state prodotte con agitatore vortex alla massima velocità per 30 secondi, nella maggior parte dei casi senza effettuare il *quench* per standardizzare nel processo e con un rapporto RNA/lipidi pari a 1:30. Le dimensioni medie che si sono ottenute sono nell'intorno di 350 nm con un potenziale ζ tra 5 e 7 mV. Questo valore positivo di carica indica che l'RNA non è depositato sulla superficie, ma si trova all'interno e l'incapsulamento risulta essere circa del 98%. Sono state eseguite delle prove al fine di andare a valutare la variazione sull'efficienza di incapsulamento in funzione del rapporto tra RNA e lipidi. Dai risultati ottenuti è emerso che aumentando la concentrazione dell'acido nucleico rispetto a quella dei lipidi da 1:30 a 1:15, l'intrappolamento risulta essere migliore del 2%.

Infine, una parte delle LNP con RNA sono state preparate per essere sottoposte al processo di liofilizzazione all'interno del MicroFD. Per prima è stato necessario allontanare tutte le tracce di etanolo per evitare che creasse problemi di sicurezza, per cui è stata svolta la dialisi per 20 ore a cui sono seguiti due lavaggi con la centrifuga. Le LNP risospese in *water nuclease free* vengono così preparate per la liofilizzazione; per cui sono miscelate con rapporto 1:2 con una soluzione acqua/saccarosio al 12.5% in modo tale da ottenere una concentrazione complessiva di zucchero pari a 10%. Il processo di liofilizzazione è stato effettuato eseguendo un congelamento non controllato da 20 °C a -50°C con una velocità pari ad un grado al minuto ed un successivo essiccamento primario da -50°C a -10°C a 60 mTorr. Al termine del processo, una parte dei flaconi è stata risospesa ed analizzata al DLS e allo spettrofotometro; è emerso che il diametro medio, al netto di tutte le operazioni intermedie, è passato da 346 nm a 615 nm, quindi è raddoppiato rispetto a dopo la sintesi. Inoltre, si è valutata la perdita di RNA a valle della liofilizzazione, e questa risulta essere inferiore dell'1%.

Le altre nanoparticelle lipidiche con RNA dopo la sintesi sono state separate dal solvente e miscelate nella stessa soluzione zuccherina utilizzata nella liofilizzazione; queste poi sono state riposte in parte in frigorifero a 4°C e in parte in freezer a -20°C. Dopo 24 ore, le dimensioni sono aumentate di circa il 50%, ma meno rispetto a quelle sottoposte a liofilizzazione. A distanza di 6 giorni dalla sintesi sono state ripetute le analisi, le LNP conservate in frigorifero risultano essersi disgregate e quelle in freezer si sono ingrandite fino ad uscire completamente dalla scala nanometrica, al contrario, le nanoparticelle liofilizzate sono rimaste inalterate.

In questo lavoro di Tesi sono state anche sintetizzate *nanocarriers* di chitosano, biopolimero che si ottiene dall'esoscheletro dei crostacei e risulta essere totalmente biocompatibile e non tossico. Dalle prove preliminari senza RNA è emerso che a parità di *quench*, la sintesi via Vortex portava ad ottenere risultati migliori in termini di dimensioni delle nanoparticelle. Utilizzando una concentrazione di chitosano pari a 0.5 mg/mL, il diametro medio è circa 400 nm e la carica superficiale è nell'intorno di 8 mV. Questo valore risulta aumentare una volta incapsulato l'RNA, infatti si raggiungono i 20 mV; tuttavia, le dimensioni risultano essere ridotte e concentrate su un intervallo più piccolo rispetto al caso senza oligonucleotide. Infatti, senza RNA il range esce dalla nanoscala poiché va da 200 nm a 3500 nm, invece con l'acido nucleico le nanoparticelle si distribuiscono tra i 200 e i 700 nm; l'efficienza di incapsulamento è di circa il 98%.

7. Abbreviazioni

AAV: Adeno-associated virus
Ad: Adenovirus
CFD: Computational Fluid Dynamics
CFU: Colony-forming unit
CHOL: Colesterolo
CIJM: Confined Impinging Jets Mixer
CS: Chitosano
DA: Grado medio di acetilazione
DLS: Dynamic Light Scattering
DODAP: 1,2-dioleil-3-dimetilammonio propano
DOTMA: 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane
EMA: European Medicines Agenc
ESD: Emulsion Solvent Diffusion
HA: Acido Ialuronico
LNP: Lipid Nanoparticles
MEA : Malt Extract Agar
MEB: Malt Extract Broth
mRNA : RNA messaggero
NP: Nanoparticles
ON: Oligonucleotidi
PCL: poli(ϵ -caprolattone)
PEI: poli(etilene immina)
PLGA: poli(lattide-co-glicolidi)
PNP: Polimeric Nanoparticles
PSD: Particle-size distribution
PU: poliuretani
RESS: Rapid Espantion Supercritic Solution
SAS: Supercritic Anti-Solvent
SCF: Supercritical fluid
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SEM: Microscopio a Scansione Elettronica
SLN: Solid- Liquid Nanoparticles

8. Bibliografia

Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S. W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, **8**, article n.102

Aldosari B.N., Alfagih I. M., Almurshedi A. S. (2021). Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics*, **13** (2), article n.206

Alshamsan A. (2014). Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **22** (3), 219-222

Amoabediny G., Haghirsadat F., Naderinezhad S., Helder M. N., Kharanaghi E. A., Arough J. M. (2018) Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **67** (6), 383-400

Aubry J., Ganachaud F., Addad J. C., Cabane B. (2009). Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting: 1. Boundaries. *Langmuir*, **25**, 1970-1979

Barba A. A., Bochicchio S., Dalmoro A., Lamberti G. (2019). Lipid Delivery Systems for Nucleic-Acid-Based-Drugs: From Production to Clinical Applications. *Pharmaceutics*, **11** (8), article n.360

Bilati U., Allémann e., Doelker E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **24** (1), 67-75

Bosco F., (2021). *Appunti del corso di Principi di biotecnologie farmaceutiche*, Politecnico di Torino

Bravo-Anaya L. M., Soltero J. F. A., Rinaudo M. (2016). DNA/chitosan electrostatic complex. *International Journal Biological Macromolecules*, **88**, 345-353

Bucca G., 2019, Uso della liofilizzazione per la conservazione dei liposomi. Tesi di laurea, Politecnico di Torino

Caruso C., 2019, Sintesi di nanoparticelle per veicolare principi attivi. Tesi di laurea, Politecnico di Torino

Chen C., Han D., Cai C., Tang X. (2010). An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release*, **142** (3), 299-311

Chibowski E., Szcześ A. (2016) Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme. *Adsorption*, **22**, 55-765

Conti Dragà S., 2019, Studio del processo di liofilizzazione in un micro-liofilizzatore. Tesi di laurea, Politecnico di Torino

Dong Y., Dai T., Wei Y., Zhang L., Zheng M., Zhou F. (2020). A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**, article n.237

Dutta N. K., Mazumdar K., Gordy J. T. (2020). The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. *Journal of Virology*, **94**, article n.13

EMA, European Medicines Agency, 2020, EMA recommends first COVID-19 vaccine for authorisation in the EU. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-first-covid-19-vaccine-authorisation-eu>

EMA, European Medicines Agency, 2021, EMA recommends COVID-19 Vaccine Moderna for authorisation in the EU. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-covid-19-vaccine-moderna-authorisation-eu>

FDA .a, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2021, Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/pfizer-biontech-covid-19-vaccine>

FDA .b, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2021, Moderna COVID-19 Vaccine. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/moderna-covid-19-vaccine>

Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Ammoury N., Benita S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, **55**, 1-4

Fini A., Orienti I. (2003). The Role of Chitosan in Drug Delivery - Current and Potential Applications. *American Journal of Drug Delivery*, **1**, 43–59

Gavi, E., Marchisio, D.L., Barresi, A.A., Olsen, M.G, Fox, R.O. (2010). Turbulent precipitation in micromixers: CFD simulation and flow field validation. *Chemical Engineering Research and Design*. **88** (9), 1182–1193.

Hassan O. & Chang T. (2017). Chitosan for Eco-friendly Control of Plant Disease. *Asian Journal of Plant Pathology*, **11** (2), 53-70

Jackson L. A., Anderson E. J., Roupheal N. G., Roberts P. C., Makhene M., Coler R. N., McCullough M. P., Chappell J. D., Denison M. R., Stevens L. J., Pruijssers A. J., McDermott A., Flach B., Doria-Rose N. A., Corbett K. S., Morabito K. M., O'Dell S., Schmidt S. D., Swanson P. A., Padilla M., Mascola J. R., Neuzil K. M., Bennett H., Sun W., Peters E., Makowski M., Albert J., Cross K., Buchanan W., Pikaart-Tautges R., Ledgerwood J. E., Graham B. S., Beigel J. H., mRNA-1273 Study Group (2020). An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *The New England Journal Medicine*, **383** (20), 1920-1931

Johnson B. K., Prud'homme R. K. (2003). Chemical processing and micromixing in Confined Impinging Jets. *AIChE Journal*, **49**, 2264-2282

Kumari A., Yadav S. K., Yadav S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **75** (1), 1-18

Lee S.W., Paoletti C., Campisi M-, Osaki T., Adriani G., Kamm R. D., Mattu C., Chionoa V. (2019). MicroRNA delivery through nanoparticles. *Journal Control Release*, **313**, 80-95

Lepletier E., Bourgaux C. & Couvreur P. (2014). Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to Drug Delivery Device. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **71**, 86-97.

Linde S. Witzigmann D., Kulkarni J. A., Verbeked R., Kersten G., Jiskoot W. J., Crommelin D. J. A. (2021). mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, **601**, 120586

- Locatelli E., Franchini M. C. (2012). Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *Journal of Nanoparticles Research*, **14**, 1-17
- Miladi K., Sfar S., Fessi H., Elaissari A. (2015). Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies. *Industrial Crops and Products*, **72**, 24-33
- Morris R. (2015). Spectrophotometry. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, **11** (1), 1-30
- Marchisio, D.L., Rivautella, L., Barresi, A.A. (2006). Design and scale-up of chemical reactors for nanoparticle precipitation. *AIChE Journal*, **52** (5), 1877–1887.
- Nikam A.P., Ratnaparkhiand M.P., Chaudhari S. P. (2014). Nanoparticles – An Overview. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, **3** (5), 121-127
- Pisano R. (2019). Alternative methods of controlling nucleation in freeze drying. *Lyophilization of Pharmaceuticals and Biologicals*, 79-111
- Pisano R., (2021). *Appunti del corso di Principi di biotecnologie farmaceutiche*, Politecnico di Torino
- Prasanthan P., Kishore N. (2019). Combined effect of equimolar osmolytes trehalose and glycine on stability of hen egg-white lysozyme: Quantitative mechanistic aspects. *Journal of molecular liquids*, 278, 477-483
- Quiagen, 2019, RNeasy® Mini Handbook. <https://www.qiagen.com/dk/resources/faq?id=fc31b2a3-f727-4d10-b7cf-444add819597&lang=en>
- Puri A., Loomis K., Smith B., Lee JH., Yavlovich A., Heldman E., Blumenthal R. (2009). Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers. *Concepts to Clinic*, 523-580, [ISSN 0743-486]
- Rivas C. J. M., Tarhini M., Badri W., Miladi K., Greige-Gerges H., Nazari Q.A., Rodríguez S. A. G., Román R. A., Fessia H., Elaissari A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **532** (1), 66-81
- Rawat M., Singh D., Saraf S., Saraf S. (2006). Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **29** (9), 1790-1798
- Reis P. C. Neufeld R. J., Ribeiro A. J., Veiga F. (2006). Nanoencapsulation II. Biomedical Applications and Current Status of Peptide and Protein Nanoparticulate Delivery Systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2**, 53–65
- Sarathi M., Simon M. C., Venkatesan C., Sahul Hameed A. S. (2008). Oral Administration of Bacterially Expressed VP28dsRNA to Protect *Penaeus Monodon* from White Spot Syndrome Virus. *Marine Biotechnology*, **10** (3), 242-249
- Semple S. C., Klimuk S. K., Harasym T. O., Santos N. D., Ansell S. M., Wong K. F., Maurer N., Stark H., Cullis P. R., Hope M. J., Scherrer P. (2001). Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesiclestructures. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1510**, 152-166
- Siew, A. (2013). Controlling Ice Nucleation During the Freezing Step of Lyophilization. *Pharmaceutical Technology*, **37**(5), 36-40

Stark B., Pabst G., Prassl R. (2010). Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **41** (3-4), 546-555

Thompson, T. N. (2013). LyoPAT™: Real-Time Monitoring and Control of the Freezing and Primary Drying stages During Freeze-drying for Improved Product Quality and Reduced Cycle Times. *American Pharmaceutical Review*, **16**

Valente I., Celasco E., Marchisio D.L., Barresi A.A. (2012). Nanoprecipitation in confined impinging jets mixers: Production, characterization and scale-up of pegylated nanospheres and nanocapsules for pharmaceutical use. *Chemical Engineering Science*, **77**, 217-227

Vegeto E., Maggi A., Minghetti P. (2020). *Farmaci biotecnologici - Aspetti farmacologici e clinici*, Zanichelli [ISBN978-88-08-72053-5]

Verbeke R., Lentacker I., Smedt S. C. D., Dewitte H. (2021). The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *Journal of Controlled Release*, **333**, 511-520

Wexler, E., Brower, J. (2015). *New Developments in Controlled Nucleation: VERISEQ Nucleation Technology*. Tratto il giorno 1 Ottobre 2018 da: <http://www.pharmtech.com/new-developments-controlled-nucleation-veriseqnucleation-technology>

Zhang X., Zhang J., Zhu K.Y. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, **19** (5), 683-93

9. Sitografia

[1.a] Sigma Aldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/avanti/890850>

[1.b] Sigma Aldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/avanti/880180P>

[1.c] SigmaAldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/substance/cholesterol3866557885>

[2] Mettler Toledo :

https://www.mt.com/gb/en/home/applications/L1_AutoChem_Applications/L2_Crystallization/Supersaturation_Application

[3] Apex Scientific: <https://www.apexscientific.co.za/resources/yeast-cell-count-at-od600/linear-part-of-yeast-cells-calibration-curve/#main>

Appendice

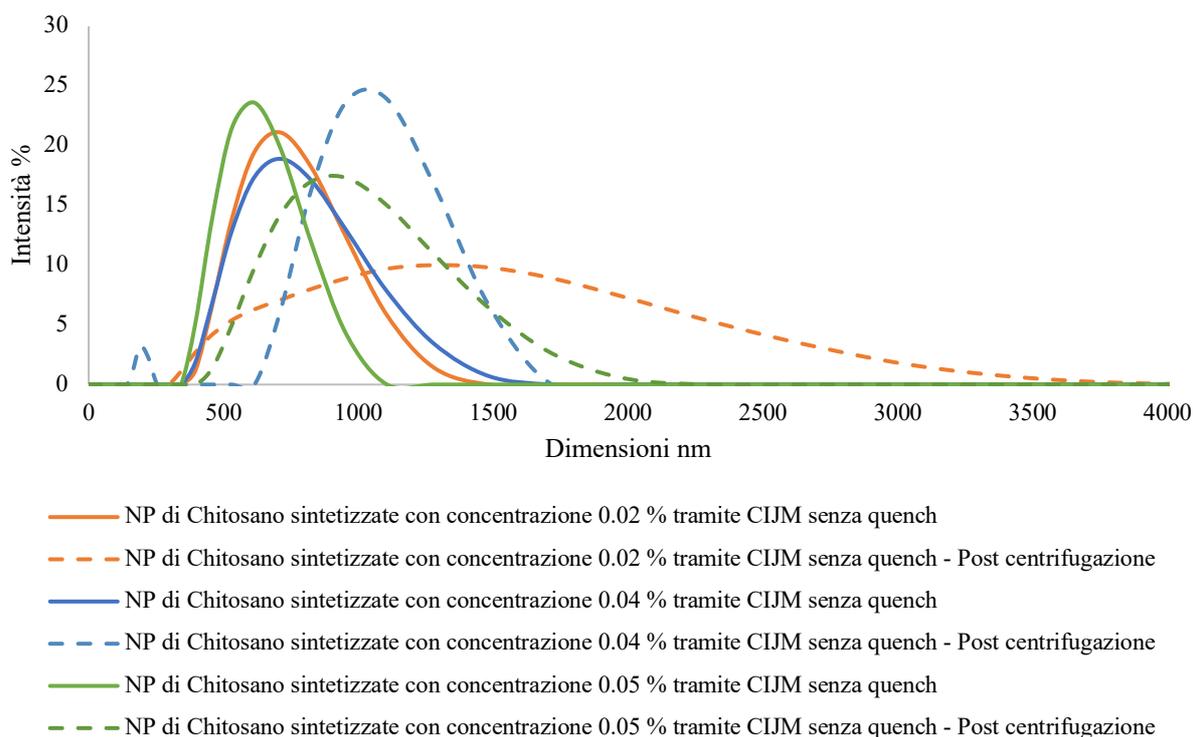


Figura A. 1: Confronto delle PSD prima e dopo centrifugazione delle NP sintetizzate con concentrazioni differenti di chitosano tramite CIJM (36 mL/min) e senza quench

Gli effetti della centrifugazione risultano essere indipendenti dalla concentrazione di chitosano che è presente in soluzione; infatti, in tutti i casi si verificano dei fenomeni di aumento delle dimensioni a seguito di fenomeni di aggregazione durante l'operazione.

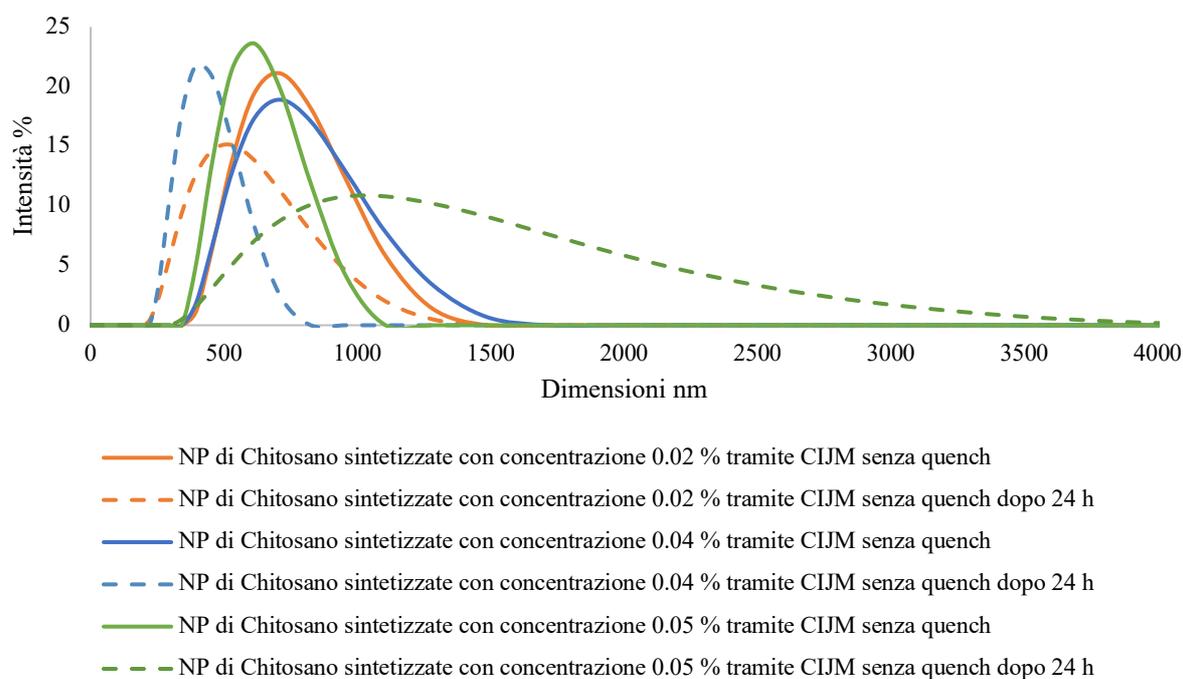


Figura A. 2 Studio della stabilità nel tempo delle nanoparticelle di chitosano ottenute con concentrazioni differenti tramite CIJM (36 mL/min) – Frigorifero per 24 h.

Dal confronto delle curve di distribuzioni delle dimensioni riportate nelle figure sopra, emerge che le nanoparticelle conservate in soluzioni acquose risultano essere poco stabili nel tempo.

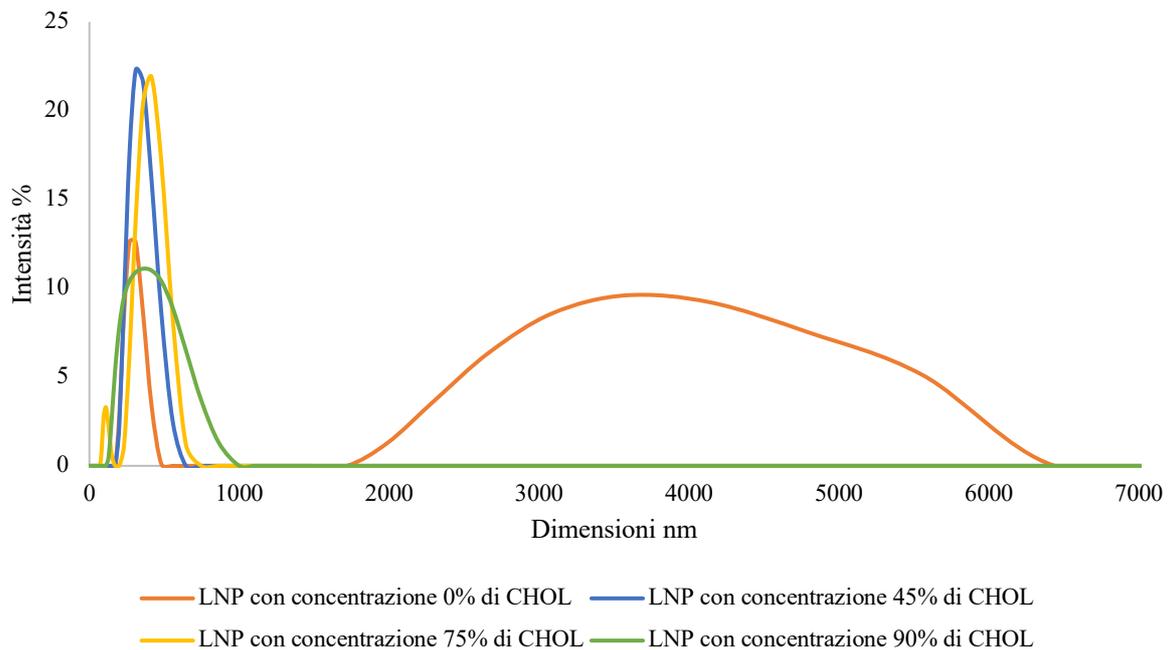


Figura A. 3: Confronto delle PSD delle LNP sintetizzate con concentrazioni differenti di CHOL tramite vortex (30 secondi) e senza quench

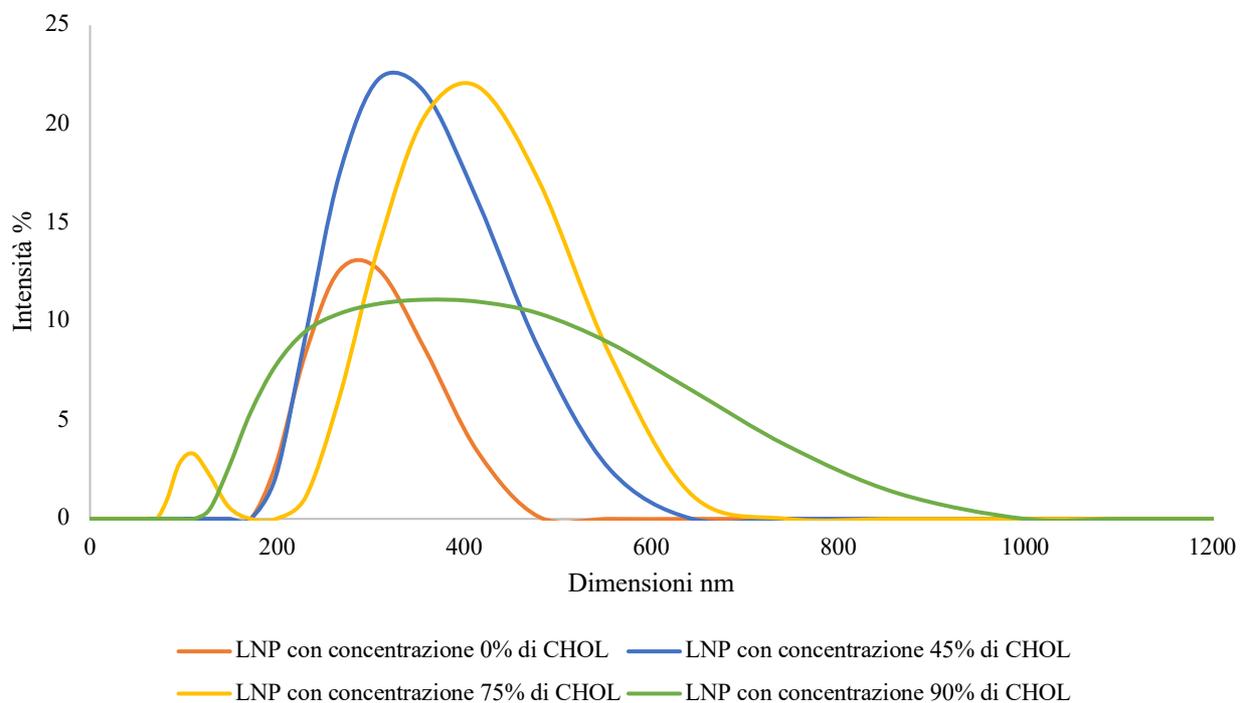


Figura A. 4: Confronto delle PSD delle LNP sintetizzate con concentrazioni differenti di CHOL tramite vortex (30 secondi) e senza quench - Dettaglio Figura A. 3

Dalle Figura A. 3 e Figura A. 4 è emerso che la concentrazione ottimale per la sintesi delle nanoparticelle, in termini di distribuzione delle dimensioni, risulta essere 45 %, ovvero quella di

riferimento. Tuttavia, le prove di incapsulamento di RNA sono state eseguite anche con concentrazioni differenti, in modo tale da valutare le variazioni di dimensioni e le efficienze intrappolamento.

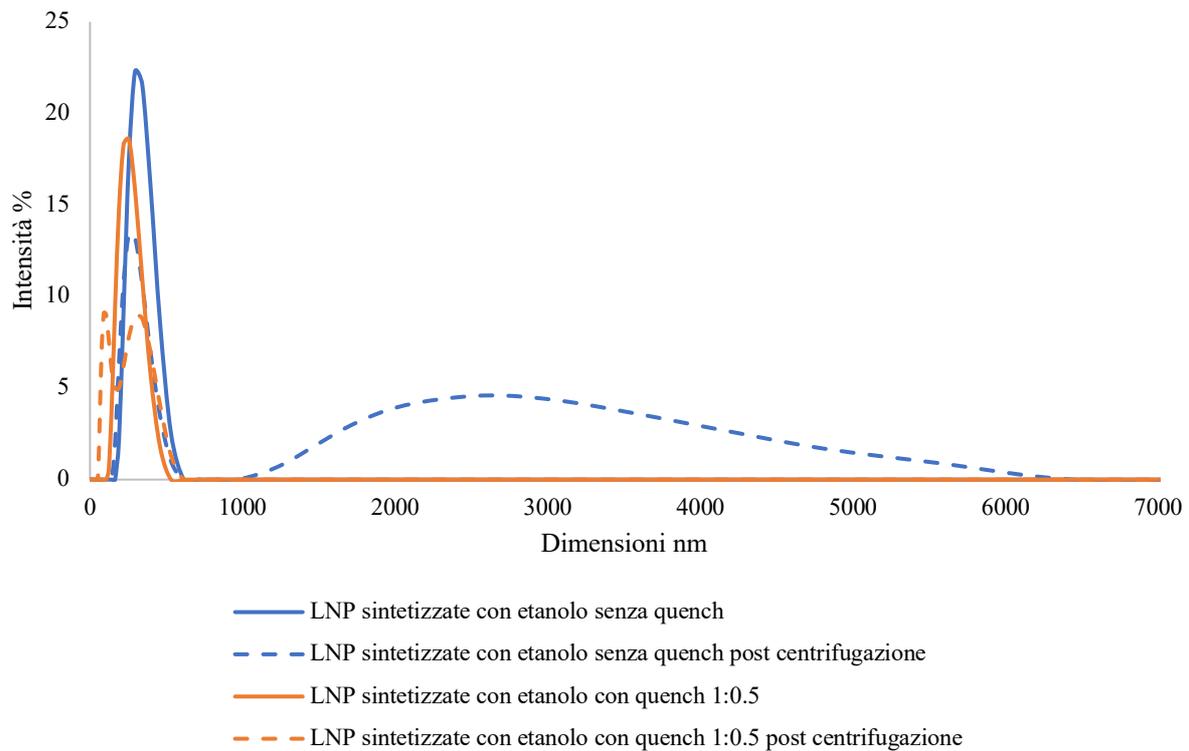


Figura A. 5: Confronto delle PSD prima e dopo la centrifugazione delle LNP ottenute tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

In Figura A. 5 è riportato un confronto delle distribuzioni delle dimensioni prima e dopo l'operazione. Da questa è possibile notare che soprattutto nel caso senza diluizione sono rilevanti i fenomeni di aggregazione, infatti sono presenti due curve: la prima maggiormente definita attorno alle dimensioni del range desiderato (inferiore ai 500 nm) e una seconda che risulta essere distribuita in un più ampio intervallo di dimensioni in cui si esce dalla scala nanometrica. Analizzando entrambe le curve è possibile affermare che sono avvenuti sia fenomeni di aggregazione che di rottura.

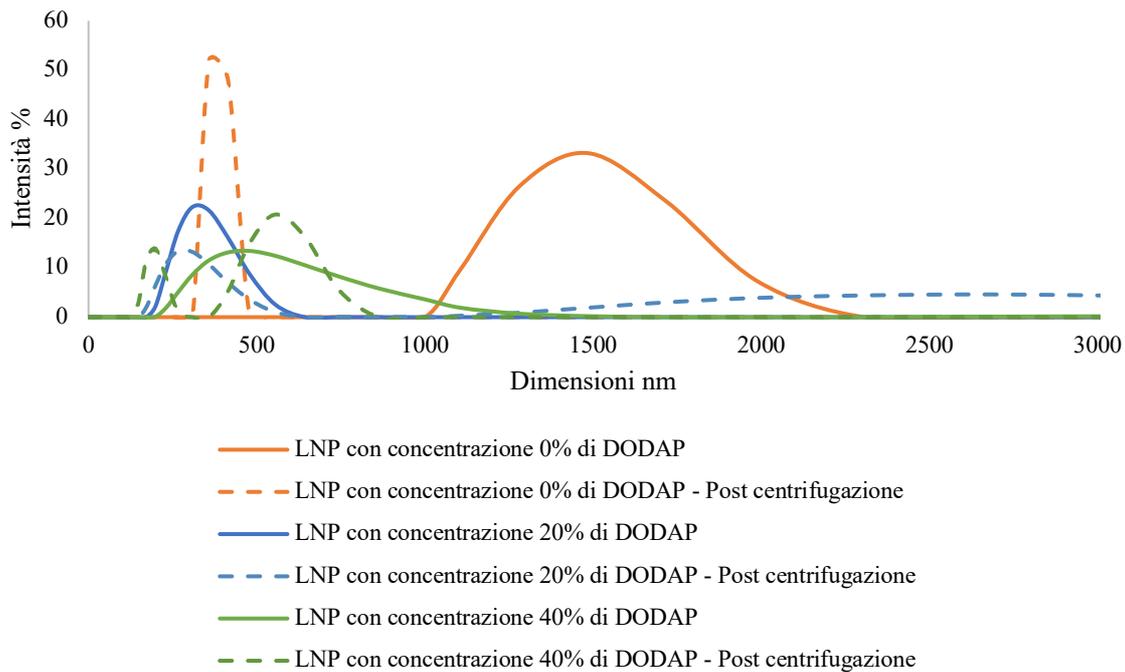


Figura A. 6: Confronto delle PSD prima e dopo centrifugazione delle LNP sintetizzate con concentrazioni differenti di DODAP tramite vortex (30 secondi) e senza quench – Si è considerato solo il range dimensionale della scala nanometrica

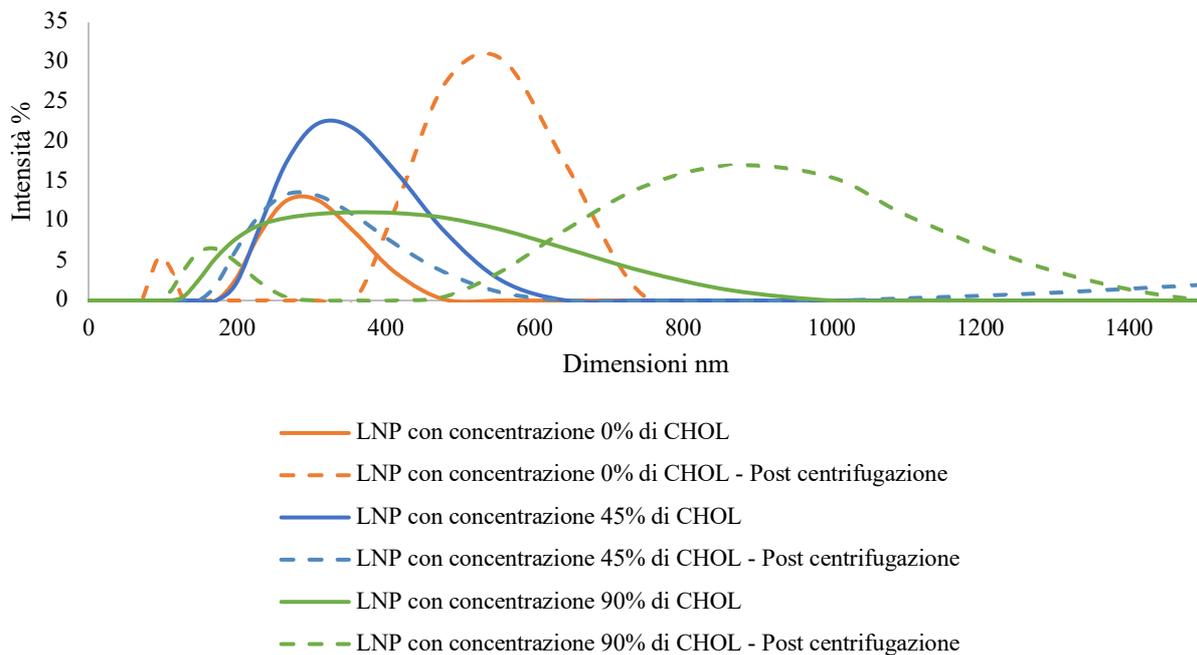


Figura A. 7: Confronto delle PSD prima e dopo centrifugazione delle LNP sintetizzate con concentrazioni differenti di CHOL tramite vortex (30 secondi) e senza quench – Dettaglio del range delle dimensioni tra 0 e 1400 nm

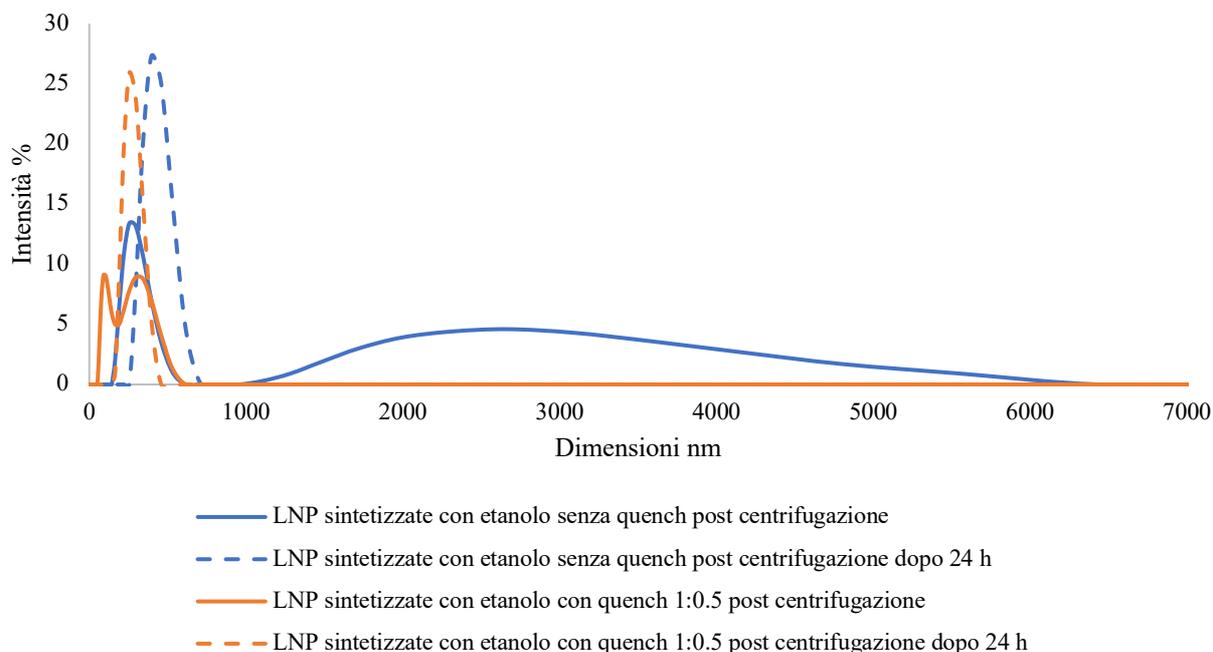


Figura A. 8: Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche dopo 24 h in frigorifero, ottenute tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

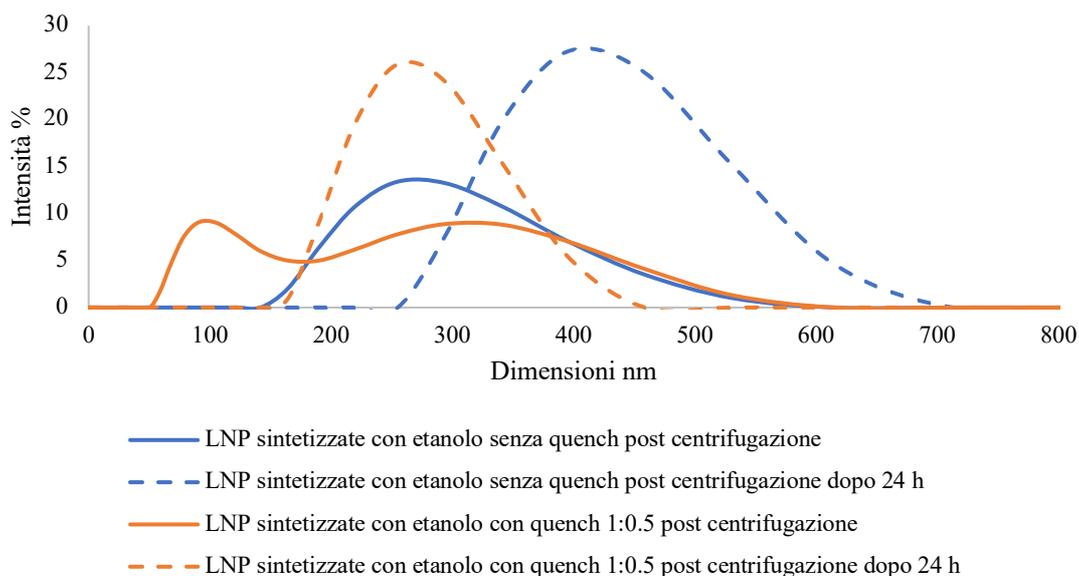


Figura A. 9: Studio della stabilità delle nanoparticelle lipidiche post centrifugazione dopo 24 h in frigorifero, ottenute tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti – Dettaglio di Figura A. 8

Nelle Figura A. 8 e Figura A. 9 sono confrontate le distribuzioni delle dimensioni delle nanoparticelle prima e dopo le 24 ore in frigorifero e nella seconda viene analizzato unicamente il range della scala di interesse. Nella seconda figura è possibile notare che trascorse le 24 ore le nanoparticelle risultano avere dimensioni in media maggiori di circa il 10 – 15 %, ma la distribuzione risulta essere più concentrata in un range più limitato di dimensioni e quindi sembra esserci un blando effetto stabilizzante.

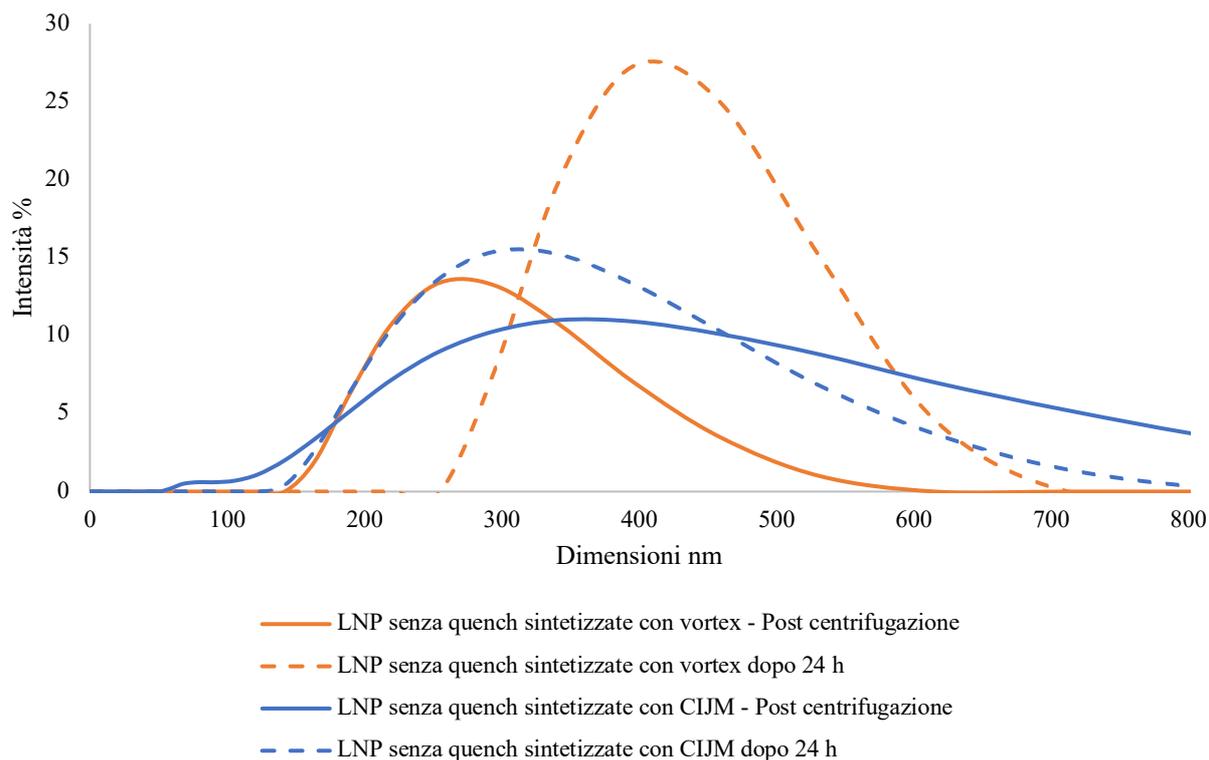


Figura A. 10: Confronto delle PSD delle LNP dopo centrifugazione e trascorse 24 h in frigorifero sintetizzate con agitatore vortex (30 secondi) e CIJM (36 mL/min) e senza quench

Il metodo di sintesi risulta avere poca influenza sulla stabilità delle nanoparticelle; infatti in entrambi i casi analizzati, vortex e CIJM, si verifica un aumento delle dimensioni delle NP a seguito di 24 ore dalla sintesi e conservate a 4°C.

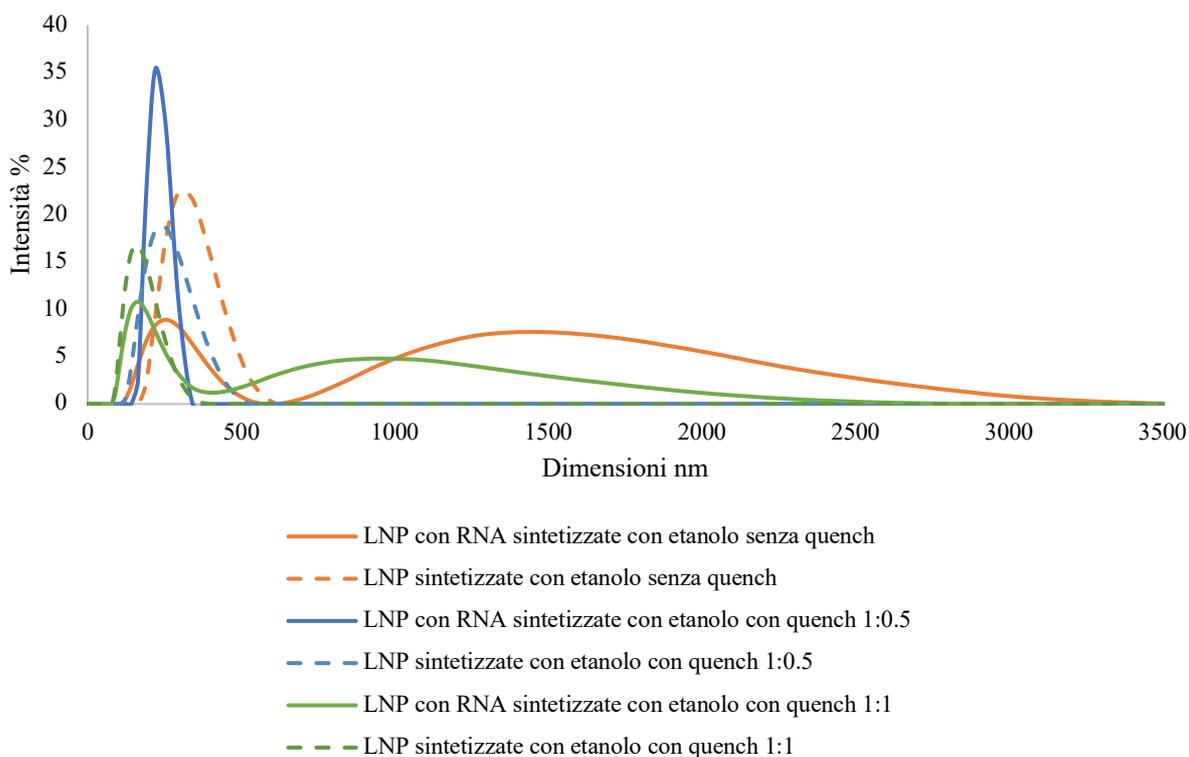


Figura A. 11: Confronto delle PSD delle LNP con RNA incapsulato sintetizzate tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

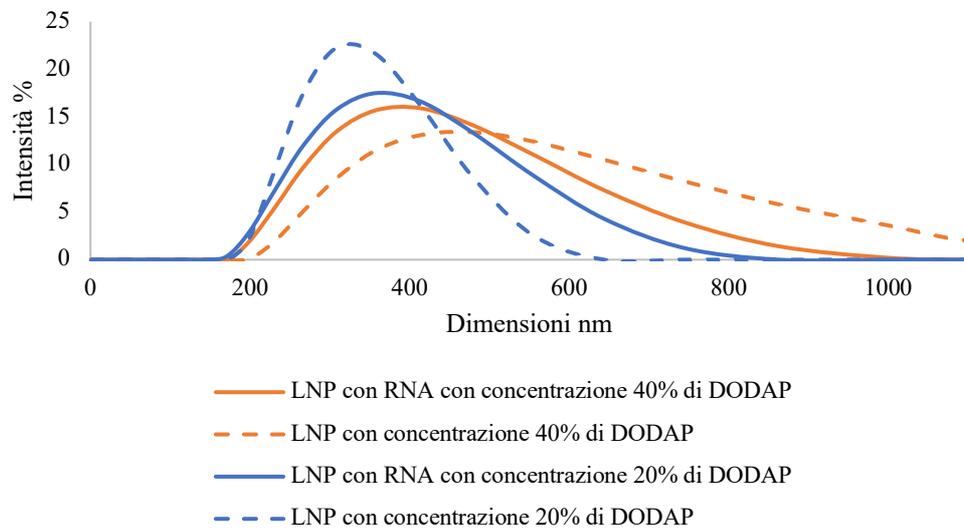


Figura A. 12: Confronto delle PSD delle LNP con RNA incapsulato e senza sintetizzate con concentrazioni differenti di DODAP tramite vortex (30 secondi) e senza quench

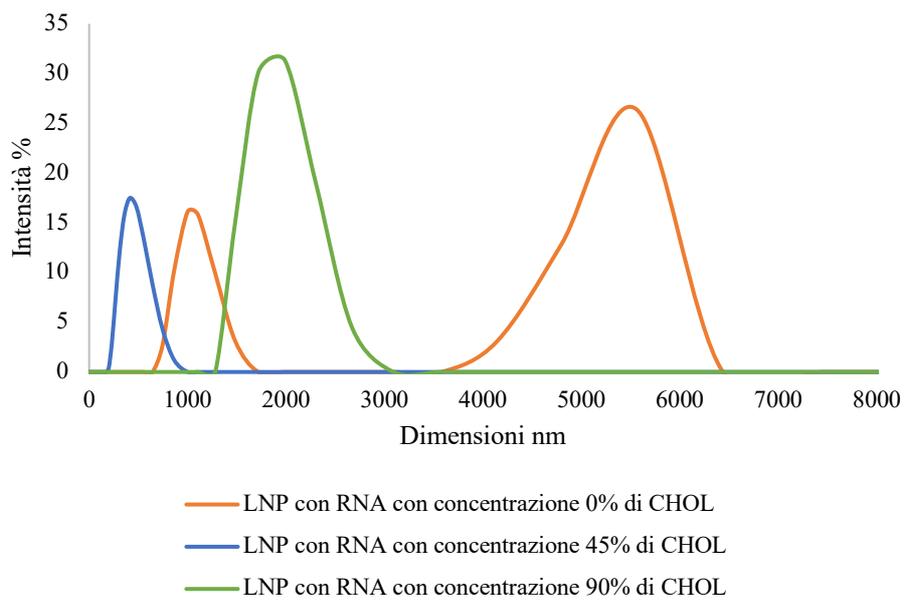


Figura A. 13: PSD delle LNP con RNA incapsulato dopo centrifugazione sintetizzate con concentrazioni differenti di CHOL tramite vortex (30 secondi) e senza quench

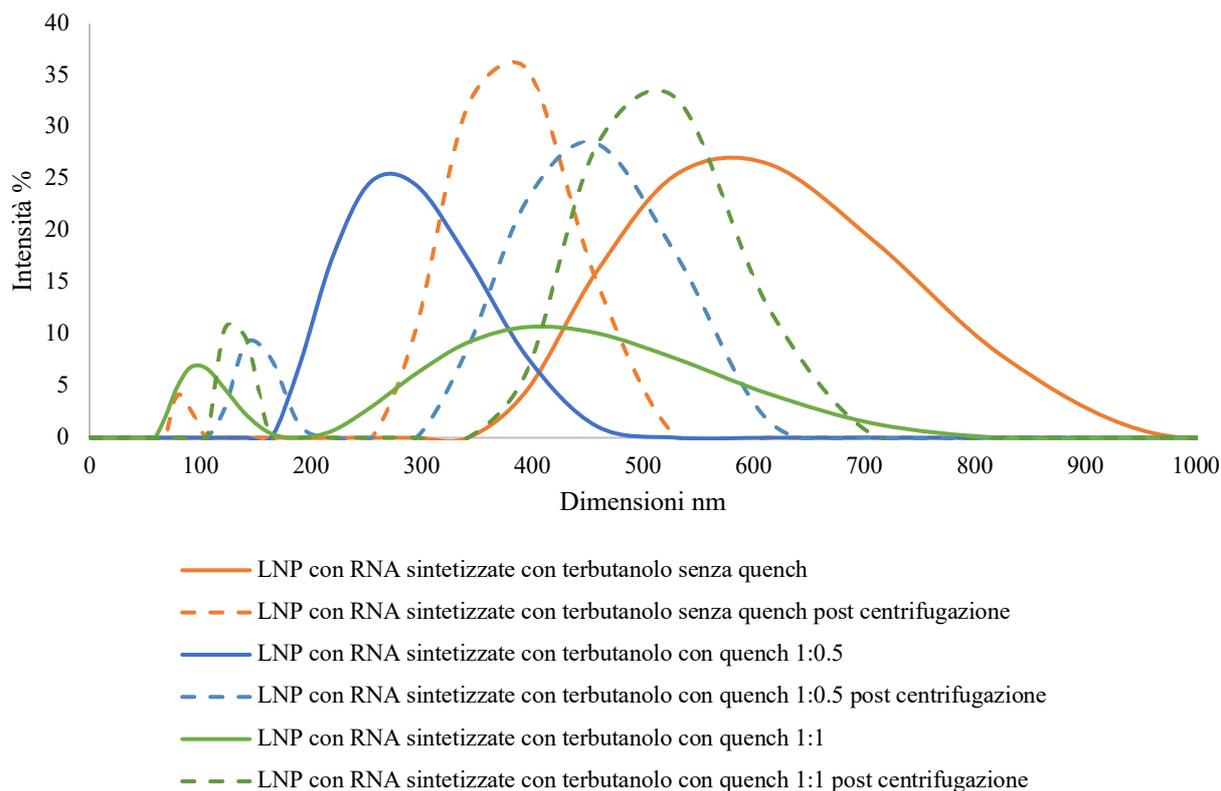


Figura A. 14: Confronto delle PSD delle nanoparticelle lipidiche con RNA incapsulato prima e dopo centrifugazione sintetizzate con terbutanolo tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

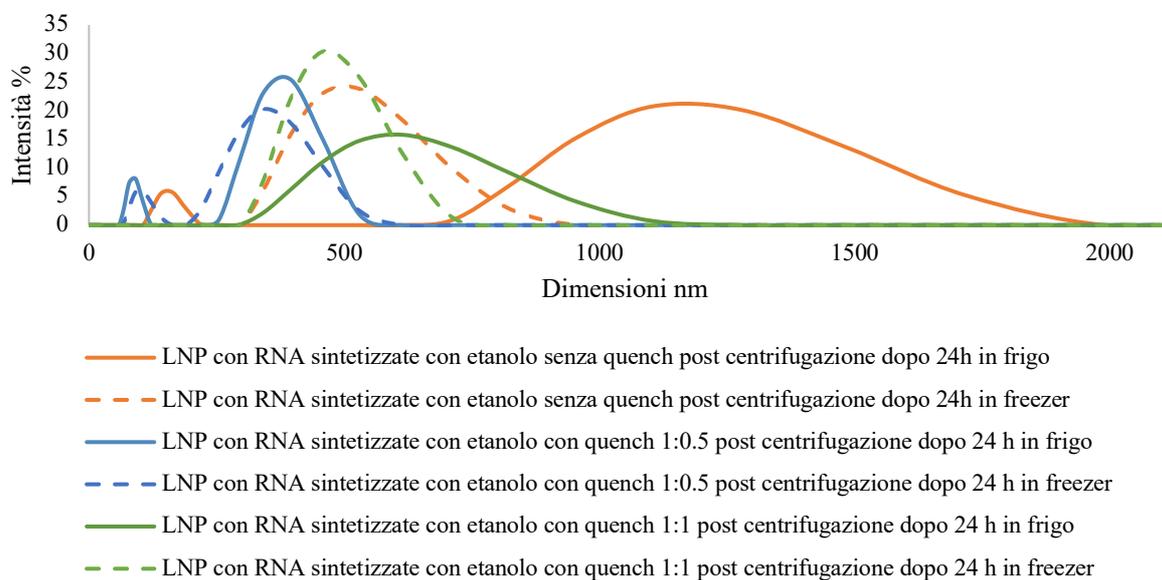


Figura A. 15: Confronto delle PSD delle LNP con RNA incapsulato conservate per 24 ore in frigorifero e in freezer (disciolte in una soluzione acqua/saccarosio al 10%) sintetizzate tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

La variazione in termini di dimensioni risulta essere molto più contenuta nel caso in cui le nanoparticelle vengono conservate in freezer. Infatti, rimanendo in frigorifero per 24 ore le LNP tendono ad aggregare fino quasi a triplicare le dimensioni rispetto all'altro caso.

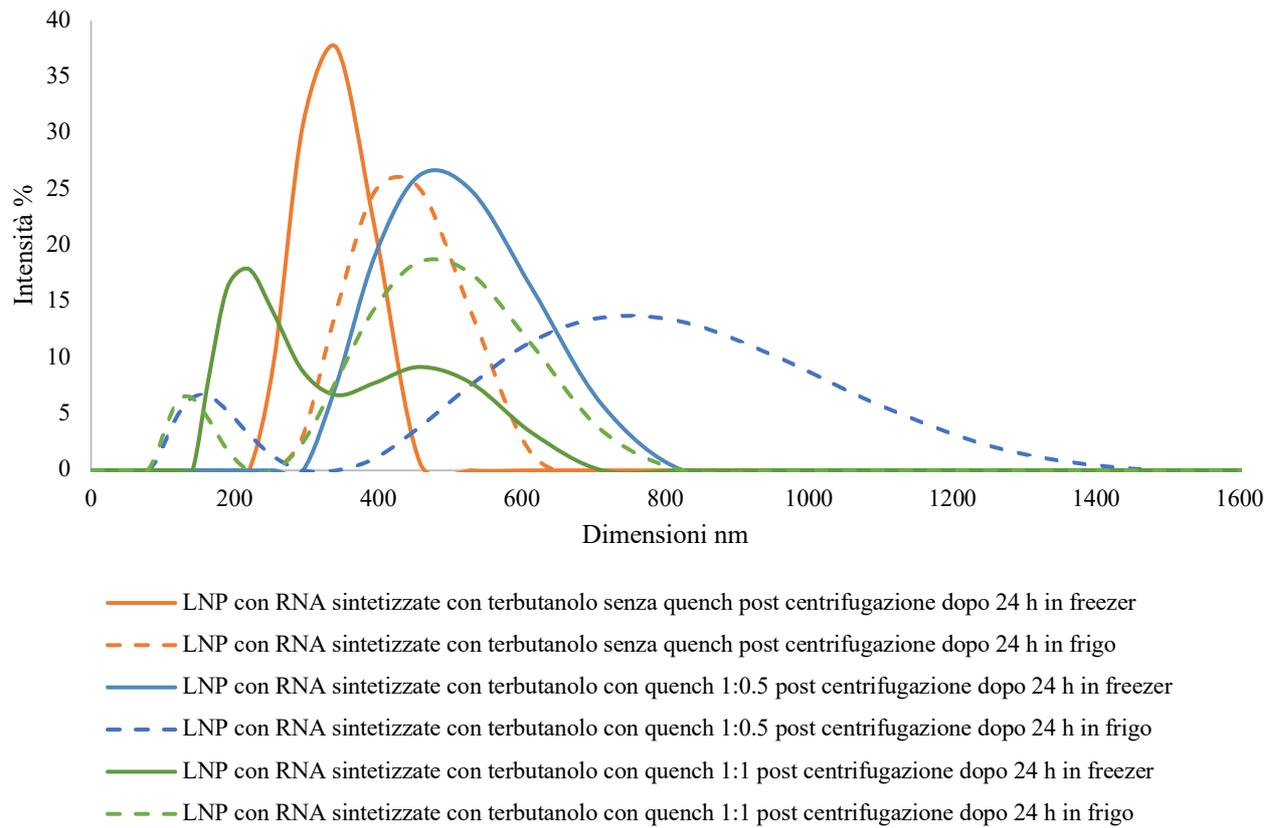


Figura A. 16: Confronto delle PSD delle LNP con RNA incapsulato conservate per 24 ore in frigorifero e in freezer (disciolte in una soluzione acqua/saccarosio al 10%) sintetizzate con terbutanolo tramite agitatore vortex (30 secondi) con rapporti di diluizione differenti

Ringraziamenti

Al termine di questo lavoro di Tesi voglio cogliere l'occasione per ringraziare i miei relatori, il Prof. Davide Fissore e la Prof.ssa Francesca Bosco, e la Dott.ssa Chiara Mollea, per avermi seguito in questi mesi trasmettendomi la passione per la ricerca e mostrandosi costantemente disponibili a fornire consigli e chiarimenti.