

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 dei meccanismi di stabilizzazione
proteica espressi da eccipienti in presenza di
solventi organici**



Relatore

Prof. Roberto Pisano

Co-relatore

Dott. Andrea Arsiccio

Candidata

Paola Casucci

Dicembre 2021

INDICE

Capitolo 1 - Introduzione	1
1.1 Il processo di liofilizzazione	2
1.1.1 Congelamento	5
1.1.2 Essiccamento primario.....	8
1.1.3 Essiccamento secondario	9
1.2 Applicazione in ambito farmaceutico: le proteine	10
1.3 Stabilità delle formulazioni proteiche durante liofilizzazione: Meccanismi di denaturazione	12
1.3.1 Instabilità fisica	12
1.3.2 Instabilità chimica	14
1.3.3 Stress legati al processo di liofilizzazione	15
1.4 Eccipienti e meccanismi di stabilizzazione della proteina durante liofilizzazione	18
1.4.1 Meccanismi di stabilizzazione	18
1.4.2 Eccipienti comuni.....	19
1.5 Co-solventi ed uso del tert-butanolo	22
1.6 Presentazione del caso di studio ed obiettivi della tesi.....	26
Capitolo 2 - Metodi e materiali	27
2.1 Materiali - preparazione delle soluzioni	27
2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)	29
2.3 Criomicroscopio (Freeze Drying Microscope, FDM)	31
2.4 Protocolli di congelamento e liofilizzazione.....	33
2.4.1 Congelamento veloce.....	34
2.4.2 Congelamento lento.....	34
2.4.3 Cicli di liofilizzazione.....	36
2.5 Analisi dell'attività residua	37
2.6 Analisi statistica	40
Capitolo 3 - Risultati.....	43
3.1 Caratterizzazione termica delle formulazioni	43
3.1.1 Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	43
3.1.2 Criomicroscopio (FDM)	64
3.2 Studio della stabilità proteica durante congelamento, scongelamento e liofilizzazione.....	71
3.2.1 Effetto della velocità di congelamento	71
3.2.2 Effetto dell'essiccamento.....	73
3.2.3 Effetto degli eccipienti.....	78
3.2.4 Effetto tensioattivo	79
3.2.5 Effetto del TBA.....	80
Capitolo 4 - Conclusioni	81

Lista dei simboli.....	84
Abbreviazioni.....	86
Elenco delle figure	87
Elenco delle tabelle	91
Bibliografia	92
Ringraziamenti	97

Capitolo 1 - Introduzione

L'acqua riveste un ruolo fondamentale per la struttura e la funzione di molteplici macromolecole che permettono agli organismi di sviluppare e moltiplicarsi. Tuttavia, soluzioni acquose di molte sostanze organiche tendono ad essere soggette a cambiamenti chimici, microbici e fisici, che sono ritenuti indesiderati o anche pericolosi e letali.

In ambito farmaceutico, si distinguono due categorie di prodotti: i prodotti farmaceutici tradizionali e i biofarmaci. I farmaci tradizionali sono costituiti da molecole di piccole dimensioni e sono ottenuti generalmente per sintesi chimica; i biofarmaci sono costituiti da molecole molto più complesse e contengono uno o più principi attivi prodotti o estratti da un sistema biologico. Appartengono alla categoria dei farmaci biologici ormoni, enzimi, emoderivati, sieri e vaccini, immunoglobuline, allergeni, anticorpi monoclonali. Tra i medicinali biologici sono definiti biotecnologici quei farmaci i cui principi attivi sono prodotti tramite le tecnologie del DNA ricombinante, l'espressione controllata di geni codificanti per proteine biologicamente attive nei procarioti e negli eucarioti, le tecniche utilizzate nella produzione di ibridomi e di anticorpi monoclonali (Aifa).

Negli ultimi decenni il numero di biofarmaci ha subito una crescita esponenziale, arrivando a costituire quasi il 30% dei farmaci presenti sul mercato e raggiungendo anche il 50% dei farmaci approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) (BioPlan Associates). È pertanto evidente la loro crescente importanza nel mercato farmaceutico, oltre che il crescente interesse dal punto di vista medico, avvalorato dalla loro particolare efficacia nel trattamento di numerose malattie.

I principi attivi dei medicinali biologici differiscono da quelli dei prodotti di sintesi chimica per molti aspetti: essi consistono infatti di molecole di maggiori dimensioni, presentano elevata complessità strutturale e una diversa stabilità del prodotto finale. Diversamente dai prodotti di sintesi chimica, inoltre, i processi di produzione dei farmaci biologici sono spesso caratterizzati dall'uso di sistemi viventi con la possibilità di variazioni strutturali rilevanti nel prodotto finale (ad esempio, differenti profili di glicosilazione), che possono dar luogo a differenze importanti a livello immunogenico (Aifa).

Il prodotto biofarmaceutico finale risulta spesso sensibile alle condizioni di stoccaggio e piuttosto instabile, soprattutto se presente in soluzione acquosa. Appare necessario designare delle tecniche volte all'eliminazione della parte acquosa e alla generazione di un prodotto anidro, capace di mantenere la sua attività biologica e, quindi, la sua efficacia terapeutica nel tempo.

Se nell'ambito alimentare uno dei principali metodi di eliminazione del contenuto acquoso è l'essiccazione, essa non è praticabile in quello farmaceutico, dove si ha a che fare con molecole estremamente sensibili alle elevate temperature e dove pertanto tale processo risulterebbe deleterio.

Sotto queste premesse, la liofilizzazione si è gradualmente affermata come metodo standard per rendere stabili i prodotti farmaceutici. Nonostante questa tecnica sia dispendiosa a livello energetico ed economico, rilevanti sono vantaggi quali le basse temperature usate durante il processo, la possibilità di operare in condizioni di sterilità, la facile reidratazione del prodotto, la praticità del formato del prodotto finale.

Il primo capitolo di questa tesi ha come obiettivo quello di collocare l'attività sperimentale svolta nell'attuale contesto scientifico e ambisce a fornire una panoramica sintetica ma

completa del processo di liofilizzazione di farmaci a base proteica. Sono riportate nozioni teoriche riguardanti la liofilizzazione e le sue fasi, gli aspetti più critici del processo quali potenziali rischi di denaturazione del principio attivo, gli effetti benefici esercitati dagli eccipienti e dall'eventuale aggiunta di co-solventi non acquosi, soffermandosi sugli aspetti che sono stati oggetto di studio del presente lavoro di tesi.

1.1 Il processo di liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo che si colloca come ultima unità di trattamento nella fase di downstream del processo di produzione di molti biofarmaci. Ad oggi essa rappresenta il metodo universalmente preferito per rendere stabili i preparati farmaceutici e garantire la conservazione di sostanze termolabili o instabili in soluzione acquosa in modo da garantirne una shelf life accettabile. Infatti, nello stato solido liofilizzato le reazioni di degradazione chimica e fisica sono inibite o sufficientemente rallentate, garantendo una migliorata stabilità sul lungo termine (Carpenter *et al.*, 1997).

La liofilizzazione promuove la rimozione del solvente (generalmente acqua) tramite una sequenza di operazioni: esso viene inizialmente congelamento e successivamente allontanato tramite sublimazione, solitamente condotta in condizioni di elevato grado di vuoto.

Mentre il corrispettivo nome inglese di tale processo, *freeze-drying*, si ricollega alla sequenza di operazioni che lo caratterizzano, il nome in italiano con cui esso è conosciuto deriva da "liofilo", ovvero affine al solvente, e si rifà alla natura particolarmente predisposta alla solubilizzazione del prodotto finale. Quest'ultimo, infatti, è rappresentato da un solido poroso, friabile, dalla struttura "elegante" e uniforme, igroscopico, ad elevata superficie specifica e velocemente solubile.

Un impianto per la liofilizzazione (Figura 1.1) è generalmente composto da:

- una camera contenente dei ripiani sui quali vengono disposti i prodotti, la cui temperatura possa essere controllata e mantenuta ad un valore desiderato;
- un condensatore, munito del proprio compressore e sistema di scambio di calore che permetta di rimuovere il vapore acqueo liberato dalla sublimazione del ghiaccio dalla camera;
- una pompa a vuoto;
- un gruppo frigorifero per il raffreddamento dei ripiani;
- un gruppo di riscaldamento munito di pompa che permetta la circolazione del fluido nei ripiani della camera.

Gli impianti moderni prevedono anche sistemi di monitoraggio e controllo computerizzati che permettano di automatizzare un determinato ciclo di essiccamento. Inoltre, per applicazioni farmaceutiche, è essenziale prevenire contaminazioni tra cicli successivi ed è quindi necessaria la presenza di sistemi di pulizia (CIP, *clean in place*) e di sterilizzazione (SIP, *sterilization in place*), tramite cui la camera possa essere adeguatamente decontaminata (Franks and Auffret, 2007). È importante che la camera di liofilizzazione sia mantenuta a pressioni al di sotto di quelle di saturazione del ghiaccio alla temperatura di processo scelta (in genere, anche poche decine di microbar).

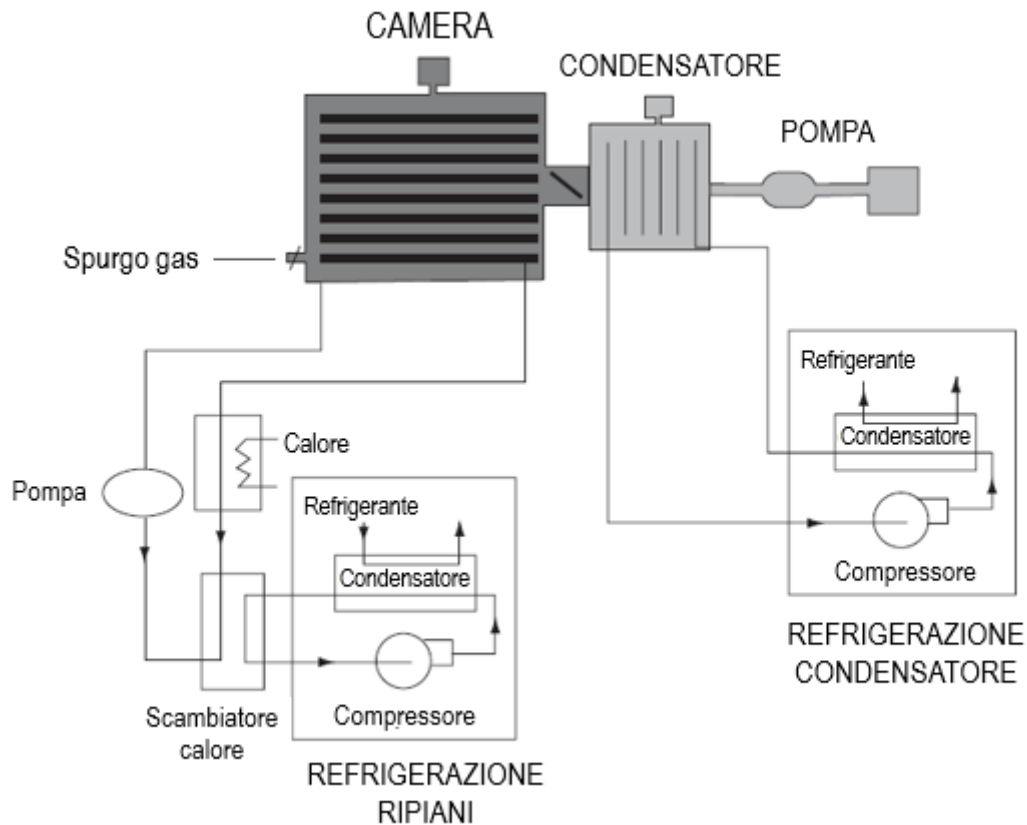


Figura 1.1 - Schema di un tipico impianto industriale di liofilizzazione. Figura tratta da (Franks and Auffret, 2007) con modifiche.

Il processo di liofilizzazione è composto da tre fasi: congelamento, essiccamento primario ed essiccamento secondario (Figura 1.2). Durante il congelamento, il solvente viene separato dal soluto tramite un abbassamento di temperatura, che porta alla formazione di cristalli di ghiaccio; tale fase determina la morfologia della matrice congelata. Si procede con l'essiccamento primario, condotto in condizioni di altissimo vuoto (generalmente, da 5 a 30 Pa) e blando riscaldamento, per allontanare tramite sublimazione il solvente precedentemente cristallizzato. L'ultima fase, l'essiccamento secondario, allontana per desorbimento il solvente intimamente legato alla matrice solida essiccata, ovvero una piccola percentuale di solvente non cristallizzata e rimasta nel prodotto come umidità residua, ed è condotto generalmente a temperature più elevate.

In generale, la liofilizzazione è un processo di essiccamento di lunga durata e ad elevato consumo energetico. Il congelamento generalmente ha una durata di qualche ora mentre la fase di essiccamento necessita spesso di giorni. In particolare, l'essiccamento secondario ha una durata relativamente ridotta (~ ore) rispetto al primario (~ giorni). Per questo lo sviluppo di cicli di liofilizzazione si è concentrato principalmente sull'ottimizzazione della fase di essiccamento primario (agendo, ad esempio, sulla temperatura dei ripiani o sulla pressione della camera) (Kasper and Friess, 2011).

Tra i parametri critici che definiscono la qualità del prodotto liofilizzato si ricordano:

- il recupero dell'attività biologica, ovvero la frazione di potere terapeutico che il prodotto è in grado di esprimere a valle della liofilizzazione rispetto al valore iniziale;
- il tempo di ricostituzione del prodotto liofilizzato, in quanto il farmaco per essere somministrato deve essere prima ricostituito e la dissoluzione del farmaco in soluzione fisiologica o acquosa deve essere rapida e completa, senza particolari trattamenti e

manipolazioni della soluzione;

- la stabilità del prodotto sul lungo termine, ovvero la sua capacità di preservare l'attività terapeutica nel tempo alle condizioni di stoccaggio desiderate;
- il contenuto di umidità, che deve essere sufficientemente basso da inibire la degradazione biologica ma evitare un essiccamento eccessivo che potrebbe eliminare le molecole di acqua di solvatazione sulla superficie del principio attivo;
- l'aspetto della 'torta' liofilizzata (in inglese 'cake'), che non deve presentare difetti superficiali o morfologici, e deve essere esente da fenomeni di collasso.

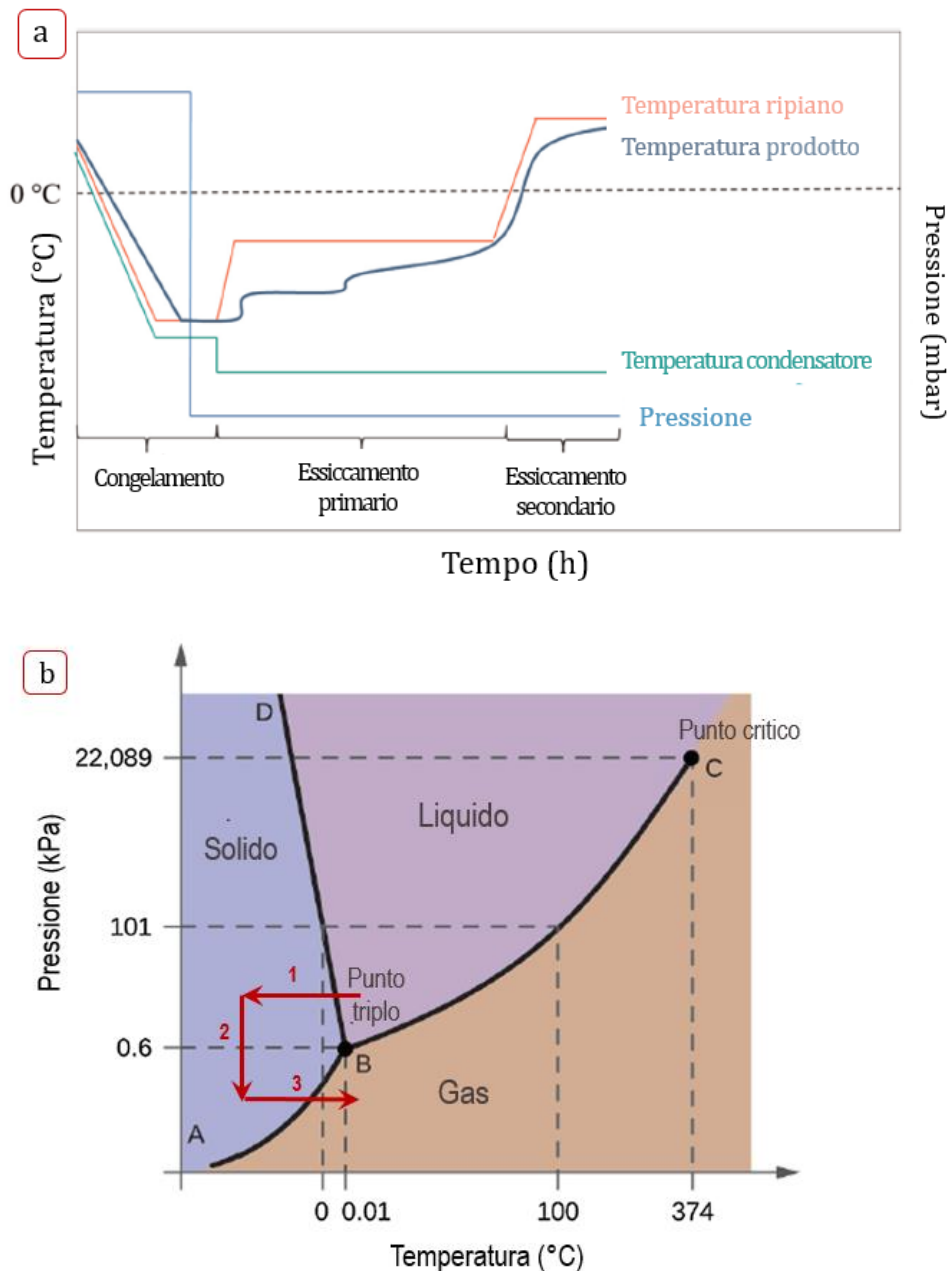


Figura 1.2 - (a) Evoluzione tipica della pressione e temperatura dei ripiani e del prodotto durante un ciclo di liofilizzazione. Figura tratta da (Morais et al., 2016) con modifiche. (b) Diagramma di fase dell'acqua su cui è evidenziato il processo di liofilizzazione nelle sue fasi. Figura tratta da (Schwarz et al., 2020) con modifiche.

1.1.1 Congelamento

In passato, l'ottimizzazione del processo di liofilizzazione si è concentrata particolarmente sulla fase di essiccamento, trascurando inizialmente il congelamento. Tuttavia, ad oggi, è riconosciuta l'importanza di tale fase, in quanto cruciale sia per le prestazioni del processo nella sua interezza che per la qualità del prodotto finale. Infatti, il congelamento incide sulla microstruttura dei pori della matrice essiccata e su caratteristiche di processo quali la velocità di essiccamento primario e secondario (Kasper and Friess, 2011): la dimensione dei pori nel prodotto secco, in assenza di fenomeni indesiderati quali il collasso, coinciderà con quella dei cristalli di ghiaccio formati durante il congelamento. Inoltre, pori più grandi offriranno una minore resistenza al flusso di vapore e maggiore velocità di sublimazione ma rallenteranno il processo di desorbimento.

Per comprendere come il congelamento sia importante nel processo di liofilizzazione, è fondamentale conoscere i fenomeni chimico fisici che avvengono durante il suo svolgimento.

Quando l'acqua pura è raffreddata alla pressione atmosferica, non congela spontaneamente al suo punto di congelamento di 0°C. Il mantenimento dello stato liquido al di sotto del punto di congelamento della soluzione è detto sotto-raffreddamento ed è rappresentato in Figura 1.3 dal tratto A-B. Esso avviene sempre durante il congelamento, spesso nell'intervallo di -10÷-15°C in condizioni di laboratorio, o anche di più in condizioni GMP (*good manufacturing practice*), dove la presenza di impurezza ed eventuali contaminanti è strettamente controllata.

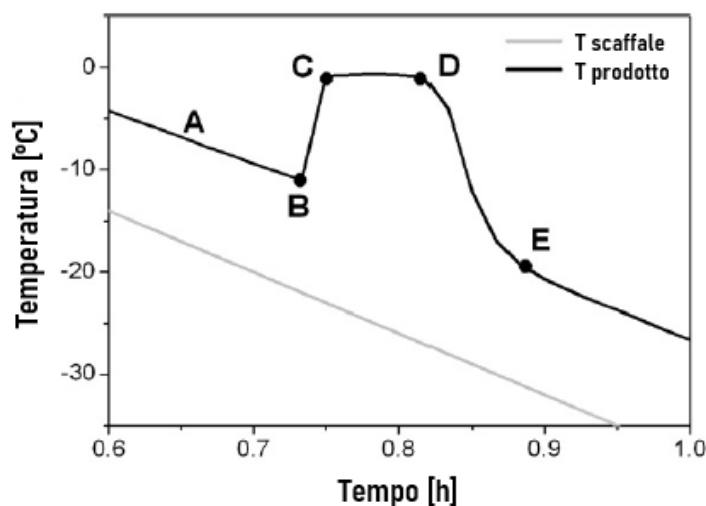


Figura 1.3 - Profilo termico tipico di un congelamento di una formulazione farmaceutica attraverso un raffreddamento controllato ad una velocità di 1°C/min. Figura tratta da (Kasper and Friess, 2011) con modifiche.

Il grado di sotto-raffreddamento dipende dalle proprietà della soluzione e dalle condizioni di processo, ed è definito come la differenza tra la temperatura di congelamento all'equilibrio termodinamico (0°C) e quella alla quale si formano effettivamente i primi cristalli di ghiaccio. Il sotto-raffreddamento corrisponde ad uno stato metastabile dell'acqua liquida. A causa delle fluttuazioni di densità legate a moti browniani, le molecole di acqua tendono a formare *cluster* di molecole, tramite legami idrogeno relativamente a lunga durata, dalla conformazione simile a quella dei cristalli di ghiaccio (Franks and Auffret, 2007). Poiché il processo risulta essere energeticamente sfavorito, tali cluster tendono a rompersi rapidamente, pertanto la formazione di nuclei stabili è un evento piuttosto raro a causa della collisione tra molecole. La probabilità per essi di accrescersi in dimensione e numero aumenta all'abbassarsi della temperatura e,

quindi, all'aumentare del grado di sotto-raffreddamento.

Una volta raggiunta la dimensione critica dei nuclei (determinata da considerazioni termodinamiche), la cristallizzazione del ghiaccio avviene rapidamente nell'intero sistema (punto B), attraverso un fenomeno noto come nucleazione.

Esistono due tipi di nucleazione: omogenea ed eterogenea. La nucleazione omogenea è caratterizzata dalla presenza di una barriera energetica superiore rispetto a quella eterogenea: per esempio, l'acqua forma i primi nuclei stabili in maniera omogenea solo ad una temperatura intorno ai -40°C (Kasper *et al.*, 2011). Tuttavia, se sono presenti impurezze all'interno della soluzione, esse fungeranno da centri di nucleazione, portando ad una nucleazione, detta eterogenea, che può avvenire a temperature notevolmente superiori (spesso, nell'intervallo $-10 \div -20^{\circ}\text{C}$). Queste impurezze possono essere contaminanti esterni, solidi sospesi, le pareti del contenitore stesso o anche alcune macromolecole come le proteine. La natura stocastica del fenomeno di nucleazione del ghiaccio rappresenta una grande sfida per il controllo del processo e provoca una certa eterogeneità tra diversi campioni di uno stesso lotto.

Una volta formati dei cristalli stabili, la loro crescita procede mediante l'aggiunta di molecole all'interfaccia (tratto C-D in Figura 1.3). Una volta iniziato l'accrescimento, essendo quest'ultimo esotermico, la temperatura rapidamente risale a quella di equilibrio termodinamico di cristallizzazione e rimane approssimativamente costante.

Il tratto D-E in Figura 1.3 rappresenta il termine del congelamento, segnato da un evidente calo della temperatura.

Pertanto, il processo di congelamento può essere immaginato come diviso in tre fasi, una inizialmente legata al sotto-raffreddamento, fino a che non si ha l'inizio della nucleazione, poi seguita dalla crescita dei cristalli. È importante sottolineare che il numero di nuclei di ghiaccio, la velocità di crescita e la dimensione dei cristalli dipendono dal grado di sotto-raffreddamento: più esso è elevato, maggiore sarà il numero di nuclei generati; come risultato si avrà un elevato numero di cristalli di piccole dimensioni. Di contro, un più basso grado di sotto-raffreddamento comporta un ridotto numero di cristalli dalla dimensione maggiore.

Esistono almeno 10 forme polimorfiche del ghiaccio; a temperature e pressioni tipiche della liofilizzazione, la struttura cristallina stabile del ghiaccio è quella esagonale (Ih), dove ogni atomo di ossigeno è tetraedricamente circondato da 4 atomi di ossigeno. La struttura esagonale del ghiaccio è di grande importanza nella liofilizzazione di formulazioni farmaceutiche, perché la maggior parte dei soluti non riesce ad inserirsi nella densa struttura del ghiaccio esagonale che si forma durante il congelamento. Di conseguenza, la concentrazione di soluti nella formulazione aumenta nelle regioni interstiziali tra i cristalli di ghiaccio man mano che essi crescono (crioconcentrazione) (Kasper and Friess, 2011).

Il congelamento è completo quando il soluto subisce un processo di cristallizzazione o, per formulazioni amorfe, vetrificazione (Figura 1.4).

A seguito della cristallizzazione dei soluti nella soluzione crioconcentrata, si forma una miscela eutettica: esempi di elementi che cristallizzano durante congelamento sono il mannitolo, la glicina, il cloruro di sodio o il tampone fosfato. La temperatura più bassa a cui il soluto resta liquido è la cosiddetta temperatura eutettica (T_{eu}).

È importante raffreddare i prodotti cristallini al di sotto della loro temperatura eutettica prima di passare alla fase successiva di essiccamento, perché piccole quantità di materiale non cristallizzato possono rimanere nel prodotto, espandersi e compromettere la stabilità strutturale del prodotto liofilizzato.

Un secondo tipo di prodotto congelato è costituito dalla presenza di soluti che non cristallizzano

ma restano amorfi e vengono trasformati in una rigida struttura vetrosa: il solvente continua a congelare al di sotto della temperatura eutettica, la soluzione diventa soprassatura ed estremamente viscosa. L'aumento di viscosità rallenta la cristallizzazione del ghiaccio fino a che, ad una temperatura caratteristica, il congelamento non avviene più. Questo fenomeno è detto vetrificazione e la temperatura a cui si verifica è detta di transizione vetrosa T_g' (Kasper and Friess, 2011). La T_g' non rappresenta un cambio di stato, bensì piuttosto una variazione nella mobilità molecolare, da solido vetroso a gommoso.

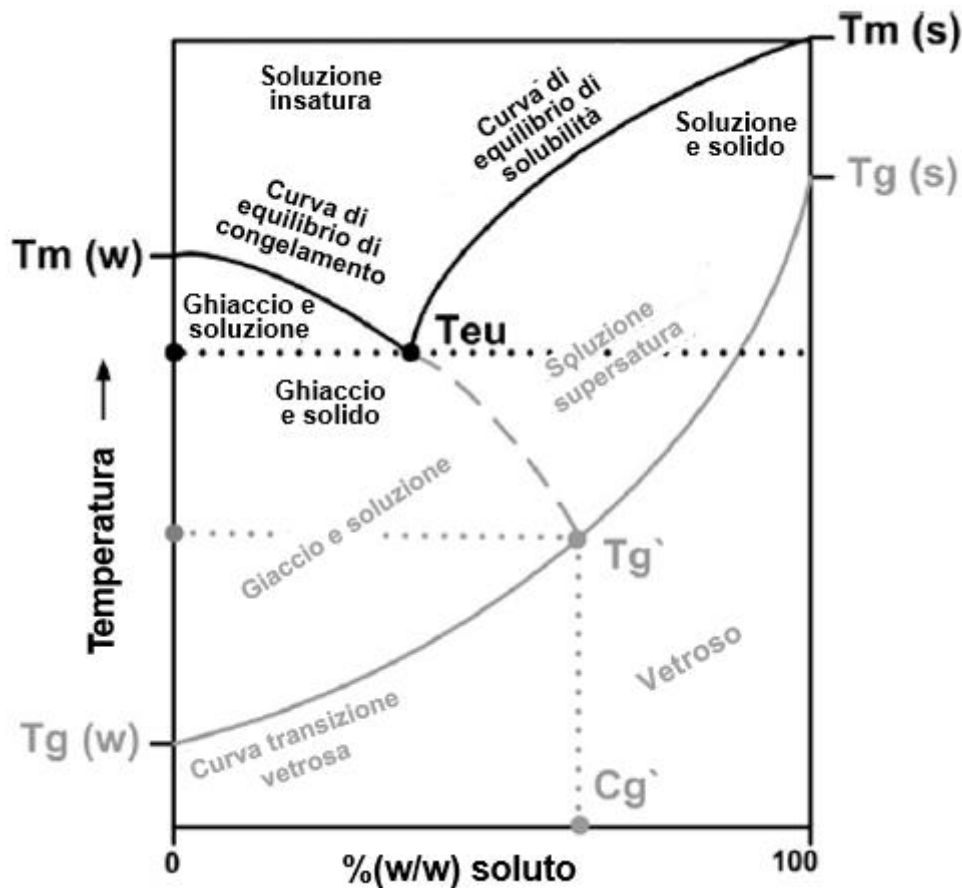


Figura 1.4 - Diagramma di stato acqua/soluto in cui sono evidenziate temperatura eutettica e di transizione vetrosa. Figura tratta da (Kasper and Friess, 2011) con modifiche.

Talora il processo di congelamento comprende una fase ulteriore, detta *annealing*. Essa consiste nel mantenere il prodotto ad una temperatura al di sopra dell'eutettico o della transizione vetrosa per un determinato periodo di tempo. L'*annealing* favorisce la cristallizzazione completa dei soluti cristallini, quali mannitolo e glicina, prevenendo successivi stress meccanico-viscosi per il principio attivo e migliorandone la stabilità. L'*annealing* può anche esercitare un effetto benefico sull'essiccamento primario, in quanto aumenta la dimensione dei cristalli di ghiaccio (e quindi dei pori della matrice solida) e ciò accelera il processo di sublimazione, riducendo la resistenza al trasferimento di vapore nello strato essiccato (Butreddy *et al.*, 2021).

1.1.2 Essiccamento primario

L'essiccamento primario ambisce all'allontanamento del solvente libero, ovvero quella frazione di solvente che si è separata sotto forma di cristalli. Essi vengono allontanati, come anticipato, tramite sublimazione, condotta in condizioni di altissimo vuoto mediante l'utilizzo di una pompa a vuoto e di blando riscaldamento. L'acqua sublimata si sposta da una zona ad alta pressione (la camera) ad una di bassa pressione, nel condensatore.

La sublimazione è un processo endotermico, pertanto la sua evoluzione presuppone che il prodotto riceva una certa quantità di calore tale da compensare il calore esportato per sublimazione. Ciò è garantito dall'incremento della temperatura del ripiano.

La sublimazione porta alla formazione di due strati nel prodotto: lo strato essiccato e quello ancora congelato. Il primo sarà uno strato di materiale poroso dove il solvente è già stato allontanato e al suo posto è rimasto un interstizio, il secondo sarà invece ancora costituito da una matrice di soluto che circonda i cristalli di ghiaccio. L'interfaccia di sublimazione tende a retrocedere verso il basso man mano che il solvente viene rimosso; lo strato congelato è presente al di sotto dello strato essiccato e riduce il proprio spessore durante il processo (Figura 1.5).

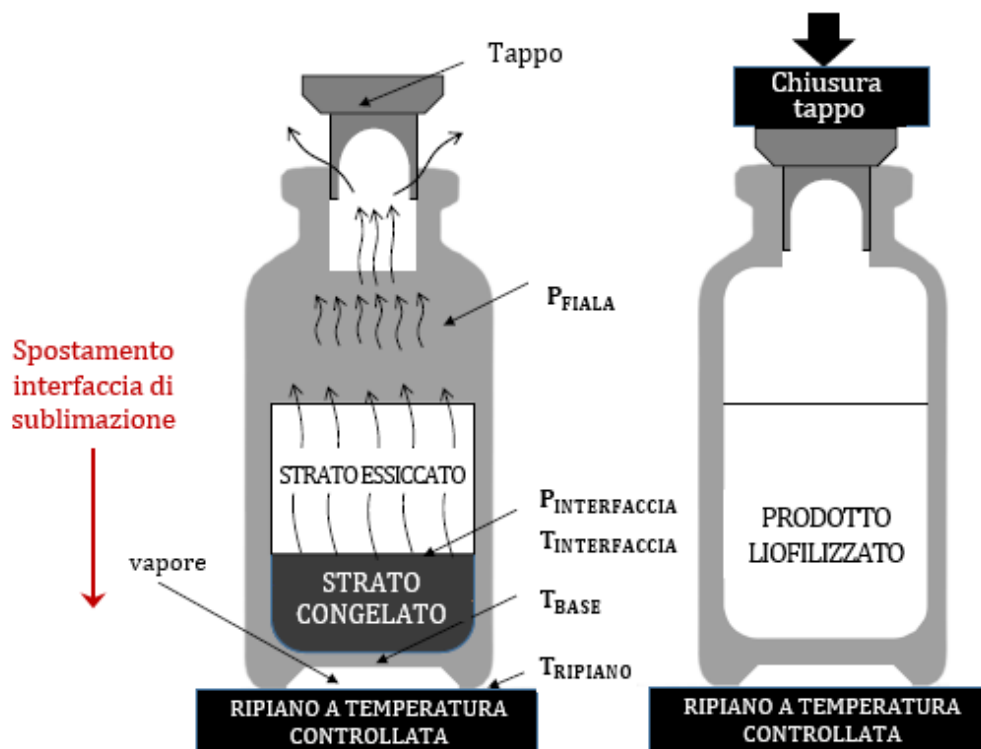


Figura 1.5 - Rappresentazione di una fiala contenente una soluzione sottoposta ad essiccamento primario. È rappresentato lo strato essiccato, lo strato congelato, la fuoriuscita del vapore dal tappo e lo spostamento dell'interfaccia di sublimazione verso il basso. Figura tratta da (Ganesh et al., 2019) con modifiche.

L'essiccamento primario rappresenta la fase più lunga ed è critica per la qualità del prodotto finale. I parametri fondamentali di questa fase del processo di liofilizzazione sono due: la pressione nella camera (P) e la temperatura dei ripiani (T), e su di essi si deve agire per migliorarne l'efficienza. Modulare T e P permette infatti di ridurre le tempistiche dell'essiccamento primario e ottimizzare il ciclo.

La pressione, in particolare, deve essere inferiore alla tensione di vapore e deve essere scelta in

base alla temperatura a cui è condotto il processo; tipicamente la pressione in camera durante la fase di essiccamento primario di farmaci è compresa tra i 4 ed i 40 Pa (Khairnar *et al.*, 2012). Più la pressione è bassa, maggiore sarà la forza spingente per il trasporto di materia; pressioni eccessivamente basse (inferiori a 6-7 Pa) risultano però controproducenti poiché limitano lo scambio termico e portano ad un allungamento dei tempi dell'essiccamento primario.

La velocità di essiccamento dipende da due grandezze: la temperatura del prodotto, che determina la forza spingente del trasferimento di materia, e la struttura della matrice porosa essiccata, caratteristica legata alla formulazione e al protocollo di congelamento, che determina la resistenza che essa offre al flusso di vapore.

La velocità di sublimazione è tanto più elevata quanto più elevata è la temperatura del prodotto. Essa però dovrà mantenersi al di sotto di un valore critico, superato il quale il prodotto subisce modifiche morfologiche e fenomeni indesiderati, quali il collasso. Il collasso è definito come la perdita della struttura della cake e comporta l'ottenimento di un prodotto poco gradevole nell'aspetto, caratterizzato da elevata umidità residua, maggiori tempi di ricostituzione e impatto negativo sulla stabilità di principi attivi a base proteica (Tang and Pikal, 2004; Kasper *et al.*, 2013). Tale temperatura critica, detta temperatura di collasso (T_{coll}), dipende dal tipo di formulazione, ma anche dal protocollo di congelamento. Generalmente la temperatura di collasso è qualche grado (2-3°C) più alta della temperatura di transizione vetrosa T_g' per soluti amorfi o della temperatura eutettica T_{eu} per i materiali cristallini (Pikal and Shah, 1990).

Alcuni eccipienti cristallini, come mannitolo e glicina, possono avere la capacità di aumentare la temperatura di collasso della soluzione, perché forniscono un supporto alla struttura porosa. Per questa loro funzione, questi eccipienti sono detti *bulking agent* e saranno nuovamente trattati nei paragrafi successivi.

1.1.3 Essiccamento secondario

L'essiccamento secondario mira all'allontanamento del solvente che non si è separato per cristallizzazione ma è rimasto, invece, intimamente legato alla matrice solida essiccata o assorbito sulla sua superficie.

Terminato il processo di essiccamento primario, i prodotti amorfi presentano generalmente un contenuto residuo di acqua tra il 5 e il 20% in peso, mentre quelli cristallini si attestano generalmente su valori più bassi. L'obiettivo dell'essiccamento secondario è di ridurre tale contenuto ad un livello ottimale per la stabilità, solitamente meno dell'1% (Tang and Pikal, 2004).

Non esiste un'opinione di comune accordo riguardante il contenuto residuo ottimale di acqua da ottenere al termine dell'essiccamento, tuttavia, valori troppo bassi di umidità residua, non sono sempre favorevoli alla stabilità proteica. Gli effetti di bassi livelli di acqua residua sulla stabilità fisica e chimica del prodotto solido sono ancora oggetto di ricerca, ma molteplici studi hanno dimostrato che in formulazioni proteiche disidratate oltre un punto critico (ad esempio 1% di umidità) le reazioni di degradazione accelerano nuovamente; tale fenomeno è detto *over-drying* e rappresenta un potenziale rischio nello sviluppo di formulazioni farmaceutiche stabili. (Duralliu *et al.*, 2020)

È importante tener conto del fatto che nel caso di formulazioni amorfe, il livello di umidità ha un impatto importante sulla T_g' del prodotto: nello specifico, l'acqua agisce da plasticizzante, riducendo la temperatura di transizione vetrosa ed aumentando così la mobilità all'interno della matrice. Come conseguenza si ha che le reazioni di degradazione possono essere accelerate, con conseguenze deleterie per la stabilità a lungo termine.

La temperatura a cui viene condotto l'essiccamento secondario è spesso maggiore di quella usata per il primario, generalmente compresa tra 20 e 40°C, per diverse ore (Khairnar *et al.*, 2012). La temperatura del ripiano, tuttavia, deve spesso aumentare gradualmente durante l'esecuzione di tale fase perché una rampa di riscaldamento troppo rapida potrebbe provocare il collasso di prodotti amorfi, a causa dell'ancora elevato contenuto residuo di acqua nel prodotto amorfo e, quindi, della bassa temperatura di transizione vetrosa. I prodotti cristallini non incorrono nel rischio di collasso durante il secondario e, dunque, per tali prodotti è adeguata l'applicazione di una rampa termica più veloce (Tang and Pikal, 2004).

Il desorbimento dell'acqua legata è molto sensibile alla temperatura del prodotto e non dipende in maniera sostanziale dalla pressione della camera, a patto che questa sia inferiore a circa 26 Pa (Pikal *et al.*, 1990). La pressione dell'essiccamento primario, pertanto, è spesso adatta anche al secondario e non è necessario cambiarla.

Anche il tempo di essiccamento è un importante parametro da tenere in considerazione: il prodotto va tenuto ad alta temperatura per un periodo sufficiente a consentire il desorbimento dell'acqua. Solitamente, è consigliabile mantenere il prodotto ad un'alta temperatura del ripiano per un tempo ridotto, piuttosto che ad una temperatura più bassa per un periodo più lungo (Pikal *et al.*, 1990). Il motivo è legato al fatto che la velocità di desorbimento diminuisce drasticamente con il tempo ad una data temperatura. È importante, inoltre, considerare che i prodotti amorfi sono più difficili da essiccare rispetto ai cristallini e che, pertanto, temperature più alte e tempi più lunghi sono necessari per il desorbimento del corretto quantitativo di acqua.

1.2 Applicazione in ambito farmaceutico: le proteine

Le proteine sono le macromolecole che svolgono molti tra i ruoli più dinamici e diversificati del corpo umano: catalizzano reazioni biochimiche, formano recettori e canali nelle membrane, provvedono al supporto intra ed extracellulare, trasportano molecole nella cellula o tra un organo e l'altro. Si stima che il numero di geni del genoma umano codificanti per proteine sia tra i 25000 e i 40000 e con processi quali *splicing* alternativo e modifiche post-traduzionali il numero di proteine funzionali possa essere ancora maggiore. Questa stima pone una grande sfida alla moderna medicina, dato che ad uno stato patologico può corrispondere un'anomalia di tali proteine o una loro concentrazione troppo bassa o troppo alta. Ad oggi l'FDA ha approvato più di 130 nuove proteine o peptidi per uso clinico e molte altre sono in sviluppo (Leader *et al.*, 2008).

I farmaci a base di proteine hanno una serie di vantaggi rispetto a quelli basati su piccole molecole: innanzitutto le proteine sono altamente specifiche e svolgono una serie di complesse funzioni che non possono essere svolte da semplici composti chimici. Essendo, quindi, molto specifici, l'interferenza di tali farmaci sui normali processi biologici e le possibili reazioni avverse sono ridotte. Inoltre, in caso di malattie genetiche, le proteine possono fornire un efficace trattamento senza ricorrere alla terapia genica, ancora non disponibile per la cura di molte patologie (Leader *et al.*, 2008).

Sin dagli anni '80, le proteine hanno iniziato ad emergere come nuova classe di farmaci, acquisendo notevole importanza per la salute umana. I farmaci a base di proteine sono classificati in base alla loro attività farmacologica come farmaci che i) sostituiscono una proteina carente o anormale, ii) ampliano un percorso esistente, iii) forniscono una nuova funzione o attività, iv) interferiscono con una molecola o un organismo, v) trasportano un carico come radionuclide, farmaco citotossico o effettore proteico (Leader *et al.*, 2008).

In alternativa, i farmaci a base di proteine possono essere raggruppati in molteplici tipologie molecolari, includendo farmaci basati su anticorpi, anticoagulanti, fattori del sangue, proteine *scaffold* ingegnerizzate, proteine morfogenetiche delle ossa, enzimi, proteine di fusione, fattori di crescita, ormoni, interferoni, interleuchine e trombolitici (Carter, 2011).

Nell'industria biofarmaceutica, tra le forme di dosaggio con cui vengono attualmente commercializzati i biofarmaci a base di proteine, prevalgono i prodotti liofilizzati (46%), seguiti da soluzioni e sospensioni (Figura 1.6.a). La Figura 1.6.b riporta una distribuzione percentuale delle varie classi funzionali di prodotti a base di proteine che vengono commercializzati in forma liofilizzata (Gervasi *et al.*, 2018).

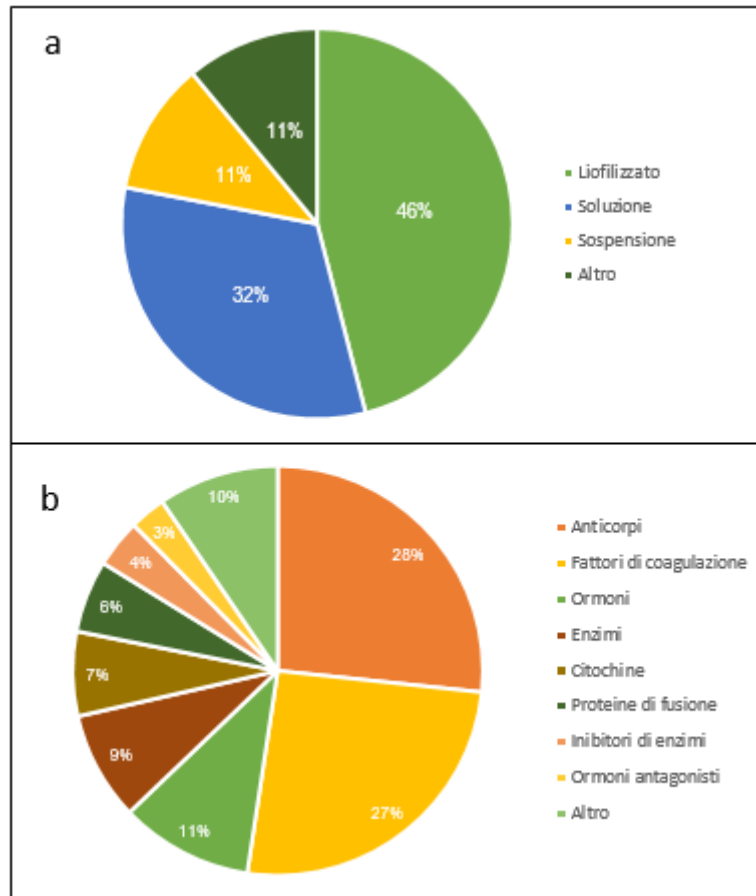


Figura 1.6 - (a) Grafico a torta riportante le percentuali delle varie forme di dosaggio con cui sono commercializzati i farmaci proteici. La forma liofilizzata risulta prevalente. Figura tratta da (Butreddy *et al.*, 2021) con modifiche. (b) Grafico a torta riportante la ripartizione delle principali classi funzionali di farmaci proteici sul totale di biofarmaci a base di proteine commercializzati in forma liofilizzata. Figura tratta da (Gervasi *et al.*, 2018) con modifiche.

Ad oggi, tra le molteplici sfide che questo settore offre, sicuramente vi è quella di garantire un efficace mantenimento dell'attività terapeutica dopo e durante il processo di produzione. Come si avrà modo di spiegare nei paragrafi successivi, molteplici sono i fattori critici che minano l'integrità e la stabilità delle proteine, sia durante la fase di stoccaggio che quella di liofilizzazione stessa, e di notevole interesse è comprendere come arginare tali effetti degradativi.

1.3 Stabilità delle formulazioni proteiche durante liofilizzazione: Meccanismi di denaturazione

Le proteine sono molecole estremamente sensibili e si degradano molto facilmente. Nonostante la liofilizzazione sia da decenni il metodo universalmente più utilizzato per ottenere prodotti farmaceutici stabili nel tempo, essa comunque sottopone le proteine a numerosi stress che possono causare notevoli perdite di attività biologica. Una proteina tende a denaturarsi ogni qual volta essa sia sottoposta a variazioni di temperatura, pH o interagisca con un'interfaccia. Il processo di liofilizzazione espone il principio attivo a stress legati alle basse temperature, formazione di interfacce acqua/ghiaccio, modifiche nella concentrazione di soluti, separazione di fase e disidratazione.

È, quindi, di fondamentale importanza comprendere a fondo i principali meccanismi con cui una proteina si denatura, le loro cause ed effetti e, infine, conoscere i fattori di rischio più critici del processo di liofilizzazione a cui il prodotto viene sottoposto, con lo scopo di minimizzarne gli effetti deleteri.

Prima di procedere nella trattazione risulta necessario chiarire il significato del concetto di stabilità. Quando si parla di stabilità in ambito proteico è importante distinguere tra due possibili significati, ovvero “stabilità proteica” e “stabilità farmaceutica”.

La stabilità farmaceutica è un concetto legato alla capacità di una proteina di non subire cambiamenti irreversibili nella struttura, conformazione o stato di aggregazione. L'instabilità termodinamica, o proteica, si riferisce invece a variazioni di tipo fisico reversibili che non necessariamente si traducono in instabilità farmaceutica (Bhatnagar *et al.*, 2007).

1.3.1 Instabilità fisica

L'instabilità fisica si riferisce a qualsiasi processo tramite cui la proteina cambia il suo stato fisico senza modificare la propria composizione chimica (Manning *et al.*, 2010).

I più comuni meccanismi di degradazione fisica sono la denaturazione, l'aggregazione e l'adsorbimento.

La denaturazione consiste nella perdita parziale o totale della struttura secondaria e terziaria della proteina e può essere causata da vari fattori, quali temperatura, pH, aggiunta di osmoliti denaturanti. La proteina denaturata subisce cambiamenti nel proprio stato fisico mentre, invece, mantiene invariata la propria composizione chimica (Butreddy *et al.*, 2021); infatti, non vengono coinvolti legami peptidici ma solo legami di tipo non covalente che mantengono inalterata la struttura primaria della proteina. La denaturazione può avvenire allo stato solido ma è più probabile nel caso di una proteina in stato acquoso o durante il processo di essiccamento.

La denaturazione può essere di natura termica, a caldo o a freddo. La denaturazione a caldo è lo stress più comune e comporta la perdita della struttura globulare a temperature elevate; durante la denaturazione termica, le molecole di proteina aventi struttura dispiegata (*unfolded*) rapidamente si associano e formano aggregati. Questo fenomeno può accadere anche allo stato solido a temperature sufficientemente alte (tipicamente dai 150°C in su).

La maggior parte delle proteine è anche soggetta a denaturazione a freddo, spesso al di sotto del punto di congelamento dell'acqua (Manning *et al.*, 2010). Generalmente i residui idrofobici della proteina sono ripiegati all'interno della conformazione nativa e la denaturazione/*unfolding* comporta l'esposizione di tali gruppi all'esterno della struttura tridimensionale. L'aumento di area superficiale e l'esposizione di tali gruppi idrofobici nella struttura dispiegata promuove a

sua volta fenomeni di adsorbimento e aggregazione (Mensink *et al.*, 2017).

La denaturazione chimica è, invece, promossa dall'interazione con denaturanti, ovvero sostanze capaci di legarsi anche in modo transitorio, attraverso legami deboli come ponti idrogeno o forze di van der Waals, con determinati residui amminoacidici della proteina. I legami con questi agenti sono preferiti dal punto di vista termodinamico a quelli intramolecolari con altri residui o con l'acqua e ciò promuove la perdita di configurazione tridimensionale della proteina. Questo processo è in genere reversibile, ovvero una proteina può tornare alla propria struttura nativa, ripiegandosi (*fold*ing). Può accadere, però, che due o più proteine denaturate interagiscano tra di loro attraverso le porzioni idrofobiche esposte durante il dispiegamento, aggregandosi. L'aggregazione, al contrario della denaturazione, è nella grande maggioranza dei casi un processo irreversibile.

L'aggregazione può essere indotta da un numero piuttosto ampio di interazioni molecolari e fattori ambientali. Gli aggregati possono nascere attraverso svariati meccanismi e possono essere classificati in molti modi, come ad esempio solubili/insolubili, covalenti/non covalenti, reversibili/irreversibili. La loro presenza nel farmaco è indesiderata, perché tali aggregati possono portare a reazioni immunogeniche o eventi avversi durante la somministrazione (Cromwell *et al.*, 2006), oltre che ad una riduzione dell'attività terapeutica del prodotto.

Con la definizione di aggregati solubili si indicano generalmente agglomerati che non sono visibili come particelle discrete e che non possono essere rimosse tramite un filtro dai pori di dimensione pari a 0.22 μm . Un livello di aggregati solubili al di sotto del 5-10% è generalmente accettabile all'interno di una formulazione proteica. Tuttavia, non vi è un comune accordo sul massimo livello di aggregati consentito, in quanto esso varia da caso a caso: alcune proteine risultano sicure e stabili con livelli di aggregati relativamente elevati, mentre altre sono significativamente affette dal processo di aggregazione sia nella stabilità che nella sicurezza. Gli aggregati insolubili, di contro, sono spesso visibili ad occhio nudo e possono essere rimossi per filtrazione (Cromwell *et al.*, 2006).

Aggregati reversibili si formano a seguito di interazioni non covalenti relativamente deboli tra le proteine (Cromwell *et al.*, 2006). Quando i legami sono più forti, e coinvolgono per esempio l'instaurazione di ponti disolfuro tra residui esposti di cisteina, l'aggregazione diventa irreversibile.

È documentato in letteratura che proteine non native hanno una tendenza ad aggregarsi maggiore rispetto a quelle native.

L'aggregazione può avere luogo sia allo stato liquido che allo stato solido e avviene per lo più come conseguenza delle interazioni proteina-proteina, influenzate da cambiamenti nella concentrazione, viscosità, temperatura, forza ionica, pH, condizioni di stoccaggio, processi di congelamento-scongelo, agitazione, liofilizzazione e altri fattori coinvolti nello sviluppo della formulazione (Wang and Roberts, 2018).

Per quanto riguarda l'adsorbimento, esso avviene quando i residui idrofobici della proteina interagiscono e sono adsorbiti su una superficie, portando quindi ad una riduzione della concentrazione della proteina in soluzione. Tra le superfici responsabili di ciò sono incluse quelle dei serbatoi di produzione, il vetro delle fiale, i tappi in gomma, ma anche i componenti del processo quali filtri e tubi (Butreddy *et al.*, 2021).

1.3.2 Instabilità chimica

Numerosi fattori chimici sono coinvolti nella degradazione di proteine; tra questi ricordiamo ossidazione, idrolisi e deaminazione.

Ossidazione

L'ossidazione delle proteine è legata alla presenza di catene laterali di amminoacidi come metionina, cisteina, istidina, triptofano e tirosina. Residui di metionina e cisteina possono dare ossidazione anche se esposti ad ossigeno atmosferico in condizioni di stoccaggio comuni. Tracce di ioni metallici, perossidi o radicali liberi possono essere presenti nella formulazione della proteina e indurre il fenomeno di auto-ossidazione. Il principale meccanismo responsabile dell'instabilità proteica causata da ossidazione riguarda le catene laterali di cisteina, coinvolte nella formazione di legami disolfuro. Anche l'ossidazione di altri amminoacidi può, tuttavia, alterare la conformazione nativa (Butreddy *et al.*, 2021).

Specie reattive come perossido di idrogeno, anioni superossido, radicali idrossilici e specie azotate attive come ossido nitrico, nitrati, nitriti, perossinitriti, inducono modifiche ossidative nelle proteine terapeutiche; altri fattori di rischio per tale processo includono esposizione alla luce, tracce di metalli, elevati livelli di perossidi ed ossidanti chimici. L'ossidazione delle catene laterali reattive può accadere durante tutto il processo di produzione, purificazione, formulazione e stoccaggio (Manning *et al.*, 2010).

Deaminazione

La deaminazione consiste nell'idrolisi del gruppo amminico dell'asparagina o della glutammina ad acido carbossilico, liberando una molecola di ammoniaca, ed è promosso da elevate temperature, ma soprattutto da pH estremi. La deaminazione influenza la bioattività, l'emivita, l'aggregazione, l'immunogenicità e la conformazione proteica. La velocità di tale reazione dipende da struttura, temperatura, pH, forza ionica, tipo di tampone utilizzato e interazioni intramolecolari. In particolare, la deaminazione dell'asparagina è una delle modifiche chimiche più comuni nelle proteine e può generare instabilità a causa dei comportamenti aggregativi che induce (Butreddy *et al.*, 2021).

Idrolisi

L'idrolisi può portare alla rottura dei legami peptidici. Il meccanismo di idrolisi è indotto attraverso un processo di catalisi da parte del gruppo carbonilico del residuo di asparagina. Altri fattori responsabili per l'idrolisi sono temperatura e pH. L'idrolisi di legami peptidici Asp-Gly e Asp-Pro porta ad una frammentazione della proteina (Goswami *et al.*, 2013). L'idrolisi enzimatica è uno dei percorsi di degradazione più comuni in formulazioni ad alta concentrazione di proteina e il rischio ad esso associato è maggiore nei primi stadi di purificazione in quanto il quantitativo di contaminanti risulta più elevato (citazione ancora non rintracciata)

La Figura 1.7 riassume i principali percorsi di degradazione chimica e fisica a cui può essere soggetta una proteina, riportando i principali fattori che generano instabilità.

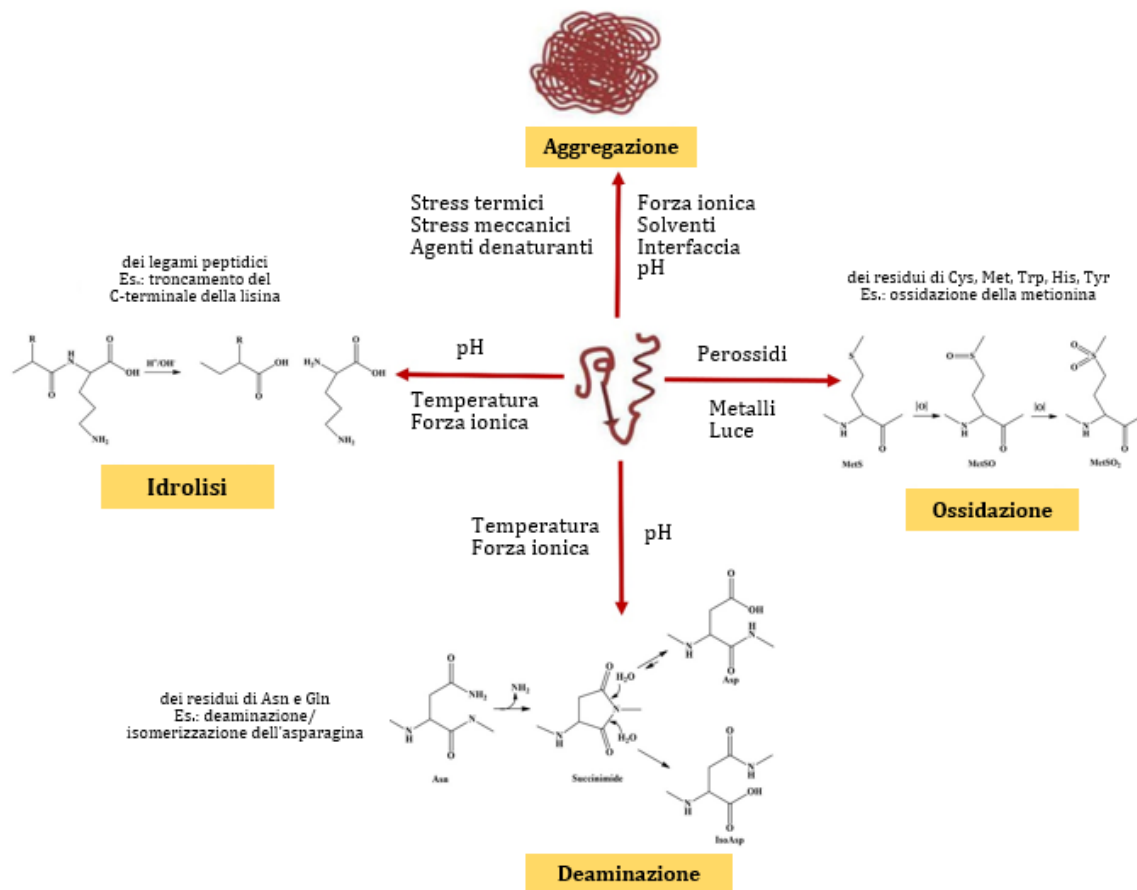


Figura 1.7 - Vari percorsi di instabilità fisica e chimica a cui sono soggette le proteine.
 Figura tratta da (Butreddy et al., 2021) con modifiche.

1.3.3 Stress legati al processo di liofilizzazione

Durante un ciclo di liofilizzazione le proteine vanno incontro a numerosi stress, molti dei quali sono concentrati nella fase di congelamento; per tal motivo essa è generalmente ritenuta la fase più critica dell'intero processo. Sono perciò illustrati in questa sezione i fattori di rischio più rilevanti che possono portare a denaturazione/*unfolding* della proteina e quindi ad una perdita dell'attività biologica.

Denaturazione a freddo

La curva relativa all'energia libera di denaturazione di una proteina (Figura 1.8) ha un andamento solitamente parabolico e diventa negativa (ovvero la forma denaturata è termodinamicamente favorita rispetto a quella nativa) non solo ad alte temperature, ma anche a basse. Ciò significa che non solo le alte temperature, come ben noto, possono destabilizzare una proteina, ma anche quelle basse hanno un effetto e il fenomeno corrispondente è indicato come denaturazione a freddo (Wang, 2000). Le proteine quindi sono termodinamicamente stabili solo in un limitato intervallo di temperatura (Tang and Pikal, 2005).

La denaturazione a freddo è relativa solamente all'abbassamento delle temperature e si ha anche in assenza di congelamento; va pertanto differenziata dalla denaturazione legata al congelamento vero e proprio.

La natura della denaturazione a freddo non è ancora delineata in modo soddisfacente; si ritiene che, poiché la solubilità di gruppi apolari in acqua aumenta con il decrescere della temperatura,

le interazioni solvofobiche nella proteina si indeboliscono con il decrescere della temperatura e ciò promuove l'esposizione dell'interno idrofobico della proteina al solvente. In luce di ciò, mentre la denaturazione termica a caldo è guidata dall'entropia, quella a freddo è guidata da fenomeni entalpici (Wang, 2000).

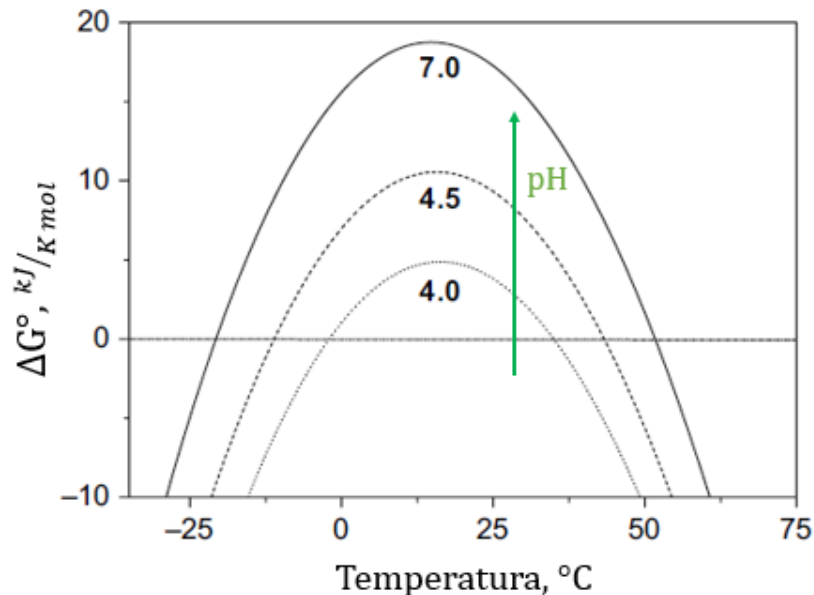


Figura 1.8 - Andamento dell'energia libera di Gibbs legata alla denaturazione, al variare di temperatura e pH. Figura tratta da (Bhatnagar et al., 2007) con modifiche.

Crioconcentrazione

Durante il congelamento, a causa della formazione di cristalli di solvente, la concentrazione di soluto nella fase liquida rimanente aumenta rapidamente. Pertanto, tutte le proprietà fisiche direttamente collegate alla concentrazione, quali forza ionica e viscosità, possono variare notevolmente e potenzialmente destabilizzare la proteina (Wang, 2000).

Generalmente le basse temperature riducono la velocità delle reazioni chimiche, ma in una soluzione parzialmente congelata tali reazioni possono nuovamente accelerare, proprio a causa dell'aumento della concentrazione di soluto (Pikal, 2004).

Formazione di interfaccia acqua-ghiaccio

Durante il congelamento si assiste alla creazione di interfacce tra i cristalli di ghiaccio che si generano e la restante soluzione non congelata. Le proteine in soluzione acquosa possono interagire con l'interfaccia, adsorbendosi o andando incontro a denaturazione. Un congelamento rapido genera cristalli di dimensioni inferiori e, quindi, aree di interfaccia acqua-ghiaccio maggiori; aree ridotte sono, invece, generate da un congelamento lento e ciò in genere riduce il rischio di denaturazione proteica (Wang, 2000).

L'aggiunta di tensioattivi riduce notevolmente l'effetto denaturante della superficie acqua-ghiaccio, in quanto essi impediscono stericamente l'avvicinamento delle proteine alle interfacce (Manning et al., 2010).

Variazioni di pH

Molte proteine sono stabili solo in ristretti intervalli di pH, al di fuori dei quali la repulsione/attrazione elettrostatica tra le proteine può aumentare, provocando l'*unfolding*, la

denaturazione e/o l'aggregazione.

Inoltre, variazioni di pH possono influenzare notevolmente la velocità di reazioni chimiche di degradazione.

Durante il congelamento di proteine, alcune specie del buffer possono cristallizzare in maniera selettiva, causando variazioni importanti di pH. Un esempio è costituito dal buffer fosfato di sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), a causa della cristallizzazione selettiva del Na_2HPO_4 (Wang, 2000).

Separazione di fase

Un aumento della concentrazione di soluto può provocare una separazione di fase nel liquido con il decrescere della temperatura. Di conseguenza, possono generarsi due o più fasi amorfe durante il congelamento. Il fenomeno è stato riportato principalmente per formulazioni contenenti elettroliti, polimeri, polisaccaridi, proteine o tensioattivi (Bhatnagar *et al.*, 2007). La ripartizione della proteina in due fasi, le quali avranno chiaramente diversa composizione e diverse proprietà, può privare la proteina dell'effetto crioprotettivo degli stabilizzanti e di conseguenza renderla più vulnerabile a stress.

Diversi studi hanno dimostrato che l'inserimento del mannitolo nella formulazione minimizza la separazione di fase e la conseguente degradazione della proteina. Si pensa che la cristallizzazione del mannitolo segreghi il crioconcentrato in domini microscopici, inibendo la separazione di fase. Si ritiene, pertanto, che una scelta appropriata della composizione della formulazione (per esempio, con l'aggiunta di mannitolo), accoppiata ad appropriate condizioni di processo, in particolare agendo sulla velocità di congelamento, possa prevenire il fenomeno di separazione di fase (Bhatnagar *et al.*, 2007).

L'instabilità delle proteine a causa della separazione di fase è spiegata dal fatto che quest'ultima modifica le interazioni proteina-eccipiente e/o dal fatto che i cristalli di ghiaccio diventino possibili siti per la denaturazione superficiale (Izutsu and Kojima, 2000).

Cristallizzazione del soluto

L'aumento di concentrazione che si verifica durante il congelamento può avere un'ulteriore conseguenza, ovvero la cristallizzazione del soluto; la cristallizzazione di un eccipiente può imporre stress addizionali sulla stabilità della proteina, legati alla formazione di un'ulteriore interfaccia su cui può avvenire denaturazione ed adsorbimento. Eccipienti come glicina, mannitolo, glicole polietilenico possono cristallizzare completamente durante il processo di liofilizzazione se essi raggiungono a causa della crioconcentrazione un sufficiente livello di sovrasaturazione.

La cristallizzazione dei sali del buffer, come precedentemente accennato, può provocare inoltre importanti cambiamenti di pH, anche di 3 o 4 unità, in particolare in sistemi tampone a base di fosfato di sodio e potassio.

Nonostante ciò, la capacità dei soluti di cristallizzare offre un supporto macroscopico al sistema amorfo e permette di svolgere un essiccamento primario al di sopra delle temperature di collasso della fase amorfa senza osservare collasso strutturale del prodotto, rendendo il processo complessivamente più veloce (Bhatnagar *et al.*, 2007)

Disidratazione

Le proteine in soluzione acquosa sono completamente idratate e coperte da un monostrato di acqua, chiamato guscio di idratazione. Il processo di liofilizzazione rimuove parte di tale guscio e ciò rischia di alterare lo stato nativo proteico, causando denaturazione (Butreddy *et al.*, 2021).

La proteina completamente idratata, quando esposta ad un ambiente povero di acqua durante il processo, tende a trasferire protoni a gruppi carbossilici ionizzati; ciò comporta una riduzione nella densità di carica nella proteina, che può facilitare le interazioni idrofobiche proteina-proteina e favorirne l'aggregazione (Wang, 2000)

Le molecole di acqua possono anche essere parte integrante dei siti attivi di una proteina e la loro rimozione, durante una disidratazione, può causare inattivazione.

Infine, la disidratazione generata dalla liofilizzazione potrebbe essere non uniforme; vi potrebbero essere zone dove vi sia un localizzato *over-drying*, che a sua volta potrebbe causare una denaturazione indotta dalla disidratazione.

1.4 Eccipienti e meccanismi di stabilizzazione della proteina durante liofilizzazione

Come discusso nel paragrafo precedente, le proteine subiscono numerosi stress durante il processo di liofilizzazione e risulta quindi di notevole importanza progettare una formulazione capace di minimizzare la perdita di attività terapeutica.

È ormai pratica comune nell'industria farmaceutica, oltre all'ottimizzazione dei parametri di processo, l'utilizzo di sostanze, dette eccipienti, in grado di attuare un'azione protettiva nei confronti della proteina. A tal proposito si distinguono eccipienti che proteggono la proteina durante il congelamento (crioprotettori) e durante l'essiccamento (lioprotettori).

I meccanismi di protezione con cui agiscono i vari eccipienti sono diversi tra di loro, infatti non è affatto scontato che, ad esempio, un buon lioprotettore sia anche efficace come crioprotettore, proprio perché gli stress subiti durante congelamento sono diversi da quelli causati dall'essiccamento. Spesso, pertanto, è necessario prevedere nella formulazione più eccipienti, proprio per garantire un'adeguata protezione in entrambe le fasi del processo di liofilizzazione (Wang, 2000).

1.4.1 Meccanismi di stabilizzazione

I meccanismi di stabilizzazione con cui agiscono gli eccipienti possono essere di tipo termodinamico o cinetico. In particolare, un crioprotettore che sposta l'equilibrio dalla conformazione denaturata verso quella nativa opera tramite un meccanismo termodinamico. Esempi di meccanismi di stabilizzazione di tipo termodinamico sono la teoria dell'esclusione preferenziale e della sostituzione delle molecole d'acqua. Di contro, un crioprotettore che rallenta la velocità di inattivazione ma non sposta l'equilibrio termodinamico tra stato nativo e denaturato agisce tramite un meccanismo cinetico; l'ipotesi della vetrificazione ne è un esempio (Butreddy *et al.*, 2021)

La teoria maggiormente usata per spiegare la stabilizzazione di tipo termodinamico è quella dell'esclusione preferenziale, proposta per spiegare la stabilizzazione della proteina in soluzione durante il congelamento. Secondo questa teoria, i crioprotettori sono preferenzialmente esclusi dalla superficie della proteina, che preferisce interagire con l'acqua (idratazione preferenziale) e ciò incrementa l'energia libera di Gibbs dello stato denaturato, favorendo la conformazione nativa (Wang, 2000; Bhatnagar *et al.*, 2007). La denaturazione, infatti, comporterebbe un aumento della superficie esposta dalla proteina in contatto con il solvente e quindi una maggiore esclusione preferenziale: ciò rende il processo di denaturazione termodinamicamente sfavorito (variazione di energia libera $\Delta G > 0$) (Bhatnagar *et al.*, 2007). L'esclusione preferenziale

aumenta, oltretutto, con la concentrazione di eccipiente.

La teoria della sostituzione delle molecole d'acqua afferisce anch'essa ai meccanismi di tipo termodinamico, ma acquisisce importanza nella fase di essiccamento. Gli eccipienti si sostituiscono all'acqua nella formazione di legami idrogeno con la proteina, generalmente tramite i loro gruppi idrossilici, per soddisfare la richiesta di legami idrogeno dei residui polari (Mensink *et al.*, 2017). Infatti la proteina, a causa della disidratazione, potrebbe formare legami idrogeno intramolecolari di tipo non-nativo che possono portare ad *unfolding*; se l'eccipiente funge da sostituto dell'acqua, la formazione di legami idrogeno non-nativi tende ad essere inibita (Pisano and Arsiccio, 2019).

La vetrificazione è, invece, un meccanismo che descrive la stabilizzazione da un punto di vista cinetico ed è legata alla T_g della matrice vetrosa che contiene l'eccipiente amorfo e la proteina. Si basa sul concetto di immobilizzare la proteina in una matrice rigida vetrosa: l'aggiunta di eccipienti aumenta la viscosità della soluzione in cui si trova la proteina dispersa e ne riduce la mobilità. Di conseguenza, *unfolding* e degradazione risultano rallentati (Chang *et al.*, 2005), senza che venga influenzata l'energia libera legata alla denaturazione.

Per quanto riguarda l'azione protettiva esercitata dai tensioattivi, sono stati proposti differenti meccanismi, tra cui il fatto che essi si dispongano preferenzialmente alle interfacce, riducendo i fenomeni di adsorbimento e aggregazione. In questo caso, l'effetto protettivo dipende fortemente dalla concentrazione del tensioattivo ed è correlato alla concentrazione critica micellare.

E' stato anche proposto che il tensioattivo possa partecipare al *refolding* della proteina, aumentando l'energia libera della configurazione denaturata, o che si possa legare alla proteina in soluzione, prevenendone l'aggregazione (Pisano and Arsiccio, 2019). Proprio relativamente a quest'ultimo caso, è stato dimostrato che i polisorbati possono legarsi ad alcune proteine, come l'ormone della crescita; anche altri tensioattivi, ionici e non, sono in grado di formare legami con proteine. In tutti questi casi, l'interazione diretta con lo stato nativo della proteina può portare ad una stabilizzazione conformazionale (Manning *et al.*, 2010).

1.4.2 Eccipienti comuni

Tra gli eccipienti più comunemente utilizzati durante il processo di liofilizzazione si ricordano:

- Zuccheri, come disaccaridi quali saccarosio, trealosio, lattosio o il monosaccaride glucosio;
- Polioli, come sorbitolo e glicerolo;
- Polimeri come albumina, destrano, polivinilpirrolidone (PVP) o idrossietil cellulosa (HEC);
- Amminoacidi, come glicina, prolina, arginina;
- Tensioattivi, come i polisorbati Tween 20 e Tween 80.

Zuccheri/polioli

Molti zuccheri o polioli sono usati come efficaci crioprotettori e lioprotettori (Tabella 1.1). Generalmente il livello di stabilizzazione da loro offerto dipende fortemente dalla concentrazione: una concentrazione di 0.3 M è stata spesso indicata come valore minimo per ottenere una stabilizzazione significativa (Arakawa *et al.*, 2001). Il meccanismo di azione degli zuccheri/polioli è generalmente legato all'esclusione preferenziale durante congelamento e alla vetrificazione/sostituzione delle molecole d'acqua durante l'essiccamento.

Si è riscontrato come i disaccaridi siano particolarmente efficaci. L'inefficacia di saccaridi più

grandi potrebbe essere legata all'ingombro sterico, che interferisce nei legami idrogeno tra zucchero e proteina.

Tra i disaccaridi, saccariosio e trealosio sono i più comunemente usati; il trealosio sembra essere un migliore lioprotettore perché ha una temperatura di transizione vetrosa maggiore, in parte giustificata dalla formazione di microcristalli di trealosio, proteina e acqua (Crowe.,1992; Crowe *et al.*, 1996).

Tra i polioli, il mannitolo è spesso utilizzato come *bulking agent*, mentre il glicerolo è principalmente impiegato come crioprotettore.

Tabella 1.1 - Saccaridi e polioli maggiormente utilizzati come eccipienti nel processo di liofilizzazione (Liu and Zhou, 2015).

Tipo	Nome	Formula	PM (g/mol)	T _g ' (°C)	T _{coll} (°C)
<i>Monosaccaridi</i>	Glucosio	$C_6H_{12}O_6$	180.16	-43	-41
	Galattosio			-41	
	Mannosio			-41	
	Fruttosio			-42	
	Ribosio	$C_5H_{10}O_5$	150.13	-47	
	Xilosio			-48	
<i>Oligosaccaridi</i>	Saccariosio	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	-32	-31
	Lattosio				-30.5
	Maltosio monoidrato	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	360.32	-30	
	Trealosio diidrato	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$	378.34		-29
	Raffinosio pentaidrato	$C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 5H_2O$	594.53		-26
<i>Polisaccaridi</i>	Mannitolo	$C_6H_{14}O_6$	182.17	-27	
	Glicerolo	$C_3H_8O_3$	92.09	-65	
	Sorbitolo	$C_6H_{14}O_6$	182.17	-44	-54
	Xilitolo	$C_5H_{12}O_5$	152.17	-47	
	Inositolo	$C_6H_{12}O_6$	180.16		

Più recente è l'interesse per le ciclodestrine (CD) come eccipienti. Esse sono oligosaccaridi ciclici che consistono in unità di D-glucopiranosio unite tramite legami glicosidici α -1,4. La nomenclatura delle CD dipende dal numero di unità di glucosio nella struttura (Figura 1.9.a). L' α -CD, β -CD e γ -CD includono rispettivamente 6, 7 e 8 unità di glucopiranosio. Le ciclodestrine possiedono una superficie esterna idrofila e una cavità idrofobica. Possono incapsulare altre molecole mediante la formazione di complessi di inclusione (Parmar *et al*,

2018). La loro struttura può essere descritta come toroidale cava, simile pertanto ad un tronco di cono (Figura 1.9.b). In questo modo, le ciclodestrine possono legare porzioni idrofobiche della superficie di proteine, generando uno strato di copertura idrofilo che aumenta la solubilità della proteina (Otzen *et al.*, 2002).

Alcuni studi riportano che le β -CD aumentano la stabilità fisica, inibendo l'aggregazione, per un elevato numero di proteine, quali per esempio gli ormoni della crescita (Otzen *et al.*, 2002); risultati simili sono stati riportati per l'insulina (Tokihiro *et al.*, 1997).

Le β -ciclodestrine sono le più utilizzate, grazie alla maggiore disponibilità, il basso prezzo e l'elevata capacità di accogliere molecole idrofobiche (Otzen *et al.*, 2002)

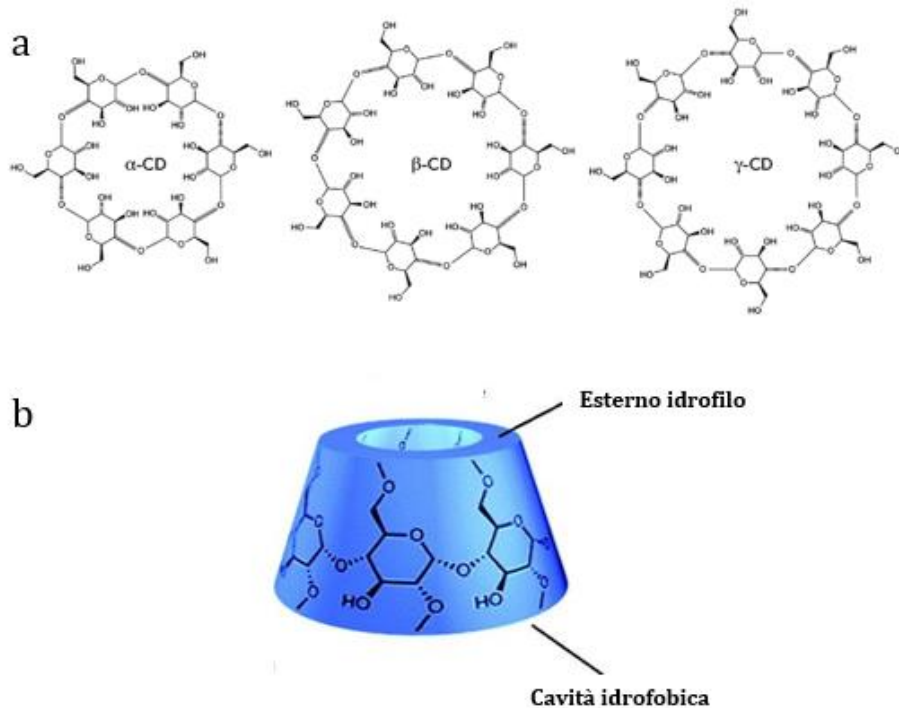


Figura 1.9 - Struttura delle ciclodestrine. (a) Figura tratta da (Nikitenko and Prassolov, 2013) con modifiche. (b) Struttura 3D delle ciclodestrine, in cui si evidenzia la forma a tronco di cono. Figura tratta da (Baykal *et al.*, 2019) con modifiche.

Polimeri

I polimeri sono utilizzati come eccipienti, principalmente perché innalzano la temperatura di transizione vetrosa della soluzione. I polimeri inoltre creano ingombro sterico tra le molecole proteiche, aumentano la viscosità della soluzione, inibiscono la cristallizzazione di eccipienti presenti nella formulazione e aiutano a stabilizzare il pH (Liu and Zhou, 2015).

È stato riportato che polimeri come il destrano stabilizzano proteine aumentando notevolmente la T_g della formulazione, ed inibendo la cristallizzazione di piccoli eccipienti stabilizzanti quali il saccarosio (Skrabanja *et al.*, 1994). Inoltre, polietilenglicole (PEG) 3350 o destrano riducono l'abbassamento di pH durante il congelamento di una soluzione con buffer fosfato, inibendo la cristallizzazione del fosfato disodico (Heller *et al.*, 1997)

D'altra parte, i polimeri potrebbero anche indurre separazione di fase durante il congelamento o non essere in grado di formare efficienti legami idrogeno con la proteina a causa del loro ingombro sterico (Wang, 2000).

Proteina in alte concentrazioni

L'aggregazione delle proteine in soluzione dipende dalla concentrazione: un aumento della concentrazione delle proteine superiore a 0.02 mg/ml può facilitare il processo di aggregazione. Di contro, proteine in concentrazioni elevate sono spesso più resistenti agli stress legati a congelamento ed essiccamento. I meccanismi legati a questa auto-stabilizzazione non sono ancora chiari, ma varie spiegazioni sono state proposte. Una prima ipotesi afferma che l'alta concentrazione, durante il congelamento, possa temporaneamente inibire l'*unfolding* tramite la repulsione sterica generata tra proteine adiacenti. Una seconda ipotesi si fonda sul fatto che la superficie di interfaccia tra ghiaccio e soluzione acquosa è limitata e a concentrazioni elevate la percentuale di proteine che vi si può adsorbire e denaturare è minore (Wang, 2000).

Tensioattivi

I tensioattivi riducono notevolmente la tensione superficiale della soluzione proteica e la tensione interfacciale tra due liquidi. I meccanismi attraverso cui questi composti agiscono sono stati descritti nel paragrafo precedente. Basse concentrazioni di tensioattivo sono spesso sufficienti, grazie alla loro bassa concentrazione micellare critica (CMC). Tween 80 è il tensioattivo maggiormente utilizzato per stabilizzare soluzioni proteiche durante il congelamento: è dimostrato che protegga sia la lattato deidrogenasi (LDH) che la glutammato deidrogenasi (GDH) per concentrazioni maggiori di 0.01% w/v (Wang, 2000).

I tensioattivi agiscono anche come agenti umidificanti durante il processo di idratazione (Liu and Zhou, 2015).

Amminoacidi

Alcuni amminoacidi possono essere utilizzati come crioprotettori e/o lioprotettori: glicina, prolina e idrossiprolina incrementano notevolmente il recupero della attività proteica. È stato dimostrato che la glicina, a basse concentrazioni, riduce gli abbassamenti di pH nella fase di congelamento legati al buffer fosfato. Dunque, gli amminoacidi potrebbero proteggere la proteina dagli stress indotti dal congelamento riducendo, almeno in parte, l'estensione della precipitazione selettiva del buffer (Wang, 2000).

Solventi non acquosi

A basse concentrazioni, solventi non acquosi possono avere un effetto stabilizzante. Questi solventi dall'effetto stabilizzante includono polietilenglicone (PEG), glicole etilenico, glicerolo e alcuni solventi polari ed aprotici come il dimetilsolfossido (DMSO) e la dimetilformammide (DMF). Gli alcoli polidrici sono comunemente usati come efficienti crioprotettori (Wang, 2000).

1.5 Co-solventi ed uso del tert-butanolo

Generalmente l'acqua è il tipico solvente in quantità significative che deve essere rimosso dalla soluzione tramite liofilizzazione. Tuttavia, non è inusuale trovare piccole quantità di solventi organici, o come co-solventi volutamente introdotti o come residui del processo di produzione. Ci sono infatti casi in cui liofilizzare da un solvente organico o da miscele acqua/solvente organico può offrire una serie di vantaggi rispetto alle soluzioni acquose classiche.

Tra i vantaggi relativi all'utilizzo di co-solventi si riscontrano:

- un aumento della velocità di sublimazione ed una riduzione del tempo di essiccamento;
- un aumento della stabilità chimica della soluzione pre- e post-essiccamento;
- un aumento della bagnabilità del farmaco e della solubilità in soluzione;
- un miglioramento delle caratteristiche di ricostituzione, quali per esempio una riduzione dei tempi richiesti;
- un miglioramento della sterilità della soluzione bulk prima dell'essiccamento.

Ciononostante, molteplici sono i problemi associati al loro uso. Potenziali svantaggi infatti sono:

- problemi relativi alla tossicità del solvente rimanente;
- alta infiammabilità e complicazioni nella gestione - e quindi rischi per l'operatore;
- il bisogno di particolari attrezzature, strutture o aree di stoccaggio;
- proprietà del solvente difficili da gestire;
- il bisogno di un elevato grado di purezza del solvente stesso;
- elevati costi;
- un maggiore controllo normativo.

Pertanto, vantaggi e svantaggi del loro uso devono essere attentamente valutati prima dell'eventuale introduzione nel processo di produzione di un farmaco (Teagarden and Baker, 2002).

Attualmente il co-solvente più studiato e più utilizzato è il tert-butanolo (TBA), che possiede elevata pressione di vapore, congela completamente nella maggior parte dei liofilizzatori, sublima velocemente durante l'essiccamento primario, aumenta le velocità di sublimazione e ha bassa tossicità. Ad oggi viene usato nel mercato dei prodotti farmaceutici iniettabili. Quando viene usato questo solvente, sia la formulazione che il controllo di processo richiedono un'adeguata ottimizzazione per massimizzare la velocità di essiccamento e minimizzare i livelli di solvente residuo alla fine del processo (Teagarden and Baker, 2002).

Studi hanno dimostrato che il tert-butanolo riduce l'essiccamento di circa la metà del tempo, quando affiancato al saccarosio, e la temperatura di collasso risulta innalzata. Il TBA congela velocemente e rimane congelato durante l'essiccamento primario; quando esso sublima, crea una struttura porosa che facilita il trasferimento di materia del vapore acqueo, grazie alla ridotta resistenza dello strato secco. Il prodotto essiccato al termine del processo presenta, inoltre, un significativo aumento di superficie (Teagarden and Baker, 2002).

In particolare, il punto di congelamento del TBA è a 24°C e l'eutettico del sistema TBA-acqua è a temperature maggiori di -10°C; ciò permette la conduzione dell'essiccamento primario a temperature relativamente alte. Nei sistemi congelati la presenza di TBA porta alla formazione di cristalli di ghiaccio a forma di aghi (Figura 1.10). La forma e la dimensione media dei cristalli di TBA dipende sia dalla concentrazione che dalla velocità di congelamento (Bhatnagar *et al.*, 2020).

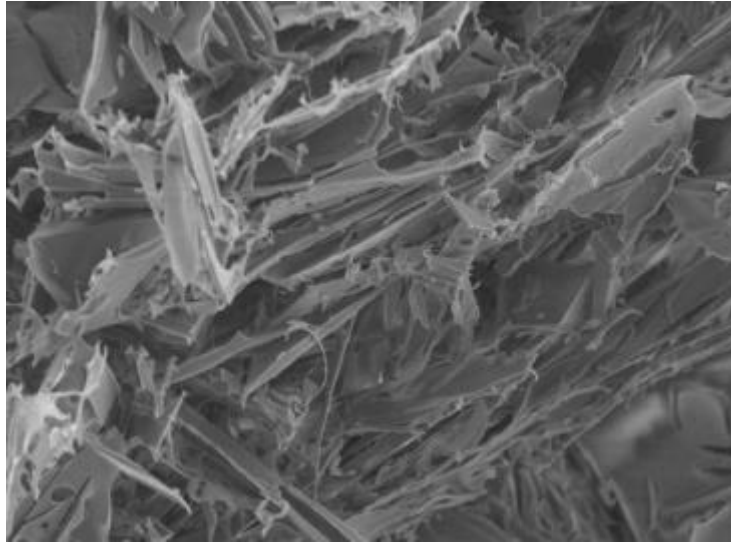


Figura 1.10 - Foto al SEM di una polvere sterile liofilizzata con una soluzione TBA/acqua al 20% v/v, in cui risulta evidente la struttura aghiforme. Foto tratta da (Teagarden and Baker, 2002) con modifiche.

È stata documentata l'esistenza di due eutettici nel sistema TBA-acqua (Figura 1.11), uno nella regione più ricca di acqua, l'altro nella regione più ricca di TBA. È stata inoltre osservata l'esistenza di cinque idrati: diidrato, triidrato, esaidrato, eptaidrato e 7.7-idrato.

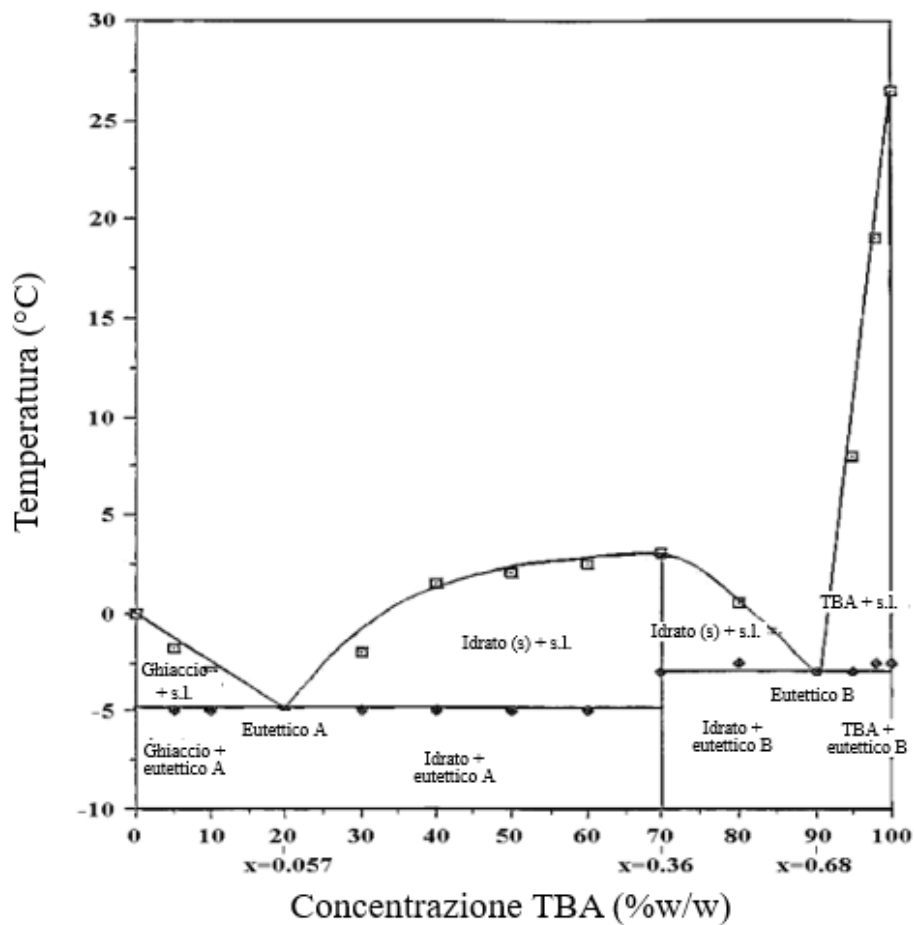


Figura 1.11 - Diagramma di fase del sistema tert-butanolo/acqua. Figura tratta da (Kasraian and DeLuca, 1995) con modifiche.

Studi di calorimetria differenziale a scansione hanno evidenziato, per campioni con concentrazione di TBA compresa tra il 2.5 ed il 15% w/w, la presenza di tre picchi endotermici, due dei quali si sovrappongono tra -10 e -5°C e sono legati alla conversione del diidrato ed eptaidrato nella miscela eutettica. Il picco endotermico finale è localizzato vicino 0°C ed è attribuito alla fusione del ghiaccio.

Quando la concentrazione di TBA è maggiore del 20%, si osserva invece un picco esotermico a -15°C, legato alla cristallizzazione dell'eptaidrato, seguito da uno endotermico localizzato tra -10 e -3°C, dovuto alla fusione dell'eutettico (Figura 1.12).

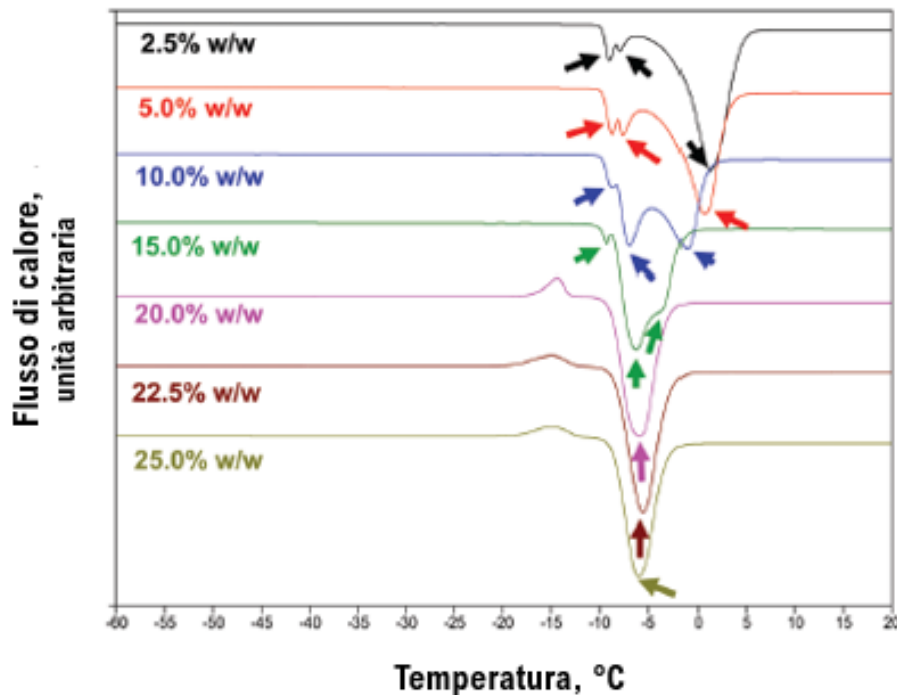


Figura 1.12 - Analisi calorimetrica di sistemi TBA/acqua con diverse composizioni.
Figura tratta da (Bhatnagar *et al.*, 2020) con modifiche.

Attraverso studi basati sulla calorimetria a scansione differenziale e sulla cristallografia a raggi X si è ipotizzato che, durante il congelamento della soluzione TBA-acqua, il TBA cristallizzi come diidrato; nella fase di riscaldamento, nel caso di basso contenuto di TBA (<20% w/w), l'eutettico ghiaccio-TBA diidrato fonde a -10°C, come rivela il picco endotermico della DSC (Figura 1.12). A concentrazioni superiori al 20%, il TBA diidrato si trasforma in eptaidrato a circa -13°C, come evidenzia il picco esotermico del termogramma. L'eutettico ghiaccio-eptaidrato fonde infine tra -6 e -9°C (Bhatnagar *et al.*, 2020).

Ulteriori studi sono stati condotti sugli effetti del TBA in combinazione con il mannitolo. Si è osservato che il TBA, in concentrazioni al di sotto dell'eutettico, inibisce la cristallizzazione del mannitolo durante il congelamento, mentre quest'ultimo cristallizza come δ -mannitolo anidro durante il riscaldamento. Tale inibizione della cristallizzazione consente al mannitolo di fungere da crioprotettore. Inoltre, essendo il mannitolo presente in forma cristallizzata nel prodotto liofilizzato finale, può fungere da *bulking agent*. Il mannitolo, pertanto, esplica una duplice funzione in presenza di TBA, agendo come crioprotettore nello stato congelato e come *bulking agent* nella matrice liofilizzata (Bhatnagar *et al.*, 2020).

1.6 Presentazione del caso di studio ed obiettivi della tesi

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo quello di studiare sperimentalmente l'impatto del congelamento e della liofilizzazione su formulazioni proteiche preparate in miscele acqua/TBA. Il lavoro verterà su analisi di attività biologica e sulla quantificazione del processo di aggregazione, e verrà altresì supportato da esperimenti di calorimetria a scansione differenziale (DSC) e al criomicroscopio (FDM).

In particolare, lo studio sperimentale si concentrerà sull'effetto di differenti eccipienti (mannitolo, saccarosio e idrossipropil- β -ciclodestrina) sul recupero dell'attività biologica di due proteine modello, la mioglobina (Mb), caratterizzata dall'essere estremamente sensibile alla denaturazione a freddo, specialmente a basso pH, e la L-lattato deidrogenasi (LDH), che invece subisce principalmente denaturazione all'interfaccia.

Particolare attenzione è stata riservata al tert-butanolo, co-solvente organico, il cui effetto sulle differenti formulazioni è stato valutato per concentrazioni che variano dal 5% al 30%.

Si è infine valutato anche l'effetto dell'aggiunta di un tensioattivo, il Tween80.

Capitolo 2 - Metodi e materiali

Nel presente capitolo si procederà alla descrizione dei materiali, dei metodi, degli strumenti e delle formulazioni utilizzati per lo svolgimento delle prove sperimentali, i cui risultati saranno riportati nel capitolo successivo.

L'attività sperimentale relativa al lavoro di tesi è stata svolta presso i laboratori del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT) del Politecnico di Torino. Sono state scelte due proteine modello, la mioglobina e la L-lattato deidrogenasi (LDH), e per ognuna di esse sono state analizzate diciannove differenti formulazioni, alcune delle quali contenenti TBA.

Si è inizialmente proceduto con una caratterizzazione termica delle formulazioni in esame, utilizzando tecniche quali la calorimetria a scansione differenziale e la criomicroscopia.

È stato in seguito valutato il recupero dell'attività proteica a seguito di due diversi metodi di congelamento: i) veloce, in azoto liquido e scongelamento in aria, e ii) lento, in liofilizzatore, applicando una rampa di 0.3 °C/min. È stato infine valutato il recupero a valle di un ciclo di liofilizzazione, dopo aver opportunamente ricostituito il prodotto liofilizzato.

2.1 Materiali - preparazione delle soluzioni

Per l'attività sperimentale sono state utilizzate mioglobina estratta da cuore di cavallo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e L-lattato deidrogenasi estratta da muscolo di coniglio (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La scelta è ricaduta su tali proteine (Figura 2.1) perché caratterizzate da temperature di denaturazione a freddo molto diverse: 283 K per la mioglobina a pH 3.7 e 245 K per la L- lattato deidrogenasi a pH 6.5 (Arsiccio *et al.*, 2019).

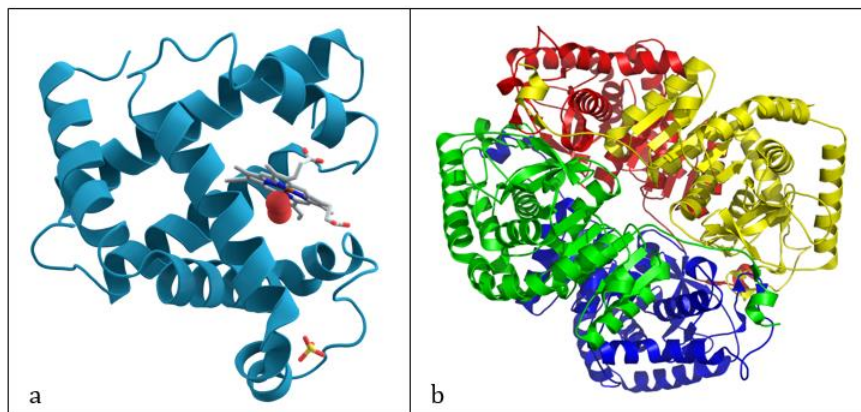


Figura 2.1 - Rappresentazione della struttura proteica di (a) mioglobina, (b) L-lattato deidrogenasi.

La mioglobina, nelle varie formulazioni, è stata dosata a 0.1 mg/ml e disciolta in buffer citrato 10mM a pH 3.7, mentre l'LDH è stata dosata a 5 µg/ml in buffer citrato 10mM a pH 6.5.

È stato scelto di utilizzare il buffer citrato perché esso non precipita in modo selettivo e perciò il pH di tale buffer rimane costante durante gli esperimenti di congelamento e scongelamento.

L'LDH è stato dializzato con buffer citrato 10mM a pH 6.5 ed il processo di dialisi è stato svolto a temperatura di 4°C tramite un bagno termostato. Il buffer è stato cambiato 3 volte, la prima dopo 3 ore, la seconda dopo 6 ore e la terza è stato lasciato per l'intera notte. La concentrazione dell'LDH al termine della dialisi è stata poi determinata tramite spettroscopia UV/VIS (Multiskan Sky, ThermoScientific, Milano, Italia), monitorando il picco a 280 nm ed utilizzando un coefficiente di estinzione molare di 1.44 ml/(mg cm).

Per valutare l'effetto del tensioattivo, sono state previste delle formulazioni in cui è stato inserito Tween80 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) in concentrazione pari allo 0.01% w/v.

Particolare attenzione è stata data alla presenza di tert-butanolo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), che è stato inserito in soluzione in differenti dosaggi, quali 5%, 10%, 20% e 30% w/w. La maggior parte delle formulazioni contenenti TBA, hanno presentato un dosaggio di quest'ultimo pari al 20% w/w, concentrazione cui si è riservata maggiore attenzione in quanto vicina alla concentrazione di eutettico e presentante comportamenti di maggiore interesse ai fini dello studio.

È stata inoltre considerata la presenza, durante i cicli di congelamento e liofilizzazione, di tre diversi eccipienti. Gli esperimenti sono stati effettuati per formulazioni contenenti (a) 5% w/w saccarosio (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), (b) 5% w/w mannitolo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), (c) 5% w/w 2-idrossipropil- β -ciclodestrina (HP β CD, Sigma-Aldrich, Milano, Italia), (d) solo buffer citrato 10mM.

Sono state valutate formulazioni proteiche contenenti varie combinazioni di eccipiente, tensioattivo e co-solvente, come mostrato in Tabella 2.1. Lo scopo è stato quello di valutare gli effetti di co-solvente, tensioattivo, singoli eccipienti e possibili effetti sinergici risultanti dalla loro combinazione.

Tabella 2.1 - Formulazioni sottoposte ad analisi termica tramite DSC

B	-
M	Mannitolo 5% in w/w
S	Saccarosio 5% w/w
H	HP β CD 5% w/w
B*	Tween 80 0.01% w/v
M*	Mannitolo 5% w/w + Tween 80 0.01% w/v
S*	Saccarosio 5% w/w + Tween 80 0.01% w/v
H*	HP β CD 5% w/w + Tween 80 0.01% w/v
Bo	TBA 20% w/w
Mo	Mannitolo 5% w/w + TBA 20% w/w
So	Saccarosio 5% w/w + TBA 20% w/w
Ho	HP β CD 5% w/w + TBA 20% w/w
Bo*	TBA 20% w/w + Tween 80 0.01% w/v
Mo*	Mannitolo 5% w/w + TBA 20% w/w + Tween 80 0.01% w/v
So*	Saccarosio 5% w/w + TBA 20% w/w + Tween 80 0.01% w/v
Ho*	HP β CD 5% w/w + TBA 20% w/w + Tween 80 0.01% w/v
Bo05	TBA 5% w/w
Bo1	TBA 10% w/w
Bo3	TBA 30% w/w

Tutte le formulazioni riportate in tabella sono state preparate in buffer citrato 10 mM.

2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) è la tecnica di analisi termica più utilizzata. La DSC permette di misurare le variazioni di entalpia che si verificano nei campioni analizzati in seguito ad alterazioni delle loro proprietà fisiche e chimiche in funzione della temperatura o del tempo. Il vantaggio è quello di poter misurare variazioni nelle proprietà fisiche di un materiale in modo semplice ma estremamente accurato, permettendo di applicare queste tecniche sia alla ricerca e allo sviluppo che al controllo qualità di numerosi settori industriali (Alfatest).

La DSC misura la differenza di calore assorbita o rilasciata da due campioni, quello da analizzare e uno di riferimento che non subisce alcuna trasformazione, durante un riscaldamento o raffreddamento controllato dei due campioni, al fine di mantenere entrambi alla stessa temperatura. Chiaramente, se il campione subisce trasformazioni quali variazione di stato, cristallizzazione, ecc., il calore necessario per mantenerlo alla temperatura obiettivo subirà delle variazioni che saranno misurate per differenza con il flusso termico del riferimento. Viene tracciato, quindi, un grafico del flusso di calore in funzione della temperatura.

Le transizioni che il campione subisce sono rappresentate dai picchi del termogramma, la cui area rappresenta l'entalpia in gioco nel fenomeno. Dato che il grafico rappresenta una differenza rispetto ad un riferimento, è importante scegliere una tra le due configurazioni 'eso-endo' opposte con cui i picchi possono essere rappresentati. Secondo la convenzione scelta in questo lavoro, picchi verso il basso rappresentano trasformazioni endotermiche, mentre quelli verso l'alto corrispondono a trasformazioni esotermiche, come mostrato in Figura 2.2. Le transizioni dallo stato vetroso a quello gommoso sono dovute invece a variazioni di calore specifico senza contributo entalpico netto e sono rappresentate da flessi del termogramma.

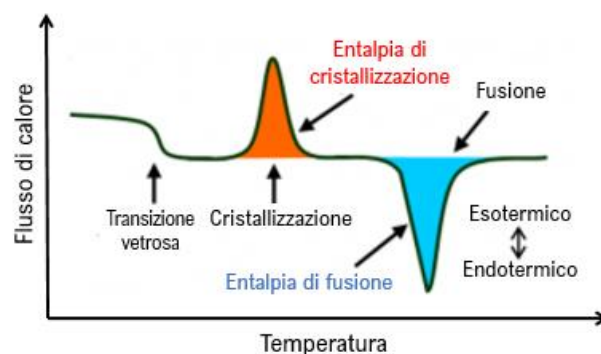


Figura 2.2 - Convenzione 'eso-endo' per cui i picchi esotermici corrispondono a una variazione positiva rispetto alla linea di base e i picchi endotermici a una variazione negativa.

La DSC permette di determinare molte proprietà, tra cui:

- La temperatura di transizione vetrosa T_g ;
- La temperatura di eutettico T_{eu} ;
- La temperatura di cristallizzazione T_{cr} ;
- L'entalpia di fusione e cristallizzazione;
- Il grado di cristallinità;
- Polimorfismo;
- Transizioni solido-solido;
- Comportamenti di fase, nel caso di polimeri liquido-cristallini.

Durante lo svolgimento della tesi sono state effettuate le caratterizzazioni termiche delle formulazioni scelte (Tabella 2.1) con lo scopo di individuare le temperature caratteristiche degli

eccipienti utilizzati, quali cristallizzazione, transizione vetrosa ed eventuale eutettico. Solo le formulazioni B e B* non sono state sottoposte ad analisi, in quanto il loro basso contenuto di solidi non avrebbe consentito l'individuazione di picchi caratteristici.

Le prove sono state eseguite utilizzando una DSC Q200 (TA Instruments, New Castle, DE, USA), con l'utilizzo di un'atmosfera inerte ottenuta introducendo 50 ml/min di azoto all'interno della cella di misura. I campioni sono stati dosati in una quantità compresa tra i 25 e i 35 mg in porta-campioni (crogioli) di alluminio TZERO pan.

Inizialmente sono state effettuate delle prove sulla formulazione H (buffer e ciclodestrina) a pH differenti, sia 3.7 che 6.5, per escludere l'influenza di quest'ultimo sulle transizioni termiche. Non avendo notato alcun effetto del pH, le restanti formulazioni sono state analizzate unicamente a pH 3.7.

Particolare attenzione è stata riservata alla caratterizzazione del comportamento del TBA, alla sua interferenza con gli altri eccipienti, alle sue conversioni nei vari idrati (diidrato, eptaidrato) e agli eutettici che si generano nel sistema acqua-TBA.

Tutte le prove sono state effettuate utilizzando il protocollo riportato nella Tabella 2.2.

Tabella 2.2 - Protocollo utilizzato per le analisi DSC

Fase	Descrizione	Tempi
1	Equilibratura a 25°C	
2	Rampa a -80°C	velocità 1°C/min
3	Holding a -80°C	per 1 min
4	Rampa a +25°C	velocità 1°C/min
5	Equilibratura a 25°C	

In Figura 2.3 è riportata una immagine dell'apparecchiatura utilizzata, presente nei laboratori del DISAT del Politecnico di Torino.

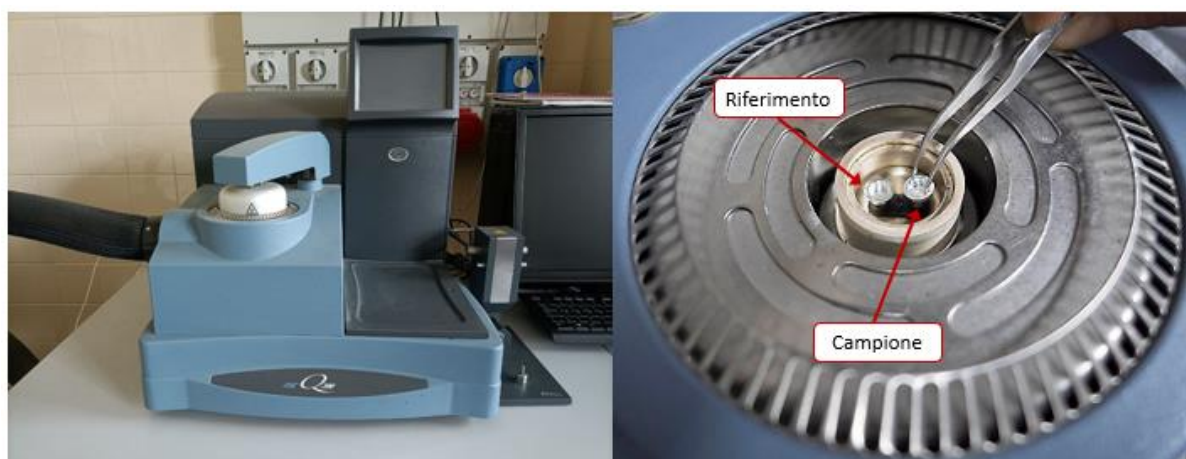


Figura 2.3 - A sinistra: foto della DSC Q200 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) presente nei laboratori del DISAT. A destra: fotografia della cella collocata al di sotto del coperchio dell'apparecchiatura in cui sono inseriti il riferimento e il campione da analizzare. Foto tratta da (Polipro) con modifiche.

2.3 Criomicroscopio (Freeze Drying Microscope, FDM)

Il criomicroscopio è uno strumento ampiamente utilizzato nello sviluppo di processi di liofilizzazione. Il vantaggio è che esso permette di ricavare informazioni sui campioni sottoponendoli a condizioni di temperatura e pressione molto simili a quelle del ciclo di liofilizzazione. Il campione viene, infatti, fatto congelare in una piccola camera del microscopio tramite azoto liquido, seguendo una rampa impostata dall'operatore. In seguito, tramite l'attivazione di una pompa a vuoto, la pressione viene abbassata notevolmente e il campione subisce un graduale aumento di temperatura, secondo una rampa opportunamente impostata, che simula la fase di essiccamento primario.

Il FDM permette di osservare direttamente, fotografare e registrare, tramite il microscopio ottico di cui è composto, il fronte di sublimazione. Cambi nello strato essiccato possono essere usati per comprendere lo stato del sistema (amorfo o cristallino) e soprattutto la temperatura di collasso del sistema.

In particolare, attraverso il FDM si possono determinare varie proprietà del campione tra cui:

- La temperatura di fusione eutettica nel caso di formulazioni cristalline T_{eu} ;
- La temperatura di collasso nel caso di formulazioni amorfe T_{coll} ;
- La velocità di avanzamento e l'aspetto del fronte di sublimazione;
- La nucleazione del campione;
- La potenziale formazione di croste superficiali;
- L'effetto dell'*annealing* sulla crescita dei cristalli;
- La struttura del soluto.

Il criomicroscopio è stato utilizzato ai fini di questo lavoro di tesi per determinare le temperature di collasso ed evidenziare eventuali microcollassi all'interno della struttura delle formulazioni che presentano eccipienti (H, Mo, So, Ho, M*, S*, H*, Mo*, So*, Ho*). La conoscenza di tale temperatura è fondamentale per ottimizzare il processo, in particolare la fase di essiccamento. Come si osserva infatti al microscopio ottico, il superamento di tale temperatura è distruttivo per il campione e porta al disfacimento della struttura essiccata. In Figura 2.4 sono riportate alcune immagini di esempio di un campione contenente (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina e TBA (formulazione Ho), sottoposto a FDM.

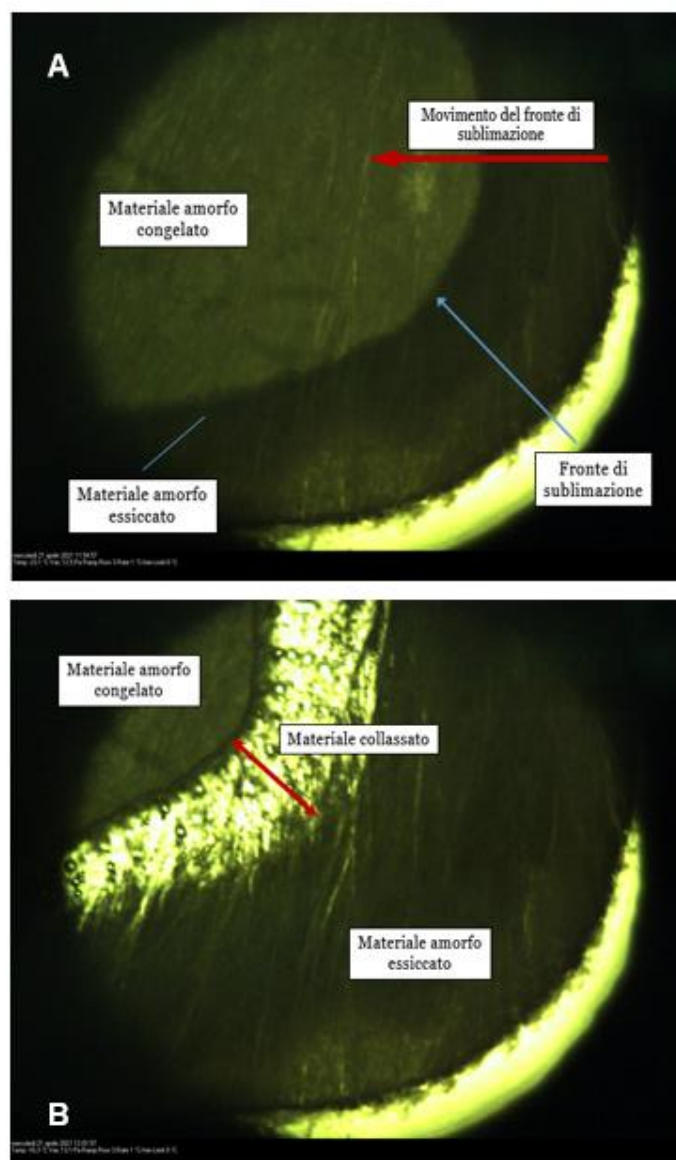


Figura 2.4 - Esempi di immagini prodotte da un FDM, relative ad un campione contenente HP β CD e TBA. (A) Campione prima del collasso; il fronte di sublimazione risulta chiaramente visibile. (B) Lo stesso campione pochi minuti dopo, successivamente al collasso.

Il protocollo utilizzato per le analisi al FDM è riportato in Tabella 2.3.

Tabella 2.3 - Protocollo utilizzato per le prove al FDM.

Fase	Descrizione	Velocità
1	Fino a -60°C	5°C/min
2	Fino a -30°C	2°C/min
3	Fino a -10°C	1°C/min
4	Fino a +20°C	5°C/min

Le prove al FDM sono state effettuate su un quantitativo di soluzione di circa 3 μ l; tra la fase 1 e 2 in Tabella 2.3, ovvero al termine del congelamento, è stata attivata la pompa a vuoto, portando la pressione del vano porta-campione tra i 10 e i 12 Pa, prima di procedere con il graduale incremento di temperatura.

Durante questo lavoro sperimentale è stato utilizzato un criomicroscopio, presente nei laboratori del DISAT, con le seguenti componenti (Figura 2.5):

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

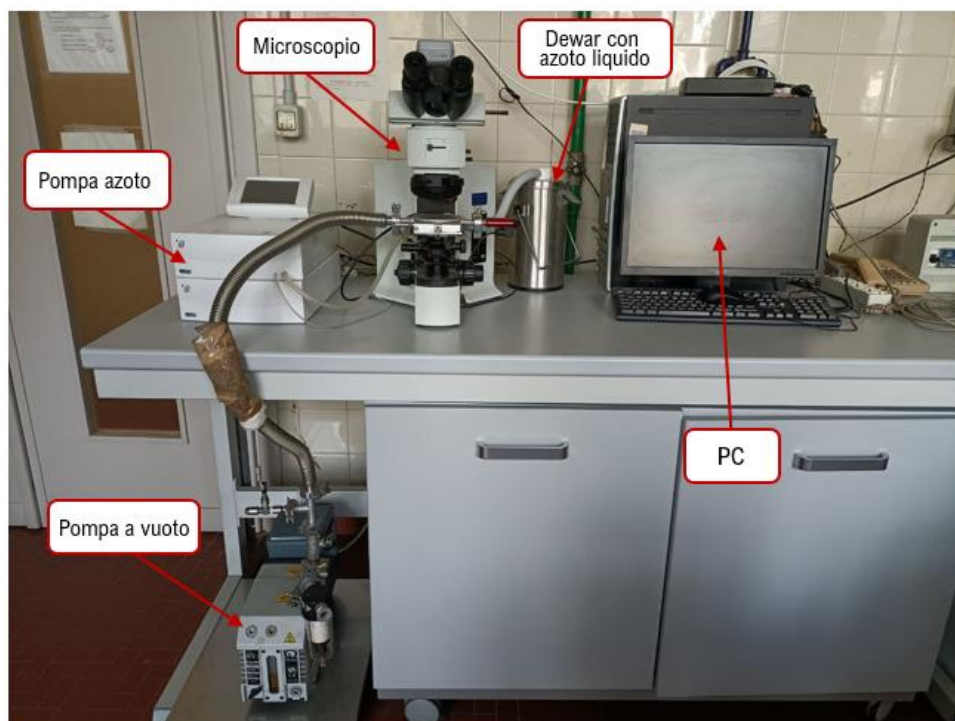


Figura 2.5 - Foto del criomicroscopio, presente nei laboratori del DISAT, utilizzato per le analisi; in figura sono indicati gli elementi che compongono lo strumento.

Anche in questo caso la formulazione H è stata testata sia a pH 3.7 che 6.5, per escludere un'influenza di quest'ultimo sulla temperatura di collasso della matrice essiccata.

2.4 Protocolli di congelamento e liofilizzazione

Il recupero di attività proteica in ciascuna formulazione, per ognuna delle due proteine modello, è stato valutato a valle di congelamento veloce, congelamento lento e liofilizzazione.

Ognuna delle formulazioni è stata suddivisa in 3 aliquote da 1 ml poste all'interno di flaconi 4R (16x45 mm, Nuova Omipi glass division, Stevanato Group, Piombino Dese, Italia) e tappate

con tappi in silicone (West Pharmaceutical Services, Milano, Italia), parzialmente nel caso del ciclo di liofilizzazione, totalmente durante i cicli di congelamento.

Le formulazioni sono state preparate per ognuna delle due proteine modello, le quali sono state dosate nelle seguenti quantità e utilizzando buffer citrato 10mM con il seguente pH:

- Mioglobina 0.1 mg/ml a pH 3.7 (a cui la proteina risulta soggetta a denaturazione a freddo)
- L-lattato deidrogenasi 5 µg/ml a pH 6.5 (a cui la proteina è particolarmente sensibile a denaturazione interfacciale).

2.4.1 Congelamento veloce

Per comprendere l'effetto di diverse aree di superficie ghiaccio-acqua sulla stabilità proteica, si è scelto di analizzare il recupero a valle di due differenti protocolli di congelamento.

È noto, infatti, che un congelamento veloce comporta la formazione di cristalli di dimensioni inferiori e in elevato numero, e che presentano, pertanto, una maggiore superficie di interfaccia tra la fase congelata e la soluzione acquosa. In particolare, un congelamento veloce permette di quantificare l'entità della denaturazione interfacciale subita da una proteina.

Nel caso di congelamento veloce, i campioni da 1ml, posti in fiale 4R, sono stati congelati mediante immersione in azoto liquido per 2 minuti e lasciati scongelare in aria a temperatura ambiente.

In particolare, per la mioglobina, l'operazione è stata ripetuta tre volte, ovvero sono stati effettuati tre congelamenti in azoto liquido, ognuno dei quali della durata di 2 minuti, seguiti da uno scongelamento in aria. Tale scelta è stata determinata dal fatto che la mioglobina è più sensibile a stress a freddo che a stress legati alla formazione di interfacce, e un singolo ciclo di congelamento veloce non avrebbe quindi dato adito a variazioni misurabili nella sua attività.

Per quanto concerne l'LDH, l'operazione di congelamento in azoto liquido e successivo scongelamento in aria è stata effettuata una sola volta, in quanto già sufficientemente deleteria per la proteina, molto sensibile a stress interfacciali.

2.4.2 Congelamento lento

Per quanto riguarda le prove sperimentali con un congelamento lento, esse sono state condotte all'interno di un liofilizzatore, tramite il quale è stato possibile imporre una velocità di congelamento controllata. È stato utilizzato il liofilizzatore LyoBeta 25TM della Telstar (Terrassa, Spagna), presente nei laboratori del DISAT del Politecnico di Torino (Figura 2.6).

Il liofilizzatore LyoBeta è composto da:

- Camera da 0.2 m³ equipaggiata con 4 scaffali di area 0.16 m²;
- Pompa a vuoto (Agilent Variant DS402; Agilent Technologies, Santa Clara, California, Stati Uniti);
- Condensatore esterno e pompa a vuoto;
- Misuratore di pressione capacitivo (Baratron type 626A, MKS Instruments, Andover, MA, USA, fondo scala 10 mbar);
- Misuratore di pressione a conducibilità termica (Pirani type PSG-101-S, Inficon, Bad Ragaz, Switerland);
- Termocoppie di tipo T, per la misura della temperatura dei prodotti;
- Sistema di refrigerazione.



Figura 2.6 - Liofilizzatore Telstar Lyobeta 25 utilizzato per le prove sperimentali e presente nei laboratori del DISAT.

Per ogni formulazione contenente la proteina in analisi sono state realizzate 3 aliquote, contenute all'interno di flaconi 4R, per un totale di 57 flaconi. Sono stati inoltre aggiunti 6 flaconi contenenti le soluzioni M, S, H, Mo, So e Ho, all'interno dei quali sono state inserite delle termocoppie di tipo T, con lo scopo di monitorare la temperatura durante il processo.

Il protocollo utilizzato per le prove con congelamento lento ha previsto 3 (per la mioglobina) o 1 (per LDH) cicli di congelamento- scongelamento, ciascuno dei quali condotto come mostrato in Tabella 2.4.

Tabella 2.4 - Protocollo di un singolo ciclo di congelamento lento - scongelamento. Tale processo è stato ripetuto una (per LDH) o tre (per la mioglobina) volte prima dell'analisi di attività proteica.

Fase	Descrizione	Tempi
1	Rampa a -45°C	a 0.3°C/min
2	Holding a -45°C	per 30 min
3	Rampa a +20°C	a 0.3°C/min
4	Holding a +20°C	per 30 min

2.4.3 Cicli di liofilizzazione

Oltre alla valutazione dell'effetto di un congelamento lento e rapido, si è valutata l'attività residua delle due proteine modello anche al termine di un ciclo di liofilizzazione completo.

Le prove di liofilizzazione sono state effettuate utilizzando il liofilizzatore LyoBeta 25TM Telstar (Terrassa, Spagna). Per ognuna delle 19 formulazioni sono stati realizzati 3 campioni da 1 ml posti all'interno di flaconi 4R (16x45 mm, Nuova Ompi glass division, Stevanato Group, Piombino Dese, Italia), parzialmente tappati con tappi in silicone (West Pharmaceutical Services, Milan, Italia). Sono stati inoltre inseriti nel liofilizzatore altri 6 flaconcini, contenenti le soluzioni M, S, H, Mo, So ed Ho, che sono stati collegati alle termocoppie del liofilizzatore.

Il protocollo (Tabella 2.5) ha previsto il congelamento dei campioni da 20°C a -45°C con velocità pari a 0.3°C/min. La temperatura è stata mantenuta per due ore a -45°C, per poi procedere con l'essiccamento primario, condotto a -25°C e 10 Pa. È stata impostata una rampa di 4 ore per il passaggio al secondario, che ha portato la temperatura da -25°C a 20°C, e infine la temperatura di 20°C è stata mantenuta per 5 ore.

Il termine dell'essiccamento primario è stato monitorato tramite il rapporto delle misure di pressione fornite dalla sonda termoconduttiva Pirani e del sensore capacitivo Baratron, che durante lo svolgimento di tale fase del processo non coincidono. La sonda Pirani, infatti, è composta da un filamento metallico ad alta temperatura e sospeso in un gas; le molecole di gas urtano la superficie del filamento e asportano calore per conduzione con una velocità che dipende dalla conducibilità termica del gas, a sua volta funzione della pressione. Esso è un sensore calibrato per un'atmosfera composta al 100% di azoto e durante l'essiccamento primario fornisce un valore errato di pressione (essendo in camera presente vapore acqueo).

Il sensore Baratron, invece, è costituito da una membrana e da un elettrodo metallico depositato su un supporto di materiale ceramico; la membrana separa due ambienti, quello di misura e un riferimento in condizioni di altissimo vuoto e pressione nota. Il Baratron, quindi, è in grado di fornire una misura assoluta di pressione, indipendente dalla composizione dei gas in camera. Da ciò si deduce che fino a quando l'essiccamento primario è in svolgimento, i due elementi misureranno valori diversi di pressione, mentre quando indicheranno lo stesso valore, il primario si potrà considerare terminato. Il metodo usato è definito *comparative pressure measurement* (Doen *et al.*, 2010)

Tabella 2.5 - Protocollo seguito per i cicli di liofilizzazione dei campioni

	Fase	Descrizione	Tempi	Pressione
1	Congelamento	Fino a -45°C	a 0.3°C/min	
2	Congelamento - mantenimento	-45°C	per 2h	
3	Essiccamento Primario - rampa	-25°C	massima velocità	10 Pa
4	Essiccamento primario	-25°C	termine indicato dal rapporto Pirani/Baratron	10 Pa
5	Essiccamento secondario rampa	A 20 °C	rampa di 4h	10 Pa
6	Essiccamento secondario	20°C	per 5h	10 Pa

2.5 Analisi dell'attività residua

I metodi utilizzati per determinare l'attività residua delle proteine in analisi si sono basati sull'utilizzo dello spettrofotometro UV/VIS, le cui misure di assorbanza sono correlabili alla concentrazione della specie analizzata tramite la legge di Lambert Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad (3.1)$$

dove ε è il coefficiente di estinzione molare, b è lo spessore della soluzione attraversato dalla radiazione e C è la concentrazione della sostanza assorbente nella soluzione.

Nota questa correlazione di proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione, è possibile operare direttamente sul valore di assorbanza per determinare il recupero della proteina all'interno della soluzione in analisi.

Mioglobina

Per valutare l'attività residua delle formulazioni contenenti la mioglobina, si è misurata l'assorbanza a determinate lunghezze d'onda caratteristiche della proteina attraverso l'uso di uno spettrofotometro UV/VIS (Multiskan Sky, ThermoScientific, Milano, Italia). Il tipo di analisi scelto non permette di ottenere informazioni dettagliate circa la struttura secondaria e terziaria o l'attività biologica della mioglobina in soluzione, ma permette di misurare in modo indiretto la denaturazione e la presenza di grandi aggregati (Arsiccio *et al.*, 2020).

I campioni sottoposti a liofilizzazione sono stati opportunamente ricostituiti tramite l'aggiunta di 1 ml di acqua per iniezione (Figura 2.7) prima di essere analizzati.

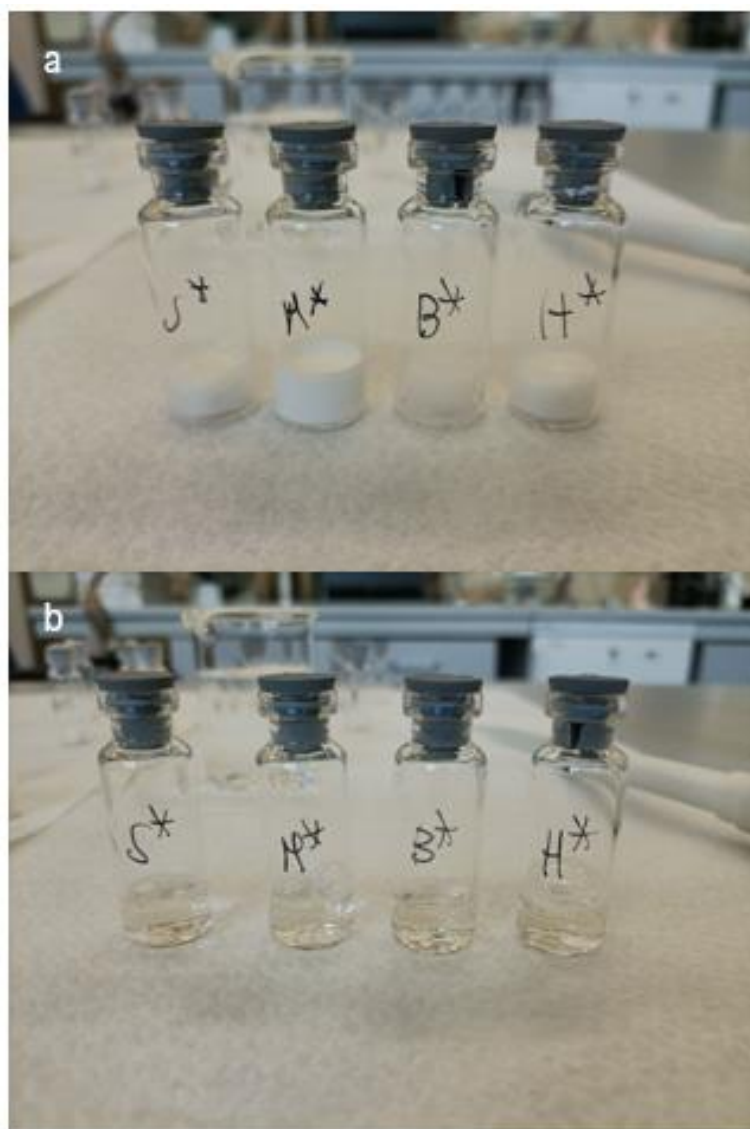


Figura 2.7 - Esempio di campioni contenenti mioglobina ed eccipienti dopo il ciclo di liofilizzazione (a) Campioni prima della ricostituzione, è possibile vedere chiaramente la 'torta' liofilizzata. (b) I medesimi campioni dopo essere stati ricostituiti con 1ml di acqua per preparati iniettabili. La completa dissoluzione della matrice porosa ha richiesto pochi secondi.

I campioni sottoposti a congelamento sono stati invece analizzati appena terminato lo scongelamento.

Il contenuto dei flaconi 4R è stato trasferito in fiale eppendorf da 1.5 ml (AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Germania) e centrifugato a 13000 rpm per 5 minuti con una centrifuga da banco (Heraeus Megafuge 8 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia).

L'assorbanza dei campioni a 280 nm e 410 nm è stata misurata tramite uno spettrofotometro UV/VIS (Multiskan Sky, ThermoScientific, Milano, Italia).

La lettura è stata effettuata in piastre a 96 pozzetti (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania), leggendo ogni campione in duplicato (per un totale di 6 misure/formulazione), e con un volume di riempimento pari a 100 μ l per ciascun pozzetto.

La scelta di misurare l'assorbanza a queste due lunghezze d'onda è legata alle caratteristiche della mioglobina: lo spettro di assorbimento della Mb, come quello di altre proteine, presenta un

picco centrato a 280 nm legato agli amminoacidi aromatici, principalmente triptofano e tirosina, presenti nella catena polipeptidica e, quindi, è direttamente correlato alla concentrazione della proteina. Una riduzione di tale valore di assorbanza è indicativa di aggregazione e precipitazione.

Un secondo picco è presente a 410 nm ed è legato al gruppo eme (Figura 2.8), presente all'interno della mioglobina e quindi caratteristico di quest'ultima. Il valore di assorbanza a 410 nm è correlato sia alla concentrazione della proteina che alla sua conformazione, e pertanto sarà sempre più basso del valore di assorbanza misurato a 280 nm. Un suo abbassamento è indicativo di perdita della struttura nativa della proteina, oltre che di aggregazione (Arsiccio *et al.*, 2020).

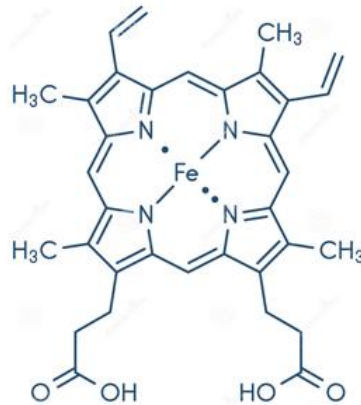


Figura 2.8 - Il gruppo eme è un complesso chimico appartenente alla famiglia delle porfirine e contenente un atomo di ferro. L'eme costituisce il gruppo prostetico, cioè la parte non proteica, di una serie di proteine tra cui l'emoglobina, la mioglobina e i citocromi.

L'estrapolazione di un valore rappresentante il recupero dell'attività proteica è stato ottenuto rapportando la media aritmetica dei valori di assorbanza, calcolati per ogni formulazione (n = 6) al termine del processo, con il corrispondente valore di assorbanza di riferimento, ottenuto a monte dei cicli di congelamento/scongelo e liofilizzazione.

Lattato deidrogenasi

Per l'analisi dell'attività residua di LDH è stato utilizzato un apposito kit (Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich, Milano, Italia)

L'LDH è un'ossidoreduttasi che catalizza l'interconversione del piruvato e del lattato. Con il kit utilizzato, l'LDH riduce il NAD⁺ in NADH; la misura dell'assorbanza a 450 nm sarà indice della concentrazione di NADH generato e, quindi, riconducibile all'attività della proteina.

I campioni liofilizzati contenenti LDH sono stati adeguatamente ricostituiti con l'aggiunta di 1 ml di acqua per preparati iniettabili, mentre quelli congelati sono stati analizzati tal quali a valle dello scongelamento. In ambo i casi, i campioni sono stati diluiti con buffer citrato 10 mM prima dell'analisi, utilizzando un fattore di diluizione pari a 125.

La misura dell'assorbanza è stata effettuata attivando l'incubatore dello spettrofotometro a 37°C, tenendo la piastra al buio ed effettuando una misura di assorbanza a 450 nm ogni 5 minuti per 6 volte.

Analogamente a quanto fatto per la mioglobina, le piastre da 96 pozzetti (Corning, Kennebunk, USA) sono state riempite assegnando due pozzetti per ciascun campione (per un

totale di 6 letture/formulazione).

In Figura 2.8. è riportato un esempio di piastra al termine della misura spettrofotometrica.

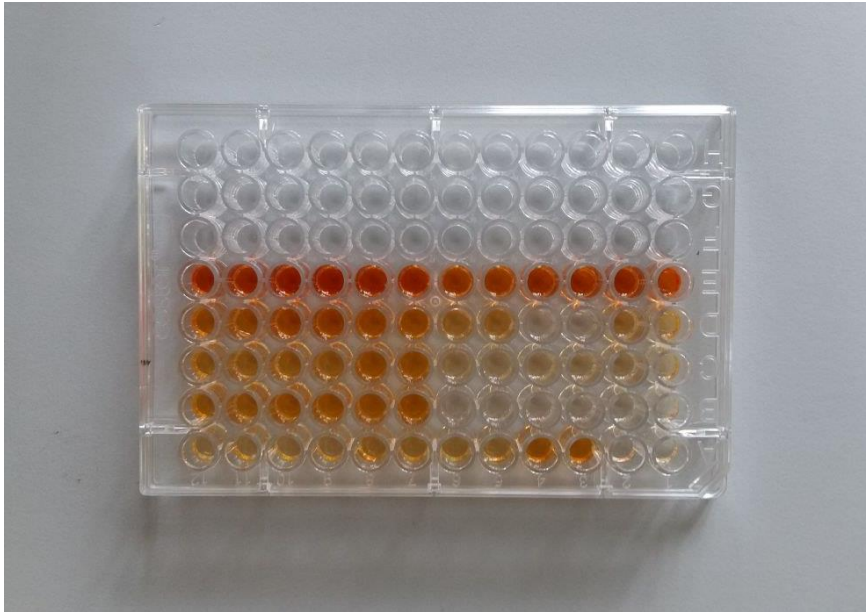


Figura 2.9 - Piastra da 96 pozzetti utilizzata per l'analisi dell'attività dell'LDH, fotografata al termine della misurazione allo spettrofotometro. Il mix di reazione del kit utilizzato conferisce alle soluzioni analizzate un caratteristico colore arancione, che ha intensità tanto maggiore quanto più elevato è il contenuto di NADH convertito.

Il calcolo effettuato per l'estrapolazione del valore di attività dell'LDH, come indicato dal kit apposito, è il seguente:

$$\text{Attività LDH} = \frac{B}{(\text{Tempo di reazione}) \cdot V} \cdot \text{Fattore di diluizione} \quad (3.2)$$

Dove B è il quantitativo di NADH (nmol) generato nell'intervallo di tempo, V è il volume di campione con cui sono stati riempiti i pozzetti. Il tempo di reazione è stato espresso in minuti.

Per calcolare il quantitativo di NADH generato in ogni pozzetto è stata costruita una retta di calibrazione con una soluzione 1.25 mM di NADH.

Per ogni campione è stata effettuata una misura temporale nell'arco di 30 minuti; della misura di assorbanza realizzata si è ricavata una media temporale delle 6 misurazioni di assorbanza per ciascuna formulazione. Il valore ottenuto è stato infine rapportato al valore di attività ottenuto dal riferimento, ovvero dalla soluzione di LDH a valle dei cicli di congelamento/scongelo e liofilizzazione.

2.6 Analisi statistica

L'analisi della varianza (ANOVA, dall'inglese *Analysis of Variance*) è un insieme di tecniche statistiche che consentono di verificare delle ipotesi relative alle differenze tra medie di due o più popolazioni e di confrontare sia le variabilità interne di gruppi che le variabilità esterne dei gruppi stessi.

Il nome "analisi della varianza" si basa sull'approccio con cui la procedura usa la varianza per

determinare se le medie sono differenti. La procedura confronta la varianza tra medie di gruppi con la varianza all'interno del gruppo, allo scopo di determinare se i gruppi sono parte di una unica popolazione o di popolazioni statisticamente diverse (Minitab).

Affinché il test ANOVA sia consistente, è necessario che le ipotesi richieste dal modello siano verificate. Esse sono: (1) le popolazioni considerate devono avere distribuzione normale o quasi normale (gaussiana); (2) i dati di ogni gruppo devono avere la stessa origine (nonché la stessa distribuzione stocastica) e le differenze osservate tra i gruppi devono essere casuali; (3) le popolazioni confrontate nel test devono avere varianza omogenea.

Relativamente a quest'ultima ipotesi, poiché le varianze delle popolazioni non sono nella gran parte dei casi note a priori, tipicamente si effettuano degli ulteriori test di ipotesi sulle varianze. Per semplicità, molto spesso ci si limita ad utilizzare la seguente regola empirica: se il rapporto tra la deviazioni standard estreme (più alta e più bassa) nel set di dati considerato è minore di 2, allora il test ANOVA può essere utilizzato (GMSL).

L'ANOVA tuttavia funziona bene anche se l'assunzione di normalità (distribuzione gaussiana) viene violata, a meno che una o più distribuzioni siano altamente distorte o le varianze siano molto differenti (Minitab).

Esistono diversi tipi di test ANOVA, classificati in base al numero di variabili indipendenti e dipendenti presenti nel modello oggetto di studio:

- modelli che prevedono una sola variabile indipendente: disegni a una via (*One-Way ANOVA*);
- modelli che prevedono due o più variabili indipendenti: disegni fattoriali;
- modelli che prevedono una sola variabile dipendente: analisi della varianza univariata;
- modelli che prevedono due o più variabili dipendenti: analisi della varianza multivariata (*MANOVA - Multivariate Analysis of Variance*) (GMSL).

Il software utilizzato per condurre l'analisi statistica è stato Minitab 17.

Due set di dati si dicono statisticamente differenti quando il valore p (p -value) calcolato tramite ANOVA risulta minore di un livello di significatività α precedentemente stabilito dall'utente (in genere, 0.05 oppure 0.1). L'ANOVA, quindi, fornisce una valutazione globale della presenza di differenze statisticamente rilevanti all'interno del dataset considerato, ma non indica dove tali differenze siano localizzate. A questo scopo esistono numerosi test *post-hoc* (test a posteriori), che comparano tutte le possibili coppie di medie.

Si è scelto pertanto di procedere, a valle dell'ANOVA, con una tecnica di comparazione frequentemente utilizzata, conosciuta come *honestly significant difference* (HSD) o Tukey test.

Il Tukey test fa uso di una distribuzione nota come *Student distribution* o *q-distribution*,

$$q = \frac{M_i - M_j}{\sqrt{MS_{errore} \left(\frac{1}{S}\right)}} \quad (3.3)$$

dove M_i ed M_j sono le medie dei gruppi comparati, MS_{errore} è lo scarto quadratico medio calcolato precedentemente con l'ANOVA, S è il numero di osservazioni per gruppo, supponendo che i gruppi siano di uguale dimensione.

Un volta calcolata la distribuzione, essa viene comparata con un valore $q_{critico}$, che dipende, nel caso del Tukey test, dal valore di α , generalmente pari a 0.05, dai gradi di libertà $\nu = N - K$ dove N è il numero totale di elementi e K è il numero di gruppi, e dal parametro R , numero totale delle medie, ed è ricavabile da apposite tabelle (Abdi and Williams, 2010).

Il Tukey test procede con una comparazione a coppie di tutte le medie, e la differenza tra due medie risulterà significativa se

$$|M_i - M_j| \geq HSD \quad (3.4)$$

Dove HSD è definito come

$$HSD = q_{critico} \cdot \sqrt{\frac{MS_{errore}}{s}} \quad (3.5)$$

Capitolo 3 - Risultati

Il presente capitolo raccoglie i risultati delle prove sperimentali svolte nei laboratori del gruppo di ricerca Molecular Engineering Laboratory del Politecnico di Torino, con gli strumenti e le modalità riportate nel Capitolo 2.

Nello specifico, si riportano i risultati relativi alle prove di caratterizzazione termica delle formulazioni dove si è valutato l'effetto della presenza di TBA sulle proprietà termiche delle varie formulazioni utilizzate. Seguono, poi, i risultati relativi al recupero dell'attività proteica di mioglobina e L-lattato deidrogenasi in varie formulazioni, come riportato in Tabella 2.1, a valle di cicli di congelamento/scongelo e liofilizzazione.

Si riassume, nel seguito, la nomenclatura utilizzata nel resto del capitolo per identificare le diverse formulazioni considerate: B: buffer citrato, M: mannitolo, S: saccarosio, H: ciclodestrina, -o: con aggiunta di TBA al 5 (Bo05), 10 (Bo1), 20 (Bo) o 30 (Bo3) % w/w, -*: con aggiunta di Tween 80.

3.1 Caratterizzazione termica delle formulazioni

Al fine di comprendere il comportamento termico delle soluzioni durante i cicli di congelamento e liofilizzazione, è stato necessario eseguire una serie di caratterizzazioni sulle formulazioni considerate, avvalendosi dell'uso del criomicroscopio (FDM) e della calorimetria a scansione differenziale (DSC).

In questo paragrafo vengono riportati i risultati ottenuti mediante le prove sopracitate, che in particolare hanno permesso la determinazione delle temperature di transizione vetrosa, eutettico, cristallizzazione e collasso.

3.1.1 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Le analisi alla DSC hanno avuto come scopo l'individuazione di temperature di transizione vetrosa, di cristallizzazione e di fusione di eutettici legate agli eccipienti utilizzati. Si è cercato di discernere l'effetto di pH, tensioattivo e TBA sulle transizioni termiche delle varie formulazioni.

Si ricorda che la DSC permette di misurare le variazioni di entalpia che si verificano nei campioni analizzati in seguito ad alterazioni delle loro proprietà fisiche e chimiche in funzione della temperatura, e che la convenzione utilizzata nelle seguenti analisi prevede che picchi verso il basso rappresentino trasformazioni endotermiche, mentre quelli verso l'alto corrispondano a trasformazioni esotermiche.

Si è scelto di riportare le porzioni più significative dei termogrammi delle formulazioni analizzate; per ogni formulazione è stata contrassegnata con la lettera h, da *heating*, la sezione del termogramma relativa alla fase di riscaldamento, con la lettera c, da *cooling*, la sezione del termogramma relativa alla fase di congelamento.

Un'iniziale analisi termica delle formulazioni H (a pH 3.7) e H' (a pH 6.5) ha avuto come scopo quello di escludere l'influenza del pH sulle transizioni termiche; le prove (Figura 3.1 e 3.2) hanno confermato che la temperatura di transizione vetrosa della ciclodestrina risulta sostanzialmente invariata nelle due soluzioni a pH 3.7 e 6.5, per cui le restanti formulazioni

sono state analizzate unicamente ad un pH di 3.7; la scelta di tale pH è stata dettata unicamente dalla maggiore semplicità di preparazione del buffer citrato a pH acidi (3.7) piuttosto che neutri (6.5). Infatti, la temperatura di transizione vetrosa per la ciclodestrina a pH 3.7 e 6.5 è risultata essere pari, rispettivamente, a -17.33°C e -17.68°C , ovvero non ha mostrato variazioni significative.

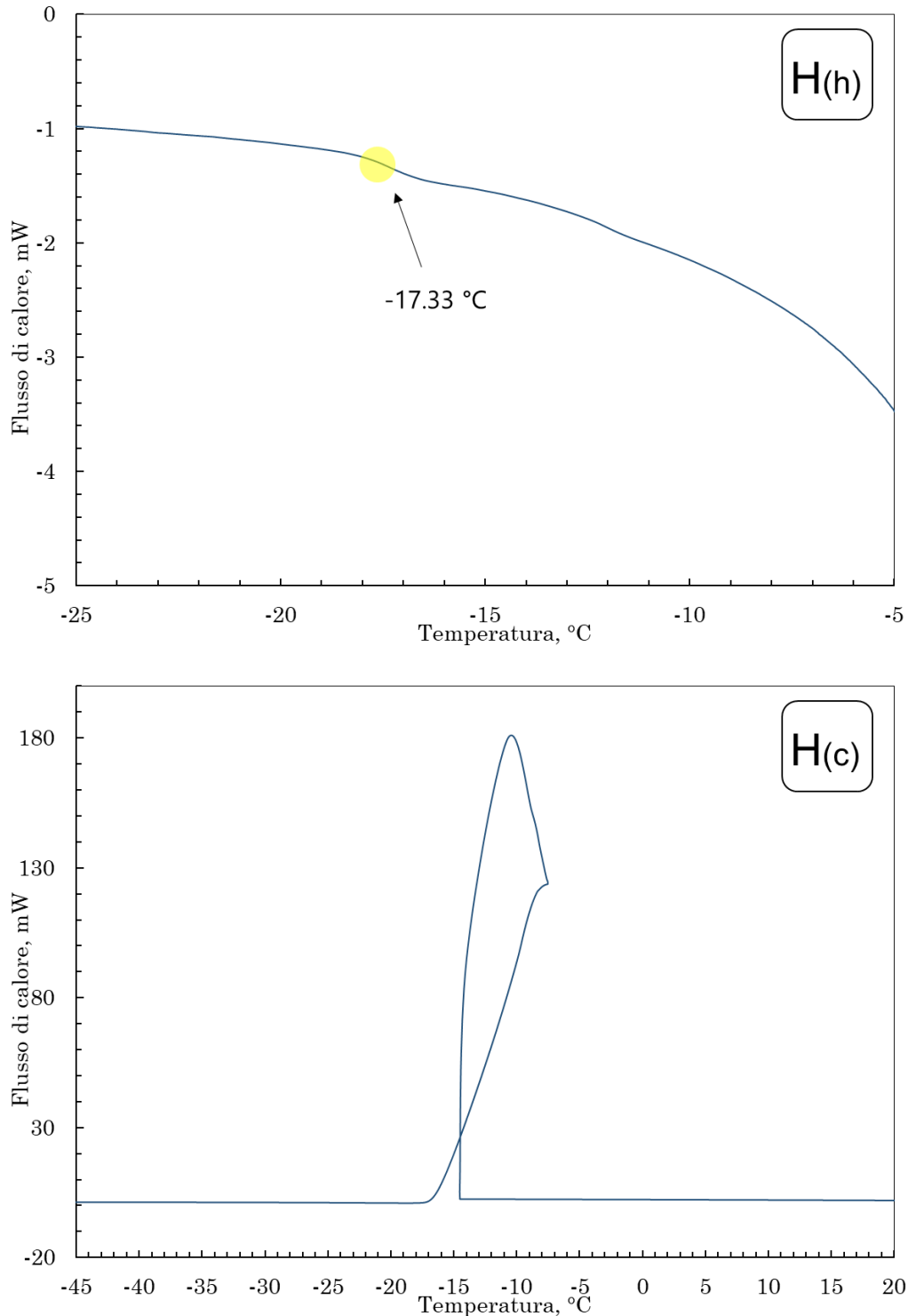


Figura 3.1 - Risultati delle analisi DSC per il campione H (5% w/w HPβCD, a pH 3.7). In alto è riportato il termogramma in fase di riscaldamento, contrassegnato con la lettera h (heating), sotto quello in fase di congelamento, contrassegnato dalla lettera c (cooling). Il cerchio giallo evidenzia la transizione vetrosa sul termogramma.

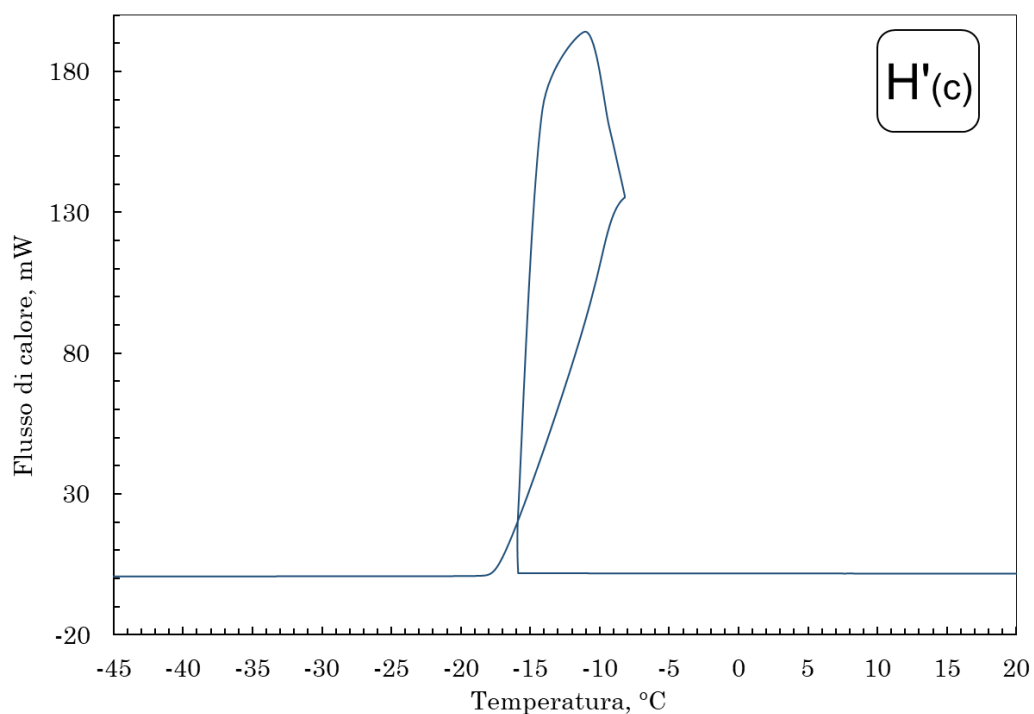
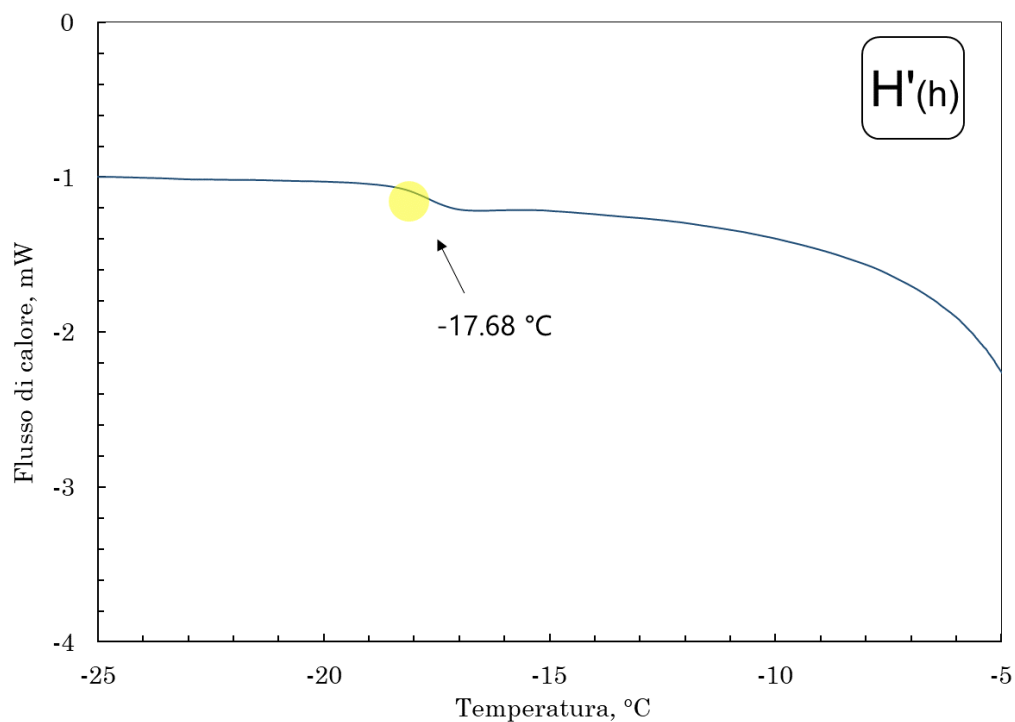


Figura 3.2 - Risultati delle analisi DSC per la formulazione H' (5% w/w HP β CD, a pH 6.5). In alto è riportato il termogramma in fase di riscaldamento, contrassegnato con la lettera h (heating), sotto quello in fase di congelamento, contrassegnato dalla lettera c (cooling). Il cerchio giallo evidenzia la transizione vetrosa sul termogramma.

In Figura 3.3 e 3.4 sono riportate le analisi alla DSC delle soluzioni contenenti saccarosio e mannitolo al 5% in peso (Marenco, 2019). Per la soluzione M, è stato individuato un picco esotermico durante la fase di raffreddamento, a -34.5°C, relativo alla cristallizzazione del mannitolo; il flesso, rinvenuto nella fase di riscaldamento a -31.1°C, è invece riconducibile alla temperatura di transizione vetrosa del mannitolo rimasto amorfo, ed è in linea con quanto già

riportato in letteratura (Meredith *et al.*, 1996). Intorno ai -23.8°C , nella fase di riscaldamento, è presente un picco esotermico pronunciato, legato probabilmente alla cristallizzazione del mannitolo rimasto amorfo durante il congelamento, oppure alla conversione di una forma cristallina metastabile ad una più stabile. Ciò avviene perché, durante lo scongelamento e dopo la transizione vetrosa, la matrice solida acquista mobilità sufficiente a riorganizzarsi secondo la configurazione termodinamicamente favorita, che è quella cristallina nel caso del mannitolo. L'elevata variazione entalpica associata al picco a -23.8°C suggerisce inoltre che la maggior del mannitolo cristallizza durante la fase di riscaldamento (Marenco, 2019).

Per la soluzione S, contenente solo saccarosio, è stato rinvenuto un flesso alla temperatura di -33.5°C , riconducibile alla temperatura di transizione vetrosa T_g' del saccarosio, il cui valore riportato in letteratura è di -32°C (Kasraian *et al.*, 1998).

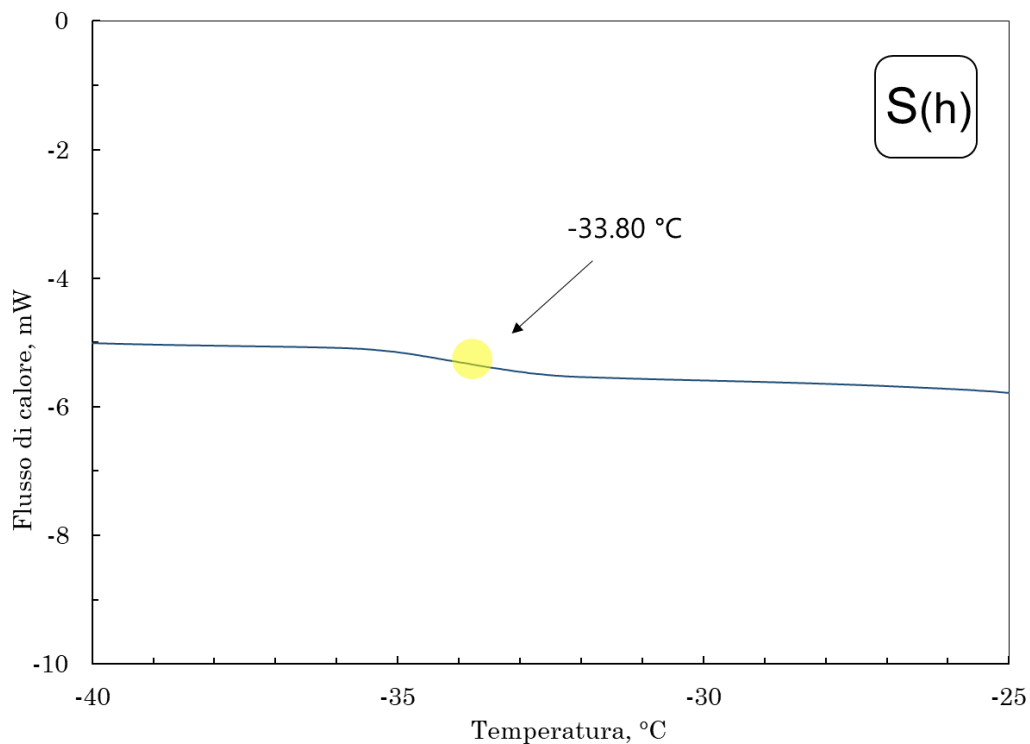


Figura 3.3 - Analisi DSC della soluzione S (saccarosio 5% w/w). Figura realizzata con i dati di (Marenco, 2019).

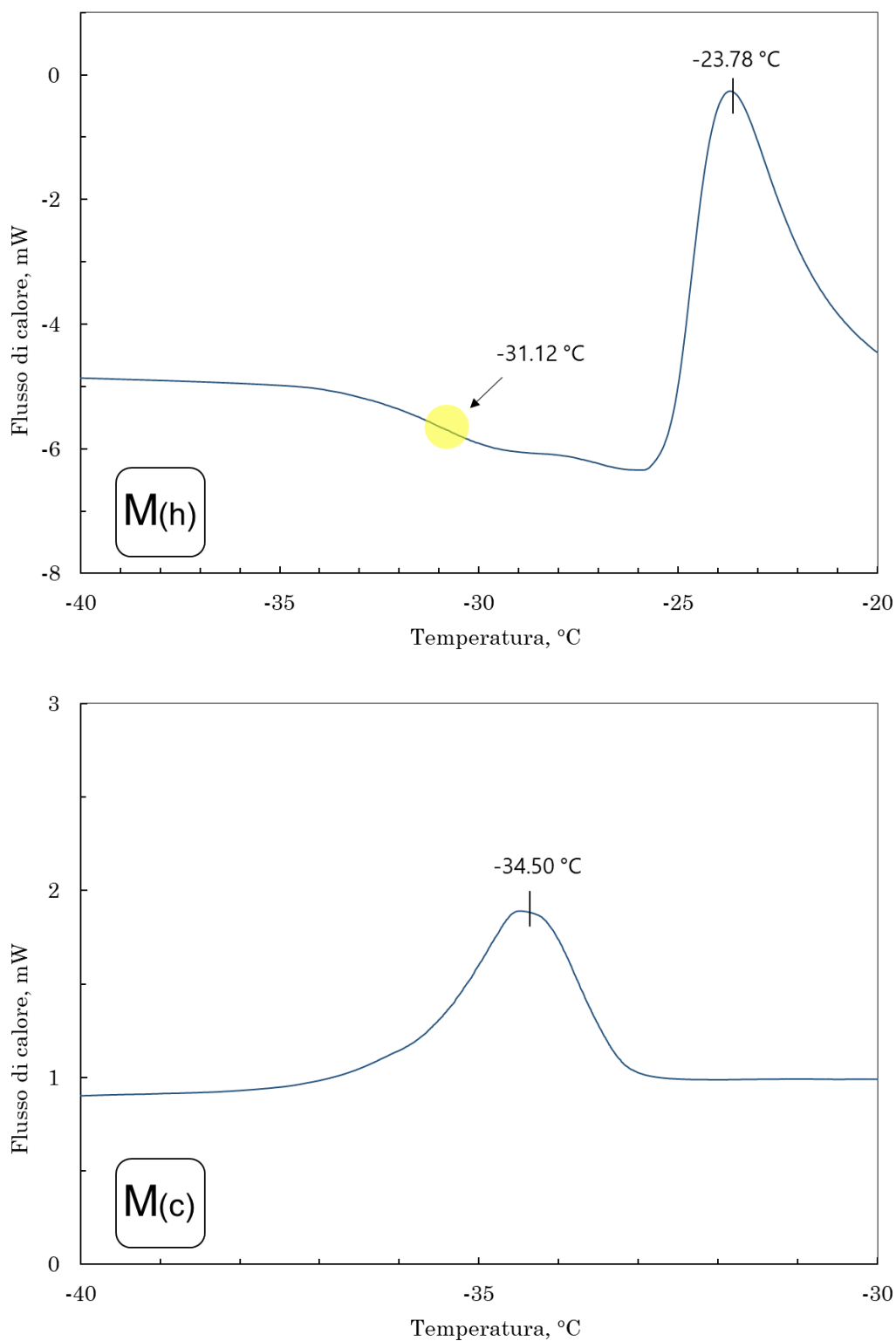


Figura 3.4 - Analisi DSC della soluzione M (mannitolo 5% w/w). In alto, è riportato il termogramma relativo alla fase di riscaldamento, indicato con la lettera h (heating), in basso quello relativo alla fase di congelamento, indicato con la lettera c (cooling).
 Figura realizzata con i dati di (Marenco, 2019)

Successivamente, sono state effettuate delle analisi aventi lo scopo di determinare gli effetti del tensioattivo sulle temperature di transizione vetrosa. Come mostrato dai termogrammi riportati in Figura 3.5, per la formulazione S*, si ripresenta il medesimo flesso riportato per S, attorno ai -33.4°C. In Figura 3.5 è inoltre stata individuata una ulteriore transizione, collocata attorno

a -43°C , riconducibile alla transizione vetrosa del citrato di sodio, che è presente nel buffer utilizzato per le prove, e ha appunto una T'_g di circa -41°C in base a dati di letteratura (Chang and Randall, 1992).

Per formulazione M* (Figura 3.6), contenente sia mannitolo che Tween 80, le temperature di transizione vetrosa e quelle di cristallizzazione del mannitolo non sono influenzate dalla presenza del tensioattivo. La T'_g del mannitolo, infatti, rimane prossima ai -31°C , così come i picchi di cristallizzazione sono a circa -34°C nel raffreddamento e circa -23°C nel riscaldamento.

Infine, nel caso della formulazione H* (Figura 3.7), si è osservato il medesimo flesso della formulazione H, corrispondente ad una temperatura di transizione vetrosa T'_g pari a -17.8°C

Si conclude, quindi, che non vi è alcun effetto rilevante del tensioattivo sulle transizioni termiche delle soluzioni in esame.

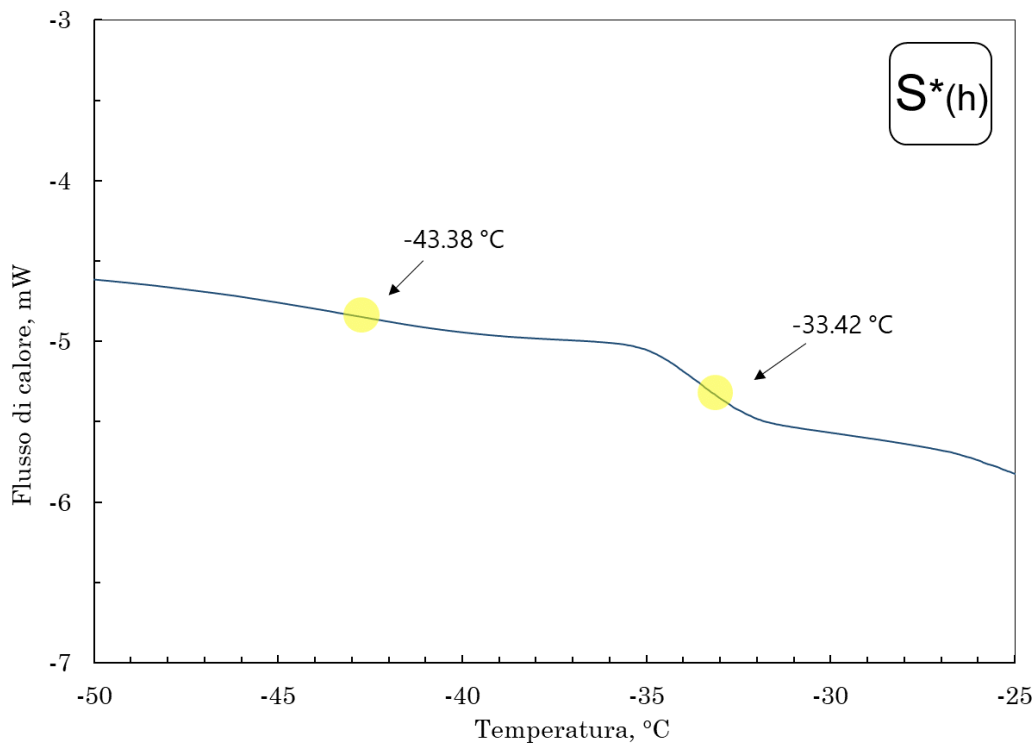


Figura 3.5 - Termogramma della formulazione S* (5% w/w saccarosio, 0.01% w/v Tween 80). Figura ricavata dai dati di (Marenco, 2019).

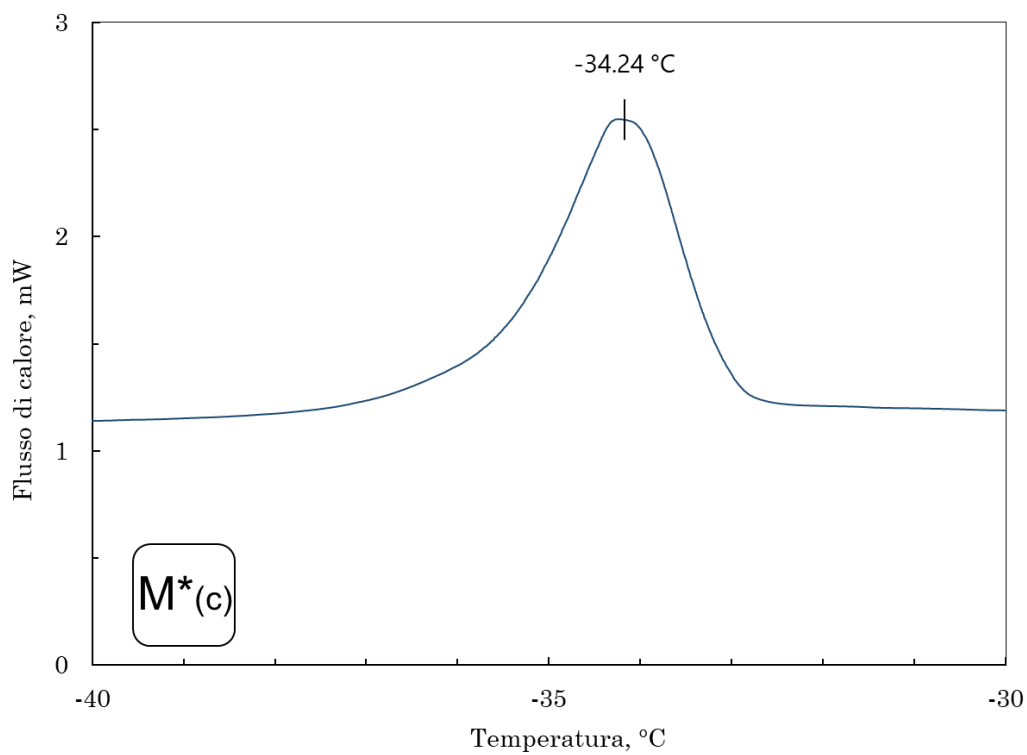
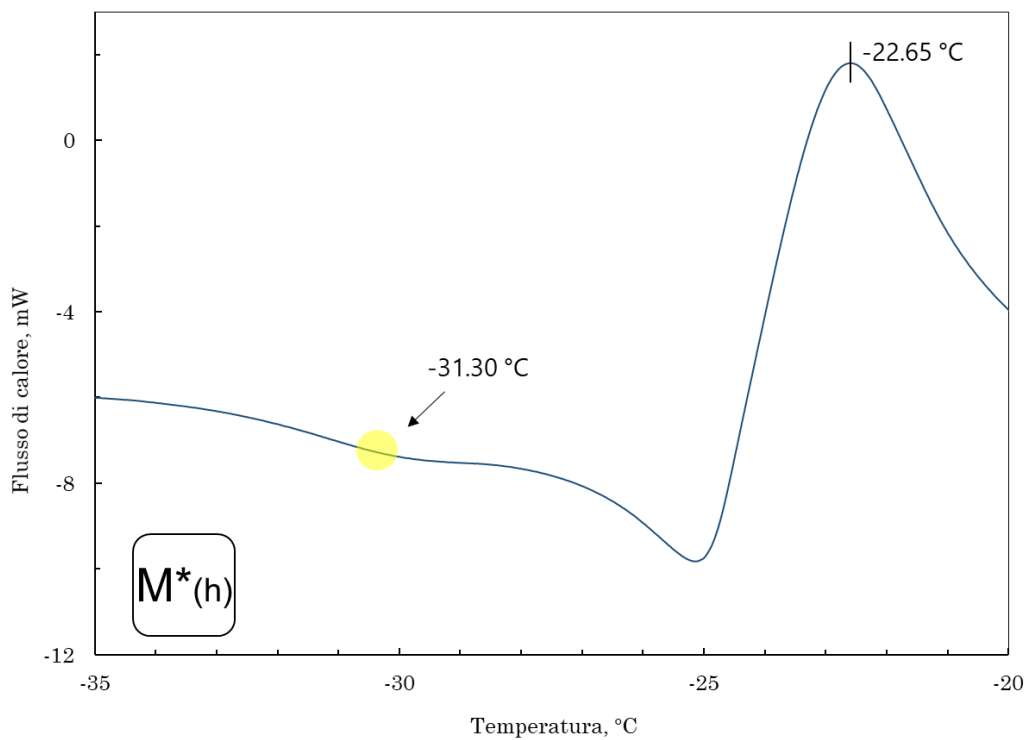


Figura 3.6 - Termogramma della formulazione M* (5% w/w mannitolo, 0.01% w/v Tween 80) per la fase di riscaldamento (in alto) e di congelamento (in basso). Figura realizzata con i dati di (Marenco, 2019).

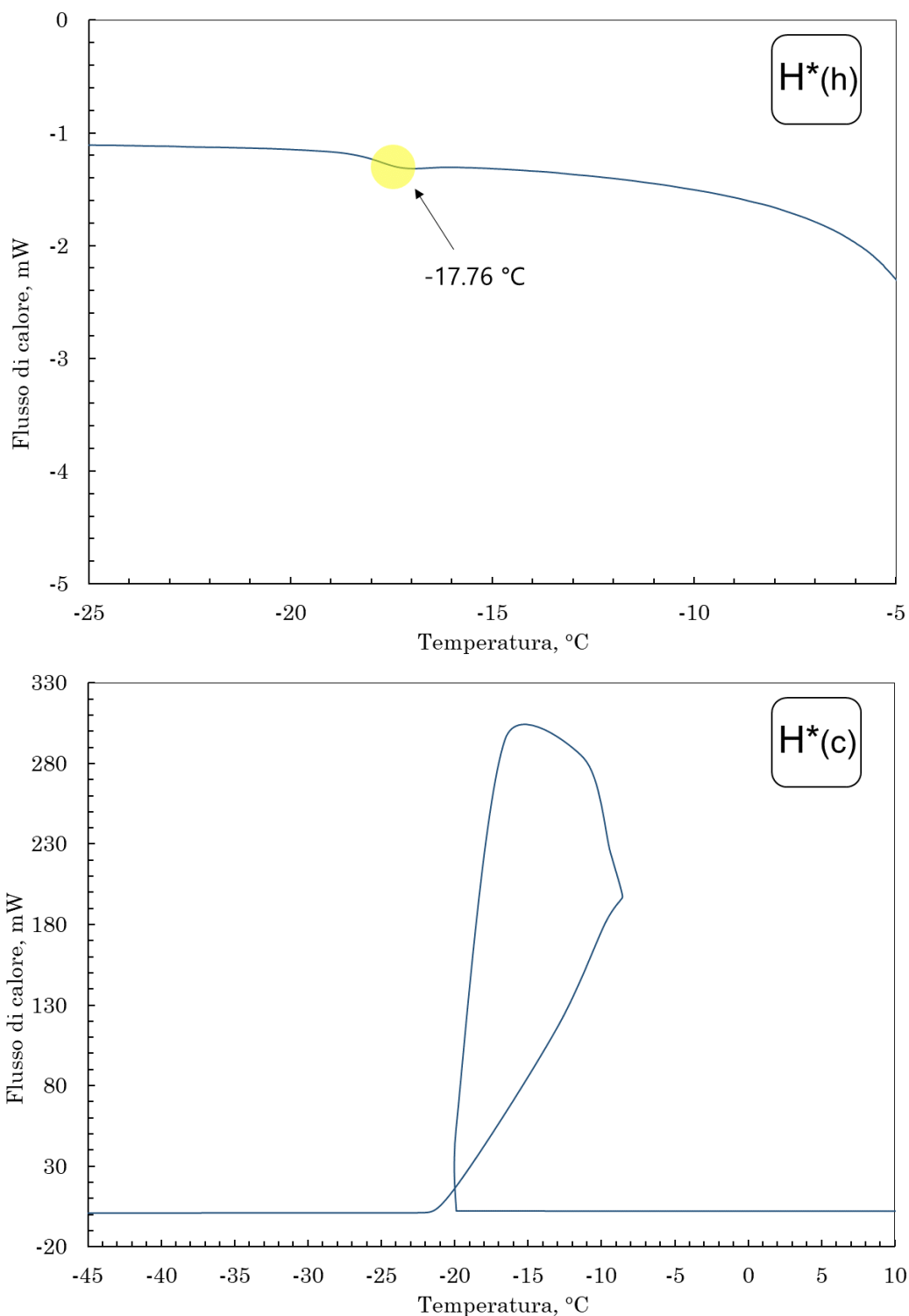


Figura 3.7 - Termogramma della formulazione H* (5% w/w HPβCD, 0.01% w/v Tween 80), nella fase di riscaldamento (in alto) e congelamento (in basso).

In Figura 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 sono riportati i risultati relativi alle analisi alla DSC delle formulazioni contenenti unicamente TBA. Sono state caratterizzate formulazioni composte da buffer e TBA in varie concentrazioni. In particolare, come riportato nella Tabella 2.1, la soluzione Bo05 presenta una concentrazione 5% w/w di TBA, la soluzione Bo1 è al 10% w/w di TBA, Bo presenta il 20% w/w e Bo3 il 30% w/w di TBA. È stato così possibile analizzare il comportamento del co-solvente al variare della sua concentrazione, tenendo conto del fatto che

la concentrazione di eutettico riportata in letteratura è prossima al 22.5% w/w (Teagarden and Baker, 2002).

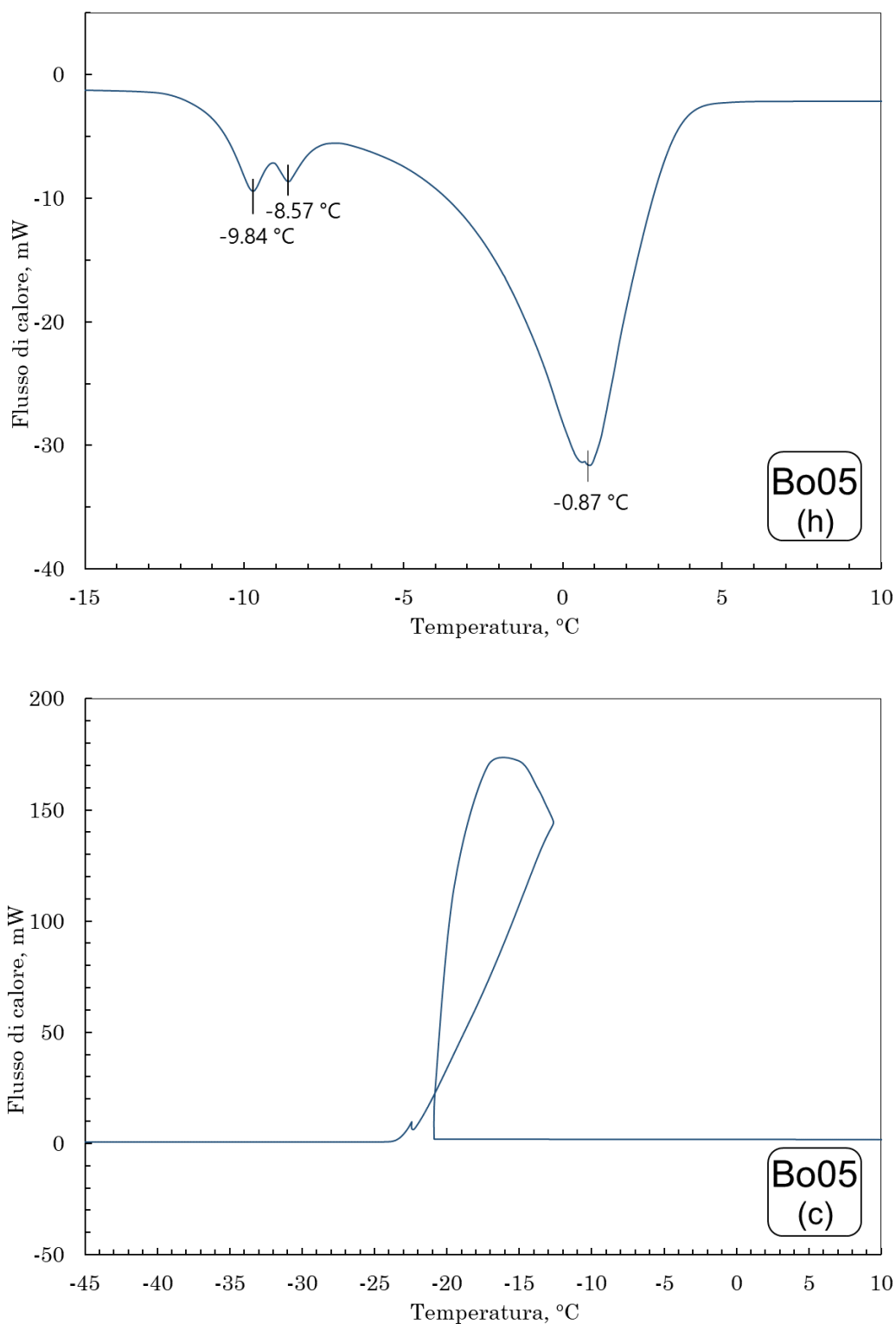


Figura 3.8 - Analisi DSC della formulazione Bo05 (5% w/w di TBA).

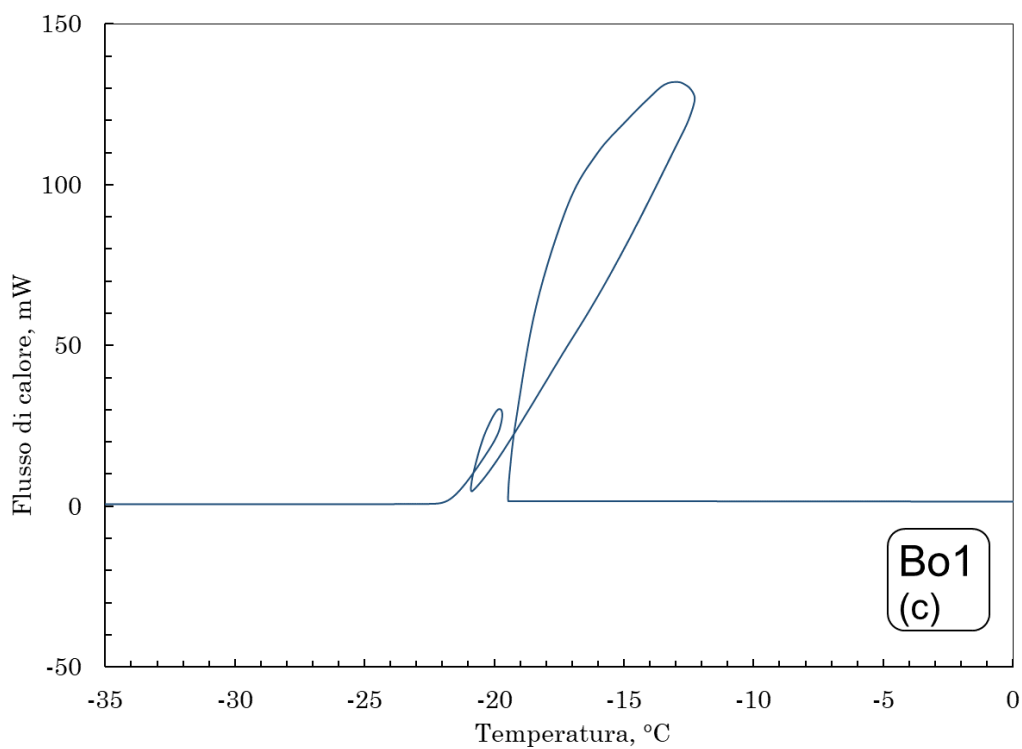
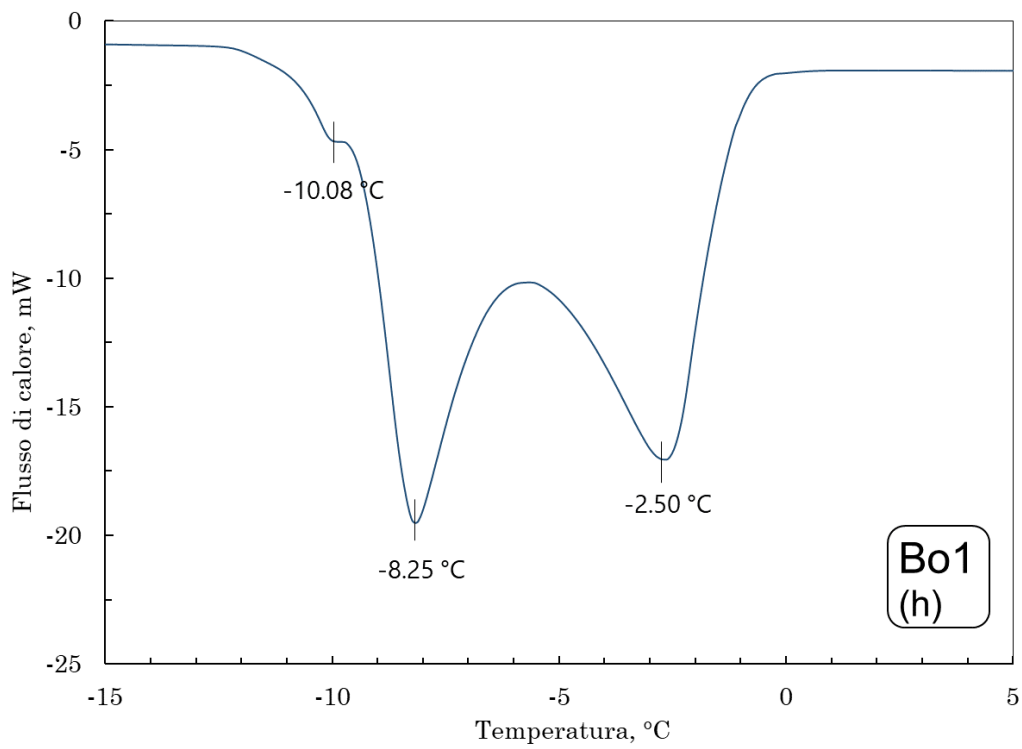


Figura 3.9 - Analisi DSC della formulazione Bo1 (10% w/w di TBA).

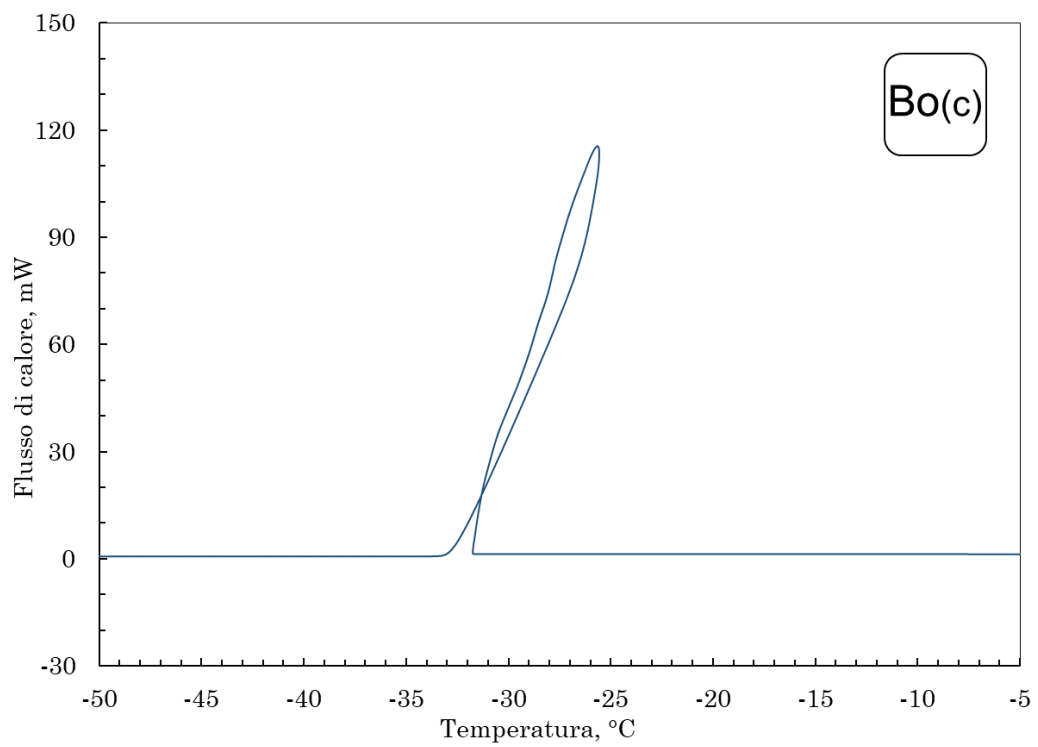
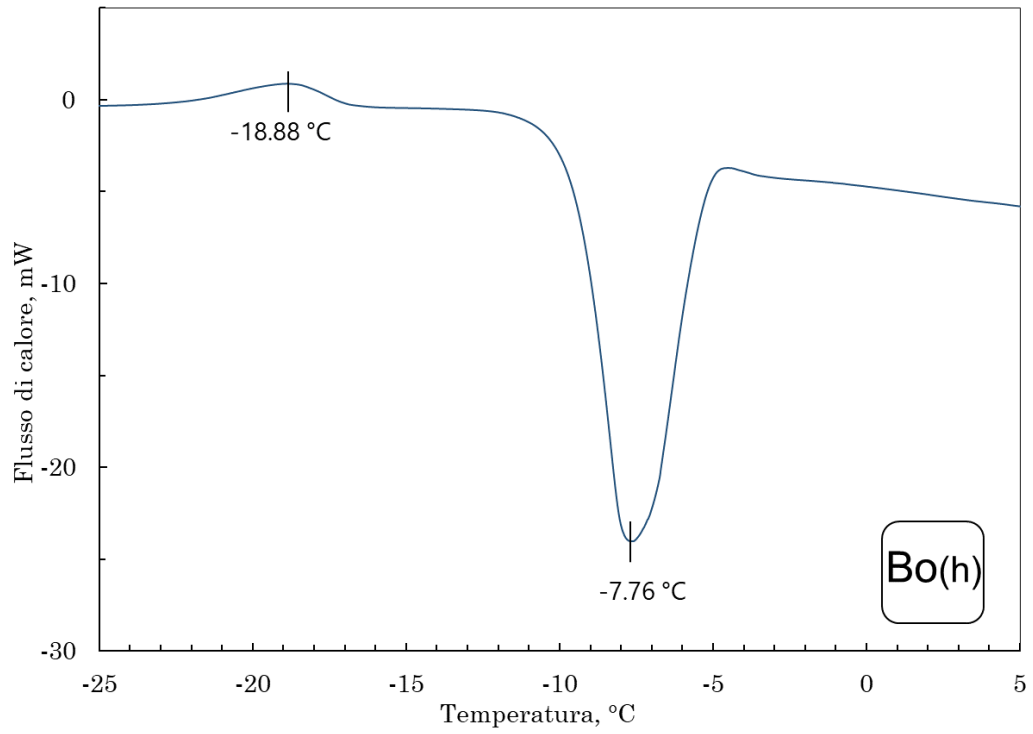


Figura 3.10 - Analisi DSC della formulazione Bo (20% w/w di TBA).

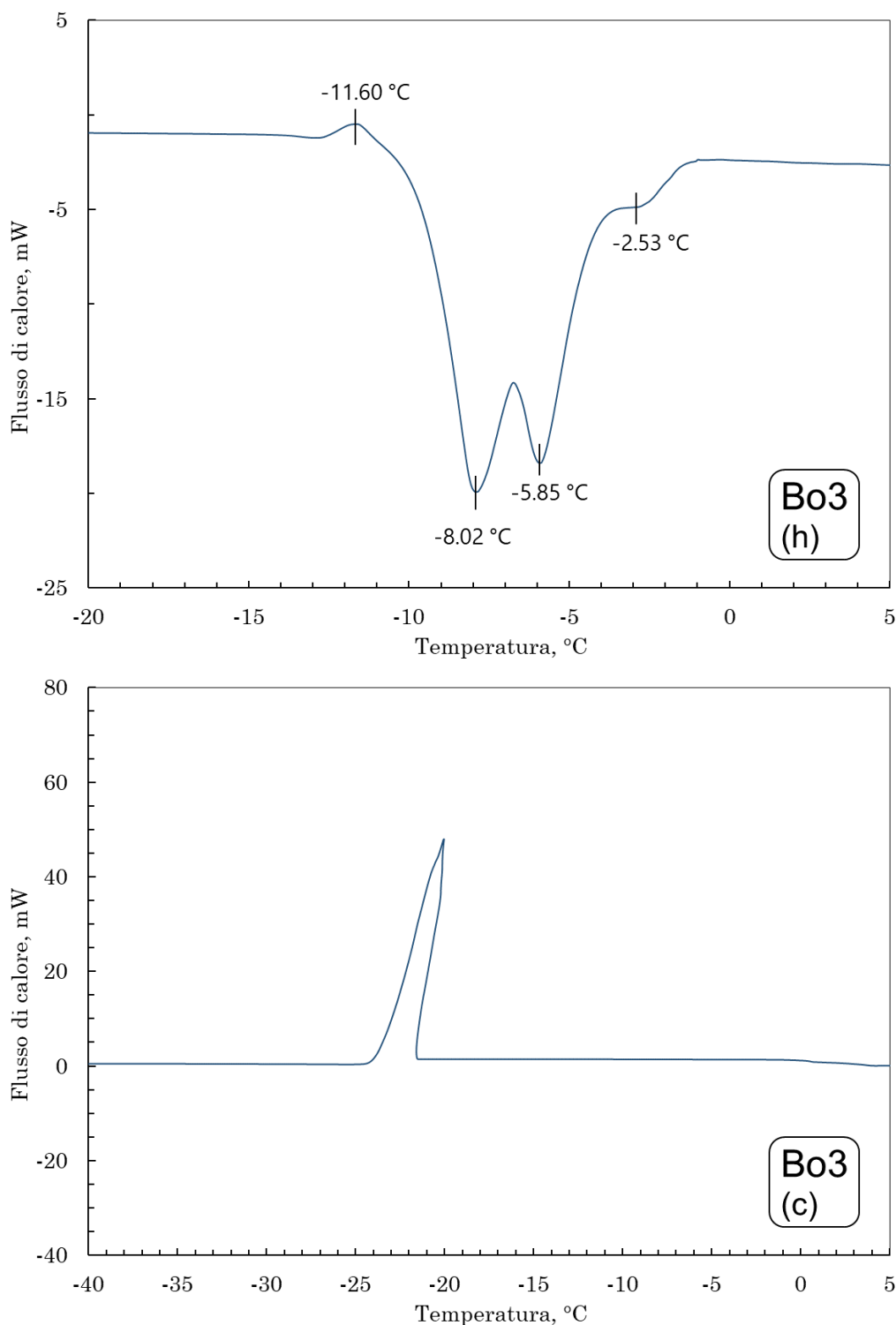


Figura 3.11 - Analisi DSC della formulazione Bo3 (30% w/w di TBA).

Dall'analisi DSC della formulazione Bo05 (Figura 3.8), si discernono tre picchi endotermici, come già riportato in letteratura (Bhatnagar *et al.*, 2020). Per maggiori informazioni in merito al comportamento termico del sistema qui studiato, si rimanda al diagramma di stato TBA-acqua presente nel Capitolo 1, in Figura 1.11. Il primo picco, a -9.84°C , rappresenta probabilmente la fusione dell'eutettico TBA diidrato-ghiaccio ed è stato osservato anche in letteratura (Bhatnagar *et al.*, 2020) a circa -10°C per le formulazioni aventi una concentrazione di TBA inferiore al 15% w/w; tale picco è infatti presente anche per la formulazione Bo1, a

-10.08°C. Il secondo picco endotermico per la formulazione Bo05 è localizzato a -8.57°C, e rappresenta la fusione dell'eutettico TBA eptaidrato-ghiaccio; lo stesso picco è presente anche per la formulazione Bo1, in modo notevolmente più marcato, a -8.25°C. Il terzo ed ultimo picco endotermico, per Bo05 a 0.87°C e per Bo1 a -2.5°C, è relativo alla fusione del ghiaccio.

La formulazione Bo, con una percentuale di TBA pari al 20% w/w, il cui termogramma è mostrato in alto in Figura 3.8, presenta un picco esotermico in prossimità di -18°C, in letteratura osservato intorno a -15°C (Bhatnagar *et al.*, 2020), probabilmente legato alla transizione da fase metastabile a stabile, ovvero alla cristallizzazione dell'eptaidrato; è inoltre presente un picco endotermico a -7.7°C, relativo alla fusione dell'eutettico TBA eptaidrato – ghiaccio.

L'ultima formulazione riportata in Figura 3.11 è Bo3, contenente il 30% w/w di TBA. Il termogramma di quest'ultima formulazione presenta due picchi endotermici ravvicinati, a -8.02°C e -5.85°C, il primo dei quali probabilmente legato alla fusione dell'eutettico TBA diidrato – ghiaccio, il secondo legato alla fusione dell'eutettico TBA eptaidrato – ghiaccio. Il termogramma evidenzia la presenza di un picco esotermico a -11.60°C, probabilmente legato alla cristallizzazione del TBA eptaidrato. Infine, il picco endotermico a -2.5°C è chiaramente legato alla fusione del ghiaccio.

Si sono inoltre analizzate le formulazioni contenenti gli eccipienti mannitolo, saccarosio o ciclodestrina, al 5% in peso, e il TBA al 20% in peso (Figura 3.12, 3.13, 3.14). L'obiettivo di tali analisi è stato quello di discernere i contributi degli eccipienti e del TBA e vedere gli effetti di quest'ultimo sulle transizioni termiche della formulazione.

Per la soluzione Mo (Figura 3.12), contenente mannitolo e TBA, è stata individuata una temperatura di transizione vetrosa a -32.4°C, lievemente inferiore al valore ottenuto per la formulazione M (-31.1°C). Nella fase di riscaldamento compaiono due picchi esotermici, uno a -26°C, relativo alla cristallizzazione del mannitolo rimasto amorfo durante il congelamento, ed uno a -20°C, probabilmente dovuto alla cristallizzazione del tert-butanolo, anche se è difficile identificare la forma cristallina coinvolta (diidrato o eptaidrato). È tuttavia complesso fornire un'interpretazione certa di tali dati utilizzando solo la DSC, in quanto è riportato che per concentrazioni di TBA superiori al 20% la cristallizzazione del mannitolo e del TBA eptaidrato si sovrappongono (Sonje *et al.*, 2020). È infine presente un picco endotermico a -7.9°C, legato alla fusione dell'eutettico ghiaccio-eptaidrato. Nella fase di raffreddamento è stato nuovamente individuato un picco di cristallizzazione del mannitolo, a -35.4°C. Per discernere i contributi di TBA e mannitolo sul termogramma, è stata realizzata un'ulteriore prova che ha previsto un *annealing*, della durata di 5 minuti a -20°C, utilizzando le medesime rampe utilizzate per il congelamento e il riscaldamento delle prove di DSC classiche (Figura 3.13). In particolare la soluzione è stata portata a -80°C, riscaldata fino a -20°C, mantenuta a quest'ultima temperatura per 5 minuti, raffreddata nuovamente fino a -50°C e infine riscaldata a temperatura ambiente. Si osserva che l'*annealing* elimina la cristallizzazione del mannitolo nel riscaldamento, permettendo di misurare solo i contributi sulle transizioni termiche del TBA. Il termogramma riporta due eutettici, uno a -13.54°C, relativo probabilmente al TBA diidrato, e uno a -10.11°C, relativo al TBA eptaidrato.

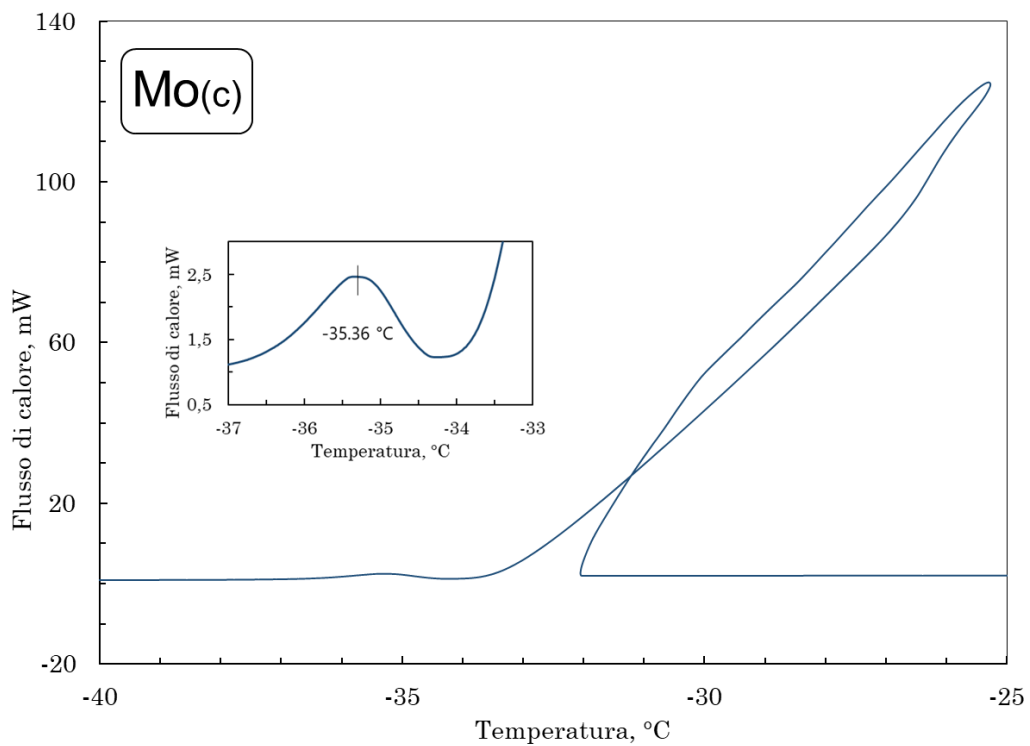
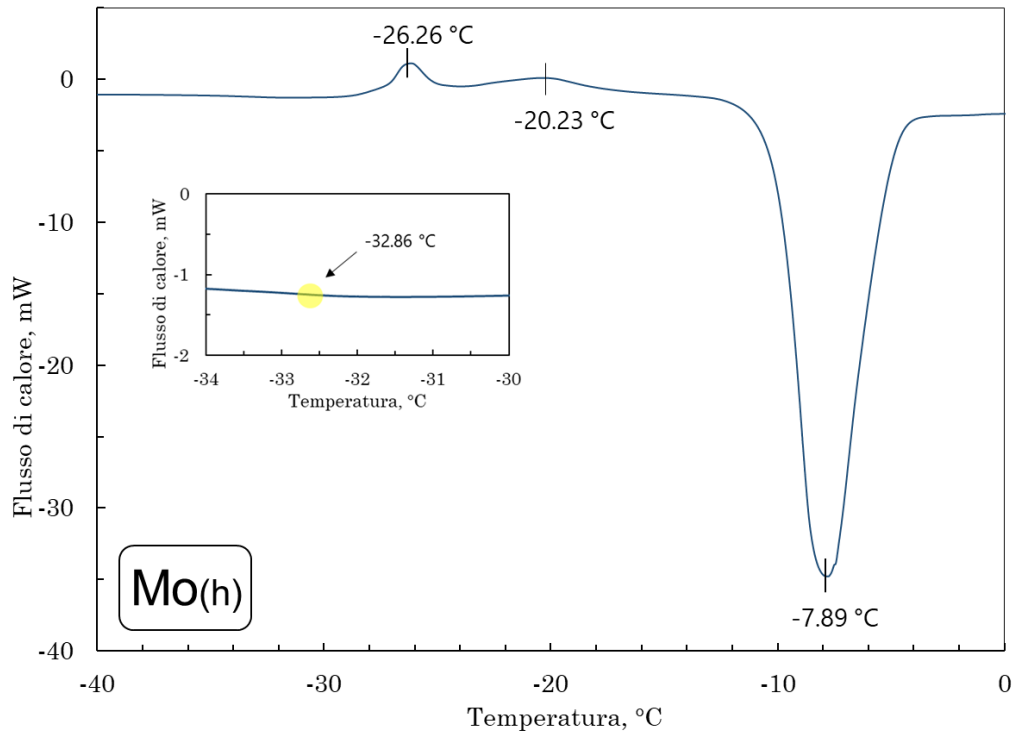


Figura 3.12 - Analisi DSC della formulazione Mo, per la fase di riscaldamento (h) e di congelamento (c).

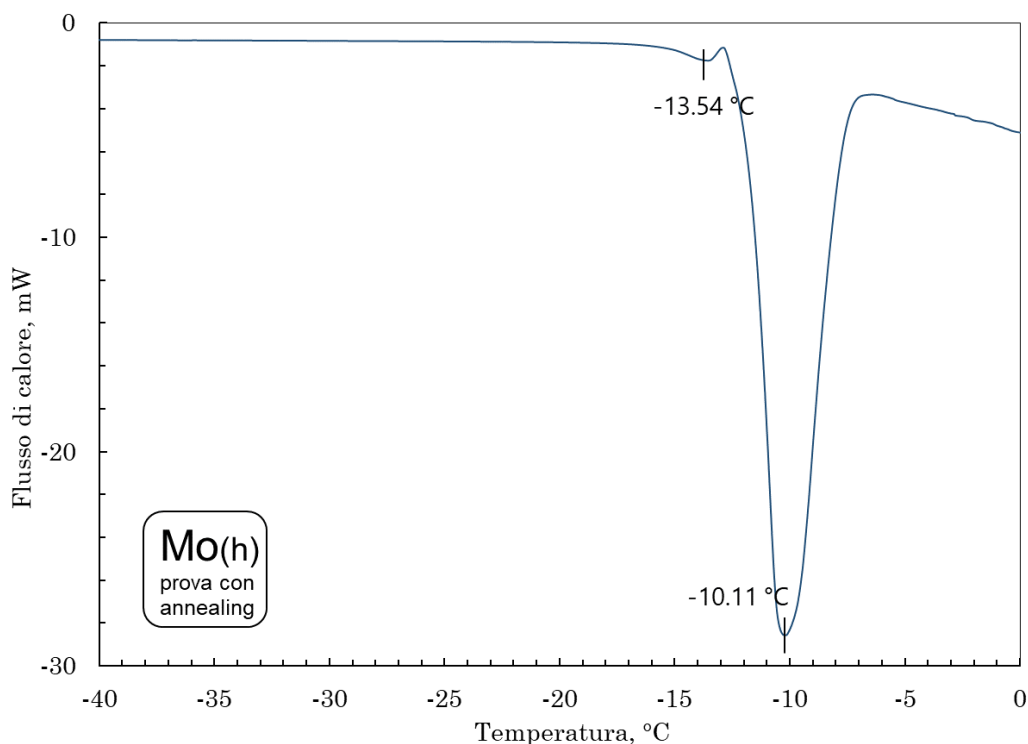


Figura 3.13 - Analisi DSC della formulazione Mo successivamente all'applicazione di un annealing a -20°C , della durata di 5 minuti. La figura riprende la parte del termogramma relativa alla fase di riscaldamento finale.

Per quanto riguarda la soluzione So (Figura 3.14), contenente saccarosio e TBA, si osserva un abbassamento della temperatura di transizione vetrosa del saccarosio (-41.5°C) rispetto al caso in assenza di TBA. Si nota anche sul termogramma un picco esotermico a -23°C , probabilmente relativo alla cristallizzazione del TBA eptaidrato. Compare infine un picco endotermico a -8.3°C , relativo alla fusione dell'eutettico eptaidrato-ghiaccio.

Per quanto riguarda la formulazione Ho (Figura 3.15), contenente ciclodestrina e TBA, l'analisi DSC ha evidenziato due flessi, corrispondenti a due transizioni vetrose della ciclodestrina nella fase di riscaldamento (-33.5°C e -23.6°C). È inoltre presente un picco esotermico legato alla cristallizzazione del TBA eptaidrato, a circa -16°C , e un picco endotermico relativo alla fusione dell'eutettico a -7.8°C . Si deduce, quindi, che uno degli effetti del TBA è quello di abbassare le temperature di transizione vetrosa degli eccipienti amorfi.

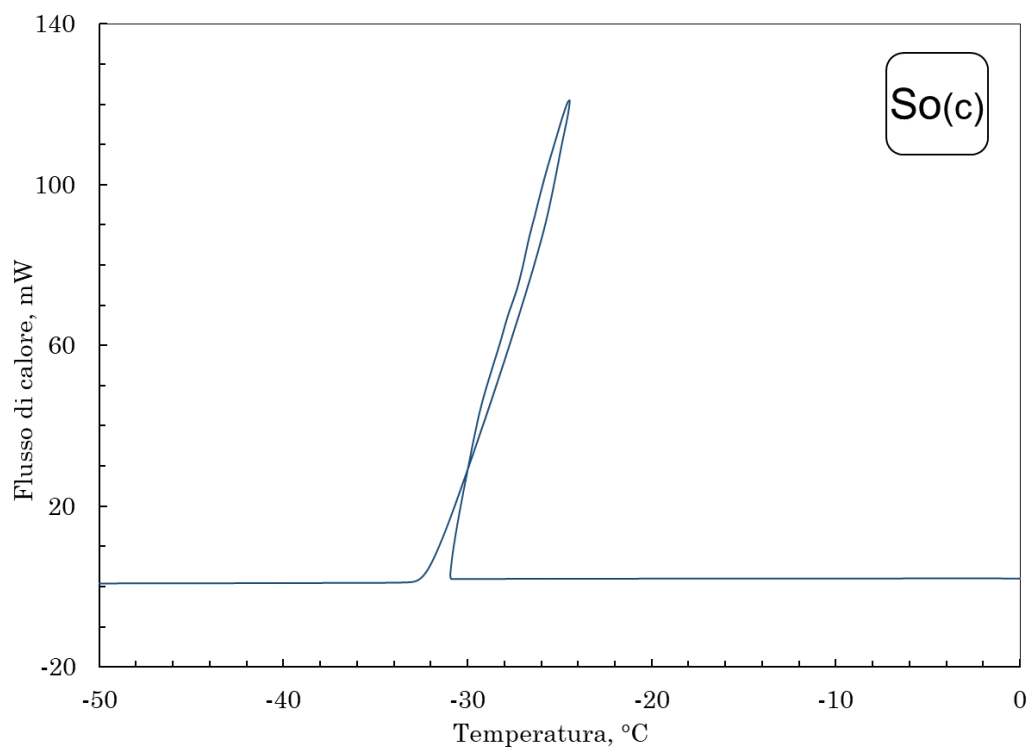
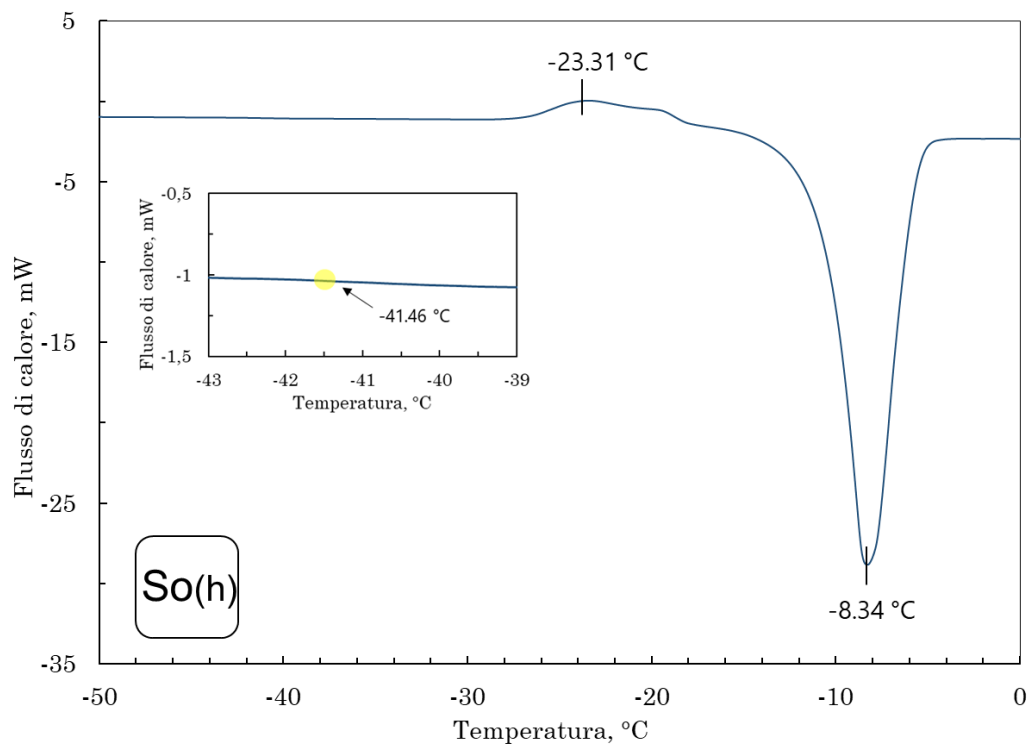


Figura 3.14 - Analisi DSC della formulazione So.

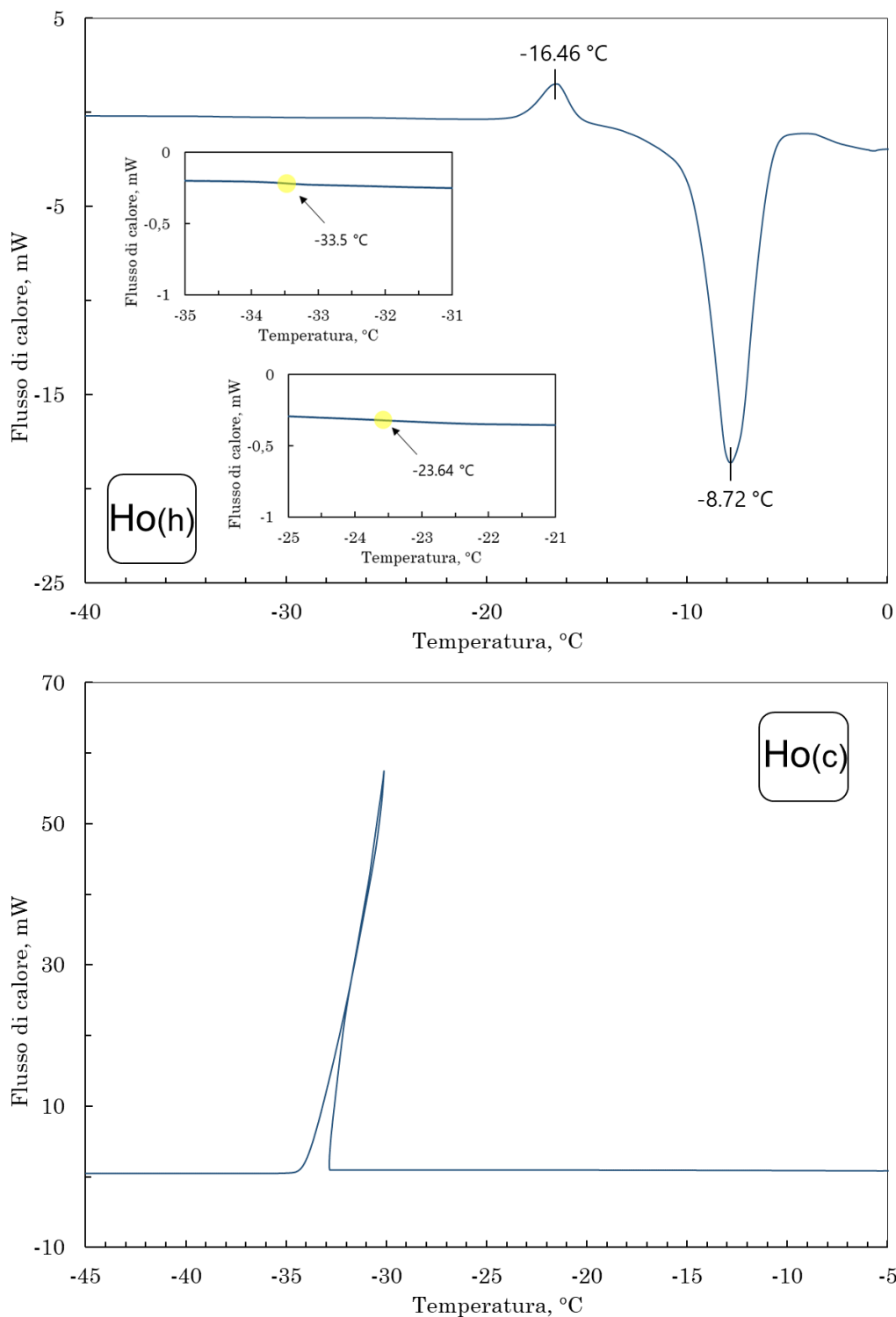


Figura 3.15 - Analisi DSC della formulazione Ho.

Sono state infine analizzate le formulazioni contenenti sia TBA che Tween 80 (Figure 3.16, 3.17, 3.18, 3.19).

Per la soluzione Bo* (Figura 3.16), contenente TBA e Tween 80, l'analisi DSC evidenzia la presenza di quel che può essere identificato come un eutettico imputabile al TBA diidrato, a -12.55°C , e una temperatura di fusione dell'eutettico eptaidrato-ghiaccio a -7.87°C .

La formulazione Mo*, i cui termogrammi sono riportati in Figura 3.17, presenta due

temperature di cristallizzazione del mannitolo, nella fase di raffreddamento (-34.5°C) e riscaldamento (-22.8°C), corrispondenti a due picchi esotermici. È sempre presente una prima transizione vetrosa, a circa -32.0°C , e una seconda, a -26.4°C , chiaramente legate al mannitolo. Si può osservare inoltre che la presenza del Tween 80 sembra modificare il comportamento del TBA, portando il sistema a mostrare due temperature di fusione dell'eutettico, a -11.8°C e a -8.3°C , legate rispettivamente al TBA diidrato ed eptaidrato.

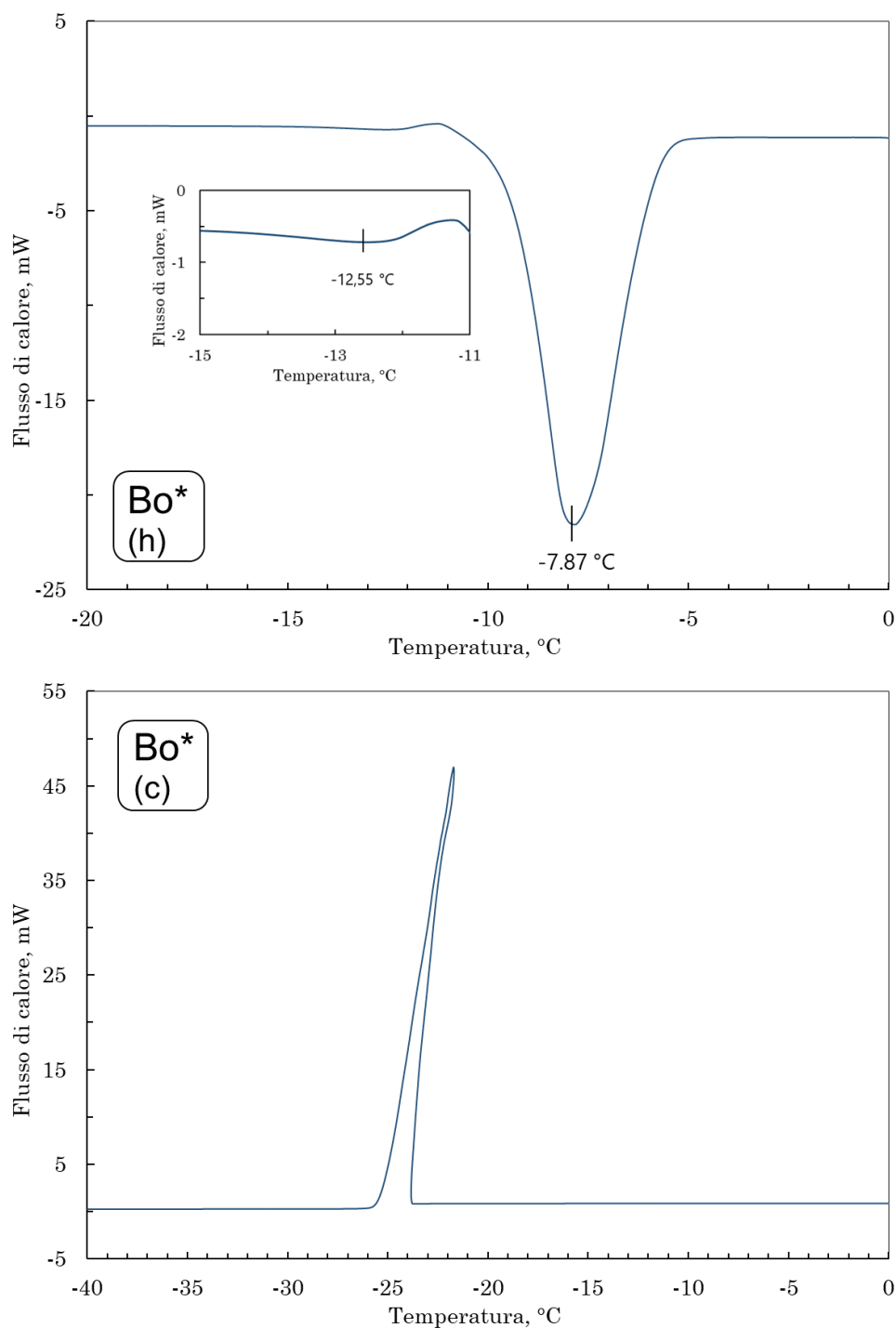


Figura 3.16 - Analisi DSC della formulazione Bo*.

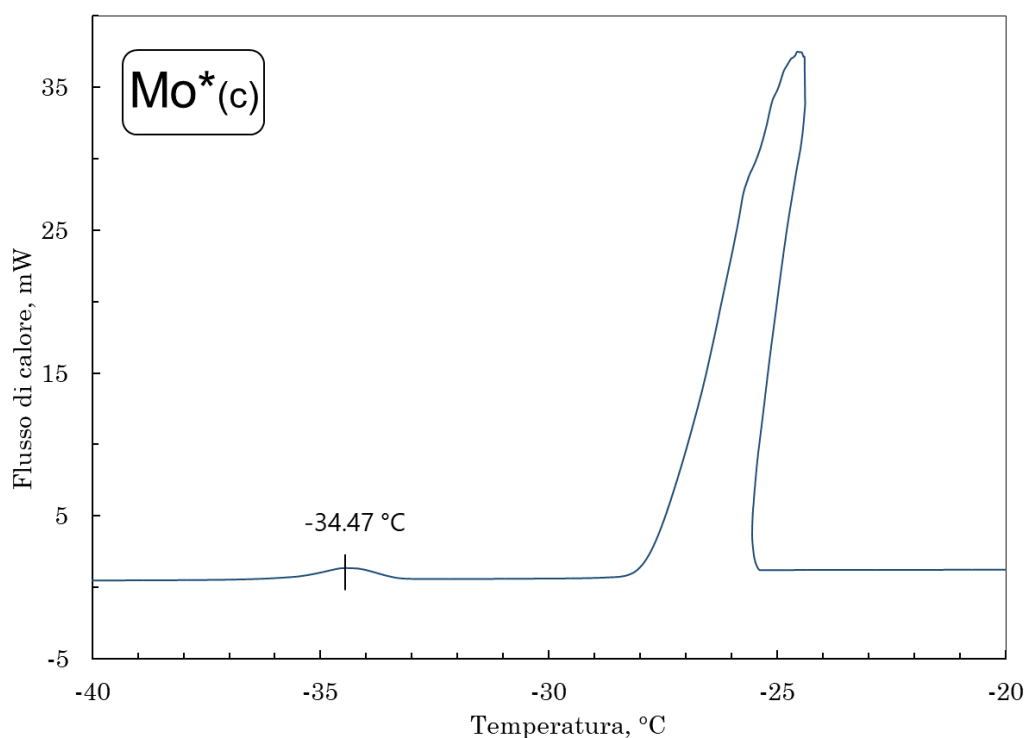
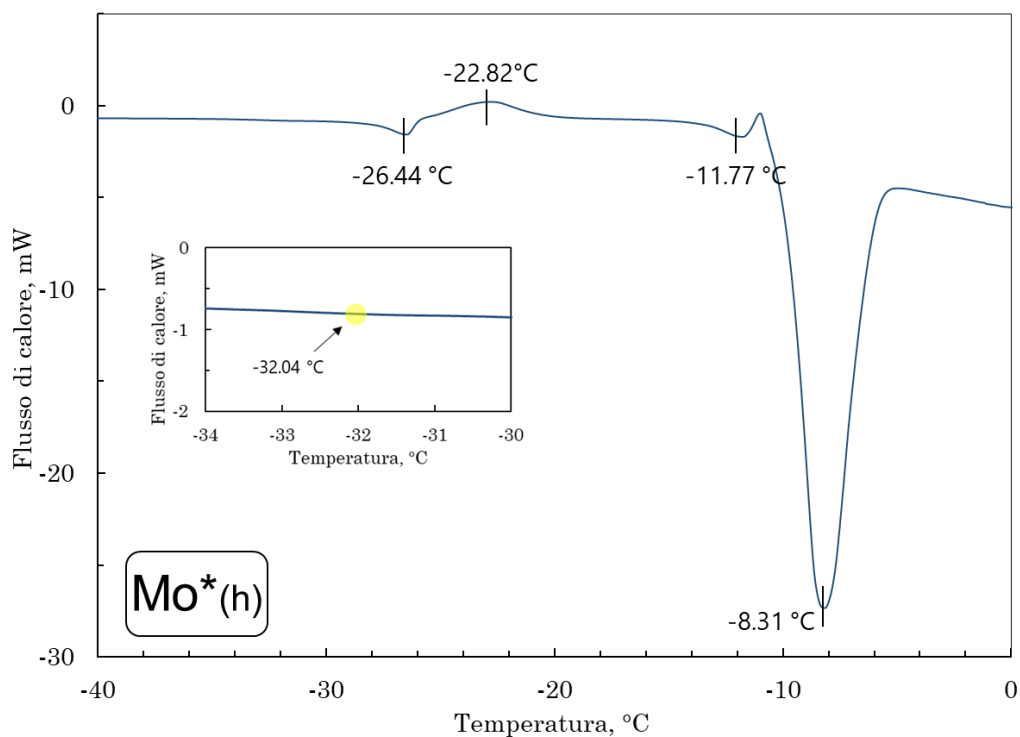


Figura 3.17 - Analisi DSC della formulazione Mo*.

La formulazione So* (Figura 3.18) presenta una transizione vetrosa dovuta al saccarosio, come già osservato abbassata dal TBA, a circa -39°C ; vi sono poi due eutettici del TBA, uno a -14.85°C (legato al TBA diidrato) e uno a -8.72°C (imputabile al TBA eptaidrato).

Ho*, infine, ha evidenziato la presenza di due temperature di transizione vetrosa, a -29.72°C e -23.41°C , legate alla ciclodestrina, e, come visto per le due formulazioni precedenti, due eutettici legati al TBA, uno a -11.14°C e l'altro a -8.52°C .

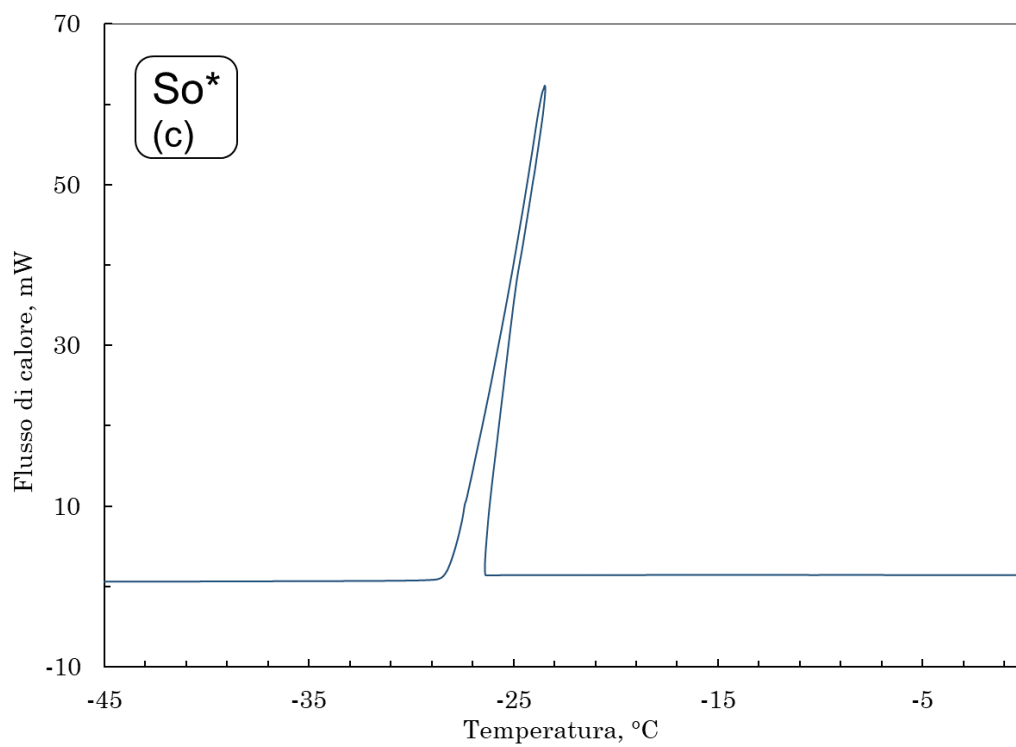
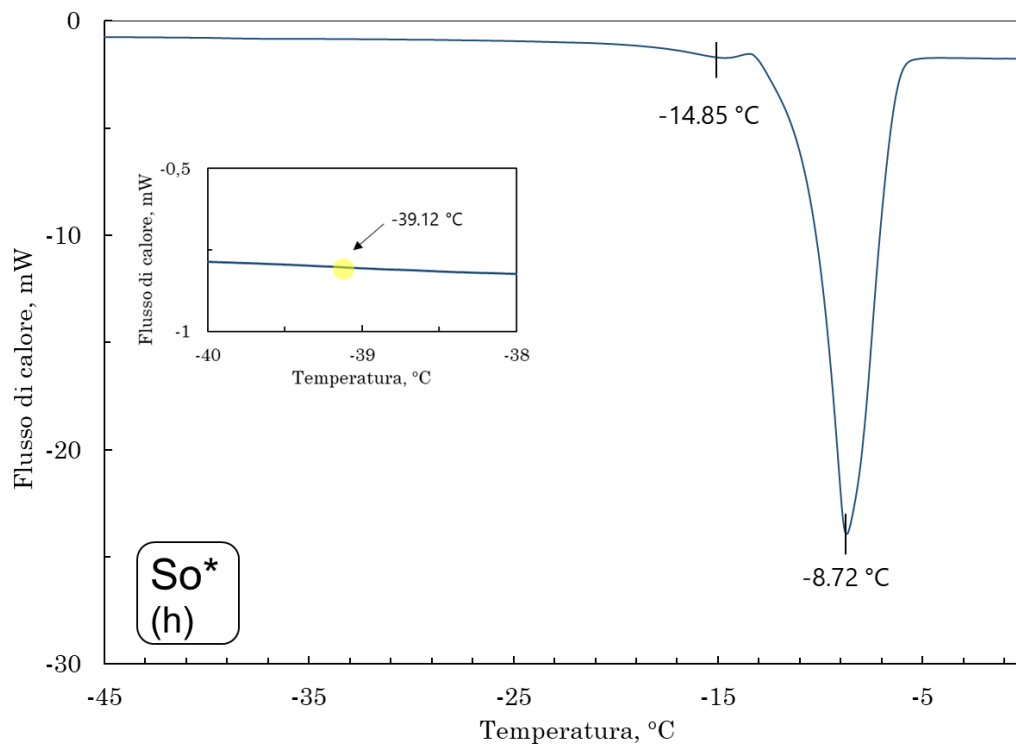


Figura 3.18 - Analisi DSC della formulazione So*.

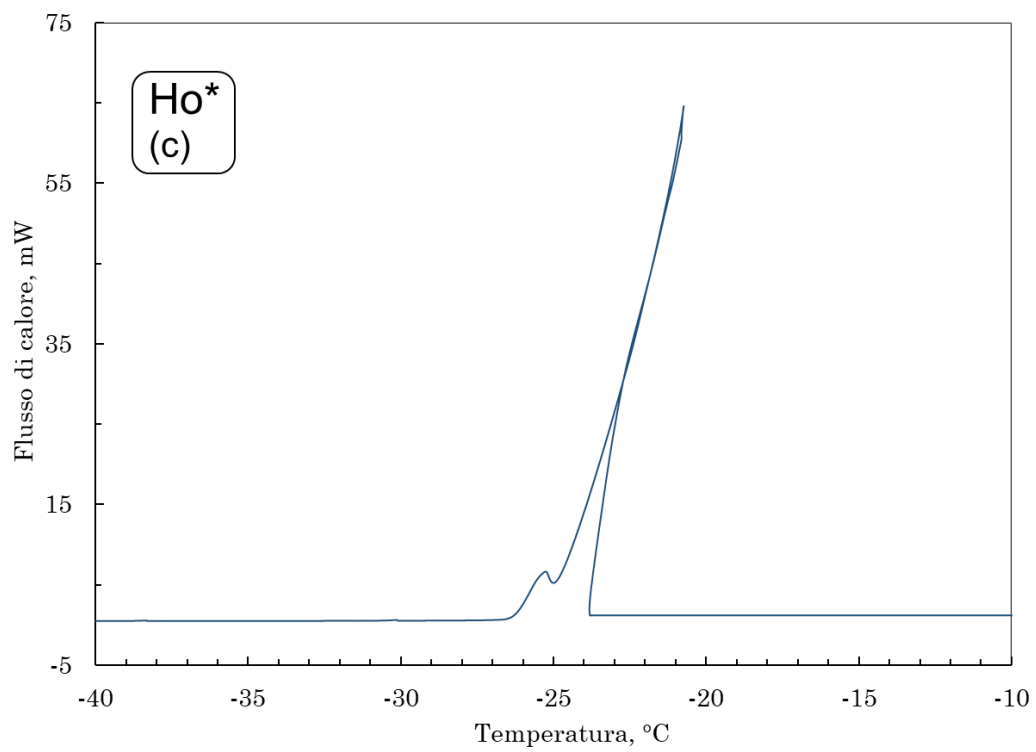
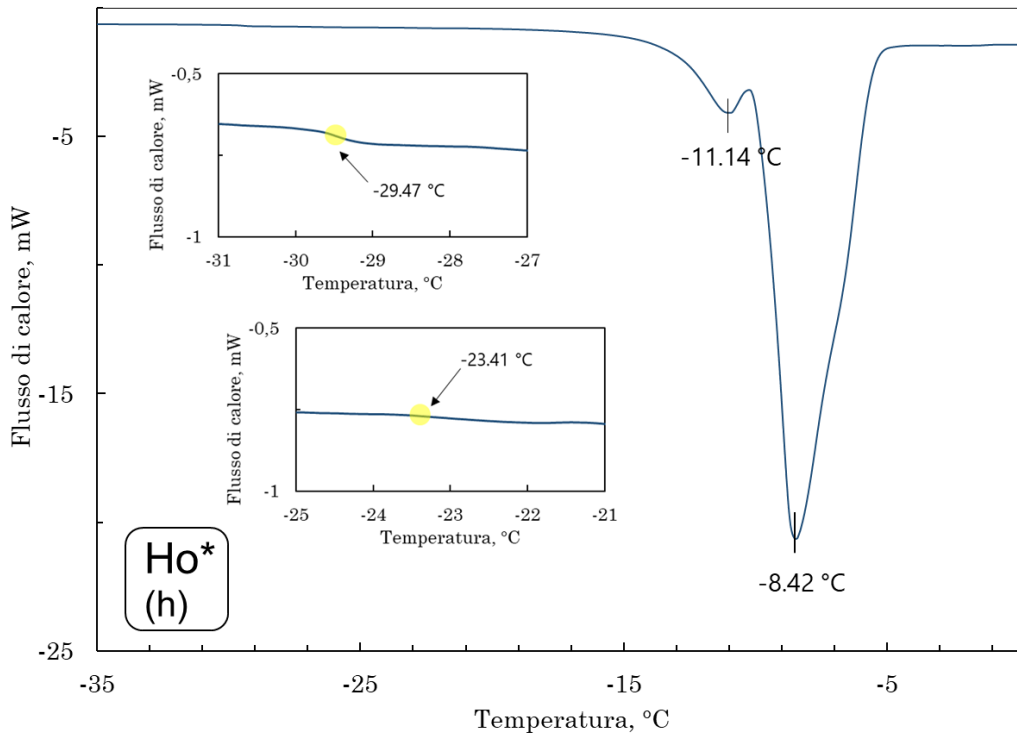


Figura 3.19 - Analisi DSC della formulazione Ho*.

3.1.2 Criomicroscopio (FDM)

Nel presente paragrafo sono riportate alcune delle immagini ricavate dalle prove al criomicroscopio per le formulazioni indicate nel Capitolo 2, in Tabella 2.1. Il protocollo utilizzato per le analisi al criomicroscopio è riportato nella Tabella 2.3.

Le immagini, catturate al crescere della temperatura, riportano l'andamento del fronte di sublimazione che parte dal bordo della goccia congelata e avanza verso l'interno della stessa. Al di sotto di ogni fotografia è riportata la temperatura a cui essa è stata scattata, con particolare attenzione alle immagini rappresentanti l'eventuale collasso o microcollasso che si verifica durante la prova. In particolare, una volta raggiunta la T_{coll} , la struttura inizia a presentare piccole fratture in corrispondenza del fronte di sublimazione che avanza, e man mano che la temperatura aumenta, l'intera struttura essiccata inizia a perdere struttura, fino a raggiungere un collasso totale.

Si ricorda che sono state analizzate al criomicroscopio solo le formulazioni contenenti eccipienti (M, S, H, Mo, So, Ho, M*, S*, H*, Mo*, So*, Ho*). Per le formulazioni contenenti eccipienti amorfi, quali ciclodestrina e saccarosio, è stato chiaramente osservato il fenomeno del collasso, evidenziato nelle fotografie sottostanti. Per le formulazioni contenenti mannitolo non è stato possibile distinguere in maniera netta la fusione del mannitolo da quella del ghiaccio. Questo perché il mannitolo possiede una T_{eu} di circa $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kim et al., 1998), molto vicina alla temperatura di fusione del ghiaccio, che rende difficile catturare in maniera distinta i due eventi (Marenco, 2019). Si è osservato, tuttavia, che le formulazioni contenenti mannitolo evidenziano la comparsa di microfratture che non portano alla rottura della matrice e sono quindi interpretabili come un microcollasso; infatti, superato tale evento, il fronte di sublimazione continua ad avere un percorso lineare e la struttura della matrice essiccata non presenta difetti.

In analogia con quanto operato per la DSC, una prima prova iniziale ha avuto come scopo quello di determinare se il pH avesse un'effettiva influenza sul comportamento dei campioni. A tal proposito è stata analizzata una formulazione contenente ciclodestrina sia a pH 3.7 (H) che a pH 6.5 (H').

Sono riportate in Figura 3.20 e 3.21 le immagini al FDM delle formulazioni H (pH 3.7) e H' (pH 6.5) che hanno mostrato, rispettivamente, delle temperature di collasso di circa -14.6°C e -14.9°C . Si è pertanto concluso che le differenze tra le due soluzioni sono trascurabili dal punto di vista del collasso.

Per le formulazioni M ed S, le analisi al criomicroscopio sono state già effettuate in un precedente lavoro di tesi (Marenco, 2019). Per la formulazione S è stata osservata una temperatura di collasso pari a -31.9°C .

La Tabella 3.1, riportata alla fine del paragrafo, raccoglie le varie temperature di collasso ricavate dalle analisi termiche effettuate.

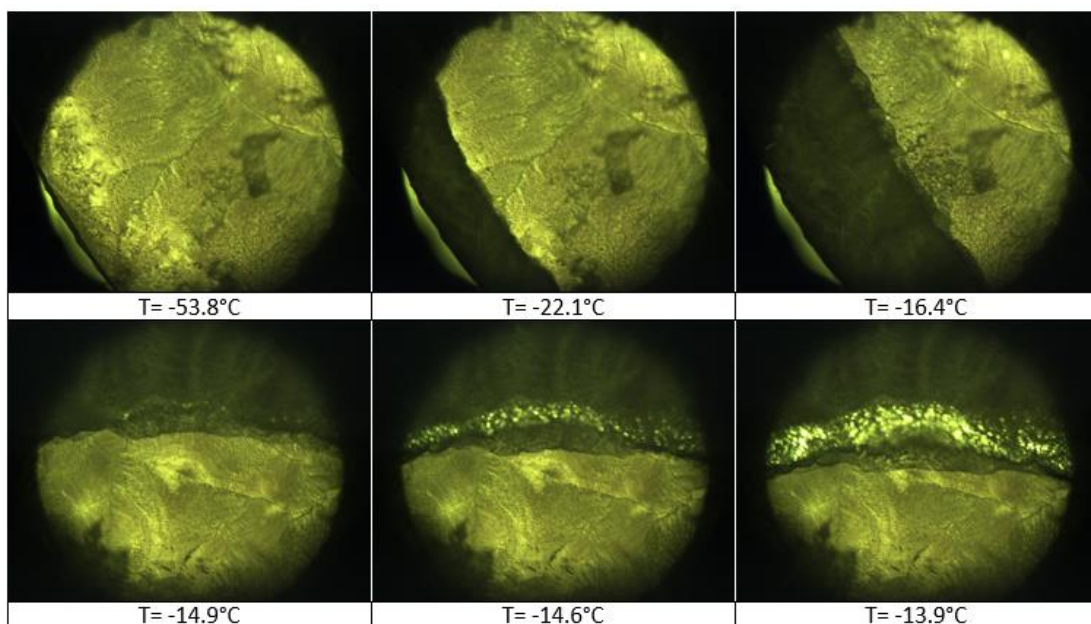


Figura 3.20 - Immagini al criomicroscopio rappresentanti l'avanzamento del fronte di sublimazione di un campione di formulazione H, contenente il 5% in peso di ciclodestrina, a pH 3.7. La banda scura rappresenta la matrice essiccata, mentre la zona chiara rappresenta la goccia ancora congelata.

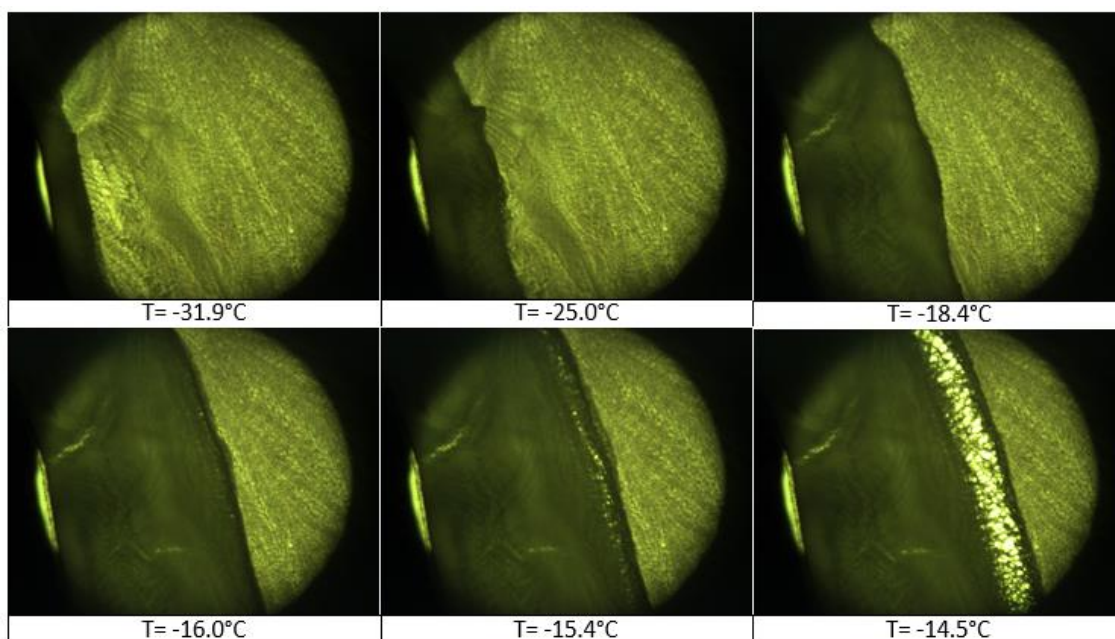


Figura 3.21 - Immagini al criomicroscopio della formulazione H', contenente il 5% in peso di ciclodestrina, a pH 6.5.

È stato poi studiato l'effetto della presenza del tensioattivo nelle formulazioni. Per la formulazione H*, contenente 5% w/w di ciclodestrina e 0.01% w/v di Tween 80, è stato osservato un collasso della struttura alla temperatura di -14.2°C (Figura 3.22).

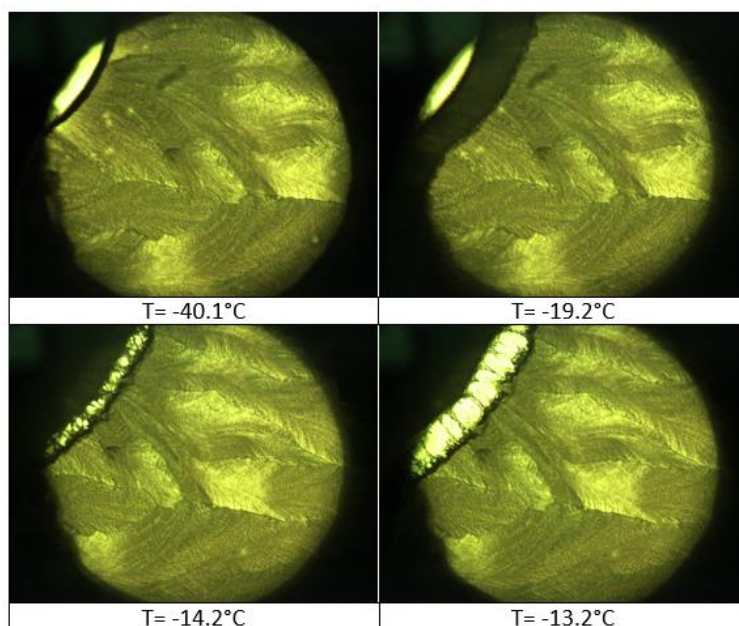


Figura 3.22 - Prova al FDM della formulazione H*, contenente ciclodestrina e Tween 80.

Le prove successive al criomicroscopio hanno avuto come obiettivo l'osservazione del comportamento delle formulazioni a cui è stato aggiunto il 20% in peso di TBA, ponendo particolare attenzione agli effetti di quest'ultimo sulle temperature di collasso.

La formulazione Mo, contenente mannitolo e TBA, ha evidenziato la presenza di un microcollasso alla temperatura di -28.2°C : in prossimità del fronte di sublimazione, a tale temperatura, si sono osservate delle microfrazture (Figura 3.23); superata tale temperatura, però, lo strato essiccato ha ripreso ad accrescersi in modo lineare. Probabilmente il fenomeno è legato alla presenza di mannitolo rimasto amorfo, la cui temperatura di transizione vetrosa è stata osservata essere prossima a -31°C (Figura 3.4).

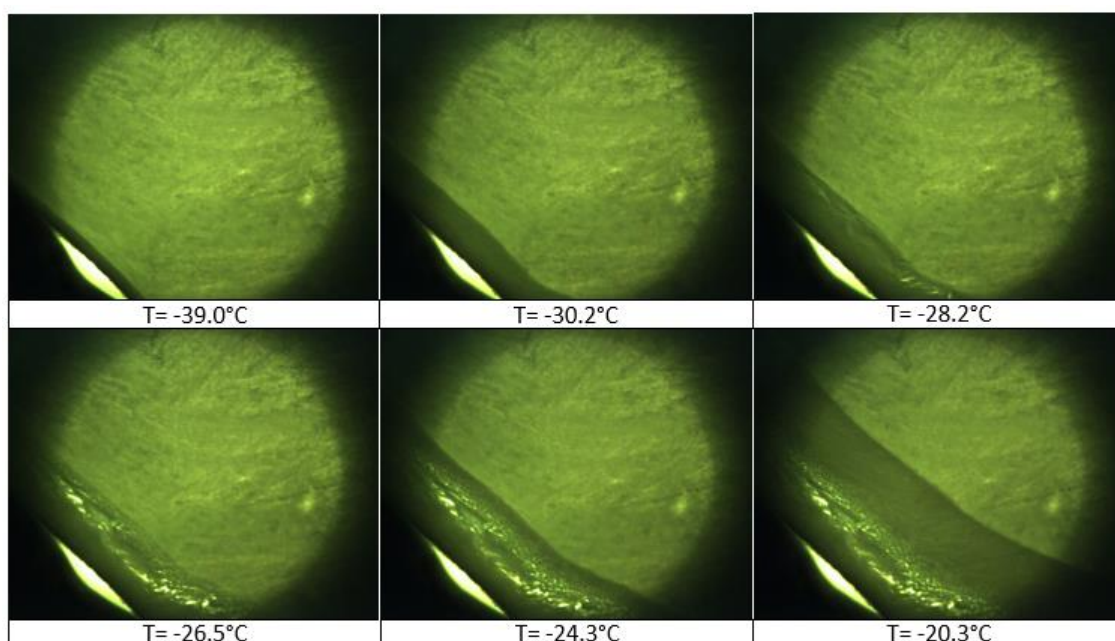


Figura 3.23 - Immagini al criomicroscopio della formulazione Mo, contenente 5% in peso di mannitolo e 20% in peso di TBA.

In Figura 3.24 è riportato l'andamento del fronte di sublimazione della formulazione So, contenente TBA e saccarosio: è stata osservata una temperatura di collasso prossima ai -33°C , lievemente più bassa rispetto a quella registrata per la formulazione S.

È stata poi effettuata una prova sulla formulazione contenente ciclodestrina e TBA (Ho). Il campione ha evidenziato una T_c prossima ai -18.3°C (Figura 3.25), più bassa rispetto ai -14.6°C osservati per la formulazione H, anche in questo caso avvalorando l'ipotesi che il TBA abbia l'effetto di abbassare le temperature di collasso.

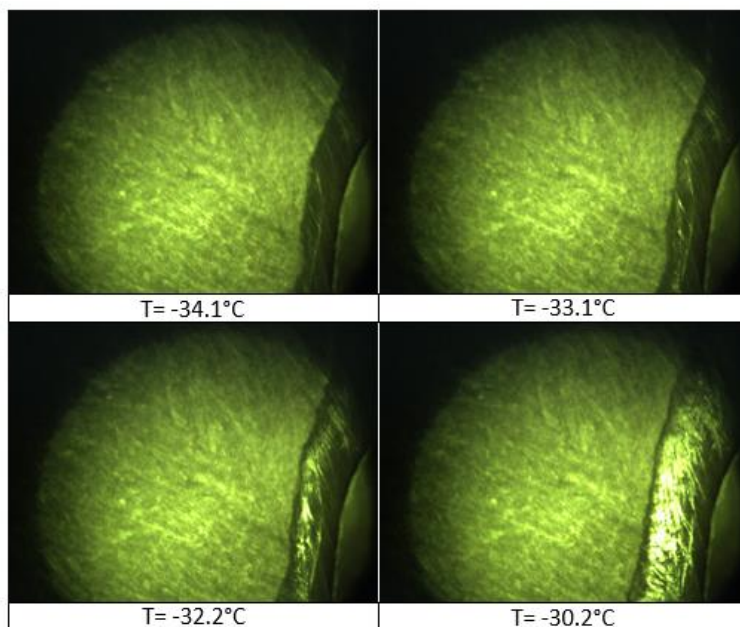


Figura 3.24 - Collasso della formulazione So, contenente il 5% di saccarosio e il 20% di TBA in peso.

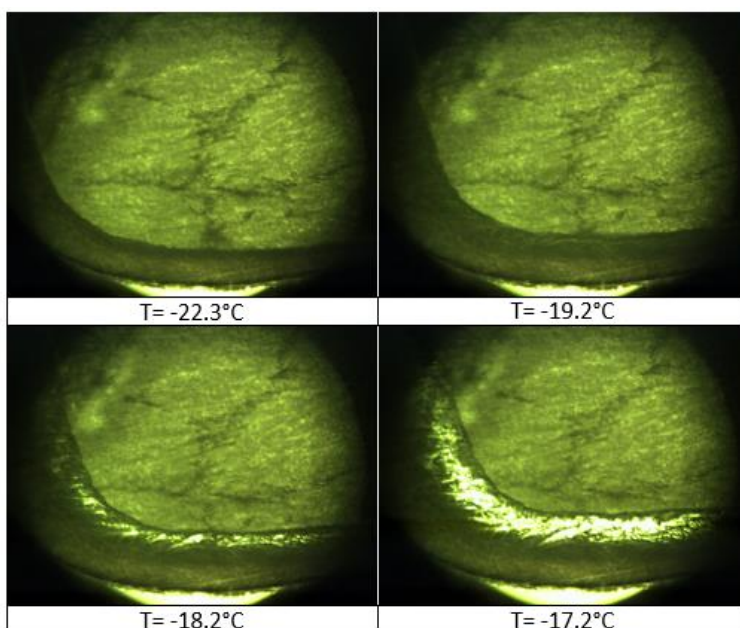


Figura 3.25 - Andamento del fronte di sublimazione per la formulazione Ho, contenente il 5% di ciclodestrina e il 20% di TBA in peso.

L'ultimo insieme di prove ha avuto come obiettivo la valutazione degli effetti relativi alla combinazione di tensioattivo e co-solvente. Le Figure 3.26, 3.27, 3.28 riportano, rispettivamente, le immagini delle prove al FDM condotte sulle soluzioni Mo*, So* ed Ho*.

In particolare, per la soluzione Mo*, si continua ad osservare un microcollasso a temperature prossime ai -28°C e l'assenza di un vero e proprio collasso.

La formulazione So* ha riportato una temperatura di collasso pari a -33.1°C, in analogia con il caso in assenza di Tween 80, avvalorando l'ipotesi della scarsa influenza del tensioattivo sulle transizioni termiche.

Infine, la prova effettuata sul campione Ho* ha riportato una T_c pari a -18.2°C, analoga al caso in assenza di Tween 80.

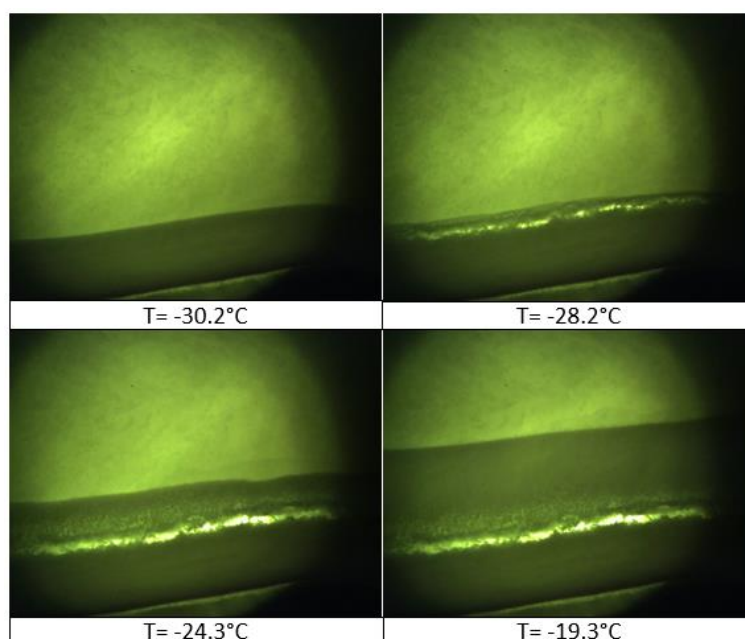


Figura 3.26 - Prova al FDM della formulazione Mo*, contenente 5% w/w mannitolo, 20% w/w TBA, 0.01% w/v Tween80.

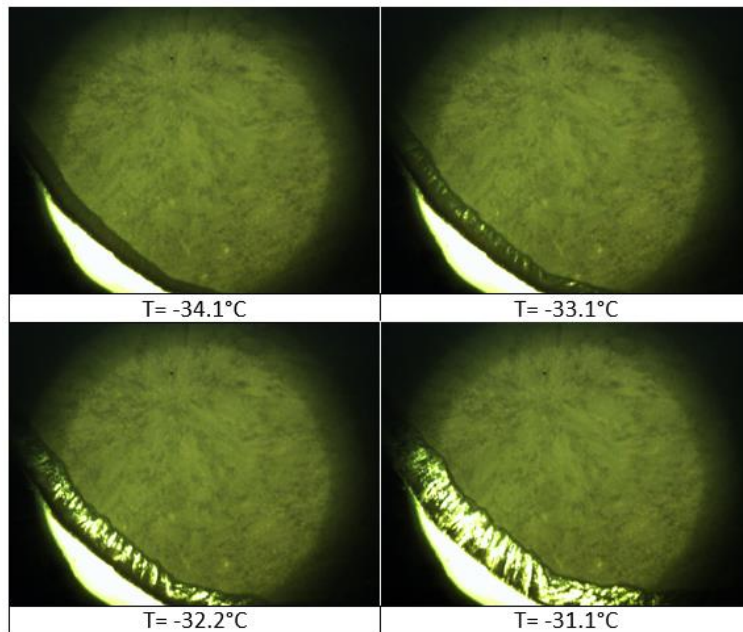


Figura 3.27 - Prova al FDM della formulazione *So**, contenente 5% w/w saccarosio, 20% w/w TBA, 0.01% w/v Tween80.

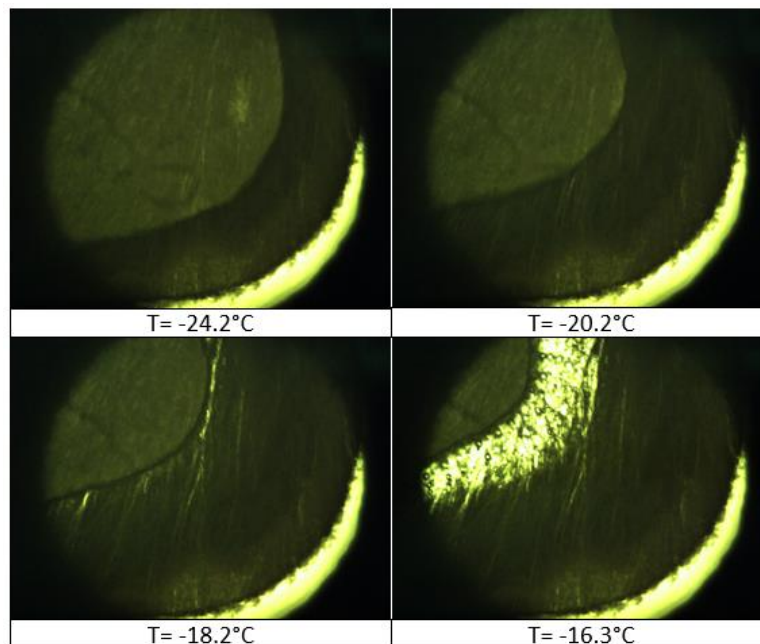


Figura 3.28 - Prova al FDM della formulazione *Ho**, contenente 5% w/w saccarosio, 20% w/w TBA, 0.01% w/v Tween80.

In conclusione di questo paragrafo, si riassumono nella Tabella 3.1 i risultati ottenuti dalle prove di calorimetria a scansione differenziale e al criomicroscopio per le formulazioni analizzate.

Tabella 3.1 - Riassunto dei risultati ottenuti dall'analisi termica delle formulazioni, in termini di temperature di transizione vetrosa T_g' , temperatura di cristallizzazione T_{cr} , temperatura di fusione dell'eutettico T_{eu} e temperatura di collasso T_{coll} . La lettera C (cooling) accanto ad alcune formulazioni indica che il fenomeno è stato identificato nella fase di raffreddamento, la H (heating) nella fase di riscaldamento.

	T_g' (°C)		T_{cr} (°C)			T_{eu} (°C)			T_{coll} (°C)	
M	-31.12		-34.5 (C)	-23.78 (H)	-					
S	-33.52								-31.9	
H	-17.33 pH 3.7	-17.68 pH 6.5							-14.6 pH 3.7	-14.9 pH 6.5
M*	-31.30		-34.24 (C)	-26.65 (H)				-		
S*	-33.42								N.D.	
H*	-17.76								-14.2	
Bo			-18.88			-7.76				
Mo	-32.36		-35.36 (C)	26.26 (H)	-20.23 (H)	-7.89			-	
So	-41.46		-23.31			-8.34			-33.1	
Ho	-33.50	-23.64	-16.46			-7.85			-18.3	
Bo*						-12.55	-7.87			
Mo*	-32.04	-26.44	-34.47 (C)	-22.62 (H)	-11.77			-8.31	-	
So*	-39.12					-14.85	-8.72	-33.1		
Ho*	-29.47	-23.41				-11.14	-8.42	-18.2		
Bo05						-9.84	-8.57	0.87		
Bo1						-10.08	-8.25	-2.50		
Bo3			-11.60			-8.02	-5.85			

3.2 Studio della stabilità proteica durante congelamento, scongelamento e liofilizzazione

Il recupero di attività proteica in ciascuna formulazione, per ognuna delle due proteine modello, è stato valutato a valle di congelamento veloce (in azoto liquido), congelamento lento (a 0.3°C/min) e liofilizzazione.

3.2.1 Effetto della velocità di congelamento

Come illustrato nella sezione 2.4 del Capitolo 2, si è scelto di valutare il recupero dell'attività proteica a valle di due differenti protocolli di congelamento. Lo scopo di tale operazione è stata quella di determinare l'effetto di diversa estensione di superficie ghiaccio-acqua sulla stabilità proteica.

È noto che la mioglobina, a pH 3.7, è una proteina soggetta principalmente agli effetti della denaturazione a freddo (Arsiccio *et al.*, 2020). Essa, quindi, è particolarmente sensibile a cicli di congelamento lento; viceversa, la L-lattato deidrogenasi si denatura principalmente all'interfaccia e, quindi, durante congelamenti veloci.

Si è operato con un congelamento veloce tramite immersione in azoto, che ha avuto lo scopo di massimizzare l'estensione superficie di interfaccia. Il congelamento lento è stato invece condotto imponendo una rampa di 0.3°C/min all'interno del liofilizzatore, seguendo il protocollo riportato in Tabella 2.4.

La valutazione del recupero di attività biologica residua è stata effettuata attraverso misure spettrofotometriche, volte a determinare l'entità dell'aggregazione, nel caso della mioglobina, o dell'attività enzimatica, per l'LDH.

È stato inoltre effettuato un test ANOVA ad una sola variabile indipendente, seguito dalla tecnica post-hoc di comparazione nota come *honestly significant difference* (HSD) o Tukey test. Gli istogrammi riportati nel seguito includono i valori di recupero proteico misurati, nonché i risultati del test di Tukey effettuato: colonne etichettate da lettere diverse rappresentano valori statisticamente differenti.

Mioglobina

Le formulazioni contenenti mioglobina sono state sottoposte a 3 cicli di congelamento veloce in azoto e scongelamento in aria.

I campioni, una volta scongelati, sono stati analizzati con lo spettrofotometro UV/VIS, misurandone l'assorbanza a 280 nm e 410 nm. L'assorbanza a 280 nm è legata agli amminoacidi aromatici e, di conseguenza, alla concentrazione della proteina; un decremento di tale valore, a valle di centrifugazione, è indice di aggregazione. Il valore di assorbanza a 410 nm, invece, è legato al gruppo eme caratteristico della proteina e un suo abbassamento è indice sia di aggregazione che denaturazione. Si deduce, pertanto, che il valore di assorbanza riportato a 410 nm è generalmente più basso rispetto a quello misurato a 280 nm, in quanto influenzato anche da fenomeni di perdita di struttura secondaria/terziaria.

Le Figure 3.29 e 3.30 riportano la percentuale di attività residua (relativa alla proteina non processata) dopo tre cicli di congelamento veloce (in nero) e tre cicli di congelamento lento (in tratteggiato), misurata rispettivamente a 280 nm o a 410 nm. Si può notare come effettivamente il valore di recupero misurato a 410 nm sia inferiore rispetto a quello ottenuto a 280 nm.

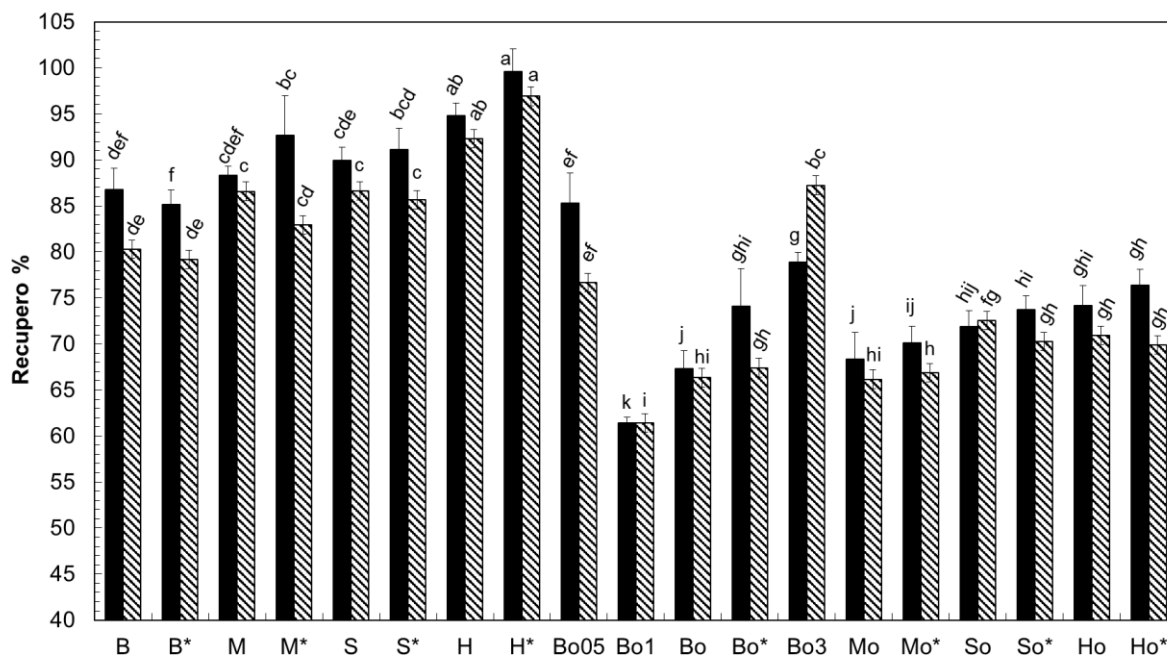


Figura 3.29 - Recupero proteico a valle di tre cicli di congelamento/scongelo in azoto liquido e tre cicli di congelamento lento per le formulazioni contenenti mioglobina, misurato a 280 nm. Le colonne nere rappresentano i valori di recupero a seguito dell'applicazione del protocollo di congelamento veloce, le colonne tratteggiate rappresentano i valori di recupero misurati in seguito al congelamento lento. Colonne etichettate da lettere diverse rappresentano valori statisticamente differenti in base al Tukey test ($p < 0.05$).

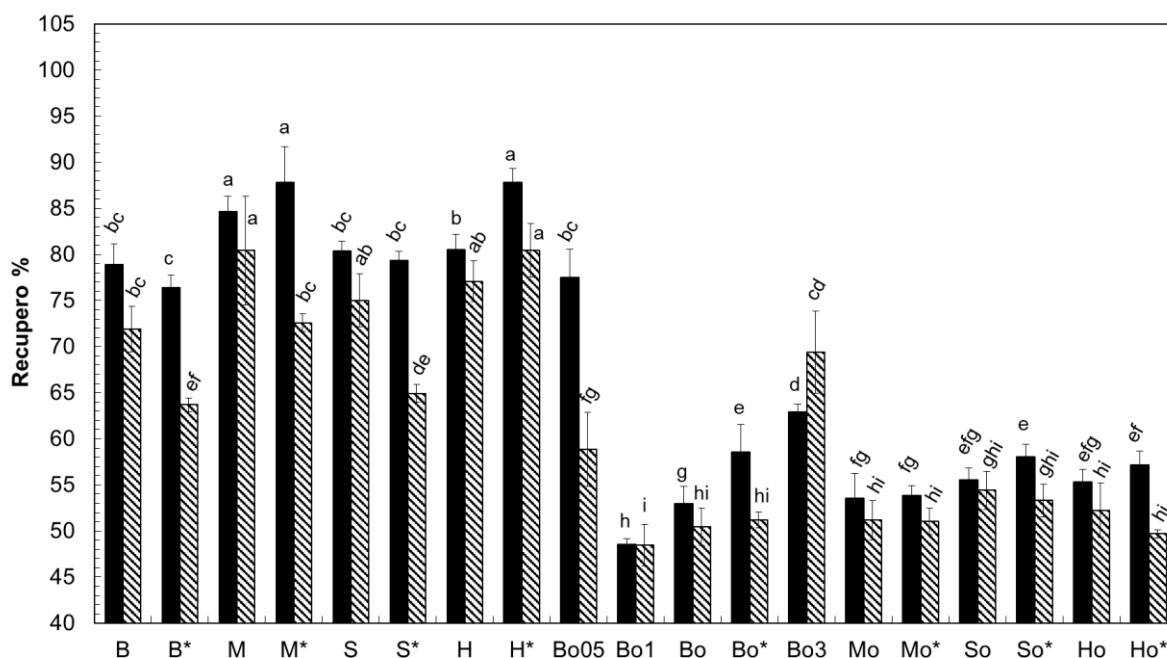


Figura 3.30 - Recupero proteico a valle di tre cicli di congelamento/scongelo in azoto liquido e tre cicli di congelamento lento per le formulazioni contenenti mioglobina, misurato a 410 nm. Le colonne nere rappresentano i valori di recupero a seguito dell'applicazione del protocollo di congelamento veloce, le colonne tratteggiate rappresentano i valori di recupero misurati in seguito al congelamento lento. Colonne etichettate da lettere diverse rappresentano valori statisticamente differenti in base al Tukey test ($p < 0.05$).

Lattato deidrogenasi (LDH)

I campioni contenenti LDH sono stati sottoposti ad un unico ciclo di congelamento rapido in azoto liquido, seguito da scongelamento in aria. L'LDH è una proteina principalmente soggetta a stress legati alla formazione di interfacce, quindi particolarmente sensibile a congelamenti rapidi. Le prove di congelamento lento sulle formulazioni contenenti LDH hanno seguito il protocollo riportato in Tabella 2.4. Il congelamento è stato eseguito una sola volta, con successivo scongelamento in aria. I risultati ottenuti tramite l'applicazione di tali protocolli sono riportati in Figura 3.31.

Si nota come in linea generale i valori di recupero percentuale siano leggermente più elevati rispetto al congelamento veloce; ciò è dovuto alla minore sensibilità dell'LDH alla denaturazione a freddo.

La misura del recupero è stata effettuata tramite l'uso di un apposito kit di misura dell'attività della L-lattato deidrogenasi: l'LDH riduce il NAD^+ in NADH e la formazione di NADH viene monitorata leggendo l'assorbanza a 450 nm.

Il valore di attività è stato poi rapportato a quello di riferimento, opportunamente misurato sulla proteina non processata.

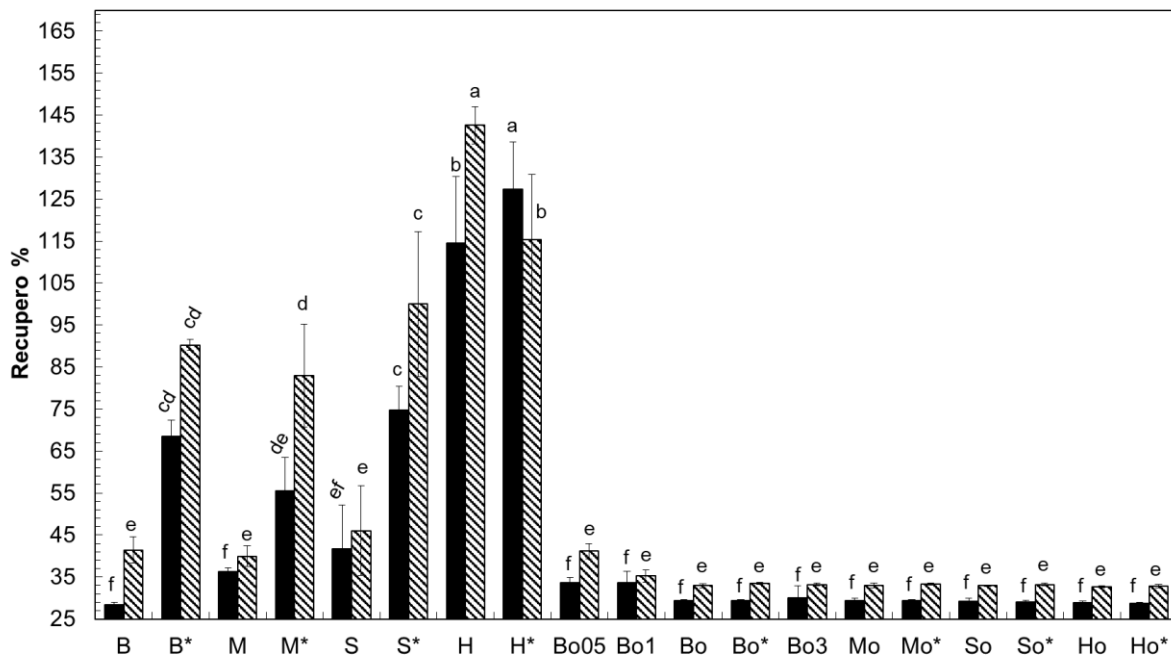


Figura 3.31 - Recupero proteico a valle di un ciclo di congelamento/scongelamento in azoto liquido e un ciclo di congelamento lento per le formulazioni contenenti L-lattato deidrogenasi. Le colonne nere rappresentano i valori di recupero a seguito dell'applicazione del protocollo di congelamento veloce, le colonne tratteggiate rappresentano i valori di recupero a seguito dell'applicazione del protocollo di congelamento lento. Colonne etichettate da lettere diverse rappresentano valori statisticamente differenti in base al Tukey test ($p < 0.05$).

3.2.2 Effetto dell'essiccamento

Sulle formulazioni contenenti mioglobina e quelle contenenti la L-lattato deidrogenasi è stato effettuato il medesimo protocollo di liofilizzazione, riportato in Tabella 2.5.

L'analisi per l'attività residua è stata realizzata, per ciascuna formulazione, in modo del tutto analogo a quanto già descritto per i cicli di congelamento.

Mioglobina

Il ciclo di liofilizzazione sui campioni contenenti mioglobina ha riportato i valori di recupero percentuale riportati nelle Figure 3.32-3.33.

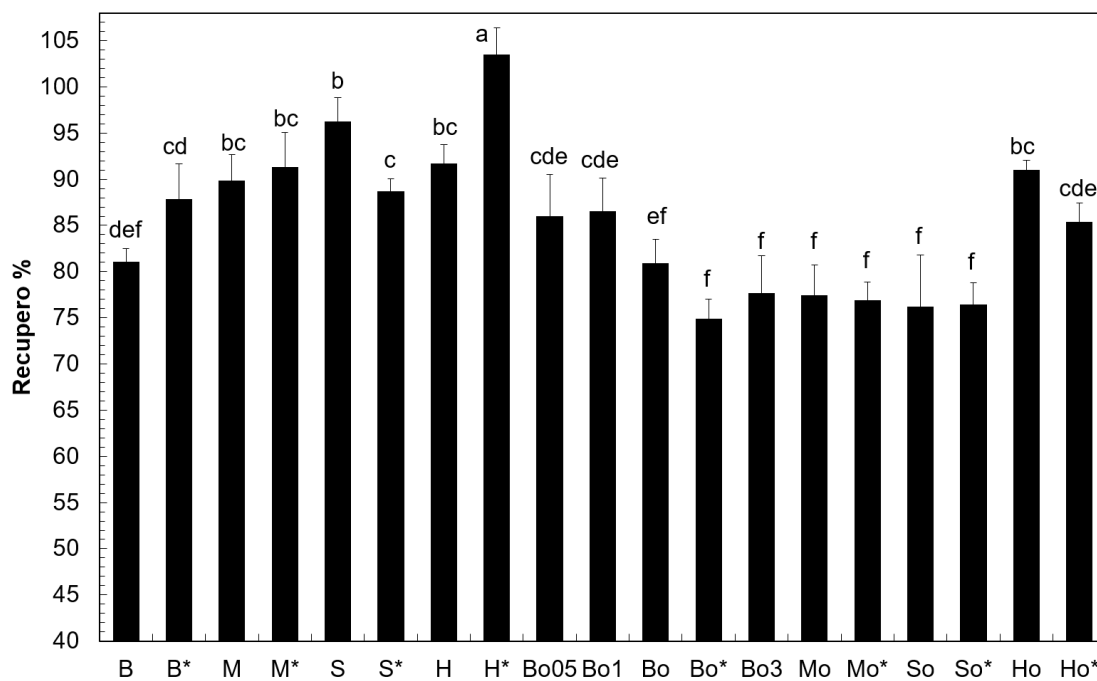


Figura 3.32 - Recupero proteico a valle del ciclo di liofilizzazione per le formulazioni contenenti mioglobina, misurato a 280 nm.

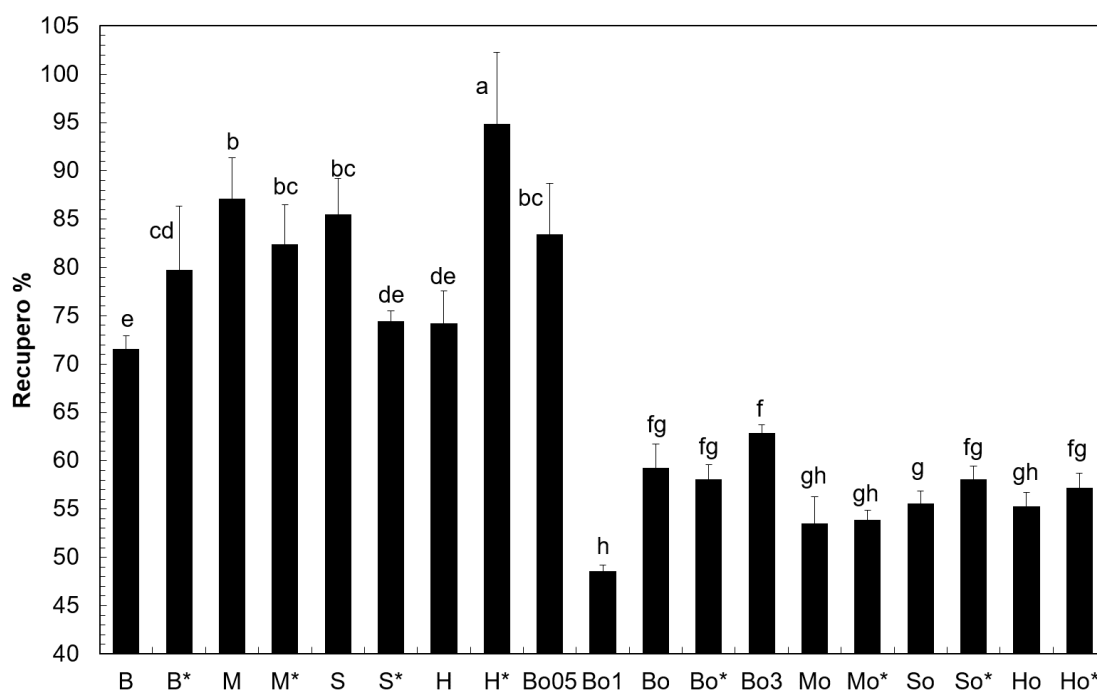


Figura 3.33 - Recupero proteico a valle del ciclo di liofilizzazione per le formulazioni contenenti mioglobina, misurato a 410 nm.

Sono inoltre riportati nel seguito i dati relativi al ciclo di liofilizzazione (Figura 3.34), e in particolare l'andamento della pressione nella camera, misurata sia tramite manometro Baratron che sonda Pirani. Si ricorda che la misura del sensore Baratron rappresenta un valore di pressione assoluta e indipendente dalla composizione dei gas in camera, mentre la sonda Pirani è calibrata per un'atmosfera composta al 100% di azoto; la sua lettura dipende dalla composizione dei gas in camera e durante l'essiccamento primario fornisce, perciò, un valore errato di pressione. L'uguaglianza dei valori misurati dalle due sonde indica il termine dell'essiccamento primario e l'inizio dell'essiccamento secondario.

Si osserva dal grafico che la durata dell'essiccamento primario risulta essere pari a circa 16 ore, in base all'andamento della pressione misurata dalla sonda Pirani. L'intero ciclo di liofilizzazione ha avuto una durata complessiva di circa 32 ore.

Il medesimo grafico riporta anche l'andamento della temperatura del ripiano (in verde).

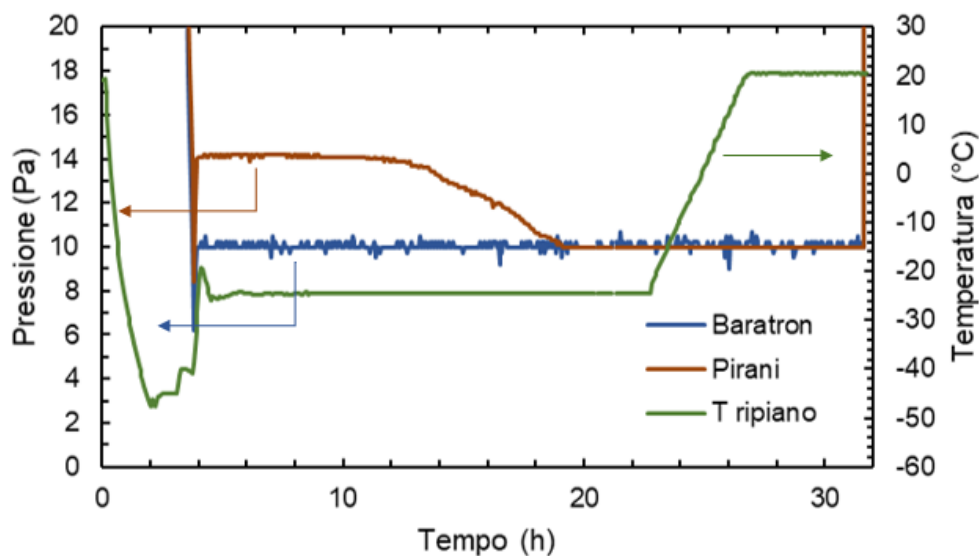


Figura 3.34 - Andamento della pressione misurata con il manometro Baratron e la sonda Pirani e della temperatura del ripiano durante il ciclo di liofilizzazione delle formulazioni contenenti mioglobina. Le frecce rappresentano l'asse di riferimento delle rispettive curve.

Sono inoltre state disposte, durante il ciclo di liofilizzazione svolto, sei termocoppie all'interno di flaconi contenenti, rispettivamente, le formulazioni S, M, H, So, Mo e Ho.

L'evoluzione della temperatura nei flaconi durante il ciclo di liofilizzazione è mostrata in Figura 3.35a, mentre in Figura 3.35b è mostrato un ingrandimento della fase di congelamento. Si nota come le temperature di nucleazione dei campioni contenenti TBA (la cui media è pari a -19.14°C) siano significativamente più basse rispetto ai campioni che non presentano TBA (la cui temperatura media di nucleazione è invece -8.3°C).

Una possibile spiegazione del fenomeno è legata al fatto che la temperatura di fusione dell'eutettico TBA-acqua, per concentrazioni di TBA pari al 20% in peso, è prossima ai -9°C (Figura 1.11) e che, quindi, la temperatura di congelamento all'equilibrio termodinamico si abbassa rispetto al sistema contenente esclusivamente acqua come solvente. Supponendo che il grado di sotto-raffreddamento rimanga costante, appare evidente che l'abbassamento della temperatura di equilibrio termodinamico provocherà anche un abbassamento della temperatura alla quale si formano i primi cristalli di ghiaccio. La differenza tra le temperature medie di nucleazione dei due gruppi di campioni risulta essere, infatti, di circa 10°C , in linea con il corrispondente abbassamento delle temperature di equilibrio di congelamento.

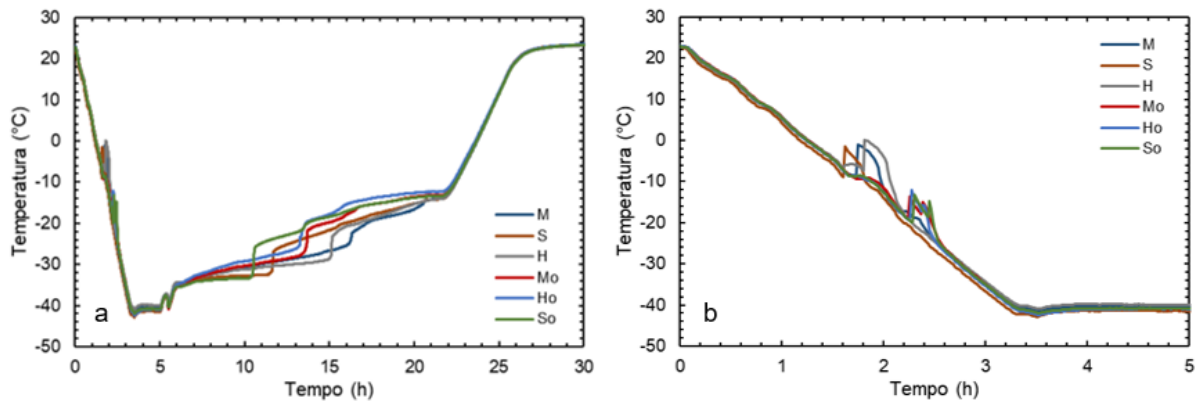


Figura 3.35 - Andamento delle temperature nei campioni M, S, H, Mo, Ho e So durante congelamento. In (a) è riportata la temperatura del prodotto durante l'intero ciclo di liofilizzazione; in (b) la temperatura durante congelamento.

Lattato deidrogenasi (LDH)

La Figura 3.36 riporta i valori di recupero dell'attività proteica delle formulazioni contenenti LDH a valle del ciclo di liofilizzazione.

La Figura 3.37 riporta l'andamento della pressione in camera misurata dal manometro Baratron e dalla sonda Pirani, e la temperatura del ripiano. Si osserva che la durata dell'essiccamento primario è stata di circa 15 ore, momento in cui si verifica l'uguaglianza delle due misure di pressione, mentre la durata complessiva del processo di liofilizzazione è stata di circa 45 ore.

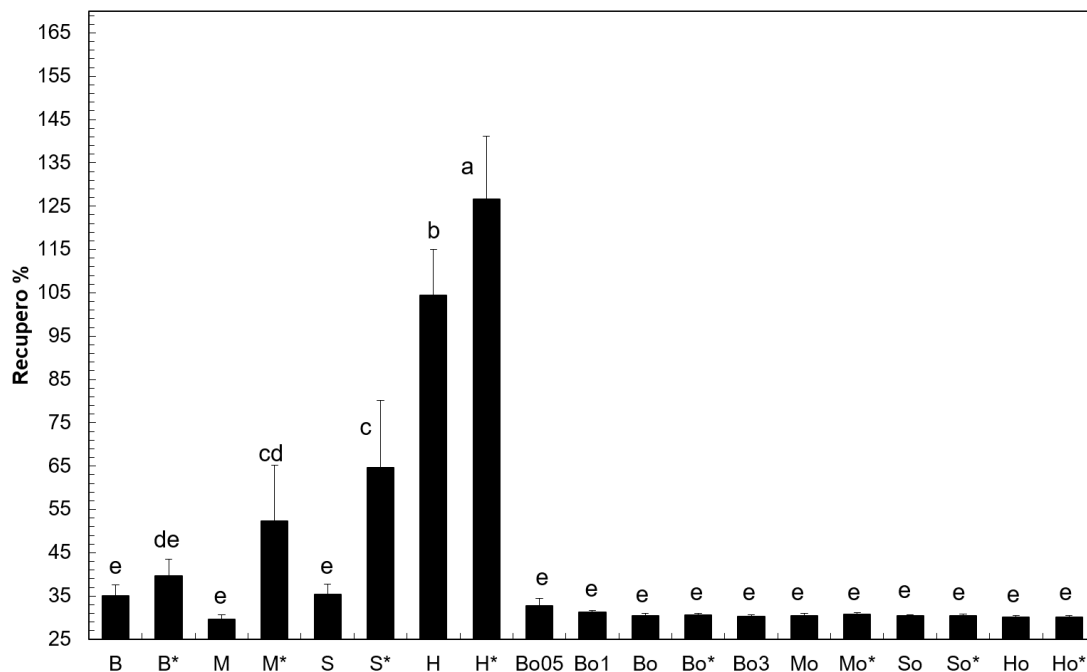


Figura 3.36 - Recupero dell'attività dell'LDH a valle del ciclo di liofilizzazione.

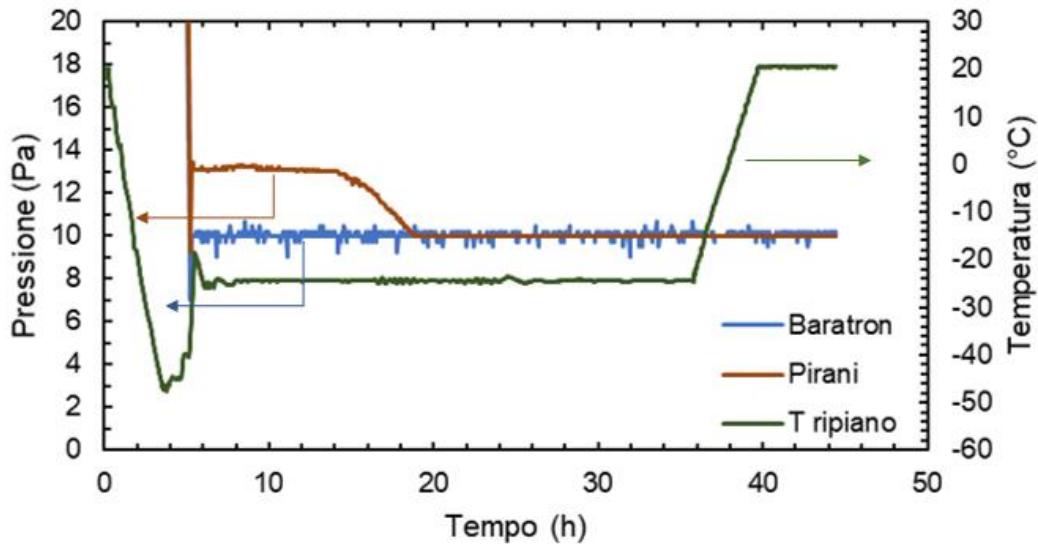


Figura 3.37 - Andamento della pressione misurata dal manometro Baratron e dalla sonda Pirani e della temperatura del ripiano durante il ciclo di liofilizzazione delle formulazioni contenenti LDH. Le frecce rappresentano l'asse di riferimento delle rispettive curve.

È infine riportato in Figura 3.38, in analogia a quanto fatto per i campioni contenenti mioglobina, l'andamento della temperatura nelle formulazioni M, S, H, Mo, So e Ho, come letta dalle termocoppie. L'evoluzione della temperatura nei flaconi durante il ciclo di liofilizzazione è mostrata in Figura 3.38a, mentre in Figura 3.38b è mostrato un ingrandimento della fase di congelamento. Anche in questo secondo caso, si nota come le temperature di nucleazione dei campioni contenenti TBA (la cui media è pari a -20.44°C) siano significativamente più basse rispetto ai campioni che non presentano TBA (la cui temperatura media di nucleazione è invece -8.02°C).

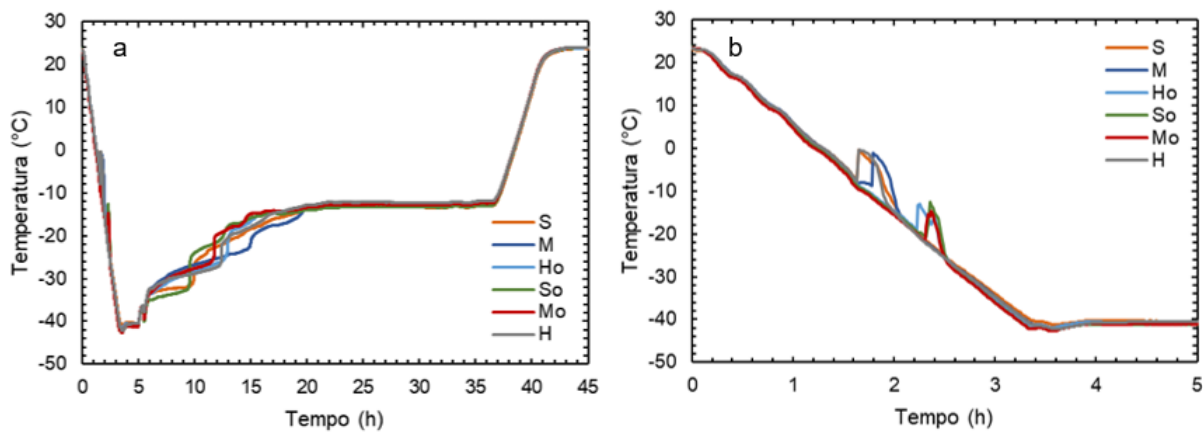


Figura 3.38 - Profili di temperatura delle formulazioni M, S, H, Mo, So e Ho durante congelamento. In (a) è riportata la temperatura del prodotto durante l'intero ciclo di liofilizzazione; in (b) la temperatura durante congelamento.

La Tabella 3.2 riassume i risultati relativi al recupero di attività proteica per le due proteine modello a valle dei cicli di congelamento e liofilizzazione.

Tabella 3.2 - Tabella riassuntiva riportante l'effetto crio e lioprotettivo di eccipienti, tensioattivo e TBA.

	Mioglobina	LDH
Congelamento veloce	$M^* \approx H^* > M > H > S > S^* > B > Bo05 > B^* > Bo3 > Bo^* \approx So^* > Ho^* > So \approx Ho > Mo^* \approx Mo > Bo > Bo1$	$H^* > H \gg S^* > B^* > M^* > S > M > Bo05 \approx Bo1 > Bo \approx Bo^* \approx Bo3 \approx Mo \approx Mo^* \approx So \approx So^* \approx Ho^* \approx Ho \approx B$
Congelamento lento	$M \approx H^* > H > S > M^* > B > Bo3 > S^* > B^* > Bo05 > So > So^* > Ho > Bo^* \approx Mo \approx Mo^* > Bo > Ho^* > Bo1$	$H \gg H^* > S^* > B^* > M^* > S > B \approx Bo05 > M > Bo1 > Bo \approx Bo^* \approx Bo3 \approx Mo \approx Mo^* \approx So \approx So^* \approx Ho \approx Ho^*$
Liofilizzazione	$H^* > M > S > Bo05 > M^* > B^* > S^* \approx H > B > Bo3 > Bo > Bo^* \approx So^* > Ho^* > So \approx Ho > Mo^* \approx Mo > Bo1$	$H^* \gg H > S^* > M^* > B^* > B > S > Bo05 > Bo1 > Bo \approx Bo^* \approx Bo3 \approx Mo \approx Mo^* \approx So \approx So^* \approx Ho \approx Ho^* \approx M$

3.2.3 Effetto degli eccipienti

Mioglobina

A valle dei cicli di congelamento in azoto liquido, dai diagrammi riportanti la percentuale di recupero a 280 nm, rappresentanti quindi l'entità del fenomeno di aggregazione, si osserva che i tre eccipienti considerati (mannitolo, saccarosio e ciclodestrina) migliorano il recupero rispetto alla formulazione contenente solo buffer; l'aggregazione, in particolare, sembra quasi annullarsi nella formulazione contenente ciclodestrina. Considerando invece le letture di assorbanza a 410 nm, spiccano per i loro elevati valori di recupero le formulazioni contenenti mannitolo e ciclodestrina, in particolare M* e H*, con valori anche superiori all'85%.

Per il congelamento lento, i valori di recupero riportati sono complessivamente più bassi, a causa della elevata sensibilità della mioglobina alla denaturazione a freddo. Anche in questo caso, dai diagrammi ottenuti a 280 nm si evidenzia come l'effetto degli eccipienti risulti benefico, aumentando il recupero del 10% rispetto al solo buffer, e, quindi, esplicando un effetto crioprotettore sulla proteina. Dalla misura a 410 nm spiccano nuovamente le formulazioni contenenti mannitolo e ciclodestrina, in particolare M e H*, il cui recupero appare dell'80% circa.

Nel caso del ciclo di liofilizzazione, spicca la formulazione H*, seguita da quelle contenenti mannitolo M e saccarosio S.

Lattato deidrogenasi (LDH)

Nel caso di congelamento veloce il recupero dell'attività proteica dell'LDH mostra un picco con le formulazioni contenenti ciclodestrina, in particolare con H*, contenente ciclodestrina e Tween 80. Gli altri eccipienti, mannitolo e saccarosio, inducono solo una lieve stabilizzazione rispetto al solo buffer.

Nel caso di congelamento lento le formulazioni migliori risultano essere ancora H e H*, in

particolare la prima delle due manifesta i valori di recupero più elevati. Mannitolo e saccarosio non sembrano apportare significative modifiche al comportamento osservato in solo buffer.

Nel caso del ciclo di liofilizzazione, le formulazioni contenenti ciclodestrina conservano valori molto elevati di recupero, in particolare con la formulazione H*; mannitolo e saccarosio non esercitano un effetto marcato, in quanto i loro valori di recupero sono statisticamente indistinguibili da quelli ottenuti in buffer.

3.2.4 Effetto tensioattivo

Mioglobina

L'effetto del tensioattivo nelle formulazioni contenenti mioglobina, nel complesso, risulta essere positivo. Osservando i valori di recupero di attività proteica per il congelamento veloce, il tensioattivo sembra migliorare il comportamento sia del mannitolo che della ciclodestrina.

Nei cicli di congelamento lento, il tensioattivo sembra, tuttavia, esercitare un effetto negativo sia per la formulazione contenente buffer che per quella contenente mannitolo e saccarosio. La combinazione tensioattivo/ciclodestrina risulta essere invece favorevole.

Durante il ciclo di liofilizzazione, l'aggiunta del tensioattivo appare estremamente efficace solo per la formulazione contenente ciclodestrina, per cui i valori di recupero appaiono essere i più alti.

Si nota che sia per i cicli di congelamento che per quelli di liofilizzazione, la presenza di tensioattivo nelle formulazioni contenenti il TBA risulta quasi ininfluenza e, quindi, poco utile nel ridurre l'effetto denaturante del co-solvente.

Lattato deidrogenasi (LDH)

L'effetto del tensioattivo nelle formulazioni contenenti la L-lattato deidrogenasi appare positivo nel caso di congelamento veloce, dove entra in gioco la formazione di elevati valori di area interfacciale. Il Tween 80 sembra migliorare i valori di recupero sia per la formulazione contenente solo buffer che per quelle contenenti gli eccipienti (M, S, H).

Nel caso di congelamento lento, l'effetto benefico del Tween 80 si riscontra ancora, specialmente nel caso delle formulazioni B, M ed S; tuttavia, il tensioattivo non esplica un effetto ugualmente benefico, in questo caso, per la formulazione contenente ciclodestrina.

Nel caso del ciclo di liofilizzazione, l'influenza del tensioattivo appare meno evidente rispetto ai due casi precedenti, seppur la sua aggiunta appaia comunque migliorativa per tutte le formulazioni.

Si nota come in tutti e tre i protocolli applicati, il Tween 80 non eserciti, neanche nel caso di questa seconda proteina modello, alcun effetto sulle formulazioni contenenti TBA, i cui valori di recupero restano mediamente bassi, attestandosi su un valore pari al 30% circa.

L'effetto del Tween 80 si spiega tenendo conto che l'azione protettiva esercitata dai tensioattivi è legata al fatto che essi si dispongono preferenzialmente alle interfacce, riducendo i fenomeni di adsorbimento ed aggregazione; ciò risulta particolarmente positivo per i protocolli di congelamento veloce, dove il fenomeno in gioco è proprio l'elevata estensione di superficie di interfaccia.

Precedenti studi (Arsiccio *et al.*, 2020) hanno dimostrato che il Tween 80 stabilizza all'interfaccia, ma esercita un effetto denaturante sulla mioglobina. Infatti, dai diagrammi in Figura 3.23 e 3.24 si osserva che la presenza del tensioattivo nella formulazione contenente

solo buffer è peggiorativa. La presenza di eccipienti, invece, probabilmente contrasta l'effetto denaturante che il Tween 80 esercita sulla mioglobina, portando ad un effetto complessivo benefico ai fini del recupero dell'attività proteica.

Per quanto riguarda il caso di studio dell'LDH, si può dedurre che la capacità del tensioattivo di disporsi all'interfaccia sia particolarmente positiva per la proteina, che è notevolmente sensibile a denaturazione interfacciale. Una possibile spiegazione del fatto che la combinazione Tween 80/ciclodestrina è estremamente positiva per l'LDH potrebbe essere legata al fatto che la ciclodestrina si comporti in maniera affine ad un tensioattivo, e che la combinazione dei due eccipienti eserciti, quindi, un effetto sinergico.

3.2.5 Effetto del TBA

Mioglobina

Sia nel caso di un protocollo di congelamento lento che veloce, risulta evidente che l'effetto del TBA sia controproducente ai fini del recupero dell'attività proteica; tutte le formulazioni contenenti TBA al 20% in peso manifestano un recupero notevolmente inferiore rispetto alla medesima formulazione senza TBA.

Per tutti i protocolli applicati si osserva che il recupero minimo, ovvero la situazione più sfavorevole, è rappresentata dalla formulazione Bo1, contenente il 10% in peso di TBA. Si osserva che il valore di recupero aumenta invece quando la percentuale di TBA scende al 5% w/w, o sale al 30% w/w.

Il TBA ha un forte effetto denaturante sulla mioglobina, in particolare per concentrazioni tra il 10 e il 20% in peso: si osserva come i valori derivati dalla misura a 410 nm siano molto più bassi rispetto a quelli relativi alla misura a 280 nm, e ciò è indice del marcato *unfolding* che subisce la proteina a causa di tale co-solvente.

La presenza di eccipienti o del tensioattivo, inoltre, appare chiaramente non sufficiente a contrastare l'effetto denaturante del TBA.

Lattato deidrogenasi (LDH)

La presenza del TBA appare estremamente deleteria in tutte le sue concentrazioni sia durante i protocolli di congelamento che durante liofilizzazione. L'effetto denaturante è molto marcato, portando a valori di recupero dell'attività proteica intorno al 30%, e quindi non accettabili. Come nel caso della mioglobina, la presenza di tensioattivo o di eccipienti non manifesta alcun effetto benefico in presenza di TBA.

Una possibile spiegazione per il comportamento denaturante del TBA si potrebbe ottenere supponendo che il co-solvente si disponga all'interfaccia tra proteina e soluzione. È noto che nella struttura nativa di una proteina, i residui idrofobici sono rivolti all'interno mentre quelli idrofili sono esposti sulla superficie. L'esposizione della proteina al TBA, di natura idrofobica, fa sì che sia promossa l'esposizione in superficie dei gruppi idrofobici, provocando, quindi, la denaturazione della proteina.

Inoltre, né il Tween 80, né gli altri eccipienti riescono ad arginare l'effetto denaturante del co-solvente: il loro effetto è pressoché nullo, probabilmente perché essi non riescono ad allontanare il TBA dall'interfaccia proteina – soluzione.

È interessante notare, tuttavia, che per la mioglobina, l'effetto deleterio sembra ridursi con concentrazioni superiori di TBA.

Capitolo 4 - Conclusioni

La liofilizzazione si è gradualmente affermata come metodo preferenziale per la stabilizzazione di preparati farmaceutici in soluzione acquosa. Tra i prodotti farmaceutici si distingue la classe dei biofarmaci, costituiti da molecole più complesse e contenenti uno o più principi attivi prodotti o estratti da un sistema biologico, la cui importanza nella medicina e nel mercato farmaceutico è in continua crescita. I farmaci a base di proteine, in particolare, manifestano una serie di vantaggi rispetto a quelli tradizionali, quali ad esempio l'elevata specificità, la bassa interferenza con i normali processi biologici e le ridotte reazioni avverse.

Sebbene la liofilizzazione sia il processo prevalente nella produzione di biofarmaci a base di proteine, è tuttavia noto che essa sottopone tali biomolecole a molteplici stress, sia nella fase di congelamento sia nell'essiccamento, provocandone denaturazione ed aggregazione. L'utilizzo di eccipienti è quindi pratica comune nell'industria farmaceutica per ridurre gli effetti deleteri della liofilizzazione. Una corretta formulazione deve prevedere sia lioprotettori che crioprotettori, per garantire un'adeguata protezione in entrambe le fasi del processo.

Recenti studi hanno rivelato casi in cui l'utilizzo di solventi organici come co-solventi, volutamente introdotti o presenti come residui di fasi di processo precedenti, possa offrire una serie di vantaggi rispetto alle soluzioni acquose classiche, quali una maggiore velocità di sublimazione ed un minor tempo di essiccamento, migliori caratteristiche di ricostituzione e un aumento della stabilità chimica della soluzione. L'uso di tali co-solventi organici, tuttavia, necessita di attente valutazioni in quanto può presentare problemi di tossicità, infiammabilità, gestione e costi. Attualmente il co-solvente più studiato e più utilizzato è il tert-butanolo (TBA), che possiede elevata pressione di vapore, congela completamente nella maggior parte dei liofilizzatori, sublima velocemente durante l'essiccamento primario, aumenta le velocità di sublimazione ed ha bassa tossicità.

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo quello di studiare sperimentalmente l'impatto del congelamento e della liofilizzazione su formulazioni proteiche preparate in miscela acqua/TBA, analizzandone l'attività biologica e quantificando l'effetto del co-solvente sul processo di aggregazione.

In particolare, si è studiato il comportamento di due proteine modello, la mioglobina (Mb) e la L- lattato deidrogenasi (LDH), dosate rispettivamente a 0.1 mg/ml in buffer citrato 10mM a pH 3.7 e 5 µg/ml in buffer citrato 10mM a pH 6.5. Le due proteine sono caratterizzate da un comportamento molto differente durante congelamento e liofilizzazione: la mioglobina, infatti, risulta estremamente sensibile a denaturazione a freddo, mentre l'LDH subisce principalmente denaturazione all'interfaccia. Si è cercato di valutare gli effetti del processo sulle due biomolecole, individuando le migliori condizioni operative ai fini del recupero di attività biologica residua. Le formulazioni considerate hanno previsto la presenza di tert-butanolo in concentrazione variabile dal 5% al 30% in peso. Ci si è focalizzati in modo particolare sulla concentrazione del 20% in peso, selezionata in quanto prossima all'eutettico TBA-acqua. È stato valutato, inoltre, l'effetto di altre variabili, come la presenza di differenti eccipienti quali mannitolo, saccarosio e idrossipropil-β-ciclodestrina (dosati al 5% in peso) e di un tensioattivo non-ionico, il Tween 80 (studiato allo 0.01% in peso).

Inizialmente lo studio sperimentale ha previsto prove di caratterizzazione termica tramite la calorimetria a scansione differenziale (DSC) e il criomicroscopio (FDM). Quel che è emerso è che il TBA abbassa la temperatura di transizione vetrosa degli eccipienti, in particolare se associato ad eccipienti amorfi, come nel caso di ciclodestrina e saccarosio. È stato inoltre

evidenziato che il TBA, sempre in associazione con gli eccipienti amorfi, ne abbassa le temperature di collasso. L'effetto del tensioattivo sulle transizioni termiche è risultato essere trascurabile. Si è inoltre ottenuta una panoramica del comportamento del tert-butanolo al variare della concentrazione all'interno della formulazione, confermando quanto già riportato in letteratura (Bhatnagar et al., 2020).

Le successive prove hanno previsto l'applicazione di protocolli di congelamento/scongelo, con lo scopo di valutare l'effetto della differente velocità di congelamento sul recupero dell'attività proteica. Cicli di congelamento veloce sono stati effettuati tramite immersione in azoto liquido e scongelamento in aria, mentre quelli di congelamento lento tramite una rampa controllata di 0.3 °C/min all'interno del liofilizzatore. Il ciclo è stato ripetuto tre volte per le formulazioni contenenti Mb, una singola volta per quelle contenenti LDH. La valutazione del recupero di attività biologica residua è stata effettuata attraverso misure spettrofotometriche, volte a determinare l'entità dell'aggregazione (per la mioglobina) o dell'attività enzimatica (per LDH). Si è osservato che, per le formulazioni contenenti Mb, i congelamenti lenti risultano essere più deleteri e che pertanto l'approccio migliore con tale proteina è quello di utilizzare protocolli che minimizzino i tempi di congelamento. Di contro, l'LDH ha riportato valori di recupero più elevati nel caso di congelamento lento, e si è, invece, denaturata quasi totalmente durante protocolli di congelamento rapidi.

È stato poi condotto un ciclo di liofilizzazione completo, con il fine di valutare l'effetto dell'essiccamento sulle formulazioni. Quel che si è osservato è che l'essiccamento non sembra abbassare ulteriormente i valori di recupero, facendo intendere che la fase più critica è proprio quella di congelamento. Inoltre, dai profili di temperatura riportati dalle termocoppie durante il ciclo di liofilizzazione, si è riscontrato come la presenza di TBA al 20% in peso abbassi significativamente la temperatura di nucleazione.

L'effetto degli eccipienti, nel complesso, è risultato essere benefico per entrambe le proteine: per la mioglobina, mannitolo e idrossipropil- β -ciclodestrina si sono rivelati essere gli eccipienti migliori, mentre l'idrossipropil- β -ciclodestrina è risultata essere particolarmente efficace nel proteggere l'LDH.

L'effetto del tensioattivo si è dimostrato, in linea generale, benefico e, soprattutto nel caso di protocolli di congelamento veloci, ha migliorato le prestazioni degli eccipienti per entrambe le proteine. La combinazione tensioattivo/ciclodestrina è risultata essere estremamente favorevole, in particolar modo per l'LDH.

L'effetto del TBA, invece, è risultato essere deleterio; infatti, per entrambe le proteine, le formulazioni che non presentavano TBA hanno manifestato valori di recupero nettamente superiori. Se per la mioglobina alcune concentrazioni di TBA (5% in peso o 30% in peso) hanno portato ad un effetto denaturante moderato, per l'LDH la presenza del TBA in qualsiasi concentrazione si è rivelata estremamente dannosa. Si è infine osservato che la presenza di eccipienti o del tensioattivo non sortisce alcun effetto benefico sul comportamento denaturante del co-solvente.

In definitiva, nel presente lavoro di tesi è emerso che, nonostante i possibili vantaggi che un co-solvente possa apportare al processo di liofilizzazione, la presenza del TBA abbassa di molto i valori di recupero dell'attività proteica e, a maggior ragione, il suo uso va attentamente valutato. Inoltre, di potenziale interesse si è rivelata essere l'idrossipropil- β -ciclodestrina, sia in presenza che in assenza di Tween80, la cui introduzione all'interno della formulazione ha migliorato il recupero dell'attività biologica per entrambe le proteine.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno avuto come scopo quello di offrire un contributo sullo studio dei co-solventi, volto ad arricchire il panorama delle conoscenze relative al

processo di liofilizzazione; nonostante da decenni sia pratica comune nell'industria farmaceutica, tale tecnologia di essiccamento presenta ancora alcune criticità, con margini quindi di miglioramento dell'efficienza del processo e della qualità del prodotto finale.

Studi futuri potrebbero concentrarsi sulla natura del comportamento denaturante del TBA, unendo lo studio sperimentale a simulazioni di dinamica molecolare, e, eventualmente, sull'identificazione di eccipienti capaci di mitigare i suoi effetti deleteri.

I risultati, inoltre, aprono interessanti prospettive sulle ciclodestrine, che sembrano premettere molteplici utilizzi come eccipienti per una vasta gamma di proteine di interesse commerciale e medico. Appare, perciò, sicuramente interessante approfondire lo studio dei meccanismi con cui esse proteggono le biomolecole e delle sinergie legate alla loro combinazione con i tensioattivi.

Lista dei simboli

b	Spessore della soluzione attraversato dalla radiazione
B	NADH (nmol) generato nell'intervallo di tempo
C	Concentrazione
ΔG	Variazione di energia libera di Gibbs
ε	Coefficiente di estinzione molare
K	Numero gruppi (Tukey test)
$M_i; M_j$	Medie dei gruppi comparati (Tukey test)
MS_{errore}	Scarto quadratico medio (Tukey test)
N	Numero totale elementi (Tukey test)
p	p-value
P	Pressione
PM	Peso molecolare
q	Student distribution
R	Numero totale medie (Tukey test)
S	Numero di osservazioni per gruppo (Tukey test)

T	Temperatura
T_{coll}	Temperatura di collasso
T_{cr}	Temperatura di cristallizzazione
T_{eu}	Temperatura eutettica
T_g'	Temperatura di transizione vetrosa
ν	Gradi di libertà (Tukey test)
V	Volume di campione nei pozzetti

Abbreviazioni

ANOVA	Analysis of Variance
c/C	Cooling
CD	Ciclostine
CMC	Concentrazione micellare critica
DMF	Dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FDM	Freeze-Drying Microscope
GDH	Glutammato deidrogenasi
h/H	Heating
HEC	Idrossietil cellulosa
HP β CD	2-idrossipropil- β -ciclostina
HSD	Honestly significant difference
LDH	L-lattato deidrogenasi
Mb	Mioglobina
PEG	Glicole polietilenico
PVP	Polivinilpirrolidone
SEM	Microscopio elettronico a scansione
TBA	Tert-butanolo

Elenco delle figure

Figura 1.1 - Schema di un tipico impianto industriale di liofilizzazione. Figura tratta da (Franks and Auffret, 2007) con modifiche.	3
Figura 1.2 - (a) Evoluzione tipica della pressione e temperatura dei ripiani e del prodotto durante un ciclo di liofilizzazione. Figura tratta da (Morais <i>et al.</i> , 2016) con modifiche. (b) Diagramma di fase dell'acqua su cui è evidenziato il processo di liofilizzazione nelle sue fasi. Figura tratta da (Schwarz <i>et al.</i> , 2020) con modifiche.	4
Figura 1.3 - Profilo termico tipico di un congelamento di una formulazione farmaceutica attraverso un raffreddamento controllato ad una velocità di 1°C/min. Figura tratta da (Kasper and Friess, 2011) con modifiche.	5
Figura 1.4 - Diagramma di stato acqua/soluto in cui sono evidenziate temperatura eutettica e di transizione vetrosa. Figura tratta da (Kasper and Friess, 2011) con modifiche.	7
Figura 1.5 - Rappresentazione di una fiala contenente una soluzione sottoposta ad essiccamento primario. È rappresentato lo strato essiccato, lo strato congelato, la fuoriuscita del vapore dal tappo e lo spostamento dell'interfaccia di sublimazione verso il basso. Figura tratta da (Ganesh <i>et al.</i> , 2019) con modifiche.	8
Figura 1.6 - (a) Grafico a torta riportante le percentuali delle varie forme di dosaggio con cui sono commercializzati i farmaci proteici. La forma liofilizzata risulta prevalente. Figura tratta da (Butreddy <i>et al.</i> , 2021) con modifiche. (b) Grafico a torta riportante la ripartizione delle principali classi funzionali di farmaci proteici sul totale di biofarmaci a base di proteine commercializzati in forma liofilizzata. Figura tratta da (Gervasi <i>et al.</i> , 2018) con modifiche.	11
Figura 1.7 - Vari percorsi di instabilità fisica e chimica a cui sono soggette le proteine. Figura tratta da (Butreddy <i>et al.</i> , 2021) con modifiche.	15
Figura 1.8 - Andamento dell'energia libera di Gibbs legata alla denaturazione, al variare di temperatura e pH. Figura tratta da (Bhatnagar <i>et al.</i> , 2007) con modifiche.	16
Figura 1.9 - Struttura delle ciclodestrine. (a) Figura tratta da (Nikitenko and Prassolov, 2013) con modifiche. (b) Struttura 3D delle ciclodestrine, in cui si evidenzia la forma a tronco di cono. Figura tratta da (Baykal <i>et al.</i> , 2019) con modifiche.	21
Figura 1.10 - Foto al SEM di una polvere sterile liofilizzata con una soluzione TBA/acqua al 20% v/v, in cui risulta evidente la struttura aghiforme. Foto tratta da (Teagarden and Baker, 2002) con modifiche.	24
Figura 1.11 - Diagramma di fase del sistema tert-butanolo/acqua. Figura tratta da (Kasraian and DeLuca, 1995) con modifiche.	24
Figura 1.12 - Analisi calorimetrica di sistemi TBA/acqua con diverse composizioni. Figura tratta da (Bhatnagar <i>et al.</i> , 2020) con modifiche.	25
Figura 2.1 - Rappresentazione della struttura proteica di (a) mioglobina, (b) L-lattato deidrogenasi.	27

Figura 2.2 - Convenzione ‘eso-endo’ per cui i picchi esotermici corrispondono a una variazione positiva rispetto alla linea di base e i picchi endotermici a una variazione negativa.	29
Figura 2.3 - A sinistra: foto della DSC Q200 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) presente nei laboratori del DISAT. A destra: fotografia della cella collocata al di sotto del coperchio dell’apparecchiatura in cui sono inseriti il riferimento e il campione da analizzare. Foto tratta da (Polipro) con modifiche.	30
Figura 2.4 - Esempi di immagini prodotte da un FDM, relative ad un campione contenente HP β CD e TBA. (A) Campione prima del collasso; il fronte di sublimazione risulta chiaramente visibile. (B) Lo stesso campione pochi minuti dopo, successivamente al collasso.	32
Figura 2.5 - Foto del criomicroscopio, presente nei laboratori del DISAT, utilizzato per le analisi; in figura sono indicati gli elementi che compongono lo strumento.	33
Figura 2.6 - Liofilizzatore Telstar Lyobeta 25 utilizzato per le prove sperimentali e presente nei laboratori del DISAT.	35
Figura 2.7 - Esempio di campioni contenenti mioglobina ed eccipienti dopo il ciclo di liofilizzazione (a) Campioni prima della ricostituzione, è possibile vedere chiaramente la ‘torta’ liofilizzata. (b) I medesimi campioni dopo essere stati ricostituiti con 1ml di acqua per preparati iniettabili. La completa dissoluzione della matrice porosa ha richiesto pochi secondi.	38
Figura 2.8 - Il gruppo eme è un complesso chimico appartenente alla famiglia delle porfirine e contenente un atomo di ferro. L'eme costituisce il gruppo prostetico, cioè la parte non proteica, di una serie di proteine tra cui l'emoglobina, la mioglobina e i citocromi.	39
Figura 2.9 - Piastra da 96 pozzetti utilizzata per l’analisi dell’attività dell’LDH, fotografata al termine della misurazione allo spettrofotometro. Il mix di reazione del kit utilizzato conferisce alle soluzioni analizzate un caratteristico colore arancione, che ha intensità tanto maggiore quanto più elevato è il contenuto di NADH convertito.	40
Figura 3.1 - Risultati delle analisi DSC per il campione H (5% w/w HP β CD, a pH 3.7). In alto è riportato il termogramma in fase di riscaldamento, contrassegnato con la lettera h (<i>heating</i>), sotto quello in fase di congelamento, contrassegnato dalla lettera c (<i>cooling</i>). Il cerchio giallo evidenzia la transizione vetrosa sul termogramma.	44
Figura 3.2 - Risultati delle analisi DSC per la formulazione H’ (5% w/w HP β CD, a pH 6.5). In alto è riportato il termogramma in fase di riscaldamento, contrassegnato con la lettera h (<i>heating</i>), sotto quello in fase di congelamento, contrassegnato dalla lettera c (<i>cooling</i>). Il cerchio giallo evidenzia la transizione vetrosa sul termogramma.	45
Figura 3.3 - Analisi DSC della soluzione S (saccarosio 5% w/w). Figura realizzata con i dati di (Marenco, 2019).	46
Figura 3.4 - Analisi DSC della soluzione M (mannitolo 5% w/w). In alto, è riportato il termogramma relativo alla fase di riscaldamento, indicato con la lettera h (<i>heating</i>), in basso quello relativo alla fase di congelamento, indicato con la lettera c (<i>cooling</i>). Figura realizzata con i dati di (Marenco, 2019).	47
Figura 3.5 - Termogramma della formulazione S* (5% w/w saccarosio, 0.01% w/v Tween 80). Figura ricavata dai dati di (Marenco, 2019).	48

Figura 3.6 - Termogramma della formulazione M* (5% w/w mannitolo, 0.01% w/v Tween 80) per la fase di riscaldamento (in alto) e di congelamento (in basso). Figura realizzata con i dati di (Marenco, 2019).	49
Figura 3.7 - Termogramma della formulazione H* (5% w/w HP β CD, 0.01% w/v Tween 80), nella fase di riscaldamento (in alto) e congelamento (in basso).	50
Figura 3.8 - Analisi DSC della formulazione Bo05 (5% w/w di TBA).	51
Figura 3.9 - Analisi DSC della formulazione Bo1 (10% w/w di TBA).	52
Figura 3.10 - Analisi DSC della formulazione Bo (20% w/w di TBA).	53
Figura 3.11 - Analisi DSC della formulazione Bo3 (30% w/w di TBA).	54
Figura 3.12 - Analisi DSC della formulazione Mo, per la fase di riscaldamento (h) e di congelamento (c).	56
Figura 3.13 - Analisi DSC della formulazione Mo successivamente all'applicazione di un <i>annealing</i> a -20°C, della durata di 5 minuti. La figura riprende la parte del termogramma relativa alla fase di riscaldamento finale.	57
Figura 3.14 - Analisi DSC della formulazione So.	58
Figura 3.15 - Analisi DSC della formulazione Ho.	59
Figura 3.16 - Analisi DSC della formulazione Bo*.	60
Figura 3.17 - Analisi DSC della formulazione Mo*.	61
Figura 3.18 - Analisi DSC della formulazione So*.	62
Figura 3.19 - Analisi DSC della formulazione Ho*.	63
Figura 3.20 - Immagini al criomicroscopio rappresentanti l'avanzamento del fronte di sublimazione di un campione di formulazione H, contenente il 5% in peso di ciclodestrina, a pH 3.7. La banda scura rappresenta la matrice essiccata, mentre la zona chiara rappresenta la goccia ancora congelata.	65
Figura 3.21 - Immagini al criomicroscopio della formulazione H', contenente il 5% in peso di ciclodestrina, a pH 6.5.	65
Figura 3.22 - Prova al FDM della formulazione H*, contenente ciclodestrina e Tween 80. ..	66
Figura 3.23 - Immagini al criomicroscopio della formulazione Mo, contenente 5% in peso di mannitolo e 20% in peso di TBA.	66
Figura 3.24 - Collasso della formulazione So, contenente il 5% di saccarosio e il 20% di TBA in peso.	67
Figura 3.25 - Andamento del fronte di sublimazione per la formulazione Ho, contenente il 5% di ciclodestrina e il 20% di TBA in peso.	67
Figura 3.26 - Prova al FDM della formulazione Mo*, contenente 5% w/w mannitolo, 20% w/w TBA, 0.01% w/v Tween80.	68
Figura 3.27 - Prova al FDM della formulazione So*, contenente 5% w/w saccarosio, 20% w/w TBA, 0.01% w/v Tween80.	69

Figura 3.28 - Prova al FDM della formulazione Ho*, contenente 5% w/w saccarosio, 20% w/w TBA, 0.01% w/v Tween80.	69
Figura 3.29 - Recupero proteico a valle di tre cicli di congelamento/scongelo in azoto liquido e tre cicli di congelamento lento per le formulazioni contenenti mioglobina, misurato a 280 nm. Le colonne nere rappresentano i valori di recupero a seguito dell'applicazione del protocollo di congelamento veloce, le colonne tratteggiate rappresentano i valori di recupero misurati in seguito al congelamento lento. Colonne etichettate da lettere diverse rappresentano valori statisticamente differenti in base al Tukey test ($p < 0.05$).	72
Figura 3.30 - Recupero proteico a valle di tre cicli di congelamento/scongelo in azoto liquido e tre cicli di congelamento lento per le formulazioni contenenti mioglobina, misurato a 410 nm. Le colonne nere rappresentano i valori di recupero a seguito dell'applicazione del protocollo di congelamento veloce, le colonne tratteggiate rappresentano i valori di recupero misurati in seguito al congelamento lento. Colonne etichettate da lettere diverse rappresentano valori statisticamente differenti in base al Tukey test ($p < 0.05$).	72
Figura 3.31 - Recupero proteico a valle di un ciclo di congelamento/scongelo in azoto liquido e un ciclo di congelamento lento per le formulazioni contenenti L-lattato deidrogenasi. Le colonne nere rappresentano i valori di recupero a seguito dell'applicazione del protocollo di congelamento veloce, le colonne tratteggiate rappresentano i valori di recupero a seguito dell'applicazione del protocollo di congelamento lento. Colonne etichettate da lettere diverse rappresentano valori statisticamente differenti in base al Tukey test ($p < 0.05$).	73
Figura 3.32 - Recupero proteico a valle del ciclo di liofilizzazione per le formulazioni contenenti mioglobina, misurato a 280 nm.	74
Figura 3.33 - Recupero proteico a valle del ciclo di liofilizzazione per le formulazioni contenenti mioglobina, misurato a 410 nm.	74
Figura 3.34 - Andamento della pressione misurata con il manometro Baratron e la sonda Pirani e della temperatura del ripiano durante il ciclo di liofilizzazione delle formulazioni contenenti mioglobina. Le frecce rappresentano l'asse di riferimento delle rispettive curve.	75
Figura 3.35 - Andamento delle temperature nei campioni M, S, H, Mo, Ho e So durante congelamento. In (a) è riportata la temperatura del prodotto durante l'intero ciclo di liofilizzazione; in (b) la temperatura durante congelamento.	76
Figura 3.36 - Recupero dell'attività dell'LDH a valle del ciclo di liofilizzazione.	76
Figura 3.37 - Andamento della pressione misurata dal manometro Baratron e dalla sonda Pirani e della temperatura del ripiano durante il ciclo di liofilizzazione delle formulazioni contenenti LDH. Le frecce rappresentano l'asse di riferimento delle rispettive curve.	77
Figura 3.38 - Profili di temperatura delle formulazioni M, S, H, Mo, So e Ho durante congelamento. In (a) è riportata la temperatura del prodotto durante l'intero ciclo di liofilizzazione; in (b) la temperatura durante congelamento.	77

Elenco delle tabelle

Tabella 2.1 - Formulazioni sottoposte ad analisi termica tramite DSC.....	28
Tabella 2.2 - Protocollo utilizzato per le analisi DSC	30
Tabella 2.3 - Protocollo utilizzato per le prove al FDM.....	32
Tabella 2.4 - Protocollo di un singolo ciclo di congelamento lento - scongelamento. Tale processo è stato ripetuto una (per LDH) o tre (per la mioglobina) volte prima dell'analisi di attività proteica.....	36
Tabella 2.5 - Protocollo seguito per i cicli di liofilizzazione dei campioni	37
Tabella 3.1 - Riassunto dei risultati ottenuti dall'analisi termica delle formulazioni, in termini di temperature di transizione vetrosa T_g' , temperatura di cristallizzazione T_{cr} , temperatura di fusione dell'eutettico T_{eu} e temperatura di collasso T_{coll} . La lettera C (<i>cooling</i>) accanto ad alcune formulazioni indica che il fenomeno è stato identificato nella fase di raffreddamento, la H (<i>heating</i>) nella fase di riscaldamento.....	70
Tabella 3.2 - Tabella riassuntiva riportante l'effetto crio e lioprotettivo di eccipienti, tensioattivo e TBA.....	78

Bibliografia

- Abdi, H. and Williams, L. (2010). Newman-Keuls Test and Tukey Test. In *Encyclopedia of Research Design*. <https://dx.doi.org/10.4135/9781412961288.n266>
- Aifa . Farmaci biologici. <https://www.aifa.gov.it/farmaci-biologici> (Accesso: 15 Ottobre 2021).
- Alfatest. L' Analisi termica differenziale (DTA) e la calorimetria differenziale a scansione (DSC). <https://www.alfatest.it/approfondimenti/l-analisi-termica-differenziale-dta-e-la-calorimetria-differenziale-scansionedsc> (Accesso: 14 Ottobre 2021).
- Arakawa, T., Prestrelski, S. J., Kenney, W. C., & Carpenter, J. F. (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1– 3), 307–326.
- Arsiccio, A., Paladini, A., Pattarino, F., & Pisano, R. (2019). Designing the optimal formulation for biopharmaceuticals: a new approach combining molecular dynamics and experiments. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(1), 431-438. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.09.002>
- Arsiccio, A., Giorsello, P., Marengo, L., & Pisano, R. (2020). Considerations on protein stability during freezing and its impact on the freeze drying cycle: a design space approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 464–475. doi: 10.1016/j.xphs.2019.10.022.
- Baykal, A., Bozkurt, A., Jeremy, R., Asiri, S. M. M., Lima-Tenório, M. K., Kaewsaneha, C., & Elaissari, A. (2019). Multistimuli-responsive magnetic assemblies. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Woodhead Publishing Series in Biomaterials*, 2, 155–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101995-5.00006-4>
- Bhatnagar, B. S., Bogner, R. H., & Pikal, M. J. (2007). Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology*, 12(5), 505–523. <https://doi.org/10.1080/10837450701481157>
- Bhatnagar, B. S., Sonje, J., Shalaev, E., Martin, S. W. H., Teagarden, D. L., & Suryanarayanan, R. (2020). A refined phase diagram of the tert -butanol–water system and implications on lyophilization process optimization of pharmaceuticals. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(3), 1583–1590. <https://doi.org/10.1039/C9CP06576H>
- BioPlan Associates (2019). FDA Biopharmaceutical Approvals: a record year for follow-on products, but is innovation lagging? <https://bioplanassociates.com/wp-content/uploads/2017/02/2019-FDA-Biopharmaceutical-Approvals-WP-22Jan2020.pdf> (Accesso: 15 Ottobre 2021).
- Butreddy, A., Janga, K. Y., Ajjarapu, S., Sarabu, S., & Dudhipala, N. (2021). Instability of therapeutic proteins - An overview of stresses, stabilization mechanisms and analytical techniques involved in lyophilized proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 309–325. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.11.188>
- Carpenter, J. F., Pikal, M. J., Chang, B. S., & Randolph, T. W. (1997). Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharmaceutical Research*, 14(8), 969–975. <https://doi.org/10.1023/A:1012180707283>
- Carter, P. J. (2011). Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. *Experimental Cell Research*, 317(9), 1261–1269.

<https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2011.02.013>

- Chang, L. (Lucy), Shepherd, D., Sun, J., Ouellette, D., Grant, K. L., Tang, X. (Charlie), & Pikal, M. J. (2005). Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(7), 1427–1444. <https://doi.org/10.1002/jps.20364>
- Chang, B. S., & Randall, C. S. (1992). Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology*, 29(5), 632–656. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90067-C](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90067-C)
- Cromwell, M.E.M.; Hilario, E.; Jacobson, F. (2006). Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS*, 8, E572–E579.
- Crowe, J. H. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 579–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.54.1.579>
- Crowe, L. M., Reid, D. S., & Crowe, J. H. (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal*, 71(4), 2087–2093. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)
- Doen, T., Patel, S., & Pikal, M. (2010). Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control. *AAPS PharmSciTech*, 11, 73–84. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9362-7>
- Duralliu, A., Matejtschuk, P., Stickings, P., Hassall, L., Tierney, R., & Williams, D. R. (2020). The influence of moisture content and temperature on the long-term storage stability of freeze-dried high concentration immunoglobulin G (IgG). *Pharmaceutics*, 12(4), 303. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040303>
- Franks, F., & Auffret, T. (2007). Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals. In *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*. <https://doi.org/10.1039/9781847557704>
- Ganesh, S., Murugan, M., & Balakrishnan, R. (2019). Numerical investigation of heat and mass transfer behavior of freeze drying of milk. *Heat and Mass Transfer*, 55, 2073–2081. <https://doi.org/10.1007/s00231-018-02538-1>
- Gervasi, V., Dall Agnol, R., Cullen, S., McCoy, T., Vucen, S., & Crean, A. (2018). Parenteral protein formulations: an overview of approved products within the European Union. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 131, 8–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.011>
- GMSL. Analisi della varianza (Test ANOVA). <https://www.gmsl.it/wp-content/uploads/2017/05/Articolo-ANOVA-Full-version-1.pdf> (Accesso: 15 Ottobre 2021).
- Goswami, S., Wang, W., Arakawa, T., & Ohtake, S. (2013). Developments and challenges for mAb-based therapeutics. *Antibodies*, 2(3), 452–500. <https://doi.org/10.3390/antib2030452>
- Heller, M. C., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W. (1997). Manipulation of lyophilization-induced phase separation: implications for pharmaceutical proteins. *Biotechnology Progress*, 13(5), 590–596. <https://doi.org/10.1021/bp970081b>
- Izutsu, K. & Kojima, S. (2000). Freeze-concentration separates proteins and polymer excipients into different amorphous phases. *Pharm. Res.*, 17, 1316–1322.

<https://doi.org/10.1023/a:1026412107574>.

- Kasper, J. C., & Friess, W. (2011). The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 248–263. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2011.03.010>
- Kasper, J. C., Winter, G., & Friess, W. (2013). Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2013.05.019>
- Kasraian, K., & DeLuca, P. P. (1995). Thermal analysis of the tertiary butyl alcohol-water system and its implications on freeze-drying. *Pharmaceutical Research*, 12(4), 484–490. <https://doi.org/10.1023/A:1016233408831>
- Kasraian, K., Spitznagel, T. M., Juneau, J. A., & Yim, K. (1998). Characterization of the sucrose/glycine/water system by differential scanning calorimetry and freeze-drying microscopy. *Pharmaceutical Development and Technology*, 3(2), 233–239. <https://doi.org/10.3109/10837459809028500>
- Khairnar, S., Kini, R., Harwalkar, M., Salunkhe, K., & Chaudhari, S. (2012). A review on Freeze Drying Process of Pharmaceuticals. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, 4(1), 76 - 94.
- Kim, A. I., Akers, M. J., & Nail, S. L. (1998). The physical state of mannitol after freeze-drying: effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(8), 931–935. <https://doi.org/10.1021/js980001d>
- Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(1), 21–39. <https://doi.org/10.1038/nrd2399>
- Liu, B., & Zhou, X. (2015). Freeze-drying of proteins. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1257, 459–476. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_23
- Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W., & Katayama, D. S. (2010). Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharmaceutical Research*, 27(4), 544–575. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6>
- Marenco, L. (2019). *Applicazione del Quality by Design alla liofilizzazione di biofarmaci*. Tesi di Laurea Magistrale. Politecnico di Torino. Dicembre 2019
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2017). How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114, 288–295. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2017.01.024>
- Meredith, P., Donald, A. M., & Payne, R. S. (1996). Freeze-drying: in situ observations using Cryoenvironmental Scanning Electron Microscopy and Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(6), 631–637. <https://doi.org/10.1021/js950324z>
- Minitab. What is ANOVA? <https://support.minitab.com/en-us/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/what-is-anova/> (Accesso: 15 Ottobre 2021).
- Morais, A. R. D. V., Alencar, É. D. N., Xavier Júnior, F. H., Oliveira, C. M. De, Marcelino, H.

- R., Barratt, G., Fessi, H., Egito, E. S. T. Do, & Elaissari, A. (2016). Freeze-drying of emulsified systems: a review. *International Journal of Pharmaceutics*, *503*(1–2), 102–114. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2016.02.047>
- Nikitenko, N., & Prassolov, V. (2013). Non-viral delivery and therapeutic application of small interfering RNAs. *Acta Naturae*, *5*, 35–53. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-3-35-53>
- Otzen, D. E., Knudsen, B. R., Aachmann, F., Larsen, K. L., & Wimmer, R. (2002). Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation. *Protein Science*, *11*(7), 1779–1787. <https://doi.org/https://doi.org/10.1110/ps.0202702>
- Parmar, V., Patel, G., & Abu-Thabit, N. Y. (2018). 20 - Responsive cyclodextrins as polymeric carriers for drug delivery applications. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 1*, 555–580. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00024-2>
- Pikal, M. (2004). Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics. *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, *96*, 161–198. <https://doi.org/10.1201/9780203021323.ch3>
- Pikal, M. J., Shah, S., Roy, M. L., & Putman, R. (1990). The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *International Journal of Pharmaceutics*, *60*(3), 203–207. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90074-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90074-E)
- Pikal, Michael J., & Shah, S. (1990). The collapse temperature in freeze drying: dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *International Journal of Pharmaceutics*, *62*(2–3), 165–186. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90231-R](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90231-R)
- Pisano, R., & Arsicchio, A. (2019). Formulation design and optimization using molecular dynamics. In *Freeze Drying of Pharmaceutical Products*. <https://doi.org/10.1201/9780429022074-2>
- Polipro. Differential Scanning Calorimetry (DSC). <https://www.polipro.com.tr/laboratuvar/diferansiyel-taramali-kalorimetre-dsc-testi/?lang=en> (Accesso: 20 Ottobre 2021).
- Schwarz, A., Bluhm, J., & Schröder, J. (2020). Modeling of freezing processes of ice floes within the framework of the TPM. *Acta Mechanica*, *231*, 3099–312. <https://doi.org/10.1007/s00707-020-02686-8>
- Skrabanja, A. T. P., De Meere, A. L. J., De Ruiten, R. A., & Van Den Oetelaar, P. J. M. (1994). Lyophilization of biotechnology products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, *48*(6), 311 – 317. <http://journal.pda.org/content/48/6/311>
- Sonje, J., Thakral, S., & Suryanarayanan, R. (2020). t-Butanol enables dual functionality of mannitol: a cryoprotectant in frozen systems and bulking agent in freeze-dried formulations. *Molecular Pharmaceutics*, *17*(8), 3075–3086. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00492>
- Tang, X. & Pikal, M. J. (2005). The effect of stabilizers and denaturants on the cold denaturation temperatures of proteins and implications for freeze-drying. *Pharmaceutical Research*, *22*, 1167–1175.
- Tang, X. & Pikal, M. J. (2004). Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals:

- practical advice. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 191–200.
<https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016234.73023.75>
- Teagarden, D. L., & Baker, D. S. (2002). Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2), 115-133.
[https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00221-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00221-4)
- Tokihiro, K., Irie, T., & Uekama, K. (1997). Varying effects of cyclodextrin derivatives on aggregation and thermal behavior of insulin in aqueous solution. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(3), 525–531. <https://doi.org/10.1248/cpb.45.525>
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1–2), 1-60.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00423-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00423-3)
- Wang, W., & Roberts, C. J. (2018). Protein aggregation – Mechanisms, detection, and control. *International Journal of Pharmaceutics*, 550(1–2), 251–268.
<https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2018.08.043>

Ringraziamenti

Dicono che dopo la laurea triennale la strada sia in discesa, come se bastasse seguire una linea tratteggiata. Se devo dire la mia, però, questo percorso tutto è stato tranne che facile, anzi. Ho dovuto affrontare, anche al di là dell'università, una serie di problematiche che non mi sarei mai aspettata di trovare davanti. Ma in fondo è andata bene così, mi piace pensare che sia stata proprio la risoluzione di tali problemi ad avermi reso una persona migliore.

Grazie al mio relatore, il Prof. Roberto Pisano, che ha permesso di dedicarmi ad un argomento così interessante e affine ai miei interessi.

Grazie ad Andrea Arsiccio, il mio co-relatore. La sua immensa pazienza e disponibilità è quello di cui l'università ha bisogno e io non avrei potuto essere più fortunata.

Alla mia famiglia, che ha fatto sì che ciò fosse possibile e che, nonostante le distanze e le differenze, ha sempre capito.

Agli amici di sempre, che non mi hanno mai lasciato indietro.

Agli amici nuovi, persone speciali conosciute durante questo percorso, che saranno sempre parte di me.

Buona vita a tutti.