

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

**Caratterizzazione termica e citotossicità di
eccipienti per liofilizzazione e applicazioni
in vitro**



Relatori

Prof. Pisano Roberto
Prof. Limongi Tania
Dott. Susa Francesca

Candidato

Millone Michela

Marzo 2022

Indice

CAPITOLO 1	1
INTRODUZIONE	1
1.1 Liofilizzazione.....	1
1.1.1 Descrizione del processo.....	2
1.1.2 Vantaggi e svantaggi.....	6
1.2 Eccipienti.....	6
1.2.1 Classi di eccipienti	8
1.2.2 Meccanismi di protezione.....	9
1.3 Applicazione della liofilizzazione in ambito biomedicale e farmaceutico	11
1.3.1 Liofilizzazione di liposomi.....	11
1.3.2 Liofilizzazione di vescicole extracellulari (EVs).....	13
1.3.3 Liofilizzazione di farmaci, proteine, anticorpi monoclonali e policlonali	15
1.3.4 Liofilizzazione di vaccini.....	17
1.4 Scopo della tesi.....	19
CAPITOLO 2	21
MATERIALI E METODI.....	21
2.1 Materiali utilizzati e preparazione delle soluzioni.....	21
2.2 Caratterizzazione termica	22
2.2.1 Calorimetria differenziale a scansione	22
2.2.2 Crio-microscopio	24
2.3 Impianto di liofilizzazione	25
2.4 Liofilizzazione delle soluzioni campione.....	26
2.5 Titolazione di Karl Fischer	27
2.6 Colture cellulari	29
2.6.1 Citotossicità.....	30
CAPITOLO 3	31
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	31
3.1 Analisi termica	31
3.2 Liofilizzazione: temperature rilevate alle termocoppie	36
3.3 Analisi qualitativa della struttura essiccata.....	37
3.4 Valutazione dell'umidità residua	40
3.5 Risultati analisi di citotossicità	40
CAPITOLO 4	45
CONCLUSIONI.....	45

BIBLIOGRAFIA.....	47
Appendice.....	53
Ringraziamenti	67

Elenco delle figure

Figura 1.1: Rappresentazione schematica del processo di freeze-drying: con T è indicata la temperatura di trattamento mentre P indica la pressione in camera. All'interno del contenitore è rappresentato con colori diversi lo stato del prodotto: da sinistra la soluzione completamente allo stato liquido (nero), la soluzione contenente il solvente completamente congelato (grigio scuro), la parte superiore del flacone essiccato (grigio chiaro) e la parte inferiore contenente ancora una parte di solvente congelato ed infine sulla destra il prodotto quasi completamente essiccato con una concentrazione residua di solvente inferiore al 2%.

Figura 1.2: Profilo termico di una soluzione durante la fase di congelamento. Il tratto 1-2 rappresenta il raffreddamento spinto del campione, da 2 a 3 vi è la nucleazione durante la quale, nel solvente, iniziano a formarsi i primi nuclei stabili. Il tratto 3-4 rappresenta la fase di accrescimento dei nuclei e formazione dei cristalli di ghiaccio (processo esotermico) ed infine, oltre il punto 4, la struttura è completamente ghiacciata.

Figura 1.3: Rappresentazione schematica del processo di spray freeze-drying [modificata da (Sahoo et al., 2016)].

Figura 1.4: Rappresentazione di un flacone su di un ripiano riscaldato all'interno del liofilizzatore. Nello specifico è rappresentata la fase di essiccamento primario dove nella parte sottostante del flacone vi è ancora uno strato congelato mentre a mano a mano la parte superiore passa in forma essiccata. I cerchietti verdi rappresentano il vapore acqueo che si produce e che raggiunge il condensatore. I flussi J_q e J_w rappresentano rispettivamente il flusso di calore dal ripiano al flacone e il flusso di materia del vapore che si allontana dallo strato essiccato.

Figura 1.5: Rappresentazione grafica del processo di essiccamento classico (tratto rosso), essiccamento sotto vuoto (tratto blu) e liofilizzazione (tratto verde).

Figura 1.6: Rappresentazione del processo di “water replacement”: la parte superiore dello schema rappresenta un meccanismo in cui non vi è l'aggiunta di alcun eccipiente in grado di sostituire l'acqua a seguito del processo di disidratazione mentre, nella parte inferiore, è riportato il caso in cui vi è l'aggiunta del trealosio alla soluzione. Come si evince dall'immagine l'aggiunta dello zucchero migliora la struttura finale del prodotto di interesse mantenendola invariata a seguito della reidratazione [modificata da (Crowe et al., 1985)].

Figura 1.7: Rappresentazione della struttura di un liposoma [modificata da (Baumber, 2020)].

Figura 1.8: Rappresentazione schematica dell'interazione liposoma-cellula bersaglio [modificata da (Bozzuto e Molinari, 2015)].

Figura 1.9: Rappresentazione grafica della differente secrezione di esosomi e microvescicole: i primi generati all'interno della cellula e le seconde dall'estruzione della membrana cellulare. Sono inoltre rappresentati i corpi apoptotici originati da un processo di apoptosi (Bianciardi et al., 2021).

Figura 1.10: Rappresentazione del processo di produzione di compresse tramite liofilizzazione. La componente attiva del farmaco (rappresentata dai cerchi azzurri) e gli eccipienti (rappresentati dai triangoli verdi) vengono miscelati in soluzione acquosa; a

seguire, avviene il dosaggio e la liofilizzazione con l'ottenimento delle compresse di interesse come prodotto finale.

Figura 1.11: Immagini ottenute al SEM: formulazione trealosio- β CD rapporto massico β CD:IgG 1:2,5 (a, b), formulazione trealosio-HP β CD rapporto massico HP β CD:IgG 1:5 (c,d), formulazione trealosio-HP β CD rapporto massico HP β CD:IgG 1:2,5 (e,f) (Pouya et al., 2018).

Figura 2.1: Camera di alloggiamento dei due padellini in alluminio (camera aperta per l'inserimento del campione da analizzare).

Figura 2.2: Strumenti utilizzati per l'analisi DSC: in particolare, nel riquadro in rosso è evidenziata la camera chiusa e, nel dettaglio circondato in azzurro, il punto di caricamento del campione (particolare interno in Figura 2.1).

Figura 2.3: Strumento FDM con camera chiusa, lente posta sul vetrino in modo da permettere la visione dell'immagine della goccia tramite software Lynksys32 su pc e cannula per evitare la formazione della condensa (A). Particolare a camera aperta del sito di alloggiamento del vetrino su cui viene posizionata la goccia da trattare (B).

Figura 2.4: Schema di impianto Revo [modificato da fonte ufficiale Millrock technology].

Figura 2.5: Particolare della disposizione dei flaconi prima di essere caricati nel liofilizzatore in cui è possibile notare il tappo semi-chiuso (A) e vassoio caricato nella camera del liofilizzatore (B).

Figura 2.6: Rappresentazione di Karl Fischer titrator (CA-31 Moisture Meter, Mitsubishi Chemical Analytech).

Figura 3.1: Soluzione contenente cellobiosio a concentrazione 100 mg/ml: sulla destra il valore di T_g rilevato con la DSC.

Figura 3.2: Andamenti del fronte della goccia in condizioni di pressione di circa 10 Pa. Le immagini A-B e C fanno riferimento alla soluzione 100 mg/ml, le immagini D-E ed F si riferiscono alla soluzione 10 mg/ml mentre G-H e I a quella avente una concentrazione di 1 mg/ml.

Figura 3.3: Flacone contenente destrano a concentrazione 100 mg/ml.

Figura 3.4: Flacone contenente (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina a concentrazione 100 mg/ml.

Figura 3.5: Flacone contenente trealosio a concentrazione 1 mg/ml.

Figura 3.6: Flacone contenente isoleucina a concentrazione 10 mg/ml.

Figura 3.7: Flacone contenente glicina a concentrazione 1 mg/ml (A) e mannitolo a concentrazione 1 mg/ml (B).

Figura 3.8: Flacone contenente PEG a concentrazione 100 mg/ml.

Figura 3.9: Il grafico rappresenta la vitalità dei linfociti dopo 24 ore di trattamento con i diversi eccipienti. Il grigio chiaro corrisponde a 1 mg/ml, il grigio scuro a 10 mg/ml e il nero a

100 mg/ml. I dati sono visualizzati come media \pm errore standard. ** per $P \leq 0,001$ e * per $P \leq 0,05$.

Figura 3.10: Il grafico rappresenta la vitalità di Daudi dopo 24 ore di trattamento con i diversi eccipienti. Il grigio chiaro è 1 mg/ml, il grigio scuro è 10 mg/ml e il nero è 100 mg/ml. I dati sono visualizzati come media \pm errore standard. ** per $P \leq 0,001$ e * per $P \leq 0,05$.

Figura 3.11: Il grafico rappresenta la vitalità dei linfociti dopo 48 ore di trattamento con i diversi eccipienti. Il grigio chiaro corrisponde a 1 mg/ml, il grigio scuro a 10 mg/ml e il nero a 100 mg/ml. I dati sono visualizzati come media \pm errore standard. ** per $P \leq 0,001$ e * per $P \leq 0,05$.

Figura 3.12: Il grafico rappresenta la vitalità di Daudi dopo 48 ore di trattamento con i diversi eccipienti. Il grigio chiaro è 1 mg/ml, il grigio scuro è 10 mg/ml e il nero è 100 mg/ml. I dati sono visualizzati come media \pm errore standard. ** per $P \leq 0,001$ e * per $P \leq 0,05$.

Figura A1: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di cellobiosio con concentrazioni 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A2: Valore di eutettico relativo alla soluzione a base di isoleucina con concentrazione 10 mg/ml.

Figura A3: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti isoleucina aventi concentrazione pari a 10 mg/ml (A, B e C) e 1 mg/ml (D, E ed F).

Figura A4: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di lattosio con concentrazioni 100-10 e 1 mg/ml (rispettivamente A, B e C).

Figura A5: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti lattosio aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D, E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

Figura A6: Valore di eutettico e di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di metionina con concentrazioni 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A7: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti metionina aventi concentrazione pari a 10 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (D, E ed F).

Figura A8: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di saccarosio con concentrazioni 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A9: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti saccarosio aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D, E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

Figura A10: Valore di transizione vetrosa ed eutettico rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di glicina con concentrazioni 100-10 e 1 mg/ml (rispettivamente A, B e C).

Figura A11: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti glicina aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D, E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

Figura A12: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di trealosio con concentrazioni 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A13: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti trealosio aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D, E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

Figura A14: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di destrano con concentrazioni 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A15: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti destrano aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D, E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

Figura A16: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina con concentrazioni 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A17: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D, E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

Figura A18: Valore di transizione vetrosa ed eutettico rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base mannitolo con concentrazioni 100 mg/ml (A e B) e 10 mg/ml (C, D ed E).

Figura A19: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti mannitolo aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D, E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

Figura A20: Flacone contenente (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina a concentrazione 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A21: Flacone contenente lattosio a concentrazione 100–10 e 1 mg/ml (rispettivamente A, B e C).

Figura A22: Flacone contenente saccarosio a concentrazione 100-10 e 1 mg/ml (rispettivamente A, B e C).

Figura A23: Flacone contenente trealosio a concentrazione 100 mg/ml.

Figura A24: Flacone contenente trealosio a concentrazione 10 mg/ml.

Figura A25: Flacone contenente cellobiosio a concentrazione 100 mg/ml.

Figura A26: Flacone contenente cellobiosio a concentrazione 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A27: Flacone contenente metionina concentrazione 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A28: Flacone contenente destrano a concentrazione 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A29: Flacone contenente glicina a concentrazione 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

Figura A30: Flacone contenente isoleucina a concentrazione 1 mg/ml.

Figura A31: Flacone contenente mannitolo a concentrazione 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

Elenco delle tabelle

Tabella 1.1: Tabella rappresentativa dei principali stress provocati dal congelamento [(Hansen et al., 2015) con modifiche].

Tabella 2.1: Elenco dei soluti utilizzati con le rispettive concentrazioni massime.

Tabella 2.2: Valori tratti da fonte ufficiale Millrock technology.

Tabella 3.1: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti cellobiosio.

Tabella 3.2: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti isoleucina.

Tabella 3.3: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti lattosio.

Tabella 3.4: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti metionina.

Tabella 3.5: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti saccarosio.

Tabella 3.6: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti mannitolo.

Tabella 3.7: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti glicina

Tabella 3.8: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti trealosio.

Tabella 3.9: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti destrano.

Tabella 3.10: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina.

Tabella 3.11: Valori rilevati attraverso le termocoppie durante il processo di liofilizzazione.

Tabella 3.12: Valori di umidità residua % delle soluzioni a massima concentrazione di soluto.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Liofilizzazione

La liofilizzazione, nota anche con il termine di crioessiccamento, è un processo di essiccamento che prevede la rimozione dell'acqua dal campione da trattare tramite sublimazione e la conservazione del prodotto di interesse sotto forma di polveri disidratate mantenendone il più inalterate possibili struttura e proprietà e consentendone un trasporto e una conservazione più agevole ed economica.

La liofilizzazione (in inglese freeze-drying), prevede tre fasi: congelamento del campione, essiccamento primario ed essiccamento secondario riportate in Figura 1.1.

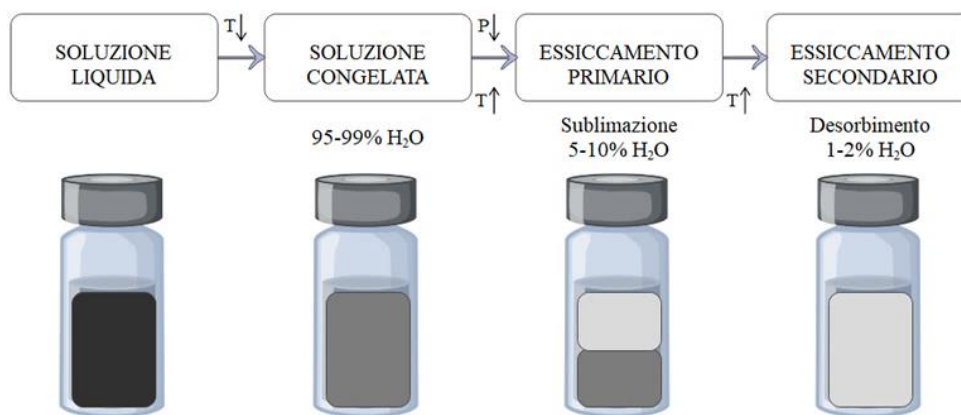


Figura 1.1: Rappresentazione schematica del processo di freeze-drying: con T è indicata la temperatura di trattamento mentre P indica la pressione in camera. All'interno del contenitore è rappresentato con colori diversi lo stato del prodotto: da sinistra la soluzione completamente allo stato liquido (nero), la soluzione contenente il solvente completamente congelato (grigio scuro), la parte superiore del flacone essiccato (grigio chiaro) e la parte inferiore contenente ancora una parte di solvente congelato ed infine sulla destra il prodotto quasi completamente essiccato con una concentrazione residua di solvente inferiore al 2%.

La liofilizzazione, nata nel 1906 in Francia grazie ai ricercatori Arsène d'Arsonval e Frederic Bordas, i quali la sperimentarono per la prima volta nella conservazione di sieri e vaccini, è applicata in numerosi processi che spaziano dal settore farmaceutico a quello alimentare.

Le prime applicazioni industriali della liofilizzazione risalgono agli anni della seconda guerra mondiale, quando Flosdorf negli Stati Uniti d'America e Greaves in Inghilterra la usarono per la conservazione del plasma mentre Sir Ernst Boris Chain la usò per la preparazione di antibiotici dopo la scoperta della penicillina (Rey, 2010).

1.1.1 Descrizione del processo

Il congelamento rappresenta la prima fase del processo di liofilizzazione e prevede il raffreddamento del campione da temperatura ambiente fino a -30/-50 °C, in modo da separare la fase acquosa dal soluto mediante la cristallizzazione.

Questa prima fase del processo di liofilizzazione, che può avvenire nella stessa camera in cui avviene il successivo essiccamento del prodotto oppure in una distinta, inizia con un super raffreddamento della soluzione da trattare fino al fenomeno di nucleazione, durante il quale iniziano a formarsi i primi nuclei stabili dai quali si sviluppano in un secondo momento i cristalli che si vanno via via ad accrescere fino all'ottenimento di una struttura solida completamente congelata.

Il congelamento riduce il contenuto di acqua allo stato liquido e quella rimanente nel campione finale prende il nome di “*bound water*” (Abdelwahed et al., 2006).

In base alla velocità con cui questa fase avviene si possono ottenere cristalli di ghiaccio con caratteristiche morfologiche differenti: in particolare, a velocità di congelamento elevate corrispondono cristalli di dimensioni contenute mentre, imponendo un congelamento più lento, si ottiene la formazione di cristalli di dimensioni maggiori (Trenkenschuh e Friess, 2021).

La scelta di tale parametro e, di conseguenza il tipo di cristalli che si vogliono ottenere, dipende dal tipo di campione che si vuole andare a sottoporre al processo.

Nel caso di trattamento di liposomi, se da un lato un congelamento lento può portare al danneggiamento del doppio strato lipidico a causa delle dimensioni elevate dei cristalli che si vengono a formare, dall'altro vi è una possibilità ridotta di formazione di cristalli nel “core” interno e, di conseguenza, la membrana ha il tempo di ricostituirsi a seguito degli stress subiti (Susa et al., 2021).

Analizzando il caso di liofilizzazione di proteine, durante la fase di congelamento è bene lavorare con una velocità bassa promuovendo così la formazione di cristalli di dimensioni elevate: minimizzando l'area superficiale dei cristalli di ghiaccio si possono ridurre gli stress apportati da questa fase (Butreddy et al., 2021).

La temperatura di congelamento può essere influenzata dalla presenza di alcuni tipi di soluto in soluzione, come ad esempio i sali inorganici che ne provocano un abbassamento.

In ambito farmaceutico il congelamento può avvenire per contatto diretto con una superficie raffreddata oppure attraverso un congelamento a rotazione/dinamico in un bagno refrigerante; quest'ultima tecnica può essere utilizzata per trattare quantità di prodotto elevate mentre la prima è adatta anche nel caso si vogliono trattare volumi inferiori

Il processo di accrescimento dei cristalli di ghiaccio è esotermico ma, come è possibile notare nella Figura 1.2, il calore è sottratto sfruttando il fatto che i flaconi si trovano a basse temperature: quanto più è elevata la portata di calore che si sottrae, tanto più veloce sarà la formazione dei cristalli. La quantità di nuclei iniziali che si vengono a formare dipende dalla temperatura di nucleazione poiché più questa è bassa, tanto maggiore sarà il numero di nuclei che si verranno a formare.

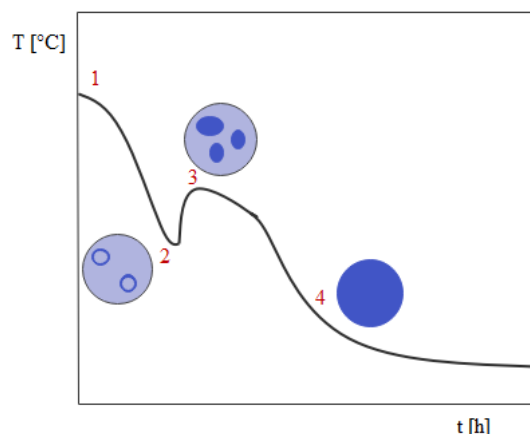


Figura 1.2: Profilo termico di una soluzione durante la fase di congelamento. Il tratto 1-2 rappresenta il raffreddamento spinto del campione, da 2 a 3 vi è la nucleazione durante la quale, nel solvente, iniziano a formarsi i primi nuclei stabili. Il tratto 3-4 rappresenta la fase di accrescimento dei nuclei e formazione dei cristalli di ghiaccio (processo esotermico) ed infine, oltre il punto 4, la struttura è completamente ghiacciata.

La quantità di nuclei formati, a loro volta, influenza la dimensione dei cristalli che si andranno ad ottenere ed, in particolare, maggiore è la loro quantità più piccoli saranno i cristalli.

Una tecnica particolare di liofilizzazione è rappresentata dallo “spray freeze-drying” dove, a monte del congelamento, utilizzando un atomizzatore, si formano piccole gocce a partire dalla soluzione (Figura 1.3). Questo passaggio permette una liofilizzazione più efficiente riducendo la resistenza della struttura essiccata ed aumentando l’uniformità del trasferimento del calore (Adali et al., 2020).

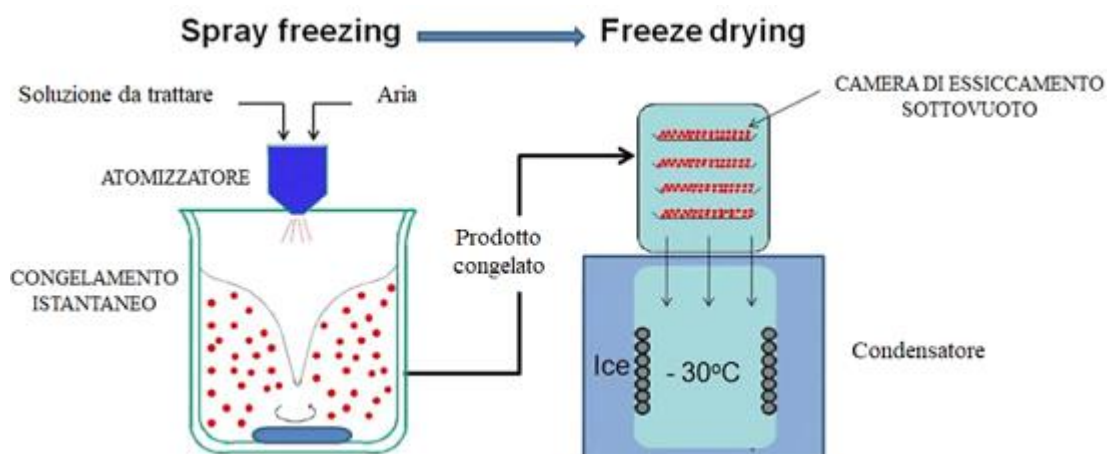


Figura 1.3: Rappresentazione schematica del processo di spray freeze-drying [modificata da (Sahoo et al., 2016)].

Dopo la fase di congelamento seguono le due fasi di essiccamento che hanno l’obiettivo di ridurre il contenuto di acqua nel campione fino all’1-2%. Durante l’essiccamento primario il ghiaccio viene allontanato mediante sublimazione e i parametri da tenere sotto controllo sono la temperatura del ripiano e la pressione all’interno della camera.

La pressione da mantenere in camera durante questa fase deve essere inferiore al valore di tensione di vapore del ghiaccio al fine di permetterne la sublimazione ma è importante non

raggiungere pressioni troppo basse poiché si andrebbe a limitare lo scambio termico, ottenendo un tempo di essiccamento primario elevato che risulterebbe essere controproducente (Merivaara et al., 2021).

Inizialmente viene trasmesso calore al flacone contenente il campione attraverso il ripiano riscaldato mantenendosi al di sotto della temperatura critica di collasso; a seguito della sublimazione il vapore passa attraverso lo strato essiccato fino alla superficie del campione ed è poi inviato al condensatore (Figura 1.4) (Abdelwahed et al., 2006).

Il campione non deve superare la temperatura critica di collasso, oltre la quale la struttura collaserebbe. Nel caso di un campione con una natura cristallina la temperatura critica viene chiamata temperatura eutettica, oltre la quale la matrice solida fonde, mentre nel caso sia amorfa è la temperatura di collasso della struttura (all'incirca la temperatura di transizione vetrosa) che comporta una diminuzione della sublimazione con conseguente aumento di acqua nella struttura.

La sublimazione viene influenzata da diversi fattori: cristalli di ghiaccio di dimensioni elevate formano una struttura molto porosa favorendo la sublimazione e riducendo i tempi per l'essiccamento primario mentre, al diminuire delle dimensioni dei cristalli di ghiaccio, i tempi del primario si allungheranno.

La fine dell'essiccamento primario può essere sancita utilizzando diversi indicatori:

- Il "test di aumento di pressione" (PRT) prevede la chiusura della valvola che collega il condensatore alla camera di liofilizzazione e, se la sublimazione è stata completata, non vi è perdita di vuoto in camera. Tuttavia, qualora vi fosse ancora ghiaccio non sublimato, applicando questa tecnica diminuisce l'auto-raffreddamento conseguente alla sublimazione e la temperatura del prodotto tenderebbe ad aumentare, portando alla fusione o al collasso del prodotto.
- Risposta della temperatura del prodotto: consiste nella disposizione di termocoppie in alcuni campioni per monitorare la temperatura; in assenza di ghiaccio la temperatura aumenterà fino a raggiungere un valore simile a quello della piastra su cui si trova. Tuttavia, la presenza delle termocoppie provoca nei campioni in cui sono posizionati un disturbo agendo da nucleante. Questo comporta un essiccamento primario più rapido rispetto agli altri campioni e, per questo, i flaconi associati alle termocoppie non sono rappresentativi per l'intero carico.
- Monitoraggio della temperatura al condensatore: il passaggio da vapore acqueo a ghiaccio, che avviene nel condensatore, è un processo esotermico che libera calore. In assenza di ghiaccio, e quindi al termine dell'essiccamento primario, la temperatura del condensatore tende a diminuire.
- Controllo e monitoraggio della pressione (tecnica CPM): questa si basa sul monitoraggio di pressione in camera rilevata tramite un sensore termoconduttivo (di tipo Pirani) e un sensore capacitivo (di tipo Baratron). Quando i due valori di pressione rilevati con i due sensori si eguagliano la fase di essiccamento primario può ritenersi conclusa.

Al termine di questa fase, nel caso di una preparazione amorfa il contenuto di acqua in fase liquida presente assume valori da 20-30% w/w fino a 50% w/w mentre nel caso di un campione cristallino vi è un quantitativo residuo nettamente minore (Franks e Auffier, 2007).

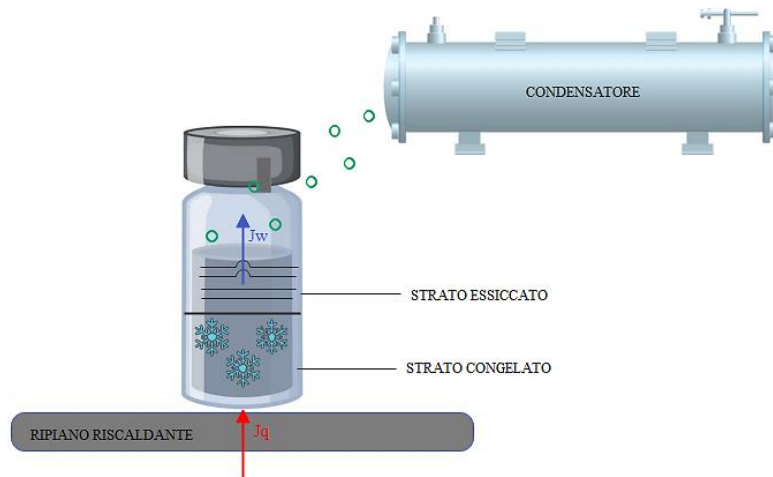


Figura 1.4: Rappresentazione di un flacone su di un ripiano riscaldato all'interno del liofilizzatore. Nello specifico è rappresentata la fase di essiccamento primario dove nella parte sottostante del flacone vi è ancora uno strato congelato mentre a mano a mano la parte superiore passa in forma essiccata. I cerchietti verdi rappresentano il vapore acqueo che si produce e che raggiunge il condensatore. I flussi J_q e J_w rappresentano rispettivamente il flusso di calore dal ripiano al flacone e il flusso di materia del vapore che si allontana dallo strato essiccato.

A seguito dell'essiccamento primario vi è l'ultima fase del processo che prevede l'essiccamento secondario in cui avviene il desorbimento dell'acqua residua contenuta nella struttura fino a ridurre al minimo il suo contenuto. Durante l'essiccamento secondario si aumenta la temperatura in camera garantendo una condizione di vuoto più spinta rispetto alla fase precedente. Al termine di questa fase il quantitativo di acqua residua è minimo e questo aumenta la conservabilità del prodotto che è stato essiccato.

Il vapore acqueo viene allontanato e raccolto dal condensatore e, a seguito dell'apertura della camera di liofilizzazione, si procede con la chiusura delle fiale o dei flaconi che erano precedentemente mantenuti semi aperti per permettere la sublimazione del ghiaccio.

Negli ultimi anni, nell'ambito farmaceutico, si sta volgendo sempre più l'attenzione verso un processo di liofilizzazione in continuo. Questo presenta numerosi vantaggi rispetto ad un processo di tipo discontinuo poiché consente di ottenere lotti di produzione più uniformi ed un miglior controllo della temperatura di nucleazione a differenza di un processo discontinuo nel quale, la natura stocastica della nucleazione porta ad avere flaconi contenenti prodotti morfologicamente diversi e, quindi, diversi tempi di essiccamento. Si hanno inoltre miglioramenti relativi all'efficienza del processo e un miglior controllo sulle proprietà del prodotto finale. Utilizzando una tecnica di questo tipo, i tempi di trattamento sono ridotti fino a dieci volte rispetto ad un analogo processo discontinuo ed inoltre i macchinari richiesti sono di dimensioni più contenute. Nonostante i numerosi vantaggi, gli ostacoli nella realizzazione di un processo di liofilizzazione completamente continuo sono principalmente di natura economica ed, inoltre, un ulteriore problema risiede nella mancanza di personale qualificato e di conoscenze sufficienti per il passaggio da una tecnologia consolidata ad una innovativa (Fissore et al., 2019).

1.1.2 Vantaggi e svantaggi

I prodotti liofilizzati presentano innumerevoli caratteristiche positive che rendono questo tipo di trattamento vantaggioso.

Tra le caratteristiche principali vi è il fatto che i prodotti liofilizzati, da cui si elimina fino al 99,5% di acqua, possono essere conservati per lunghi periodi e trasportati a temperatura ambiente per poi essere impiegati previa aggiunta di solventi che ne consentono una rapida e fisiologica ricostituzione (Kumar, 2012). Essi, specie se preparati per uso farmaceutico, devono rispondere ad alti standard di purezza e/o sterilità.

Dalla Figura 1.5 è possibile individuare la differenza tra il processo di liofilizzazione e l'essiccamento classico o sottovuoto. Durante un processo di essiccamento classico si procede con l'incremento della temperatura al fine di far evaporare il solvente contenuto nel campione da trattare e, tale tecnica, non risulta efficace per i prodotti farmaceutici e biofarmaci poiché essi sono termolabili. Risulta favorevole in tal caso far riferimento alla liofilizzazione che, presentando un congelamento, una successiva condizione di vuoto e conseguente riscaldamento permette un monitoraggio migliore della temperatura in camera senza andare ad interferire con le proprietà del prodotto di interesse.

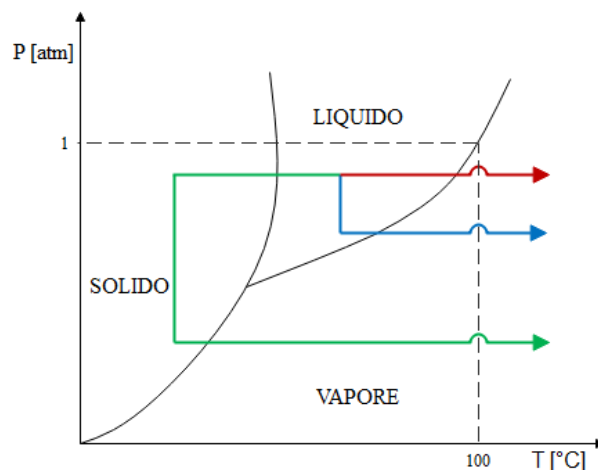


Figura 1.5: Rappresentazione grafica del processo di essiccamento classico (tratto rosso), essiccamento sotto vuoto (tratto blu) e liofilizzazione (tratto verde).

Tra gli aspetti svantaggiosi del processo vi sono il costo elevato dei macchinari, gli elevati costi energetici e i tempi di trattamenti molto lunghi (Kumar, 2012).

Nonostante questo, la liofilizzazione resta una tecnica molto applicata per la conservazione di una vasta gamma di prodotti.

1.2 Eccipienti

Nello studio in esame l'attenzione è volta all'applicazione della liofilizzazione in ambito farmaceutico per la conservazione di molecole biologicamente attive, farmaci, liposomi, vescicole extracellulari e vaccini.

In questo ambito, un aspetto che riveste particolare importanza, riguarda la scelta delle sostanze prive di azione farmacologica da aggiungere alla soluzione di interesse prima del processo di congelamento. Queste sostanze, comunemente dette eccipienti, come nel caso del

lattosio, saccarosio o glucosio, non devono interferire con l'azione del farmaco garantendone la sicurezza e la stabilità prima e dopo l'eventuale ricostituzione (Franks e Auffier, 2007).

Gli eccipienti, se scelti adeguatamente, non hanno il solo scopo di facilitare la somministrazione e la conservazione del principio attivo ma anche garantire l'efficacia del prodotto finale. L'eccipiente ha inoltre la funzione di "adiuvante" ovvero esso è in grado di aiutare il principio attivo stesso nella sua attività garantendo la stabilità del prodotto farmaceutico e modificandone, talvolta, le sue proprietà organolettiche (tra cui l'odore e il sapore) e in alcuni casi può arrivare a costituire il 90% del volume totale del medicinale (Abrantes et al., 2016). Gli eccipienti possono interagire direttamente con il principio attivo del farmaco attraverso i loro gruppi funzionali e risulta quindi fondamentale una scelta accurata della combinazione farmaco-eccipiente (Bjelošević et al., 2020).

Il processo degradativo del farmaco può avvenire con meccanismi differenti:

- Idrolisi
- Ossidazione
- Isomerizzazioni
- Fotolisi
- Polimerizzazione (Fathima et al., 2011).

Nel processo di liofilizzazione farmaceutica, gli eccipienti svolgono diverse funzioni:

- Protezione della componente attiva
- Aumentano la stabilità nel tempo del prodotto
- Ottimizzano la resistenza meccanica della matrice solida liofilizzata
- Riducono i rischi comportati dalla presenza dell'acqua residua
- Comportano un miglioramento economico sul tempo di processo

Questi stabilizzatori hanno un duplice ruolo poiché, oltre a proteggere il medicinale durante il congelamento della soluzione favorendo la formazione di una matrice vetrosa, promuovono anche la resistenza fisica del prodotto essiccato a seguito dell'aumento di contenuto solido nella miscela trattata.

La presenza di un eccipiente amorfo influenza sia la temperatura di transizione vetrosa (T_g') della soluzione sia quella (T_g) del prodotto essiccato poiché esso spesso rappresenta la componente maggiore all'interno della miscela trattata.

Ad esempio, l'aggiunta del destrano ($T_g' = -14$ °C) permette di effettuare una fase di essiccamento a temperature relativamente elevate ($T_g = 81$ °C) mentre l'aggiunta del glicerolo ($T_g' = -100$ °C) abbassa la temperatura di transizione vetrosa ad un valore di -93 °C (considerando anidro il prodotto finale) (Franks e Auffier, 2007).

Esistono due tipi di eccipienti che possono essere utilizzati: amorfi o cristallini. Qualora si aggiunga un amorfo alla soluzione di interesse, questo comporta una ridotta formazione di ghiaccio con conseguente riduzione del tempo richiesto per l'essiccamento primario a fronte di un aumento di quello secondario. Il vantaggio nell'utilizzare un eccipiente amorfo rispetto ad un cristallino risiede nel fatto che esso è in grado di proteggere il prodotto dagli stress procurati dal congelamento a differenza di quello cristallino che, sebbene conferisca supporto strutturale, non è in grado di svolgere questo effetto (Wang e Grainger, 2019).

L'identificazione della temperatura di transizione vetrosa (T_g') nel caso di un amorfo o la temperatura di eutettico (T_e) nel caso di un cristallino risulta di estrema importanza per identificare un intervallo di temperatura oltre il quale la struttura che si andrà a liofilizzare subirà il collasso, ovvero risentirà della mancanza di solvente andando a cedere e di conseguenza subendo un potenziale deterioramento (Franks e Auffier, 2007).

1.2.1 Classi di eccipienti

Esistono diverse categorie di eccipienti che possono essere utilizzate, ciascuna con caratteristiche e attività differenti.

- Stabilizzatori: fanno parte di questa classe i crioprotettori e i lioprotettori.

Con il termine crioprotettore si indica un eccipiente in grado di prevenire cambiamenti dati dalla fase di congelamento mentre i lioprotettori rivestono importanza durante la fase di essiccamento. In genere questa classe di eccipienti è aggiunta alla miscela al fine di proteggere chimicamente il principio attivo dal possibile deterioramento che potrebbe verificarsi durante la liofilizzazione.

Facendo riferimento ai crioprotettori, durante la liofilizzazione di cellule questi possono esplicare la loro azione sia come agenti intracellulari che extracellulari. Nel primo caso entrano direttamente all'interno delle cellule per prevenire la formazione di cristalli di ghiaccio con conseguente rottura della membrana.

Nel secondo caso invece, come avviene usando il saccarosio, trealosio e altri zuccheri, essi operano richiamando osmoticamente acqua dalle cellule che risultano così più protette dal danneggiamento causato dal lento congelamento (Bahr et al., 2020).

Nel caso specifico di vaccini proteici, l'aggiunta di un crioprotettore, quale il trealosio, favorisce il mantenimento della struttura originaria della proteina (Preston e Randolph, 2021). Anche l'uso combinato di crioprotettori differenti quali il glicole polietilenico (PEG), destrano e saccarosio risulta essere ottimale per il mantenimento della stabilità delle proteine. Inoltre, è stato osservato che la combinazione di arginina, alanina e glicina con il saccarosio comporta un tempo di ricostruzione del prodotto liofilizzato più rapida rispetto alle soluzioni contenenti solo saccarosio (Dalvi et al., 2021).

Nella Tabella 1.1 sono riportati alcuni tra i principali stress provocati dal congelamento del campione dove, in ciascuno dei casi elencati, l'utilizzo di un crioprotettore risulta essere uno dei meccanismi di protezione adottati.

Tabella 1.1: Tabella rappresentativa dei principali stress provocati dal congelamento [(Hansen et al., 2015) con modifiche].

Tipologia di stress	Causa	Meccanismo di protezione adottato
Formazione di ghiaccio all'interno del campione da sottoporre al congelamento	Congelamento veloce	- Crioprotettore - Velocità di congelamento adeguata
Danneggiamento meccanico	Formazione di ghiaccio	Crioprotettore
Transizione di fase	Formazione di ghiaccio	Crioprotettore
Variazione della forza ionica	Conversione dell'acqua in ghiaccio	- Crioprotettore - Velocità di congelamento adeguata

- “Bulking agent”: questi sono una classe di eccipienti che serve a conferire struttura al prodotto liofilizzato consentendo di ottenere una matrice solida omogenea e con una distribuzione dei pori adeguata e, in genere, sono aggiunti a farmaci con un basso dosaggio. L’ottenimento di una matrice solida omogenea è di estrema importanza poiché, se si va a perdere la struttura del prodotto trattato, il vapore sottratto al flacone durante la fase di essiccamento viene ostacolato con conseguente aumento di umidità residua nel prodotto finale: questo porta alla degradazione del principio attivo e ad una sua peggiore conservazione.

All’interno di questa classe di eccipienti vi sono polioli come il mannitolo, polisaccaridi (tra cui lattosio, trealosio e glucosio), amminoacidi (principalmente arginina, glicina e istidina) e polimeri (tra cui il destrano e il glicole polietilenico). La scelta di un agente di bulking amorfo risulta essere favorevole poiché in determinate condizioni, la stabilità fisica del prodotto può essere compromessa dalla cristallizzazione di un composto cristallino (Baheti et al., 2010).

- Tensioattivi: hanno la funzione di impedire fenomeni di aggregazione sia tra le superfici proteiche del materiale in esame sia all’interfaccia ghiaccio/aria e acqua: l’aggiunta di un tensioattivo comporta una riduzione della tensione superficiale delle interfacce venutasi a creare durante la liofilizzazione e nella successiva fase di ricostruzione del prodotto liofilizzato (Bjelošević et al., 2020).
- “Buffering agent”: il ruolo di questa classe di eccipienti è quello di mantenere le condizioni di pH ottimali durante il processo.

Quelli maggiormente utilizzati nel processo sono il sodio fosfato, l’acetato, il citrato e il succinato: tra questi il migliore è quello a base di citrato poiché presenta una minor tendenza a cristallizzare durante la fase di congelamento ed inoltre, avendo una temperatura di collasso (T_c) alta, contribuisce a ridurre il tempo richiesto per l’essiccamento primario (Franks e Auffier, 2007), (Baheti et al., 2010).

Gli eccipienti che sono stati utilizzati e analizzati nel corso di questo lavoro sono di natura amminoacidica, zuccherina o polimerica. Tra i polioli è stato utilizzato il mannitolo, tra i polisaccaridi il lattosio, il cellobiosio, il trealosio, il saccarosio e la (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina, tra gli amminoacidi la metionina, la glicina e l’isoleucina mentre i due campioni a base polimerica sono stati il destrano e il PEG. Il destrano è stato scelto come modificatore della temperatura di collasso, il saccarosio, trealosio, cellobiosio, lattosio, PEG e la ciclodestrina rientrano nella categoria degli stabilizzatori, mentre gli amminoacidi e il mannitolo sono considerati dei buoni agenti di bulking in quanto conferiscono supporto alla struttura.

1.2.2 Meccanismi di protezione

Esistono diversi meccanismi di protezione che si possono adottare durante la liofilizzazione. In particolare vi sono la vetrificazione, il “water replacement”, il “water entrapment” e l’esclusione preferenziale.

Con il termine vetrificazione si va ad indicare il processo secondo il quale l’aggiunta di un eccipiente alla soluzione di interesse comporta un incremento della viscosità capace di ridurre, di conseguenza, problemi inerenti all’aggregazione e alla denaturazione.

Facendo riferimento alla liofilizzazione di liposomi, per esempio, questa tecnica ne previene l'aggregazione proteggendo il doppio strato lipidico dalla formazione dei cristalli di ghiaccio (Chen et al., 2010).

Mentre l'aggiunta di un disaccaride comporta una minimizzazione delle forze di van der Waals con conseguente aumento della distanza tra le teste polari dei fosfolipidi, è richiesta l'aggiunta di un monosaccaride, come per esempio il glucosio, in elevate quantità per ottenere un analogo risultato.

La tecnica del "water replacement", il cui meccanismo di azione è riportato nella Figura 1.6, sfrutta la capacità di alcuni eccipienti di sostituirsi alle molecole d'acqua allontanate durante il processo di liofilizzazione garantendo il mantenimento della struttura del prodotto inalterata ed evitando fenomeni di aggregazione.

Crowe fu il primo a proporre di applicare una tecnica di sostituzione della fase acquosa, "water replacement", durante il trattamento di liposomi ed è stato dimostrato che il trealosio è in grado di interagire con il gruppo fosfato del liposoma (Chen et al., 2010).

Più nel dettaglio, in uno studio condotto da Cristina S. Pereira et al. è emerso che, andando a lavorare a 325 K e a 475 K, il trealosio è in grado di minimizzare i danni prodotti dall'elevata temperatura sul doppio strato fosfolipidico andando ad interagire direttamente con esso attraverso dei legami ad idrogeno (Pereira et al., 2004).

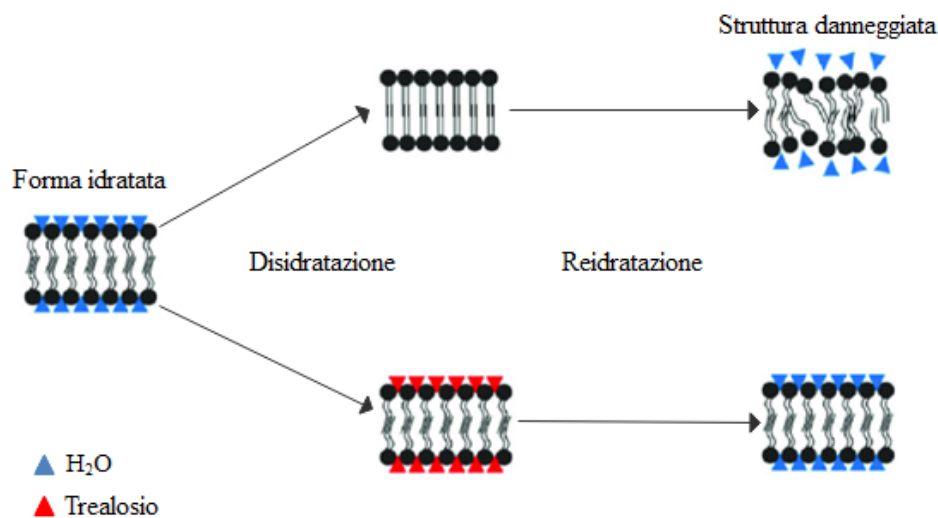


Figura 1.6: Rappresentazione del processo di "water replacement": la parte superiore dello schema rappresenta un meccanismo in cui non vi è l'aggiunta di alcun eccipiente in grado di sostituire l'acqua a seguito del processo di disidratazione mentre, nella parte inferiore, è riportato il caso in cui vi è l'aggiunta del trealosio alla soluzione. Come si evince dall'immagine l'aggiunta dello zucchero migliora la struttura finale del prodotto di interesse mantenendola invariata a seguito della reidratazione [modificata da (Crowe et al., 1985)].

Un altro meccanismo di azione protettivo è rappresentato dal "water entrapment" secondo il quale, durante la fase di essiccamento, gli eccipienti costituiscono una struttura protettiva attorno al prodotto di interesse; questo strato compatto che si viene a creare comporta una diffusività dell'acqua maggiore all'esterno rispetto che all'interno di essa andando a ridurre di conseguenza la mobilità delle molecole d'acqua sulla superficie del prodotto.

L'esclusione preferenziale è un meccanismo secondo cui alcuni eccipienti sono esclusi dalla superficie proteica del prodotto favorendo l'interazione di questa con le molecole

d'acqua. Questo crea una situazione termodinamicamente sfavorevole, aggravata da un aumento della superficie esposta. Nonostante questo, l'eventuale denaturazione che si potrebbe avere in assenza di eccipienti comporterebbe una maggiore superficie di contatto tra le proteine e il solvente risultando in una condizione decisamente più sfavorita.

Tutti questi meccanismi protettivi sono richiesti durante la liofilizzazione e trovano impiego non soltanto nell'ambito farmaceutico ma anche in quello alimentare e nei biosistemi.

1.3 Applicazione della liofilizzazione in ambito biomedicale e farmaceutico

La liofilizzazione, come già introdotto nella sezione precedente, consente di stabilizzare diverse classi di prodotti per uso nanotecnologico e biomedicale sia di ricerca che clinico.

Ad oggi numerose componenti sintetiche e/o biologiche quali liposomi, vescicole cellulari, acidi nucleici e proteine vengono usate come prodotti o parti di prodotti ibridi per trattamenti in vitro e in vivo. Chiaramente gli standard adoperati per una buona liofilizzazione di prodotti per uso biomedicale/terapeutico devono essere alti e tali da garantire riproducibilità, alta biocompatibilità e non ingerenza con le normali attività biofarmacologiche del prodotto finale.

1.3.1 Liofilizzazione di liposomi

I liposomi sono delle vescicole lipidiche scoperte da Alec D. Bangham negli anni '60 del '900 all'università di Cambridge, con dimensioni che variano da poche decine di nanometri a qualche micron.

Il loro meccanismo di formazione è riconducibile alle caratteristiche biochimiche dei fosfolipidi che li costituiscono, formati da una coda apolare e da una testa polare, che in acqua li portano a disporsi spontaneamente a formare un doppio strato e strutture vescicolari caratterizzate da compartimenti idrofilici come schematizzato nella Figura 1.7 (Bozzuto e Molinari, 2015).

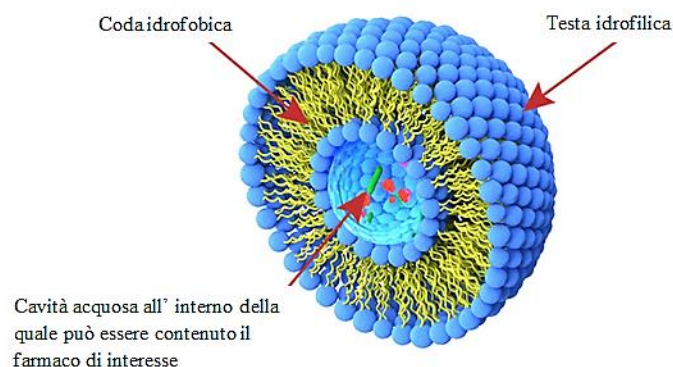


Figura 1.7: Rappresentazione della struttura di un liposoma [modificata da (Baumber, 2020)].

I liposomi grazie alla loro alta biocompatibilità sono studiati ed applicati già da molte decine di anni per la loro capacità di carico e di trasporto di sostanze farmacologicamente attive compresi antibiotici, anticorpi, acidi nucleici, o nanoparticelle per trattamenti mirati (Hernandez e Shukla, 2022), (Li et al., 2022), (Limongi, Susa, Marini et al., 2021).

Dal momento che i liposomi sono composti da un doppio strato di molecole anfipatiche, essi possono trasportare sia carichi idrofilici che idrofobici proteggendoli, quando contenuti al loro interno, da degradazione enzimatica e/o denaturazione fino al luogo e al momento del rilascio. Data la loro elevata biocompatibilità i liposomi sono definiti “safe nanocarriers” e l’aggiunta di gruppi funzionali sia chimici che biologici può da un lato aumentare l’efficacia del trasporto ma dall’altro potrebbe causare tossicità sia in vitro che in vivo.

Entrando nel merito di applicazioni farmacologiche, nel momento in cui un liposoma interagisce con una cellula, il trasferimento del principio attivo può avvenire o mediante l’interazione con la cellula tramite recettori presenti sulla membrana plasmatica della stessa (Figura 1.8 A) oppure mediante interazione elettrostatica e adsorbimento sulla membrana cellulare (Figura 1.8 B).

Per quanto riguarda invece il trasporto del farmaco all’interno della cellula esso può avvenire in diversi modi:

- Fusione del liposoma con la membrana plasmatica e rilascio del carico contenuto nella vescicola all’interno della cellula bersaglio (Figura 1.8 C);
- Scambio di componenti del carrier con la membrana della cellula (Figura 1.8 E);
- Internalizzazione dei liposomi per endocitosi negli endosomi (Figura 1.8 F) con fusione con i lisosomi e conseguente degradazione della membrana liposomica e rilascio del farmaco (Figura 1.8 G) oppure con fusione negli endosomi e destabilizzazione delle vescicole (Figura 1.8 H) (Bozzuto e Molinari, 2015).

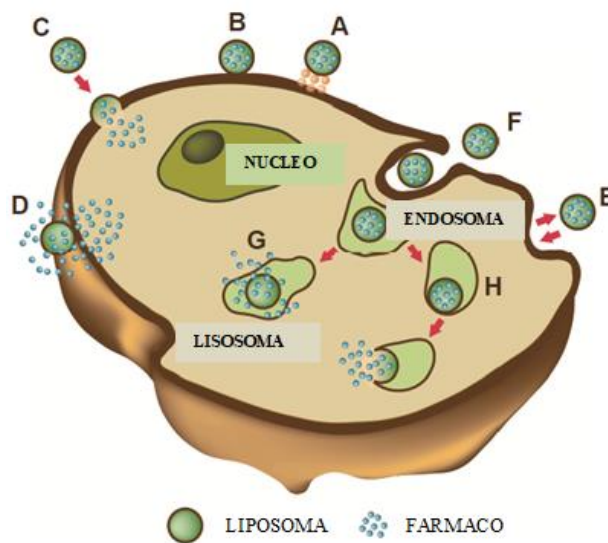


Figura 1.8: Rappresentazione schematica dell’interazione liposoma-cellula bersaglio [modificata da (Bozzuto e Molinari, 2015)].

La struttura e composizione dei liposomi li rende, in alcune situazioni, particolarmente suscettibili a degradazione ossidativa limitandone la stabilità specie in applicazioni biomedicali. Per ovviare a questo tipo di problema per stabilizzarli, conservarli e trasportarli correttamente, sono state messe a punto una serie di tecniche tra le quali la liofilizzazione è particolarmente indicata per il trattamento di sostanze termosensibili.

Alcuni degli aspetti limitanti di questa tecnica, quando usata per la conservazione di liposomi, riguardano la formazione di cristalli di ghiaccio nel doppio strato lipidico, l’eventuale aggregazione delle vescicole a seguito del processo di disidratazione e gli

eventuali danni dovuti alla transizione di fase durante la reidratazione del prodotto. Al fine di non incorrere in questi problemi è molto importante fare attenzione alla scelta delle formulazioni e individuare per ciascun prodotto i migliori parametri per ciascuna fase dell'intero processo (Susa et al., 2021).

Uno studio sugli effetti della liofilizzazione di liposomi in presenza e in assenza di eccipienti è stato condotto da Susa et al.. In particolare sono state analizzate due soluzioni liposomali le quali sono state sottoposte a due tipologie di cicli di congelamento e scongelamento: il primo prevedeva una sequenza di sette cicli lenti mentre il secondo, sempre composto da sette cicli, avveniva in maniera veloce sfruttando un congelamento in azoto liquido. Il processo è stato condotto in un primo momento senza l'utilizzo di eccipienti e poi andandone ad aggiungere alla soluzione trattata al fine di poter effettuare un paragone sulla base dei risultati ottenuti a valle del trattamento. Quanto emerso è che l'aggiunta di eccipienti quali cellobiosio, lattosio o trealosio alle soluzioni liposomali sottoposte al trattamento (sia esso lento o veloce) rappresentavano i lioprotettori migliori in grado di prevenire i danni causati dall'intero processo mantenendo invariato il numero di particelle (Susa et al., 2021).

Uno studio riportato da Luo et al. ha analizzato l'effetto della liofilizzazione su diversi tipi di nanoparticelle, tra cui i liposomi, in presenza o in assenza di eccipienti aggiunti alla soluzione trattata. Nel dettaglio i liposomi, costituiti da L- α -idrogenato fosfatidilcolina di soia e colesterolo, hanno presentato differenze qualitative della struttura essiccata in base alla scelta fatta sull'eccipiente. In particolare, la struttura della soluzione in cui era presente trealosio o saccarosio ha mostrato delle disomogeneità che, invece, nel caso contenente mannitolo non erano presenti. In quest'ultimo caso la superficie della matrice solida risultava essere liscia ed omogenea. Considerando invece l'umidità residua nei campioni, è emerso che in assenza di eccipienti i valori ottenuti erano compresi tra il 2,6 e lo 0,2% mentre, l'aggiunta di lioprotettori ne comportava una quantità nettamente inferiore (<1%). Per quanto riguardava il tempo richiesto per la ricostruzione del prodotto trattato: in assenza di lioprotettori erano necessari circa 16 minuti mentre l'aggiunta di saccarosio, trealosio o mannitolo ha permesso di ridurlo a circa 5 minuti (Luo et al., 2021).

1.3.2 Liofilizzazione di vescicole extracellulari (EVs)

Le vescicole extracellulari (EVs) sono vescicole costituite da un doppio strato fosfolipidico secrete dalle cellule procariotiche ed eucariotiche sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Come mediatori della comunicazione intercellulare sono presenti nei fluidi biologici (latte, componenti sanguigni, urina, ...) e regolano l'omeostasi e le diverse fasi del processo vitale di cellule sane o malate veicolando biomolecole quali proteine, lipidi, RNA e DNA (Picca et al., 2022), (Limongi, Susa, Dumontel et al., 2021), (Kusuma et al., 2018).

Le EVs a seconda della loro origine e delle loro dimensioni sono suddivise in diverse famiglie:

- Gli esosomi sono delle vescicole intraluminari (ILVs) originate durante il processo di maturazione degli endosomi multivescicolari (MVEs). Questi hanno una dimensione compresa tra i 30 e i 200 nm. È possibile descrivere la loro formazione attraverso tre passaggi: a) formazione dell'endosoma a partire da un ripiegamento della membrana plasmatica; b) invaginazione della membrana endosomica con conseguente formazione di un "multi vesicular body" (MVB) contenente le ILVs; c) rilascio degli esosomi all'esterno della cellula a seguito della fusione del MVB con la membrana cellulare.

- Le micro vescicole sono generate da un'estrusione della membrana cellulare verso l'esterno e hanno una dimensione compresa tra i 100 e i 1000 nm.
- I corpi apoptotici hanno dimensioni comprese tra i 50 e i 2000 nm e vengono secreti soltanto durante la morte cellulare nello spazio extracellulare (Qin et al., 2020).

Le diverse classi di vescicole extracellulari e la loro biogenesi sono riportati in Figura 1.9.

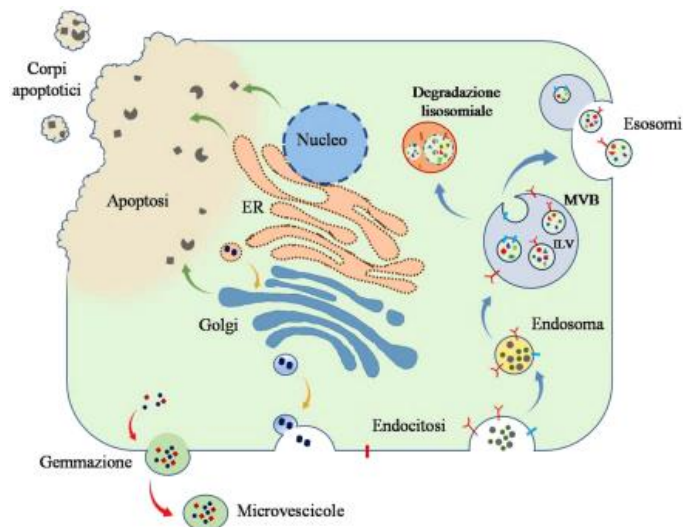


Figura 1.9: Rappresentazione grafica della differente secrezione di esosomi e micro vescicole: i primi generati all'interno della cellula e le seconde dall'estrusione della membrana cellulare. Sono inoltre rappresentati i corpi apoptotici originati da un processo di apoptosi (Bianciardi et al., 2021).

La biotecnologia e la nanotecnologia sfruttano da anni con successo la naturale capacità di mediatori e trasportatori di segnali intercellulari delle EVs per lo sviluppo di vaccini, dispositivi teranostici e per il trasporto mirato di farmaci (Santos e Almeida, 2021), (Herrmann et al., 2021), (Kusuma et al., 2018).

Questo tipo di vescicole, contrariamente ai liposomi, è caratterizzato da una serie di proteine inserite nel doppio strato lipidico. La composizione di queste vescicole biologiche in lipidi e proteine dipende sia qualitativamente che quantitativamente dalla linea cellulare da cui traggono origine e dal momento in cui vengono secrete, ovvero dallo stadio di differenziamento e da una eventuale condizione più o meno patologica in corso. La presenza di proteine sulle membrane delle vescicole e la presenza di un cargo, sia esso nativo o dovuto a successive ingegnerizzazioni, rende critica l'ottimizzazione di eventuali processi per la loro conservazione.

Per evitare che durante la liofilizzazione le EVs si rompano, aggregino o subiscano ossidazioni o denaturazioni dei gruppi biologicamente attivi che le caratterizzano, si procede con l'aggiunta di agenti crioprotettori solubili in acqua e non tossici, quali ad esempio il trealosio, mannitolo e PEG. La loro aggiunta va di volta in volta tarata a seconda della tipologia e della quantità di prodotto da trattare per evitare che risultino tossici o interferiscano con la loro azione farmacologica o biologica.

Durante uno studio effettuato da Charoenviriyakul e al., è stata condotta la liofilizzazione di esosomi provenienti da una coltura di cellule di melanoma murino B16BL6 per verificarne lo stato di conservazione paragonandoli a quelli stoccati a -80 °C. Nel caso in esame sono stati preparati due campioni nei quali era presente o meno il trealosio con una concentrazione di 50 mM i quali sono stati congelati rapidamente in azoto liquido. Al termine della

liofilizzazione sono stati stoccati a temperatura ambiente per 1-4 settimane prima del loro utilizzo. Quanto è emerso dall'analisi condotta con il microscopio elettronico a trasmissione (TEM), è che gli esosomi liofilizzati senza l'aggiunta del trealosio come crioprotettore formavano degli aggregati e, quindi, risultavano danneggiati dopo trattamento. Il lotto di campioni in cui era stato aggiunto il trealosio, invece, non ha mostrato fenomeni di aggregazione e dal punto di vista morfologico risultava comparabile con quello dei campioni stoccati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Charoenviriyakul et al., 2018).

1.3.3 Liofilizzazione di farmaci, proteine, anticorpi monoclonali e policlonali

Le formulazioni solide dei farmaci rappresentano una delle tipologie principali distribuite sul mercato; molto spesso, infatti, i farmaci si trovano sotto forma di capsule o compresse. Anche in questo ambito la liofilizzazione rappresenta una valida pratica di trattamento.

Analizzando il processo di produzione delle compresse, il farmaco è aggiunto agli eccipienti andando a costituire una miscela che viene poi dosata all'interno di uno stampo che subisce un processo di essiccamento come rappresentato in Figura 1.10 (Tran et al., 2021).



Figura 1.10: Rappresentazione del processo di produzione di compresse tramite liofilizzazione. La componente attiva del farmaco (rappresentata dai cerchi azzurri) e gli eccipienti (rappresentati dai triangoli verdi) vengono miscelati in soluzione acquosa; a seguire, avviene il dosaggio e la liofilizzazione con l'ottenimento delle compresse di interesse come prodotto finale.

In uno studio condotto da Ibrahim e al., è indicato il processo di produzione di compresse contenenti silimarina (SLM), che è utilizzato nel trattamento di numerosi disturbi tra cui la cirrosi. Per la preparazione delle compresse, SLM (250 mg) è stato disciolto in etanolo (1,5 ml) mentre è stata preparata una seconda soluzione sciogliendo l'alcool polivinilico (usato come stabilizzatore) e il mannitolo (come crioprotettore) in acqua e successivamente raffreddati. A seguire la soluzione contenente il principio attivo è stata rapidamente iniettata in quella a base di alcool polivinilico e la soluzione così ottenuta è stata trasferita all'interno di un blister e congelata a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 6 ore e liofilizzata per 24 ore. Con questo processo si ottiene una compressa altamente porosa contenente la dose di silimarina di 50 mg per ciascuna compressa (Ibrahim et al., 2019).

La liofilizzazione in ambito farmaceutico non si limita soltanto alla produzione di farmaci sotto forma di compresse ma un medicinale sotto forma di solido essiccato può risultare utile per una somministrazione di tipo polmonare o per applicazioni nasali al fine di rendere i farmaci facilmente ed efficacemente inalabili. In entrambi i casi la distribuzione delle dimensioni delle particelle solide venutesi a creare deve essere molto stretta in modo da ridurre la frazione di particelle che non riescono a raggiungere il loro bersaglio negli alveoli polmonari; inoltre è fondamentale ottenere particelle abbastanza piccole e leggere affinché possano essere inalate con facilità senza provocare danni e irritazioni durante la loro

somministrazione. È inoltre possibile ricostituire le polveri liofilizzate al fine di ottenere un farmaco iniettabile, consentendone un trasporto e una distribuzione migliore sotto forma di prodotto solido.

Un altro campo di applicazione del processo di liofilizzazione riguarda il trattamento e la conservazione di farmaci a base proteica quali vaccini, ormoni, anticorpi monoclonali e policlonali. Circa il 46% di questo tipo di farmaci subisce tale processo e, come nel caso di ogni altro prodotto, sono presenti degli stress che potrebbero andare a denaturare la proteina rendendola non più adatta al proprio utilizzo. Anche in questo caso risulta essere vantaggiosa l'aggiunta di agenti crioprotettori e lioprotettori (Butreddy et al., 2021).

Tra gli eccipienti più utilizzati vi sono zuccheri semplici, quali il fruttosio, disaccaridi, tra cui il trealosio, il saccarosio e il lattosio, oppure amminoacidi, tra cui l'isoleucina, la glicina, l'arginina e la metionina, o ancora polimeri tra i quali il destrano e il PEG. L'utilizzo di un amminoacido ha evidenziato effetti simili a quelli degli zuccheri o dei polimeri dal punto di vista di crio-lio protezione e, per questo, rappresenta una valida alternativa.

In particolare, secondo uno studio di Startzel, la struttura chimica dell'arginina, unica nel suo genere, consente di aumentare i benefici nella formulazione di proteine soggette a freeze-drying (Stärtzel, 2018).

Tra le classi di proteine terapeutiche citate, gli anticorpi monoclonali (MAb) sono una categoria di anticorpi identici fra loro che sono in grado di riconoscere selettivamente un unico epitopo specifico dell'antigene mentre gli anticorpi policlonali sono un insieme di anticorpi che sono in grado di riconoscere ciascuno uno specifico epitopo presente su di uno stesso antigene e rappresentano una popolazione di anticorpi eterogenea.

La Figura 1.11 mostra, a titolo di esempio, uno studio effettuato da Pouya e altri su formulazioni differenti di un prodotto contenente anticorpi policlonali della classe IgG, per un'applicazione di tipo polmonare, con l'aggiunta di β -ciclodestrine (β CD) o idrossipropil- β -ciclodestrine (HP β CD) in combinazione al trealosio sottoposti a trattamento di spray freeze-drying (SFD). Le immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) sono state ottenute a due scale differenti, 5 μ m e 10 μ m, e mostrano come la formulazione trealosio- β CD porti alla formazione di particelle mediamente più grandi (il cui diametro varia dai 6,12 μ m ai 6,49 μ m) e molto irregolari, con elevata porosità interna (Figura 1.11 a, b). La formulazione trealosio-HP β CD forma particelle più compatte e sferiche aventi un diametro medio compreso tra 5,32 μ m e 5,85 μ m (Figura 1.11 c, d, e, f).

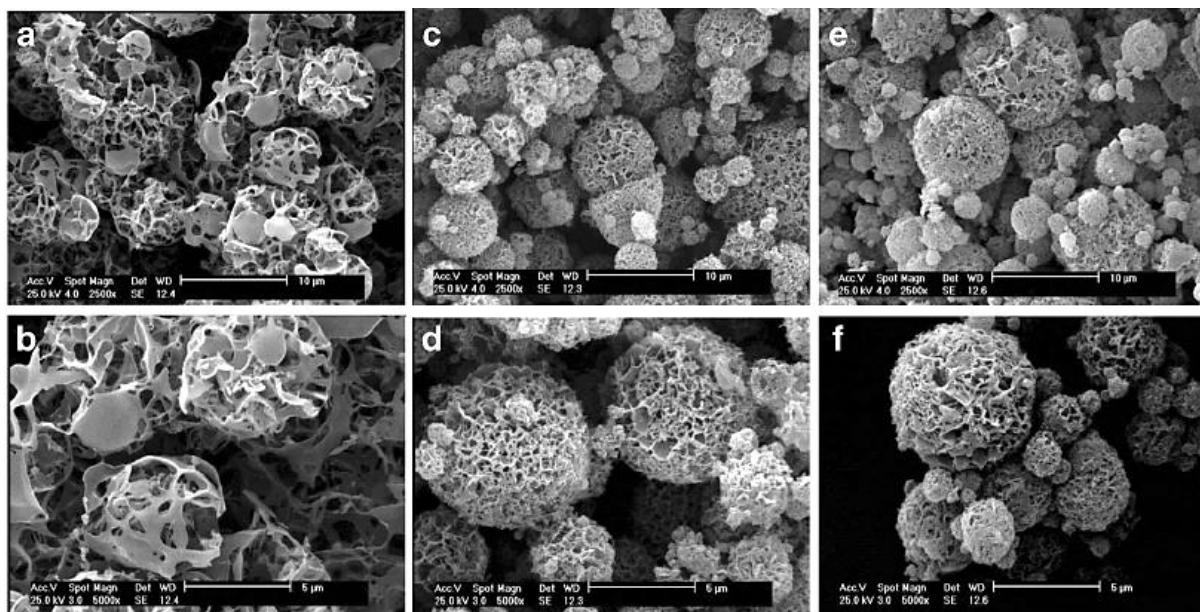


Figura 1.11: Immagini ottenute al SEM: formulazione trealosio- β CD rapporto massico β CD:IgG 1:2,5 (a, b), formulazione trealosio-HP β CD rapporto massico HP β CD:IgG 1:5 (c,d), formulazione trealosio-HP β CD rapporto massico HP β CD:IgG 1:2,5 (e,f) (Pouya et al., 2018).

La combinazione di eccipienti che ha fornito i migliori risultati è stata quella costituita da trealosio-HP β CD, in termini di grado di aggregazione, stabilità, caratteristiche morfologiche e aerodinamiche. L'idrossipropil- β -ciclodestrina è in grado di agire da crioprotettore durante il congelamento, stabilizzando efficacemente le sezioni idrofobiche della proteina, impedendo così la formazione di aggregati e, addirittura, promuovendo la rimozione di quelli già presenti.

Dal punto di vista tossicologico le β -ciclodestrine nelle concentrazioni utilizzate dal gruppo di ricercatori risultano al di sotto del limite di tossicità, in particolare l'HP β CD risulta essere quella più sicura di tutte.

Alla luce dei risultati ottenuti, la formulazione trealosio-HP β CD per gli anticorpi policlonali è risultata essere la migliore tra quelle indagate ed in grado di proteggere dagli stress peculiari del processo di SFD il prodotto garantendone la conservazione nel tempo (Pouya et al., 2018).

1.3.4 Liofilizzazione di vaccini

Tra tutti i prodotti sensibili biologici e non che la liofilizzazione può stabilizzare in polveri senza danneggiarli vi sono, oltre ai farmaci chimici e biologici, anche sieri e vaccini i quali consentono di ridurre, in media, ogni anno la morte di tre milioni di persone (Preston e Randolph, 2021).

Esistono diverse tipologie di vaccini:

- I vaccini attenuati sono prodotti partendo dagli agenti infettivi resi non patogeni (ad esempio per il morbillo);
- I vaccini inattivati sono prodotti inattivando virus o batteri (ad esempio per l'epatite A);
- I vaccini ad anatossine o tossoidi sfruttano le tossine provenienti dall'agente infettivo per attivare le difese immunitarie dell'organismo nel quale viene somministrato (ad esempio per il tetano);
- I vaccini a subunità, nei quali viene utilizzata soltanto una parte dell'antigene;
- I vaccini ad acidi nucleici;
- I vaccini peptidici (Plotkin, 2005).

Al fine di garantirne la sicurezza e l'efficacia terapeutica di questi preparati è molto importante mantenere entro i limiti indicati parametri come il pH e la temperatura durante le diverse fasi di preparazione, stoccaggio, spedizione e infine somministrazione ai pazienti (Hansen et al., 2015).

Come spesso accade per composti farmaceuticamente attivi in formulazioni liquide, anche i vaccini sono soggetti a fenomeni di ossidazione, riduzione, aggregazione e/o denaturazione quindi la liofilizzazione contribuisce a stabilizzarli fino al momento della ricostituzione e somministrazione. Anche per i vaccini, al fine di mantenere l'efficacia terapeutica dei prodotti, la liofilizzazione richiede l'uso di idonei crioprotettori per ridurre ai composti attivi gli stress chimico fisici del processo di stabilizzazione in polvere.

Durante la fase di congelamento, inoltre, avviene una variazione di pH che è bene monitorare e che non deve essere sottovalutata; Brandau dimostrò l'importanza del pH sull'attività dei virus e, prendendo per esempio in considerazione i virus influenzali si evince che ad un pH di 7,1 il prodotto si mantiene inalterato fino ad un mese stoccato a 4 °C mentre, utilizzando la stessa formulazione, in condizioni di pH maggiori o minori si ha una riduzione dell'emivita (Brandau et al., 2003).

Un esempio di vaccino sottoposto a processo di crioessiccamento, che ha consentito la quasi completa eliminazione dell'epidemia di meningite A in Africa sub-sahariana, è rappresentato dal vaccino "MenAfriVac". Come altri vaccini anti-meningococcici è di tipo coniugato ovvero ottenuti da un frammento del batterio legato ad una proteina al fine di renderlo più efficace. Nel caso specifico è costituito dal polisaccaride della capsula del batterio meningococco A legato al tossoide tetanico. Andando ad effettuare la liofilizzazione su questo prodotto è stato possibile stabilizzarlo per garantirne l'uso in condizioni climatiche particolari anche a temperature superiori ai 40 °C fino a quattro giorni prima della somministrazione (Lydon et al., 2014).

La tecnica di "spray drying", durante la quale la miscela da trattare subisce una fase di atomizzazione con conseguente essiccamento, consente l'ottenimento di prodotti sotto forma di polveri estremamente fini ed uniformi, somministrabili per via intranasale, polmonare o orale senza il bisogno di ricostituire il prodotto essiccato. Lo sviluppo di vaccini somministrabili per via polmonare comporta enormi benefici nel trattamento di malattie respiratorie quali la tubercolosi consentendo un'azione locale e diretta nel sito di infezione (Preston e Randolph, 2021).

Uno studio condotto da Saluja et al. ha analizzato un vaccino influenzale trattato con una tecnica di spray drying; la soluzione da trattare è stata preparata miscelando 40 ml del vaccino

a subunità in un tampone fosfato salino (PBS) con 40 ml di soluzione di inulina in PBS all'11% w/w. In maniera analoga è stata preparata una soluzione di vaccino utilizzando una soluzione salina tamponata con HEPES (HBS). Quello che è emerso è che il lotto trattato con PBS risultava essere migliore rispetto a quello trattato con HBS garantendo la stabilità del vaccino a valle del processo. L'efficacia dei vaccini somministrati seguendo tale tecnica risultava essere analoga alla consueta somministrazione con formulazione liquida (Saluja et al., 2010).

1.4 Scopo della tesi

Lo scopo di questo lavoro è stato studiare l'effetto sulla vitalità di due linee cellulari, una sana ed una tumorale, degli eccipienti più frequentemente utilizzati per la formulazione di preparati per applicazioni farmaceutiche. Prima del loro uso in cellula gli eccipienti, a diverse concentrazioni, sono stati caratterizzati sia dal punto di vista termico che per la valutazione della eventuale umidità residua.

A seguito delle varie analisi vengono riportate le differenze e le qualità favorevoli e sfavorevoli delle varie miscele trattate al fine di costruire un quadro completo delle diverse formulazioni.

Per prima cosa si è effettuata l'analisi termica sfruttando la calorimetria differenziale a scansione (DSC) e il crio-microscopio (FDM) procedendo poi con la liofilizzazione dei campioni utilizzando il liofilizzatore REVO®. La matrice solida, a valle del processo, è stata analizzata qualitativamente e a seguire si è condotta l'analisi di umidità residua effettuata tramite la titolazione di Karl Fischer.

Nel Capitolo 1 si è riportato il processo di liofilizzazione, i suoi vantaggi e svantaggi nelle diverse applicazioni e sono state analizzate diverse possibili applicazioni di tale tecnica per fini farmaceutici. Particolare attenzione è stata volta alla scelta e all'importanza degli eccipienti.

Nel Capitolo 2 si presentano i materiali e gli strumenti utilizzati.

Nel Capitolo 3 della trattazione vengono presentati e discussi gli esiti delle analisi di laboratorio.

Nel Capitolo 4 si espongono le conclusioni a seguito dei risultati ottenuti.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Materiali utilizzati e preparazione delle soluzioni

Per questo studio sono stati utilizzati undici eccipienti che sono riportati di seguito:

- D(-)-mannitolo, formula bruta $C_6H_{14}O_6$, massa molecolare 182,17 g/mol, purezza 98%, di Chem-Lab.
- Glicina, formula bruta $C_2H_5NO_2$, massa molecolare 75,07 g/mol, purezza $\geq 98,5\%$ di SIGMA-ALDRICH.
- Destrano 40, formula bruta $(C_6H_{10}O_5)_n$, massa molecolare 40000 g/mol, PanReac AppliChem.
- D-(+)-cellobiosio, formula bruta $C_{12}H_{22}O_{11}$, massa molecolare 342,30 g/mol, purezza $\geq 99\%$ di SIGMA.
- D-(+)- trealosio diidrato, formula bruta $C_{12}H_{22}O_{11}$, massa molecolare 378,33 g/mol, purezza $\geq 99\%$ di SIGMA.
- L-isoleucina, formula bruta $C_6H_{13}NO_2$, massa molecolare 131,17 g/mol, purezza $\geq 98\%$ di SIGMA-ALDRICH.
- L-metionina, formula bruta $C_5H_{11}NO_2S$, massa molecolare 149,21 g/mol, purezza $\geq 98\%$ di SIGMA-ALDRICH.
- Polyethyleneglycol 400 per sintesi, di SIGMA-ALDRICH.
- (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina, di ALDRICH.
- Lattosio, formula bruta $C_{12}H_{22}O_{11}$, massa molecolare 342,30 g/mol, di Fluka.
- Saccarosio, formula bruta $C_{12}H_{22}O_{11}$, massa molecolare 342,30 g/mol, di Fisher Chemical.

Sono state preparate, per ciascuno degli eccipienti citati, delle soluzioni aventi come solvente acqua bidistillata.

Partendo da una soluzione con una concentrazione elevata di soluto (pari a 100 mg/ml o 10 mg/ml), sono stati preparati campioni da 10 mg/ml e 1 mg/ml ottenuti da una diluizione di quella iniziale più concentrata.

Le concentrazioni massime adottate per ogni eccipiente sono riportate nella Tabella 2.1.

Tabella 2.1: Elenco dei soluti utilizzati con le rispettive concentrazioni massime.

ECCIPIENTE	CONCENTRAZIONE MASSIMA [mg/ml]
Lattosio	100
Mannitolo	100
Metionina	10
Glicina	100
Isoleucina	10
PEG	100
Trealosio	100
Destrano	100
Saccarosio	100
Cellobiosio	100
(2-idrossipropil)- β -ciclodestrina	100

L'isoleucina presenta una solubilità in acqua pari a 34 g/l a una temperatura di 293 K ed è stata quindi scelta come soluzione a maggiore concentrazione quella a 10 mg/ml. Per lo stesso motivo anche per la metionina è stata scelta come concentrazione massima quella di 10 mg/ml poiché presenta una solubilità in acqua pari a 57 g/l a 293 K.

Tutti gli altri soluti presentano invece una solubilità maggiore di 100 mg/ml ed è quindi stato possibile adottare soluzioni più concentrate.

2.2 Caratterizzazione termica

Per prima cosa è stata fatta una caratterizzazione termica di ciascuna soluzione andando a valutare la temperatura di transizione vetrosa o il punto di eutettico (sulla base della natura amorfa o cristallina dell'eccipiente in esame); questo risulta utile per stimare un intervallo di temperatura massima per evitare di provocare il collasso della matrice solida durante la fase di essiccamento primario del processo di liofilizzazione. Per fare questo sono state utilizzate due tecniche: la calorimetria differenziale a scansione e il crio-microscopio.

2.2.1 Calorimetria differenziale a scansione

La tecnica di calorimetria differenziale a scansione, permette di analizzare fenomeni differenti quali il congelamento, la sublimazione, la condensazione, transizioni vetrose, reazioni esotermiche ed endotermiche valutandone le corrispondenti cinetiche, entalpie di transizione e temperature.

L'analisi termica è stata fatta utilizzando lo strumento DSC Q200 (TA Instruments, New Castle, DE, USA).

Per ciascuna prova è stato preparato un padellino Tzero di alluminio della TA Instruments andando a riporvi all'interno la soluzione in esame (la quantità minima da trattare è di circa 12 mg fino ad un massimo di circa 25 mg) il quale è poi stato chiuso ermeticamente con un

coperchio Tzero hermetic Lid di alluminio della TA Instruments, attraverso lo strumento Tzero PRESS (TA Instruments).

A seguire, viene posizionato il portacampione all'interno di una camera contenente due postazioni collegate ad un sistema di termocoppie: su una viene posizionato il campione in esame mentre sulla seconda è posizionato un padellino vuoto di riferimento (Figura 2.1).

La camera viene poi chiusa ermeticamente per evitare interazioni con l'ambiente esterno che andrebbero a compromettere i risultati della prova (Figura 2.2). Viene impostato il programma termico tramite computer e un flusso continuo di azoto garantisce un'atmosfera inerte.

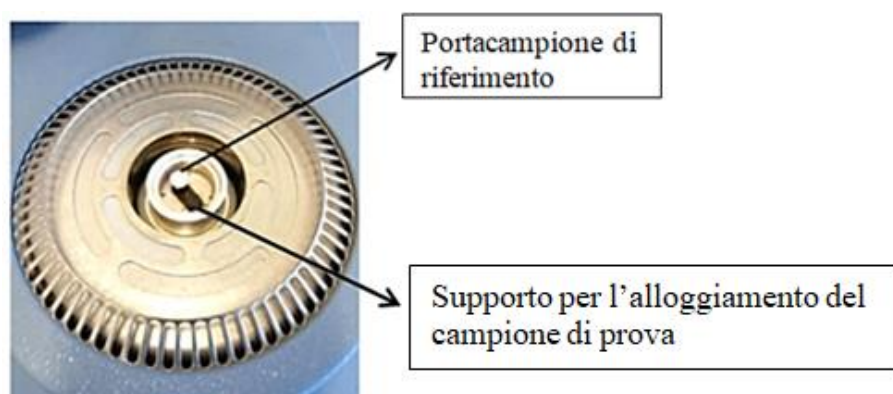


Figura 2.1: Camera di alloggiamento dei due padellini in alluminio (camera aperta per l'inserimento del campione da analizzare).



Figura 2.2: Strumenti utilizzati per l'analisi DSC: in particolare, nel riquadro in rosso è evidenziata la camera chiusa e, nel dettaglio circondato in azzurro, il punto di caricamento del campione (particolare interno in Figura 2.1).

Durante la prova vi è un trasferimento di calore volto a portare i due padellini nella stessa condizione di temperatura: durante il test vi sono delle variazioni di flusso termico tra i due a causa di fenomeni dovuti al materiale da esaminare. I valori termici rilevati dal sistema di termocoppie vengono inviati ad un elaboratore che li elabora attraverso un apposito software al fine di generare i risultati.

È stata scelta una rampa termica che prevede il raggiungimento di equilibrio a 25 °C, il raffreddamento fino a -60 °C a una velocità di 1 °C/min, il mantenimento a tale temperatura per un minuto e il successivo riscaldamento fino a 25 °C con una velocità di 5 °C/min.

L'asse delle ascisse dei grafici ottenuti rappresenta la temperatura mentre quello delle ordinate il flusso di calore.

La presenza di un punto di flesso nella parte inferiore del grafico evidenzia la presenza di una transizione vetrosa mentre una parabola con concavità verso l'alto corrisponde a un punto di eutettico.

2.2.2 Crio-microscopio

Il crio-microscopio, quello utilizzato è stato il BX51 (Olympus Europa, Amburgo, Germania) con regolatore di temperatura PE95-T95 (Linkam, Scientific Instruments, Tadworth, Surrey, Regno Unito) riportato in Figura 2.3, è uno strumento che permette di rilevare la temperatura di collasso di una soluzione. Viene impostata una rampa di congelamento a 5 °C/min fino a una temperatura di -60 °C a pressione atmosferica. Per permettere tale congelamento si utilizza l'azoto liquido, il quale viene caricato all'interno di un dewar e aspirato con una pompa.

A seguito del congelamento si procede con un abbassamento di pressione fino a un valore di circa 10-11 Pa tramite una pompa da vuoto e il campione viene riscaldato per consentirne l'essiccamento. In questa fase si registrano delle immagini dell'andamento del fronte della goccia nel tempo per rilevarne il collasso e la temperatura associata.

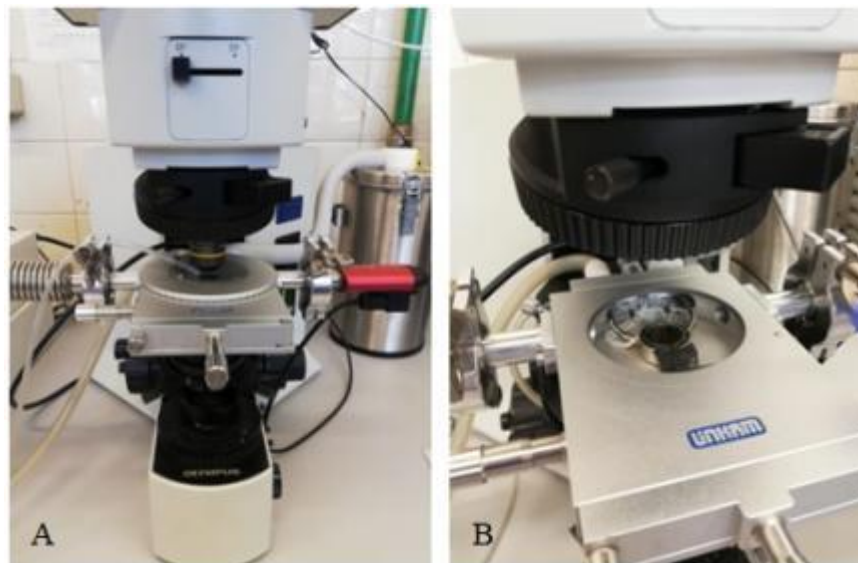


Figura 2.3: Strumento FDM con camera chiusa, lente posta sul vetrino in modo da permettere la visione dell'immagine della goccia tramite software Lynksys32 su pc e cannula per evitare la formazione della condensa (A). Particolare a camera aperta del sito di alloggiamento del vetrino su cui viene posizionata la goccia da trattare (B).

Con questo strumento è possibile riprodurre condizioni analoghe a quelle interne al liofilizzatore consentendo la rilevazione della temperatura critica (T_c) a cui avviene il collasso della struttura che risulta essere fondamentale per capire quale sia la massima temperatura raggiungibile durante la fase di essiccamento primario del campione.

Lo studio combinato della DSC e della FDM consente di definire un intervallo di temperature (durante la DSC) per passare poi a una definizione più precisa di temperatura critica (attraverso la FDM).

Se la soluzione è amorfa la T_c sarà di poco superiore alla temperatura di transizione vetrosa rilevata con la calorimetria differenziale a scansione mentre, in caso di un cristallino, questa sarà all'incirca pari a quella di eutettico (Meister e Gieseler, 2009).

2.3 Impianto di liofilizzazione

Ciascuna soluzione elencata precedentemente è stata liofilizzata utilizzando un impianto di liofilizzazione REVO® (Millrock Technology, Kingston, USA) (Figura 2.4).

Questo è costituito da una camera di liofilizzazione in acciaio inossidabile al cui interno vi sono cinque ripiani, su cui vengono disposti i flaconi da trattare, i quali hanno una dimensione 12" x 24". La camera di liofilizzazione è collegata ad un condensatore che ha la funzione di condensare il vapore, prodotto durante la fase di sublimazione che costituisce l'essiccamento primario, sfruttando le basse temperature delle superfici che lo compongono.

Gli incondensabili vengono poi rimossi tramite una pompa da vuoto collegata al condensatore stesso.

Nello strumento sono presenti un sensore di pressione termo-conduttivo (Pirani tipo PSG-101-S, Inficon, BadRagaz, Svizzera) e uno capacitivo (Baratron tipo 626A, MKS instruments, Andover, MA, USA). Il primo tipo di sensore è costituito da un filamento di metallo surriscaldato ad alta temperatura e messo in contatto con il gas che si vuole studiare; le molecole di gas, urtando il filamento riscaldato, ne asportano calore per conduzione. La velocità di estrazione di calore dipende dalla conducibilità termica del gas che, a sua volta, è funzione della pressione in camera. Il secondo tipo di sensore, invece, è costituito da una membrana che separa una zona di altissimo vuoto e una che è rappresentata dalla sezione in esame; quando la pressione nelle due sezioni analizzate è la stessa la membrana risulta indeformata mentre quando questa condizione di equilibrio viene a mancare vi è la deformazione, funzione della differenza di pressione.

Quando le due sonde rilevano lo stesso valore di pressione si ha il raggiungimento del termine dell'essiccamento primario.

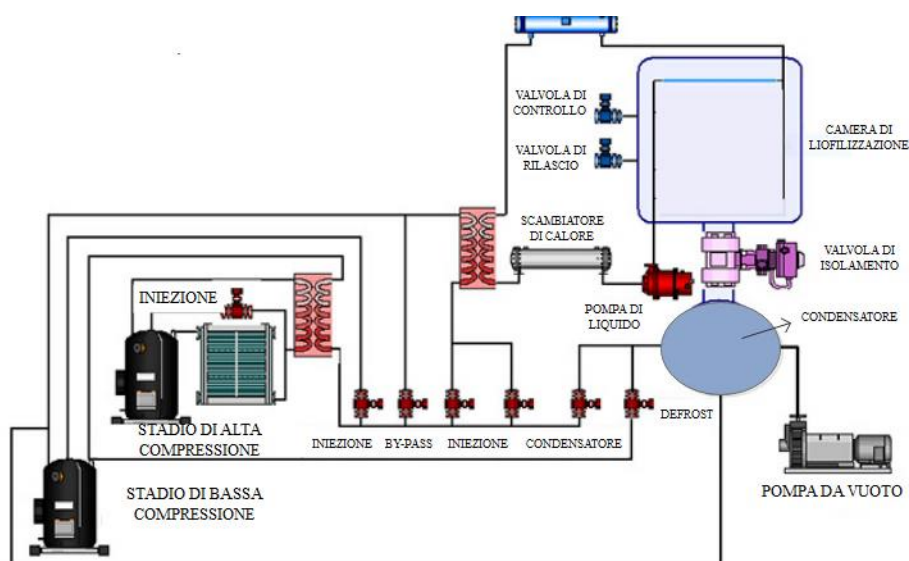


Figura 2.4: Schema di impianto Revo [modificato da fonte ufficiale Millrock technology].

Nella Tabella 2.2 sono riportati alcuni valori relativi al sistema Revo.

Tabella 2.2: Valori tratti da fonte ufficiale Millrock technology .

Dimensione del ripiano	305 mm * 610 mm
Temperatura raggiunta dal condensatore	-53 °C o -85 °C
Capacità del condensatore	0,03 m ³
Portata volumetrica di condensazione	0,833 l/h
Range di temperatura del ripiano	Da -45 °C a 65 °C (-53 °C al condensatore) Da -70 °C a 65 °C (-85 °C al condensatore)
Sensori di temperatura	4 termocoppie di tipo T
Pompa da vuoto	Resistente alla corrosione
Sistema di controllo	PC(PLC con software Opt-Dry
Dimensione cabinet	Larghezza= 0,889 m Profondità= 1,168 m Altezza= 1,905 m
Controllo del vuoto	Pirani con elettrovalvola e valvola a spillo

2.4 Liofilizzazione delle soluzioni campione

A seguito dell'analisi termica è stata effettuata la liofilizzazione dei campioni.

Sono state preparate, per ciascuno degli eccipienti in esame, le soluzioni come precedentemente descritto. Successivamente sono stati riempiti i flaconi di tipo 2R, della marca SB, con 300 µl delle soluzioni preparate. Questi sono stati caricati su di un vassoio con il tappo forato semi-chiuso: questo accorgimento è di estrema importanza poiché consente al vapore prodotto di fuoriuscire dal flacone e raggiungere il condensatore. I flaconi contenenti i campioni da analizzare vengono disposti nella parte centrale del vassoio mentre attorno vengono caricati dei flaconi vuoti che consentono di mantenere una struttura ferma e compatta (Figura 2.5).

Si è scelto, inoltre, di disporre delle termocoppie nei campioni contenenti le soluzioni più concentrate al fine di monitorare nel tempo l'andamento della temperatura a cui erano sottoposti.

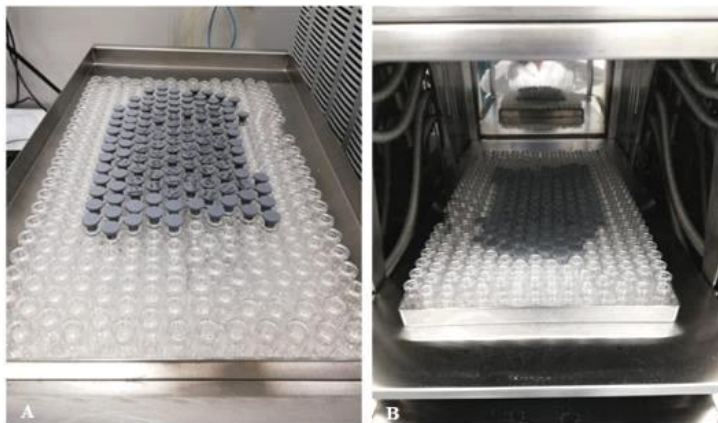


Figura 2.5: Particolare della disposizione dei flaconi prima di essere caricate nel liofilizzatore in cui è possibile notare il tappo semi-chiuso (A) e vassoio caricato nella camera del liofilizzatore (B).

Per prima cosa si è effettuato il congelamento fino al raggiungimento di $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 120 minuti. Al termine di questa fase si procede con l'essiccamento primario e, quindi, con l'abbassamento della pressione fino ad un valore di 10 Pa (scala Baratron) impostando la temperatura del ripiano a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il tempo per cui va mantenuta questa temperatura deve consentire alla sonda Baraton e Pirani di raggiungere la stessa rilevazione di pressione poiché, come espresso precedentemente, questo è sinonimo della conclusione di questa prima fase di essiccamento. L'essiccamento secondario è avvenuto portando la temperatura del ripiano a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 5 ore e mantenendola per 12 ore.

Al termine della liofilizzazione i tappini vengono chiusi immediatamente, ancora prima di estrarre i flaconi dalla camera, in modo da evitare l'ingresso dell'umidità che andrebbe a compromettere la prova.

2.5 Titolazione di Karl Fischer

A seguito della liofilizzazione risulta interessante valutare il contenuto residuo di umidità nei campioni andando ad utilizzare lo strumento *Karl Fischer titrator* (CA-31 Moisture Meter, Mitsubishi Chemical Analytech) e applicando la titolazione coulometrica di Karl Fisher.

La titolazione è la determinazione di una sostanza specifica (analita) contenuta in un campione di soluzione con concentrazione nota mediante l'aggiunta controllata di un reagente (titolante) sulla base di una reazione chimica completa che avviene tra la sostanza e il reagente. Il titolante viene aggiunto fino a quando la reazione è completa (punto di equivalenza).

Attraverso la titolazione di Karl Fisher si possono determinare contenuti di umidità elevati (in questo caso si parla di "titrimetria") oppure si possono rilevare bassi contenuti in ppm (come nel caso in esame, parlando di "coulometria") (Zhou et al., 2010).

Nella titolazione coulometrica, il campione da analizzare viene aggiunto in una soluzione elettrolitica costituita da ioni ioduro, biossido di zolfo, una base e un solvente alcolico.

L'ossidazione elettrolitica provoca la produzione di iodio secondo la seguente reazione:



Nel caso di titolazione volumetrica (per elevate quantità di acqua nel campione) lo iodio viene aggiunto come soluzione titolante mentre in quella coulometrica di nostro interesse questo è generato elettroliticamente.

Quando lo iodio prodotto secondo la reazione appena indicata viene a contatto con l'acqua contenuta nel campione, questa viene titolata seguendo la reazione di Karl Fisher:



Fino a quando è presente acqua nella cella di reazione, lo iodio viene generato seguendo la reazione [2.1].

Una volta esaurita tutta l'acqua vi è un eccesso di iodio che viene rilevato da un doppio elettrodo di platino nell'analita.

Secondo la legge di Faraday, la quantità di iodio prodotta è proporzionale alla corrente che si viene a generare e ciò significa che è possibile rilevare il contenuto di acqua sulla base della

quantità di Coulomb necessari per far avvenire l'ossidazione elettrolitica (1 mg di acqua corrisponde a 10,71 Coulomb).

In Figura 2.6 è riportata un'immagine rappresentativa dello strumento utilizzato in laboratorio.

Durante l'analisi è possibile utilizzare come solvente Hydranal®-Water standard 10.0 ppm per andare a testare la funzionalità del titolatore mentre per soluzioni contenenti mannitolo, destrano o glicina andrebbe utilizzata la formammide.

Per la valutazione della percentuale di umidità residua nel campione sono state utilizzate le seguenti formule:

- Nel caso in cui Hydranal®-Water standard 10.0 è utilizzato per testare la funzionalità del titolatore e la soluzione del Karl Fischer è aggiunta al flacone contenente la struttura essiccata:

$$g_{H_2O\ tot} = \frac{E * 10^{-6} * (B + g_{solido})}{C}$$

$$\% \text{ umidità} = \frac{g_{H_2O\ tot}}{g_{solido} - g_{H_2O\ tot}} * 100$$

- Nel caso in cui il solvente aggiunto nel flacone in esame fosse formammide:

$$g_{H_2O\ tot} = \frac{E * 10^{-6} * (B + g_{solido})}{C}$$

$$g_{H_2O\ solido} = g_{H_2O\ tot} - \frac{g_{H_2O\ b} * 10^{-6} * B}{m_b}$$

$$\% \text{ umidità} = \frac{g_{H_2O\ solido}}{g_{solido} - g_{H_2O\ solido}} * 100$$

g_{solido} rappresenta la quantità di campione in esame, B la quantità di solvente iniettato nel flacone, C è la quantità di soluzione iniettata nella cella di titolazione, E è il valore di umidità rilevata dallo strumento, m_b rappresenta quantità di formammide iniettata in cella durante la determinazione del bianco all'inizio della prova (valore mediato sulla base delle tre prove di bianco effettuate) mentre $g_{H_2O\ b}$ indica il valore di umidità rilevato dallo strumento durante la prima fase di determinazione del bianco.



Figura 2.6: Rappresentazione di Karl Fischer titrator (CA-31 Moisture Meter, Mitsubishi Chemical Analytech).

2.6 Colture cellulari

Le due linee cellulari utilizzate in questo studio sono state coltivate seguendo i protocolli standard per la coltura delle cellule di mammifero con tecnica sterile a 37 °C in un'atmosfera con il 5% di CO₂ all'interno di flaconi da 75 cm² non trattati (Corning).

Il terreno di coltura per ogni linea cellulare è stato integrato con siero fetale bovino (FBS), inattivato tramite riscaldamento ad una temperatura di 56 °C per 30 minuti per inibire l'azione del complemento, senza influire sulle proprietà dell'FBS, e con l'1% di penicillina/streptomina (P/S, 10000 unità di penicillina e 10 mg di streptomina/ml, Sigma).

I linfociti (IST-EBV-TW6B) sono stati acquistati dalla banca cellulare IRCCS AOU dall'IST San Martino (Genova, Italia). Sono stati mantenuti in terreno di coltura cellulare advanced RPMI 1640 (Gibco) integrato con il 20% di FBS (Gibco) e l'1% di L-glutammina 200 mM (Q, Lonza), con una densità cellulare compresa tra 9×10^4 e 9×10^5 cellule/ml. Dopo 20 giorni di utilizzo, il terreno viene nuovamente integrato con l'1% di Q e l'1% di soluzione di amminoacidi non essenziali (Sigma).

La linea cellulare Daudi (ATCC® CCL-213TM), derivante dal sangue periferico di un paziente affetto dal linfoma di Burkitt, è stata coltivata nel terreno di coltura RPMI 1640 (ATCC) integrato con il 10% di FBS (ATCC), con una densità cellulare compresa tra 3×10^5 e 3×10^6 cellule/ml.

2.6.1 Citotossicità

L'analisi della citotossicità è stata effettuata sulle due linee cellulari: quella di linfociti immortalizzati e quella di linfoma, Daudi. Entrambe le linee sono state sottoposte al trattamento con 100, 10 e 1 mg/ml di ciascun eccipiente per 24 e 48 ore. La citotossicità è stata valutata mediante il test di proliferazione cellulare WST-1. 2×10^5 cellule per ogni ml di trattamento sono state centrifugate, risospese in 1, 10 e 100 mg/ml di soluzione contenente eccipienti e una quantità pari a 100 μ l è stata posizionata all'interno di ciascun pozzetto della piastra di coltura da 96 pozzetti (GreinerBio-one, 96 pozzetti per coltura in sospensione). Dopo 20 e 44 ore di incubazione a 37 °C e con una concentrazione di CO₂ del 5%, 10 μ l di reagente WST-1 (CELLPRO-RO Roche) sono stati aggiunti in ciascun pozzetto e, dopo altre 4 ore di incubazione, nelle stesse condizioni è stata rilevata l'assorbanza a 450 nm del formazano attraverso lo spettrofotometro per micropiastre (Multiskan Go microplate spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) utilizzando un riferimento di 620 nm. Sono stati effettuati esperimenti indipendenti in triplicato tre volte per ciascuna linea cellulare, tempo, concentrazione ed eccipiente e i risultati sono stati normalizzati al controllo.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Analisi termica

La prima analisi che è stata effettuata è stata quella di tipo termico.

Come esposto precedentemente, questo tipo di analisi è stata fatta attraverso un'analisi DSC e FDM andando ad analizzare le diverse soluzioni di interesse.

La Figura 3.1 mostra, a titolo di esempio, il grafico ottenuto alla DSC della soluzione contenente cellobiosio in concentrazione di 100 mg/ml nel quale è evidenziato il valore di transizione vetrosa rilevato mentre la Figura 3.2 riporta l'avanzamento del fronte della goccia a diverse concentrazioni all'aumentare della temperatura evidenziando, in particolare, la T_c rilevata attraverso l'FDM.

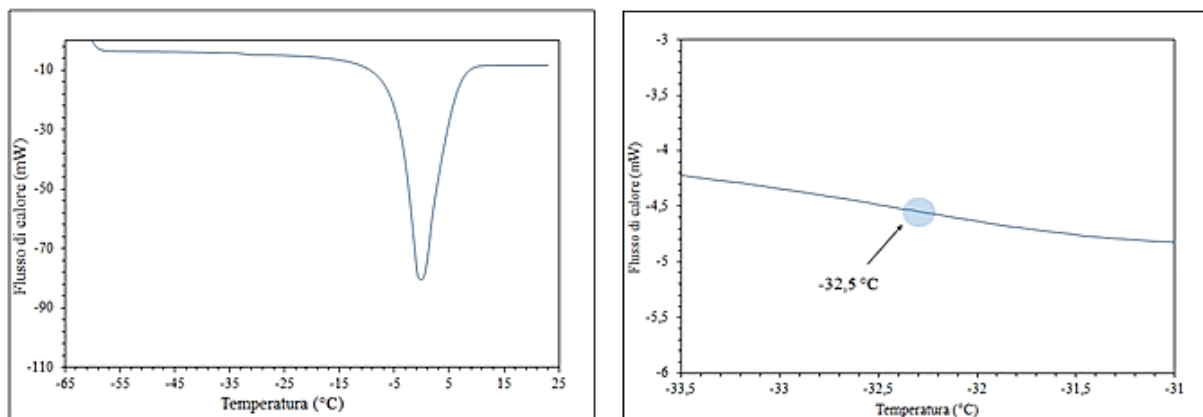


Figura 3.1: Soluzione contenente cellobiosio a concentrazione 100 mg/ml: sulla destra il valore di T_g rilevato con la DSC.

La soluzione cellobiosio-acqua bidistillata avente una concentrazione pari a 100 mg/ml, ha evidenziato un flesso in corrispondenza di $-32,5$ °C a cui corrisponde il valore di temperatura di transizione vetrosa.

La temperatura di transizione vetrosa, rilevata alla DSC, indica la temperatura alla quale la concentrazione massima ghiacciata della soluzione diventa vetrosa; a temperature maggiori si ha la mobilità del sistema il quale passa a un comportamento gommoso o fase liquida (Pansare e Patel, 2016).

Il rilevamento del collasso della struttura è facilmente visibile dalle immagini ottenute al microscopio poiché, quando esso avviene, è possibile notare la formazione di fessure con conseguente variazione di colore dell'immagine riprodotta (Meister e Gieseler, 2009).

Per quanto riguarda la soluzione più concentrata, ciò che emerge dalla Figura 3.2 C è che in corrispondenza di una temperatura pari a $-26,3$ °C si sono iniziati a rilevare i primi segni di collasso della struttura solida. Tale valore di temperatura corrisponde alla temperatura critica di collasso ed è in linea con quanto è emerso dall'analisi svolta alla DSC.

Per la soluzione avente una concentrazione di 10 mg/ml di cellobiosio, il collasso è avvenuto in corrispondenza dei $-28,2$ °C (Figura 3.2 F) mentre, nel caso della soluzione a

1 mg/ml non vi è la formazione di alcuna struttura solida: a temperature molto basse, di pochi gradi al di sopra dei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, vi è il distacco del materiale essiccato senza formazione di matrice solida che, pertanto, tende ad essere trasportato dal flusso di vapore.

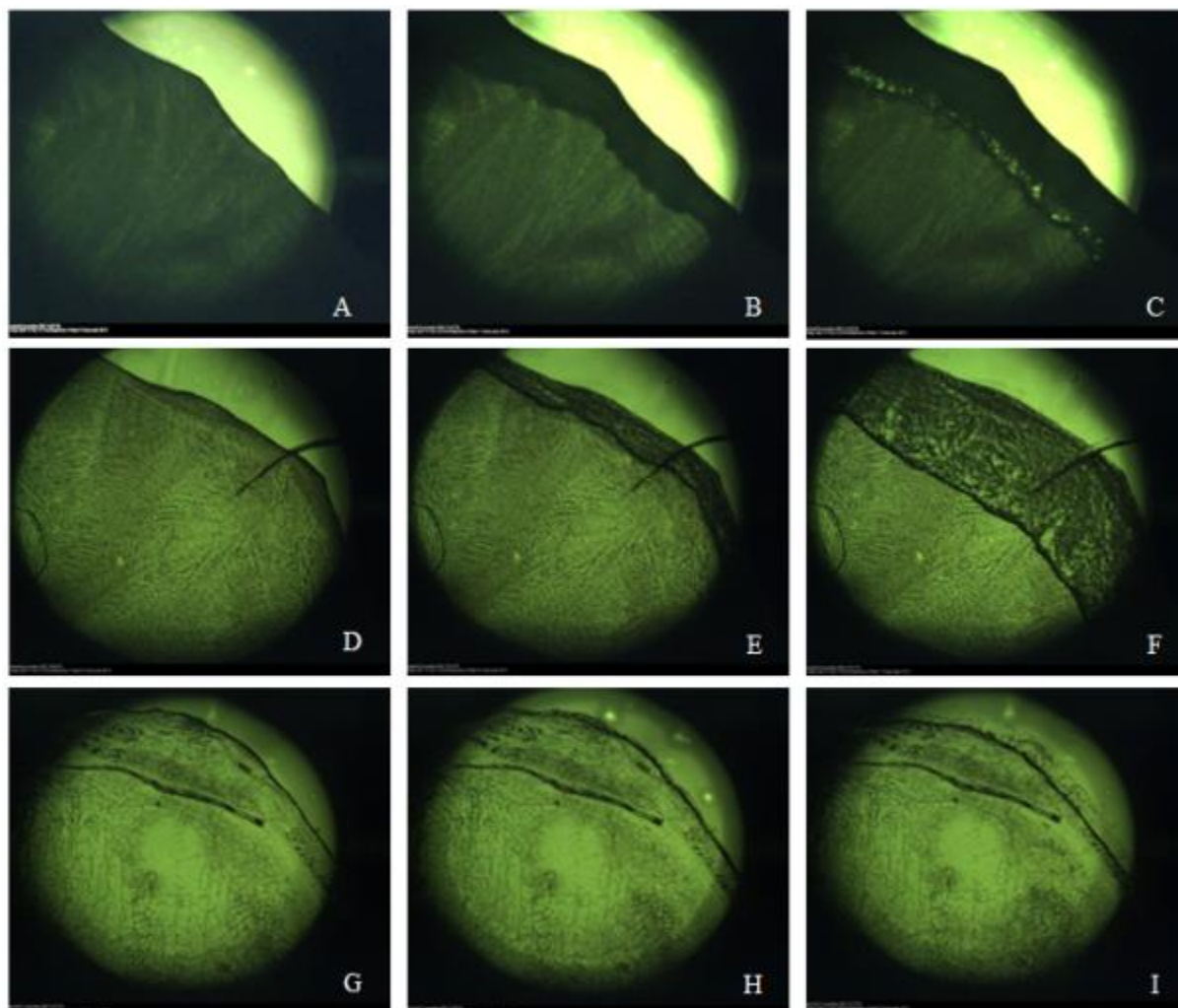


Figura 3.2: Andamenti del fronte della goccia in condizioni di pressione di circa 10 Pa. Le immagini A-B e C fanno riferimento alla soluzione 100 mg/ml, le immagini D-E ed F si riferiscono alla soluzione 10 mg/ml mentre G-H e I a quella avente una concentrazione di 1 mg/ml.

In Tabella 3.1 sono riassunti i valori di transizione vetrosa e le temperature di collasso relative alla soluzione contenente cellobiosio a diverse concentrazioni.

Tabella 3.1: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti cellobiosio.

Cellobiosio - acqua bi distillata	T_g [$^{\circ}\text{C}$]	T_c [$^{\circ}\text{C}$]
100 mg/ml	-32,5	-26,3
10 mg/ml	-33,3	-28,2
1 mg/ml	-35,2	Non vi è la formazione di matrice solida

In alcuni casi di eccipienti amorfi non è stato rilevato alcun andamento riconducibile ad un flesso nel grafico della DSC: questo è stato riscontrato soprattutto nei casi di soluzioni molto diluite.

Tale fenomeno è legato al fatto che essendo la T_g' un valore dipendente da una variazione di calore specifico (C_p), è possibile che questa variazione non sia evidente in maniera marcata poiché varia il C_p dell'eccipiente ma non di tutto il prodotto che costituisce il campione che, nei casi di soluzioni molto diluite, è rappresentato per lo più da ghiaccio.

Il valore di T_g' non varia significativamente con la concentrazione della miscela: durante la prima fase della liofilizzazione, ovvero il congelamento, avviene la separazione dell'acqua sotto forma di ghiaccio e, in un secondo momento, vi è la formazione di una fase solida costituita dal soluto rappresentato dall'eccipiente. Questo può precipitare in forma cristallina a una specifica temperatura di fusione (T_c) oppure come solido amorfo, evidenziando una specifica T_g' , con una certa quantità di acqua libera che è indipendente dalla concentrazione in esame.

La temperatura di collasso evidenziata tramite l'FDM, invece, è legata a fenomeni cinetici e strutturali e quindi cambia al variare della concentrazione; in particolare quanto più la soluzione è diluita tanto più facilmente la struttura tenderà a collassare.

La Tabella 3.2 rappresenta i dati ottenuti tramite l'analisi DSC ed FDM delle soluzioni contenenti isoleucina e acqua bidistillata.

L'analisi FDM della soluzione avente una concentrazione di 10 mg/ml di tale aminoacido, non ha rilevato segni di collasso della struttura prima della fusione mentre, analogamente al caso precedente, per soluzioni diluite non vi è la formazione di una struttura solida.

Tabella 3.2: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti isoleucina.

Isoleucina	T_c [°C]	T_c [°C]
10 mg/ml	0,9	Non si sono rilevati segni di collasso prima della fusione
1 mg/ml	Non rilevato	Non vi è la formazione di matrice solida

La Tabella 3.3 rappresenta i dati ottenuti tramite l'analisi DSC ed FDM delle soluzioni contenenti lattosio e acqua bidistillata.

Durante l'analisi DSC per quasi tutte le soluzioni contenenti lattosio è stato rilevato un valore di transizione vetrosa compreso tra i -33 °C e i -31 °C che rileva il comportamento amorfo. Dai dati emersi dalla letteratura questo risulta avere un valore di T_g' di circa -28 °C che è confermato dalle analisi effettuate (Baheti et al., 2010).

Tabella 3.3: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti lattosio.

Lattosio	T_g' [°C]	T_c [°C]
100 mg/ml	-31,6	-26,2
10 mg/ml	-31,7	-27,2
1 mg/ml	-32	Non vi è la formazione di matrice solida

La Tabella 3.4 rappresenta i dati ottenuti tramite l'analisi DSC ed FDM delle soluzioni contenenti metionina e acqua bidistillata.

Le soluzioni contenenti questo tipo di amminoacido hanno evidenziato, anche in questo caso, la formazione di una struttura solida del prodotto liofilizzato soltanto nel caso più concentrato, corrispondente a 10 mg/ml di metionina.

Tabella 3.4: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti metionina.

Metionina	T _g ' [°C]	T _e [°C]	T _c [°C]
10 mg/ml	-	0,03	-0,2
1 mg/ml	-32	-	Non vi è la formazione di matrice solida

In Tabella 3.5 sono riportati i dati ottenuti tramite l'analisi DSC ed FDM delle soluzioni contenenti saccarosio e acqua bidistillata.

Il saccarosio, disaccaride formato da due monosaccaridi rispettivamente glucosio e fruttosio, è presente sempre in forma amorfa e presenta un valore di transizione vetrosa pari a -32 °C (Horn e Friess, 2018). Quanto emerge dalle analisi DSC effettuate nelle tre concentrazioni è un valore di T_g' compreso tra i -35 °C e i -32 °C che conferma il dato di letteratura.

Soltanto le soluzioni a 100 mg/ml e 10 mg/ml hanno portato alla formazione di struttura solida al termine del processo di essiccaamento.

Tabella 3.5: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti saccarosio.

Saccarosio	T _g ' [°C]	T _e [°C]
100 mg/ml	-35,5	-31,2
10 mg/ml	-32,2	-32,2
1 mg/ml	Non rilevato	Non vi è la formazione di matrice solida

La Tabella 3.6 rappresenta i dati ottenuti tramite l'analisi DSC ed FDM delle soluzioni contenenti mannitolo e acqua bidistillata.

Il mannitolo è un composto che presenta fenomeno di polimorfismo. Con questo termine si indica il fenomeno per cui un composto chimico assume, cristallizzandosi, proprietà fisiche e strutture diverse presentando diverse fasi cristalline.

Tabella 3.6: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti mannitolo.

Mannitolo	T _g ' [°C]	T _e [°C]	T _c [°C]
100 mg/ml	-	0,5 -25,7	-1,4
10 mg/ml	-30,8	-3,2 -25,8	-20,8
1 mg/ml	Non rilevato	Non rilevato	Non vi è la formazione di matrice solida

I risultati ottenuti tramite l'analisi DSC ed FDM delle soluzioni contenenti glicina e acqua bidistillata sono riportati in Tabella 3.7. La glicina, a seconda delle condizioni di essiccamento, può portare allo sviluppo di forme amorfe o cristalline e, di conseguenza, sono indicati i relativi valori di T_g' e T_c .

Tabella 3.7: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti glicina.

Glicina	T_g' [°C]	T_e [°C]	T_c [°C]
100 mg/ml	-10,5	-	-3,1
10 mg/ml	-	-5,4	-26,4
1 mg/ml	-	-5,9	Non vi è la formazione di matrice solida

In linea generale è emerso che per ogni soluzione avente una concentrazione inferiore a 10 mg/ml (indipendentemente dall'eccipiente scelto) non vi era la formazione di una struttura compatta poiché non c'è sufficiente resistenza meccanica a causa del basso quantitativo di soluto.

La Tabella 3.8 riporta i valori ottenuti tramite l'analisi DSC ed FDM delle soluzioni contenenti trealosio e acqua bidistillata.

I risultati emersi durante l'analisi termica confermano la natura amorfa del trealosio e la sua temperatura di transizione vetrosa intorno ai -28 °C (Horn e Friess, 2018). Anche in questo caso la formazione di una struttura solida a seguito della fase di essiccamento è stata riscontrata per soluzioni aventi una concentrazione di soluto superiore a 1 mg/ml.

Tabella 3.8: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti trealosio.

Trealosio	T_g' [°C]	T_c [°C]
100 mg/ml	-31,8	-27,2
10 mg/ml	-31,1	-29,2
1 mg/ml	Non rilevato	Non vi è la formazione di matrice solida

La Tabella 3.9 rappresenta i dati ottenuti tramite l'analisi DSC ed FDM delle soluzioni contenenti destrano e acqua bidistillata.

Il destrano, polimero ramificato del glucosio, presenta una natura amorfa e una temperatura di transizione vetrosa pari a circa -10 °C (Baheti et al., 2010). La soluzione a 100 mg/ml ha permesso di rilevare un valore di T_g' pari a -13,4 °C, confrontabile con il dato tratto dall'analisi di letteratura, così come quella a concentrazione 10 mg/ml per la quale è emerso un valore pari a -13,8 °C.

Tabella 3.9: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti destrano.

Destrano	T_g' [°C]	T_c [°C]
100 mg/ml	-13,4	-6,5
10 mg/ml	-13,8	-10,3
1 mg/ml	Non rilevato	Non vi è la formazione di matrice solida

La Tabella 3.10 rappresenta i dati ottenuti tramite l'analisi DSC ed FDM delle soluzioni contenenti (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina e acqua bidistillata.

Tabella 3.10: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite DSC e FDM per soluzioni contenenti (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina.

(2-idrossipropil)-β-ciclodestrina	T_g' [°C]	T_c [°C]
100 mg/ml	-15,8	-11,4
10 mg/ml	-16,6	-12,2
1 mg/ml	Non rilevato	Non vi è la formazione di matrice solida

Le soluzioni a base di PEG non hanno portato al rilevamento di particolari andamenti nell'analisi DSC e ne è stato omesso lo studio FDM.

3.2 Liofilizzazione: temperature rilevate alle termocoppie

Le termocoppie utilizzate durante la liofilizzazione hanno permesso di rilevare nel tempo la temperatura risentita dai diversi campioni.

In Tabella 3.11 sono riportati i valori relativi ai campioni presi in esame: in particolare sono indicati gli intervalli di temperatura durante la fase di congelamento, durante l'essiccamento primario e quello secondario.

Tabella 3.11: Valori rilevati attraverso le termocoppie durante il processo di liofilizzazione.

CAMPIONE	CONGELAMENTO [°C]	ESSICCAMENTO PRIMARIO [°C]	ESSICCAMENTO SECONDARIO [°C]
Cellobiosio (100 mg/ml)	19,7 / -41,8	-36,5 / -18,6	14,9 / 20,5
Lattosio (100 mg/ml)	19,2 / -42,9	-36 / -19,2	14,2 / 19,8
Metionina (10 mg/ml)	19,6 / -42,4	-38,1 / -18,4	14,7 / 20,5
(2-idrossipropil)- β -ciclodestrina (100 mg/ml)	20,2 / -41,9	-37,4 / -18,1	15,2 / 21,1
Glicina (100 mg/ml)	19,1 / -43,2	-37,6 / -19,7	14,4 / 19,5
Mannitolo (100 mg/ml)	19,9 / -42,2	-37,2 / -18,8	14,9 / 20,5
Trealosio (100 mg/ml)	19,9 / -41,8	-35,6 / -18,4	15 / 20,5
Saccarosio (100 mg/ml)	20 / -41,8	-36,4 / -18,1	15,2 / 20,6
Destrano (100 mg/ml)	20 / -42	-35,1 / -19,1	15,5 / 20,7

3.3 Analisi qualitativa della struttura essiccata

A seguito del processo di liofilizzazione è stata effettuata un'analisi qualitativa della matrice solida venutasi a creare la quale ha assunto aspetti e caratteristiche differenti nei diversi campioni. Di seguito sono riportati i casi di strutture particolari.

La soluzione con una concentrazione di destrano pari a 100 mg/ml ha riportato una struttura in cui è presente un fenomeno definito “minor splashing”: al di sopra della struttura si è venuto a creare un “anello” di materiale essiccato aderente alle pareti del flacone come conseguenza del fatto che parte della soluzione è rimasta a contatto con i lati della parete durante il processo (Figura 3.3) (Patel et al., 2017).

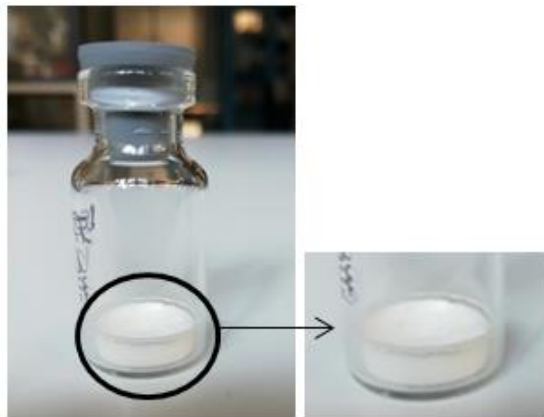


Figura 3.3: Flacone contenente destrano a concentrazione 100 mg/ml.

Lo stesso fenomeno è stato rilevato nel caso di soluzioni contenenti (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina a concentrazione 10 mg/ml, lattosio 100 mg/ml e 10 mg/ml, saccarosio 100 mg/ml, cellobiosio 100 mg/ml e trealosio 100 mg/ml.

Nel campione contenente (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina con concentrazione 100 mg/ml si è riscontrato un fenomeno di rottura della struttura (Figura 3.4). È possibile che una parte dell'acqua presente nel campione non sia congelata per cui gli stress associati alla fase di essiccamento possono portare, come conseguenza, a questo tipo di fenomeno (Patel et al., 2017).



Figura 3.4: Flacone contenente (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina a concentrazione 100 mg/ml.

Analoghi risultati sono stati riscontrati anche nel caso di soluzioni a base di metionina a concentrazione 1 mg/ml e lattosio 1 mg/ml.

Numerose soluzioni aventi una bassa concentrazione di eccipiente hanno presentato delle strutture che, seppur presenti, risultavano essere molto meno compatte rispetto a quelle più concentrate come conseguenza della bassa quantità di solido disperso nella soluzione.

In Figura 3.5 è riportato, a titolo di esempio, la struttura venutasi a creare nel caso della soluzione con trealosio a concentrazione 1 mg/ml.

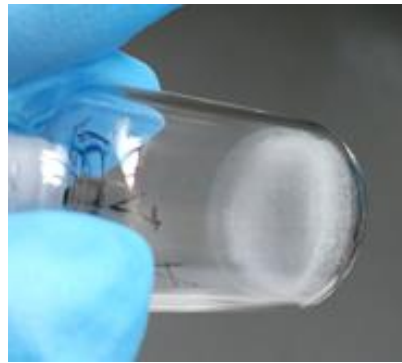


Figura 3.5: Flacone contenente trealosio a concentrazione 1 mg/ml.

Un ulteriore tipo di aspetto è stato rilevato nel campione contenente isoleucina a concentrazione 10 mg/ml.

In questo caso particolare la struttura ha assunto una forma definita “vulcano” in cui la parte centrale della matrice solida risulta essere rialzata rispetto al resto della struttura come evidenziato nella Figura 3.6 (Patel et al., 2017). Se la matrice congelata è aderente alle pareti interne può espandersi dal centro andando a creare di conseguenza una cupola.

I flaconi che presentano questo tipo di aspetto possono comunque considerarsi accettabili.



Figura 3.6: Flacone contenente isoleucina a concentrazione 10 mg/ml.

Alcune soluzioni aventi una concentrazione di eccipiente pari a 1 mg/ml hanno presentato una struttura non aderente al fondo del flacone ma rialzata lungo le pareti come indicato, per esempio, in Figura 3.7. Anche questo è dovuto a una bassa concentrazione di solido e, talvolta, possono esserci stati ulteriori stress subiti durante la fase di scarico dei flaconi dalla camera di liofilizzazione.

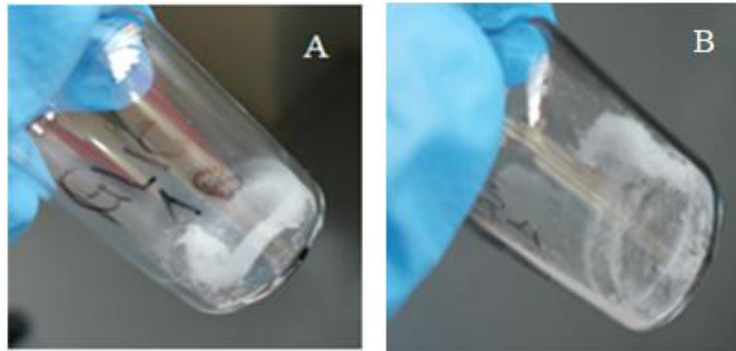


Figura 3.7: Flacone contenente glicina a concentrazione 1mg/ml (A) e mannitolo a concentrazione 1 mg/ml (B).

Lo stesso fenomeno è stato evidenziato nel caso di soluzione contenente isoleucina 1 mg/ml.

Nel caso di soluzioni a base di PEG, indipendentemente dalla concentrazione assunta, non è stata rilevata alcuna struttura solida (Figura 3.8).



Figura 3.8: Flacone contenente PEG a concentrazione 100 mg/ml.

3.4 Valutazione dell'umidità residua

La Tabella 3.12 riporta i valori del residuo di umidità delle soluzioni più concentrate rilevati attraverso la titolazione di Karl Fischer.

Tabella 3.12: Valori di umidità residua % delle soluzioni a massima concentrazione di soluto.

CAMPIONE	RESIDUO DI UMIDITA' %
Cellobiosio (100 mg/ml)	0,9
Lattosio (100 mg/ml)	0,5
Metionina (10 mg/ml)	1,1
(2-idrossipropil)- β -ciclodestrina (100 mg/ml)	0,5
Trealosio (100 mg/ml)	1
Saccarosio (100 mg/ml)	0,7
Isoleucina (10 mg/ml)	0,5

3.5 Risultati analisi di citotossicità

I dati di citotossicità raccolti sono stati analizzati tramite ANOVA a tre vie e hanno mostrato che, quando le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di eccipienti, non ci sono state differenze significative tra le due linee cellulari (linfociti e Daudi) e i tempi di trattamento (24 e 48 h).

A partire da queste analisi, i dati sugli eccipienti e le loro concentrazioni (1, 10 e 100 mg/ml), sono stati valutati utilizzando l'ANOVA a due vie. Poiché l'isoleucina e la metionina avevano una solubilità in acqua inferiore a quella degli altri eccipienti (34 e 57 mg/ml, rispettivamente), sono state effettuate gli esperimenti solo sulle concentrazioni di 10 e 1 mg/ml.

Per effettuare un'analisi affidabile, sono stati valutati separatamente due pool di dati: il primo, rappresentato sul grafico dagli asterischi in nero, ha escluso isoleucina e metionina dal confronto effettuato tra tutti gli altri eccipienti alle tre concentrazioni, il secondo, rappresentato da quelli in rosso, ha confrontato tutti gli eccipienti solo alle concentrazioni di 10 e 1 mg/ml.

Nella Figura 3.9 sono rappresentati i risultati della vitalità dei linfociti dopo 24 ore di trattamento. Confrontando le concentrazioni tra i diversi eccipienti, c'è stata una differenza statisticamente significativa tra 1 e 100 mg/ml ($P \leq 0,001$) e 10 e 100 mg/ml ($P = 0,003$ per il lattosio, $P = 0,018$ per la glicina, e $P \leq 0,001$ per gli altri) per tutti gli eccipienti analizzati a parte destrano e PEG, che non hanno dimostrato alcuna differenza significativa tra le tre concentrazioni testate. La vitalità dei linfociti a 1 e 10 mg/ml era simile per tutti gli eccipienti.

Confrontando i diversi eccipienti alle stesse concentrazioni, a 100 mg/ml la vitalità delle cellule trattate con destrano era considerevolmente più alta di quelle trattate con ciclodestrina

($P = 0,018$) e cellobiosio ($P = 0,049$), mentre a 10 mg/ml, le cellule erano meno influenzate dal trattamento con ciclodestrina se confrontate con glicina ($P = 0,045$). Considerando il secondo gruppo di dati, che ha confrontato tutti gli eccipienti a 1 e 10 mg/ml, i linfociti trattati con ciclodestrina erano più vitali di quelli con metionina ($P = 0,006$), glicina ($P = 0,008$), isoleucina ($P = 0,016$), e cellobiosio ($P = 0,042$).

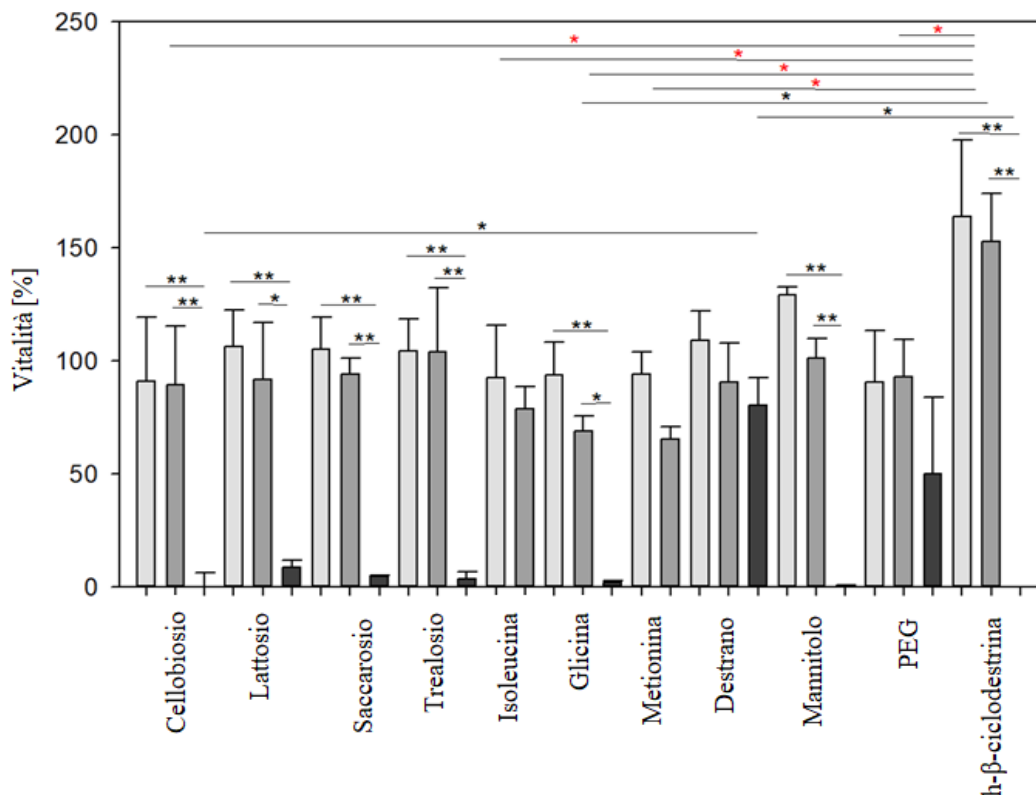


Figura 3.9: Il grafico rappresenta la vitalità dei linfociti dopo 24 ore di trattamento con i diversi eccipienti. Il grigio chiaro corrisponde a 1 mg/ml, il grigio scuro a 10 mg/ml e il nero a 100 mg/ml. I dati sono visualizzati come media \pm errore standard. ** per $P \leq 0,001$ e * per $P \leq 0,05$.

Nella Figura 3.10 sono rappresentati i risultati della vitalità della linea Daudi dopo 24 ore di trattamento. Confrontando le concentrazioni tra i diversi eccipienti, c'è una differenza statisticamente significativa tra 1 e 100 mg/ml ($P = 0,040$ per destrano e $P \leq 0,001$ per gli altri), 10 e 100 mg/ml ($P = 0,010$ per il destrano e $P \leq 0,001$ per gli altri), e 1 e 10 mg/ml solo nei trattamenti con lattosio, glicina, isoleucina e metionina ($P = 0,020$, $P \leq 0,001$, $P = 0,003$ e $P \leq 0,001$ rispettivamente).

Confrontando i diversi eccipienti alle stesse concentrazioni, a 100 mg/ml la vitalità delle cellule trattate con destrano era notevolmente superiore a tutti gli altri trattamenti ($P = 0,002$ per il lattosio e $P \leq 0,001$ per tutti gli altri) mentre, a 10 mg/ml, la glicina ha dimostrato di influenzare fortemente la vitalità di Daudi se confrontata con destrano e ciclodestrina ($P = 0,017$ e $P = 0,044$, rispettivamente).

Considerando il secondo pool di dati, che ha confrontato tutti gli eccipienti a 1 e 10 mg/ml, la linea Daudi trattata con metionina è stata significativamente compromessa dal trattamento, se confrontato con ciclodestrina ($P \leq 0,001$), destrano ($P = 0,002$), saccarosio ($P = 0,007$), e lattosio ($P = 0,030$), ed è anche stata influenzata dal trattamento con isoleucina rispetto alla ciclodestrina ($P = 0,038$). Confrontando la vitalità delle cellule a 10 mg/ml, è stata compromessa più dalla metionina che da destrano, ciclodestrina, saccarosio, cellobiosio

($P \leq 0,001$), PEG ($P = 0,006$), lattosio ($P = 0,013$), mannitolo ($P = 0,029$), e dall'isoleucina piuttosto che dal destrano ($P = 0,004$) e dalla ciclodestrina ($P = 0,011$).

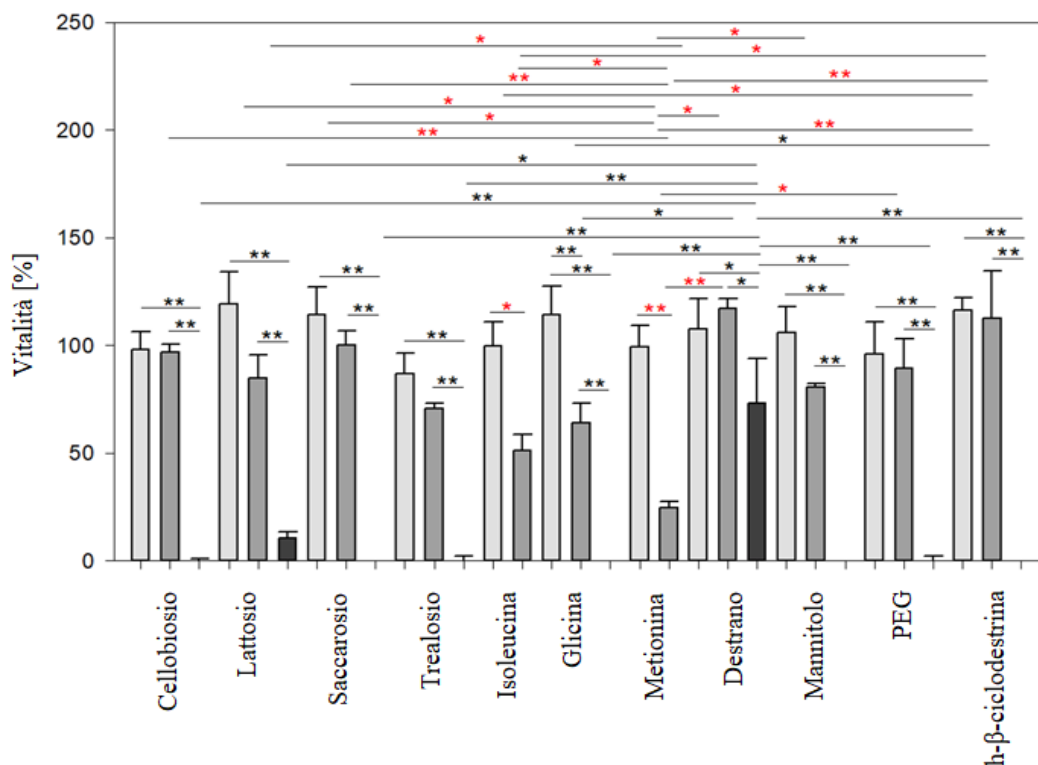


Figura 3.10: Il grafico rappresenta la vitalità di Daudi dopo 24 ore di trattamento con i diversi eccipienti. Il grigio chiaro è 1 mg/ml, il grigio scuro è 10 mg/ml e il nero è 100 mg/ml. I dati sono visualizzati come media \pm errore standard. ** per $P \leq 0,001$ e * per $P \leq 0,05$.

Nella Figura 3.11 sono stati rappresentati i risultati della vitalità dei linfociti dopo 48 ore di trattamento. Confrontando le concentrazioni tra i diversi eccipienti, vi è una differenza statisticamente significativa tra 1 e 100 mg/ml ($P = 0,002$ per il cellobiosio, $P = 0,018$ per il saccarosio, $P = 0,010$ per il trealosio, $P = 0,005$ per la glicina, $P = 0,008$ per il destrano, $P = 0,006$ per il mannitolo, $P \leq 0,001$ per PEG e ciclodestrina), 10 e 100 mg/ml ($P = 0,017$ per il cellobiosio, $P = 0,024$ per il saccarosio, $P = 0,007$ per il trealosio, $P = 0,013$ per il mannitolo, $P = 0,003$ per PEG, e $P \leq 0,001$ per la ciclodestrina) e 1 e 10 mg/ml solo nel trattamento con metionina ($P = 0,048$).

Non ci sono state differenze significative tra la vitalità delle cellule trattate con la stessa concentrazione di eccipienti.

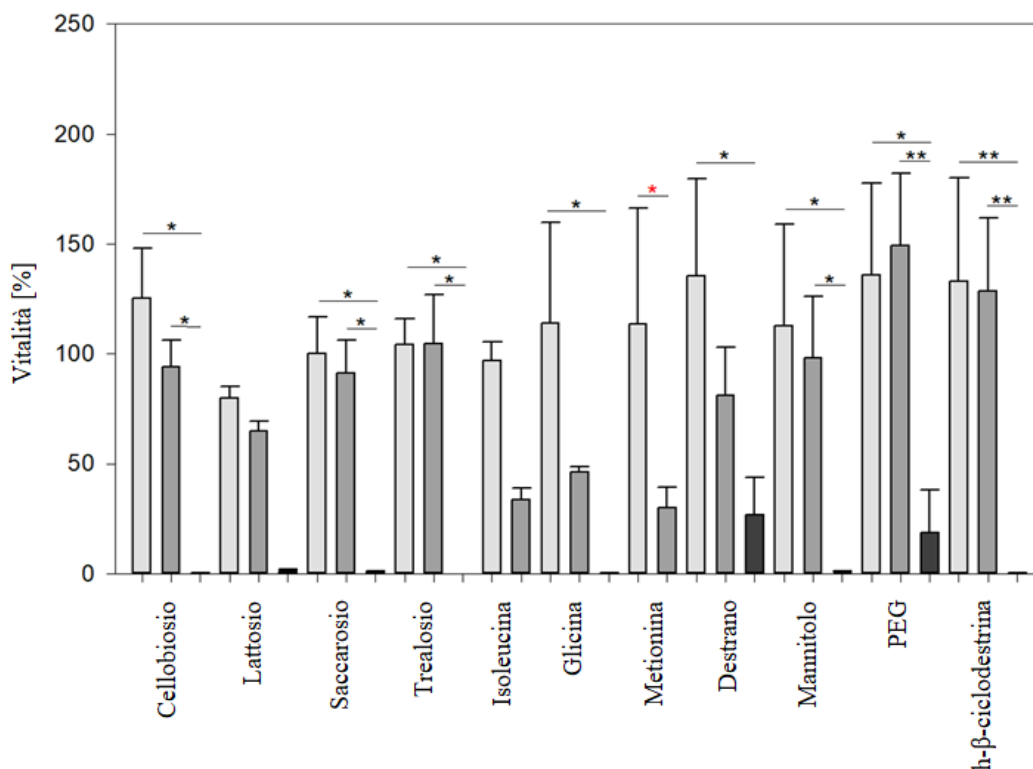


Figura 3.11: Il grafico rappresenta la vitalità dei linfociti dopo 48 ore di trattamento con i diversi eccipienti. Il grigio chiaro corrisponde a 1 mg/ml, il grigio scuro a 10 mg/ml e il nero a 100 mg/ml. I dati sono visualizzati come media \pm errore standard. ** per $P \leq 0,001$ e * per $P \leq 0,05$.

Nella Figura 3.12 sono stati rappresentati i risultati della vitalità di Daudi dopo 48 ore di trattamento.

Considerando i diversi eccipienti, le cellule sono state meno compromesse dal trattamento con destrano rispetto a PEG, mannitolo, glicina e trealosio ($P \leq 0,001$), saccarosio ($P = 0,007$), cellobiosio ($P = 0,013$), e da quelle contenenti ciclodestrina rispetto a quelle con PEG e mannitolo ($P = 0,007$ e $P = 0,023$, rispettivamente).

Confrontando le concentrazioni tra i diversi eccipienti, c'è una differenza statisticamente significativa tra 1 e 100 mg/ml ($P \leq 0,001$), 10 e 100 mg/ml ($P = 0,005$ per destrano e $P \leq 0,001$ per gli altri), e 1 e 10 mg/ml solo nei trattamenti con glicina ($P = 0,002$), isoleucina e metionina ($P \leq 0,001$ per entrambi).

Confrontando i diversi eccipienti alle stesse concentrazioni, a 100 mg/ml la vitalità delle cellule trattate con destrano era notevolmente superiore a tutti gli altri trattamenti ($P \leq 0,001$ per ciclodestrina e PEG, $P = 0,002$ per trealosio, cellobiosio e mannitolo, $P = 0,003$ per il lattosio e il saccarosio, e $P = 0,004$ per la glicina), a 10 mg/ml la ciclodestrina influisce meno sulla vitalità di Daudi rispetto al mannitolo ($P = 0,009$), glicina e PEG ($P \leq 0,001$ per entrambi) e anche il destrano non ha compromesso Daudi rispetto alla glicina ($P = 0,004$) e al PEG ($P = 0,011$). Non ci sono state differenze a 1 mg/ml.

Considerando il secondo gruppo di dati, che ha confrontato tutti gli eccipienti a 1 e 10 mg/ml, la linea Daudi trattata con ciclodestrina presentava una vitalità superiore a quella trattata con metionina, isoleucina e PEG ($P \leq 0,001$), mannitolo ($P = 0,003$), glicina ($P = 0,007$) e trealosio ($P = 0,043$) e anche le cellule con destrano avevano una vitalità superiore a quelle con metionina ($P = 0,004$) e isoleucina ($P = 0,020$); anche il lattosio ha compromesso meno Daudi rispetto alla metionina ($P = 0,037$). Confrontando la vitalità delle cellule a 10

mg/ml, è stata compromessa più dalla metionina che dalla ciclodestrina, destrano, lattosio ($P \leq 0,001$), saccarosio ($P = 0,007$), cellobiosio ($P = 0,009$), trealosio ($P = 0,018$), più dall'isoleucina che dalla ciclodestrina, destrano ($P \leq 0,001$) e lattosio ($P = 0,009$), più dalla glicina che dalla ciclodestrina ($P = 0,005$) e destrano ($P = 0,027$) e più dal PEG piuttosto che dalla ciclodestrina ($P = 0,011$).

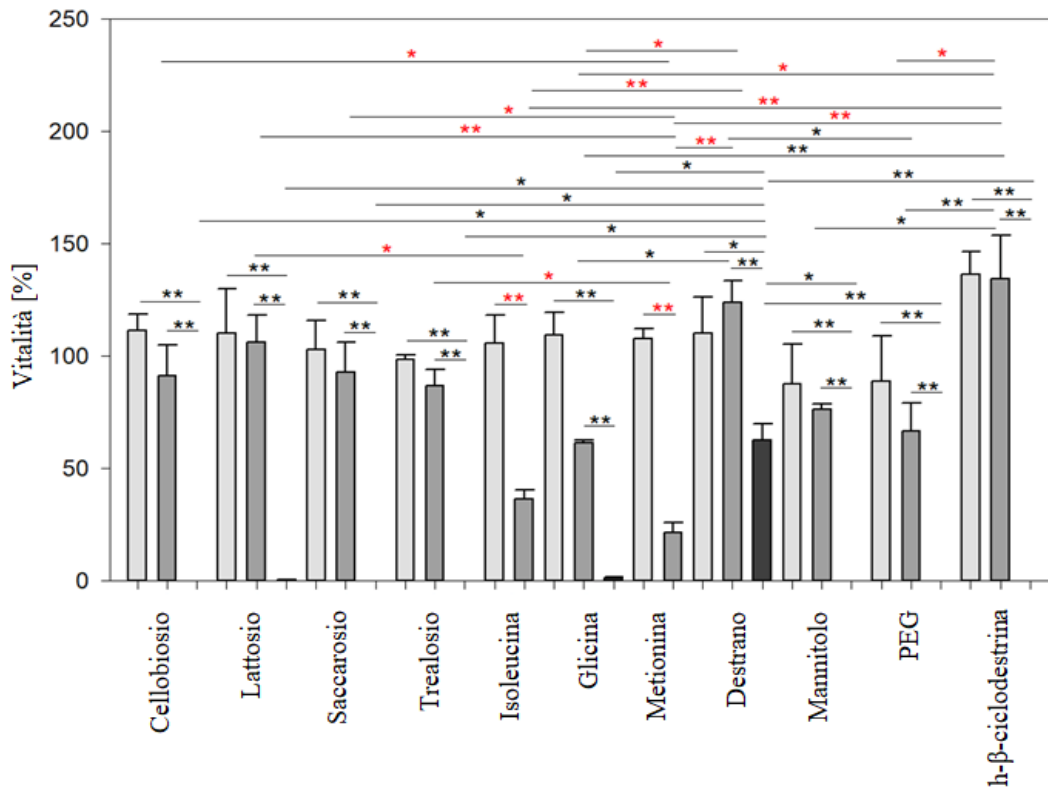


Figura 3.12: Il grafico rappresenta la vitalità di Daudi dopo 48 ore di trattamento con i diversi eccipienti. Il grigio chiaro è 1 mg/ml, il grigio scuro è 10 mg/ml e il nero è 100 mg/ml. I dati sono visualizzati come media \pm errore standard. ** per $P \leq 0,001$ e * per $P \leq 0,05$.

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

Le analisi effettuate durante questo lavoro hanno permesso di mettere a confronto diverse sostanze utilizzate comunemente come eccipienti per la preparazione di soluzioni farmaceutiche soggette a liofilizzazione.

Sulla base di quanto riscontrato nei diversi casi, le soluzioni a concentrazione minore di 10 mg/ml in acqua bidistillata risultano essere poco performanti non portando all'ottenimento di una matrice essiccata compatta.

Tuttavia, nonostante l'analisi FDM non rilevasse la formazione di matrice solida liofilizzata per le soluzioni avente una concentrazione di eccipiente di 1 mg/ml, dai campioni liofilizzati è emerso che, sebbene poco compatta, la matrice si è generata in ogni caso.

Una situazione particolare riguarda il PEG: in questo caso, indipendentemente dalla concentrazione scelta, la matrice solida non si è venuta a creare. Questo dimostra che la scelta di utilizzare tale eccipiente singolarmente, senza l'aggiunta di altri, non risulta essere una scelta appropriata perché non è in grado di conferire le proprietà ideali alla struttura. Inoltre, l'analisi DSC non aveva permesso di rilevare andamenti particolari durante la fase di essiccazione e non è quindi stato possibile riportare una temperatura di transizione vetrosa o un eutettico di questo campione.

Tra le soluzioni che hanno portato all'ottenimento di liofilizzati con le caratteristiche strutturali migliori ci sono quelle a base di destrano, metionina, cellobiosio, mannitolo e glicina.

In generale le strutture analizzate in questo elaborato possono ritenersi accettabili e i difetti riportati in alcuni casi sotto forma di disomogeneità, non ne compromettono l'efficacia.

Andando ad analizzare i valori rilevati alle termocoppie, durante la fase di congelamento il flacone contenente glicina è stato quello che ha risentito della temperatura minore rilevandone un valore di -43,3 °C.

I campioni a base di (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina e saccarosio hanno rilevato invece una temperatura di -18,1 °C al termine dell'essiccazione primario e, tale valore, è stato quello più alto. Il destrano ha subito, invece, l'essiccazione secondario in condizioni di temperatura maggiori rispetto agli altri variando dai 15,5 ai 20,7 °C nell'arco dell'intera fase.

L'analisi di umidità residua, effettuata attraverso la titolazione di Karl Fischer, ha rilevato un quantitativo in generale inferiore al 2%: questo valore relativamente basso è vantaggioso poiché, un minor quantitativo di acqua nel campione consente una conservazione più efficace.

Dopo la ricostituzione, il comportamento in cellula dei prodotti liofilizzati è stato valutato tramite saggio di proliferazione WST-1. Sono state selezionate due linee cellulari (una sana proveniente da linfociti B e una cancerosa denominata Daudi, proveniente dal sangue periferico di un paziente affetto dal linfoma di Burkitt).

Dall'analisi risulta che non ci sono differenze significative né in base alla linea cellulare né alla diversa durata del trattamento.

Considerando invece le diverse concentrazioni di eccipienti, i trattamenti a 100 mg/ml hanno dimostrato in generale una vitalità inferiore rispetto a quelli a 10 e 1 mg/ml, indipendentemente dall'eccipiente esaminato. Risulta interessante il comportamento del

destrano che, nel trattamento di più breve durata delle cellule sane, non ha comportato variazioni di vitalità rispetto ai controlli a nessuna delle tre concentrazioni testate. Degno di nota anche l'esito dei test effettuati in cellula con gli amminoacidi, isoleucina, glicina, e metionina, in quanto, sia per i trattamenti brevi che per quelli più lunghi, la loro aggiunta ha avuto un impatto significativamente peggiore sulla vitalità delle cellule tumorali: questo risulta essere un aspetto vantaggioso per lo sviluppo di terapie oncologiche.

Dalle analisi effettuate in presenza di PEG è emerso che questo non riduce significativamente la vitalità delle cellule sane, se sottoposte a un trattamento breve, indipendentemente dalla sua concentrazione.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. and Fessi, H., 2006, Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58** (15), 1688–1713. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Abrantes, C. G., Duarte, D. and Reis, C. P., 2016, An overview of pharmaceutical excipients: safe or not safe?, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **105** (7), 2019–2026. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.019>
- Adali, M. B., Barresi, A. A., Boccardo, G. and Pisano, R., 2020, Spray freeze-drying as a solution to continuous manufacturing of pharmaceutical products in bulk, *Processes*, **8** (6). <https://doi.org/10.3390/pr8060709>
- Baheti, A., Kumar, L. and Bansal, A. K., 2010, Excipients used in lyophilization of small molecules, *Journal of Excipients and Food Chemicals*, **1** (1), 41–54.
- Bahr, M. M., Amer, M. S., Abo-El-Sooud, K., Abdallah, A. N. and El-Tookey, O. S., 2020, Preservation techniques of stem cells extracellular vesicles: a gate for manufacturing of clinical grade therapeutic extracellular vesicles and long-term clinical trials, *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, **8** (1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/23144599.2019.1704992>
- Baumber, M., 2020, Training on creating liposome-based drug delivery systems, *Microfluidics*.
- Bianciardi, S., Merlotti, D. and Materozzi, M., 2021, Vescicole extracellulari e metabolismo osseo: ruolo e possibili implicazioni cliniche, *L'Endocrinologo*, **22** (1), 28–33. <https://doi.org/10.1007/s40619-021-00817-4>
- Bjelošević, M., Zvonar Pobirk, A., Planinšek, O. and Ahlin Grabnar, P., 2020, Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation, *International Journal of Pharmaceutics*, **576**, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119029>
- Bozzuto, G. and Molinari, A., 2015, Liposomes as nanomedical devices, *International Journal of Nanomedicine*, **10**, 975–999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Brandau, D. T., Jones L. S., Wethoff, C. M., Rexroad, J. and Middaugh, C. R., 2003, Thermal stability of vaccines, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **92** (2), 218–231. <https://doi.org/10.1002/jps.10296>
- Butreddy, A., Janga, K. Y., Ajjarapu, S., Sarabu, S. and 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>
- Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Nishikawa, M. and Takakura, Y., 2018, Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization, *International Journal of Pharmaceutics*, **553** (1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.032>

- Chen, C., Han, D., Cai, C. and Tang, X., 2010, An overview of liposome lyophilization and its future potential, *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, **142** (3), 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024>
- Crowe, L. M., Crowe, J. H., Rudolph, A., Womersley, C. and Appel, L., 1985, Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **242** (1), 240–247. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90498-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90498-9)
- Dalvi, H., Bhat, A., Iyer, A., Sainaga Jyothi, V. G. S., Jain, H., Srivastava, S. and Madan, J., 2021, Armamentarium of cryoprotectants in peptide vaccines: mechanistic insight, challenges, opportunities and future prospects, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10303-y>
- Fathima, N., Mamatha, T., Qureshi, H. K., Anitha, N. and Venkateswara Rao, J., 2011, Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **1** (6), 66–71.
- Fissore, D., Pisano, R. and Barresi, A. A., 2019, *Freeze drying of Pharmaceutical Products* (1st Editio). CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9780429022074>
- Franks, F. and Auffier, T., 2007, *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals: Principles and Practice*, The royal society of chemistry.
- Hansen, L. J. J., Daoussi, R., Vervaet, C., Remon, J. P. and De Beer, T. R. M., 2015, Freeze-drying of live virus vaccines: a review, *Vaccine*, **33** (42), 5507–5519. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.085>
- Hernandez, C. and Shukla, S., 2022, Liposome based drug delivery as a potential treatment option for Alzheimer’s disease, *Neural Regeneration Research*, **17** (6), 1190–1198. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.327328>
- Herrmann, I. K., Wood, M. J. A. and Fuhrmann, G., 2021, Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform, *Nature Nanotechnology*, **16** (7), 748–759. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00931-2>
- Horn, J. and Friess, W., 2018, Detection of collapse and crystallization of saccharide, protein, and mannitol formulations by optical fibers in lyophilization, *Frontiers in Chemistry*, **6**, 4, <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00004>
- Ibrahim, A. H., Rosqvist, E., Smått, J. H., Ibrahim, H. M., Ismael, H. R., Afouna, M. I., Samy, A. M. and Rosenholm, J. M., 2019, Formulation and optimization of lyophilized nanosuspension tablets to improve the physicochemical properties and provide immediate release of silymarin, *International Journal of Pharmaceutics*, **563**, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.064>
- Izutsu, K.I., Fujimaki, Y., Kuwabara, A. and Aoyagi, N., 2005, Effect of counterions on the physical properties of l-arginine in frozen solutions and freeze-dried solids, *International Journal of Pharmaceutics*, **301** (1–2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.019>

- Kumar, R. B., 2012, A review on freeze drying process and technologies, *International Journal of Pharmacy and Technology*, **4** (3), 2215–2243.
- Kusuma, G. D., Barabadi, M., Tan, J. L., Morton, D. A. V, Frith, J. E. and Lim, R., 2018, To protect and to preserve: novel preservation strategies for extracellular vesicles, *Frontiers in Pharmacology*, **9**, 1199. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01199>
- Li, M., Li, Y., Li, S., Jia, L., Wang, H., Li, M., Deng, J., Zhu, A., Ma, L., Li, W., Yu, P. and Zhu, T., 2022, The nano delivery systems and applications of mRNA, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **227**. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113910>
- Limongi, T., Susa, F., Dumontel, B., Racca, L., Perrone Donnorso, M., Debellis, D. and Cauda, V., 2021, Extracellular vesicles tropism: a comparative study between passive innate tropism and the active engineered targeting capability of lymphocyte-derived EVs, *Membranes*, **11** (11). <https://doi.org/10.3390/membranes11110886>
- Limongi, T., Susa, F., Marini, M., Allione, M., Torre, B., Pisano, R. and Di Fabrizio, E., 2021, Lipid-based nanovesicular drug delivery systems, *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, **11** (12). <https://doi.org/10.3390/nano11123391>
- Luo, W.C., O'Reilly Beringsh, A., Kim, R., Zhang, W., Patel, S. M., Bogner, R. H. and Lu, X., 2021, Impact of formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, **169**, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.10.014>
- Lydon, P., Zipursky, S., Tevi-Benissan, C., Djingarey, M. H., Gbedonou, P., Youssouf, B. O. and Zaffran, M., 2014, Economic benefits of keeping vaccines at ambient temperature during mass vaccination: the case of meningitis A vaccine in Chad, *Bulletin of the World Health Organization*, **92** (2), 86–92. <https://doi.org/10.2471/BLT.13.123471>
- Meister, E. and Gieseler, H., 2009, Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition data, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **98** (9), 3072–3087. <https://doi.org/10.1002/jps.21586>
- Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernandes, F. M. and Yliperttula, M., 2021, Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: change of paradigm, *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, **336**, 480–498. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042>
- Pansare, S. K. and Patel, S. M., 2016, Practical considerations for determination of glass transition temperature of a maximally freeze concentrated solution, *AAPS PharmSciTech*, **17** (4), 805–819. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0551-x>
- Patel, S. M., Nail, S. L., Pikal, M. J., Geidobler, R., Winter, G., Hawe, A., Davagnino, J. and Rambhatla Gupta, S., 2017, Lyophilized drug product cake appearance: what is acceptable?, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **106** (7), 1706–1721. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.014>

- Pereira, C. S., Lins, R. D., Chandrasekhar, I., Freitas, L. C. G. and Hünenberger, P. H., 2004, Interaction of the disaccharide trehalose with a phospholipid bilayer: a molecular dynamics study, *Biophysical Journal*, **86** (4), 2273–2285. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74285-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74285-X)
- Picca, A., Guerra, F., Calvani, R., Coelho-Junior, H. J., Bucci, C. and Marzetti, E., 2022, Circulating extracellular vesicles: friends and foes in neurodegeneration, *Neural Regeneration Research*, **17** (3), 534–542. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320972>
- Plotkin, S. A., 2005, Vaccines: past, present and future, *Nature Medicine*, **11** (4S), S5. <https://doi.org/10.1038/nm1209>
- Pouya, M. A., Daneshmand, B., Aghababaie, S., Faghihi, H. and Vatanara, A., 2018, Spray-freeze drying: a suitable method for aerosol delivery of antibodies in the presence of trehalose and cyclodextrins, *AAPS PharmSciTech*, **19** (5), 2247–2254. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1023-2>
- Preston, K. B. and Randolph, T. W., 2021, Stability of lyophilized and spray dried vaccine formulations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **171**, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.016>
- Qin, B., Zhang, Q., Hu, X. M., Mi, T. Y., Yu, H. Y., Liu, S. S., Zhang, B., Tang, M., Huang, J. F. and Xiong, K., 2020, How does temperature play a role in the storage of extracellular vesicles?, *Journal of Cellular Physiology*, **235** (11), 7663–7680. <https://doi.org/10.1002/jcp.29700>
- Rey, L., 2010, *Freeze-drying/lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products* (3rd ed.), CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9781439825761>
- Sahoo, C. K., Rao, S. R. M., Sudhakar, M. and Bhaskar, J., 2016, Advances in granulation technology, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, **9** (5), 571–580. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2016.00108.6>
- Saluja, V., Amorij, J. P., Kapteyn, J. C., de Boer, A. H., Frijlink, H. W. and Hinrichs, W. L. J., 2010, A comparison between spray drying and spray freeze drying to produce an influenza subunit vaccine powder for inhalation, *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, **144** (2), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.02.025>
- Santos, P. and Almeida, F., 2021, Exosome-based vaccines: history, current state, and clinical trials, *Frontiers in Immunology*, **12**, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711565>
- Stärtzel, P., 2018, Arginine as an excipient for protein freeze-drying: a mini review, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **107** (4), 960–967. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.11.015>
- Susa, F., Bucca, G., Limongi, T., Cauda, V. and Pisano, R., 2021, Enhancing the preservation of liposomes: the role of cryoprotectants, lipid formulations and freezing approaches, *Cryobiology*, **98**, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.12.009>

- Tran, P. H. L., Lee, B. J. and Tran, T. T. D., 2021, Strategies and formulations of freeze-dried tablets for controlled drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, **597**.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120373>
- Trenkenschuh, E. and Friess, W., 2021, Freeze-drying of nanoparticles: how to overcome colloidal instability by formulation and process optimization, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, **165**, 345–360.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.024>
- Wang, Y. and Grainger, D. W., 2019, Lyophilized liposome-based parenteral drug development: reviewing complex product design strategies and current regulatory environments, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **151–152**, 56–71.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.03.003>
- Zhou, L., Socha, J. M. and Chen, S. K. A. S., 2010, A systematic method development strategy for water determinations in drug substance using Karl Fischer Titrations, *American Pharmaceutical Review*.

Appendice

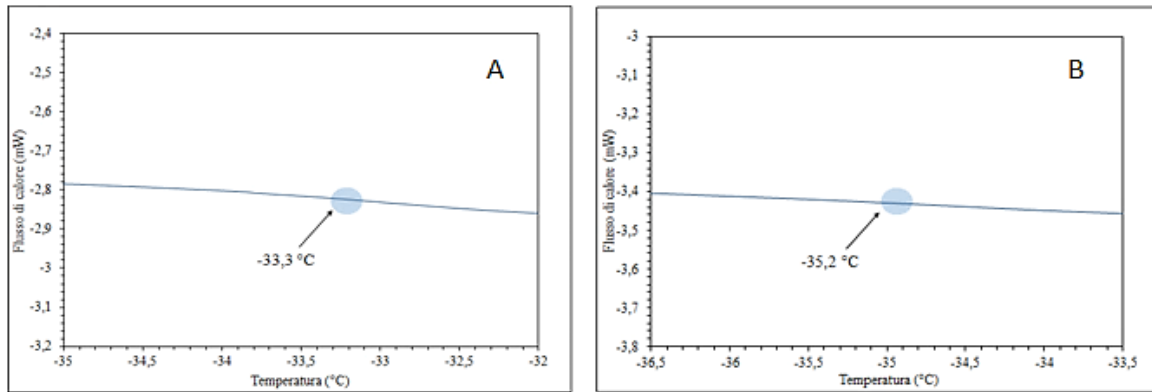


Figura A1: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di cellobiosio con concentrazioni 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

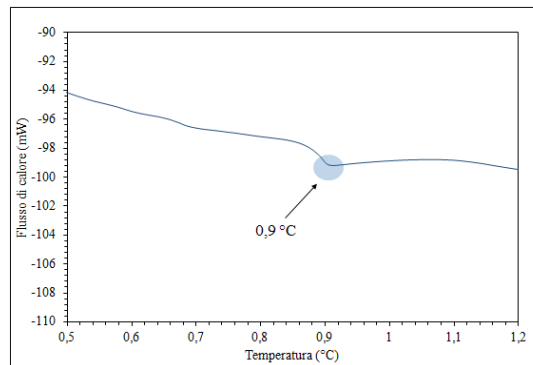


Figura A2: Valore di eutettico relativo alla soluzione a base di isoleucina con concentrazione 10 mg/ml.

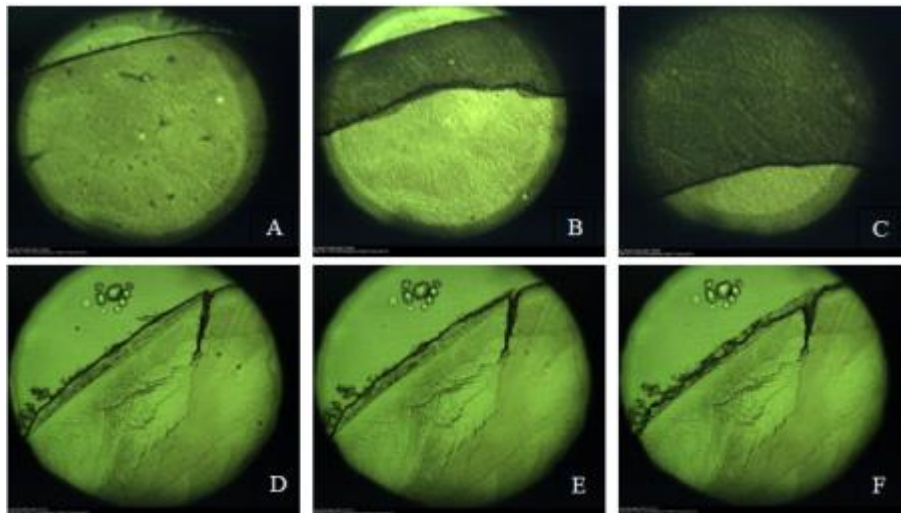


Figura A3: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti isoleucina aventi concentrazioni pari a 10 mg/ml (A, B e C) e 1 mg/ml (D, E ed F).

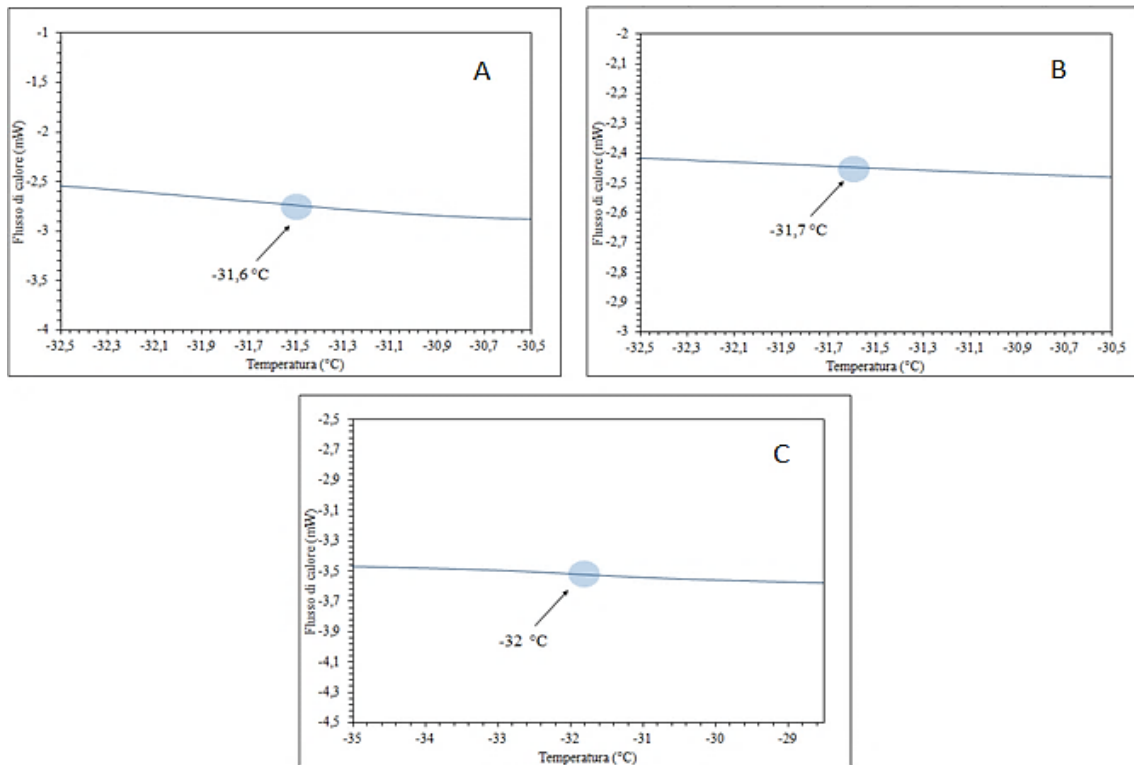


Figura A4: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di lattosio con concentrazioni 100-10 e 1 mg/ml (rispettivamente A, B e C).

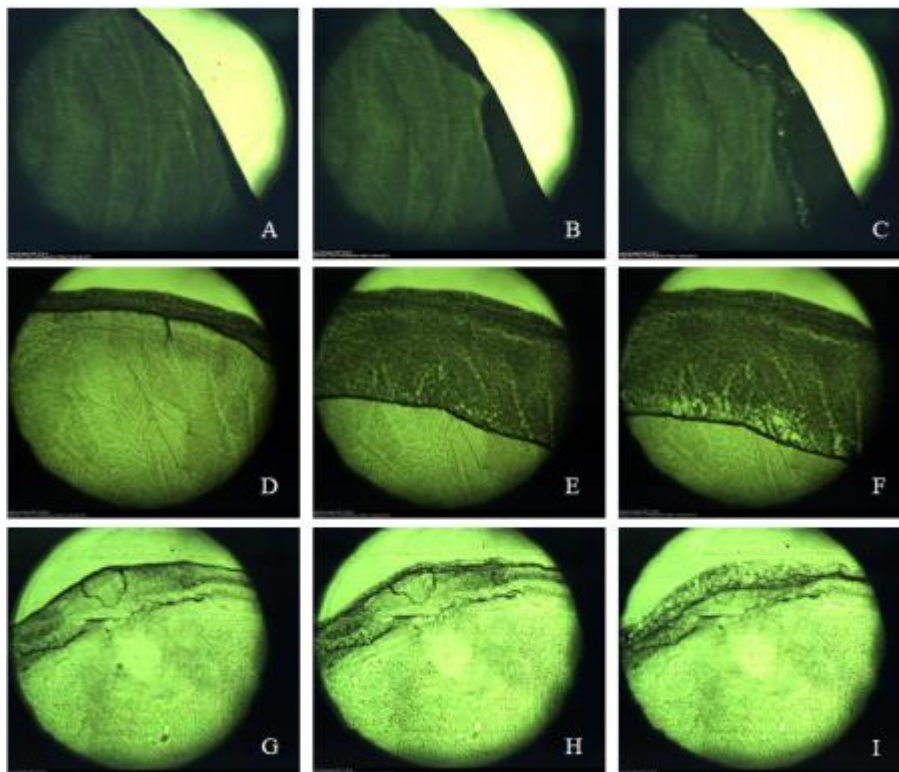


Figura A5: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti lattosio aventi concentrazioni pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D, E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

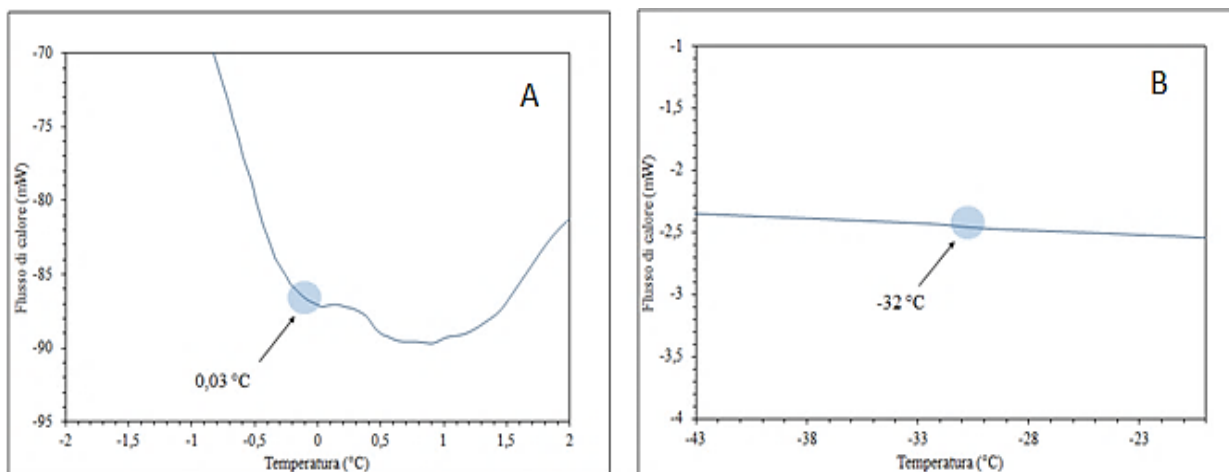


Figura A6: Valore di eutettico e di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di metionina con concentrazioni 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

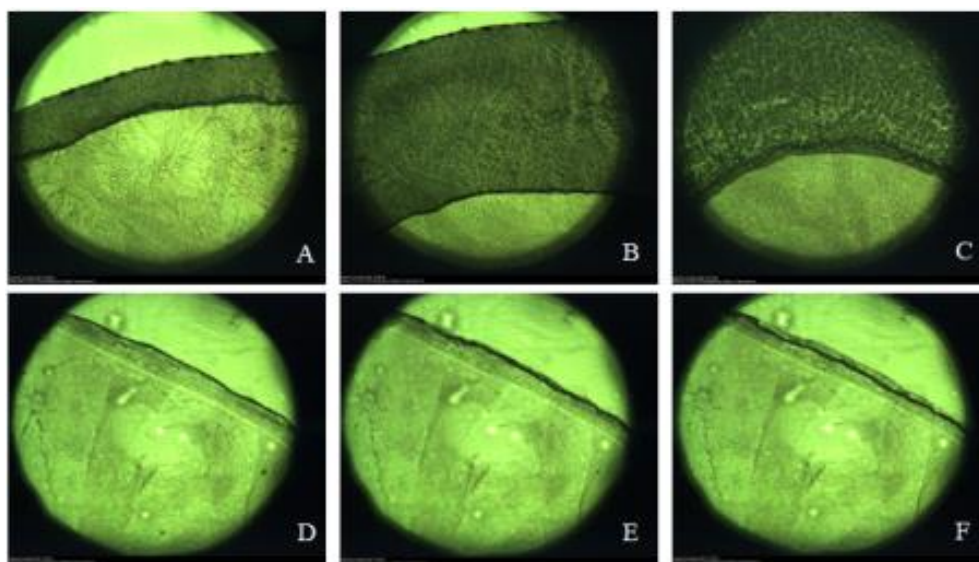


Figura A7: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti metionina aventi concentrazione pari a 10 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (D, E ed F).

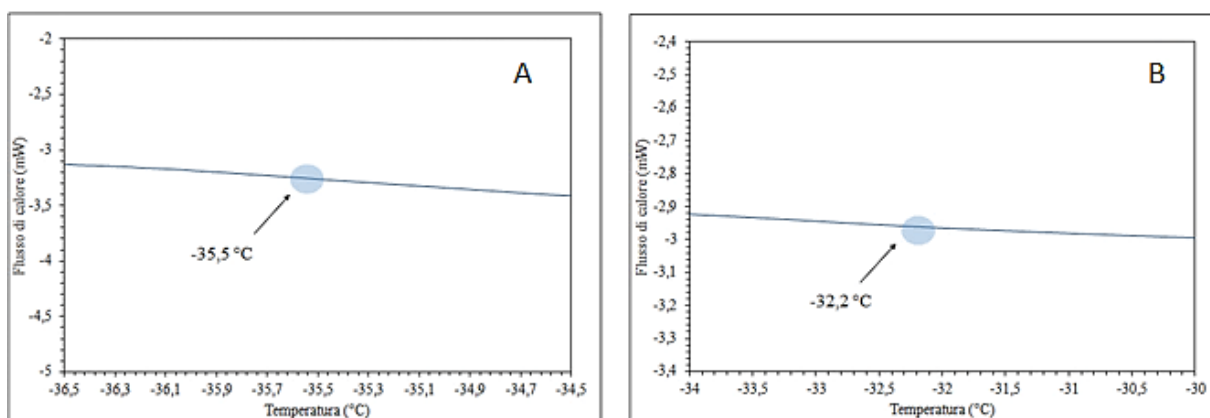


Figura A8: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di saccarosio con concentrazioni 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

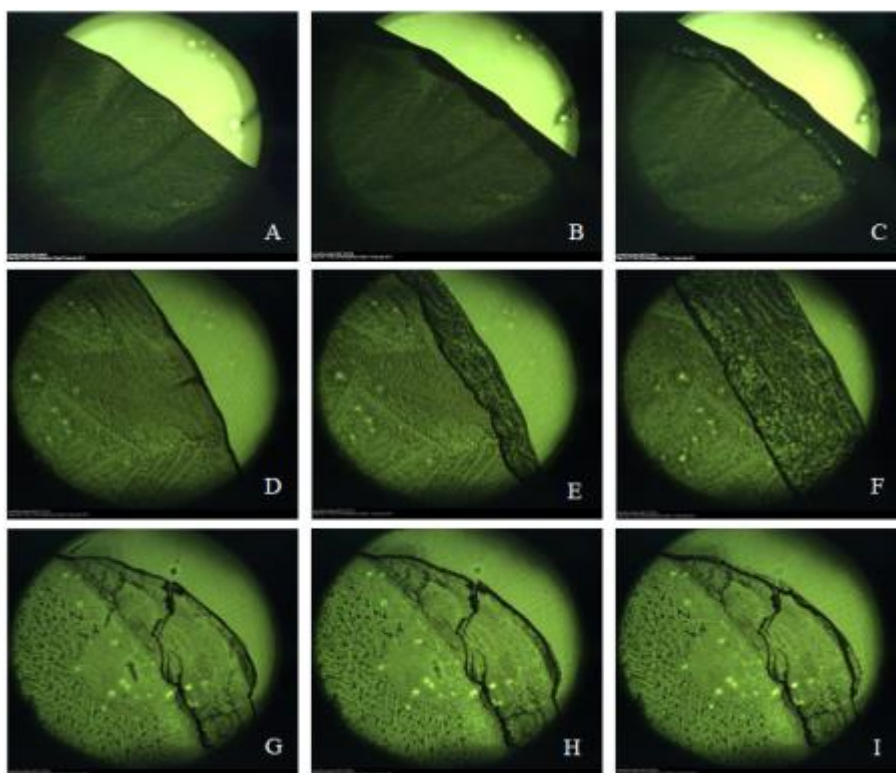


Figura A9: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti saccarosio aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D,E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

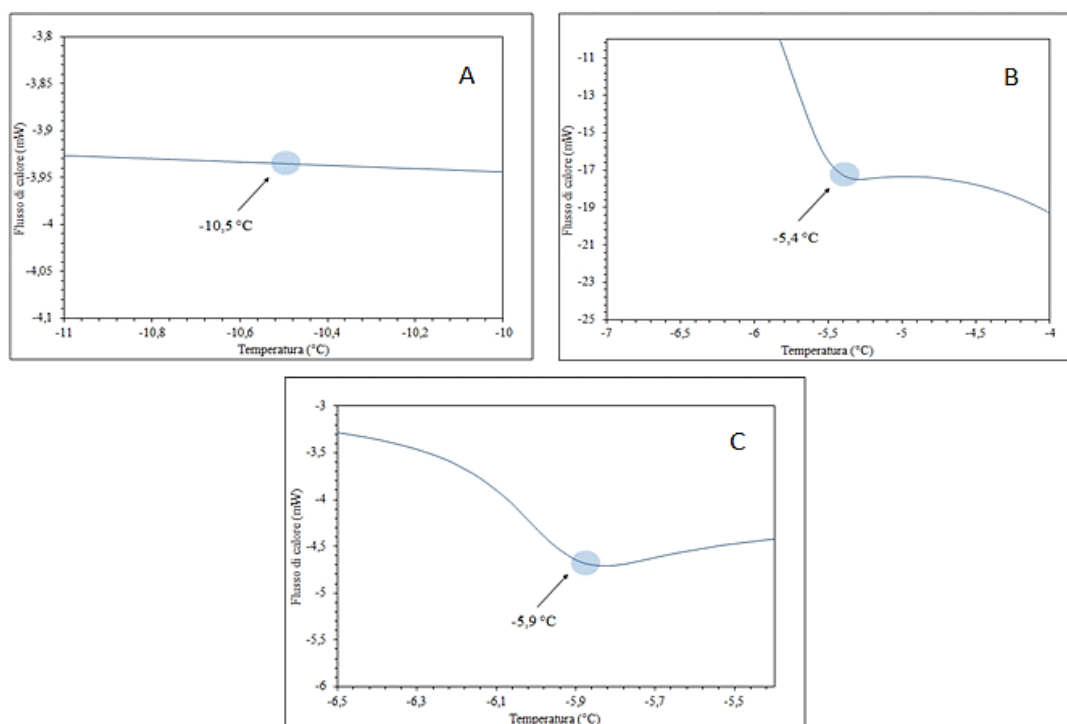


Figura A10: Valore di transizione vetrosa ed eutettico rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di glicina con concentrazioni 100-10 e 1 mg/ml (rispettivamente A, B e C).

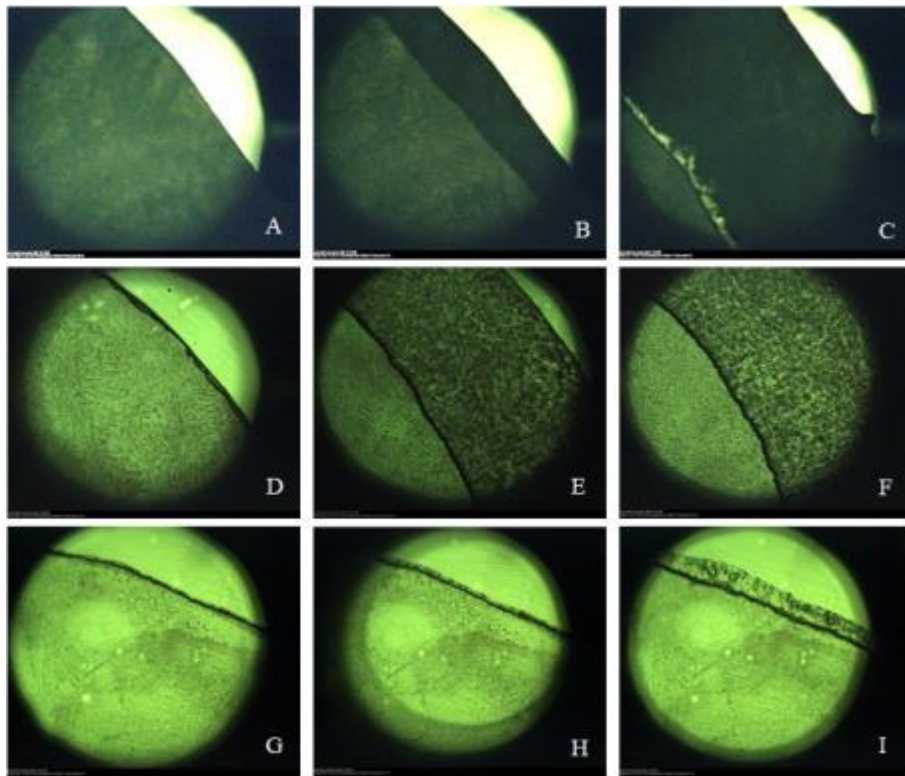


Figura A11: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti glicina aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D,E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

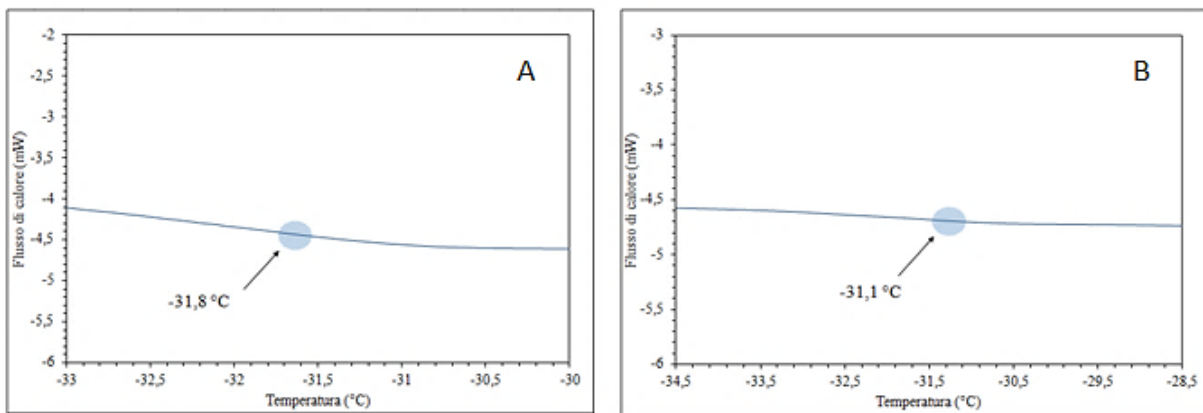


Figura A12: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di trealosio con concentrazioni 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

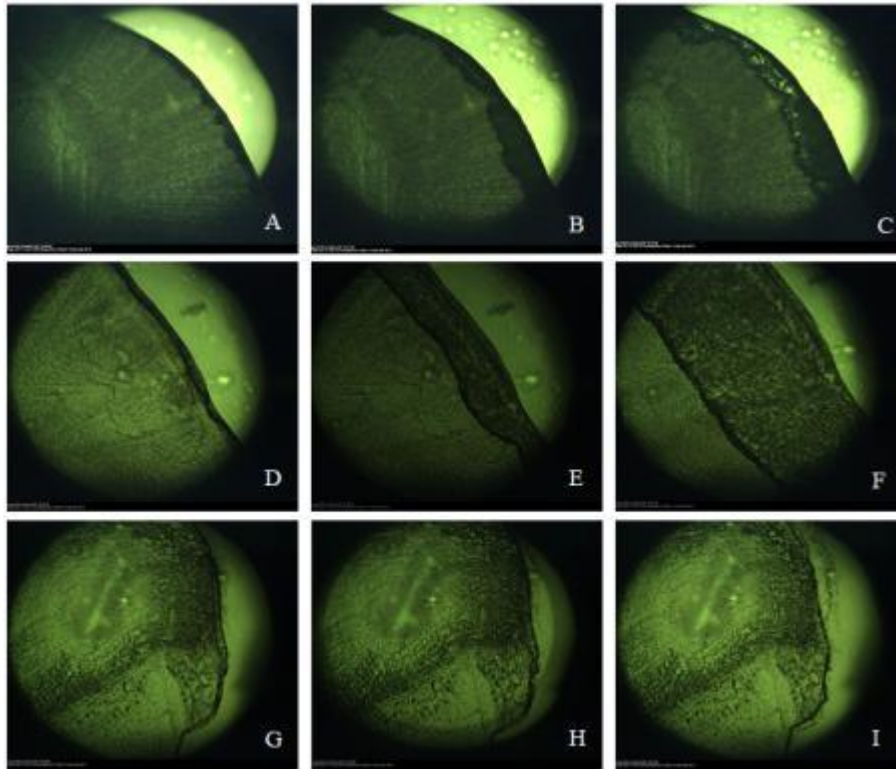


Figura A13: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti trealosio aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D,E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

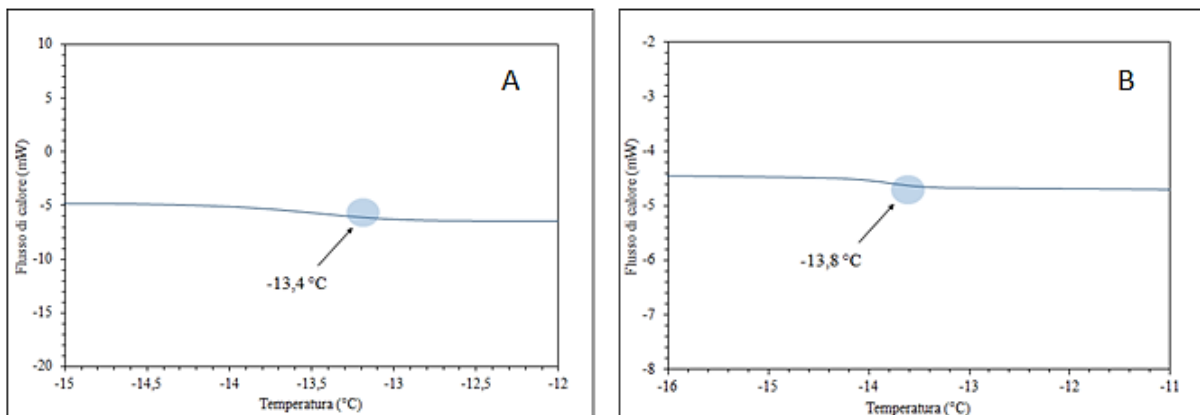


Figura A14: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di destrano con concentrazioni 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

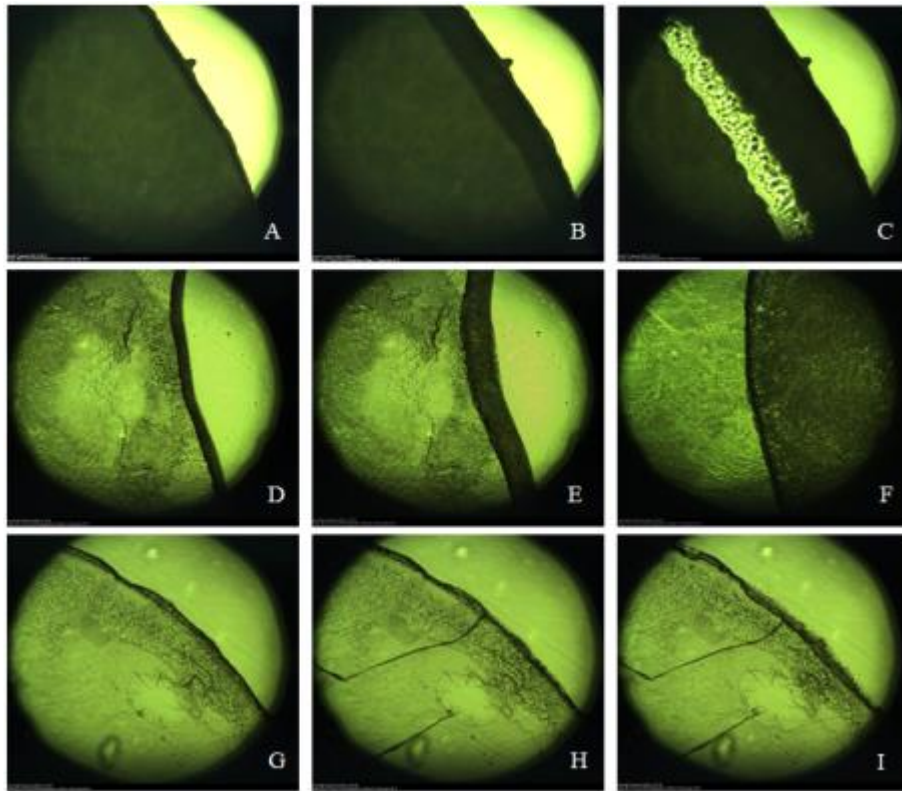


Figura A15: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti destrano aventi concentrazioni pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D,E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

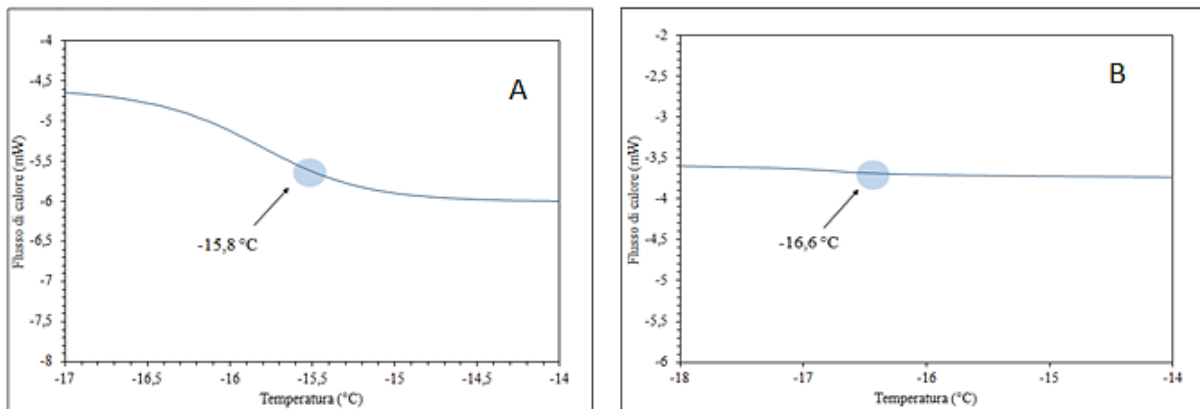


Figura A16: Valore di transizione vetrosa rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base di (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina con concentrazioni 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

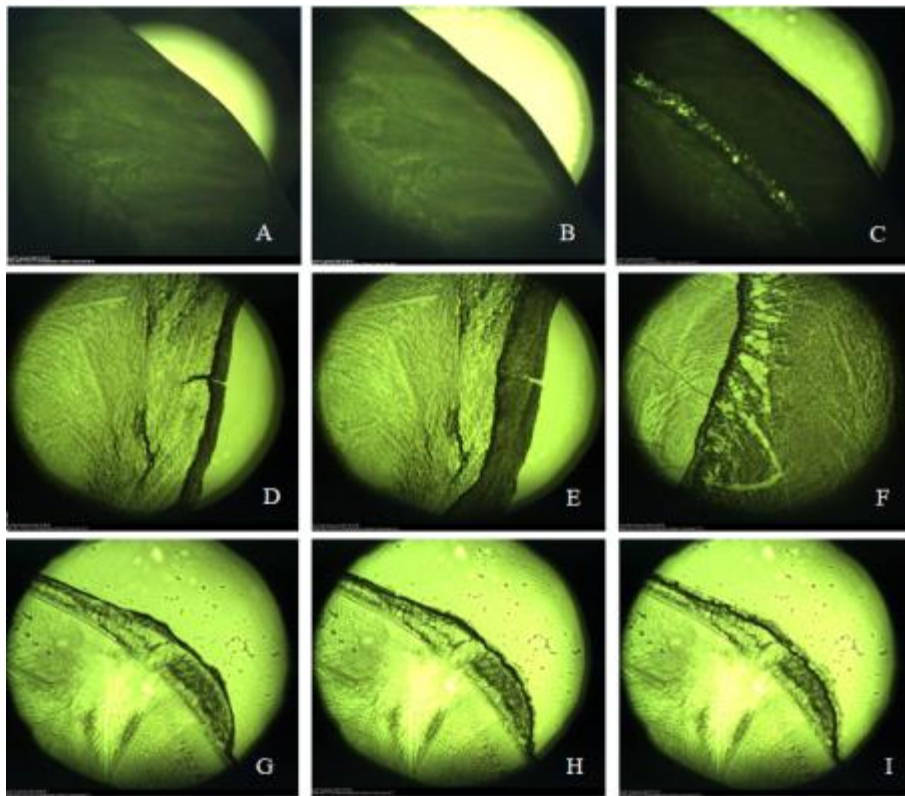


Figura A17: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D,E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

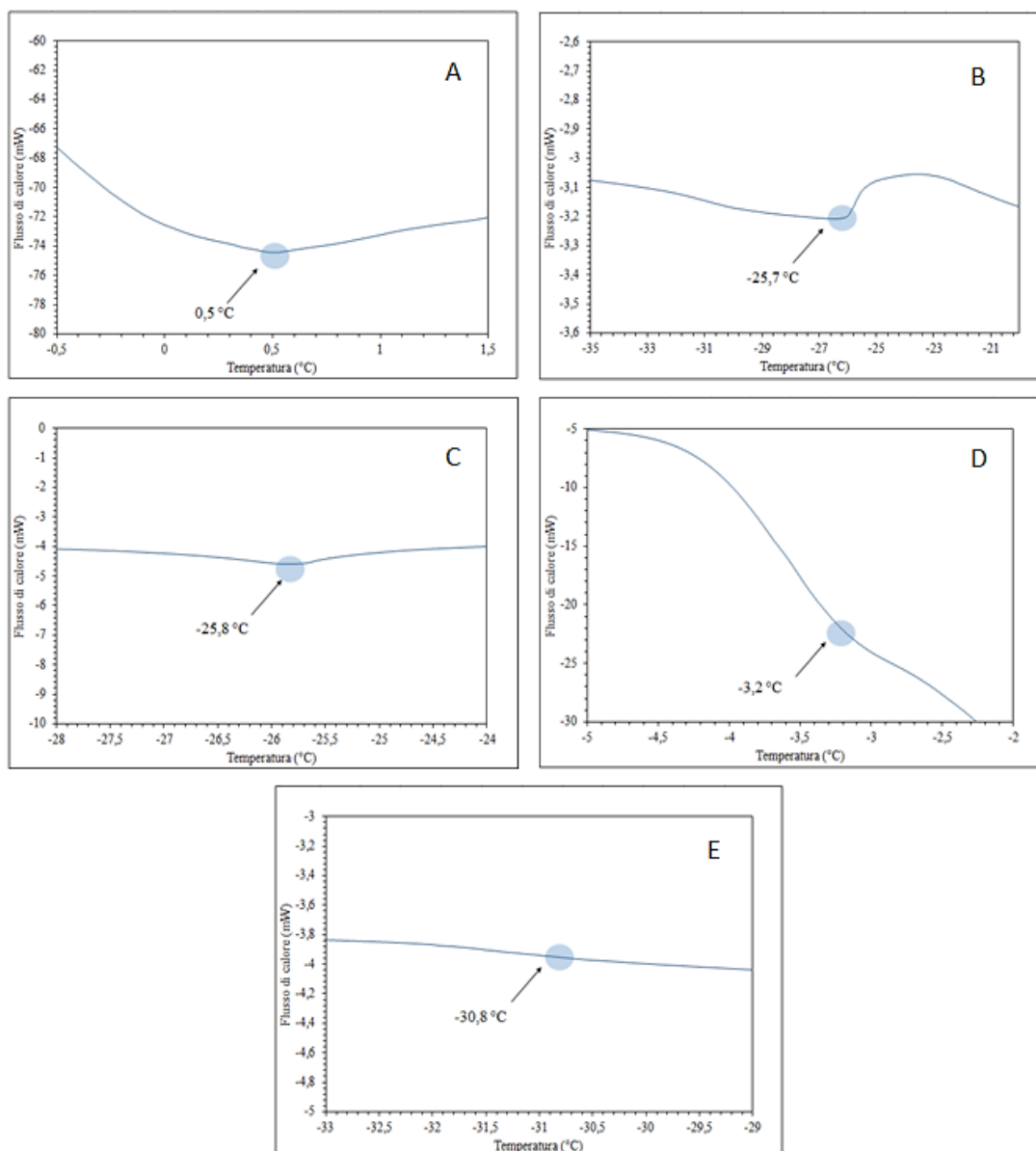


Figura A18: Valore di transizione vetrosa ed eutettico rilevato tramite l'analisi DSC delle soluzioni a base mannitolo con concentrazioni 100 mg/ml (A e B) e 10 mg/ml (C, D ed E).

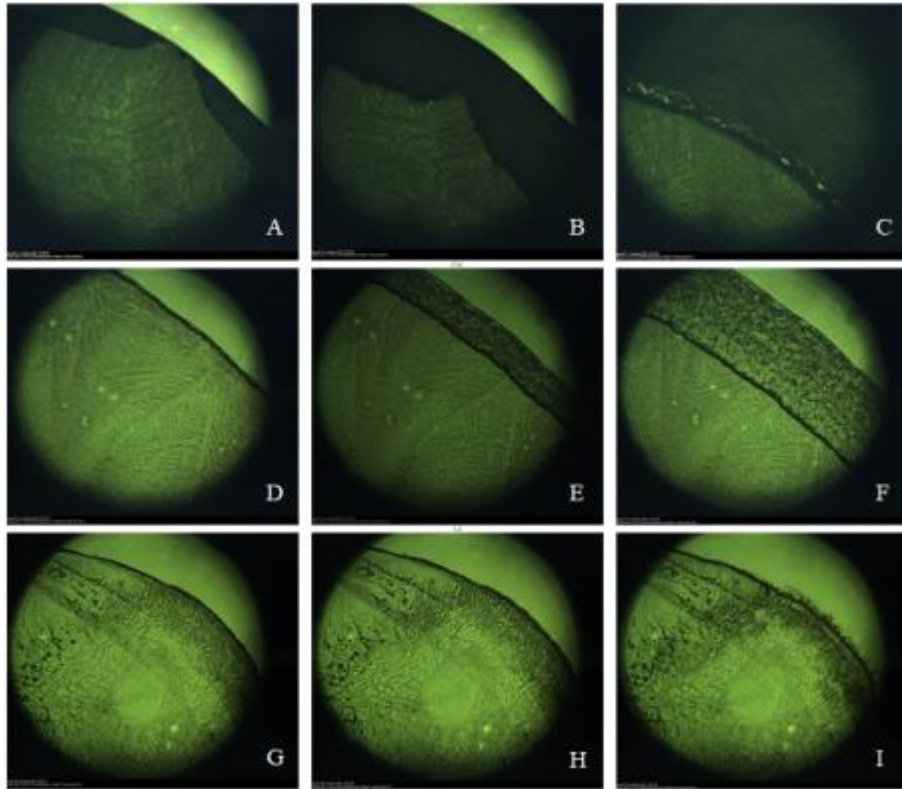


Figura A19: Andamenti del fronte della goccia delle soluzioni contenenti mannitolo aventi concentrazione pari a 100 mg/ml (A, B e C in cui avviene il collasso), 10 mg/ml (D,E ed F in cui avviene il collasso) e 1 mg/ml (G, H e I).

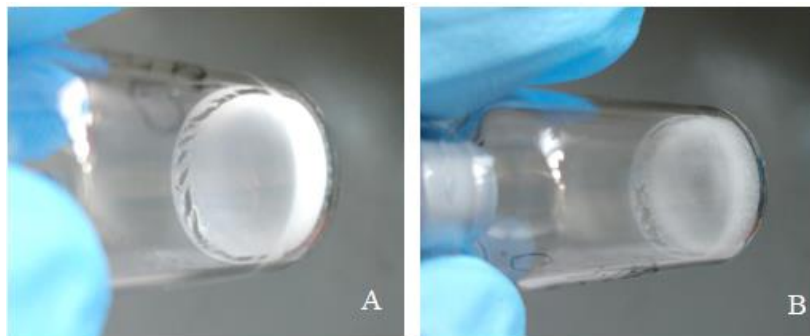


Figura A20: Flacone contenente (2-idrossipropil)- β -ciclodestrina a concentrazione 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

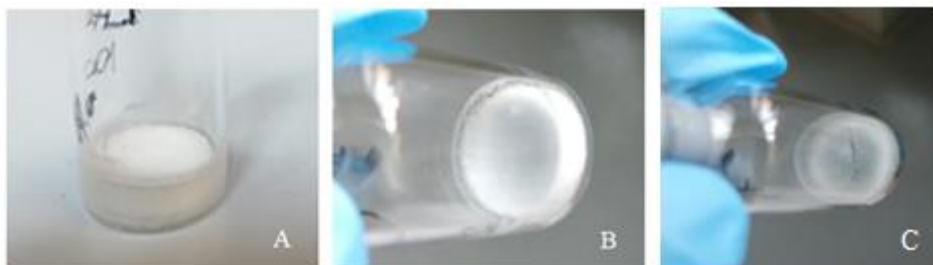


Figura A21: Flacone contenente lattosio a concentrazione 100-10 e 1 mg/ml (rispettivamente A, B e C).



Figura A22: Flacone contenente saccarosio a concentrazione 100-10 e 1 mg/ml (rispettivamente A, B e C).



Figura A23: Flacone contenente trealosio a concentrazione 100 mg/ml.



Figura A24: Flacone contenente trealosio a concentrazione 10 mg/ml.

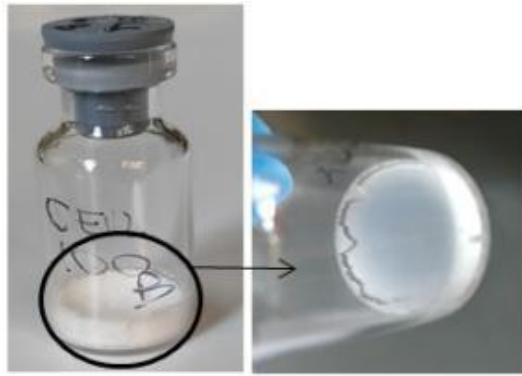


Figura A25: Flacone contenente cellobiosio a concentrazione 100 mg/ml.



Figura A26: Flacone contenente cellobiosio a concentrazione 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

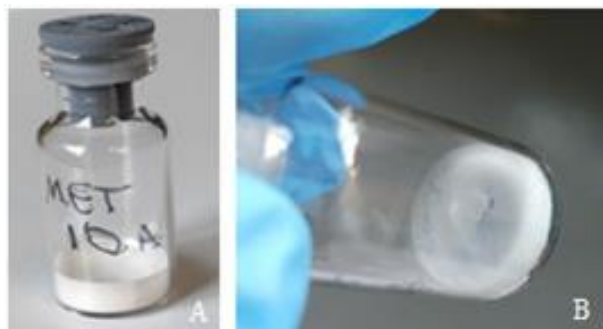


Figura A27: Flacone contenente metionina a concentrazione 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

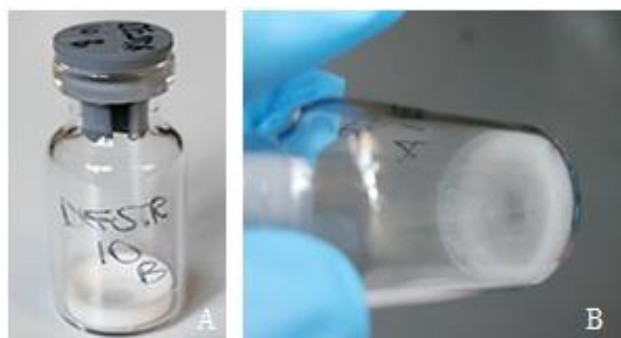


Figura A28: Flacone contenente destrano a concentrazione 10 e 1 mg/ml (rispettivamente A e B).

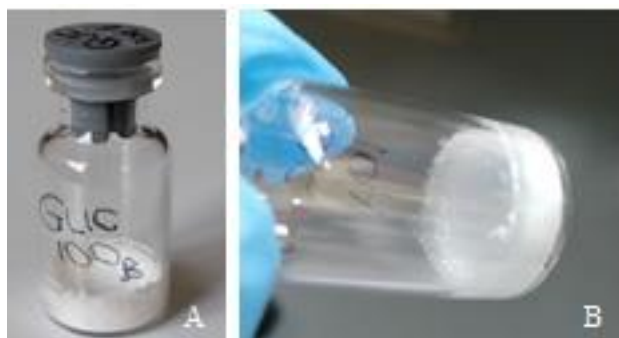


Figura A29: Flacone contenente glicina a concentrazione 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).



Figura A30: Flacone contenente isoleucina a concentrazione 1 mg/ml.

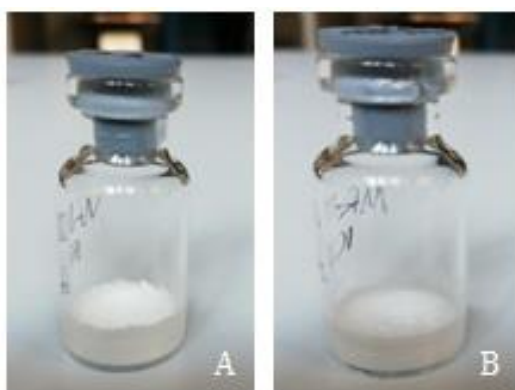


Figura A31: Flacone contenente mannitolo a concentrazione 100 e 10 mg/ml (rispettivamente A e B).

Ringraziamenti

La stesura di questa tesi corrisponde alla fine di un percorso universitario che non avrei mai potuto affrontare da sola, senza il supporto di molte persone che vorrei ringraziare qui di seguito.

Prima di tutto la mia famiglia, che mi ha permesso di arrivare fino a qui standomi sempre vicino, supportandomi in ogni momento difficile di questo percorso e che mi ha sostenuta nei tanti momenti di sconforto: il vostro sostegno è stato fondamentale. Un ringraziamento particolare è rivolto a tutte le persone che ho incontrato in questi anni: in particolare Martina, Elisa e Lorena (con la quale ho condiviso gioie e dolori di questo percorso fino alla fine) per tutti i momenti trascorsi insieme che mi rimarranno per sempre nel cuore.

Grazie a Silvia e Francesca B., compagne di laboratorio, che sono state fondamentali durante questi ultimi mesi universitari. Ringrazio inoltre il Prof. Roberto Pisano, la Prof. Tania Limongi e la Dott. Francesca Susa per avermi dato la possibilità di lavorare con loro a questo progetto di tesi.