# 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

# Studio sperimentale relativo alla crio-conservazione e liofilizzazione di vescicole extracellulari



**Relatori** Prof. Roberto Pisano Prof.ssa Valentina Cauda Prof.ssa Tania Limongi

> **Candidato** Francesca Borgione

Dicembre 2021

# **INDICE**

CAPITOLO 1	1
INTRODUZIONE	1
1.1 Nanotecnologia: nanoparticelle per il drug delivery	1
1.2 Nanoparticelle	
1.2.1 Nanoparticelle a base di carbonio	
1.2.2 Nanoparticelle inorganiche	
1.2.3 Nanoparticelle organiche	
1.3 Vescicole extracellulari: Microvescicole, Esosomi, Corpi apoptotici	
1.3.1 Esosomi	5
1.3.2 Microvescicole	5
1.3.3 Corpi apoptotici	6
1.4 Metodi di conservazione delle vescicole extracellulari	
1.5 Liofilizzazione delle vescicole extracellulari	7
1.5.1 Eccipienti	
1.5.1.1 Stabilizzanti	9
1.5.1.2 Agenti di bulking	
1.5.1.3 Buffers	10
1.5.1.4 Tensioattivi	10
1.6 Fasi del processo di liofilizzazione	10
1.6.1 Congelamento	11
1.6.2 Essiccamento primario	12
1.6.3 Essiccamento secondario	13
1.7 Scopo della tesi	13
CAPITOLO 2	15
MATERIALI E METODI	
2.1 Isolamento di vescicole extracellulari (EV)	15
2.2 Caratterizzazione proteica: saggio di Bradford	16
2.3 Formulazioni	16
2.4 Caratterizzazione termica	17
2.4.1 DSC	17
2.4.2 FDM o crio - microscopio	21
2.5 Preparazione delle soluzioni per liofilizzazione	22
2.6 Liofilizzazione	22
2.7 NTA	23
2.8 Titolazione Karl Fisher, valutazione della percentuale di umidità residua	25

2.9 Analisi statistica	26
CAPITOLO 3	27
RISULTATI	27
3.1 Scelta degli eccipienti e liofilizzazione	27
3.2 Caratterizzazione con Nanosight	31
3.3 Valutazione percentuale dell'umidità residua dei campioni liofilizzati	
CAPITOLO 4	40
CONCLUSIONI	
BIBLIOGRAFIA	
Appendice	
Ringraziamenti	80

# Elenco delle figure

**Figura 1.1:** Schema di una vescicola extracellulare: nel doppio strato lipidico, in blu sono schematizzati i fosfolipidi (A), in giallo (B) una proteina di membrana mentre all'interno parte del contenuto di acidi nucleici e proteine.

**Figura 1.2:** (A) Cellula contenente corpi multivescicolari che possono originare per endocitosi gli esosomi e dalla quale per invaginazione della membrana possono essere rilasciate le microvescicole; (B) cellula apoptotica che origina corpi apoptotici. Modificata da "Composition, Biological Relevance, and Methods of Study" (Zaborowski et al., 2015).

**Figura 1.3:** Figura tratta da "Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation" con modifiche (Bjelošević et al., 2020).

**Figura 1.4:** Grafico generale dell'intero processo di liofilizzazione: il primo tratto (1) riporta le condizioni di pressione e temperatura relative alla fase di congelamento, il secondo (2) quelle relative all'essiccamento primario ed il terzo (3) le condizioni operative relative all'essiccamento secondario. Nel tratto finale del grafico (4) vi sono le condizioni di stoccaggio a cui possono essere mantenuti i campioni liofilizzati, ovvero temperatura e pressione ambiente. Al di sotto del grafico vi è uno schema rappresentante le trasformazioni subite dal campione durante la liofilizzazione a cui viene sottoposto. Figura tratta da "Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm" (Merivaara et al., 2021) con modifiche.

**Figura 1.5:** Nello schema sono rappresentati i fenomeni a cui è soggetto un campione durante l'essiccamento primario. Il calore può essere fornito con tre diversi meccanismi: irraggiamento (1), conduzione (2) e convezione (3). Le frecce in rosso indicano il flusso di calore, le frecce in blu identificano il trasferimento di massa e in corsivo sono riportati alcuni dei fattori che influenzano la sublimazione durante questa fase. Figura tratta da "Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm" (Merivaara et al., 2021) con modifiche.

Figura 2.1: DSC Q200 TA Instruments.

**Figura 2.2:** Esempio di fenomeni, endotermici ed esotermici, osservabili con DSC. In presenza di eccipiente amorfo (A) si ha una transizione vetrosa. In presenza di eccipienti cristallini (B) si ha un punto di eutettico. All'abbassarsi della temperatura si verifica la cristallizzazione (C) mentre all'aumentare della stessa la fusione (D).

**Figura 2.3:** FDM BX51 Olympus, criomicroscopio utilizzato per le prove in laboratorio; all'interno dell'ovale rosso è messa in evidenza la camera del microscopio all'interno della quale viene depositato il campione da analizzare.

Figura 2.4: Liofilizzatore REVO® Millrock Technology.

**Figura 2.5:** Disposizione delle *vials* contenenti i campioni e posizionamento all'interno della camera del liofilizzatore.

**Figura 2.6:** Nanosight NS300 utilizzato per determinare la concentrazione e la distribuzione di taglia delle EV.

Figura 2.7: Titolatore Karl Fisher utilizzato per le analisi del residuo di umidità dei campioni liofilizzati.

**Figura 3.1:** Risultati ottenuti con DSC (A e B) e FDM (C) per il campione destrano al 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -26.62 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -24.4 °C.

**Figura 3.2:** Sequenza di immagini durante la caratterizzazione del destrano 5% w/V con *FDM* nella prima immagine (A, T = -51.8 °C) vi è la goccia congelata, nelle foto (B, T = -41.9 °C) – (C, T = -32.0 °C) – (D, T = -28.4 °C) vi è il progressivo avanzamento del fronte della goccia, che corrisponde alla formazione della matrice liofilizzata. Nell'immagine (E, T = -24.4 °C) vi è l'insorgenza delle prime discontinuità all'interno della matrice che portano, attraverso i frame (F, T = -22.5 °C) – (G, T = -20.5 °C) – (H, T = -15.0 °C), al totale collasso della struttura. L'istante in cui si osservano le prime discontinuità determina la temperatura di collasso della soluzione.

**Figura 3.3:** Campione A: saccarosio 5% w/V presenta una struttura non omogenea e compatta. Campione B: destrano al 5% w/V con struttura integra, compatta ed omogenea.

**Figura 3.4:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV conservate a -80°C (A), EV liofilizzate in sola fisiologica (B), EV liofilizzate con destrano 10% w/V (C) ed EV liofilizzate con lattosio 10% w/V (D).

**Figura 3.5:** Il grafico riporta le concentrazioni delle EV in termini di particelle per ml rappresentate come media  $\pm$  ES. Sono considerati significativi \* p < 0.05 e \*\* p < 0.001. C = ciclodestrina, D = destrano, F = fisiologica, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccarosio, T = trealosio.

**Figura 3.6:** Il grafico riporta i diametri delle EV rappresentati come media  $\pm$  ES. Sono considerati significativi \* p < 0.05 e \*\* p < 0.001. C = ciclodestrina, D = destrano, F = fisiologica, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccarosio, T = trealosio.

**Figura 3.7:** Il grafico riporta le concentrazioni delle EV in termini di particelle per ml rappresentate come media  $\pm$  ES. Sono considerati significativi \* p < 0.05 e \*\* p < 0.001. C = ciclodestrina, D = destrano, F = fisiologica, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccarosio, T = trealosio.

**Figura 3.8:** Il grafico riporta i diametri delle EV rappresentati come media e *standard error*. Sono considerati significativi \* p < 0.05 e \*\* p < 0.001. C = ciclodestrina, D = destrano, F = fisiologica, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccarosio, T = trealosio.

**Figura A.1:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione destrano 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -19.4 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -15.4 °C.

**Figura A.2:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione contenente la sola fisiologica (0.9% NaCl). In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico pari a -20.9 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -50.9 °C.

**Figura A.3:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione H –  $\beta$  - ciclodestrina 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -36.8 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -38.1 °C.

**Figura A.4:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione H –  $\beta$  - ciclodestrina 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento

relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -27 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -24.1 °C.

**Figura A.5:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione glicina 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico pari a -24.8 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -39 °C.

**Figura A.6:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione glicina 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico pari a -25.0 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -24.2 °C.

**Figura A.7:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione lattosio 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -44.6 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -47.1 °C.

**Figura A.8:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione lattosio 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -37.1 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -29.2 °C.

**Figura A.9:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione lattosio - destrano 5% - 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -29.9 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -23.5 °C.

**Figura A.10:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione lattosio - destrano 7% - 3% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -33.2 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -29.2 °C.

**Figura A.11:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione mannitolo 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico a 3.8 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -45.3 °C.

**Figura A.12:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione mannitolo 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico a 2.6 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -38.1 °C.

**Figura A.13:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione saccarosio 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo

alla temperatura di transizione vetrosa pari a -47.0 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -40.2 °C.

**Figura A.14:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione saccarosio 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -39.2 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -33.1 °C.

**Figura A.15:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione saccarosio – destrano 5% - 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -32.7 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -29.3 °C.

**Figura A.16:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione saccarosio – destrano 7% - 3% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -36.1 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -33.9 °C.

**Figura A.17:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano 4% - 1% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -41.7 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -40.3 °C.

**Figura A.18:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -46.6 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -40.1 °C.

**Figura A.19:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -39.4 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -41.2 °C.

**Figura A.20:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano 5% - 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -30.3 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -24.7 °C.

**Figura A.21:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano 7% - 3% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -34.0 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -31.2 °C.

**Figura A.22:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano – mannitolo 7% - 2% - 1% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato

l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -37.7 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -33.3 °C.

**Figura A.23:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano – glicina 7% - 2% - 1% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -39.2 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -34.0 °C.

**Figura A.24:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con ciclodestrina 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 23 nm, 77 nm, 110 nm, 152 nm, 185 nm, 215 nm e 293 nm.

**Figura A.25:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con ciclodestrina 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 81 nm, 121 nm, 177 nm, 244 nm, 270 nm e 322 nm.

**Figura A.26:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con destrano 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 27 nm, 44 nm, 64 nm, 98 nm, 145 nm, 202 nm, 280 nm, 334 nm e 505 nm.

**Figura A.27:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con destrano 10% w/V. Distribuzione monodispersa delle dimensioni medie, con picchi a 37 nm, 51 nm, 113 nm e 505 nm.

**Figura A.28:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV conservate a -80 °C. Distribuzione monodispersa delle dimensioni medie, con picchi a 32 nm, 93 nm, 135 nm, 349 nm e 450 nm.

**Figura A.29:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate senza aggiunta di eccipienti. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 74 nm, 101 nm, 141 nm, 222 nm, 270 nm, 318 nm, 407 nm e 452 nm.

**Figura A.30:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con glicina 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 28 nm, 86 nm, 171 nm, 232 nm, 350 nm e 382 nm.

**Figura A.31:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con glicina 10% w/V. Distribuzione monodispersa delle dimensioni medie, con picchi a 45 nm, 111 nm e 373 nm.

**Figura A.32:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con lattosio 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 32 nm, 108 nm, 125 nm, 178 nm, 227 nm, 323 nm e 615 nm.

**Figura A.33:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con lattosio 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 107 nm, 170 nm, 247 nm, 306 nm, 391 nm, 444 nm, 620 nm e 1000 nm.

**Figura A.34:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con lattosio – destrano 5% - 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 56 nm, 106 nm, 151 nm, 206 nm, 288 nm e 414 nm.

**Figura A.35:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con lattosio – destrano 7% - 3% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 100 nm, 133 nm, 191 nm, 328 nm, 372 nm, 474 nm, 578 nm e 828 nm.

**Figura A.36:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con mannitolo 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 38 nm, 85 nm, 111 nm, 161 nm, 241 nm e 418 nm.

**Figura A.37:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con mannitolo 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 25 nm, 49 nm, 124 nm e 546 nm.

**Figura A.38:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con saccarosio 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 99 nm, 149 nm, 307 nm, 359 nm, 476 nm e 753 nm.

**Figura A.39:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con saccarosio 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 105 nm, 151 nm, 255 nm, 285 nm, 417 nm e 485 nm.

**Figura A.40:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con saccarosio – destrano 5% - 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 33 nm, 56 nm, 109 nm, 140 nm, 167 nm, 236 nm, 327 nm e 420 nm.

**Figura A.41:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con saccarosio – destrano 7% - 3% w/V. Distribuzione monodispersa delle dimensioni medie, con picchi a 40 nm, 112 nm, 182 nm, 259 nm, 376 nm e 437 nm.

**Figura A.42:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con trealosio 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 38 nm, 107 nm, 306 nm, 365 nm, 443 nm e 561 nm.

**Figura A.43:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con trealosio 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 28 nm, 86 nm, 114 nm, 146 nm, 352 nm e 393 nm.

**Figura A.44:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con trealosio – destrano 5% - 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 62 nm, 114 nm, 157 nm, 221 nm, 245 nm e 295 nm.

**Figura A.45:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con trealosio – destrano 7% - 3% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 43 nm, 72 nm, 108 nm, 143 nm, 190 nm. 273 nm, 421 nm, 461 nm e 657 nm.

# Elenco delle tabelle

**Tabella 2.1.** Elenco delle formulazioni; nelle celle riguardanti le combinazioni di diversi eccipienti sono stati indicati con la loro iniziale, D = destrano, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccarosio, T = trealosio.

**Tabella 3.1.** Tabella contenente i risultati ottenuti con DSC e FDM di tutte le formulazioni testate; nelle formulazioni contenenti più di un eccipiente sono state utilizzate le iniziali di ognuno di essi con le relative concentrazioni (T =trealosio, D =destrano, M =mannitolo, G =glicina, L =lattosio, S =saccarosio).

**Tabella 3.2.** Valore medio della concentrazione, misurato in particelle/ml (pt/ml), e del diametro, misurato in nanometri (nm), con relativo errore standard.

**Tabella 3.3.** Risultati relativi all'analisi statistica effettuata con t test tra EV conservate in -80 e gli altri campioni.

**Tabella 3.4.** Risultati relativi all'analisi statistica effettuata con t test tra EV liofilizzati in fisiologica e liofilizzati con i vari eccipienti.

Tabella 3.5. Valore percentuale di umidità residua per i diversi campioni di eccipienti liofilizzati.

# **CAPITOLO 1**

# INTRODUZIONE

#### 1.1 Nanotecnologia: nanoparticelle per il drug delivery

La nanotecnologia è una scienza interdisciplinare in continua espansione che combina saperi di diversi settori quali l'ingegneria, la fisica, la scienza dei materiali, la chimica, la biologia e la medicina per lo studio e l'implementazione di strutture, dispositivi e sistemi nanometrici (Bayda et al., 2019; Limongi et al., 2016; Limongi et al., 2019b). L'utilizzo delle nanotecnologie in campo biomedicale sta dando risultati impressionanti e sono moltissimi gli studi focalizzati sullo sviluppo di soluzioni nanotecnologiche applicate al *drug delivery*, ovvero la veicolazione di sostanze attive o farmaci direttamente verso un particolare tessuto o cellula garantendo rilasci controllati e localizzati per una maggiore efficienza di trattamento.

Un *drug delivery* ottimale deve assicurare in terapia antitumorale (De Jong e Borm, 2008; Mukherjee, 2013; Jain, 2020), nell'*imaging* diagnostico (De Jong e Borm, 2008; Mukherjee, 2013; Jain, 2020) e nel trattamento di malattie croniche come il diabete, il Parkinson, l'Alzheimer e molti altri disturbi (De Jong e Borm, 2008; Mukherjee, 2013; Jain, 2020) che la minor concentrazione efficace di sostanza d'interesse raggiunga nella maniera più selettiva possibile le cellule o il tessuto bersaglio riducendo al minimo eventuali effetti collaterali. Le nanotecnologie in questi ultimi anni assistono il *drug delivery* più tradizionale con sistemi innovativi in grado di svolgere un'azione di tipo farmacologico ben precisa, volta al design di soluzioni sempre più sicure in termini di riduzione delle dosi, dei tempi di trattamento e degli eventuali effetti avversi.

Tra le nanotecnologie più utilizzate in ambito farmacologico le nanoparticelle (NP) stanno danno ottimi risultati in quanto molte loro applicazioni permettono di ridurre la tossicità e gli effetti collaterali dei farmaci mantenendo inalterato il loro effetto terapeutico (De Jong e Borm, 2008; Mukherjee, 2013; Mauricio, 2018). Le dimensioni nanometriche dalle NP consentono loro di attraversare le principali barriere biologiche. Questo si rivela particolarmente interessante perché permette loro l'accesso a diversi comparti cellulari, incluso il nucleo. Alcuni studi si stanno concentrando anche sulla somministrazione di farmaci nanotecnologici a livello cerebrale in quanto molte NP possono superare la barriera emato encefalica (De Jong e Borm, 2008; Jain, 2020). Non sono solo le loro dimensioni estremamente ridotte a renderle particolarmente interessanti ma anche il loro elevato rapporto superficie/volume grazie al quale sono in grado di legare, assorbire, trasportare e successivamente rilasciare sostanze o composti attivi nel circolo sanguigno o in particolari siti di trattamento (De Jong e Borm, 2008). Altre caratteristiche importanti che le nanoparticelle devono possedere sono un'ottima biocompatibilità ed un'adeguata biodegradabilità tali da non causare reazioni tossiche a livello locale o sistemico durante il viaggio verso il sito di trattamento dove il farmaco deve essere rilasciato (De Jong e Borm, 2008; Plucinski et al., 2021; Sguizzato et al., 2021). Le fase di sintesi o produzione di NP sono volte alla realizzazione di prodotti con dimensione e forma tali da minimizzare eventuali fenomeni di aggregazione e facilitarne l'internalizzazione da parte delle cellule bersaglio (Mauricio et al., 2018). Le NP, oltre che di sintesi, possono essere anche di natura biologica e in questo caso possono essere ingegnerizzate sia con materiale di origine biologica che con polimeri, carbonio, silice o metalli (De Jong e Borm, 2008; Mauricio et al., 2018; Lepeltier et al., 2020).

#### 1.2 Nanoparticelle

A seconda della loro composizione, le nanoparticelle si possono dividere in tre principali categorie: nanoparticelle a base di carbonio, nanoparticelle inorganiche (metalli, ossidi di metalli, ceramiche e quantum dots) e nanoparticelle organiche (polimeriche e non).

#### 1.2.1 Nanoparticelle a base di carbonio

Le nanoparticelle a base di carbonio sono caratterizzate da diverse proprietà fisico – chimiche e ciò le ha rese particolarmente interessanti in diversi ambiti, tra cui quello della biomedicina (Gumpa et al., 2019; Augustine et al., 2017). I fullereni e i nanotubi di carbonio sono due delle più note tipologie di NP carboniose.

Per quanto riguarda i fullereni, questi sono strutture sferiche insolubili in acqua, nuovi allotropi del carbonio e con una struttura poligonale costituita da 60 atomi di carbonio (Limongi et al., 2019a; Mauricio et al., 2018). I derivati del fullerene si sono rivelati particolarmente importanti in applicazioni diagnostiche e terapeutiche di diverso tipo (Limongi et al., 2019b; Lisik e Krokosz, 2021).

I nanotubi di carbonio, invece, possono essere sia a parete singola che multipla e si ottengono arrotolando uno o più fogli di grafite su sé stessa (Limongi et al., 2019b; De Jong e Borm, 2008). Il loro impiego, dal momento che fungono da fibre biopersistenti, ha riscontrato particolare successo in applicazioni di tipo biomedico come la medicina rigenerativa, l'oncologia e la somministrazione di farmaci e vaccini (Limongi et al., 2019b; De Jong e Borm, 2008; Lisik e Krokosz, 2021; De Carvalho Lima et al., 2021).

#### 1.2.2 Nanoparticelle inorganiche

Tra le NP inorganiche si possono annoverare i *Quantum Dots (QD)*, le nanoparticelle metalliche, le nanoparticelle di ossido di metallo e di ceramica (Limongi et al., 2019b; Limongi et al., 2019a).

I *QD* sono nanoparticelle costituite da materiali semiconduttori con proprietà fluorescenti (Mauricio et al., 2018). Sono costituiti da un nucleo semiconduttore all'esterno del quale vi è un guscio coniugabile con biomolecole di vario tipo, al fine di migliorarne le proprietà ottiche e fisiche e prevenire la fuoriuscita di metalli tossici pesanti (Limongi et al., 2019b; Mauricio et al., 2018). La loro principale funzione è quella di aumentare la stabilità complessiva delle nanoparticelle nei fluidi biologici (Limongi et al., 2019b).

Le nanoparticelle metalliche e ossido metalliche sono caratterizzate da particolari proprietà elettroniche e ottiche, da un'elevata stabilità chimica e da biocompatibilità. Sono largamente impiegate in diversi ambiti quali quello teranostico, oncologico, infettivologico, cardiologico e rigenerativo (Limongi et al., 2019b; Li et al., 2021; Younis et al., 2021; Liu et al., 2021).

#### 1.2.3 Nanoparticelle organiche

Nella categoria delle nanoparticelle organiche rientrano quelle polimeriche, liposomi e vescicole extracellulari (EV) (Limongi et al., 2019a).

Le nanoparticelle polimeriche sono note per le loro caratteristiche di biodegradabilità e biocompatibilità e possono essere costituite sia da polimeri naturali che sintetici; si possono ottenere con diverse tecniche che permettono di controllarne e regolarne sia la dimensione che la solubilità (Limongi et al. 2019b; Mauricio et al., 2018). Queste caratteristiche le rendono particolarmente interessanti per la somministrazione endovenosa e orale di farmaci antitumorali, antibiotici e vaccini. (El – Say ed El - Sawy, 2017).

I liposomi, che in base ai metodi di preparazione si dividono in unilamellari, multilamellari e unilamellari giganti, con dimensioni variabili da 20 nm a qualche micron di diametro, sono vescicole sferiche costituite da un doppio strato lipidico contenente una sostanza acquosa (Mauricio et al., 2018). Si possono ottenere da colesteroli, fosfolipidi, tensioattivi e proteine. Anche in questo caso ci sono diverse tecniche atte alla loro sintesi. Il loro principale utilizzo è quello di sistemi di rilascio e si sono rivelati modelli ideali per membrane biologiche in grado di trasportare al loro interno molecole e/o farmaci sia idrosolubili che liposolubili (Limongi et al., 2019a; Alavi et al., 2017; Mozafari, 2005).

Le vescicole extracellulari sono NP di origine biologica perché secrete dalle cellule viventi nel mezzo extracellulare e nella gran parte dei fluidi corporei. La loro composizione e funzione rispecchia il contenuto delle cellule che le hanno prodotte e le rende le principali mediatrici della comunicazione intercellulare mediante il trasferimento di acidi nuclei, proteine e altre biomolecole (Limongi et al., 2019b).

#### 1.3 Vescicole extracellulari: Microvescicole, Esosomi, Corpi apoptotici

Le EV sono un gruppo eterogeneo di strutture membranose costituite da un doppio strato lipidico contenente lipidi, acidi nucleici e proteine (Zaborowski et al., 2015; Doyle e Wang, 2019; Tkach e Théry, 2016) (Figura 1.1). Tenendo conto delle loro dimensioni e del loro meccanismo di biogenesi posso essere individuate tre principali classi di vescicole extracellulari: gli esosomi (di origine endocitica), le microvescicole (rilasciate da invaginazioni della membrana cellulare plasmatica) ed i corpi apoptotici (secreti dalle cellule durante il processo apoptotico) (Doyle e Wang, 2019; Ståhl et al., 2019) (Figura 1.2).



**Figura 1.1:** Schema di una vescicola extracellulare: nel doppio strato lipidico, in blu sono schematizzati i fosfolipidi (A), in giallo (B) una proteina di membrana mentre all'interno parte del contenuto di acidi nucleici e proteine.

Queste vescicole vengono secrete da tutte le cellule viventi sia procariotiche che eucariotiche, siano esse sane o malate. Recenti studi hanno dimostrato che le cellule tumorali rilasciano un quantitativo maggiore di EV rispetto a quello che fanno mediamente le sane (Bebelman et al., 2018; Lydic et al., 2015). Le EV, come responsabili della comunicazione cellula - cellula, sono coinvolte anche nei processi di insorgenza di patologie tumorali e metastatizzazione e in ambito medico - farmaceutico, sono sempre più utilizzate come biomarcatori per scopi diagnostici, vettori di farmaci o nanocostrutti ingegnerizzati (Zaborowski et al., 2015; Doyle e Wang, 2019; Borges et al., 2013). Questo è possibile grazie alla loro caratteristica peculiare di poter contenere al loro interno un carico attivo e consegnarlo ad un'altra cellula, influenzando in tal modo diverse funzioni fisiologiche e patologiche delle cellule riceventi incluse quelle della stessa linea da cui sono state secrete o isolate. Una volta rilasciate nello spazio extracellulare, le vescicole extracellulari in vivo passano nei fluidi corporei e raggiungono tessuti anche molto distanti dal luogo di genesi (Zaborowski et al., 2015; Yáñez-Mó et al., 2015; Doyle e Wang, 2019). Le cellule che ricevono le EV lo possono fare in diversi modi grazie alle proteine presenti sulla membrana delle EV, le quali presentano una certa affinità di legame con i ligandi presenti sulla membrana plasmatica delle cellule riceventi. Grazie alla fusione tra la membrana delle EV e la membrana della cellula il contenuto vescicolare può essere trasferito nella cellula bersaglio o, diversamente, le EV possono essere interiorizzate per endocitosi e/o fagocitosi (Tkach e Théry, 2016; Borges et al., 2013). In ambito biomedico le vescicole extracellulari sono dotate di elevata biomimeticità, essendo ben tollerate e con una lunga emivita di circolazione nei fluidi corporei, sono internalizzate in cellule di diverso tipo e si stanno rivelando una preziosa risorsa per lo sviluppo di nuove tecniche di diagnosi e cura in ambito di nanomedicina o medicina personalizzata. (Frank et al., 2018; Noguchi et al., 2019).



**Figura 1.2:** (A) Cellula contenente corpi multivescicolari che possono originare per endocitosi gli esosomi e dalla quale per invaginazione della membrana possono essere rilasciate le microvescicole; (B) cellula apoptotica che origina corpi apoptotici. Modificata da "Composition, Biological Relevance, and Methods of Study" (Zaborowski et al., 2015).

#### 1.3.1 Esosomi

Gli esosomi sono piccole vescicole coinvolte nella comunicazione tra cellule, indipendentemente dalla distanza a cui esse si trovano, e sono racchiusi da una singola membrana. Il loro diametro è tipicamente tra 40 e 120 nm, anche se in alcuni articoli risulta che il diametro sia compreso tra 30 e 100 nm (Zaborowski et al., 2015; Van Niel et al., 2018; Bebelman et al., 2018; Borges et al., 2013). Questa tipologia di vescicole extracellulari può essere secreta da tutti i tipi di cellule. Si possono trovare, come gran parte delle vescicole extracellulari, in molti dei fluidi umani come plasma, urine, sperma, saliva, liquido bronchiale, liquido cerebrospinale, latte materno, siero, liquido amniotico e lacrime (Doyle e Wang, 2019; Borges et al., 2013). Si formano per via endosomiale e la fusione tra corpi multivescicolari e membrana plasmatica porta alla formazione di vescicole intraluminali. In particolare, si ha una gemmazione verso l'interno della membrana esterna degli endosomi precoci che maturano in corpi multivescicolari durante il processo. A loro volta gli endosomi precoci derivano dal germogliamento, sempre verso l'interno, della membrana plasmatica cellulare e sono coinvolti nella selezione, nel riciclaggio, nello stoccaggio, nel trasporto e nel rilascio delle proteine (Doyle e Wang, 2019).

In origine si credeva che gli esosomi fossero il mezzo attraverso cui la cellula si liberava di materiale di scarto, mentre successivamente si è scoperto che essi sono una delle componenti più importanti dell'attiva rete di comunicazione cellula – cellula e sono coinvolti nella regolazione di numerosi processi fisiopatologici, come quelli che regolano l'immunità, l'insorgere di processi infiammatori e la tumorigenesi (Doyle e Wang, 2019, Borges et al., 2013). Anche a livello cerebrale sono fondamentali dal momento che promuovono la formazione di mielina e aiutano nella crescita dei neuriti, andando a svolgere un ruolo importante a livello di riparazione e rigenerazione dei tessuti (Doyle e Wang, 2019).

Approfondirne lo studio può ampliare il loro utilizzo come biomarcatori diagnostici, prognostici e predittivi e come strumenti nanotecnologici per lo sviluppo di nuove terapie. In ambito diagnostico gli esosomi si rivelano, infatti, particolarmente vantaggiosi come biomarcatori in quanto isolabili con delle biopsie liquide non invasive da fluidi corporei come sangue o urina, sono utili per diagnosticare un tumore, eventuali recidive o la risposta di un paziente ad un determinato trattamento (Doyle e Wang, 2019).

# 1.3.2 Microvescicole

Le microvescicole sono più grandi degli esosomi e hanno dimensioni variabili tra 100 nm e 1  $\mu$ m. A differenza degli esosomi, si formano per gemmazione diretta rivolta verso l'esterno e per fissione della membrana plasmatica della cellula (Zaborowski et al., 2015; Yáñez-Mó et al., 2015; Doyle e Wang, 2019; Borges et al., 2013). In origine venivano chiamate "polvere piastrinica" ed erano considerate materiale subcellulare derivante dalle piastrine presenti nel plasma e nel siero (Van Niel et al., 2018). Le microvescicole, quando prodotte da cellule tumorali, presentano dimensioni maggiori con un diametro che può raggiungere i 10  $\mu$ m e prendono il nome di oncosomi (Van Niel et al., 2018). Al loro interno sono contenute principalmente proteine citosoliche ed associate alla membrana plasmatica, ma sono presenti anche proteine del citoscheletro, integrine e proteine contenenti modificazione post-traduzionali (Doyle e Wang, 2019).

#### 1.3.3 Corpi apoptotici

I corpi apoptotici sono vescicole rilasciate nello spazio extracellulare dalle cellule quando si verifica il *blebbing* della membrana plasmatica durante l'apoptosi e possono essere più abbondanti degli esosomi o delle microvescicole in condizioni specifiche (Zaborowski et al., 2015). Le loro dimensioni non sono ben definite, infatti alcuni articoli riportano valori variabili da 50 fino a 2  $\mu$ m, mentre altri riportano dimensioni comprese tra 1000 nm e 5000 nm (Zaborowski et al., 2015; Yáñez-Mó et al., 2015; Doyle e Wang., 2019; Borges et al., 2013). La loro formazione è dovuta all'aumento della pressione idrostatica in seguito alla contrazione cellulare che provoca la separazione della membrana plasmatica dal citoscheletro quando la cellula sta per morire (Doyle e Wang, 2019, Borges et al., 2013). A differenza degli esosomi e delle microvescicole, i corpi apoptotici contengono organelli intatti, cromatina e piccole quantità di proteine glicosilate (Doyle e Wang, 2019).

#### 1.4 Metodi di conservazione delle vescicole extracellulari

Per un corretto utilizzo delle EV, siano esse appena isolate o ingegnerizzate, è opportuno scegliere le migliori tecniche di isolamento, purificazione e conservazione per garantire delle buone rese di preparati con alti standard di purezza e di stabilità dal punto di vista morfofunzionale (Jeyaram e Jay, 2017).

Le EV, estratte con le più svariate tecniche, tra le quali ultracentrifugazione, ultrafiltrazione e precipitazione, risultano sufficientemente stabili in fase liquida per qualche settimana, quando mantenute a temperatura ambiente. Tuttavia, in ambito farmaceutico è richiesta una durata di conservazione considerevolmente più lunga, anche di anni, che garantisca il mantenimento delle caratteristiche originali dei prodotti senza perdita di materiale o formazione di aggregati (Trenkenschuh et al., 2021; Abdelwahed et al., 2006).

Alcuni studi hanno posto a confronto la stabilità delle vescicole quando sottoposte a tre diversi tipi di conservazione:

- Crioconservazione a -80 °C
- a 4 °C
- a temperatura ambiente con liofilizzazione

In riferimento alle dimensioni iniziali delle vescicole alcuni studi riportano che non si sono riscontrate grosse differenze tra la conservazione a -80 °C e la liofilizzazione (Frank et al., 2018) mentre è stata registrata una diminuzione tra il numero di vescicole liofilizzate e il numero delle vescicole conservate a 4 °C o -80 °C, indicando una perdita di particelle o l'insorgenza di fenomeni di aggregazione (Trenkenschuh et al., 2021; Frank et al., 2018).

Analisi con microscopia elettronica a scansione (SEM) hanno confermato che in seguito alla conservazione a -80 °C la distribuzione delle dimensioni delle vescicole resta stabile, mentre a seguito di liofilizzazione viene osservata formazione di aggregati. Gli aggregati possono influenzare l'attività biologica delle EV, tuttavia, se presenti in numero trascurabile, non si ritiene compromettano la qualità dei prodotti risultanti che confermano la liofilizzazione come la più valida alternativa per la conservazione attualmente a disposizione del mondo della ricerca e dell'industria farmaceutica (Frank et al., 2018).

Sebbene ad oggi, per le EV, la liofilizzazione sia considerata un'ottima alternativa per la conservazione, questa metodica può causare danni di tipo meccanico anche molto diversi tra di loro (Trenkenschuh et al., 2021):

- formazione di cristalli di ghiaccio o di eccipiente tali da danneggiare la struttura esterna della vescicola
- esposizione alle interfacce ghiaccio liquido
- parziale precipitazione di eventuali soluzioni tampone che può causare variazioni di pH con conseguente peggioramento della stabilità dei colloidi e aumento della pressione osmotica extracellulare che potrebbe portare anche alla rottura delle vescicole
- disidratazione delle vescicole durante l'essiccamento che potrebbe portare ad un peggioramento della stabilità del prodotto finale

Per limitare l'insorgenza di questi danni, vengono aggiunti degli eccipienti con funzione protettiva alle soluzioni di vescicole da liofilizzare (Trenkenschuh et al., 2021) ed il prodotto, una volta liofilizzato, deve essere caratterizzato e rispondere ai seguenti requisiti (Abdelwahed et al., 2006):

- l'aspetto della matrice liofilizzata deve essere omogeneo e uniforme e la sua struttura porosa
- il tempo di ricostituzione della sospensione deve essere molto breve
- la distribuzione granulometrica deve essere bassa o non deve risultare modificata rispetto alle sospensioni originarie di nanoparticelle
- l'attività del farmaco deve rimanere invariata
- le caratteristiche chimico fisiche del prodotto liofilizzato si devono mantenere durante l'intero processo
- l'umidità residua all'interno del prodotto liofilizzato deve essere minore del 2%
- la formulazione deve presentare buona stabilità a lungo termine

L'ottimizzazione di un processo di liofilizzazione è quindi conseguente alla scelta degli eccipienti più adatti e all'individuazione delle migliori formulazioni atte a massimizzare la stabilità, l'attività biologica e la sicurezza dei prodotti ottenuti.

# 1.5 Liofilizzazione delle vescicole extracellulari

La liofilizzazione, tecnica di conservazione basata sul congelamento dell'acqua e sulla sua successiva rimozione, è il metodo più adatto per conservare materiali termolabili come le EV. Il prodotto, caratterizzato da un'ampia area superficiale, una volta liofilizzato può essere facilmente conservato e ricostituito nel mezzo scelto a seconda dell'applicazione che se ne andrà a fare. La liofilizzazione estende in maniera considerevole la loro durata rispetto a quanto fatto da altre tecniche di conservazione, ottimizzandone lo stoccaggio e riducendo i costi rispetto a quanto richiesto dal mantenimento del freddo per l'ultracongelamento (Bahr et al., 2020; Kusuma et al., 2018; Charoenviriyakul et al., 2018; Bjelošević et al., 2020; Kusuma et al., 2018). In seguito alla preparazione del campione e al suo congelamento (fase in cui la velocità di raffreddamento è inversamente proporzionale alla dimensione del cristallo di ghiaccio e in cui si verifica la nucleazione e la crescita del cristallo di ghiaccio), la rimozione dell'acqua avviene in due step consecutivi. Durante l'essiccamento primario l'acqua viene eliminata per sublimazione (passaggio diretto dallo stato solido allo stato gassoso grazie alla condizione di sotto pressione e temperature inferiori a 0°C) mentre durante l'essiccamento secondario viene eliminata per desorbimento (Bahr et al., 2020; Kusuma et al., 2018; Bjelošević et al., 2020). Come per la crioconservazione, anche durante la liofilizzazione il prodotto può essere soggetto a stress di diverso tipo sia durante la fase di congelamento che durante la successiva fase di essiccamento e per evitare danni alle strutture si rende necessario l'utilizzo di uno o più eccipienti nelle formulazioni (Bahr et al., 2020; Kusuma et al., 2018; Charoenviriyakul et al., 2018).

# 1.5.1 Eccipienti

Con il termine "eccipienti" si intendono tutte quelle sostanze aggiunte in un sistema di somministrazione di farmaci per dare stabilità rispondendo ai più alti standard di sicurezza (Bjelošević et al., 2020). Queste sostanze devono sempre essere bio ed emocompatibili, di alta qualità, chimicamente stabili, sterili, inerti, sicuri, e se possibile economici. Essi non dovrebbero inoltre in alcun modo interferire con gli effetti terapeutici del farmaco somministrato né indurre tossicità locale o sistemica (Bjelošević et al., 2020).

La scelta dell'eccipiente migliore per ogni formulazione dipende da vari fattori ed in prima istanza dal tipo di principio attivo al quale saranno aggiunti, in quanto potrebbe trattarsi sia di piccole sostanze chimiche sia di macromolecole biologiche. Lo scopo principale per cui vengono aggiunti gli eccipienti alle diverse formulazioni è quello di conferire al prodotto stabilità, ottenere una struttura compatta ed omogenea, avere un tempo di ricostituzione e un valore di umidità residua relativamente bassi. Come schematizzato in Figura 1.3. possono essere individuate quattro grandi classi di eccipienti quali gli stabilizzanti, gli agenti di bulking, i buffers e i tensioattivi.



**Figura 1.3:** Figura tratta da "Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation" con modifiche (Bjelošević et al., 2020).

#### 1.5.1.1 Stabilizzanti

Sono il gruppo di eccipienti di primaria importanza poiché garantiscono la stabilità sia chimica che fisica delle sostanze esposte al processo di liofilizzazione. Questa tipologia di eccipienti è di particolare rilievo perché, proprio grazie alla loro specifica funzione, consente di condurre la fase dell'essiccamento primario in condizioni più aggressive, riducendo in tal modo il tempo operativo relativo di questa fase ed ottimizzando conseguentemente l'intero processo di liofilizzazione (Bjelošević et al., 2020).

La scelta di uno stabilizzante dipende dal tipo di molecola che costituisce il principio attivo e dalla sua concentrazione, ma anche e soprattutto dalla compatibilità tra eccipiente e molecola farmacologica (Bahr et al., 2020; Bjelošević et al., 2020). La stabilizzazione durante la liofilizzazione si basa su due meccanismi principali (Bjelošević et al., 2020; Mensink et al., 2017):

- la vetrificazione: stabilizzazione di tipo cinetico direttamente legata alla temperatura di transizione vetrosa. Le biomolecole vengono immobilizzate all'interno della matrice costituita dallo stabilizzatore di tipo amorfo e le interazioni tra molecole sono in tal modo impedite.
- la sostituzione dell'acqua: stabilizzazione di tipo termodinamico. La sfera di solvatazione che si crea attorno alle EV viene sostituita da un legame di idrogeno. Le teste fosfolipidiche della membrana delle EV interagiscono con il legame idrogeno andando a formare una struttura amorfa che impedisce la fusione dei prodotti e stabilizza le proteine.

Tra gli zuccheri con funzione di stabilizzatori vi sono il saccarosio ed il trealosio. Nuovi potenziali stabilizzatori potrebbero essere alcuni polimeri come il polietilenglicole (PEG), il polivinilpirrolidone (PVP) a basso peso molecolare e le ciclodestrine (Bjelošević et al., 2020).

# 1.5.1.2 Agenti di bulking

Le formulazioni con una concentrazione di principio attivo inferiore all'1% necessitano di agenti di bulking quali zuccheri di diverso tipo, amminoacidi, mannitolo, destrano e PEG per aumentare la densità del prodotto finale e la temperatura massima alla quale può essere condotto lo step di essiccamento primario (Bjelošević et al., 2020).

Questa tipologia di eccipienti fornisce la struttura appropriata prodotto liofilizzato conferendole supporto meccanico e la giusta porosità. Tra gli eccipienti a disposizione in questa categoria, che tendono a rimanere amorfi durante la liofilizzazione e la conservazione, troviamo disaccaridi come lattosio, il saccarosio e il trealosio insieme a trisaccaridi come il raffinosio e polimeri come il destrano e il polivinilpirrolidone (PVP). Dal momento che questi eccipienti, ad eccezione destrano e dell'idrossietilcellulosa, presentano basse temperature di collasso la glicina e il mannitolo sono due gli agenti di bulking cristallini più usati e sovente preferiti a quelli amorfi. Entrambi, facilmente cristallizzabili e comodi da ricostituire, sono caratterizzati da alte temperature eutettiche (da circa -1°C a -3°C), utili per un essiccamento primario effettuato ad elevate temperature, così da prevenire il collasso e la perdita di struttura del prodotto finale (Jameel e Hershenson, 2010).

#### 1.5.1.3 Buffers

Il loro ruolo è quello di mantenere il pH della soluzione il più possibile vicino al valore di pH a cui il materiale da liofilizzare è stabile. È essenziale evitare che durante la liofilizzazione i sali dei *buffers* cristallizzino, perché questo comporterebbe instabilità nel prodotto finale a seguito di una modifica eccessiva del suo pH (Bjelošević et al., 2020). I tamponi più utilizzati sono quelli non costituiti da amminoacidi, come il fosfato di sodio, l'acetato, il citrato (preferibile perché i sali che lo costituiscono non tendono a cristallizzare ed è caratterizzato da un'elevata temperatura critica, caratteristica interessante per diminuire il tempo destinato all'essiccamento primario) e il succinato. Tra i tamponi costituiti da amminoacidi, invece, i più usati sono quelli costituiti da istidina (Bjelošević et al., 2020).

#### 1.5.1.4 Tensioattivi

Il loro ruolo è quello di impedire fenomeni di aggregazione sia tra le superfici proteiche del materiale biologico che all'interfaccia ghiaccio/aria/acqua. Questo è possibile grazie alla loro caratteristica peculiare di aumentare l'energia libera e ridurre la tensione superficiale presente all'interfaccia durante la liofilizzazione e durante la successiva fase di ricostituzione. I più usati sono i tensioattivi non ionici, come ad esempio il polisorbato 80 e 20: a differenza di quanto si osserva con i tensioattivi ionici, questi non favoriscono la denaturazione delle proteine. Durante l'utilizzo dei polisorbati, ovvero esteri degli acidi grassi del poliossietilene sorbitano, bisogna però prestare attenzione alla loro sensibilità all'ossidazione ed all'idrolisi. Infatti, i prodotti di degradazione che ne conseguono riducono notevolmente la stabilità delle biomolecole (Bjelošević et al., 2020).

#### 1.6 Fasi del processo di liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo che consiste nel rimuovere l'acqua da un campione congelato, più in generale da un prodotto solido umido, da una soluzione o da una dispersione sottoforma di ghiaccio, mediante sublimazione e desorbimento sottovuoto (Abdelwahed et al., 2006; Franks, 1998; Kasper e Friess, 2011; Kusuma et al., 2018). Il congelamento, per essere considerato completo, richiede la rimozione di oltre il 99% di acqua da una soluzione inizialmente diluita (Franks, 1998).

Come metodo di essiccamento, la liofilizzazione risulta essere particolarmente indicata per conservare sostanze sensibili al calore. Infatti, in ambito farmaceutico, è utilizzata con successo per la conservazione di virus, vaccini, proteine, peptidi, liposomi, nanoparticelle e nanoemulsioni (Abdelwahed et al., 2006; Merivaara et al., 2021; Kusuma et al., 2018).

La forza motrice per la liofilizzazione è data dalla differenza tra la pressione parziale dell'acqua sulla superficie del ghiaccio che sublima (p<sub>i</sub>) e sul condensatore (p<sub>c</sub>), legate dalla formula (Equazione 1.1) (Franks, 1998):

$$\log\left(\frac{p_c}{p_i}\right) \tag{1.1}$$

Essendo la tensione di vapore funzione della temperatura, la forza motrice può anche essere espressa in funzione della temperatura e non della pressione, dove al posto della  $p_c$  vi è la temperatura del condensatore e al posto della  $p_i$  vi è la temperatura della superficie sublimante (Franks, 1998). Il ciclo di liofilizzazione può essere diviso in tre fasi: congelamento (solidificazione), essiccamento primario (sublimazione del ghiaccio) ed essiccamento

secondario (desorbimento dell'acqua non congelata), come riportato in Figura 1.4 (Abdelwahed et al., 2006; Merivaara et al., 2021; Kasper e Friess, 2011).



**Figura 1.4:** Grafico generale dell'intero processo di liofilizzazione: il primo tratto (1) riporta le condizioni di pressione e temperatura relative alla fase di congelamento, il secondo (2) quelle relative all'essiccamento primario ed il terzo (3) le condizioni operative relative all'essiccamento secondario. Nel tratto finale del grafico (4) vi sono le condizioni di stoccaggio a cui possono essere mantenuti i campioni liofilizzati, ovvero temperatura e pressione ambiente. Al di sotto del grafico vi è uno schema rappresentante le trasformazioni subite dal campione durante la liofilizzazione a cui viene sottoposto. Figura tratta da "Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm" (Merivaara et al., 2021) con modifiche.

# 1.6.1 Congelamento

Durante il congelamento l'obiettivo è trasformare la maggior parte dell'acqua contenuta nel campione in ghiaccio. Questo passaggio può avvenire in un congelatore, in un bagno refrigerato o nello stesso liofilizzatore. La soluzione aquosa contenente il campione viene dapprima raffreddata e poi posta a super raffreddamento, portando la temperatura del campione al di sotto del punto di congelamento, con conseguente nucleazione e formazione/crescita di cristalli di ghiaccio (le due fasi che si susseguono durante il fenomeno della cristallizzazione) (Kasper e Friess, 2011).

La crescita dei cristalli di ghiaccio è successiva alla nucleazione, e, sebbene da un lato garantisca la definizione delle porosità nella struttura del materiale liofilizzato, dall'altro, la crescita dei cristalli minaccia l'integrità delle strutture biologiche presenti nel campione (Merivaara et al., 2021). Tuttavia, in questa prima fase, non è solo la formazione di cristalli di ghiaccio a minacciare l'integrità delle vescicole sottoposte a liofilizzazione. Il quantitativo di acqua che si congela, infatti, è direttamente proporzionale alla durata di questa prima fase, con conseguente aumento della concentrazione del liquido rimanente. Questo aumento di concentrazione potrebbe indurre fenomeni di aggregazione ed in alcuni casi anche la fusione

delle nanoparticelle, fenomeno indesiderato. L'aumento nella concentrazione si traduce però anche in un aumento della viscosità della soluzione, fino a che non è più possibile la formazione di ghiaccio. Quindi si ha la formazione di una fase o amorfa o cristallina, o ancora una fase combinata amorfa – cristallina (Abdelwahed et al., 2006; Merivaara et al., 2021).

Questa fase della liofilizzazione risulta determinante anche per le fasi successive di essiccamento: in presenza di sottoraffreddamento maggiore (quindi una temperatura di nucleazione minore), infatti, i nuclei si formano più rapidamente (nucleazione omogenea), ottenendo un numero maggiore di cristalli ma di dimensioni minori e con grande area superficiale. Ciò influisce sull'essiccamento primario imponendo tempistiche più lunghe e sull'essiccamento secondario con un tasso di desorbimento maggiore. Il fenomeno opposto si verifica con una temperatura di nucleazione maggiore: la nucleazione è di tipo eterogeneo, il numero di cristalli che si formano è inferiore ma caratterizzati da dimensioni più elevate (Merivaara et al., 2021). La velocità di raffreddamento influisce però anche sui tempi di ricostituzione: una velocità di raffreddamento relativamente lenta si è osservato corrispondere in molti casi a tempi di ricostituzione più brevi rispetto alle formulazioni che vengono congelate più rapidamente. Tuttavia, è da sottolineare che il tempo di ricostituzione non dipende solo dalla velocità di raffreddamento ma anche da altri parametri come la concentrazione delle proteine e la loro tipologia o la morfologia e la dimensione dei pori (Bjelošević et al., 2020).

Dal momento che la matrice del prodotto liofilizzato deve avere un aspetto compatto ed omogeneo, è fondamentale evitarne il collasso durante il processo di liofilizzazione. La temperatura di collasso (T<sub>c</sub>), ovvero la temperatura alla quale un campione collassa in seguito alla liofilizzazione, è caratteristica di ogni formulazione e può essere determinata sperimentalmente a partire da altre due temperature caratteristiche dei diversi campioni: la temperatura di transizione vetrosa con la massima concentrazione di congelamento (T<sub>g</sub>') per lo stato amorfo (generalmente la T<sub>c</sub> è superiore a T<sub>g</sub>' di 1 – 2 °C), la temperatura eutettica (T<sub>e</sub>) per lo stato cristallino (Merivaara et al., 2021). La fase di congelamento solitamente termina con una fase di *annealing*: il prodotto viene mantenuto ad una temperatura superiore alla temperatura finale del congelamento e poi la temperatura viene nuovamente abbassata alla temperatura impostata. In molti casi questa fase di ricottura permette di avere un'efficienza maggiore durante la successiva fase di essiccamento primario dal momento che rende possibile l'applicazione di temperature di essiccamento maggiori (Abdelwahed et al., 2006).

#### 1.6.2 Essiccamento primario

Durante la seconda fase, l'essiccamento primario, è prevista la sublimazione (passaggio diretto da ghiaccio a vapore) sottovuoto del ghiaccio dal prodotto che è stato appena congelato. Ciò permette di rimuovere circa il 95% dell'acqua contenuta nel prodotto da liofilizzare (Abdelwahed et al., 2006; Kasper e Friess, 2011). È la fase principale dell'essiccamento e generalmente è anche la fase più lunga dell'intero processo. La forza motrice è data dalla differenza di temperatura tra il ghiaccio e la superficie del condensatore, ed il calore, necessario per la sublimazione, viene fornito per irraggiamento, conduzione e convezione, come riportato in Figura 1.5. La temperatura del campione, tuttavia, dovrebbe rimanere comunque al di sotto della  $T_g$ ' o  $T_e$  onde evitare il collasso della matrice (Merivaara et al., 2021). La pressione della camera invece deve essere minore della tensione di vapore di saturazione del ghiaccio per facilitarne la sublimazione.

È proprio in questa fase che la struttura porosa prende forma: infatti, i pori che si trovano nel prodotto liofilizzato sono gli spazi che originariamente erano occupati dai cristalli di ghiaccio (Abdelwahed et al., 2006). L'essiccamento primario dipende sia dalla temperatura dello scaffale che dalla pressione della camera e l'ottimizzazione di questi due parametri permette anche di ridurre la durata di questa fase, considerando però che una temperatura eccessivamente alta può alterare la struttura del materiale (Abdelwahed et al., 2006).



**Figura 1.5:** Nello schema sono rappresentati i fenomeni a cui è soggetto un campione durante l'essiccamento primario. Il calore può essere fornito con tre diversi meccanismi: irraggiamento (1), conduzione (2) e convezione (3). Le frecce in rosso indicano il flusso di calore, le frecce in blu identificano il trasferimento di massa e in corsivo sono riportati alcuni dei fattori che influenzano la sublimazione durante questa fase. Figura tratta da" Preservation of biomaterials and cells by freezedrying: Change of paradigm" (Merivaara et al., 2021) con modifiche.

# 1.6.3 Essiccamento secondario

Nel corso di quest'ultima fase, considerevolmente più breve rispetto alla precedente, è prevista la rimozione per desorbimento dell'eventuale acqua non congelata che è stata assorbita dal prodotto. Infatti, al termine dell'essiccamento primario il prodotto può contenere ancora il 15 – 20% di acqua non congelata (Kasper e Friess, 2011; Merivaara et al., 2021). La temperatura operativa in questa fase viene ulteriormente aumentata: infatti, l'essiccamento secondario può essere condotta anche a temperature elevate, raggiunte però con rampe termiche lente, dal momento che la maggior parte del ghiaccio è già stata rimossa, e il rischio di collasso della matrice è minimo. Generalmente il residuo di acqua nei campioni dovrebbe essere compreso tra 0.5% e 3% (Merivaara et al., 2021). In seguito, vi è poi il riscaldamento del condensatore per andare a sciogliere e rimuovere il ghiaccio raccolto (Franks, 1998).

# 1.7 Scopo della tesi

Data l'importanza delle EV nel panorama biomedico e farmaceutico e data la necessità di ottenere un prodotto le cui caratteristiche originarie risultino inalterate e la cui stabilità sia

duratura nel tempo, l'obiettivo della tesi è stato l'ottimizzazione di un processo di liofilizzazione per la conservazione di EV isolate dal surnatante di linfociti B in coltura. Dal momento che durante la liofilizzazione le EV sono soggette a stress termici e meccanici, risulta essenziale aggiungere uno o più eccipienti alle formulazioni da liofilizzare, al fine di proteggere le EV durante l'intero processo. Diversi eccipienti sono stati analizzati con calorimetro differenziale a scansione e criomicroscopio per valutare rispettivamente la temperatura di transizione vetrosa/punto di eutettico (a seconda della natura amorfa o cristallina dell'eccipiente) e la temperatura critica. Grazie ai risultati ottenuti è stato possibile definire i parametri operativi necessari per la liofilizzazione. Successivamente le formulazioni di EV ed eccipienti sono state sottoposte a liofilizzazione. I prodotti sono stati analizzati con titolatore Karl Fisher per valutare la percentuale di umidità residua e, una volta ricostituiti, sono stati analizzati con lo strumento *Nanoparticle Tracking Analysis* per valutare la concentrazione e il diametro delle vescicole e fare delle considerazioni sull'efficacia degli eccipienti scelti.

Nel capitolo 1 si è discusso il ruolo di diversi tipi di nanoparticelle in ambito farmacologico e di *drug delivery* ponendo l'attenzione sull'importanza che le vescicole extracellulari, come classe biologica di NP, hanno in questo contesto. Trattando dei vari problemi riscontrabili in ambito di conservazione delle EV per applicazioni in ambito farmaceutico, si è discusso in maniera dettagliata di come l'ottimizzazione dei processi di liofilizzazione, mediante appositi eccipienti, fornisca una valida risposta, sicura ed efficace a ricercatori e clinici.

Nel capitolo 2 sono stati presentati gli strumenti e i materiali adottati per la preparazione e caratterizzazione dei campioni. Più nel dettaglio, per la caratterizzazione termica sono stati utilizzati il calorimetro differenziale a scansione ed il criomicroscopio. In seguito alla liofilizzazione i campioni sono stati caratterizzati dal punto di vista dimensionale con *Nanosight Tracking Analysis* e ne è stata valutata la percentuale di umidità residua attraverso titolatore Karl Fisher.

Nel capitolo 3 sono stati presentati e discussi i risultati ottenuti. In particolare, sono state valutate la temperatura di transizione vetrosa o il punto di eutettico a seconda della natura amorfa o cristallina dell'eccipiente e conseguentemente la temperatura critica. Inoltre, è stata valutata la distribuzione dimensionale dei campioni in seguito alla liofilizzazione al fine di capire se durante il processo si sono verificati fenomeni di aggregazione o frammentazione, ed è stata valutata la percentuale di umidità residua del prodotto liofilizzato.

Nel capitolo 4 sono state esposte le conclusioni che si possono trarre in seguito ai risultati ottenuti, se la scelta dei vari eccipienti è funzionale alla protezione delle EV, se con alcuni di essi vengono favoriti fenomeni indesiderati e se il valore di umidità residua rispecchia gli standard richiesti.

# **CAPITOLO 2**

# **MATERIALI E METODI**

#### 2.1 Isolamento di vescicole extracellulari (EV)

Le vescicole extracellulari utilizzate per gli esperimenti di questa tesi sono state isolate da linfociti B (IST-EBV-TW6B), acquistati presso la banca cellulare IRCSS AOU dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova in Italia. I linfociti sono stati coltivati nel terreno di coltura cellulare advanced RPMI 1640 (Gibco) a cui è stato aggiunto il 20% di siero fetale bovino (FBS, Gibco) e l'1% di L – glutammina 200 mM (Q, Lonza), mantenendo la densità cellulare tra 9x10<sup>4</sup> e 9x10<sup>5</sup> cellule/ml. Trascorsi 20 giorni di utilizzo, al terreno di coltura cellulare vengono ulteriormente aggiunti l'1% di Q e l'1% di soluzione di amminoacidi non essenziali (Sigma). Le cellule sono state coltivate in sterilità alla temperatura di 37 °C e il 5% di CO<sub>2</sub>, in fiasche non trattate da 75 cm<sup>2</sup> (Corning). Il terreno di coltura cellulare è stato integrato con FBS decomplementato, ottenuto riscaldando il FBS a 56 °C per 30 minuti, e 1% di penicillina/streptomicina (P/S, 10000 unità di penicillina e 10 mg di streptomicina/mL, Sigma). Per l'isolamento delle vescicole extracellulari i linfociti, questi sono stati coltivati per 72 ore in terreno advanced RPMI 1640 con 20% di FBS depletato, 1% Q e 1% P/S. Il FBS depletato è stato ottenuto tramite ultracentrifugazione a 100000g, 4 °C durante tutta la notte (ultracentrifuga Optima MAX - XP e rotore MLA - 50, Beckman Coulter). Il surnatante ottenuto è stato raccolto ed impiegato per integrare il terreno di coltura.

Per la produzione delle EV,  $1.5 \times 10^5$  linfociti/ml sono stati coltivati in un volume totale di 200 ml di terreno di coltura depletato in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> non trattate per 72 ore. Il protocollo di ultracentrifugazione differenziale sterile per l'isolamento delle EV è stato adattato da quello descritto da Théry et al., 2006. Per standardizzare la procedura ed evitare il recupero di corpi apoptotici sono stati processati sempre e solo surnatanti da colture con vitalità superiore o uguale al 90%. Di seguito viene riportato nel dettaglio il protocollo di ultracentrifugazione differenziale adottato per l'isolamento delle EV:

- Viene effettuata una prima centrifuga a 150g per 10 minuti a 4°C per scartare le cellule.
- Il surnatante viene recuperato e centrifugato a 2000g per 20 minuti a 4°C per eliminare le cellule morte.
- Il surnatante ottenuto viene ulteriormente centrifugato a 10000g per 30 minuti a 4°C per scartare i detriti cellulari.
- Il surnatante ottenuto viene caricato nei tubi da ultracentrifuga (32 mL, OptiSeal tubes, Beckman Coulter) e ultracentrifugato a 100000g, 4°C per 70 minuti per recuperare la frazione 100K di EV
- Il *pellet* contente le EV viene recuperato e risospeso in una soluzione salina tamponata con fosfato (PBS, Sigma) a 4°C filtrata con filtro da 0.1 μm e lavata mediante ulteriore ultracentrifugazione a 100000g, 4°C per 60 minuti.
- Il *pellet* viene recuperato e risospeso in 300 μl di soluzione salina fisiologica filtrata (0.9% w/V di NaCl, NovaSelect).

# 2.2 Caratterizzazione proteica: saggio di Bradford

Per determinare la concentrazione delle proteine totali di ciascun isolamento è stato effettuato un saggio di Bradford, un metodo quantitativo che consente di ottenere misure di assorbanza con l'ausilio del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250. Seguendo il protocollo come riportato da Théry et al.

# 2.3 Formulazioni

Per l'ottenimento di una buona struttura solida porosa nel prodotto, comunemente chiamata "torta", e per limitare l'impatto del processo di liofilizzazione sulla morfologia e sulla funzionalità delle vescicole extracellulari, si possono addizionare alle soluzioni contenenti EV degli eccipienti quali stabilizzatori, modificatori della temperatura di collasso (T<sub>c</sub>) o agenti di *bulking*.

Nell'ambito di questa tesi è stato testato l'effetto di diversi eccipienti durante la liofilizzazione delle EV, in particolare:

- Polisaccaridi: saccarosio (purezza 99%, Fluka), lattosio (Lattosio anidro, Fluka) e trealosio (D(+) Trealosio diidrato, purezza 99%, Acros Organics).
- Ciclodestrina: H  $\beta$  ciclodestrina ((2 Idrossipropil)  $\beta$  ciclodestrina, Mw  $\approx$  1460, Aldrich Chemistry).
- Poliolo: mannitolo (Mannitolo D(-), purezza 98+ %, Chem Lab).
- Amminoacido: glicina (Glicina, purezza  $\geq$  98,5 %, Sigma Aldrich).
- Polimero: destrano (Destrano 40,  $M \approx 40000$  g/mol, PamReac AppliChem).

I polisaccaridi e la ciclodestrina sono stati scelti per la loro funzione di stabilizzatori, il poliolo e l'amminoacido come agenti di *bulking* e il destrano come modificatore della temperatura di collasso (T<sub>c</sub>). Come solvente è stata utilizzata soluzione fisiologica come per le risospensioni delle vescicole extracellulari dopo l'isolamento. Gli eccipienti sono stati utilizzati in varie concentrazioni peso/volume e combinazioni per andare a formare le soluzioni descritte in Tabella 2.1.

CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (w/V)
Fisiologica (NaCl)	0.9%
Saccarosio	5%
Saccarosio	10%
Trealosio	5%
Trealosio	10%
Lattosio	5%
Lattosio	10%
Mannitolo	5%
Mannitolo	10%

<b>Tabella 2.1.</b> Elenco delle formulazioni; nelle celle riguardanti le combinazioni di diversi eccipienti so	no
stati indicati con la loro iniziale, D = destrano, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccaros	sio,
T = trealosio	

Glicina	5%
Glicina	10%
Destrano	5%
Destrano	10%
$H - \beta$ – ciclodestrina	5%
$H - \beta$ – ciclodestrina	10%
Trealosio – destrano	4% T – 1% D
Trealosio – destrano	7% T – 3% D
Trealosio – destrano	5% T – 5% D
Saccarosio – destrano	7% S – 3% D
Saccarosio – destrano	5% S – 5% D
Lattosio – destrano	7% L – 3% D
Lattosio – destrano	5% L – 5% D
Trealosio – destrano – mannitolo	7% T – 2% D – 1% M
Trealosio – destrano - glicina	7% V T – 2% D – 1% G

# 2.4 Caratterizzazione termica

Prima di definire il ciclo di liofilizzazione è stata effettuata la caratterizzazione termica delle soluzioni contenenti eccipienti per studiarne le proprietà. A questo scopo sono stati utilizzati due strumenti, un calorimetro differenziale a scansione (DSC Q200, TA Instruments, New Castle, DE, USA) e un *Freeze Drying Microscope* (FDM BX51, Olympus Europa, Amburgo, Germania), ovvero i due strumenti più comuni per determinare la temperatura di transizione vetrosa, la temperatura eutettica e la temperatura di collasso (Horn e Friess, 2018).

# 2.4.1 DSC

La calorimetria differenziale a scansione si basa sulla differenza di flusso di calore tra il campione in esame e un riferimento inerte in funzione del tempo e della temperatura. Quest'analisi permette di caratterizzare i campioni dal punto di vista termico registrando eventi endotermici (transizione vetrosa, fusione, evaporazione e trasformazioni polimorfiche) ed esotermici (cristallizzazione, ossidazione e decomposizione).

Per la caratterizzazione termica al fine della liofilizzazione l'attenzione è stata posta sul punto di eutettico e sulla temperatura di transizione vetrosa, a seconda della natura cristallina o amorfa del campione. Le miscele eutettiche presentano una temperatura di fusione inferiore a quella dei singoli componenti che le costituiscono (Gotor – Fernández e Paul, 2019). All'abbassarsi della temperatura si osserva, quindi, una separazione tra l'acqua e il soluto, costituito sia dall'eccipiente che dal sale appartenente alla fisiologica. Quando il congelamento è completato per tutti i componenti, la temperatura rilevata in quel momento si definisce temperatura eutettica. Nel caso di soluzioni amorfe, invece, al diminuire della temperatura, la viscosità della miscela aumenta (il modulo di Young aumenta da valori dell'ordine di Mpa a

valori dell'ordine di GPa) e, quando l'acqua cristallizza e la miscela solidifica con le caratteristiche di un solido vetroso, si ottiene la temperatura di transizione vetrosa (Chen et al., 2021; Meister e Gieseler, 2009).

20-30 µl di campione vengono posti in un contenitore di alluminio, chiamato padellino (Tzero, TA Instruments), con coperchio Tzero hermetic Lid, sempre di alluminio (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Queste due parti vengono sigillate ermeticamente a freddo con la Tzero Press (TA Instruments, New Castle, DE, USA), uno strumento in dotazione con la DSC che sfrutta la pressione applicata meccanicamente per sigillare le due superfici in alluminio del padellino e del rispettivo coperchio e per mantenere il campione isolato dall'ambiente esterno. Il campione sigillato a sua volta viene posto all'interno della camera del DSC Q200 (riportato in Figura 2.1), insieme al campione inerte di riferimento. Grazie ad un apposito software (TA Instrument Explorer e TA Universal Analysis), è possibile impostare le rampe termiche di interesse ed analizzare il grafico risultante. Le condizioni di bassa temperatura e di atmosfera inerte sono mantenute da una flusso di azoto.



Figura 2.1: DSC Q200 TA Instruments.

Per tutti gli eccipienti testati si è scelta un'unica rampa termica che prevedeva il raggiungimento di -60 °C a 1 °C/min e la risalita a 25 °C a 5 °C/min. Al termine della prova, sul grafico risultante è stato valutato il punto di eutettico o la temperatura di transizione vetrosa (a seconda della natura cristallina o amorfa del campione).

Un grafico tipico che si ottiene dalle analisi con DSC, come rappresentato in Figura 2.2, presenta sull'asse orizzontale la temperatura del campione, mentre sull'asse verticale la portata di calore emessa o assorbita dal campione a seconda dei passaggi di stato subiti. I fenomeni di natura endotermica, come la transizione vetrosa, punto di eutettico, la fusione, l'evaporazione

e le trasformazioni polimorfiche, sono rappresentate sul grafico con picchi rivolti verso il basso (o punti di flesso nel caso della transizione vetrosa). Al contrario i fenomeni di natura esotermica, come la cristallizzazione, l'ossidazione e la decomposizione, sono rappresentati da picchi rivolti verso l'alto.

In particolare, la transizione vetrosa, essendo un fenomeno di natura endotermica viene rappresentato con un punto di flesso (riportato in Figura 2.2A). Il punto di flesso individua la temperatura di transizione vetrosa, T<sub>g</sub>', ovvero la temperatura alla quale il soluto passa allo stato vetroso. Da questi campioni, una volta liofilizzati, si ottiene una matrice più fluida proprio grazie alle caratteristiche vetrose che la contraddistinguono.

In presenza di eccipienti cristallini invece, si ha un punto eutettico (riportato in Figura 2.2B). Essendo un fenomeno di natura endotermica viene rappresentato con un picco verso il basso il cui vertice coincide con la temperatura del punto di eutettico, T<sub>e</sub>, ovvero la temperatura alla quale il soluto solidifica in una struttura cristallina. Da questi campioni, invece, la matrice che si ottiene in seguito alla liofilizzazione presenta caratteristiche più eterogenee dal momento che la struttura è reticolare e cristallina.

In generale, all'abbassarsi della temperatura si osserva la cristallizzazione del campione (riportata in Figura 2.2C). Si tratta di un fenomeno di natura esotermica e viene rappresentato con un picco verso l'alto.

All'aumentare della temperatura, invece, il campione fonde. Essendo la fusione un fenomeno endotermico viene rappresentato con un picco rivolto verso il basso (riportato in Figura 2.2D).



**Figura 2.2:** Esempio di fenomeni, endotermici ed esotermici, osservabili con DSC. In presenza di eccipiente amorfo (A) si ha una transizione vetrosa. In presenza di eccipienti cristallini (B) si ha un punto di eutettico. All'abbassarsi della temperatura si verifica la cristallizzazione (C) mentre all'aumentare della stessa la fusione (D).

#### 2.4.2 FDM o crio - microscopio

Una volta completata la caratterizzazione con il calorimetro differenziale a scansione, i campioni sono stati sottoposti ad un'ulteriore analisi con il *Freeze Drying Microscope* BX51con regolatore di temperatura PE95 – T95 (Linkam, Scientific Instruments, Tadworth, Surrey, Regno Unito), riportato in Figura 2.3.



**Figura 2.3:** FDM BX51 Olympus, criomicroscopio utilizzato per le prove in laboratorio; all'interno dell'ovale rosso è messa in evidenza la camera del microscopio all'interno della quale viene depositato il campione da analizzare.

Attraverso l'impostazione di una rampa termica e l'azionamento di una pompa da vuoto, nella camera del microscopio si possono ricreare le condizioni della liofilizzazione. Infatti, ogni prova è stata caratterizzata da tre fasi: una prima fase di congelamento a pressione atmosferica, il vuoto a circa 10 Pa grazie alla pompa da vuoto e il successivo aumento di temperatura per la fase di essiccamento. All'interno della camera del microscopio (cerchio rosso in Figura 2.3) viene posto un apposito vetrino (Linkam) sopra al quale viene depositata una goccia di campione di circa 3 µl. La goccia viene coperta da un altro vetrino di uguale dimensione e la camera del microscopio viene chiusa. È possibile visualizzare le modifiche che subisce il campione durante l'analisi grazie ad un fascio di luce nel campo del visibile che illumina il campione e un sistema di lenti che ne ingrandisce l'immagine. Il campione è stato congelato a -60°C a 5°C/min, poi è stato fatto il vuoto con una pompa da vuoto fino a 10 Pa, mentre per la fase di essiccamento la temperatura è stata riportata ad un valore di 20°C con una velocità variabile. Infatti, è stato individuato un intervallo di temperatura pari a 10 °C (+5 °C e -5 °C rispetto alla temperatura di transizione vetrosa o punto di eutettico a seconda del campione in analisi): da -60°C al limite inferiore dell'intervallo di maggiore interesse la velocità è stata impostata pari a 5 °C/min, una velocità di 1 °C/min è stata impostata per l'intervallo di maggiore interesse e poi dal limite superiore dell'intervallo di interesse ai 20 °C la velocità è stata impostata a 10 °C/min.

# 2.5 Preparazione delle soluzioni per liofilizzazione

Mediante l'uso del calorimetro differenziale a scansione ed il criomicroscopio è stato possibile selezionare un set di formulazioni che sono state poi usate per i successivi esperimenti. 300  $\mu$ l di campione contenente per ciascun eccipiente le concentrazioni in studio sono stati posti in vials 2R (Soffieria Bertolini). Per i campioni contenenti le EV precedentemente quantificate al Bradford, sono stati preparati 300  $\mu$ l di soluzione contenente 50  $\mu$ g/ml di vescicole extracellulari e le relative concentrazioni di eccipienti. I campioni sono poi stati conservati a - 80 °C fino al momento della liofilizzazione.

# 2.6 Liofilizzazione

Per la liofilizzazione dei campioni è stato usato un liofilizzatore REVO® (Millrock Technology, Kingston, USA), Figura 2.4. La camera interna è in acciaio inossidabile 316L su tutte le parti a contatto con il fluido dove sono disposti i flaconi; lo sbrinamento del condensatore avviene con gas caldo. Parte integrante del liofilizzatore è la pompa del vuoto, fondamentale per l'intero processo dal momento che permette di rimuovere i gas incondensabili e di creare l'ambiente a bassa pressione per la sublimazione. I sensori di pressione sono due: uno di tipo capacitivo (Baratron) ed uno di tipo termo – conduttivo (Pirani).



Figura 2.4: Liofilizzatore REVO® Millrock Technology.

I campioni sono stati precongelati a -80°C, quindi è stata impostata una temperatura di set point del liofilizzatore pari a -50 °C per accogliere i campioni all'interno del liofilizzatore. Una volta raggiunta la temperatura di -50 °C sono stati prelevati i campioni dall'ultracongelatore a -80 °C e caricati nel liofilizzatore come riportato in Figura 2.5. È stato quindi avviato l'essiccamento primario creando il vuoto ad una pressione di circa 100 µbar ed impostando una temperatura di -10 °C con una rampa di 0.5 °C/min e questa temperatura è stata mantenuta per una durata sufficiente affinché la sonda Pirani e la sonda Baratron registrassero lo stesso valore. Infatti, la sonda Pirani registra valori di pressione più elevati in presenza di vapore acqueo, mentre la sonda Baratron, essendo di tipo capacitivo, non è influenzata dalla presenza di vapore acqueo. Durante la fase di essiccamento primario, poiché la quantità di vapore acqueo decresce nel tempo, la curva Pirani determinata dai valori di pressione registrati dall'analoga sonda decresce; l'intersezione con la curva Baratron determina l'assenza di vapore acqueo all'interno della camera del liofilizzatore e la conseguente fine dell'essiccamento primario.

Per l'essiccamento secondario è stata impostata una temperatura di 20 °C con una rampa di 0.5 °C/min e questa temperatura è stata mantenuta per una durata di 12 ore.

Finita questa fase è stato rilasciato il vuoto e i campioni sono stati scaricati.



**Figura 2.5:** Disposizione delle *vials* contenenti i campioni e posizionamento all'interno della camera del liofilizzatore.

# 2.7 NTA

Per determinare le dimensioni delle EV isolate è stata utilizzata la *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA). Si tratta di un'analisi utile per la caratterizzazione dimensionale e per il tracciamento di nanoparticelle, con dimensione variabile tra 10 nm e 1  $\mu$ m, in soluzione. Alla base di questa tecnologia vi sono le proprietà del moto Browniano e della diffusione della luce. Viene effettuata una registrazione del flusso delle particelle e un apposito software rileva il centro delle singole particelle. Riuscendo a misurare anche la distanza standard dalle singole particelle lungo i piani "x" e "y" si può ottenere il valore del coefficiente di diffusione. Se sono note la viscosità del solvente e la temperatura a cui viene analizzato il campione, grazie all'equazione di Stokes Einstein (Equazione 2.1) è possibile valutare il diametro idrodinamico equivalente delle particelle.

$$D_t = \frac{T * K_b}{3\pi * \eta * d} \tag{2.1}$$

Dove  $D_t$  = coefficiente di diffusione, T = temperatura del campione, K<sub>b</sub> = costante di Boltzmann,  $\eta$  = viscosità del solvente, d = diametro idrodinamico.

Lo strumento usato era un *NanoSight* NS300 (Malvern Panalytical) dotato di raggio laser ( $\lambda = 505$  nm), pompa a siringa Nanosight e software NTA 3.4 (Figura 2.6).



**Figura 2.6:** Nanosight NS300 utilizzato per determinare la concentrazione e la distribuzione di taglia delle EV.

Per le analisi i vari campioni sono stati diluiti opportunamente per ottenere un volume finale pari a 500  $\mu$ l in soluzione fisiologica. La diluzione è stata valutata per ogni campione in modo tale che l'indice particelle/frame risultasse compreso tra 20 e 100. Per ognuno dei campioni sono stati acquisiti tre video della durata di 60 secondi ciascuno. La velocità della pompa siringa è stata impostata pari a 50 A.U. e il "camera level" tra 15 e 16. Al termine delle prove i video sono stati analizzati dal software con una "detection threshold" pari a 5.

#### 2.8 Titolazione Karl Fisher, valutazione della percentuale di umidità residua

Al termine delle prove di liofilizzazione è stata effettuata la titolazione di tipo coulometrico Karl Fisher per verificare e quantificare la presenza di umidità all'interno dei campioni.

Infatti, questo metodo si basa sull'utilizzo di un reattivo che reagisce quantitativamente e in maniera selettiva con l'acqua. È stato utilizzato a tal scopo il titolatore Karl Fisher (CA – 31 Moisture Meter, Mitsubishi Chemical Analytech, titolazione coulometrica), riportato in Figura 2.7.

I sistemi di titolazione sono due: uno di tipo volumetrico e uno di tipo coulometrico. Entrambi si basano sull'Equazione 2.2.

$$H_2O + I_2 + SO_2 + CH_3OH + 3base \rightarrow base * HSO_4CH_3 + 2base * HI \qquad (2.2)$$

In particolare, per la titolazione coulometrica si aggiunge il campione ad una soluzione elettrolitica e l'ossidazione elettrolitica provoca la produzione di iodio con reazione secondo Karl Fisher Equazione 2.3.

$$2I^- \to 2e^- + I_2 \tag{2.3}$$

In accordo con la legge di Faraday lo iodio prodotto è proporzionale alla quantità di energia elettrica ed in tal modo si può determinare la quantità di acqua contenuta nel campione analizzato.



**Figura 2.7:** Titolatore Karl Fisher utilizzato per le analisi del residuo di umidità dei campioni liofilizzati.

Per i campioni contenenti mannitolo, glicina e destrano è stato usato come reagente la formammide (Honeywell, Fluka), mentre per tutti gli altri Hydranal (Mw  $\approx$  32,04, 99%, Fluka).

Il Protocollo adottato per i campioni risospesi in formammide è il seguente:

- Determinazione del bianco con la formammide. Questa misura è stata ripetuta in triplicato per ottenere il valor medio di massa reagita  $(m_b)$  e di quantità di umidità contenuta nel campione analizzato  $(g_{H2Ob})$ .
- È stato ricavato il peso della matrice del prodotto liofilizzato.
- Il campione è stato risospeso in formammide e pesato.
- una quantità nota del campione viene iniettata all'interno dello strumento.
- Per calcolare la percentuale di umidità contenuta nei vari campioni si è usata l'Equazione 2.3.

% umidità = 
$$\frac{g_{H2Osolido} x100}{F \cdot g_{H2Osolido}}$$
 (2.3)  
dove  $g_{H2Osolido} = g_{H2Ototale} - \frac{Qx10^{-6}xI}{R}$   
 $g_{H2Ototale} = \frac{Kx10^{-6}x(I+F)}{J}$   
K = valore di umidità residua registrato dallo strumento al termine di ogni  
misurazione  
I = quantità di solvente iniettato  
F = peso della matrice del prodotto liofilizzato  
J = quantità di campione impiegata per la misurazione  
Q = umidità residua valutata con la determinazione del bianco  
R = massa di formammide reagita durante la determinazione del bianco

Il triplicato per il bianco dei campioni risospesi in Hydranal è stato fatto sostituendo la formammide con *water standard* e il residuo di umidità è stato calcolato mediante l'Equazione 2.4:

% umidità = 
$$\frac{g_{H2Ototale} \times 100}{F \cdot g_{H2Ototale}}$$
 (2.4)  
dove  $g_{H2Ototale} = \frac{K \times 10^{-6} \times (I+F)}{J}$ 

K = valore di umidità residua registrato nello strumento al termine di ogni misurazione

I = quantità di solvente iniettato

F = peso della matrice del prodotto liofilizzato

J = quantità di campione impiegata per la misurazione

#### 2.9 Analisi statistica

I dati sono stati espressi come medie  $\pm$  Errore Standard (ES). Le comparazioni sono state fatte mediante t test.

Sono state considerate significative le comparazioni con \*p < 0.05 e \*\* p < 0.001.
# **CAPITOLO 3**

### RISULTATI

#### 3.1 Scelta degli eccipienti e liofilizzazione

Le vescicole extracellulari, mediatrici della comunicazione intercellulare all'interno dell'organismo, sono in grado di trasportare biomolecole come lipidi, proteine e acidi nucleici. Sono caratterizzate da un'alta capacità di carico, proprietà di *targeting* e una bassa immunogenicità (Lu et al., 2017). Grazie a queste caratteristiche intrinseche, sono in fase di studio per lo sviluppo di sistemi per il trasporto di farmaci, per l'immunoterapia e la diagnosi di diversi tipi di malattie, tra cui i tumori. (Trenkenschuh et al., 2021; Lu et al., 2017). Generalmente vengono conservate tramite congelamento a -80 °C; tuttavia questo metodo di conservazione le rende poco fruibili in clinica a causa della difficoltà nel mantenimento della catena del freddo. Un metodo alternativo per la loro conservazione che si sta affermando negli ultimi anni è la liofilizzazione. Questo metodo garantisce la stabilità di prodotti delicati, anche per lunghi periodi, a temperature più elevate (temperatura ambiente o 4°C), rendendo più semplice il trasporto e non richiedendo costosi ultracongelatori (Trenkenschuh et al., 2021; Charoenviriyakul et al., 2018).

Tuttavia, durante il processo di liofilizzazione, le vescicole extracellulari sono sottoposte a stress termici e meccanici. Durante il congelamento le EV sono sottoposte a stress dovuti alla formazione di cristalli di ghiaccio, alla crioconcentranzione dei soluti e alla formazione di gradienti osmotici. Successivamente la rimozione di acqua da soluti crioconcentrati aumenta le interazioni tra le catene di acidi grassi e, quindi, la densità dei doppi strati lipidici, causando aggregazione (Susa et al., 2021). Per evitare questi effetti indesiderati possono essere aggiunti degli eccipienti che interagiscano con le teste lipidiche polari e mantengano lo stato cristallino originale (Charoenviriyakul et al., 2018).

Per questo progetto di tesi sono state prese in considerazione le formulazioni sottoelencate le cui concentrazioni sono state espresse in percentuali massa/volume (w/V) risospesi in soluzione fisiologica:

- Destrano 5% w/V
- Destrano 10% w/V
- Fisiologica 0.9% w/V NaCl
- Glicina 5% w/V
- Glicina 10% w/V
- $H \beta$  ciclodestrina 5% w/V
- $H \beta$  ciclodestrina 10% w/V
- Lattosio 5% w/V
- Lattosio 10% w/V
- Mannitolo 5% w/V
- Mannitolo 10% w/V
- Saccarosio 5% w/V
- Saccarosio 10% w/V
- Trealosio 5% w/V
- Trealosio 10% w/V
- Lattosio 5% w/V destrano 5% w/V
- Lattosio 7% w/V destrano 3% w/V

- Saccarosio 5% w/V destrano 5% w/V
- Saccarosio 7% w/V destrano 3% w/V
- Trealosio 4% w/V destrano 1% w/V
- Trealosio 5% w/V destrano 5% w/V
- Trealosio 7% w/V destrano 3% w/V
- Trealosio 7% w/V destrano 2% w/V glicina 1% w/V
- Trealosio 7% w/V destrano 2% w/V mannitolo 1% w/V

Con il calorimetro differenziale a scansione e il criomicroscopio sono state analizzate rispettivamente la temperatura di transizione vetrosa  $(T_g')$  o il punto di eutettico  $(T_e)$  (a seconda della natura rispettivamente amorfa o cristallina dell'eccipiente) e la temperatura critica di collasso  $(T_c)$ .

I risultati di tutte le formulazioni testate sono riportati in Tabella 3.1. In Figura 3.1 vengono riportati i risultati ottenuti rispettivamente con la DSC e con il FDM per il campione destrano 5% w/V, per le altre formulazioni vedere in Appendice.

**Tabella 3.1.** Tabella contenente i risultati ottenuti con DSC e FDM di tutte le formulazioni testate; nelle formulazioni contenenti più di un eccipiente sono state utilizzate le iniziali di ognuno di essi con le relative concentrazioni (T = trealosio, D = destrano, M = mannitolo, G = glicina, L = lattosio, S =

Campione	Concentrazione (%w/V)	Tg' (°C)	Eutettico (°C)	Tc (°C)
Fisiologica (NaCl)	0.9%		-20.9	-50.9
Saccarosio	5%	-47.0		-40.2
Saccarosio	10%	-39.2		-33.1
Trealosio	5%	-46.6		-40.1
Trealosio	10%	-39.4		-41.2
Lattosio	5%	-44.6		-47.1
Lattosio	10%	-37.1		-29.2
Mannitolo	5%		3.8	-45.3
Mannitolo	10%		2.6	-38.1
Glicina	5%		-24.8	-39
Glicina	10%		-25.0	-24.2
Destrano	5%	-26.6		-24.4
Destrano	10%	-19.4		-15.4
H-β-ciclodestrina	5%	-36.8		-38.1
H-β-ciclodestrina	10%	-27.0		-24.1
Trealosio-destrano	4% T - 1% D	-41.7		-40.3
Trealosio-destrano	7% T - 3% D	-34.0		-31.2
Trealosio-destrano	5% T - 5% D	-30.3		-24.7
Saccarosio-destrano	5% S - 5% D	-32.7		-29.3

saccarosio).

Saccarosio-destrano	7% S - 3% D	-36.1	-33.9
Lattosio-destrano	5% L - 5% D	-29.9	-24.5
Lattosio-destrano	7% L - 3% D	-33.2	-29.2
Trealosio-destrano-glicina	7% T - 2% D - 1% G	-39.2	-34.0
Trealosio-destrano- mannitolo	7% T - 2% D - 1% M	-37.7	-33.3



**Figura 3.1:** Risultati ottenuti con DSC (A e B) e FDM (C) per il campione destrano 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -26.62 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -24.4 °C.

L'analisi termica tramite DSC è fondamentale per ottimizzare il processo di liofilizzazione: infatti, l'essiccamento primario andrebbe sempre condotto ad una temperatura inferiore rispetto a quella di collasso del prodotto.

In base a questi risultati si sono esclusi dalle successive analisi i campioni costituiti da trealosio – destrano 4% - 1% w/V, trealosio – destrano – glicina 7% - 2% - 1% w/V e trealosio – destrano – mannitolo 7% - 2% - 1% w/V, poiché l'insieme degli eccipienti non produceva significativi incrementi delle temperature critiche come desiderato. In generale, si riscontrano temperature critiche molto basse e questo è dovuto alla presenza del sale NaCl (cloruro di sodio) nella soluzione fisiologica che, interagendo con gli eccipienti, ne abbassa sensibilmente la temperatura di collasso (Lu e Pikal, 2004; Rasmussen et al., 1997).

In particolare, con il FDM è stato possibile osservare l'avanzamento del fronte della matrice liofilizzata fino al completo collasso della struttura. A titolo di esempio vengono riportati le immagini di una prova corrispondente al campione di destrano al 5% w/V, Figura 3.2.



**Figura 3.2:** Sequenza di immagini durante la caratterizzazione del destrano 5% w/V con *FDM* nella prima immagine (A, T = -51.8 °C) vi è la goccia congelata, nelle foto (B, T = -41.9 °C) – (C, T = -32.0 °C) – (D, T = -28.4 °C) vi è il progressivo avanzamento del fronte della goccia, che corrisponde alla formazione della matrice liofilizzata. Nell'immagine (E, T = -24.4 °C) vi è l'insorgenza delle prime discontinuità all'interno della matrice che portano, attraverso i frame (F, T = -22.5 °C) – (G, T = -20.5 °C) – (H, T = -15.0 °C), al totale collasso della struttura. L'istante in cui si osservano le prime discontinuità determina la temperatura di collasso della soluzione.

Come si evince dai risultati ottenuti da queste prime due prove, alcune formulazioni, in particolare la fisiologica, il lattosio al 5% w/V, il mannitolo 5% w/V, la glicina 5% w/V, presentano temperature critiche molto più basse rispetto ad altri campioni e questo fa supporre il collasso della struttura durante l'essiccamento primario. In generale si è potuto osservare che un aumento di concentrazione dell'eccipiente nella formulazione ha dato anche sensibili miglioramenti nella temperatura critica.

I campioni sono stati precongelati a -80°C. Nel liofilizzatore sono poi state effettuate l'essiccamento primario e secondario: si è scelta una velocità di 0.5 °C/min per portare la temperatura da -50 °C a -10 °C ed una pressione di 100  $\mu$ bar. Per l'essiccamento secondario la

pressione è stata mantenuta costante e si è scelta una velocità di 0.5 °C/min per portare la temperatura da -10 °C a 20 °C. Sono state effettuate tre liofilizzazioni mantenendo costanti però sia i parametri operativi che le formulazioni.

Le formulazioni contenenti saccarosio e trealosio in entrambe le concentrazioni, e il lattosio al 5% w/V non hanno portato alla formazione di una matrice omogenea, compatta e porosa durante il processo di liofilizzazione, a causa della loro temperatura critica molto bassa ed al contenuto di acqua residua troppo elevato (tra il 7% e il 10%, risultati ottenuti con titolatore Karl Fisher), mentre tutte le altre formulazioni hanno portato alla formazione di una matrice strutturata che conserva il suo volume originario. In Figura 3.3 sono riportate una struttura con percentuale di umidità residua troppo elevata (Figura 3.3 A) e un campione liofilizzato correttamente (Figura 3.3B).



**Figura 3.3:** Campione A: saccarosio 5% w/V presenta una struttura con percentuale di umidità residua troppo elevata. Campione B: destrano al 5% w/V con struttura integra, compatta ed omogenea.

#### 3.2 Caratterizzazione con Nanosight

I campioni liofilizzati contenti EV sono stati analizzati tramite NTA. L'analisi restituisce informazioni riguardo la concentrazione del campione in termini di particelle per ml di soluzione e le dimensioni.

In Figura 3.4 viene mostrato un esempio delle distribuzioni ottenute tramite NTA. In particolare, la distribuzione delle EV conservate in -80 (Figura 3.4A) è monodispersa, con un picco in corrispondenza di 113 nm, mentre quella delle EV liofilizzate senza l'aggiunta degli eccipienti (Figura 3.4B) presenta una distribuzione più eterogenea con vari picchi a 74, 101, 141 nm. Come dimostrato dai due grafici, la liofilizzazione danneggia fortemente le EV, andando a creare una forte aggregazione delle vescicole o una perdita delle stesse durante il processo. L'aggiunta di alcuni eccipienti alla formulazione riesce a preservare con successo la

struttura delle EV e, come si può notare dalla figura 3.4C, la distribuzione è simile a quella delle EV conservate in -80 con un picco a 113 nm, mentre altri non riescono a sopperire a questo compito, e si ottengono risultati simili alla fisiologica, come mostrato in figura 3.4D, con picchi a 107 e 170 nm. Tutti gli altri eccipienti sono riportati in Appendice. In Tabella 3.2 sono state riportate le medie delle concentrazioni e dei diametri delle EV conservate in -80, liofilizzate in fisiologica e liofilizzate in presenza dei vari eccipienti. Le medie sono state calcolate su un minimo di sei misure.



**Figura 3.4:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV conservate a -80°C (A), EV liofilizzate in sola fisiologica (B), EV liofilizzate con destrano 10% w/V (C) ed EV liofilizzate con lattosio 10% w/V (D).

Sui risultati riportati in Tabella 3.2 è stata condotta un'analisi statistica utilizzando la funzione t test. Si è confrontati le EV liofilizzate con i vari eccipienti con il loro controllo positivo, le EV conservate a -80 °C, e il controllo negativo, le EV liofilizzate con sola fisiologica. Sono stati considerati significativi i campioni con p < 0.05 e p < 0.001. In Tabella 3.3 e 3.4 vengono riportati i risultati dei due test condotti.

Eccipienti (%w/V)	Media (pt/ml)	Standard error (pt/ml)	Media (nm)	Standard error (nm)
EV conservate a -80°C	2.36E+10	2.76E+09	133	4
Fisiologica (0.9% NaCl)	1.28E+10	1.33E+09	119	5
Ciclodestrina 5%	1.29E+10	2.38E+09	112	2
Ciclodestrina 10%	1.45E+10	3.65E+09	112	3
Destrano 5%	9.21E+09	1.37E+09	143	6
Destrano 10%	1.73E+10	1.65E+09	135.8	1.7
Glicina 5%	1.29E+10	2.48E+09	133	4
Glicina 10%	1.95E+10	3.38E+09	126.3	1.3
Lattosio 5%	1.38E+10	2.11E+09	133	2
Lattosio 10%	1.00E+10	6.75E+08	128	3
Lattosio– Destrano 5% - 5%	1.33E+10	5.56E+08	137.1	1.8
Lattosio– Destrano 7% - 3%	1.24E+10	7.42E+08	137.4	1.7
Mannitolo 5%	1.18E+10	2.03E+09	130.4	1.4
Mannitolo 10%	1.24E+10	1.88E+09	126	4
Saccarosio 5%	1.18E+10	1.26E+09	133.1	1.2
Saccarosio 10%	1.35E+10	1.98E+09	126.4	1.5
Saccarosio– Destrano 5% - 5%	1.29E+10	1.57E+09	135	3
Saccarosio– Destrano 7% - 3%	1.77E+10	1.19E+09	139	3
Trealosio 5%	1.29E+10	5.37E+08	130.7	1.0
Trealosio 10%	1.44E+10	9.65E+08	123.5	1.8
Trealosio– Destrano 5% - 5%	1.12E+10	1.54E+09	136	4
Trealosio– Destrano 7% - 3%	1.16E+10	1.10E+09	146	3

**Tabella 3.2.** Valore medio della concentrazione, misurato in particelle/ml (pt/ml), e del diametro, misurato in nanometri (nm), con relativo errore standard.

Eccipienti (% w/V)	Comparazione	p (Concentrazione)	p (Diametro)
Fisiologica (0.9% NaCl)	EV	0.013	0.014
Ciclodestrina 5%	EV	0.012	< 0.001
Ciclodestrina 10%	EV	0.064	< 0.001
Destrano 5%	EV	0.008	0.084
Destrano 10%	EV	0.14	0.40
Glicina 5%	EV	0.02	0.93
Glicina 10%	EV	0.38	0.11
Lattosio 5%	EV	0.028	0.85
Lattosio 10%	EV	< 0.001	0.29
Lattosio–destrano 5% - 5%	EV	<0.001	0.25
Lattosio–Destrano 7% - 3%	EV	0.009	0.21
Mannitolo 5%	EV	0.009	0.57
Mannitolo 10%	EV	0.035	0.20
Saccarosio 5%	EV	0.007	0.89
Saccarosio 10%	EV	0.023	0.12
Saccarosio–Destrano 5% - 5%	EV	0.015	0.54
Saccarosio– Destrano 7% - 3%	EV	0.15	0.16
Trealosio 5%	EV	0.012	0.62
Trealosio 10%	EV	0.029	0.026
Trealosio– destrano 5% - 5%	EV	0.005	0.49
Trealosio– Destrano 7% - 3%	EV	0.006	0.004

**Tabella 3.3.** Risultati relativi all'analisi statistica effettuata con t test tra EV conservate in -80 e gli altri campioni.

Eccipienti (%w/V)	Comparazione	p (concentrazione)	p (diametro)
Ciclodestrina 5%	fisiologica	0.99	0.15
Ciclodestrina 10%	fisiologica	0.53	0.25
Destrano 5%	fisiologica	< 0.001	0.036
Destrano 10%	fisiologica	0.002	0.019
Glicina 5%	fisiologica	0.98	0.077
Glicina 10%	fisiologica	0.015	0.24
Lattosio 5%	fisiologica	0.57	0.042
Lattosio 10%	fisiologica	0.14	0.12
Lattosio – destrano 5% - 5%	fisiologica	0.69	0.007
Lattosio – Destrano 7% - 3%	fisiologica	0.85	0.010
Mannitolo 5%	fisiologica	0.54	0.064
Mannitolo 10%	fisiologica	0.44	0.70
Saccarosio 5%	fisiologica	0.67	0.020
Saccarosio 10%	fisiologica	0.71	0.22
Saccarosio – Destrano 5% - 5%	fisiologica	0.93	0.013
Saccarosio – Destrano 7% - 3%	fisiologica	0.072	0.013
Trealosio 5%	fisiologica	0.95	0.047
Trealosio 10%	fisiologica	0.4	0.41
Trealosio – destrano 5% - 5%	fisiologica	0.2 0.008	
Trealosio – Destrano 7% - 3%	fisiologica	0.43	0.002

**Tabella 3.4.** Risultati relativi all'analisi statistica effettuata con t test tra EV liofilizzati in<br/>fisiologica e liofilizzati con i vari eccipienti.

Confrontando le concentrazioni e le dimensioni delle EV conservate in -80 con quelle liofilizzate (Figura 3.5 e 3.6 rispettivamente), si possono fare delle ipotesi riguardo ciò che succede durante il processo di liofilizzazione e reidratazione delle EV.

Liofilizzando le EV in sola fisiologica, si osserva una diminuzione significativa sia della concentrazione (p = 0.013) che della dimensione (p = 0.014); questo è un chiaro segno che durante il processo le vescicole sono state fortemente danneggiate e sono andate incontro ad una frammentazione generale che ne ha provocato una perdita considerevole. Andando ad aggiungere gli eccipienti prima del congelamento, si è cercato di ridurre questo fenomeno, anche se non tutti hanno sortito l'effetto desiderato. Risultati poco incoraggianti sono stati

ottenuti con la ciclodestrina che ha mostrato una forte frammentazione (p < 0.001 per i diametri) sia alla concentrazione di 5% che di 10% w/v. Mentre con la ciclodestrina al 5% w/V si è anche verificata una perdita significativa nel numero di vescicole (p = 0.012), questo aspetto negativo non è avvenuto con la ciclodestrina al 10% w/V. Il trealosio al 10% w/V, in modo simile alla ciclodestrina al 5% w/V, ha mostrato una forte frammentazione e una perdita di EV nel campione (rispettivamente p = 0.026 e p = 0.005), mentre con il trealosio – destrano 7 – 3% w/V si è verificato un aumento delle dimensioni medie (p = 0.004), risultato sempre in una diminuzione della concentrazione (p = 0.006) dovuto, questa volta, ad una forte aggregazione delle EV tra loro. Risultati incoraggianti, invece, sono stati ottenuti con l'aggiunta di destrano al 10% w/V, glicina al 10% w/V e saccarosio – destrano 7 – 3% w/V. Questi eccipienti hanno conservato con successo sia le dimensioni medie che le concentrazioni se confrontate con il metodo di conservazione d'elezione delle EV, il congelamento a -80 °C.



**Figura 3.5:** Il grafico riporta le concentrazioni delle EV in termini di particelle per ml rappresentate come media  $\pm$  ES. Sono considerati significativi \* p < 0.05 e \*\* p < 0.001. C = ciclodestrina, D = destrano, F = fisiologica, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccarosio, T = trealosio.



**Figura 3.6:** Il grafico riporta i diametri delle EV rappresentati come media  $\pm$  ES. Sono considerati significativi \* p < 0.05 e \*\* p < 0.001. C = ciclodestrina, D = destrano, F = fisiologica, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccarosio, T = trealosio.

Comparando le concentrazioni e le dimensioni delle EV liofilizzate con i vari eccipienti e con il loro controllo negativo, le EV liofilizzate senza eccipienti, ossia solo in fisiologica (Figura 3.7 e 3.8 rispettivamente), si possono confrontare i comportamenti dei vari eccipienti e se la loro aggiunta vada effettivamente a migliorare il prodotto finale o meno.

L'aggiunta di destrano al 10% w/V e di glicina al 10% w/V alle EV prima del congelamento conferma la tendenza mostrata nella comparazione con le EV in -80. La loro concentrazione è significativamente superiore a quella delle EV liofilizzate senza eccipienti (p = 0.002 e p = 0.015 rispettivamente) e nel caso del destrano al 10% w/V questo risultato è confermato anche da dei diametri delle vescicole maggiori (p = 0.019). In negativo, invece, si distingue il destrano al 5% w/V dove la concentrazione è ulteriormente ridotta rispetto a quella della fisiologica da sola (p < 0.001), mentre le dimensioni sono maggiori (p = 0.036); questi risultati possono essere indice o di una frammentazione con successiva riaggregazione e perdita di EV o di una perdita delle EV con dimensioni minori. Le ciclodestrine ed il trealosio al 10% w/V confermano i risultati ottenuti con la comparazione con le EV congelate in -80: i valori ottenuti in termini di concentrazione e di dimensione sono simili a quelli della fisiologica tal quale.



**Figura 3.7:** Il grafico riporta le concentrazioni delle EV in termini di particelle per ml rappresentate come media  $\pm$  ES. Sono considerati significativi \* p < 0.05 e \*\* p < 0.001. C = ciclodestrina, D = destrano, F = fisiologica, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccarosio, T = trealosio.



**Figura 3.8:** Il grafico riporta i diametri delle EV rappresentati come media  $\pm$  ES. Sono considerati significativi \* p < 0.05 e \*\* p < 0.001. C = ciclodestrina, D = destrano, F = fisiologica, G = glicina, L = lattosio, M = mannitolo, S = saccarosio, T = trealosio.

#### 3.3 Valutazione percentuale dell'umidità residua dei campioni liofilizzati

Grazie all'analisi con titolatore Karl – Fisher è stato possibile valutare la percentuale di umidità residua nei campioni liofilizzati. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.5.

Nel caso della glicina 5% w/V e 10% w/V non sono presenti valori di umidità residua dal momento che non è stato possibile risospendere la matrice liofilizzata né nel reagente Hydranal né in formammide.

Campioni (%w/V)	Percentuale umidità residua		
Fisiologica	1 %		
Mannitolo 5%	<1 %		
Mannitolo 10%	<1 %		
Lattosio 5%	10 %		
Lattosio 10%	5 %		
Trealosio 5%	10 %		
Trealosio 10%	10 %		
Saccarosio 5%	8 %		
Saccarosio 10%	7 %		
Glicina 5%	Not detectable		
Glicina 10%	Not detectable		
$H - \beta$ – ciclodestrina 5%	3 %		
$H - \beta$ – ciclodestrina 10%	<1 %		
Destrano 5%	<1 %		
Destrano 10%	<1 %		
Lattosio – destrano 5% - 5%	<1 %		
Lattosio – destrano 7% - 3%	<1 %		
Saccarosio – destrano 5% - 5%	<1 %		
Saccarosio – destrano 7% - 3%	<1 %		
Trealosio – destrano 5% - 5%	<1 %		
Trealosio – destrano 7% - 3%	2 %		

Tabella 3.5. Valore percentuale di umidità residua	per i diversi cam	pioni di ecci	pienti liofilizzati.
--	-------------------	---------------	----------------------

Generalmente si cerca di mantenere i valori di umidità residua dei prodotti liofilizzati per farmaceutica attorno al 2-3%, poiché al di sopra potrebbero innescarsi dei fenomeni di idrolisi durante lo stoccaggio che andrebbero a degradare il campione compromettendone la qualità, l'efficacia e la sicurezza. I campioni che contengono un residuo di umidità superiore a tale valore sono effettivamente anche i campioni che non hanno una struttura ben formata e mostrano mancanza di omogeneità e di compattezza e la matrice assume un colore trasparente.

## **CAPITOLO 4**

#### CONCLUSIONI

Concludendo, con i dati presentati in questa tesi, si vuole sottolineare come tra le svariate tecniche a disposizione della comunità medico scientifica, le vescicole extracellulari risultino una delle nanotecnologie di derivazione biologica più usata negli ultimi anni per applicazioni di *drug delivery*. L'uso di questa classe particolare di nanomateriali, con o senza ulteriori funzionalizzazioni o ingegnerizzazioni, richiede tecniche di conservazione ben standardizzate ed economiche in grado di garantire il mantenimento delle caratteristiche originali dei prodotti senza causare danni sulle strutture alterandone la funzionalità.

La liofilizzazione è senza dubbio da considerarsi, come descritto in questa trattazione, una valida soluzione la conservazione delle EV, dal momento che ne garantisce la stabilità nel lungo periodo anche a temperatura ambiente. Tuttavia, dal momento che durante questo processo le EV sono soggette a stress di vario tipo, è richiesta l'aggiunta oculata di eccipienti che garantiscano, quanto più possibile l'integrità morfo-funzionale dei prodotti durante lo stoccaggio e la successiva ricostituzione.

Durante lo svolgimento del presente progetto di tesi, volto all'ottimizzazione del processo di liofilizzazione di EV isolate dal surnatante di linfociti B in coltura, sono stati caratterizzati termicamente attraverso calorimetro differenziale a scansione e criomicroscopio alcuni eccipienti da aggiungere alle formulazioni contenenti le EV. Sono stati scelti dei polisaccaridi (saccarosio, lattosio e trealosio), una ciclodestrina (H –  $\beta$  – ciclodestrina), un poliolo (mannitolo), un amminoacido (glicina) e un polimero (destrano 40), in diverse concentrazioni (5% e 10% w/V) ed in diverse combinazioni. Dati i risultati ottenuti, alcune formulazioni sono state escluse dalle prove successive, in particolare le formulazioni costituite da trealosio – destrano 4% - 1% w/V, trealosio – destrano – glicina 7% - 2% - 1% w/V e trealosio – destrano – mannitolo 7% - 2% - 1% w/V.

In seguito alla liofilizzazione, sono stati analizzati con NTA i campioni contenenti le EV conservate a -80 °C, le EV liofilizzate senza aggiunta di eccipienti, ovvero disperse in sola fisiologica, e le EV liofilizzate con l'aggiunta dei diversi eccipienti. Confrontando i risultati ottenuti, è stato possibile osservare che rispetto alle EV conservate a -80 °C, le EV liofilizzate senza eccipienti hanno presentato una distribuzione non uniforme delle dimensioni medie ed una sensibile diminuzione della concentrazione. Questo ha permesso di confermare quanto ipotizzato ovvero che gli stress a cui vengono sottoposte le EV durante la liofilizzazione risultano dannosi favorendo l'aggregazione o la rottura delle membrane delle EV, fenomeno indesiderato. Si rivela quindi necessaria l'aggiunta di eccipienti.

Tra i vari eccipienti studiati, dal punto di vista della concentrazione solo i campioni contenenti destrano e glicina al 10% w/V e quelli addizionati con saccarosio – destrano al 7% - 3% w/V hanno confermato le concentrazioni e le dimensioni medie delle EV misurate dopo almeno 1 settimana di stoccaggio a -80 °C. Nel caso delle formulazioni contenenti glicina e trealosio al 5% w/V, lattosio, mannitolo e saccarosio al 5% w 10%, lattosio – destrano e saccarosio – destrano al 5% - 5% e 7% - 3% w/V, trealosio – destrano al 5% - 5% w/V è stata osservata una significativa diminuzione nella concentrazione delle particelle senza significative variazioni delle dimensioni. Le formulazioni con ciclodestrina al 5% e 10% e trealosio al 10% hanno mostrato, oltre ad una significativa diminuzione della concentrazione, anche una riduzione del diametro medio delle particelle misurate, chiaro segnale di una possibile perdita

e/o frammentazione del materiale. Nel caso del campione contente trealosio – destrano al 7% - 3% w/V, una significativa diminuzione della concentrazione con relativo aumento delle dimensioni medie ha messo in evidenza chiari fenomeni di aggregazione.

Dal confronto tra le EV liofilizzate con e senza eccipienti è emerso che nel caso del destrano al 5% w/V vi è una sensibile diminuzione nella concentrazione, mentre con il destrano e la glicina al 10% w/V si osserva un aumento nella concentrazione di particelle, confermando l'andamento osservato precedentemente nel confronto con le EV conservate a -80 °C.

In ultima analisi è stata valutata la percentuale di umidità residua grazie al titolatore Karl Fisher e ad eccezione delle formulazioni contenenti lattosio, trealosio e saccarosio al 5% e 10% w/V si sono registrati valori di umidità residui inferiori o uguali al 3%, limite massimo consentito.

In conclusione, è possibile confermare che la liofilizzazione è una valida alternativa all'ultracongelamento. Tuttavia, è necessaria l'aggiunta di eccipienti quali glicina al 10% w/V, il destrano al 10% w/V e il saccarosio – destrano al 7% - 3% w/V per proteggere le EV dagli stress termici e meccanici subiti durante le fasi di congelamento ed essiccamento, primario e secondario.

### **BIBLIOGRAFIA**

- Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(15): 1688-1713. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.017
- Alavi M., Karimi N., Safaei M., 2017. Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Adv Pharm Bull*, 7(1): 3-9. DOI: 10.15171/apb.2017.002.
- Augustine S., Singh J., Srivastava M., Sharma M., Das A., Malhotra B.D., 2017. Recent advances in carbon based nanosystems for cancer theranostics. *Biomater Sci*, 5(5): 901-952. DOI: 10.1039/c7bm00008a.
- Bahr M.M., Amer M.S., Abo-El-Sooud K., Abdallah A.N., El-Tookhy O.S., 2020. Preservation techniques of stem cells extracellular vesicles: a gate for manufacturing of clinical grade therapeutic extracellular vesicles and long-term clinical trials. *Int J Vet Sci Med*, 8(1): 1-8. DOI: 10.1080/23144599.2019.1704992.
- Bayda S., Adeel M., Tuccinardi T., Cordani M., Rizzolio F., 2019. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1): 112. DOI: 10.3390/molecules25010112.
- Bebelman M.P., Smit M.J., Pegtel D.M., Baglio S.R., 2018. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther*, 188: 1-11. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.013.
- Bjelošević M., Zvonar Pobirk A., Planinšek O., Ahlin Grabnar P., 2020. Excipients in freezedried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *Int J Pharm*, **576**: 119029. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119029.
- Borges F.T., Reis L.A., Schor N., 2013. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res*, 46(10): 824-30. DOI: 10.1590/1414-431X20132964.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**(1–2): 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- Charoenviriyakul C., Takahashi Y., Nishikawa M., Takakura Y., 2018. Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. *Int J Pharm*, 553(1-2): 1-7. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.032.
- Chen G., Tao L., Li Y., 2021. Predicting Polymers' Glass Transition Temperature by a Chemical Language Processing Model. *Polymers (Basel)*, **13**(11): 1898. DOI: 10.3390/polym13111898.
- De Carvalho Lima E.N., Diaz R.S., Justo J.F., Castilho Piqueira J.R., 2021. Advances and perspectives in the use of carbon nanotubes in vaccine development. *Int J Nanomedicine*, 16: 5411-5435. DOI: 10.2147/IJN.S314308.
- De Jong W.H., Borm P.J., 2008. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*, **3**(2): 133-49. DOI: 10.2147/ijn.s596.
- Doyle L.M., Wang M.Z., 2019. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 8(7): 727. DOI: 10.3390/cells8070727.

- El-Say K.M., El-Sawy H.S., 2017. Polymeric nanoparticles: promising platform for drug delivery. *Int J Pharm*, **528**(*1*-2): 675-691. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.052.
- Frank J., Richter M., de Rossi C., Lehr C.M., Fuhrmann K., Fuhrmann G., 2018. Extracellular vesicles protect glucuronidase model enzymes during freeze-drying. *Sci Rep*, 8(1): 12377. DOI: 10.1038/s41598-018-30786-y.
- Franks F., 1998. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm*, **45**(3): 221-9. DOI: 10.1016/s0939-6411(98)00004-6.
- Georgiou C.D., Grintzalis K., Zervoudakis G., Papapostolou I., 2008. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal Bioanal Chem*, **391**(*1*): 391-403. DOI: 10.1007/s00216-008-1996-x.
- Gotor-Fernández V., Paul CE., 2019. Deep eutectic solvents for redox biocatalysis. J Biotechnol, 293: 24-35. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.12.018.
- Horn J., Friess W., 2018. Detection of collapse and crystallization of saccharide, protein, and mannitol formulation. *Front Chem*, **6**: 4. DOI:10.3389/fchem.2018.00004
- Jain K.K., 2020. An overview of drug delivery systems. *Methods Mol Biol*, **2059**: 1-54. DOI: 10.1007/978-1-4939-9798-5 1.
- Jameel F., Hershenson S., 2010. Formulation And Process Development Strategies For Manufacturing Biopharmaceuticals, Hoboken, John Wiley & Sons, New Jersey. [ISBN 978-0-470-11812-2]
- Jeyaram A., Jay S.M., 2017. Preservation and storage stability of extracellular vesicles for therapeutic applications. *AAPS J*, **20**(*1*): 1. DOI: 10.1208/s12248-017-0160-y.
- Kasper J.C., Friess W., 2011. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*, **78**(2): 248-63. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.03.010.
- Kusuma G.D., Barabadi M., Tan J.L., Morton D.A.V., Frith J.E., Lim R., 2018. To protect and to preserve: novel preservation strategies for extracellular vesicles. *Front Pharmacol*, 9: 1199. DOI: 10.3389/fphar.2018.01199.
- Lepeltier E., Rijo P., Rizzolio F., Popovtzer R, Petrikaite V., Assaraf Y.G., Passirani C., 2020. Nanomedicine to target multidrug resistant tumors. *Drug Resist Updat*, **52**: 100704. DOI: 10.1016/j.drup.2020.100704.
- Limongi T., Canta M., Racca L., Ancona A., Tritta S., Vighetto V., Cauda V., 2019. Improving dispersal of therapeutic nanoparticles in the human body. *Nanomedicine (Lond)*, 14(7): 797-801. DOI: 10.2217/nnm-2019-0070. a
- Limongi T., Susa F., Cauda V., 2019. Nanoparticles for hematologic diseases detection and treatment. *Hematol Med Oncol*, **4**: 1000183. DOI: 10.15761/hmo.1000183. **b**
- Limongi T., Tirinato L., Pagliari F., Giugni A., Allione M., Perozziello G., Candeloro P., Di Fabrizio E., 2017. Fabrication and applications of micro/nanostructured devices for tissue engineering. *Nanomicro Lett*, 9(1) :1. DOI: 10.1007/s40820-016-0103-7.
- Lisik K., Krokosz A., 2021. Application of carbon nanoparticles in oncology and regenerative medicine. *Int J Mol Sci*, **22**(*15*) :8341. DOI: 10.3390/ijms22158341.

- Liu H., Zhong W., Zhang X., Lin D., Wu J., 2021. Nanomedicine as a promising strategy for the theranostics of infectious diseases. J Mater Chem B, 9(38): 7878-7908. DOI: 10.1039/d1tb01316e.
- Li X., Li W., Wang M., Liao Z., 2021. Magnetic nanoparticles for cancer theranostics: advances and prospects. *J Control Release*, **335**: 437-448. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.042.
- Lu M., Xing H., Yang Z., Sun Y., Yang T., Zhao X., Cai C., Wang D., Ding P., 2017. Recent advances on extracellular vesicles in therapeutic delivery: challenges, solutions, and opportunities. *Eur J Pharm Biopharm*, **119**: 381-395. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.07.010.
- Lu X., Pikal M.J., 2004. Freeze-drying of mannitol-trehalose-sodium chloride-based formulations: the impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure. *Pharm Dev Technol*, **9**(1): 85-95. DOI: 10.1081/pdt-120027421.
- Lydic T.A., Townsend S., Adda C.G., Collins C., Mathivanan S., Reid G.E., 2015. Rapid and comprehensive 'shotgun' lipidome profiling of colorectal cancer cell derived exosomes. *Methods*, 87: 83-95. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.04.014.
- Mauricio M.D., Guerra-Ojeda S., Marchio P., Valles S.L., Aldasoro M., Escribano-Lopez I., Herance J.R., Rocha M., Vila J.M., Victor V.M., 2018. Nanoparticles in medicine: focus on vascular oxidative stress. Oxid Med Cell Longev, 2018: 6231482. DOI: 10.1155/2018/6231482.
- Meister E., Gieseler H., 2009. Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition data. *J Pharm Sci*, **98**(9): 3072-87. DOI: 10.1002/jps.21586.
- Mensink M.A., Frijlink H.W., van der Voort Maarschalk K., Hinrichs W.L., 2017. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur J Pharm Biopharm*, **114**: 288-295. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.01.024.
- Merivaara A., Zini J., Koivunotko E., Valkonen S., Korhonen O., Fernandes F.M., Yliperttula M., 2021. Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: change of paradigm. J Control Release, 336: 480-498. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.06.042.
- Mozafari M.R., 2005. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell Mol Biol Lett*, **10**(*4*): 711-9. PMID: 16341279.
- Mukherjee B., 2013. Nanosize drug delivery system. *Curr Pharm Biotechnol*, **14**(*15*): 1221. DOI: 10.2174/138920101415140804121008.
- Noguchi K., Hirano M., Hashimoto T., Yuba E., Takatani-Nakase T., Nakase I., 2019. Effects of lyophilization of arginine-rich cell-penetrating peptide-modified extracellular vesicles on intracellular delivery. *Anticancer Res*, **39**(*12*): 6701-6709. DOI: 10.21873/anticanres.13885.
- Plucinski A., Lyu Z., Schmidt B.V.K.J., 2021. Polysaccharide nanoparticles: from fabrication to applications. *J Mater Chem B*, **9**(35): 7030-7062. DOI: 10.1039/d1tb00628b.
- Rasmussen P.H., Jørgensen B., Nielsen J., 1997. Aqueous solutions of proline and NaCl studied by differential scanning calorimetry at subzero temperatures. *Thermochimica Acta*, **303**(*I*): 23-30. DOI: 10.1016/S0040-6031(97)00241-4.
- Raposo G., Stoorvogel W., 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, **200**(4): 373-83. DOI: 10.1083/jcb.201211138.

- Sguizzato M., Esposito E., Cortesi R., 2021. Lipid-based nanosystems as a tool to overcome skin barrier. *Int J Mol Sci*, **22**(*15*): 8319. DOI: 10.3390/ijms22158319.
- Ståhl A.L., Johansson K., Mossberg M., Kahn R., Karpman D., 2019. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol*, 34(1): 11-30. DOI: 10.1007/s00467-017-3816-z.
- Susa F., Bucca G., Limongi T., Cauda V., Pisano R., 2021. Enhancing the preservation of liposomes: the role of cryoprotectants, lipid formulations and freezing approaches. *Cryobiology*, 98: 46-56. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.12.009.
- Telang C., Yu L., Suryanarayanan R., 2003. Effective inhibition of mannitol crystallization in frozen solutions by sodium chloride. *Pharm Res*, **20**(4): 660-7. DOI: 10.1023/a:1023263203188.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A., 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, **30**(1): 3.22.21-3.22.29, DOI:10.1002/0471143030.cb0322s30
- Tkach M., Théry C., 2016. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, **164**(6): 1226-1232. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.043.
- Trenkenschuh E., Richter M., Heinrich E., Koch M., Fuhrmann G., Friess W., 2021. Enhancing the stabilization potential of lyophilization for extracellular vesicles. *Adv Healthc Mater*. 2100538: 1-16. DOI: 10.1002/adhm.202100538.
- Van Niel G., D'Angelo G., Raposo G., 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat Rev Mol Cell Biol, 19(4): 213-228. DOI: 10.1038/nrm.2017.125.
- Yáñez-Mó M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-da Silva A., Fais S., Falcon-Perez J.M., Ghobrial I.M., Giebel B., Gimona M., Graner M., Gursel I., Gursel M., Heegaard N.H., Hendrix A., Kierulf P., Kokubun K., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Krämer-Albers E.M., Laitinen S., Lässer C., Lener T., Ligeti E., Linē A., Lipps G., Llorente A., Lötvall J., Manček-Keber M., Marcilla A., Mittelbrunn M., Nazarenko I., Nolte-'t Hoen E.N., Nyman T.A., O'Driscoll L., Olivan M., Oliveira C., Pállinger E., Del Portillo H.A., Reventós J., Rigau M., Rohde E., Sammar M., Sánchez-Madrid F., Santarém N., Schallmoser K., Ostenfeld M.S., Stoorvogel W., Stukelj R., Van der Grein S.G., Vasconcelos M.H., Wauben M.H., De Wever O., 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 4(1): 27066.
- Younis N.K., Ghoubaira J.A., Bassil E.P., Tantawi H.N., Eid A.H., 2021. Metal-based nanoparticles: promising tools for the management of cardiovascular diseases. *Nanomedicine*, **36**: 102433. DOI: 10.1016/j.nano.2021.102433.
- Zaborowski M.P., Balaj L., Breakefield X.O., Lai C.P., 2015. Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience*, **65**(8): 783-797. DOI: 10.1093/biosci/biv084.

# Appendice



**Figura A.1:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione destrano 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -19.4 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -15.4 °C.



**Figura A.2:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione contenente la sola fisiologica (0.9% NaCl). In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico pari a -20.9 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -50.9 °C.



**Figura A.3:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione H –  $\beta$  - ciclodestrina 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -36.8 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -38.1 °C.



**Figura A.4:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione H –  $\beta$  - ciclodestrina 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -27 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -24.1 °C.



**Figura A.5:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione glicina 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico pari a - 24.8 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -39 °C.



**Figura A.6:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione glicina 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico pari a - 25.0 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -24.2 °C



**Figura A.7:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione lattosio 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -44.6 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -47.1 °C.



**Figura A.8:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione lattosio 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -37.1 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -29.2 °C.



**Figura A.9:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione lattosio - destrano 5% - 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -29.9 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -23.5 °C.



**Figura A.10:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione lattosio - destrano 7% - 3% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -33.2 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -29.2 °C.



**Figura A.11:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione mannitolo 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico a 3.8 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -45.3 °C.



**Figura A.12:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione mannitolo 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo al punto di eutettico a 2.6 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -38.1 °C.



**Figura A.13:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione saccarosio 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -47.0 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -40.2 °C.



**Figura A.14:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione saccarosio 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -39.2 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -33.1 °C.



**Figura A.15:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione saccarosio – destrano 5% - 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -32.7 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -29.3 °C.



**Figura A.16:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione saccarosio – destrano 7% - 3% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -36.1 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -33.9 °C.



**Figura A.17:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano 4% - 1% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -41.7 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -40.3 °C.


**Figura A.18:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -46.6 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -40.1 °C.



**Figura A.19:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio 10% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -39.4 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -41.2 °C.



**Figura A.20:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano 5% - 5% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -30.3 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -24.7 °C.



**Figura A.21:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano 7% - 3% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -34.0 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -31.2 °C.



**Figura A.22:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano – mannitolo 7% - 2% - 1% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -37.7 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -33.3 °C.



**Figura A.23:** Risultati ottenuti rispettivamente con calorimetro differenziale a scansione (A e B) e criomicroscopio (C) per il campione trealosio – destrano – glicina 7% - 2% - 1% w/V. In A è riportato il grafico completo relativo alla rampa termica di riscaldamento, in B è riportato l'ingrandimento relativo alla temperatura di transizione vetrosa pari a -39.2 °C, in C è riportato il *frame* corrispondente al collasso della struttura, registrato ad una temperatura pari a -34.0 °C.



**Figura A.24:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con ciclodestrina 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 23 nm, 77 nm, 110 nm, 152 nm, 185 nm, 215 nm e 293 nm.



**Figura A.25:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con ciclodestrina 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 81 nm, 121 nm, 177 nm, 244 nm, 270 nm e 322 nm.



**Figura A.26:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con destrano 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 27 nm, 44 nm, 64 nm, 98 nm, 145 nm, 202 nm, 280 nm, 334 nm e 505 nm.



**Figura A.27:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con destrano 10% w/V. Distribuzione monodispersa delle dimensioni medie, con picchi a 37 nm, 51 nm, 113 nm e 505 nm.



**Figura A.28:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV conservate a -80 °C. Distribuzione monodispersa delle dimensioni medie, con picchi a 32 nm, 93 nm, 135 nm, 349 nm e 450 nm.



**Figura A.29:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate senza aggiunta di eccipienti. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 74 nm, 101 nm, 141 nm, 222 nm, 270 nm, 318 nm, 407 nm e 452 nm.



**Figura A.30:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con glicina 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 28 nm, 86 nm, 171 nm, 232 nm, 350 nm e 382 nm.



**Figura A.31:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con glicina 10% w/V. Distribuzione monodispersa delle dimensioni medie, con picchi a 45 nm, 111 nm e 373 nm.



**Figura A.32:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con lattosio 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 32 nm, 108 nm, 125 nm, 178 nm, 227 nm, 323 nm e 615 nm.



**Figura A.33:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con lattosio 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 107 nm, 170 nm, 247 nm, 306 nm, 391 nm, 444 nm, 620 nm e 1000 nm.



**Figura A.34:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con lattosio – destrano 5% - 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 56 nm, 106 nm, 151 nm, 206 nm, 288 nm e 414 nm.



**Figura A.35:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con lattosio – destrano 7% - 3% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 100 nm, 133 nm, 191 nm, 328 nm, 372 nm, 474 nm, 578 nm e 828 nm.



**Figura A.36:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con mannitolo 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 38 nm, 85 nm, 111 nm, 161 nm, 241 nm e 418 nm.



**Figura A.37:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con mannitolo 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 25 nm, 49 nm, 124 nm e 546 nm.



**Figura A.38:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con saccarosio 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 99 nm, 149 nm, 307 nm, 359 nm, 476 nm e 753 nm.



**Figura A.39:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con saccarosio 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 105 nm, 151 nm, 255 nm, 285 nm, 417 nm e 485 nm.



**Figura A.40:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con saccarosio – destrano 5% - 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 33 nm, 56 nm, 109 nm, 140 nm, 167 nm, 236 nm, 327 nm e 420 nm.



**Figura A.41:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con saccarosio – destrano 7% - 3% w/V. Distribuzione monodispersa delle dimensioni medie, con picchi a 40 nm, 112 nm, 182 nm, 259 nm, 376 nm e 437 nm.



**Figura A.42:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con trealosio 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 38 nm, 107 nm, 306 nm, 365 nm, 443 nm e 561 nm.



**Figura A.43:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con trealosio 10% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 28 nm, 86 nm, 114 nm, 146 nm, 352 nm e 393 nm.



**Figura A.44:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con trealosio – destrano 5% - 5% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 62 nm, 114 nm, 157 nm, 221 nm, 245 nm e 295 nm.



**Figura A.45:** Grafici ottenuti con *Nanoparticle Tracking Analysis* per EV liofilizzate con trealosio – destrano 7% - 3% w/V. Distribuzione eterogenea delle dimensioni medie, con picchi a 43 nm, 72 nm, 108 nm, 143 nm, 190 nm. 273 nm, 421 nm, 461 nm e 657 nm.

## Ringraziamenti

Quando anni fa iniziai questo percorso, non ero consapevole di ciò a cui sarei andata incontro. Ora siamo arrivati alla fine di questa avventura, ed è giusto fare un bilancio. Ecco che allora il primo ringraziamento lo devo fare proprio al Politecnico: le nozioni apprese sono state tante negli anni, ma di sicuro la lezione più importante che mi ha insegnato è stata quella di ricordarmi di essere più forte delle mie debolezze. Di cadute ce ne sono state, e molte. Tuttavia, sono sempre servite per dimostrare a me stessa che il problema non era cadere, quello che contava era rialzarsi. Ecco, in questo giorno posso affermare che sì, sono riuscita a rialzarmi. Non ce l'avrei mai fatta però senza di voi, amici di Università. Grazie per essere stati sempre la mano tesa pronta ad aiutarmi, e per aver creduto che ce l'avrei fatta anche quando ero io la prima a non crederci davvero. Quindi grazie Sofi, con te non servono mai tante parole ma sai sempre quello che mi frulla per la testa e senza di te non so nemmeno se avrei potuto immaginare questo giorno. Grazie Tommy e Manzo, non bastano due righe per riassumere tutto; sappiate però che le amare giornate universitarie non avrebbero mai avuto il sapore dolce che le ha contraddistinte se non ci foste stati voi al mio fianco. Grazie Fede, per essere sempre stato il mio tecnico di fiducia ed aver condiviso con me questo percorso anche quando la strada da fare sembrava infinita. Grazie Gio, per essere sempre stata capace di portare quella ventata di leggerezza nelle giornate più pesanti. A Delia, per avermi presa sottobraccio dal primo giorno di lezione e, sebbene le nostre strade si siano divise presto dal punto di vista accademico, grazie per non avermi mai abbandonata nella vita di tutti i giorni. Grazie a Marco, grande e grosso ma delicato e sensibile. Grazie per essere stato ed essere punto di riferimento dentro quelle mura e nella vita di sempre. Infine, grazie Silvia e Michela, compagne di laboratorio: siete state le ultime arrivate nella mia vita, eppure siete state una presenza così preziosa che mai mi sarei immaginata.

Un grazie va poi a chi mi ha seguita in quest'ultimo tratto del mio percorso, in primis al professor Roberto Pisano, alla professoressa Tania Limongi e alla professoressa Valentina Alice Cauda per avermi dato la possibilità di lavorare con loro. Alla professoressa Tania Limongi e a Francesca Susa va anche il grande ringraziamento per avermi supportato e sopportato in questi mesi, per i consigli, la pazienza e la disponibilità che non sono mai mancate. Ultimo non per importanza Andrea: grazie perché le giornate di laboratorio non sarebbero mai state le stesse senza di te.

Tutto questo, però, non sarebbe mai successo senza il costante supporto della mia famiglia, a partire dai miei genitori, mia sorella, i nonni e le zie. Grazie per avermi sempre spronato a dare il massimo e per avermi accompagnata lungo tutte le fasi di questo percorso. Spesso vi ho tagliati fuori e di questo vi chiedo scusa; tuttavia, grazie per essere sempre rimasti come presenza discreta ma costante.

Un grazie speciale va ai Lockizzati, compagni fedeli in questi ultimi anni. Gu e Angi, Cozzo, Bettus, Politti e Michele, grazie per essere sempre pronti a condividere tutto, per rendere ogni fine settimana, per quanto uguale, sempre diverso. In particolare, vorrei ringraziare Richi e Ale, compagni di avventura non da molti anni. In così poco tempo siete riusciti ad entrare passo dopo passo nella mia vita ed ora, sinceramente, non so come sarei se non ci foste stati voi. Grazie per aver sempre avuto la parola giusta al momento giusto, per avermi sempre sostenuta e spronata e per avermi saputa anche criticare quando necessario. E grazie per avermi fatto sempre capire che su di voi, sì, potevo sempre contare.

Grazie a Fra e Chiara, che da 6 anni a questa parte mi avete fatto tornare la voglia di Gardaland. Grazie perché con la semplicità e concretezza che vi contraddistinguono non mi avete mai lasciata sola un secondo. Grazie per il sostegno e la fiducia che avete sempre riposto in me. Chissà quanti viaggi da condividere ci aspettano amici!

E ora tocca a voi, amici di Vinovo. Sono arrivata all'improvviso ma mi avete da subito fatta sentire parte di una famiglia allargata. Giorno dopo giorno sembrava che voi foste da tutta la vita con me. Grazie Silvia e Richi, più a Silvia per le torte che a te Richi, spero tu non me ne voglia. E grazie a voi, Pol ed Ele: casa vostra dire che è una seconda casa è riduttivo, considerando che ho già le ciabatte da voi. Grazie per essere diventati punto di riferimento negli anni e per non avermi mai fatto sentire sola.

Come tralasciare le amiche di una vita: Caro e Chia. Con te, Chia, le vite si sono intrecciate ben prima di venire al mondo. La vita è stata fatta di alti e bassi, ma in un modo o nell'altro ne siamo sempre uscite vincitrici. La nostra amicizia è tutto fuorché standard, ma grazie per aver costruito qualcosa di così profondo insieme a me, tale da avere la consapevolezza che difficilmente il tempo romperà questo legame. E tu Caro: le parole non bastano per esprimere la gratitudine che provo e la fortuna che so di avere a condividere mille avventure con te. Grazie però per essere la parte meno razionale della mia vita.

Crescendo ho incontrato te, Ale: le nostre strade hanno iniziato a sovrapporsi alle medie. Per un po' non si sono più incontrate ma poi si sa, si torna sempre dove si è stati bene. E quindi eccoci qui: grazie per aver sempre portato allegria nelle mie giornate e grazie per essere sempre stata la ventata d'aria fresca di cui avevo bisogno.

Alle medie non c'è stata solo Ale a fare la differenza: c'è stato l'Essere Umano per eccellenza, Marti. Io non so che sapore avrebbero avuto le giornate senza di te, sicuramente non avrebbero mai saputo di cioccolata calda. Dietro quella corazza che hai c'è un cuore buono, grazie per avermi permesso di sfiorarlo. Ne abbiamo passate tante, così tante che secondo me fatichiamo anche a ricordarle tutte. Ci salvano ogni tanto i ricordi di Facebook che ci fanno rimpiangere di aver mai messo piede su questa Terra, ma sappiamo benissimo che i ricordi più belli sono quelli che non abbiamo mai condiviso.

A Mat e Sara: per loro non basta questo spazio. Grazie per esserci state nei momenti più bui senza farvi spaventare, grazie per essere sempre state una presenza delicata ma decisiva. Avete gioito dei miei traguardi più di quanto facessi io per me stessa e di questo non sarò mai grata abbastanza.

Agli amici di Montoso, grazie per aver reso ogni agosto così pieno di vita. Sapete benissimo quanta poca affinità avessi con quel paese, ma da quando ci siete voi ecco, è tutto decisamente diverso. Quindi grazie Gianna, Manu, Pale, Anna e Viky, Simo, Andre e Giulia, Gianlu e Giulia, Früzen, e poi grazie a te Pranda, "vecchietta" del mio cuore, per ogni Barathier e ogni chiacchiera al chiaro delle stelle di montagna.

Arriviamo alla fine e mi rendo conto di quante persone abbiano percorso la strada insieme a me. Ma la gratitudine non finisce qui. L'ultimo grazie lo dedico a te. Tu che hai deciso oramai sei anni fa di entrare nella mia vita come un tornado. Tu che mi hai recuperato nel periodo più complicato della mia vita e con dedizione e costanza mi hai riportata in superficie. Tu che di difficoltà con me ne hai sconfitte tante: grazie per non averlo mai fatto al posto mio, ma per avermi dato la forza e la consapevolezza di essere in grado di affrontare qualunque cosa. Tu che non ti sei mai tirato indietro perché vedevi più lontano, e sapevi che giù in fondo c'era qualcosa per cui valeva la pena lottare. Ecco questo grazie va a te, Omar, che ti sei innamorato dei miei lati più nascosti, così nascosti che nemmeno io sapevo di avere, e li hai portati a galla. Grazie perché questo traguardo è anche un po' tuo: non ci fossi stato tu al mio fianco avrei mollato più che qualche sessione fa, e tutto questo sarebbe rimasto solo uno splendido sogno.

Francesca