



Politecnico di Torino

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CHIMICA E DEI MATERIALI

Corso di Laurea in Ingegneria chimica e dei Processi Sostenibili

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Utilizzo della Dinamica Molecolare per la comprensione dei
meccanismi di denaturazione di proteine a seguito di
congelamento ed essiccamento**

Candidato:

Andrea Paladini

Relatore:

Prof. Roberto Pisano

Ottobre 2017

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Caratterizzazione generale dei biofarmaci	1
1.2	Conservazione dei biofarmaci	3
1.2.1	Instabilità delle proteine terapeutiche durante il periodo di conservazione	4
1.2.2	Metodologie per la conservazione	6
1.3	Liofilizzazione come metodo di conservazione	9
1.3.1	Problematiche legate alla liofilizzazione dei biofarmaci . . .	11
1.3.2	Design ottimale del processo di liofilizzazione	15
1.4	Formulazioni proteiche	19
1.4.1	Buffers	20
1.4.2	Agenti di bulking	21
1.4.3	Agenti inibenti l'aggregazione e l'adsorbimento proteico . .	22
1.4.4	Stabilizzatori proteici	22
1.5	Caso studio: la Lattato Deidrogenasi (LDH)	25
1.5.1	Liofilizzazione di LDH: problematiche e formulazioni adot- tate	28
1.6	Obiettivo della tesi	33
2	Metodi	35
2.1	Introduzione	35
2.2	Storia della Dinamica Molecolare	36
2.3	Meccanica Classica e Meccanica Quantistica	36
2.4	La Dinamica Molecolare: aspetti teorici	38
2.4.1	Struttura di un programma di Dinamica Molecolare	39
2.4.2	Equazioni di base	39
2.4.3	Definizione di Ensemble	41
2.4.4	Spazio delle fasi	42
2.4.5	Integrazione delle equazioni del moto	43
2.4.6	Funzione potenziale	44
2.4.7	Periodic Boundary Conditions	48
2.4.8	Inclusione di un solvente nelle simulazioni di DM	48
2.5	La Dinamica Molecolare: aspetti computazionali	49

2.5.1	La Dinamica Molecolare con GROMACS	50
3	DM del LDH: condizioni operative	57
3.1	Informazioni preliminari	57
3.1.1	Condizioni di simulazione	58
3.1.2	Composizione della box	60
3.2	File input/output nelle simulazioni con GROMACS	61
3.3	Coordinate atomiche iniziali e creazione del file di topologia	62
3.4	Creazione della box di simulazione	63
3.5	Aggiunta delle molecole di eccipiente	64
3.5.1	Eccipiente singolo	64
3.5.2	Eccipiente doppio	64
3.6	Aggiunta del solvente acquoso	65
3.6.1	Fase di congelamento	65
3.6.2	Fase di essiccamento	66
3.7	Aggiunta di ioni	69
3.8	Minimizzazione energetica	70
3.9	Equilibratura	71
3.10	Simulazione di Dinamica Molecolare	72
3.11	Post processing	73
3.11.1	Valutazione dell'esclusione preferenziale	73
3.11.2	Valutazione del water replacement	77
3.11.3	Indice di vetrificazione	79
4	Risultati simulazioni di DM	87
4.1	Meccanismi di protezione in fase di congelamento ed essiccamento	87
4.2	Esclusione preferenziale: metodo di Arakawa	88
4.2.1	Fase di congelamento	88
4.2.2	Fase di essiccamento	90
4.3	Distribuzioni radiali cumulative	91
4.3.1	Eccipiente singolo	93
4.3.2	Eccipiente doppio	93
4.4	Water replacement	113
4.4.1	Eccipiente singolo in fase di congelamento	113
4.4.2	Eccipiente singolo in fase di essiccamento	114
4.4.3	Eccipienti multipli	117
4.5	Indice di vetrificazione	122
4.5.1	Viscosità in fase di congelamento	122
4.5.2	Viscosità in fase di essiccamento	127
4.5.3	Variazione di viscosità in simulazioni con eccipienti multipli	127
4.6	Considerazioni finali sulle formulazioni studiate	129
5	Conclusioni e prospettive	133

A	File input	135
A.1	Saccarosio.gro	135
A.2	Topol.top	135
A.2.1	Molecule type	137
A.2.2	Atoms	137
A.2.3	Bonds	137
A.2.4	Pairs	140
A.2.5	Angles	142
A.2.6	Dihedrals	142
A.3	em.mdp	142
A.4	nvt.mdp	145
A.5	npt.mdp	147
A.6	md.mdp	147

Alla mia famiglia, per avermi dato la possibilità di raggiungere questo traguardo.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Caratterizzazione generale dei biofarmaci

La ricerca biomedica continua ad ampliare e arricchire il sapere contemporaneo riguardo i meccanismi molecolari che si trovano alla base della salute e della malattia. Gli studi intrapresi fin dagli anni '50 hanno individuato una serie di proteine prodotte naturalmente dagli organismi viventi che posseggono interessanti applicazioni terapeutiche. Tali proteine, isolate da tessuti animali o umani, possono essere utilizzate per compensare carenze congenite all'interno dell'organismo. A tal proposito, le industrie farmaceutiche stanno sempre più puntando sullo sviluppo di sostanze terapeutiche a base proteica come nuove entità chimiche; infatti, diversamente dalle molecole di piccole dimensioni, che di norma vengono sintetizzate mediante processi chimici, la maggior parte delle proteine devono essere processate all'interno di sistemi viventi, per lo più avvalendosi della tecnologia del DNA ricombinante. In questo modo le proteine possono essere prodotte nella loro forma funzionale (struttura quaternaria) anziché per biosintesi microbica (mediante batteri o lieviti). I biofarmaci rappresentano, quindi, una quota sempre crescente dei mercati farmaceutici mondiali. Oltre 125 biofarmaci sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) a partire dall'agosto 2008 [1]. Le vendite biotecnologiche negli Stati Uniti sono aumentate a 40.3 miliardi nel 2006 (a fronte dei 33 miliardi dell'anno precedente) secondo IMS Health. Inoltre, nel 2007, 58.8 miliardi di dollari sono stati investiti nei reparti di ricerca e sviluppo dalle aziende farmaceutiche per sostenere lo sviluppo di oltre 2000 nuovi biofarmaci [1].

Le proteine terapeutiche possono essere suddivise in due grandi gruppi: quelle di prima generazione che sono sostanzialmente analoghe alle proteine endogene umane e quelle di seconda generazione che, invece, vengono modificate in modo da migliorarne le caratteristiche farmacocinetiche come la biodegradabilità e la penetrazione cellulare. Il fine risulta essere quello di generare prodotti più stabili facilitandone così la conservazione. Dal punto di vista funzionale esse si dividono nelle seguenti categorie [2] :

1. proteine con attività enzimatica o regolatoria (*gruppo I*);

2. proteine con attività di targeting specifico (*gruppo II*);
3. vaccini proteici (*gruppo III*);
4. proteine diagnostiche (*gruppo IV*).

Le proteine del *gruppo I* hanno la funzione di rimpiazzare una proteina carente o non funzionale: un esempio illustre è quello dell'insulina nel caso del diabete; in più hanno la capacità stimolare ed aumentare un particolare meccanismo già esistente. Il tPA, ad esempio, agisce aumentando il processo fibrinolitico, necessario per la prevenzione dell'infarto del miocardio; infine sono in grado di fornire una nuova funzione o attività: le proteine estratte dalla papaya sono utilizzate per accelerare la guarigione dalle ustioni, mentre quelle estratte dalle ghiandole salivari delle sanguisughe hanno una funzione anticoagulante. Diversamente, le proteine del *gruppo II* hanno la capacità di interferire con una specifica molecola o meccanismo: sono infatti usate nel trattamento di patologie infiammatorie o tumori; inoltre, fungono da trasportatrici di altri composti, sostanze o medicinali su di un sito target. Le molecole proteiche appartenenti al *gruppo III*, invece, forniscono protezione contro gli agenti patogeni esterni sfruttando le caratteristiche immunogeniche delle proteine applicate come profilassi (vaccino per l'epatite B o per HPV); in aggiunta, possono essere sfruttate per il trattamento di disordini autoimmuni come la protezione contro un sistema immunitario iper-reattivo che riconosce come agenti estranei le proteine endogene. In Figura 1.1 sono rappresentati alcuni esempi di proteine terapeutiche.

L'utilizzo delle proteine terapeutiche beneficia di notevoli vantaggi:

- tali proteine esercitano una attività estremamente specifica e mirata;
- data la loro azione specifica hanno limitati effetti collaterali e indesiderati;
- permettono di sopperire ad un difetto genetico;
- il tempo di approvazione da parte delle autorità regolatorie è significativamente inferiore a quello delle molecole di sintesi.

Nonostante i numerosi aspetti positivi sopracitati, è risultato subito evidente che lo sviluppo di proteine con azione terapeutica fosse notevolmente più oneroso rispetto allo sviluppo farmacologico tradizionale. Le dimensioni molecolari delle proteine, infatti, sono ordini di grandezza superiori rispetto ai prodotti farmaceutici tradizionali; inoltre, esse posseggono una struttura secondaria e terziaria che le rende molto suscettibili al degrado fisico-chimico. Ad esempio, possono essere facilmente denaturate a causa di una elevata temperatura o, più semplicemente, da una non corretta agitazione meccanica. Molto spesso tali situazioni comportano un cambiamento strutturale della proteina con conseguente perdita della sua funzione specifica. La somministrazione delle suddette proteine potrebbe provocare una risposta del sistema immunitario, il quale potrebbe riconoscere tali molecole come

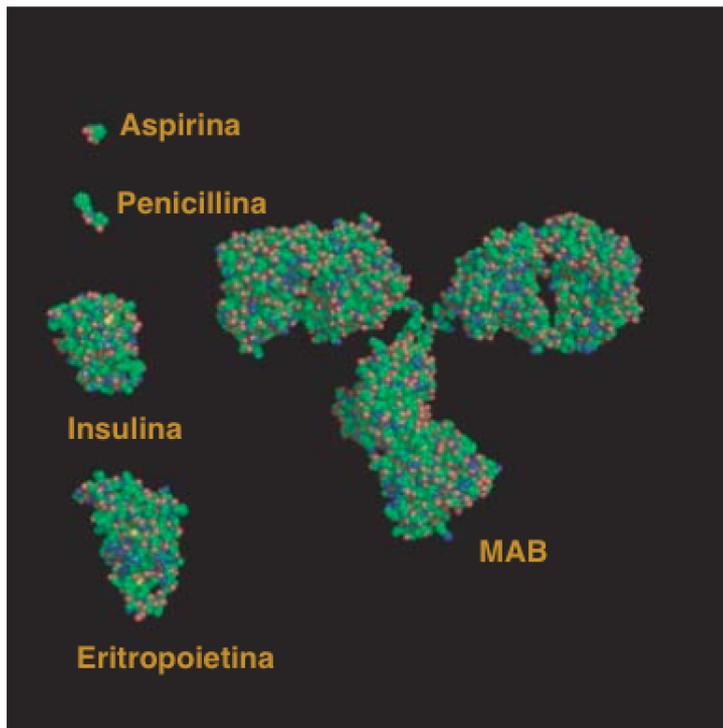


Figura 1.1: Rappresentazione molecolare di diversi tipi di proteine terapeutiche: Aspirina (180 Da), Penicillina (334 Da), Insulina (5808 Da), Eritropoietina (36000 Da), Anticorpo monoclonale (MAB) (150000 Da). Figura tratta da Jameel [3], con modifiche.

”corpi estranei”, alterando le proprietà della proteina stessa o danneggiando il paziente. Un ulteriore punto nodale riguarda la via di somministrazione più adatta; a fronte di ciò, la non indifferente stabilità delle proteine nel tratto gastrointestinale è uno dei motivi per cui esse vengono somministrate tradizionalmente per iniezione piuttosto che per via orale [4].

1.2 Conservazione dei biofarmaci

Tra tutte le diverse metodologie di conservazione bisogna privilegiare quella che permetta di salvaguardare le caratteristiche chimico-fisiche del prodotto desiderato. Come intuibile da quanto sopra esposto, oggi, uno dei fattori che limita maggiormente l’impiego su larga scala di questa applicazione è la stabilità nel tempo del prodotto finito: infatti se un prodotto non risultasse essere stabile non potrebbe essere commercializzato. In generale, un componente farmaceutico deve possedere una stabilità tale da consentire la sua conservazione per un periodo superiore ai 18 mesi. Per tale ragione vengono impiegate apposite formulazioni che hanno come

fine quello di salvaguardare l'attività proteica durante la fase di conservazione. Le caratteristiche richieste dal mercato sul prodotto finale sono le seguenti:

- deve essere sicuro ed efficace;
- deve essere stabile per soddisfare la durata di conservazione desiderata;
- la sua produzione deve essere economicamente sostenibile.

1.2.1 Instabilità delle proteine terapeutiche durante il periodo di conservazione

Uno degli aspetti più impegnativi per lo sviluppo di proteine terapeutiche è quello di ostacolare le instabilità fisiche e chimiche alle quali le molecole proteiche possono andare incontro durante il periodo precedente al loro utilizzo sul paziente.

Instabilità chimica

Le proteine contengono una elevata molteplicità di gruppi funzionali che possono incorrere in alterazioni dal punto di vista chimico. Tali reazioni vengono così classificate [3]:

- Reazioni di *idrolisi*;
- Reazioni di *ossidazione*;
- Reazioni di *condensazione*.

Idrolisi è un termine generale che caratterizza la classe di reazioni che provocano una rottura dei legami di una proteina a causa della presenza di acqua. La *deaminazione* è una delle più comuni; il suo meccanismo viene riportato in Figura 1.2. Un'altra tipologia di reazione idrolitica molto importante è la *proteolisi*; essa consiste nella rottura dei legami ammidici, i quali collegano gli amminoacidi che formano lo scheletro della proteina. Dopo il decorso della reazione lo scheletro proteico viene diviso in due catene polipeptidiche più piccole (Figura 1.3).

I processi di *ossidazione*, invece, producono delle alterazioni su residui amminoacidici aventi catene laterali aromatiche o contenenti zolfo. Tale tipo di reazione può seguire diversi meccanismi: tra i più noti vi è l'ossidazione catalizzata da metalli e quella di tipo radicalico. In tabella 1.1 sono riportati i prodotti ottenuti dopo l'ossidazione di alcuni amminoacidi.

Infine, il processo di condensazione consiste nella reazione tra due molecole, le quali si combinano tra loro per dare una molecola con un maggior peso molecolare, mediante l'eliminazione di un'altra molecola a basso peso molecolare, di solito acqua o alcool. La *glicazione* è una delle reazioni di condensazione più comuni nei peptidi e nelle proteine: uno zucchero e un'ammina reagiscono mediante l'eliminazione di una molecola d'acqua.

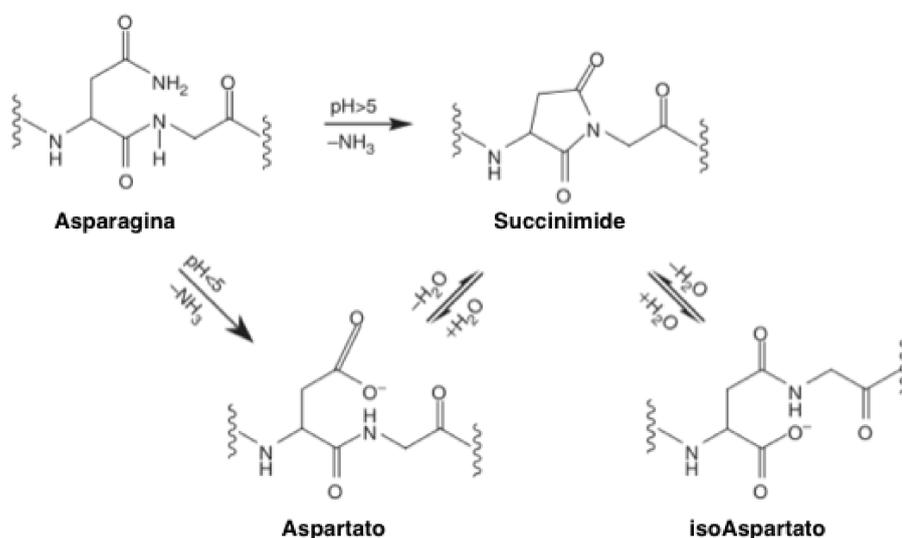


Figura 1.2: Deaminazione della Asparagina (Asn) e isomerizzazione dell'Aspartato (Asp). A $pH > 5$ la deaminazione dell'Asn procede attraverso la formazione di un intermedio di reazione (succinimide, Asu) mediante la perdita di ammoniaca, prima della formazione dell'Asp o dell'isoaspartato (isoAsp). A pH acidi vi è una reazione di idrolisi diretta che fornisce esclusivamente Asp come prodotto finale. La sua isomerizzazione ad isoAsp avviene solo attraverso la formazione dell'intermedio Asu. Immagine tratta da Jameel [3], con modifiche.

Instabilità fisica

È generalmente risaputo che le proteine modificano spontaneamente la loro struttura tridimensionale per adattarsi alle condizioni dell'ambiente circostante: se, ad esempio, sono collocate in un mezzo acquoso tenderanno ad esporre i residui polari e a nascondere quelli apolari. Tali cambiamenti strutturali comportano inevitabilmente il variare di alcune proprietà fisiche come la solubilità, la tendenza all'aggregazione e l'attività superficiale [5] [6]. In alcune situazioni, tutto ciò si traduce nella formazione di aggregati solubili, precipitati insolubili e perdite dovute all'adsorbimento superficiale.

In Figura 1.4 vengono riportate diverse strutture fisiche delle proteine. La struttura nativa (N) è caratterizzata da una forma correttamente ripiegata avente la minore energia libera. N*, invece, rappresenta una condizione rara che si verifica solo quando la struttura proteica diventa più compatta, a seguito dell'adattamento alle condizioni del sistema. In tale stato la probabilità di denaturarsi si riduce notevolmente. Tuttavia, la struttura nativa può incorrere in diverse variazioni strutturali nel momento in cui è soggetta a stress di tipo meccanico e termico oppure quando la proteina si trova all'interno di una soluzione; tale variazione strutturale

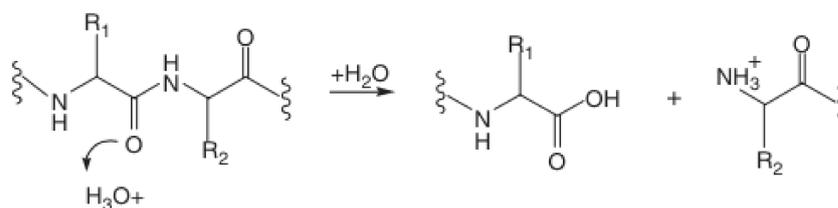


Figura 1.3: Meccanismo generale di proteolisi. Immagine tratta da Jameel [3] con modifiche.

Tabella 1.1: Prodotti comuni di reazioni di ossidazione di alcuni amminoacidi. Tratta da Jameel [3], con modifiche.

Amminoacido	Prodotto di ossidazione
Metionina (Met)	Met-solfossido
Istidina (His)	2-Oxo-His
Triptofano (Trp)	N-Formilchinureina, chinureina, idrossi-Trp
Cisteina (Cys)	Cistina, acido sulfenico
Tirosina (Tyr)	Ditirosina

comporta la formazione di un composto intermedio (I). A questo punto, a seconda delle caratteristiche dell'intermedio, si possono verificare diverse eventualità: ad esempio, se l'intermedio ha la tendenza ad interagire con altre molecole proteiche circostanti, si può incorrere nello sviluppo di aggregati solubili (A) o precipitati (P) [7]. Come si nota dalla Figura 1.4, gli aggregati di tipo A sono in equilibrio con la struttura intermedia, ma a causa di ulteriori cambiamenti conformazionali si potrebbe indurre la formazione dell'aggregato stabile A* [8]. Nel caso in cui, invece, l'intermedio subisca variazioni strutturali che hanno come conseguenza la perdita della struttura secondaria, allora si origina la forma denaturata D. Tale transizione può essere indotta da intensi stress meccanici o da una temperatura più alta di quella di denaturazione. Sebbene lo stato D sia reversibile, altre modifiche fisico-chimiche possono rendere il processo irreversibile con la formazione della forma denaturata stabile D*. Dalla precedente trattazione si evince come le caratteristiche fisico-chimiche delle proteine siano di fondamentale importanza per assicurare al prodotto finale stabilità adeguata nel lungo periodo.

1.2.2 Metodologie per la conservazione

Teoricamente sarebbe preferibile ottenere un prodotto in soluzione acquosa: tale tipo di formulazione, infatti, permetterebbe di agevolare sia la preparazione sia la manipolazione da parte dell'utente finale. Tuttavia, la maggior parte delle proteine

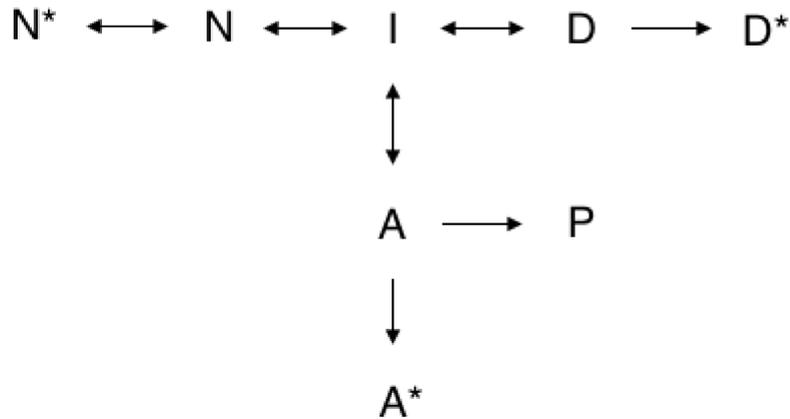


Figura 1.4: Alcune strutture delle proteine (N = struttura nativa, I = struttura ripiegata intermedia, A = forma aggregata, D = forma denaturata, P = forma precipitata). Immagine tratta da Jameel [3], con modifiche.

a scopo terapeutico sono abbastanza stabili in soluzioni acquose solo per brevi periodi di tempo. Se un prodotto non esibisce sufficiente stabilità in fase acquosa esso deve essere portato in fase solida. La stabilità di piccole molecole, infatti, aumenta nel seguente ordine:

soluzione acquosa < solido amorfo < solido cristallino

Ciò è dovuto alla sempre più limitata mobilità delle specie reattive all'interno di tali fasi. Al fine di ottenere un prodotto in forma solida le tecniche maggiormente utilizzate sono:

- essiccamento spray;
- essiccamento sottovuoto;
- liofilizzazione.

L'essiccamento spray (Figura 1.5) è un processo operante in continuo che converte una soluzione o una sospensione in polvere mediante l'utilizzo di un gas riscaldato che provoca l'immediata evaporazione del solvente [9]. La soluzione d'alimentazione viene nebulizzata in piccole goccioline mediante un apposito dispositivo detto atomizzatore o ugello nebulizzatore. Le goccioline sono poste in contatto con del gas, precedentemente preriscaldato, all'interno della drying chamber. Il contatto provoca l'immediata evaporazione del solvente e l'ottenimento di un solido in forma polverosa. Mediante un ciclone vi è la separazione e la raccolta del

prodotto ottenuto. L'essiccamento spray rappresenta il metodo maggiormente utilizzato per la disidratazione di cibi in ambito alimentare e viene anche largamente utilizzato per ottenere prodotti biofarmaceutici sotto forma di polvere; la dimensione e morfologia del prodotto finale è di notevole importanza per quanto concerne il trasporto e le performance. Tuttavia, il controllo del tenore di umidità residua e delle sollecitazioni causate dall'atomizzazione continuano ad essere fattori da migliorare per soddisfare i requisiti di stabilità e resa di processo.

L'essiccamento sottovuoto, invece, è una tecnologia che permette di eliminare l'umidità residua del componente mediante una evaporazione controllata in condizioni di vuoto. È largamente utilizzato nell'industria alimentare, in quanto è molto efficace nel salvaguardare le caratteristiche di prodotti fortemente termolabili e viene anche adoperato per stabilizzare varie formulazioni biofarmaceutiche [10] [11]. Le condizioni operative generano solitamente una struttura schiumosa. Solitamente si lavora ad una temperatura prossima a quella ambiente. L'essiccamento sottovuoto richiede una minore spesa energetica rispetto ad altri processi come la liofilizzazione, perciò rappresenta una tecnica promettente per l'applicazione su prodotti biofarmaceutici quando si deve operare in condizioni sterili [12].

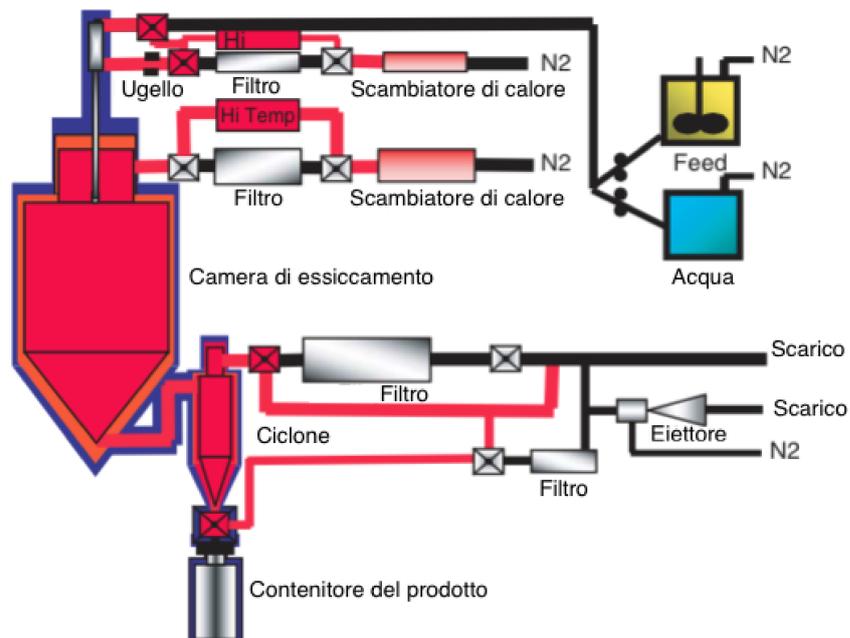


Figura 1.5: Sistema di essiccamento spray con un sistema di sterilizzazione a secco. Immagine tratta da Anhydro A/S, Denmark, con modifiche.

Tuttavia, il metodo più comunemente utilizzato al giorno d'oggi per produrre proteine terapeutiche in fase solida è la liofilizzazione.

1.3 Liofilizzazione come metodo di conservazione

La liofilizzazione è il processo di allontanamento di un solvente da una matrice solida per sublimazione. Tale tipo di processo permette di preservare le proprietà chimico-fisiche e organolettiche del prodotto. È molto utilizzato in ambito farmaceutico, in quanto stabilizza le formulazioni contenenti principi attivi. Un tipico liofilizzatore farmaceutico consta di una camera con all'interno una serie di ripiani a temperatura controllata unita ad un sistema di vuoto costituito da un condensatore ed una pompa da vuoto (Figura 1.6).



Figura 1.6: Esempio di un liofilizzatore ad utilizzo farmaceutico. Immagine tratta da www.pharmaceuticalonline.com

Il processo si articola in tre diverse fasi (Figura 1.7):

1. *Congelamento:* si diminuisce la temperatura del prodotto: così facendo la maggior parte dell'acqua presente cristallizza, mentre la restante parte viene adsorbita sulla superficie del principio attivo solido. Il quantitativo di acqua non congelata per le proteine globulari equivale a $0.3 \text{ g/g}_{\text{proteina}}$ [13] [14].
2. *Essiccamento primario:* viene ridotta la pressione all'interno del sistema e si riscalda accuratamente il prodotto in modo da indurre la sublimazione della matrice acquosa congelata.

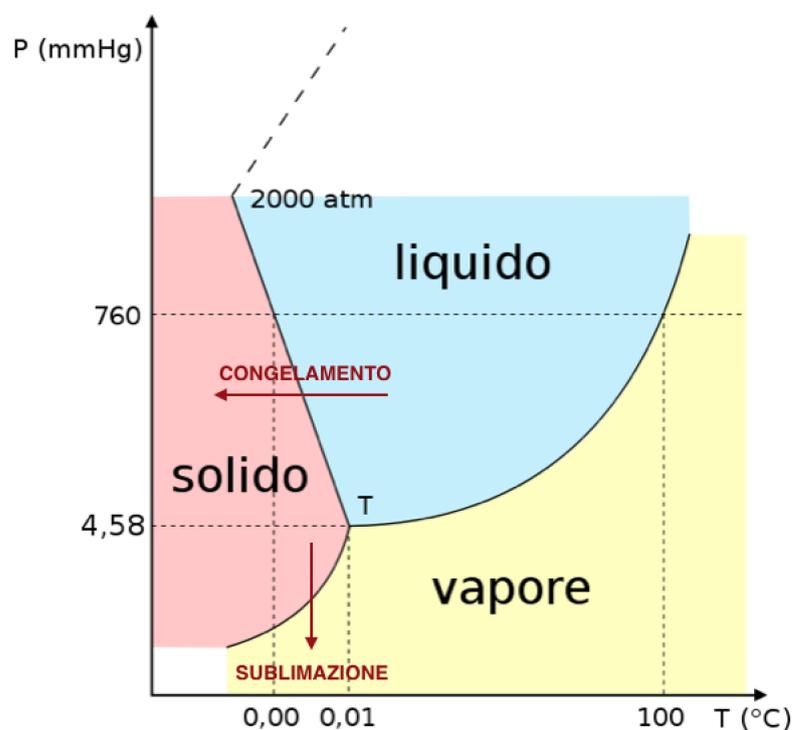


Figura 1.7: Diagramma di stato dell'acqua evidenziante le diverse fasi di un generico processo di liofilizzazione. Figura tratta da <https://it.wikipedia.org>, con modifiche.

3. *Essiccamento secondario:* si aumenta maggiormente la temperatura del prodotto, mantenendo un elevato grado di vuoto, in modo da allontanare l'acqua non congelata per desorbimento.

Durante l'essiccamento primario e secondario il ghiaccio sublimato e l'acqua rimossa per desorbimento vengono condensati all'interno di un condensatore, il quale lavora ad una temperatura inferiore rispetto alla camera di essiccamento. L'utilizzo della liofilizzazione presenta numerosi vantaggi [15]:

- Aumenta la shelf life del prodotto: esso può essere conservato a temperatura ambiente per lunghi periodi, se adeguatamente confezionato;
- Il prodotto finale conserva le medesime caratteristiche chimico-fisiche e biologiche del prodotto iniziale;
- La sublimazione dei cristalli di solvente crea una struttura porosa, con elevata area superficiale specifica, che permette di reidrattare il prodotto velocemente;
- Il prodotto essiccato presenta un tenore molto basso di umidità residua, il che rallenta le cinetiche dei processi chimici e biologici di degradazione;

- Il processo può essere condotto in condizioni sterili;
- Lo stoccaggio e il trasporto di un prodotto liofilizzato è più semplice ed economico.

In Figura 1.8 e 1.9 sono riportati alcuni biofarmaci presenti sul mercato.

1.3.1 Problematiche legate alla liofilizzazione dei biofarmaci

In commercio esistono solo alcune proteine che sono in grado di tollerare gli stress indotti dal processo di liofilizzazione senza perdere la loro funzione biologica: tra queste vi è l' α 1-antitripsina in una soluzione tampone contenente citrato [16], l'e-lastasi pancreatica porcina senza alcun eccipiente [17] e la ribonucleasi pancreatica bovina in presenza o in assenza di fosfato [18]. In generale le proteine solubili nel loro ambiente cellulare sono caratterizzate dai seguenti aspetti [19]:

- minimizzazione dell'area superficiale idrofobica mediante l'isolamento dei residui non polari dal solvente acquoso;
- minima idratazione delle molecole orientate all'interno della struttura proteica;
- massima densità d'impaccamento.

La stabilità della molecola proteica dipende dalle interazioni elettrostatiche ed idrofobiche, le quali sono sensibilmente influenzate da molteplici fattori. È noto, infatti, che una proteina denaturata mantiene inalterata la sua struttura covalente; pertanto la sua disattivazione viene causata da una competizione tra le interazioni proteina-solvente e le interazioni che, invece, stabilizzano lo stato nativo della proteina stessa. Prendendo come esempio il processo di liofilizzazione, esso genera una varietà di sollecitazioni che tendono a destabilizzare o denaturare la maggior parte delle proteine non protette. Tali stress possono essere suddivisi nelle seguenti categorie:

1. stress indotti dalle basse temperature;
2. stress dovuti al congelamento, che includono la formazione di cristalli di ghiaccio dendritici, l'incremento della forza ionica della soluzione, il cambiamento di pH e la separazione di fase;
3. stress dovuti alla fase di essiccamento che portano alla rimozione dello strato d'idratazione attorno alla proteina.

Stress a basse temperature

La solubilità in soluzioni acquose dei gruppi non polari è sensibilmente influenzata dalla temperatura. In particolare, essa aumenta con il diminuire della temperatura

Generic name	Trade name	Manufacturer	Physical form	Route of admin	Component	Concentration
Antithemophilic factor	Humate-P	Centcon	Lyophilized (recons. with sterile WFI)	IV	Factor VIII Glycine Sodium citrate Sodium chloride Other proteins	20-40 IU/mL 15-33 mg/mL 3.5-9.3 mg/mL 2-5.3 mg/mL 1-7 mg/mL
Anti-inhibitor coagulant complex vitamin K dependent clotting factors (Heparin)	Autoplex [®] T	Nabi	Lyophilized (recons. with sterile WFI)	IV	Heparin Polyethylene glycol Sodium citrate	2 units/mL 2 mg/mL 0.02 M
Anti-thymocyte globulin (transplant rejection)	Thymoglobulin	SangStat	Lyophilized (recons. with sterile WFI)	IV	Anti-thymocyte globulin Glycine Mannitol NaCl	25 mg 50 mg 50 mg 10 mg
Asparaginase (acute lymphocytic leukemia)	Elspar	Merck	Lyophilized (recons. with WFI, NaCl or D5W)	IV or IM	Asparaginase Mannitol	10,000 IU 80 mg
Basiliximab (organ rejection)	Simulect	Novartis	Lyophilized (recons. with sterile WFI)	IV	Basiliximab K phosphate monobasic Disodium hydrogen phosphate NaCl Sucrose Mannitol Glycine	10 mg 3.61 mg 0.5 mg 0.8 mg 10 mg 40 mg 20 mg
BCG, live (urinary bladder cancer)	Pacis	BioChem Pharma	Lyophilized (recons. with 0.9% NaCl Inj. USP)	Intra-vesical	Mycobacterium bovis Lactose	2.4 - 12 × 10 ⁸ CFU/ampule 15%
Botulism immune globulin (infant botulism)	BabyBIG	CA Dept. of Health	Lyophilized	IV infusion	IgG antibodies, type A IgG antibodies, type B Human albumin Sucrose NovoSeven	15 IU/mL 4 IU/mL 1% 5% 0.6 mg/mL
Coagulation factor VIIa (hemophilia treatment)	NovoSeven	Novo Nordisk	Lyophilized 60, 240 IU (recons. with sterile WFI)	IV	NaCl Calcium chloride dihydrate Glycylglycine Polysorbate 80 Mannitol	3 mg/mL 1.5 mg/mL 1.3 mg/mL 0.1 mg/mL 30 mg/mL

Figura 1.8: Alcuni biofarmaci venduti sul mercato con relative formulazioni. Immagini tratte da Schwegman [20].

Generic name	Trade name	Manufacturer	Physical form	Route of admin	Component	Concentration
Human Chorionic Gonadotropin	Profast [®]	Serono	Lyophilized 10,000 U/vial (recon. with bact WFI)	IM	Sodium phosphate monobasic	4 mg
Human Chorionic Gonadotropin	Pergonal	Serono	Lyophilized 75 U/2 mL ampule (recon. with NaCl for inj.)	IM	Sodium phosphate dibasic Mannitol Benzyl alcohol (diluent) Lactose	16 mg 100 mg 0.90% 10 mg
Human Chorionic Gonadotropin	Novarel	Ferring	Lyophilized 10,000 units (recon with bact. WFI)	IM	Mannitol	100 mg
Human Chorionic Gonadotropin	Repronex	Ferring	Lyophilized 75 U/2 mL ampule (recon. with NaCl for inj.)	IM/SC	Benzyl alcohol (diluent) Lactose monohydrate	0.90% 20 mg
Human Growth Hormone	Humatrope [®]	Lilly	Lyophilized 2, 5, 10,000 U/vial (recons. with special diluent)	SC/IM	Somatropin Mannitol	5 mg = 15 IU 25 mg
Human Growth Hormone	Nutropin [®]	Genentech	Lyophilized (recons. with bact WFI)	SC	Glycine Sodium phosphate dibasic Meta. cresol (diluent) Glycerin (diluent)	5 mg = 15 IU 1.13 mg 0.30% 1.70%
Human Growth Hormone	Nutropin Depot [™]	Genentech	Microspheres powder (recons. with special diluent)	SC (1 - 2 x monthly)	Somatropin Mannitol Sodium phosphate monobasic Sodium phosphate dibasic Glycine Benzyl alcohol (diluent)	5 mg = 15 IU 45 mg 0.4 mg 1.3 mg 1.7 mg 0.90%
Human Growth Hormone	Saizen [®] for growth def.	Serono	Lyophilized (recons. with bact WFI)	IM/SC	Somatropin Zinc acetate Zinc carbonate Polylactic/polyglycolic copolymers	13.5 mg 1.2 mg 0.8 mg 68.9 mg
Human Growth Hormone	Serostim [®] for AIDS	Serono	Lyophilized (recons. with SWFI or bact WFI)	SC	Somatropin Sucrose O-phosphoric acid Somatropin Sucrose Phosphoric acid	5.0 mg = 15 IU 34.2 mg 1.165 mg 4.0 mg = 12 IU 27.3 mg 0.9 mg

Figura 1.9: Alcuni biofarmaci venduti sul mercato con relative formulazioni. Immagini tratte da Schwegman [20].

a causa di una maggiore idratazione dei gruppi non polari che portano ad un decremento delle interazioni solvofobiche delle proteine [21] [22]. La riduzione dei tali interazioni può portare alla denaturazione della proteina. Teoricamente l'energia libera di unfolding della proteina (ΔG_{unf}) segue un andamento parabolico in funzione della temperatura. Ciò significa che esiste una temperatura alla quale si ha la massima stabilità proteica, con i fenomeni di instabilità che possono essere indotti sia dalle alte che dalle basse temperature.

Effetto di concentrazione

Il congelamento di una soluzione proteica incrementa drasticamente la concentrazione di tutti i soluti presenti per via della formazione dei cristalli di ghiaccio. Di conseguenza tutte le proprietà fisiche legate alla concentrazione sono soggette a variazione: esempi sono la forza ionica e la composizione della soluzione a causa della cristallizzazione di alcuni componenti. Inoltre, nonostante una diminuzione di temperatura possa rallentare il decorso di reazioni chimiche all'interno del sistema, esse possono in ogni caso verificarsi per via del sostanziale aumento di concentrazione della soluzione (la velocità di reazione può aumentare di ordini di grandezza [23] [24]).

Formazione di interfaccia acqua-ghiaccio e effetto del pH

Il congelamento di una soluzione proteica genera la formazione di una interfaccia acqua-ghiaccio. Le proteine possono essere adsorbite su tale interfaccia perdendo la loro struttura nativa. In tale contesto gioca un ruolo fondamentale il grado di raffreddamento applicato durante la fase di congelamento. Una leggera diminuzione di temperatura comporta la formazione di cristalli con una maggiore area superficiale e quindi aumenta il rischio di denaturazione per adsorbimento. La maggior parte delle proteine sono stabili solo in un ristretto campo di pH: infatti, valori di pH estremi provocano un aumento della repulsione elettrostatica tra le cariche all'interno delle proteine, causando l'unfolding della struttura o la denaturazione [25]. Inoltre il pH della soluzione può influenzare notevolmente la velocità di molte reazioni di degradazione proteica [26]. Il congelamento di una soluzione proteica può cristallizzare selettivamente una delle specie presenti all'interno del sistema, causando cambiamenti di pH. Ad esempio Na_2HPO_4 cristallizza più facilmente di NaH_2PO_4 per via della differente solubilità dei due composti. Per tale ragione, un tampone di fosfato di sodio a pH 7 ha un rapporto molare di $[\text{NaH}_2\text{PO}_4] / [\text{Na}_2\text{HPO}_4]$ di 0.72, ma tale rapporto aumenta a 57 durante la fase di congelamento [23]. Ciò può portare ad un calo significativo del pH con conseguente denaturazione delle proteine sensibili al mutamento di tale grandezza.

Separazione di fase durante il congelamento

La separazione di fase durante l'operazione di congelamento si verifica all'interno di soluzioni contenenti dei polimeri, la cui solubilità viene alterata dalle basse

temperature. Ad esempio, durante l'operazione di raffreddamento di una soluzione avente come principio attivo l'emoglobina e contenente il 4%(w/w) PEG 3350, 4%(w/w) destrano T500 e 150 mM NaCl si ha una separazione liquido-liquido che porta ad un incremento dell'area superficiale su cui la proteina può adsorbirsi, favorendone la denaturazione [27]. Per scongiurare tale meccanismo sono stati utilizzati diversi approcci: il più utilizzato prevede l'adeguamento della composizione relativa dei polimeri, in modo da oltrepassare rapidamente la regione di temperatura all'interno del quale si può realizzare una separazione liquido-liquido [28].

Stress dovuti alla disidratazione

Le proteine in una soluzione acquosa sono totalmente idratate. Una proteina completamente idratata ha un monostato di acqua che copre la sua superficie, chiamato guscio di idratazione. In questa condizione la quantità di acqua ammonta a 0.3 g/g_{proteina}. In generale, il contenuto acquoso di un prodotto proteico liofilizzato è inferiore al 10% in massa. Pertanto, risulta evidente come il processo di liofilizzazione rimuova una parte del guscio di idratazione. Tale rimozione può compromettere lo stato nativo di una proteina e causare la sua denaturazione. Una proteina idratata, quando esposta a un ambiente povero di acqua durante la fase di disidratazione, tende a trasferire protoni a gruppi carbossilici ionizzati e rimuove quante più cariche possibili nella proteina [13]. La diminuzione della densità di carica può facilitare l'interazione idrofobica proteina-proteina, provocando quindi l'aggregazione proteica. Inoltre, le molecole d'acqua possono essere parte integrante di siti attivi nelle proteine. La loro rimozione può perciò danneggiare irreversibilmente la struttura proteica. Infine, la disidratazione durante la liofilizzazione può causare una notevole differenza nella distribuzione dell'umidità in diverse posizioni del prodotto. Tale situazione comporta la presenza di zone localizzate dove vi è un minor quantitativo di umidità che possono indurre la denaturazione della proteina in questione.

1.3.2 Design ottimale del processo di liofilizzazione

In base a quanto espresso nel precedente paragrafo risulta evidente quanto sia importante l'ottimizzazione del processo di liofilizzazione. Il principale obiettivo di realizzare un design ottimale di un ciclo di liofilizzazione è quello di ottenere un prodotto stabile ed esteticamente accettabile. Per adempiere a tale scopo occorre innanzitutto determinare e definire alcuni parametri che caratterizzano il ciclo di liofilizzazione di una generica formulazione. I più importanti sono: la temperatura di transizione vetrosa (T'_g), la temperatura di collasso (T_{col}), il grado di raffreddamento, il grado di essiccamento e il quantitativo di umidità residua.

Temperatura di transizione vetrosa e temperatura di collasso

Si consideri una generica formulazione contenente il principio attivo proteico assieme ad opportuni eccipienti. La formazione dei cristalli di ghiaccio durante la

fase di raffreddamento modifica la concentrazione di tutti i soluti presenti, i quali cambiano lo stato della soluzione da uno liquido viscoso ad uno vetroso che contiene circa 20-50% di acqua. La temperatura di questa transizione reversibile è chiamata temperatura di transizione vetrosa. La temperatura di collasso, invece, è la massima temperatura del prodotto che permette di condurre uno step di essiccazione senza la perdita della struttura porosa formatasi durante la precedente fase di congelamento. Tale perdita causerebbe una maggiore resistenza al passaggio del vapor d'acqua con la necessità, quindi, di innalzare ulteriormente la temperatura. L'essiccamento effettuato al di sopra della temperatura di collasso porterebbe ad un peggioramento del prodotto dal punto di vista estetico, ad un più elevato contenuto di umidità residua e ad un tempo di ricostituzione più alto a causa dell'assenza della struttura porosa. Con alcune proteine ciò è accompagnato dalla perdita della loro attività biologica. Nel caso in cui tutti gli eccipienti presenti nella formulazione formino una fase amorfa dopo il congelamento senza cristallizzare, allora il valore di T'_g aumentato di 2°C rappresenta la T_{col} . Nel caso in cui, invece, gli eccipienti cristallizzano, allora la temperatura eutettica (T_e) sarà la T_{col} di quella particolare formulazione [3]. In Tabella 2.25 vengono riportate la temperatura di transizione vetrosa e quella di collasso per alcuni eccipienti comunemente utilizzati.

Tabella 1.2: Temperature di transizione vetrosa e di collasso di alcuni eccipienti. I valori di T_{col} sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di un freeze-drying microscope mentre i valori di T'_g sono stati ricavati usando una DSC con una velocità di riscaldamento di circa 10°C/min. I valori sono tratti da Jameel [3].

Materiale	$T'_g, ^\circ\text{C}$	Riferimento	$T_{col}, ^\circ\text{C}$	Riferimento
BSA	-11	34	-	-
Destrano	-10	34.11	-10	37
Destrosio	-44	11	-	-
Lattosio	-28	34.11	-31	37
Mannitolo	-35	34.11	-	-
Raffinosio	-27	35	-26	38
Saccarosio	-32	34.36	-34	37
Trealosio	-29	34.11	-34	37
Istidina	-33	34	-	-

Grado di raffreddamento

Un parametro fondamentale che deve essere accuratamente definito nella fase di congelamento è il grado di raffreddamento (v). Esso può essere interpretato mediante la relazione (1.1)

$$v = \frac{\delta T(r, t)}{\delta t}, \quad (1.1)$$

dove $T(r, t)$ è il profilo di temperatura. In generale un grado di raffreddamento veloce genera piccoli cristalli di ghiaccio, perché la cristallizzazione avviene in maniera molto rapida. Contrariamente, un grado di raffreddamento lento produce cristalli di grandi dimensioni (Figura 1.10). Questi ultimi creeranno dei pori o canali di dimensione non trascurabile durante la sublimazione del ghiaccio e renderanno, quindi, più rapido il processo di essiccamento primario. Tuttavia, una dimensione maggiore dei cristalli comporta una minore area superficiale; per tale ragione l'essiccamento secondario avverrebbe in tempi più lunghi. Occorre perciò operare con un grado di raffreddamento di circa 10-15 °C sotto lo zero (temperatura a cui si riscontra la formazione dei primi nuclei e cristalli di ghiaccio) [3].

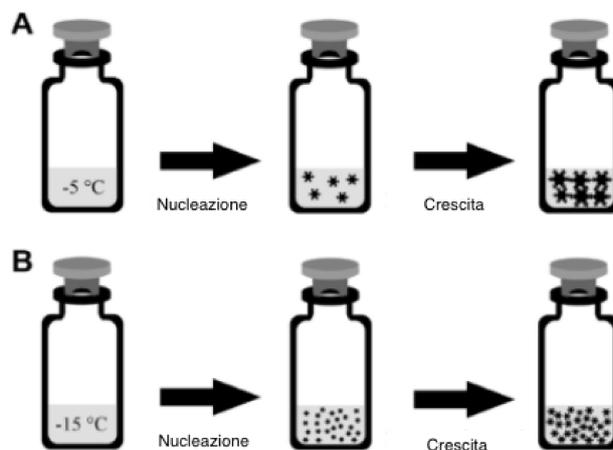


Figura 1.10: Influenza della temperatura di nucleazione sulla morfologia dei cristalli. Immagini tratte da Geidobler [29], con modifiche.

La denaturazione delle proteine durante la fase di congelamento è funzione sia del grado di raffreddamento sia della temperatura finale [23]. Inoltre, un elevato grado di congelamento è in grado di evitare la nucleazione e la conseguente cristallizzazione dei componenti presenti all'interno della soluzione. Ciascun componente ha il suo grado di raffreddamento critico che è definito come il minimo grado di raffreddamento utile ad evitare la cristallizzazione del soluto [30]: essa non si verifica se il grado di raffreddamento con cui si esegue il congelamento è maggiore di quello critico.

Grado di essiccamento

Diversi modelli sono stati ipotizzati per descrivere il grado di essiccamento (e) durante la liofilizzazione. Quando la temperatura del ripiano della camera di liofilizzazione è fissata, tale grado può essere espresso mediante la relazione (1.2):

$$e = \frac{A_p(P_p - P_0)}{R_p}, \quad (1.2)$$

dove A_p è l'area della sezione trasversale del prodotto, P_p è la tensione di sublimazione, P_0 è la pressione parziale del flacone contenente il prodotto e R_p è la resistenza esercitata dal prodotto secco al flusso di vapore. Dal momento che P_p , A_p e R_p sono generalmente fissate per un certo valore del grado di raffreddamento, allora il grado di essiccamento può essere variato agendo soltanto sulla P_0 . Inoltre, se R_p cambia durante il processo di essiccamento, la velocità di essiccamento e la temperatura del prodotto cambiano di conseguenza. La forza motrice per la sublimazione dell'acqua durante la liofilizzazione è la differenza di temperatura tra il prodotto e il condensatore. Nell'essiccamento primario, la temperatura di condensazione utilizzata è di -60 °C, consentendo una differenza di circa 20 °C rispetto alla temperatura del prodotto [23]. Durante l'essiccamento secondario, invece, la temperatura del condensatore può essere anche più bassa (-80 °C), in modo particolare per formulazioni che richiedono un'umidità residua molto bassa [31]. Poiché la temperatura del prodotto è controllata dalla temperatura del ripiano, è essenziale un efficace trasferimento di calore tra il ripiano e prodotto, influenzato dal grado di vuoto nella camera di essiccamento. Un incremento moderato della pressione nella camera provoca un incremento del grado di essiccamento per via di un trasferimento di calore più efficiente.

Per prevenire il collasso del prodotto, la sua temperatura deve essere mantenuta al di sotto della temperatura di transizione vetrosa T'_g (o T_{col}) della formulazione o inferiore alla temperatura eutettica (T_{eut}) di qualsiasi componente cristallino. D'altra parte, l'essiccamento primario dovrebbe essere condotto ad una temperatura il più vicino possibile a tali limiti, in modo da avere una elevata efficienza. Pertanto, per avere un'efficace fase di essiccamento e per ridurre la probabilità di collasso dei prodotti, una formulazione deve essere progettata in modo tale che la sua T'_g sia la più alta possibile.

Umidità residua

La durata dello step di essiccamento all'interno di un ciclo di liofilizzazione dipende dal livello di umidità residua che si vuole ottenere per il prodotto finale. Le proteine hanno siti di legame forti e deboli per accogliere l'acqua congelata. I siti di legame deboli includono generalmente i gruppi carbonilici dello scheletro polipeptidico, più alcuni gruppi idrofilici come $-OH$ e $-NH$; i siti di legame forte, invece, comprendono i gruppi ionizzabili negli amminoacidi come Glu, Asp, Lys, e Arg. Poiché il tenore di umidità residua per i prodotti proteici liofilizzati è di solito inferiore al 10%, l'essiccamento secondario rimuove il quantitativo di acqua debolmente legata alla proteina e alcune molecole acquose fortemente legate. Pertanto, l'umidità residua non è altro che una piccola porzione di molecole di acqua fortemente legate alla proteina. Essa provoca una serie di instabilità nelle proteine essiccate e, di solito, un contenuto di umidità inferiore porta ad un prodotto più

stabile nel tempo. Per trovare il contenuto di umidità residuo che conferisce la massima stabilità ad un prodotto proteico liofilizzato, dovrebbero essere condotti studi di stabilità a lungo termine su formulazioni proteiche con diversi valori di umidità residua.

1.4 Formulazioni proteiche

Come precedentemente esposto, una formulazione proteica deve essere realizzata in modo da fronteggiare le sollecitazioni e gli stress imposti da tutte le diverse fasi del processo di liofilizzazione. Il primo passo verso la progettazione di una formulazione efficace, quindi, risiede nell'identificazione delle instabilità a cui è soggetta la generica proteina durante la liofilizzazione. I criteri di ottimizzazione sono [32]:

1. bisogna inibire l'unfolding della proteina durante le fasi di congelamento ed essiccamento;
2. la temperatura di transizione vetrosa del prodotto deve essere superiore a quella di conservazione;
3. il contenuto di acqua residua deve essere estremamente basso;
4. il prodotto deve essere elegante dal punto di vista estetico;
5. bisogna adottare specifici accorgimenti per evitare la degradazione chimica della proteina.

I primi quattro criteri possono essere realizzati mediante una scelta oculata degli eccipienti e il design di un opportuno ciclo di liofilizzazione. A tal proposito, c'è da tenere in considerazione che, anche se gli eccipienti impediscono la denaturazione proteica durante il congelamento, essa si può verificare durante la successiva fase di essiccamento [33]; viceversa, se la proteina viene denaturata durante lo step di congelamento, non riacquisterà la sua struttura nativa durante la successiva disidratazione. Inoltre, è preferibile progettare delle formulazioni che abbiano come eccipienti dei composti che siano già stati approvati per prodotti ad uso parenterale. L'ultimo criterio, invece, richiede una profonda comprensione delle proprietà fisico-chimiche di ciascuna proteina. Ogni proteina, infatti, possiede delle caratteristiche uniche, alcune delle quali possono causare maggiori difficoltà nella progettazione di formulazioni stabili. In generale, gli additivi utilizzati si articolano nelle seguenti categorie:

- stabilizzatori, che si dividono in:
 - crio-protettori;
 - lio-protettori;
- soluzioni tampone (buffers);

- agenti di bulking;
- agenti inibenti l'aggregazione e l'adsorbimento proteico.

1.4.1 Buffers

Le caratteristiche proprie di un buffer utilizzato all'interno delle formulazioni proteiche sono riassunte nei seguenti punti [3]:

1. deve essere non volatile in modo che i suoi componenti non vadano persi durante l'intero processo di liofilizzazione. Nel caso in cui si utilizzi acido acetico o acido cloridrico per regolare il pH, il processo di liofilizzazione può causare cambiamenti significativi del pH;
2. deve avere una elevata T'_g e T_{col} in modo da poter condurre il processo di liofilizzazione a temperature normali;
3. non deve cristallizzare durante il raffreddamento, causando variazioni di pH; inoltre non deve avere una pK_a fortemente influenzata dalla temperatura.

Un tampone viene principalmente utilizzato per controllare e mantenere costante il pH della soluzione, specialmente durante lo step di congelamento. Si consideri, ad esempio, un sistema contenente un buffer di fosfato di sodio; tale soluzione evidenzia una drastica diminuzione del pH (quattro unità) a causa della cristallizzazione del $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [34], mentre il sistema contenente fosfato di potassio mostra solo un modesto aumento del pH, di circa 0.8 unità, dopo il congelamento, anche in condizioni di equilibrio. A tal proposito, Gomez *et al.* [35] hanno dimostrato che la cristallizzazione del tampone fosfato dipende dalla concentrazione iniziale, dal grado di raffreddamento e dalla dimensione del campione. In Tabella 1.3 vengono riportati i valori di pH, relativi a sistemi con diversi buffer di fosfato, durante lo step di congelamento, eseguito in condizioni di non equilibrio.

Tabella 1.3: Variazioni di pH durante il processo di congelamento in condizioni di non equilibrio di una soluzione contenente un buffer di fosfato. Dati reperiti da Gomez *et al.* [35].

Concentrazione, mM	pH iniziale	pH dopo il congelamento	ΔpH
<i>Fosfato di sodio</i>			
100	7.5	4.1	-3.4
8	7.5	5.1	-2.1
<i>Fosfato di potassio</i>			
100	7	8.7	1.7
100	5.5	8.6	3.1
10	5.5	6.6	1.1

I dati indicano che più alta è la concentrazione di tampone, più le variazioni di pH sono sostanziose. Alte concentrazioni del buffer, quindi, aumentano la possibilità di spostamenti di pH durante il congelamento; inoltre si deve tener presente un ulteriore aspetto: anche se la cristallizzazione dei componenti del buffer fosse evitata, i livelli elevati di sali comporterebbero il sopraggiungere di ulteriori problematiche, poiché si ridurrebbe la temperatura di transizione vetrosa della soluzione congelata [36] e, di conseguenza, la temperatura di collasso. In tale contesto, è stato dimostrato che il tampone di citrato risulta essere la scelta migliore, in quanto il citrato non cristallizza facilmente e ha una temperatura di collasso elevata.

1.4.2 Agenti di bulking

Le formulazioni che contengono una concentrazione di principio attivo minore dell'1% necessitano dell'utilizzo di un agente di bulking: esso è utile ad innalzare la densità del prodotto finale e ad evitare perdite della proteina durante la fase di essiccamento. Inoltre, permette di aumentare l'eleganza estetica del prodotto e di innalzare la temperatura massima alla quale può essere condotto lo step di essiccamento primario [3].

A seconda delle caratteristiche richieste dal prodotto finale, si possono adoperare una serie di eccipienti; tra questi vi sono disaccaridi come il saccarosio, il trealosio e il lattosio, trisaccaridi come il raffinose e altri polimeri come l'idrossietilcellulosa (HES), il destrano e il polivinilpirrolidone (PVP). Tali eccipienti, usati come agenti di bulking, tendono a rimanere amorfi durante il processo di liofilizzazione e di conservazione. Tuttavia, la maggior parte di essi, ad eccezione dell'idrossietilcellulosa e del destrano, presentano basse temperature di collasso; ciò comporta l'esigenza di effettuare la fase di essiccamento a basse temperature, innalzando, di conseguenza, il tempo necessario a svolgere il processo. Anche per le motivazioni appena evidenziate, la glicina e il mannitolo sono gli agenti di bulking (cristallini) più comunemente usati e sono spesso preferiti a quelli amorfi a causa della loro relativa facilità ad essere liofilizzati. Sono entrambi agevolmente cristallizzabili, sono facili da ricostituire e posseggono alte temperature eutetiche (da circa -1°C a -3°C), una caratteristica molto utile per eseguire l'essiccamento primario ad una temperatura elevata, prevenendo il collasso e la perdita di eleganza estetica del prodotto finale [3]. Sebbene il mannitolo sia più comunemente usato rispetto alla glicina, le formulazioni a base di mannitolo sono suscettibili a rottura del flacone durante la liofilizzazione nel momento in cui:

1. non siano progettati appropriati protocolli di congelamento;
2. sia utilizzato un volume di riempimento troppo elevato;
3. il mannitolo sia molto concentrato.

Inoltre, se il mannitolo idrato non viene desolvato durante il processo di liofilizzazione, si può verificare la desolvatazione durante la fase di conservazione del

prodotto; ciò comporterebbe una consistente diminuzione della sua temperatura di transizione vetrosa, compromettendone la stabilità. Per evitare il sopraggiungere di tale situazione, occorre condurre la fase di essiccamento secondario a temperature superiori a 50°C, in modo da desolvatare efficacemente il mannitolo presente nel sistema.

In generale, bisogna garantire che la cristallizzazione degli eccipienti (usati come agenti di bulking) sia completa durante la fase di congelamento. La presenza di altri soluti all'interno della soluzione iniziale, indipendentemente dal fatto che rimangano amorfi o cristallizzino, tenderà ad inibire la cristallizzazione dell'agente di bulking specifico. Per tale ragione, il rapporto in peso dell'agente di bulking utilizzato rispetto a tutti gli altri soluti deve essere maggiore o uguale a 3 [3].

1.4.3 Agenti inibenti l'aggregazione e l'adsorbimento proteico

Un problema non indifferente nella preparazione di proteine a scopo terapeutico risiede nell'instabilità dovuta all'unfolding della struttura proteica, per via dell'adsorbimento della proteina stessa sulle interfacce generate durante il processo di liofilizzazione. Ad esempio, come delineato in precedenza, questo fenomeno può avvenire all'interfaccia acqua-ghiaccio, durante la fase di congelamento. In tale contesto trovano un grande impiego i tensioattivi, i quali sono ampiamente utilizzati all'interno delle formulazioni proteiche con i seguenti scopi [3]:

1. prevenire la perdita della struttura nativa della proteina a causa dell'adsorbimento sulle superfici di filtri, apparecchiature e contenitori, in particolare nelle formulazioni a bassa concentrazione proteica;
2. come chaperone per aiutare a ripiegare forme strutturalmente alterate e quindi prevenire l'aggregazione.

In tutte queste applicazioni viene utilizzato un tensioattivo non ionico, tipicamente il Tween 20 o 80 tra lo 0.01% e lo 0,1% w/v. Ci sono diversi esempi in letteratura che dimostrano chiaramente che l'aggiunta di tensioattivi protegge la proteina dalla denaturazione indotta dalla presenza di interfacce, impedendo la formazione di aggregati [3].

1.4.4 Stabilizzatori proteici

Gli stabilizzatori proteici sono suddivisi in due diverse categorie a seconda delle funzioni che svolgono durante il processo di liofilizzazione.

Crio-protettori e meccanismo di stabilizzazione

La stabilità conformazionale di una proteina è normalmente soggetta ad un delicato equilibrio tra diverse interazioni. Tali interazioni sono molto sensibili alla temperatura come viene rappresentato in Figura 1.11. Quando le proteine sono esposte a temperature elevate, l'energia libera di unfolding diminuisce e si ha una

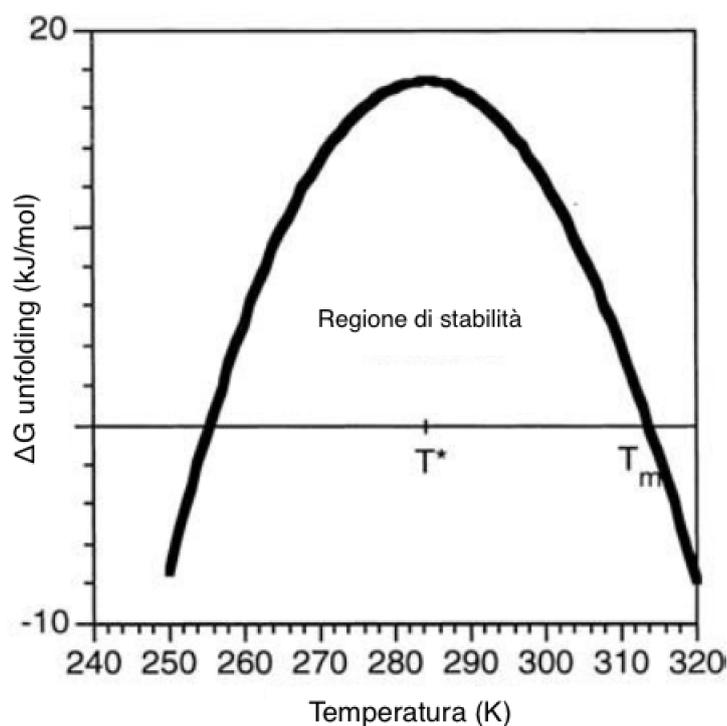


Figura 1.11: Rappresentazione schematica della curva di stabilità di una proteina che illustra la dipendenza del ΔG di unfolding dalla temperatura. Grafico tratto da Becktel [37], con modifiche.

perdita della conformazione nativa. Lo stesso discorso vale quando le proteine sono soggette a bassa temperatura. Per contrastare questo tipo di fenomeno, soluti come gli zuccheri, alcuni amminoacidi, le metilammine e i sali vengono aggiunti all'interno delle formulazioni per proteggere il principio attivo dalla denaturazione. Quando tali sostanze vengono utilizzate per prevenire modifiche e degradazioni durante il congelamento, sono chiamati crioprotettori. Essi funzionano efficacemente nell'intervallo di concentrazione 300-600 mM mediante un meccanismo chiamato *esclusione preferenziale dei soluti* proposti da Arakawa e Timasheff [57] e rivisto e dimostrato da Carpenter e Crowe [39]. Tale meccanismo non implica che le molecole di soluto non si leghino alla superficie della proteina, ma che esse siano più concentrate nel bulk della soluzione rispetto che nelle immediate vicinanze della proteina stessa. Il potenziale chimico della proteina aumenta per via della presenza di un soluto preferenzialmente escluso e ciò rappresenta la base per la spiegazione di tale meccanismo di protezione. Lo stato nativo di una proteina è termodinamicamente favorito (ad esempio in condizioni fisiologiche), in quanto ha una energia libera inferiore rispetto a quello denaturato. Quindi, la chiave per incrementare la

stabilità termodinamica della proteina è quella di accrescere la barriera energetica tra lo stato nativo e quello denaturato. Il grado di esclusione preferenziale e il concomitante incremento del potenziale chimico proteico sono direttamente collegate all'area superficiale della proteina; più è grande, maggiore sarà l'incremento di potenziale chimico. Dal momento che l'area superficiale della proteina denaturata è più elevata di quella nella sua forma nativa, di conseguenza il potenziale chimico della forma denaturata sarà superiore a quello della struttura nativa. In Figura 1.12 viene mostrata una rappresentazione schematica del meccanismo di esclusione preferenziale.

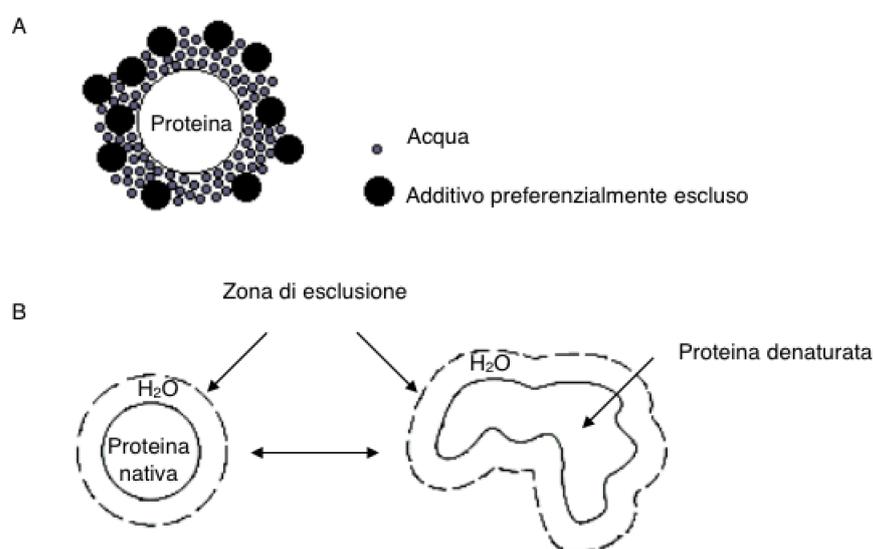


Figura 1.12: Rappresentazione schematica dell'esclusione preferenziale di un soluto dalla superficie della proteina (A), effetto di stabilizzazione del soluto preferenzialmente escluso (B). Immagine tratta da Hillgren [40], con modifiche.

Lio-protettori e meccanismo di stabilizzazione

Come già accennato, la conservazione a lungo termine di un prodotto liofilizzato dipende da due fattori critici che devono essere affrontati durante la fase di essiccamento [3]:

1. lo stato fisico, vale a dire la creazione di una struttura vetrosa con elevata T'_g e un basso contenuto di umidità residua;
2. il mantenimento della struttura nativa nello stato secco.

Il processo di liofilizzazione viene condotto per aumentare la stabilità allo stoccaggio, dal momento che la mobilità molecolare all'interno dello stato solido porterà ad un maggiore soffocamento delle possibili instabilità. Nel tentativo di rimuovere l'acqua per creare un solido vetroso con alta T_g durante l'essiccamento secondario, i legami ad idrogeno tra la proteina e l'acqua vengono spezzati. Lo strato d'idratazione, che l'acqua forma sulla superficie proteica, permette di mantenere intatta la struttura nativa della proteina stessa; di conseguenza, la sua eliminazione durante lo step di essiccamento provoca una destabilizzazione delle molecole proteiche che possono denaturarsi o incorrere in aggregazioni. L'uso di lio-protettori come "sostituti dell'acqua" favorisce, innanzitutto, la formazione di legami ad idrogeno con la proteina, simili a quelli che quest'ultima instaurava con l'acqua. Il meccanismo di stabilizzazione espletato da lio-protettori può essere interpretato sia da un punto di vista termodinamico sia cinetico. L'interpretazione termodinamica [3] sostiene che mediante la formazioni di legami ad idrogeno proteina-eccipiente venga ristabilita l'energia libera di unfolding, con la struttura nativa della proteina più stabile rispetto a quella denaturata (meccanismo di *water replacement*). L'interpretazione cinetica [3], invece, fa riferimento alla cosiddetta *ipotesi di vetrificazione* che afferma che finché la proteina rimane dispersa all'interno dello stabilizzatore amorfo, il quale è molto viscoso e si comporta come un vetro, la sua mobilità risulta limitata. Quindi, a causa di questo "microambiente viscoso" attorno alla proteina, la mobilità è bloccata e la velocità dei cambiamenti conformazionali che conducono all'unfolding proteico sarà ridotta notevolmente.

Generalmente, i disaccardi e i trisaccaridi, come il saccarosio, il trealosio o il rafinosio, sono buoni lio-protettori poiché sostituiscono efficacemente la componente acquosa e permettono di formare uno strato vetroso che diminuisce la mobilità proteica. I polimeri, invece, sono generalmente molto meno efficaci, probabilmente a causa del loro ingombro sterico che riduce le interazioni e la formazione di legami idrogeno con la proteina.

Un requisito fondamentale per uno stabilizzatore è che esso deve essere incapace reagire chimicamente con la proteina: zuccheri riducenti come il lattosio, il maltosio e il glucosio non devono essere utilizzati in grandi quantità nelle formulazioni proteiche.

1.5 Caso studio: la Lattato Deidrogenasi (LDH)

La lattato deidrogenasi è un tetramero costituito dalla combinazione di due diverse subunità (M e H), le quali, unendosi fra loro in modo vario, danno origine a cinque diversi isoenzimi:

- LDH1, che è prevalente nel miocardio, nei globuli rossi, nel rene e nelle cellule germinali;
- LDH2, il quale è presente nei globuli bianchi e nei reni, oltre che nel miocardio e nei globuli rossi;

- LDH3, che è prevalente nei polmoni e in altri tessuti;
- LDH4, che si può osservare nel muscolo scheletrico, nel fegato, nei linfonodi e nei globuli bianchi;
- LDH5, che è caratteristico del fegato e del muscolo scheletrico (in concentrazioni maggiori rispetto a LDH4).

Per meglio comprendere il ruolo di tale enzima all'interno degli organismi viventi si può ricorrere al seguente esempio. Quando un individuo pratica un esercizio fisico molto intenso le cellule non riescono ad avere l'ossigeno necessario per produrre l'energia utile a fronteggiare lo sforzo. In tale contesto entra in gioco LDH che consente di ossidare il NADH a NAD⁺, utilizzando come molecola ossidante, al posto dell'ossigeno, l'acido piruvico, il quale viene ridotto ad acido lattico secondo la reazione riportata in Figura 1.13.

Inoltre, LDH (Figure 1.14 e 1.15) funge da indicatore generale del danno tissutale e cellulare. Infatti, quando le cellule sono danneggiate o distrutte, LDH viene rilasciato nella frazione liquida del sangue (siero o plasma) o aumenta la propria concentrazione in altri liquidi biologici.

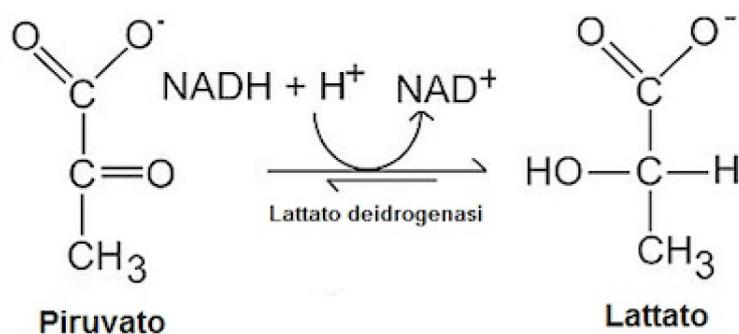


Figura 1.13: Reazione che porta alla formazione del lattato a partire dal piruvato, catalizzata dal LDH.

Le deidrogenasi sono una classe di enzimi che trovano applicazione come biocatalizzatori, biosensori e per la produzione di acido lattico. La domanda mondiale di acido lattico, infatti, si aggira intorno alle 130000-150000 tonnellate/anno. In tale scenario, la crescente richiesta di acido sarcolattico (acido L-(+)-lattico) sta favorendo un miglioramento dei metodi di produzione, in un contesto più efficiente e sostenibile.

Il metodo di conservazione maggiormente adoperato per la lattato deidrogenasi è la liofilizzazione. Tale enzima viene spesso utilizzato come proteina modello in letteratura, sia in quanto molto sensibile agli stress indotti dal processo di liofilizzazione, sia vista l'esistenza di metodologie spettrofotometriche rapide e precise per misurarne l'attività biologica.

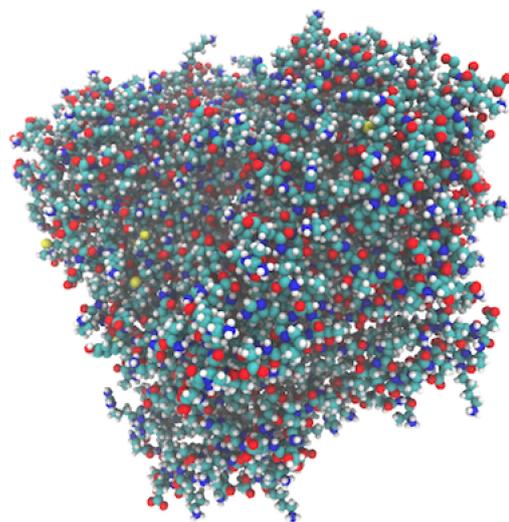


Figura 1.14: Rappresentazione molecolare di LDH utilizzando il software VMD.

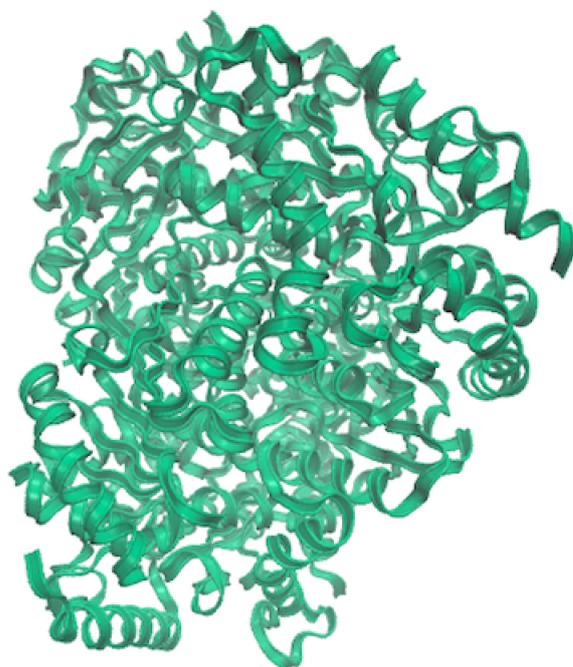


Figura 1.15: Rappresentazione molecolare di LDH utilizzando il software VMD.

1.5.1 Liofilizzazione di LDH: problematiche e formulazioni adottate

Studiando la letteratura scientifica ci si può imbattere in diversi studi circa il comportamento di LDH dopo il congelamento o dopo l'intero processo di liofilizzazione. Tali studi mirano essenzialmente alla comprensione dei fattori che influenzano la stabilità dell'enzima durante i diversi step operativi. Jiang e Nail [41] hanno sperimentato quale fosse l'attività residua di LDH dopo uno step di congelamento-scongelo o dopo la liofilizzazione, senza la presenza di eccipienti nella formulazione. I risultati ottenuti sono mostrati in Figure 1.16 e 1.17.

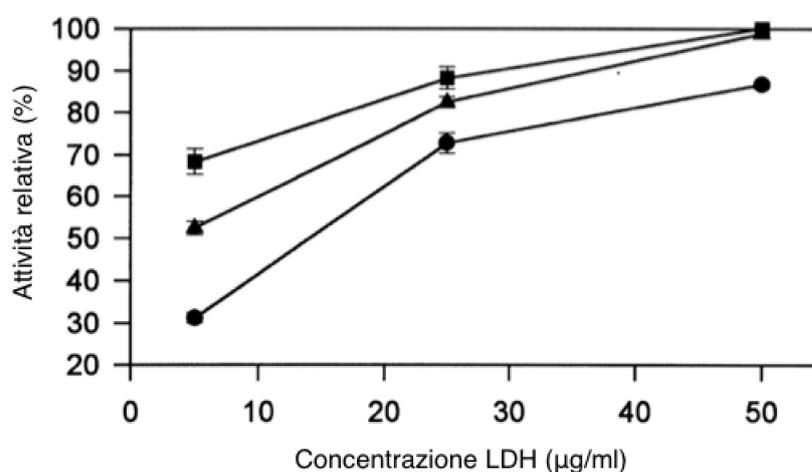


Figura 1.16: Recupero dell'attività proteica vs Concentrazione di LDH dopo uno step di congelamento-scongelo in tre diversi buffer: (●) tampone fosfato (0.05 M, pH 7.4), (■) buffer di citrato (0.05 M, pH 7.4), (▲) tris buffer (0.05 M, pH 7.4). La fase di congelamento è stata condotta a -40°C all'interno di un freezer. Grafico tratto da Jiang e Nail [41], con modifiche.

Analizzando la Figura 1.16 si può notare quanto l'effetto del tampone sia importante nello step di congelamento. In modo particolare, il buffer di fosfato mostra delle prestazioni inferiori rispetto agli altri due tamponi, probabilmente a causa della più cospicua variazione di pH della soluzione, come precedentemente evidenziato in Tabella 1.3. Inoltre, si osserva che il recupero di attività biologica aumenta con la concentrazione di LDH; come suggerito dagli autori stessi, ciò può essere dovuto all'azione della proteina stessa, secondo il meccanismo dell'esclusione preferenziale. Si comprende, quindi, come LDH sia una proteina molto sensibile al pH e una piccola variazione di tale grandezza può parzialmente denaturare l'enzima, anche in presenza di stabilizzanti come il saccarosio e il trealosio [42]. La Figura 1.17, invece, rappresenta la perdita di attività di LDH relativa alla sola fase di

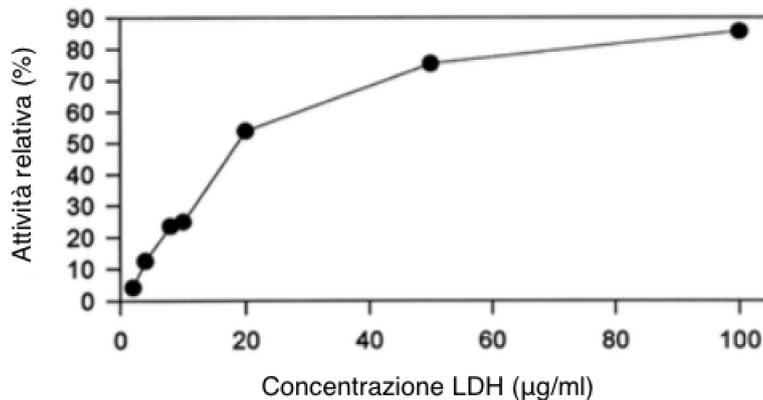


Figura 1.17: Recupero dell'attività proteica vs Concentrazione di LDH dopo il processo di liofilizzazione. Ogni punto (•) rappresenta la media di tre misurazioni. Il congelamento è stato realizzato a -45°C per 6h, mentre l'essiccamento è stato condotto a -30°C per 24h e a 25°C per 4h. Grafico tratto da Jiang e Nail [41], con modifiche.

essiccamento. Anche in tale contesto, si può notare come un incremento della concentrazione proteica permetta un recupero più efficiente di attività biologica. Ciò è dovuto, come riportato da Jiang e Nail, ad una lieve azione di water replacement della proteina stessa. Tuttavia a basse concentrazioni di LDH la perdita di attività risulta molto consistente. Per tale ragione altri autori si sono soffermati sullo studio del comportamento di LDH in presenza di diversi stabilizzatori. Gli stabilizzatori maggiormente utilizzati appartengono a diverse classi di molecole:

- zuccheri (disaccaridi, trisaccaridi e oligosaccaridi);
- polimeri;
- tensioattivi.

Gli zuccheri maggiormente utilizzati nelle formulazioni proteiche sono il saccarosio e il trealosio; tali disaccaridi presentano le seguenti caratteristiche [32]:

1. proteggono la proteina sia nella fase di freezing che in quella di drying;
2. sono non riducenti;
3. tendono a rimanere amorfi durante il processo di liofilizzazione;
4. sono già stati approvati ed utilizzati in altri prodotti a scopo terapeutico.

Ad esempio, congelando l'LDH in una soluzione acquosa contenente il 5, 10 o 34.2% (w/v) di saccarosio, la perdita di attività percentuale dell'enzima è rispettivamente pari al 27, 12 e 0% [42]. Anche altri zuccheri sono utilizzati come stabilizzatori nelle formulazioni di LDH: il cellobiosio, il glucosio, il maltosio, il mannitolo, il raffinosa e le varie ciclodestrine sono alcuni esempi (Figura 1.18). Generalmente l'efficacia di stabilizzazione da parte degli zuccheri è funzione della loro concentrazione in soluzione. Tale classe di molecole viene molto utilizzata in quanto fornisce delle buone prestazioni durante tutte le fasi del processo di liofilizzazione.

Invece, uno dei polimeri maggiormente utilizzati in letteratura è la siero albumina bovina (BSA) che funge sia da crio-protettore sia da lio-protettore. Ad esempio, Nema e Avis [42] hanno dimostrato che una concentrazione dell'1% (w/v) permette di proteggere completamente LDH durante lo step di congelamento. La stabilità dovuta all'azione polimerica viene spiegata come la concomitanza di diversi meccanismi, quali l'esclusione preferenziale e l'incremento della viscosità della soluzione. Inoltre, alcuni polimeri come il destrano o il PEG permettono di aumentare la temperatura di transizione vetrosa della formulazione e impediscono la cristallizzazione di alcuni zuccheri usati come stabilizzatori [26]. In generale, i polimeri mostrano una maggiore efficacia in termini di esclusione preferenziale e indice di vetrificazione, a causa delle più elevate dimensioni molecolari rispetto agli zuccheri, tuttavia sono più deficitari di questi ultimi in termini di water replacement.

Infine, come tensioattivi, il Tween 80 è il più comunemente utilizzato per salvaguardare l'attività biologica di LDH. L'azione dei tensioattivi si rivela importante specialmente durante il congelamento: come precedentemente spiegato, la formazione di interfacce acqua-ghiaccio può portare alla denaturazione della proteina. I tensioattivi, diminuendo la tensione superficiale delle soluzioni proteiche, riescono a ridurre la forza spingente per l'adsorbimento delle proteine a tali interfacce [26] (Figura 1.19). Analizzando la Figura 1.19 si osserva come la concentrazione di tensioattivo deve essere inferiore alla concentrazione critica micellare (cmc) per fare in modo che esso espleti correttamente la sua azione. Altrimenti, a causa della formazione delle micelle, si potrebbe incorrere nuovamente in casi di denaturazione di LDH. In Tabella 3.1 sono riportate alcune delle formulazioni più utilizzate in letteratura per la lattato deidrogenasi.

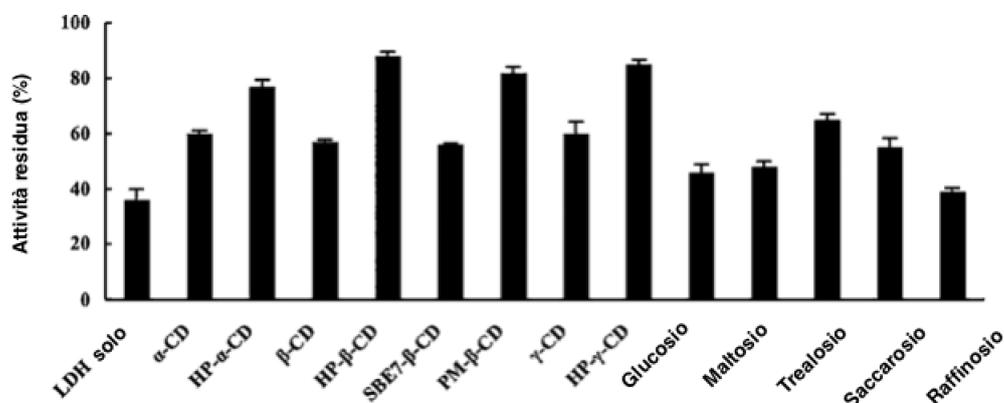


Figura 1.18: Attività residua dopo la liofilizzazione della lattato deidrogenasi in funzione di diversi eccipienti. Il quantitativo di LDH è di 12.8 $\mu\text{g/ml}$ e ogni eccipiente è stato utilizzato in concentrazione pari all'1%(w/w). Ogni valore rappresenta la media sperimentale \pm la deviazione standard di 3-5 esperimenti. Immagine tratta da Iwai [43], con modifiche.

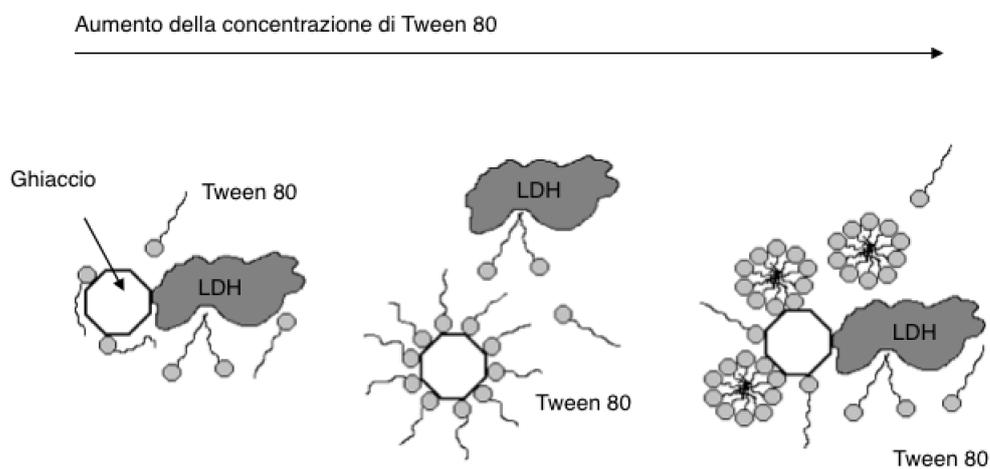


Figura 1.19: Illustrazione schematica delle possibili interazioni tra LDH, ghiaccio e Tween 80 al variare della concentrazione del tensioattivo. Immagine tratta da Hillgren [40], con modifiche.

Tabella 1.4: Formulazioni di letteratura per la lattato deidrogenasi. Dati reperiti da Wang [26].

Proteina	Composizione della formulazione	Condizioni di studio	Attività residua
LDH	9 $\mu\text{g/ml}$ in acqua	Congelamento-scongelamento	
	+5% (w/v) saccarosio		73%
	+10% (w/v) saccarosio		88%
	+5% (w/v) mannitolo		6%
	+5% (w/v) destrano		76%
	+0.9% (w/v) β -ciclodestrina		31%
	+0.005% (w/v) Tween 80		65%
	+1% (w/v) Tween 80		83%
	+1% (w/v) BSA		100%
LDH	2 mg/ml in un buffer di fosfato di potassio (20 mM, pH 7.5)	Liofilizzazione	
	+1% (w/v) PEG		83%
	+10 mM mannitolo		39%
	+10 mM lattosio		43%
	+10 mM trealosio		39%
	+1% (w/v) PEG e 10 mM mannitolo		81%
LDH	2 $\mu\text{g/ml}$ in un buffer di fosfato di sodio (50 mM, pH 7.4)	Liofilizzazione	
	+200 mM saccarosio		30%
	+400 mM mannitolo		14%
	+10 mg/ml HP- β -ciclodestrina		76%
LDH	0.5 mg/ml in un buffer di fosfato di potassio (10 mM, pH 7.5) e 0.1M NaCl	Liofilizzazione	
	+0.1% (w/v) BSA		65%
	+1% (w/v) BSA		86%
	+10% (w/v) BSA		92%

1.6 Obiettivo della tesi

L'obiettivo del seguente lavoro di Tesi è stato quello di utilizzare la Dinamica Molecolare per analizzare i meccanismi di stabilizzazione proteica durante il processo di liofilizzazione. La lattato deidrogenasi è stata utilizzata come proteina modello, per le motivazioni precedentemente delineate. Le simulazioni di Dinamica Molecolare sono state condotte utilizzando il software GROMACS, mediante la preparazione di un opportuno volume di controllo, nel quale sono stati inseriti il principio attivo proteico, i diversi eccipienti e l'acqua. Come eccipienti sono stati utilizzati saccaridi e oligosaccaridi e la composizione del sistema è stata progettata in modo da riprodurre le tipiche formulazioni utilizzate in ambito farmaceutico. Per ciascun eccipiente sono state eseguite due simulazioni diverse, la prima usando condizioni tipiche della fase di congelamento e la seconda riproducendo, invece, le caratteristiche di un sistema secco. I meccanismi di protezione indagati sono quelli maggiormente richiamati in letteratura, ovvero l'esclusione preferenziale, il water replacement e la teoria della vetrificazione. Il fine è stato quello di comprendere come la Dinamica Molecolare potesse aiutare a predire tali meccanismi, permettendo, in ultima analisi, un confronto più accurato e preciso dei diversi eccipienti utilizzati.

Capitolo 2

Metodi

2.1 Introduzione

Lo studio dei fenomeni microscopici non è realizzabile mediante l'utilizzo degli strumenti della Meccanica Classica. Ciò non significa che essa non sia veritiera, ma semplicemente evidenzia una applicabilità limitata nella trattazione di sistemi atomici o molecolari. Tale tipologia di sistemi viene, perciò, analizzata in base alle leggi della Meccanica Quantistica. In particolare, la Chimica Quantistica applica la Meccanica Quantistica a problemi di natura chimica. La sua influenza appare molto evidente in tutti i rami della chimica: dalla chimica organica a quella inorganica, dalla chimica analitica alla biochimica. Attraverso la Chimica Quantistica si possono sviluppare studi legati alle geometrie atomiche e molecolari, a momenti di dipolo e ad altre proprietà molecolari [44]. I risultati ottenuti dalla Meccanica Quantistica, applicati a sistemi molecolari, possono essere elaborati con gli strumenti della Meccanica Statistica, la quale permette il calcolo di proprietà macroscopiche a partire dalla descrizione atomica o molecolare. Nel presente lavoro di Tesi è stata utilizzata come metodologia di analisi la Dinamica Molecolare (DM). La DM è una tecnica della chimica computazionale che permette di simulare il moto dei singoli atomi in sistemi atomici o molecolari. La possibilità di descrivere sistemi molecolari complessi spiega la grande diffusione della DM nell'ambito della biochimica strutturale, soprattutto per lo studio delle proprietà dinamiche delle proteine e degli acidi nucleici, in condizioni non accessibili alle tecniche sperimentali. Nel caso specifico delle proteine, è possibile studiare il cambiamento della struttura in conseguenza dell'idratazione da parte di un solvente, il cambiamento conformazionale dovuto al legame con il substrato e le dinamiche con cui un farmaco riesca ad interagire con il sito attivo proteico. Appare evidente come lo sviluppo della DM sia notevolmente influenzato dalla costruzione di metodi di calcolo sempre più rapidi e accurati, in modo da rendere competitiva tale tipologia di analisi.

2.2 Storia della Dinamica Molecolare

Le prime simulazioni di Dinamica Molecolare sono state effettuate negli anni '50 da Alder e Wrainwright [45]. Questi condussero uno studio sui fluidi semplici mediante l'utilizzo di un modello che rappresentava gli atomi come dischi e sfere rigide. Il successivo uso di funzioni potenziale più veritiere ha permesso di ottenere risultati direttamente confrontabili con i dati sperimentali. Le prime simulazioni di questo tipo furono realizzate da Rahman [46], che utilizzò un potenziale di Lennard-Jones per descrivere le interazioni atomiche dell'argon allo stato liquido. Lo sviluppo di calcolatori più veloci ed efficienti ha consentito lo studio di sistemi più complessi come l'acqua, gli alcani flessibili [47] e piccole proteine. Le simulazioni di biomolecole sono, invece, iniziate alla fine degli anni '70. Attualmente, nel campo dell'ingegneria proteica e nello studio dei farmaci, le tecniche di simulazione stanno ricoprendo un ruolo rilevante, in quanto permettono di studiare processi chimici e biologici, di predire le proprietà delle proteine modificate e di analizzare le interazioni tra piccole molecole e macromolecole [48]. Le tecniche sono tuttora in continuo sviluppo: la complessità dei sistemi investigati, così come la lunghezza delle simulazioni sono fortemente influenzate dalla potenza dei calcolatori disponibili; con le odierne capacità computazionali, sistemi contenenti fino a 10^5 atomi possono essere simulati accuratamente in tempi brevi.

2.3 Meccanica Classica e Meccanica Quantistica

In questa sezione verranno esposti brevemente i principi base della Meccanica Classica e della Meccanica Quantistica, in modo da comprendere in maniera più completa e precisa i fondamenti di sviluppo della Dinamica Molecolare.

Per semplicità, si consideri una singola particella posta in un sistema di riferimento unidimensionale. In Meccanica Classica il moto di tale particella viene descritto dalla seconda legge di Newton:

$$F = ma = m \frac{d^2x}{dt^2}, \quad (2.1)$$

dove F rappresenta la forza agente sulla particella, m è la sua massa, t è il tempo e a è l'accelerazione, la quale corrisponde alla derivata seconda del vettore posizione rispetto al tempo. L'equazione (2.1) viene risolta mediante una doppia integrazione, che introduce all'interno della soluzione due costanti arbitrarie: una relativa alla velocità iniziale, l'altra alla posizione iniziale. Il vettore posizione può, quindi, essere espresso in funzione del tempo e delle due costanti appena citate:

$$x = f(t, c_1, c_2), \quad (2.2)$$

La parola *stato* in Meccanica Classica identifica la posizione e la velocità di ciascuna particella istante per istante. In base alla seconda legge di Newton, lo stato e il moto di un sistema possono essere perfettamente determinati. Quindi, data

l'esatta conoscenza dello stato attuale del sistema in esame, è possibile prevederne l'evoluzione futura [44].

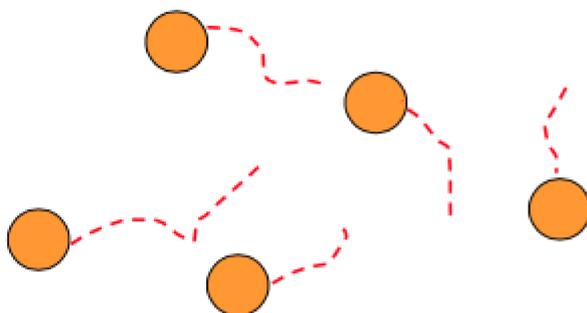


Figura 2.1: Particelle rigide classiche che seguono la seconda legge di Newton. Immagine tratta da Fortunati [50].

Considerando, invece, un sistema costituito da particelle microscopiche, secondo il principio di indeterminazione di Heisenberg, non è possibile determinare contemporaneamente sia l'esatta posizione, che la velocità di una particella. Da qui nasce la prima netta differenza tra la concezione classica e quella quantistica. Per caratterizzare l'evoluzione dello stato di un sistema quantistico, si ipotizza l'esistenza di una funzione d'onda $\Psi(q,t)$, dove q rappresenta la coordinata spaziale e t il tempo. Tale funzione identifica la posizione di una generica particella, in un certo istante temporale, all'interno di un sistema quantistico. La funzione d'onda viene interpretata in modo tale che l'espressione:

$$\Psi^* \Psi dq \quad (2.3)$$

rappresenti la probabilità di trovare la particella nel punto q all'istante t [44]. Tuttavia, per determinare l'evoluzione futura del suddetto sistema, risulta necessaria un'altra equazione che descriva come la funzione d'onda evolva nel tempo e nello spazio. Analizzando una singola particella che si muove all'interno di uno spazio unidimensionale, tale equazione risulta essere:

$$i\hbar \frac{\partial \Psi(x,t)}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \Psi(x,t)}{\partial x^2} + V(x)\Psi(x,t), \quad (2.4)$$

dove m è la massa della particella, \hbar una costante, i l'unità immaginaria e V un potenziale esterno agente sul sistema indagato. L'equazione (2.4) è conosciuta come equazione di Schrodinger non stazionaria. Inoltre, sapendo che l'energia totale del sistema è rappresentata dall'operatore quanto-meccanico Hamiltoniano:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2}{\partial x^2} + V(x), \quad (2.5)$$

l'equazione di Schrodinger viene così modificata:

$$i\hbar \frac{\partial \Psi(x, t)}{\partial t} = \hat{H} \Psi(x, t). \quad (2.6)$$

Qualora l'operatore Hamiltoniano risulti indipendente dalla coordinata temporale, l'equazione (2.6) assume la seguente forma:

$$\Psi(x, t) = \psi_n(x) \exp\left(-\frac{i}{\hbar} E_n t\right), \quad (2.7)$$

dove ψ_n e E_n sono le soluzioni del problema agli autovalori. Sostituendo l'equazione (2.7) all'interno di (2.6) si ottiene:

$$\hat{H} \psi(x) = E \psi(x), \quad (2.8)$$

meglio nota come equazione di Schrodinger stazionaria, dove l'autofunzione ψ_n corrisponde ad una soluzione stazionaria del problema. È interessante osservare che:

$$\begin{aligned} \Psi^* \Psi &= \left(\psi^*(x) \exp\left(\frac{i}{\hbar} E t\right) \right) \left(\psi(x) \exp\left(-\frac{i}{\hbar} E t\right) \right) \\ &= \exp(0) \psi^* \psi \\ &= \psi^* \psi \end{aligned} \quad (2.9)$$

Dall'equazione (2.9) si evince come per uno stato stazionario la probabilità di trovare la particella nell'intorno del punto x sia costante e non dipenda dal tempo. Analizzando l'equazione (2.6), si nota come essa contenga due incognite: le energie consentite E_n e le relative funzioni d'onda ψ_n . Per risolvere tale equazione saranno necessarie due condizioni al contorno, le quali permetteranno di individuare i livelli energetici consentiti; soltanto alcuni valori di energia soddisferanno le condizioni al contorno imposte. Ciò mette in luce una ulteriore differenza tra la Meccanica Classica e la Meccanica Quantistica: nell'approccio classico, una particella può assumere tutti i valori possibili di velocità, mentre una particella quantistica potrà muoversi soltanto ad alcuni valori ben determinati. Inoltre, non sarà possibile conoscerne l'esatta posizione, ma solamente la probabilità di trovarla in un preciso dominio spaziale [49].

In generale, le tecniche di calcolo quanto-meccaniche permettono l'ottimizzazione di geometrie atomiche e molecolari, l'analisi di proprietà come la densità elettronica e la polarizzabilità delle molecole e lo studio della configurazione atomica.

2.4 La Dinamica Molecolare: aspetti teorici

Nelle sezioni successive verranno approfonditi alcuni degli aspetti chiave delle simulazioni di Dinamica Molecolare, condotte nel presente lavoro di Tesi. Inizialmente verrà utilizzato un approccio prettamente teorico; successivamente si adotterà, invece, una trattazione maggiormente computazionale. Nel capitolo successivo, infine, si passerà ad una descrizione accurata delle condizioni operative.

Le proprietà di un sistema costituito da molte particelle possono essere investigate utilizzando gli strumenti teorici della Meccanica Statistica. Dal momento che un sistema reale presenta un grado di complessità elevato, nella maggior parte dei casi non è possibile ottenere delle soluzioni analitiche; per questa ragione, si ricorre frequentemente a tecniche basate su simulazioni al computer. In tali simulazioni, il sistema molecolare viene trattato con gli strumenti della Meccanica Classica, mentre le informazioni ottenute mediante calcoli quanto-meccanici vengono utilizzate per la costruzione dei cosiddetti *force field*. Questa tipologia di simulazioni prende il nome di Dinamica Molecolare e permette di ricavare informazioni molto dettagliate sul sistema in esame. Lo sviluppo tecnologico ha permesso un risparmio di tempo ed energia, incrementando le capacità di calcolo. La conoscenza dello stato del sistema istante per istante non è interessante in tale ambito; ciò che interessa maggiormente sono le sue proprietà macroscopiche, le quali possono essere stimate analizzando il comportamento collettivo degli atomi e delle molecole costituenti il sistema.

2.4.1 Struttura di un programma di Dinamica Molecolare

In Figura 2.2 viene riportato un protocollo base da seguire durante uno studio basato sulla Dinamica Molecolare. Dopo la lettura delle coordinate iniziali e la definizione dei parametri di simulazione, si procede al calcolo delle velocità iniziali mediante la distribuzione di Maxwell-Boltzmann; dopodiché si entra in un ciclo di calcolo, la cui lunghezza dipende dal tempo di simulazione desiderato. In tale ciclo vengono stimate le forze che agiscono su ciascun atomo costituente il sistema. Queste forze sono successivamente integrate, in modo da ottenere le posizioni e le velocità al tempo successivo. Coordinate, velocità, forze e potenziali sono memorizzati con una certa frequenza, in base all'accuratezza delle informazioni desiderate sulla traiettoria.

2.4.2 Equazioni di base

A rigore, un trattamento teorico dei moti e delle interazioni delle molecole dovrebbe essere fondato sui principi della Meccanica Quantistica, come precedentemente esposto; tuttavia, un approccio del genere è spesso impraticabile, poiché richiederebbe l'utilizzo di calcolatori di grandi dimensioni, risultando del tutto proibitivo per sistemi contenenti migliaia di atomi. Per tale ragione, invece di utilizzare la Chimica Quantistica è possibile sfruttare le nozioni della Meccanica Newtoniana. Ovviamente, questo tipo di approccio porterà ad una soluzione meno accurata, ma è possibile limitare l'errore inserendo dei coefficienti derivati da calcoli quanto-meccanici all'interno del calcolo computazionale.

Per ogni atomo, contenuto nel volume di controllo, risulta necessario determinare la posizione e la quantità di moto ad ogni istante temporale; ciò viene realizzato risolvendo la seconda legge di Newton per ciascuna particella. Tale equazione permette, infatti, di stimare l'accelerazione di ciascun atomo, da cui si possono

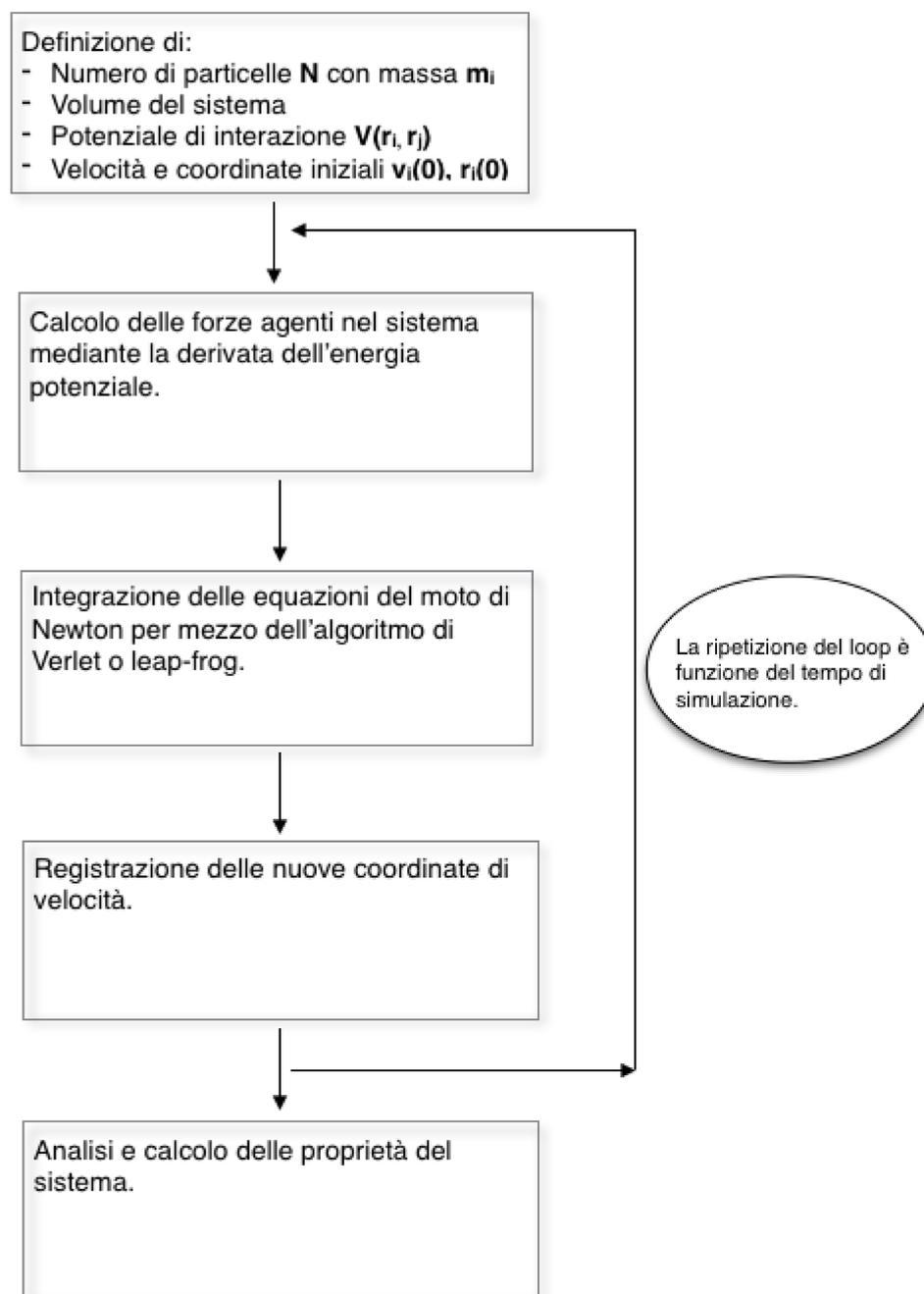


Figura 2.2: Schema raffigurante la struttura base di un protocollo di Dinamica Molecolare.

successivamente calcolare il vettore posizione e il vettore velocità. Si consideri un sistema costituito da N particelle interagenti; per ciascuna particella i -esima è possibile scrivere la seguente relazione:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N), \quad (2.10)$$

dove \mathbf{F}_i è la forza che agisce sull'atomo i -esimo, stimata come gradiente del potenziale d'interazione $V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N)$ rispetto agli spostamenti atomici. L'equazione (2.10) implica la conservazione dell'energia totale del sistema. Per il calcolo delle traiettorie dei diversi atomi, invece, è necessario conoscere sia le posizioni sia le velocità iniziali. Quest'ultime vengono stimate a partire dalla distribuzione Gaussiana delle velocità in funzione della temperatura del sistema:

$$p(\mathbf{v}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_b T} \right)^{\frac{1}{2}} \exp\left(-\frac{m_i \mathbf{v}^2}{2k_b T} \right), \quad (2.11)$$

dove m_i rappresenta la massa di ciascun atomo e k_b è la costante di Boltzman. La relazione (2.11) viene interpretata come la probabilità che la particella i -esima abbia una velocità \mathbf{v} ad una certa temperatura. Le tecniche di Dinamica Molecolare sono basate sulla soluzione esatta di tali equazioni, per tutte le N particelle costituenti il sistema, e sul calcolo diretto delle grandezze fisiche che ne derivano:

simulazione matematica → riproduzione di un sistema fisico

2.4.3 Definizione di Ensemble

L'ensemble è un insieme ipotetico costituito da un numero infinito di sistemi non interagenti, ciascuno compatibile con lo stesso macrostato (o stato termodinamico) del sistema investigato. Si consideri, per esempio, un sistema costituito da N particelle. Per questo sistema possiamo considerare l'equazione di Schrodinger corrispondente, la cui soluzione fornisce la funzione d'onda ψ e la relativa energia E , per un dato insieme di numeri quantici. A causa dell'elevato numero di particelle, si avrà un consistente numero di stati quantici o microstati compatibili con lo stesso macrostato. In Figura 2.3 vengono rappresentati i diversi sistemi statistici usati nelle simulazioni di DM. Essi vengono caratterizzati in base alle variabili termodinamiche che rimangono vincolate e quelle libere di equilibrarsi con l'ambiente esterno [48]:

- ensemble microcanonico (NVE): in questo ensemble il numero di particelle N , il volume V e l'energia totale E sono costanti. Il sistema in queste condizioni risulta isolato dall'universo;
- ensemble NVT: l'energia interna del sistema può variare, ma non la temperatura, la quale è fissata mediante un bagno termico esterno (il sistema è legato al resto dell'universo mediante le pareti diatermiche);

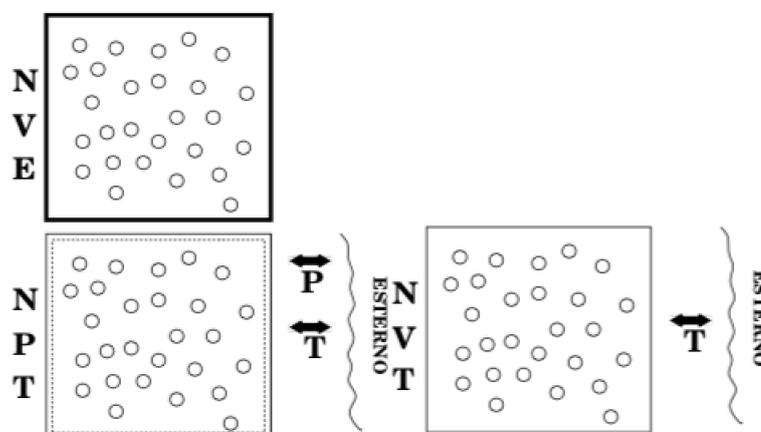


Figura 2.3: Insiemi statistici utilizzati nelle simulazioni di Dinamica Molecolare. Immagine tratta da Roccatano [48].

- ensemble NPT: il volume può variare in modo da mantenere la pressione pari a quella esterna.

Generalmente si considera valido il teorema ergodico: la media temporale di una proprietà macroscopica del sistema investigato è uguale al valore medio di questa stessa proprietà nell'ensemble. Un insieme di sistemi identificati dallo stesso valore di temperatura, volume e numero di moli è chiamato *ensemble canonico*.

2.4.4 Spazio delle fasi

Lo spazio delle fasi può essere immaginato come uno spazio a $6N$ dimensioni, individuato dalle $3N$ coordinate spaziali \mathbf{q}_i e $3N$ quantità di moto \mathbf{p}_i . Lo stato del sistema viene definito da un punto nello spazio delle fasi. L'evoluzione temporale definisce una traiettoria in tale spazio, come visibile in Figura 2.4.

Le grandezze fisiche di interesse vengono spesso ottenute mediante una media temporale, così rappresentata [49]:

$$\bar{f} = \frac{1}{T} \int_0^T f(p(t), q(t)) dt \quad (2.12)$$

Tuttavia, un ensemble viene completamente definito dalla funzione densità $\rho(p, q, t)$, tale che $\rho(p, q, t) dp^{3N} dq^{3N}$ identifichi il numero di punti che al tempo t sono contenuti nell'elemento infinitesimo di volume $dp^{3N} dq^{3N}$ dello spazio delle fasi, centrato nel punto avente coordinate (q, p) . La media della generica grandezza f si modifica come segue [49]:

$$\bar{f} = \frac{\int dp^{3N} dq^{3N} f(p, q) \rho(p, q, t)}{\int dp^{3N} dq^{3N} \rho(p, q, t)} \quad (2.13)$$

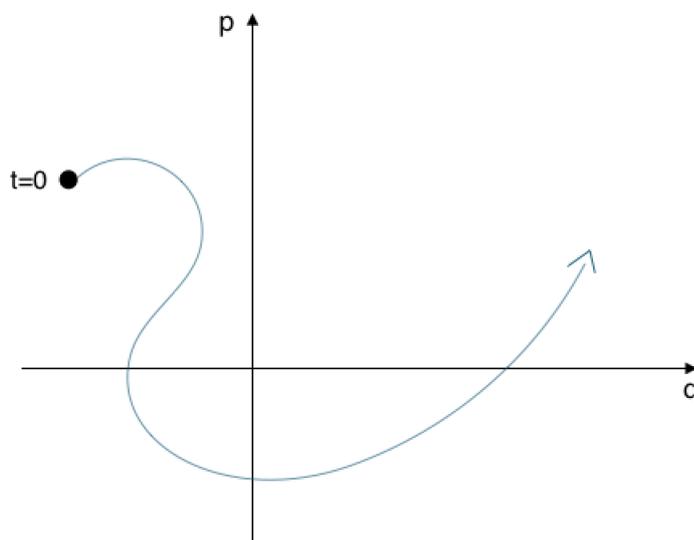


Figura 2.4: Spazio delle fasi

Tale media è supposta essere equivalente alla media temporale, come esposto dal teorema ergodico. La ricerca della funzione di distribuzione $\rho(p,q,t)$ rappresenta uno dei problemi chiave della Meccanica Statistica.

2.4.5 Integrazione delle equazioni del moto

Come precedentemente delineato, per determinare la traiettoria delle particelle soggette ad un generico potenziale durante una simulazione di Dinamica Molecolare, occorre risolvere numericamente le equazioni del moto. Per tale ragione, viene effettuata una discretizzazione delle equazioni; assumendo che il tempo vari in maniera infinitesima è possibile esprimere il vettore posizione come segue, utilizzando lo sviluppo di Taylor [52]:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 + \frac{1}{6}\dot{\mathbf{a}}(t)\delta t^3 + O(\delta t^4) \quad (2.14)$$

$$\mathbf{r}(t - \delta t) = \mathbf{r}(t) - \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 - \frac{1}{6}\dot{\mathbf{a}}(t)\delta t^3 + O(\delta t^4) \quad (2.15)$$

Sommando e sottraendo le relazioni (2.14) e (2.15) si ottiene l'*algoritmo di Verlet*:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t - \delta t) + 2\mathbf{r}(t) + \frac{F(t)}{m}\delta t^2 + O(\delta t^4) \quad (2.16)$$

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t + \delta t) - \mathbf{r}(t - \delta t)}{2\delta t} + O(\delta t^3) \quad (2.17)$$

Tale algoritmo risulta numericamente stabile e soddisfa la condizione di *simmetria per inversione temporale*.

2.4.6 Funzione potenziale

Come evidenziato in precedenza, i problemi investigati mediante simulazioni di Dinamica Molecolare coinvolgono sistemi costituiti da molti atomi, per cui risulta difficoltoso un approccio di tipo quantistico. Vengono perciò definiti dei *potenziali empirici* che rendono le simulazioni meno pesanti dal punto di vista computazionale. Le funzioni di energia potenziale, o *force field*, permettono di ottenere un soddisfacente compromesso tra l'accuratezza dei risultati e la rapidità di calcolo. Esistono vari tipi di campi di forza, i quali sono stati sviluppati da diversi gruppi di ricerca negli anni. Essi sono costituiti da librerie di parametri ottimizzati per le varie classi di molecole. Le più comuni sono quelle per lo studio delle proteine e degli acidi nucleici, tra cui CHARMM, AMBER, GROMOS e OPLS. Il potenziale generico $V(\mathbf{r})$ è funzione della coordinata \mathbf{r} che individua la posizione di tutti gli atomi nel sistema. Tale funzione viene individuata come somma di due termini:

$$V(\mathbf{r}) = V_{legame} + V_{non-legame}, \quad (2.18)$$

dove:

- V_{legame} rappresenta il potenziale di interazione tra due atomi legati chimicamente da un legame covalente;
- $V_{non-legame}$ approssima il potenziale d'interazione tra atomi non legati chimicamente.

A sua volta il termine V_{legame} può essere scorporato in tre diversi contributi:

$$V_{legame} = V_{stretching} + V_{bending} + V_{torsione}, \quad (2.19)$$

dove:

- $V_{stretching} = \frac{1}{2}K_{ij}[r_{ij} - b_{eq}]^2$ rappresenta l'interazione di stretching di legame covalente tra due atomi, dove b_{eq} è la lunghezza di legame di equilibrio e K_{ij} è una costante, che varia a seconda del tipo di legame presente (Figura 2.5)
- $V_{bending} = \frac{1}{2}K_{ijk}[\theta_{ijk} - \theta_{eq}]^2$ approssima un'interazione a tre corpi, la quale fa riferimento alla deformazione dell'angolo di valenza θ_{ijk} . θ_{eq} è l'angolo di legame in condizioni di equilibrio, mentre K_{ijk} è una costante di forza (Figura 2.6).
- $V_{torsione} = \frac{1}{2}K_{\xi}[\xi - \xi_{eq}]^2 + K_{ijkl}[1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_0)]$ tiene conto dell'ingombro sterico tra gli atomi separati da tre legami covalenti. Tale potenziale viene utilizzato per descrivere le interazioni di angolo diedro: il primo termine analizza gli angoli diedri impropri, mentre il secondo caratterizza tutti

gli altri. Il primo termine viene introdotto per correggere due artefatti, ovvero la deformazione delle geometrie tetraedriche e planari. La prima viene spiegata dal fatto che, nella maggior parte dei programmi di DM, gli idrogeni apolari (cioè quelli legati agli atomi di carbonio) non vengono considerati esplicitamente, ma viene incluso il loro contributo modificando il potenziale degli atomi a cui sono legati. Così facendo, un carbonio chirale, legato ad un idrogeno, viene simulato con solo tre legami; per vincolare la geometria del sito occorre, quindi, utilizzare il primo termine del potenziale di torsione, in modo da scongiurare possibili inversioni di chiralità durante la simulazione [48]. Il secondo termine, invece, è relativo ai normali angoli diedri ed è una funzione sinusoidale, con K_{ijkl} che è una costante di forza, n la molteplicità dei minimi e ϕ_0 la fase.

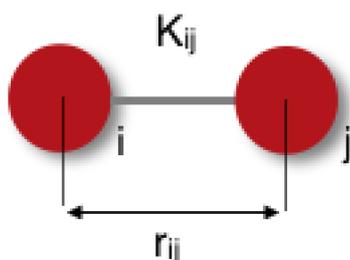


Figura 2.5: Rappresentazione molecolare di $V_{stretching}$

Il potenziale $V_{non-legame}$, invece, risulta costituito da due termini:

$$V_{non-legame} = V_{VDW} + V_{elettrostatico}, \quad (2.20)$$

dove il primo termine è legato alle interazioni attrattive di Van der Waals e repulsive di corto raggio, mentre il secondo corrisponde alle interazioni elettrostatiche. Questi contributi vengono così definiti:

- $V_{VDW} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$ è il potenziale di Lennard-Jones che permette di modellare le forze attrattive e quelle repulsive. Le forze di natura repulsiva predominano a piccole distanze, mentre a distanze maggiori dominano quelle attrattive. I due parametri ϵ_{ij} e σ_{ij} indicano rispettivamente la profondità della buca di potenziale e il diametro della sfera che approssima l'atomo, secondo un modello a sfere rigide.
- $V_{elettrostatico} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}}$, dove ϵ è la costante dielettrica del mezzo e r_{ij} la distanza tra due atomi con carica q_i e q_j .

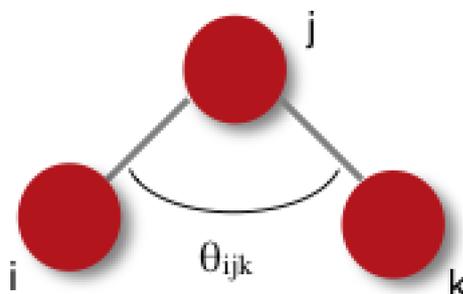


Figura 2.6: Rappresentazione molecolare di $V_{bending}$

Raggruppando tutti i termini appena analizzati, la forma compatta di un generico forze field risulta essere:

$$\begin{aligned}
 V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_n) = & \sum_{legami} \frac{1}{2} K_{ij} [\mathbf{r}_{ij} - b_{eq}]^2 \\
 & + \sum_{angoli} \frac{1}{2} K_{ijk} [\theta_{ijk} - \theta_{eq}]^2 \\
 & + \sum_{diedri-impropri} \frac{1}{2} K_{\xi} [\xi - \xi_{eq}]^2 \\
 & + \sum_{diedri} K_{ijkl} [1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_0)] \\
 & + \sum_{coppie(ij)} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{\mathbf{r}_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{\mathbf{r}_{ij}} \right)^6 \right] \\
 & + \sum_{coppie(ij)} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon\mathbf{r}_{ij}}
 \end{aligned} \tag{2.21}$$

In Figura 2.7 vengono raffigurate tutte le interazioni tra le particelle all'interno di un generico sistema.

A volte vengono aggiunti dei termini speciali per limitare lo spazio conformationale esplorato, sulla base dei dati strutturali ottenuti sperimentalmente. In particolare, vengono aggiunti tre termini: un potenziale di vincolo delle posizioni, un potenziale di vincolo sulle distanze e un potenziale di vincolo sui fattori di struttura cristallografici.

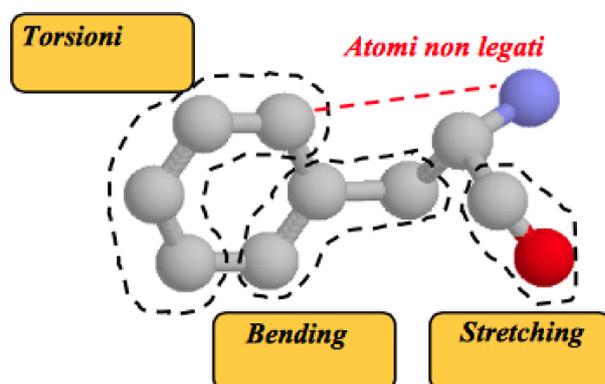


Figura 2.7: Rappresentazione delle interazioni molecolari all'interno di un generico sistema. Immagine tratta da Fortunati [50].

Limiti dei potenziali empirici

Come precedentemente esposto i potenziali empirici sono necessari per svincolarsi da una trattazione di tipo quantistico. Essi, però, sono caratterizzati da alcune limitazioni [49]:

- i parametri utilizzati nelle funzioni potenziali, i quali definiscono le interazioni tra i diversi atomi del sistema, sono definiti a inizio simulazione e rimangono costanti durante lo studio;
- i potenziali sono sviluppati in modo da tener conto delle interazioni di coppia. Ciò non permette di prendere in considerazione una serie di fenomeni (polarizzazione, ionizzazione, etc.) che si instaurano tra tre o più particelle;
- le funzioni potenziali non tengono conto degli effetti entropici. Per tale ragione, le simulazioni di DM sono realizzate in modo da riprodurre delle condizioni sperimentali ben precise (come temperatura o pressione costanti).

Calcolo delle interazioni a lungo raggio

In una simulazione di DM il 95% del tempo di calcolo è occupato dalla valutazione delle interazioni di non legame. È quindi opportuno cercare un metodo che permetta di aumentare l'efficienza computazionale della simulazione agendo sulle componenti di Van der Waals e Coulombiana. Quello più comunemente utilizzato sfrutta la definizione di un particolare raggio, chiamato raggio di *cut-off* (r_c). Tale metodologia può essere applicata secondo tre diversi approcci:

- *troncamento*: tronca le interazioni di non legame nel momento in cui la distanza tra due particelle oltrepassa il raggio di cut-off. Ciò significa che ogni

particella del sistema potrà interagire solo con gli altri atomi che si trovano all'interno di una sfera di raggio r_c ;

- *shift*: si modifica l'intera funzione potenziale in modo che essa converga a zero ad una distanza pari a quella di cut-off;
- *switch*: la funzione potenziale viene modificata solo in un limitato intervallo vicino alla distanza di cut-off.

2.4.7 Periodic Boundary Conditions

Una caratteristica importante delle simulazioni DM è il modo in cui viene trattato il contorno del sistema in esame. A causa di limiti computazionali, un tipico sistema simulato contiene circa $10^4 - 10^5$ atomi; ciò significa che, se le molecole sono sistemate in un box cubico, una gran parte di esse si troverà in prossimità della superficie e sarà soggetta a forze ed interazioni diverse rispetto alle molecole situate all'interno del volume di controllo. Le condizioni al contorno possono influenzare seriamente il risultato delle simulazioni, specie quando il sistema di interesse è un liquido omogeneo o una soluzione. Per ridurre tali effetti di superficie, tipicamente si adottano condizioni periodiche al contorno (PBC): le particelle sono contenute in una scatola ed è possibile immaginare che questa sia replicata in tutte le direzioni cartesiane, producendo un infinito sistema periodico; quando una particella esce dalla regione di simulazione, una particella-replica entra nella stessa regione dal lato opposto. Ciò permette di mantenere costante il numero di molecole all'interno della box. In altre parole, se una particella è situata in una posizione \mathbf{r} della scatola, è come se esistesse un numero infinito di particelle situate in:

$$\mathbf{r} + l\mathbf{a} + m\mathbf{b} + n\mathbf{c} \text{ con } (l, m, n = -\infty, \infty),$$

dove l, m, n sono numeri reali e $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$ sono i vettori corrispondenti ai bordi della scatola [51]. In Figura 2.8 sono raffigurate le condizioni periodiche in un sistema tridimensionale.

Attraverso l'applicazione di tali condizioni è possibile annullare gli effetti di superficie.

2.4.8 Inclusione di un solvente nelle simulazioni di DM

L'acqua gioca un ruolo fondamentale sulla struttura, la dinamica e la termodinamica delle molecole biologiche. Uno dei più importanti effetti del solvente è l'azione schermante le interazioni elettrostatiche tra le particelle del sistema. L'inclusione del solvente nelle simulazioni può essere realizzata in diversi modi. La metodologia più semplice è quella di includere una costante nel termine elettrostatico dell'energia potenziale, usando, se necessario, una costante dielettrica effettiva dipendente dalla distanza: $\epsilon_{eff} = \epsilon(r_{ij})$. Un altro approccio, invece, consiste direttamente nel popolare il sistema di molecole d'acqua. Seguendo tale approccio, bisogna adoperare condizioni al contorno specifiche, sia per prevenire la diffusione

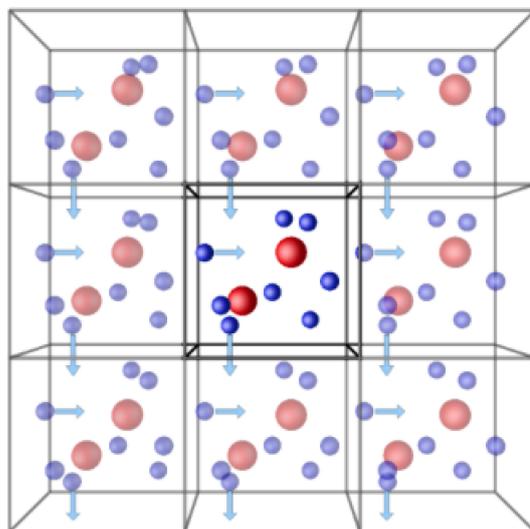


Figura 2.8: Condizioni periodiche al contorno; una particella, che esce dalla scatola di simulazione da un lato, è reintrodotta dal lato opposto. Immagine tratta da Ercolessi [51], con modifiche.

delle molecole d'acqua in zone troppo lontane dalla proteina, sia per permettere la simulazione e il calcolo delle proprietà macroscopiche con un numero limitato di molecole di solvente. Le condizioni al contorno periodiche permettono di condurre la simulazione con una quantità relativamente piccola di molecole di solvente; inoltre, così facendo, le particelle risentono di forze analoghe a quelle che sperimenterebbero nel bulk della soluzione. In Figura 2.9 viene mostrata la situazione appena descritta. Il quadrato centrale è circondato da otto quadrati vicini e le coordinate delle particelle-immagine in tali quadrati sono ottenute mediante semplici traslazioni delle posizioni delle corrispondenti particelle nel quadrato principale. Le forze nel quadrato principale sono calcolate utilizzando tutte le particelle (anche quelle dei quadrati secondari). Per quanto concerne il raggio di cut-off, invece, esso è in genere scelto in modo che una particella del quadrato primario non veda la sua immagine nei quadrati secondari.

2.5 La Dinamica Molecolare: aspetti computazionali

Esistono diversi codici che eseguono studi incentrati sulla Dinamica Molecolare di un sistema. Il software adoperato in questo lavoro di Tesi è il *GRONingen MACHINE for Chemical Simulations* (GROMACS). Tale codice è molto utilizzato per l'esecuzione di calcoli computazionali in sistemi costituiti da proteine, lipidi e acidi nucleici.

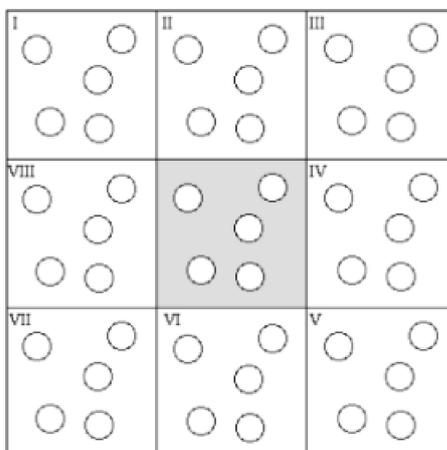


Figura 2.9: Raffigurazione delle condizioni periodiche al contorno per quanto concerne l'inclusione di un solvente all'interno delle simulazioni di Dinamica Molecolare. Immagine tratta da Ercolessi [51], con modifiche.

2.5.1 La Dinamica Molecolare con GROMACS

GROMACS utilizza molti degli aspetti teorici delineati nelle sezioni precedenti. Di seguito vengono riassunte le principali caratteristiche e approssimazioni utilizzate nelle simulazioni mediante tale software:

- *elettroni nello stato fondamentale:* GROMACS utilizza forze field di natura conservativa, che sono funzioni della sola posizione degli atomi. Ciò significa che non viene considerato il moto degli elettroni, il quale viene disaccoppiato da quello dei nuclei (approssimazione di Born-Oppenheimer). Gli elettroni permangono quindi nel loro stato fondamentale;
- *Force Field approssimativi:* il force field utilizzato nel presente lavoro di tesi è GROMOS96; tale campo di forza ha la caratteristica di essere *pair additive*, ovvero permette di stimare tutte le interazioni di non-legame mediante una somma di tutte quelle presenti. Queste interazioni, dal momento che non dipendono dalla posizione degli atomi, devono essere continuamente aggiornate;
- *raggio di cut-off:* al fine di velocizzare l'operazione di calcolo delle interazioni di non-legame, GROMACS utilizza il concetto di raggio di cut-off, precedentemente discusso. Inoltre, implementa diverse procedure di minimizzazione energetica, sia locale che globale.
- *Periodic Boundary Conditions:* per eliminare, o quantomeno limitare, gli effetti di superficie, GROMACS si serve di condizioni al contorno periodico, seguendo una procedura analoga a quanto esposto in precedenza.

Le simulazioni di Dinamica Molecolare, implementate nel presente lavoro di Tesi, seguono una serie di passaggi sequenziali, i quali sono riassunti in Figura 2.10. Di seguito, vengono identificate ed analizzate le caratteristiche principali di tali operazioni da un punto di vista computazionale.

Condizioni iniziali

In GROMACS, prima di procedere con la simulazione, è necessario specificare la dimensione della box che racchiude il sistema, le velocità e le coordinate di tutti gli atomi presenti. Risulta possibile utilizzare forme differenti del volume di controllo, in base al sistema che si vuole studiare, come indicato in Figura 2.11.

Tutte le strutture raffigurate permettono di rispettare le condizioni al contorno periodiche, utili ad eliminare gli effetti superficiali. La configurazione dodecaedrica si avvicina maggiormente ad una di tipo sferico, pertanto viene preferita nello studio di macromolecole sferiche in soluzione. Generalmente viene scelto un raggio di cut-off in base alle dimensioni e la forma della scatola utilizzata; la scelta viene ponderata utilizzando la seguente disuguaglianza:

$$r_{cut-off} = \frac{1}{2} \min(\|a\|, \|b\|, \|c\|). \quad (2.22)$$

In questo modo gli atomi costituenti la cella "reale" della box non interagiscono con le loro copie periodiche. Tale condizione prende il nome di *Convenzione dell'immagine minima*.

Minimizzazione energetica

Questa procedura serve a portare il sistema ad un minimo locale di energia potenziale, in modo da eliminare eventuali tensioni che potrebbero far insorgere problemi durante l'avvio della simulazione. L'algoritmo utilizzato nel presente lavoro è lo *steepest descent minimization* [52]: inizialmente si definisce il vettore \mathbf{r} , caratterizzante le $3N$ coordinate spaziali, e uno spostamento massimo h_0 . Vengono poi stimati il vettore forza \mathbf{F} e l'energia potenziale. Le nuove posizioni vengono calcolate mediante la seguente relazione:

$$\mathbf{r}_{n+1} = \mathbf{r}_n + \frac{\mathbf{F}_n}{\max(|\mathbf{F}_n|)} h_n, \quad (2.23)$$

dove h_n è il massimo spostamento, F_n è la forza e $\max(|\mathbf{F}_n|)$ indica il massimo valore di forza sentito dai componenti del sistema. La forza e il potenziale sono quindi determinati in maniera iterativa per il calcolo della posizione successiva delle particelle all'interno del volume di controllo. Se $V_{n+1} < V_n$ la nuova posizione è accettata e $h_{n+1} = 1.2h_n$; se, invece, $V_{n+1} > V_n$ la nuova posizione è esclusa e $h_n = 0.2h_n$. L'algoritmo si interrompe quando il massimo valore assoluto della forza scambiata tra i componenti è minore di un valore target F_{max} , accuratamente specificato durante la simulazione.

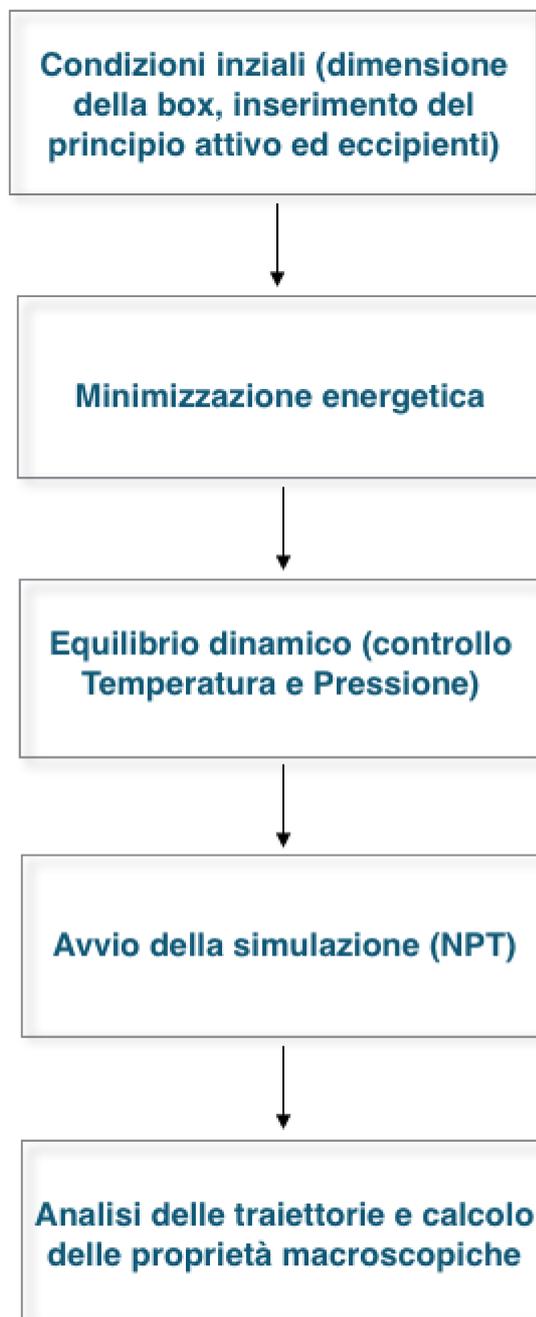


Figura 2.10: Sequenza per una simulazione di DM con GROMACS.

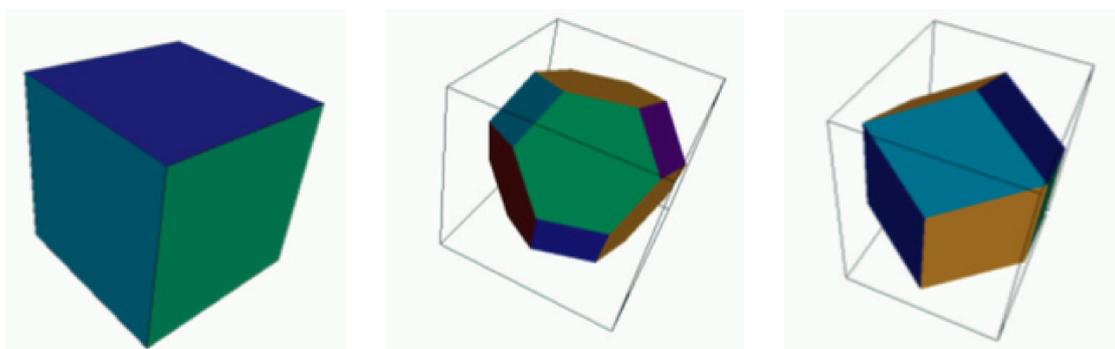


Figura 2.11: *Differenti tipi di scatole periodiche. Il volume V è riferito rispetto alla scatola cubica avente un volume unitario. a) Cubica, $V=1$. b) Ottaedrica, $V= 0.74$. c) Dodecaedrica, $V=0.71$. Immagine tratta da Roccatano [48].*

Controllo di temperatura e pressione

La temperatura T del sistema simulato è ottenuta dalla media dell'energia cinetica secondo l'espressione di equiripartizione dell'energia [49]:

$$\frac{1}{2} \sum_i^N m_i \mathbf{v}_i^2 = \frac{1}{2} N_f k_b T, \quad (2.24)$$

da cui:

$$T = \frac{1}{N_f k_b T} \sum_i^N m_i \mathbf{v}_i^2, \quad (2.25)$$

dove N è il numero di atomi, N_f il numero di gradi di libertà, k_b la costante di Boltzmann, m_i la massa e \mathbf{v}_i la velocità dell'atomo i -esimo. Per una molecola con N atomi, i gradi di libertà complessivi sono stimati mediante la relazione:

$$N_f = 3N N_b, \quad (2.26)$$

dove N_b indica il numero di legami. La pressione, invece, viene calcolata a partire dal viriale delle forze che agiscono sul sistema:

$$\Xi = -\frac{1}{2} \sum_{i < j}^N \mathbf{r}_{ij} \mathbf{F}_{ij}, \quad (2.27)$$

dove $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{t}_i - \mathbf{r}_j$ e \mathbf{F}_{ij} è la forza che agisce tra l'atomo i -esimo e il j -esimo. La pressione è quindi data dalla relazione:

$$P = \frac{2}{3V} [\langle E_{cin} \rangle - \langle \Xi \rangle], \quad (2.28)$$

in cui V è il volume del sistema e $\langle \rangle$ la media sulla traiettoria. In questo lavoro sono state realizzate simulazioni utilizzando un ensemble NPT, cioè con numero di particelle, pressione e temperatura costanti. Il controllo della temperatura e della pressione è effettuato attraverso termostati e barostati. Uno dei termostati più utilizzati è il *termostato di Berendsen*, detto anche termostato proporzionale. I termostati consentono di modificare le equazioni del moto in modo da portare la temperatura della box da una T istantanea, che risente delle fluttuazioni dovute alla dinamicità del sistema, ad una temperatura di riferimento T_0 . Ciò può essere realizzato moltiplicando la velocità delle particelle per una costante λ , così definita:

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\delta t}{\tau} \left(\frac{T - T_0}{T} \right)}, \quad (2.29)$$

dove δt è il time step della simulazione. La temperatura T_0 corrisponde al livello termico del termostato, il quale è virtualmente accoppiato con il sistema. Dal momento che il sistema è soggetto a fluttuazioni frequenti, viene implementato un algoritmo correttivo ad ogni passo temporale, in modo che la temperatura rimanga prossima a quella desiderata. Tale algoritmo viene mostrato nell'equazione:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau}. \quad (2.30)$$

La costante di tempo τ viene scelta in maniera arbitraria. Bisogna fare attenzione a non fraintendere alcuni concetti: l'algoritmo implementato non corrisponde ad una condizione reale di accoppiamento di un termostato con il sistema (non c'è nessuno scambio di calore), ma semplicemente permette di mantenere la temperatura della box costante durante tutta la simulazione.

Per quanto riguarda la pressione, si può fare un discorso analogo. L'equazione correttiva per la pressione viene riportata di seguito ed è simile a quella della temperatura.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau}. \quad (2.31)$$

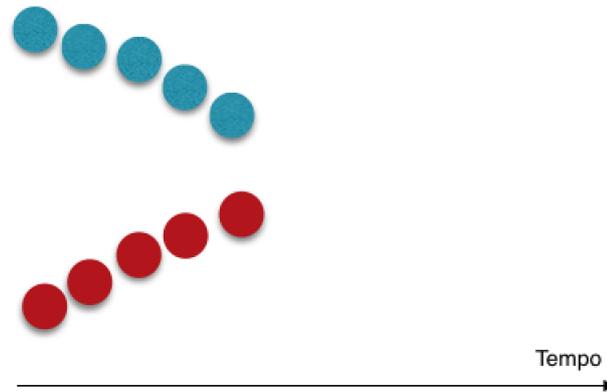
Scelta del passo temporale di integrazione

Prima di procedere con l'avvio della simulazione, occorre scegliere il time step idoneo, con cui integrare le equazioni del moto; tale questione riveste un ruolo di fondamentale importanza nelle simulazioni di DM, in quanto influenzerà l'accuratezza e l'attendibilità dei risultati ottenuti. Si considerino, ad esempio, due particelle costituenti il sistema investigato. A seconda del passo temporale scelto per condurre la simulazione si possono individuare tre diverse casistiche [49]:

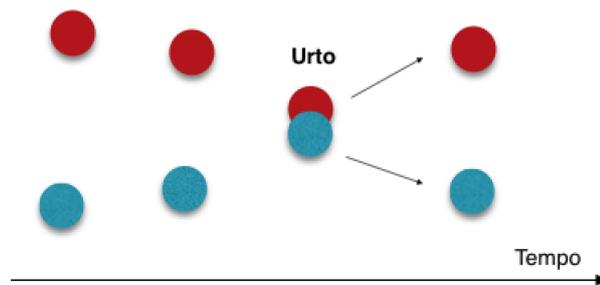
- *time step troppo piccolo*: la campionatura dei dati è accurata ma poco efficiente (Figura 2.12(a));
- *time step troppo grande*: la simulazione risulta instabile (Figura 2.12(b));

- *time step ottimale*: perfetto compromesso tra efficienza di campionatura dei dati e stabilità (Figura 2.12(c)).

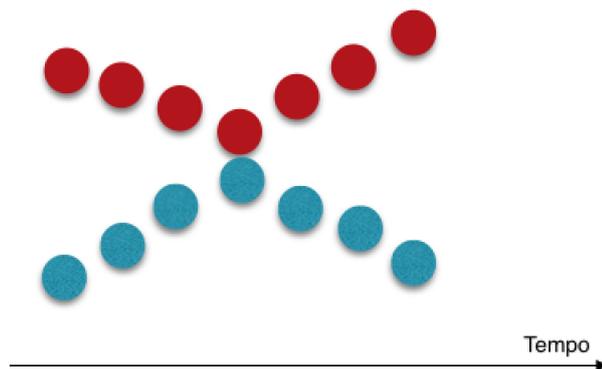
Come intuibile dalla Figura 2.12(b), un time step troppo grande ha come conseguenza un avvicinamento troppo marcato delle particelle, portando, quindi, al raggiungimento di condizioni instabili. Negli anni sono stati sviluppati diversi metodi per consentire una durata maggiore delle simulazioni. Quando le equazioni del moto di Newton sono integrate, il fattore limitante che determina il time step è la frequenza più elevata presente nel sistema [53]. Prendendo in considerazione le macromolecole biologiche solvate, la frequenza più elevata viene associata al moto vibratorio che coinvolge i legami ad idrogeno. Analizzando il legame O-H, la sua frequenza di stretching è di circa 10^4 Hz, che corrisponde ad un periodo medio di circa 10 fs: ciò limita la scelta del time step a 0.5 fs. L'introduzione di alcuni vincoli ha permesso di aumentare il time step ad un valore di 2 fs (mediante SHAKE o LINCS) [54]. In più, dato che tali vibrazioni sono disaccoppiate dalle altre vibrazioni del sistema, la dinamica di quest'ultimo non risulta essere alterata in modo consistente. Le forze che fluttuano velocemente devono essere ricalcolate a delle frequenze più elevate. Esistono alcune applicazioni chiamate *multiple time step* che permettono di ottenere un time step 4-5 volte superiore.



(a) Time step troppo piccolo



(b) Time step troppo grande



(c) Time step ottimale

Figura 2.12: Rappresentazione dell'evoluzione temporale di un sistema contenente due particelle al variare del time step utilizzato.

Capitolo 3

DM del LDH: condizioni operative

In questo capitolo verranno delineati più nel dettaglio i diversi step utili ad imbastire una simulazione di Dinamica Molecolare con GROMACS, come svolto nel presente progetto di Tesi. Esplicitando i punti riportati in Figura 2.10, vengono mostrati più specificatamente i diversi passaggi compiuti:

1. *generazione del file di topologia del principio attivo proteico;*
2. *creazione della box con all'interno la proteina;*
3. *aggiunta delle molecole di eccipiente;*
4. *aggiunta del solvente acquoso;*
5. *aggiunta di ioni per bilanciare la carica proteica;*
6. *minimizzazione energetica;*
7. *equilibratura di pressione e temperatura;*
8. *simulazione di Dinamica Molecolare;*
9. *analisi delle traiettorie e delle grandezze di interesse (post processing).*

3.1 Informazioni preliminari

Come spiegato nel capitolo introduttivo, l'obiettivo del seguente lavoro di Tesi è stato quello di utilizzare la Dinamica Molecolare per analizzare i meccanismi di stabilizzazione proteica durante il processo di liofilizzazione. I meccanismi di protezione indagati sono quelli maggiormente studiati in letteratura, ovvero l'esclusione preferenziale, il water replacement e la teoria della vetrificazione. La box di simulazione è costituita dal principio attivo proteico (LDH), uno o due eccipienti

(in particolare saccaridi e oligosaccaridi) ed il solvente acquoso. In particolare, gli eccipienti utilizzati sono i seguenti:

- saccarosio (Figura 3.1(a));
- trealosio (Figura 3.1(b));
- cellobiosio (Figura 3.1(c));
- mannitolo (Figura 3.1(d));
- istidina (Figura 3.1(e));
- β ciclodestrina (Figura 3.1(f));
- γ ciclodestrina (Figura 3.1(g)).

In Figura 3.1 in verde sono rappresentati gli atomi di carbonio, in rosso l'ossigeno, in bianco l'idrogeno e in blu l'azoto.

Il piano di lavoro è stato suddiviso in due diversi step:

- **Simulazioni ad eccipiente singolo:** inizialmente sono state imbastite simulazioni contenenti un solo eccipiente tra quelli appena elencati: in tale maniera è stato possibile indagare singolarmente quali fossero le prestazioni di ciascuna molecola, relativamente ai meccanismi di protezione analizzati;
- **Simulazioni con due eccipienti:** successivamente, invece, è stato condotto uno studio inserendo all'interno del sistema due eccipienti, in modo da valutare eventuali effetti sinergici nella protezione dell'attività proteica. In particolare, sono state eseguite simulazioni che coinvolgono la β ciclodestrina, accoppiata al saccarosio, trealosio o cellobiosio.

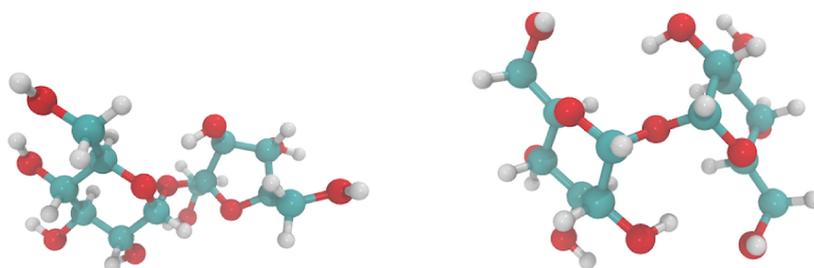
3.1.1 Condizioni di simulazione

Per ciascun eccipiente sono state condotte due simulazioni diverse, la prima usando condizioni tipiche della fase di congelamento e la seconda riproducendo, invece, le caratteristiche di un sistema secco. Le condizioni operative di temperatura e pressione sono riportate in Tabella 3.1.

Tabella 3.1: Condizioni operative.

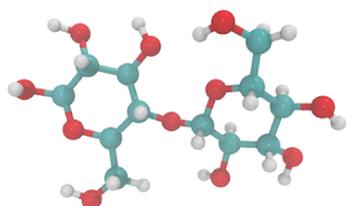
	Temperatura, K	Pressione, bar
Congelamento	258	1
Essiccamento	233	1

La temperatura della fase di congelamento è stata selezionata in quanto rappresenta la temperatura a cui si riscontra la formazione dei primi nuclei e cristalli di

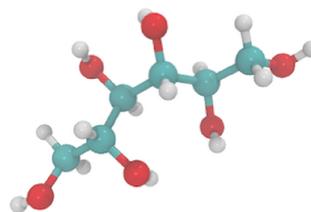


(a) Saccharosio

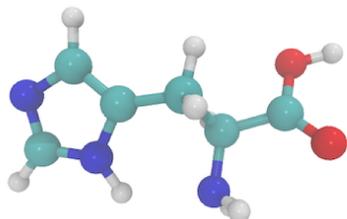
(b) Trealosio



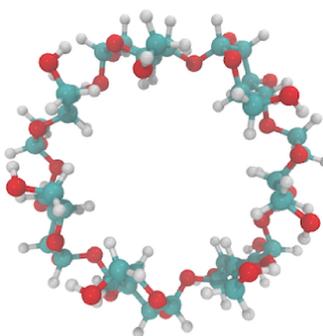
(c) Cellobiosio



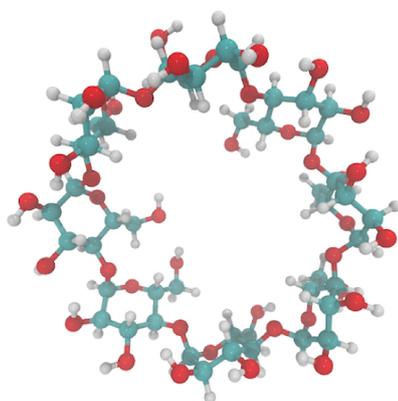
(d) Mannitolo



(e) Istidina



(f) β ciclodestrina



(g) γ ciclodestrina

Figura 3.1: Rappresentazione molecolare degli eccipienti utilizzati.

ghiaccio. Il sistema secco, invece, è stato progettato in modo che vi fosse una concentrazione residua di solvente pari al 6%(w/w) (condizione tipicamente usata in letteratura).

3.1.2 Composizione della box

La composizione della box è stata ideata in modo da essere quanto più fedele possibile alle formulazioni utilizzate in letteratura. Kawai e Suzuki [55], ad esempio, hanno studiato l'effetto stabilizzante di disaccaridi quali il saccarosio e il trealosio durante il processo di liofilizzazione; Al Hussein e Gieseler [56], invece, hanno valutato quale fosse l'influenza di mannitolo ed istidina sulla stabilità del LDH. Infine, Iwai *et al.* [43] hanno sperimentato l'azione di alcune ciclodestrine, confrontando i risultati ottenuti con eccipienti quali il saccarosio e il trealosio.

In generale, dal momento che LDH è una proteina con un peso molecolare molto elevato (circa 140000 g/mol), non è stato possibile riprodurre con precisione le concentrazioni riportate negli articoli appena citati. Ciò avrebbe comportato, infatti, una dimensione del sistema di simulazione troppo elevata e un tempo di prova non sostenibile. Per ovviare a tale problematica si è operato nel modo seguente:

- per saccarosio, trealosio, cellobiosio, mannitolo ed istidina sono state inserite un numero di molecole uguali in modo da poter confrontare le prestazioni di tali eccipienti in condizioni di uguale rapporto molare;
- per la β ciclodestrina e la γ ciclodestrina è stato eseguito un calcolo proporzionale, in modo da riprodurre lo stesso rapporto in peso (1%(w/w)) utilizzato da Iwai *et al.* [43] nel loro studio. Come riferimento di calcolo è stato preso il saccarosio. Vengono di seguito mostrati i passaggi effettuati:

1. in base alla quantità di LDH riportata nell'articolo sopra citato è stato stimato:

$$\frac{N_{saccarosio}^{Iwai}}{N_{LDH}}; \frac{N_{ciclodestrina}^{Iwai}}{N_{LDH}} \quad (3.1)$$

dove $N_{saccarosio}^{Iwai}$ e $N_{ciclodestrina}^{Iwai}$ rappresentano il numero di molecole di saccarosio e ciclodestrina utilizzate da Iwai *et al.* [43] nella loro formulazione sperimentale;

2. per calcolare il numero di molecole di ciclodestrina da inserire nella box è stata utilizzata la seguente relazione:

$$N_{ciclodestrina}^{box} = \frac{N_{ciclodestrina}^{Iwai} N_{saccarosio}^{box}}{N_{saccarosio}^{Iwai}} \quad (3.2)$$

dove $N_{saccarosio}^{box}$ è il numero di molecole di saccarosio inserite nella box, in base alle considerazioni appena elencate.

- per le simulazioni con due eccipienti sono state inserite le molecole degli eccipienti in modo che la formulazione complessiva avesse una concentrazione di eccipienti totale pari all'1%(w/w).

In Tabella 3.2 viene riportato il numero di molecole inserite per le simulazioni con singolo eccipiente; in Tabella 3.3, invece, è mostrato il numero di molecole implementate per le simulazioni con doppio eccipiente.

Tabella 3.2: Numero di molecole inserite nella box di simulazione per le prove ad eccipiente singolo.

Eccipiente	Numero di molecole
Saccarosio	700
Trealosio	700
Cellobiosio	700
Mannitolo	700
Istidina	700
β ciclodestrina	210
γ ciclodestrina	184

Tabella 3.3: Numero di molecole inserite nella box di simulazione per le prove con due eccipienti.

Eccipienti	Numero di molecole
β ciclodestrina + saccarosio	105 + 350
β ciclodestrina + trealosio	105 + 350
β ciclodestrina + cellobiosio	105 + 350

3.2 File input/output nelle simulazioni con GROMACS

Il codice GROMACS richiede in *input* una vasta varietà di file utili a specificare, oltre ai parametri fisici quali temperatura e pressione, anche la durata della simulazione, le coordinate atomiche iniziali e una serie di informazioni preliminari per l'avvio della simulazione. Tali file sono riportati di seguito:

- ***.gro**: file formato GROMACS che contiene le coordinate atomiche e molecolari;
- ***.itp**: file di topologia del force field che contiene le informazioni dei potenziali empirici utilizzati;

- ***.top**: file di topologia delle molecole (numero di atomi, molecole, angoli di legame, etc.);
- ***.mdp**: parametri di set-up della simulazione;
- ***.tpr**: contiene tutti i parametri di input, la topologia delle molecole e la struttura molecolare di partenza per l'avvio della simulazione.

Una volta terminata la simulazione, saranno generati una serie di file *output*:

- ***.trr**: file traiettoria che contiene coordinate e velocità atomiche;
- ***.xtc**: file traiettoria che contiene solamente le coordinate atomiche;
- ***.edr**: file traiettoria che contiene le informazioni energetiche del sistema;
- ***.log**: file di fine simulazione;
- ***.mdp**: parametri di simulazione step by step e di fine processo.

Una spiegazione più dettagliata della struttura di alcuni dei file appena citati è riportata in **Appendice A**.

3.3 Coordinate atomiche iniziali e creazione del file di topologia

Le coordinate atomiche iniziali del LDH sono state ricavate mediante la consultazione di appositi database. In particolare, il Protein Data Bank (PDB) è un archivio per dati di struttura 3D di proteine e acidi nucleici, ottenuti mediante la cristallografia a raggi X o la spettrografia NMR. Tali dati sono di dominio pubblico e sono accessibili gratuitamente. Una volta ottenuto il file formato **.pdb** per LDH, la creazione del file di topologia (**topol.top**) in GROMACS è avvenuta mediante il seguente comando:

```
gmx pdb2gmx -f LDH.pdb -o p.gro -water spce -ignh
```

dove:

- **gmx pdb2gmx**: legge un file *.pdb*, aggiunge gli idrogeni alle molecole e genera il file in formato *.gro* ed un file di topologia;
- **-f**: tag per fornire un file di input (in questo caso *LDH.pdb*);
- **-o**: restituisce un file output in formato *.gro* (in questo caso *p.gro*);
- **-water**: si dichiara di voler inserire la proteina all'interno di un solvente acquoso;
- **ignh**: permette di trascurare gli idrogeni presenti nella struttura.

3.4 Creazione della box di simulazione

La box di simulazione utilizzata è di forma cubica, con una dimensione di 11 nm per lato. Il comando utilizzato in GROMACS per la creazione della box con all'interno il principio attivo è:

```
gmx editconf -f p.gro -o pbox.gro -c -d 1.0 -bt cubic
```

Il codice sopra riportato ha come input il file output (**p.gro**) generato in precedenza; in particolare:

- *gmx editconf*: converte un generico file struttura in *.gro*, *.g96* o *.pdb*
- *-c*: centra la proteina all'interno della scatola;
- *-d 1.0*: fissa la distanza del LDH dai lati della box;
- *-bt cubic*: crea una scatola di forma cubica.

Il file di output **pbox.gro** contiene al suo interno le informazioni relative al LDH inserito all'interno di un volume di controllo cubico. In Figura 3.2 viene mostrato il file **pbox.gro**, analizzato mediante il software Visual Molecular Dynamics (VMD).

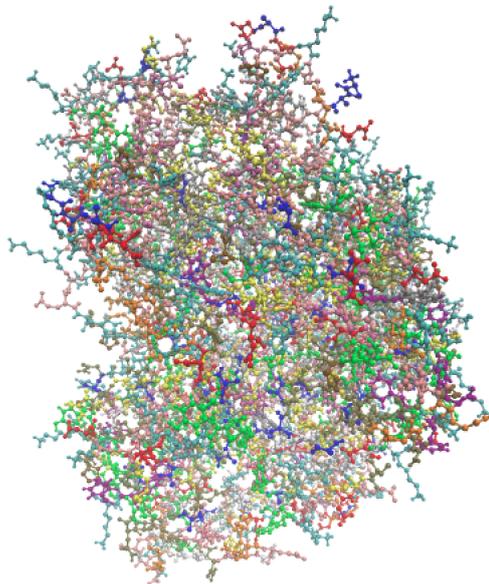


Figura 3.2: Rappresentazione mediante VMD del LDH inserito all'interno della scatola cubica. Ogni residuo proteico è raffigurato con un colore differente.

3.5 Aggiunta delle molecole di eccipiente

I file contenenti tutte le caratteristiche atomiche e molecolari degli eccipienti utilizzati sono reperibili su appositi database, sempre in formato **.pdb** ed **.itp**. Inizialmente, è quindi necessario generare un file **.gro** mediante il seguente comando:

```
gmx editconf -f eccipiente.pdb -o eccipiente.gro
```

Per inserire le molecole di eccipiente all'interno del volume di controllo contenente già la molecola di proteina, occorre distinguere il caso ad eccipiente singolo da quello con due eccipienti.

3.5.1 Eccipiente singolo

Il codice utilizzato è il seguente (come riferimento viene usato il saccarosio):

```
gmx insert-molecules -f pbox.gro -ci saccarosio.gro -nmol 700 -o psbox.gro
```

dove:

- *gmx insert-molecules*: permette di inserire un determinato composto all'interno della scatola di simulazione;
- *-pbox.gro*: file contenente le informazioni relative alla proteina all'interno della box;
- *-nmol*: numero di molecole di eccipiente da inserire;
- *-o psbox.gro*: file contenente le informazioni relative alla proteina e all'eccipiente inseriti all'interno della box.

In Figure 3.3 e 3.4 viene raffigurato il file **psbox.gro**, analizzato mediante VMD. In Figura 3.3 viene messa in evidenza la forma e la dimensione del sistema, mentre in Figura 3.4 si intuisce la posizione iniziale delle molecole di eccipiente e della proteina con maggiore accuratezza.

Una volta eseguito il comando appena descritto, occorre modificare il file di topologia **topol.top**, aggiungendo le informazioni relative al numero di molecole dell'eccipiente inserito.

3.5.2 Eccipiente doppio

Per analizzare questa casistica, vengono prese come riferimento la molecola di β ciclodestrina e di cellobiosio. I comandi utilizzati per popolare il sistema con due diversi eccipienti sono i seguenti:

```
gmx insert-molecules -f pbox.gro -ci b-ciclodestrina.gro -nmol 105 -o pcbox.gro
```

```
gmx insert-molecules -f pcbox.gro -ci cellobiosio.gro -nmol 350 -o pccbox.gro
```

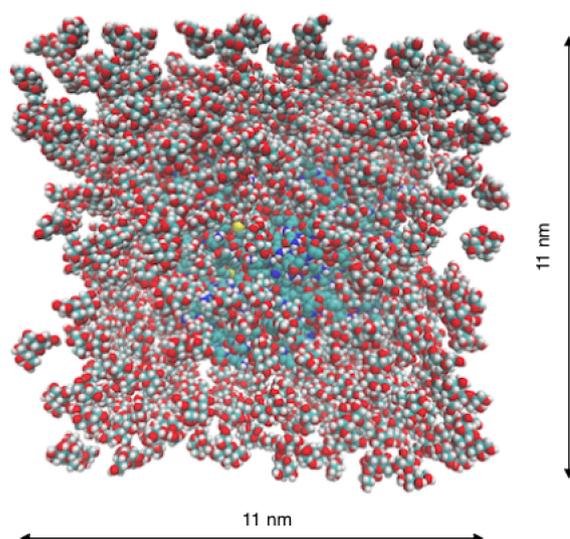


Figura 3.3: Rappresentazione mediante VMD di un sistema cubico costituito da LDH e saccarosio.

Il primo codice inserisce all'interno del sistema le molecole di β ciclodestrina e genera il file di output **pcbox.gro**. Il secondo comando, invece, ha come input il file di output precedente e permette di introdurre all'interno della box anche le molecole di cellobiosio. Il file di output finale è **pccbox.gro**, la cui immagine molecolare viene rappresentata in Figura 3.5.

Anche in questo caso, bisogna aggiornare il file di topologia inserendo le informazioni relative ai due eccipienti aggiunti.

3.6 Aggiunta del solvente acquoso

A questo punto risulta necessario distinguere la simulazione in fase di congelamento ed essiccamento.

3.6.1 Fase di congelamento

Il codice utilizzato per aggiungere il solvente è il seguente:

```
gmx solvate -cp psbox.gro -cs spc216.gro -o pcwbox.gro -p topol.top
```

dove:

- **gmx solvate**: permette di solvatare una configurazione contenente dei soluti;

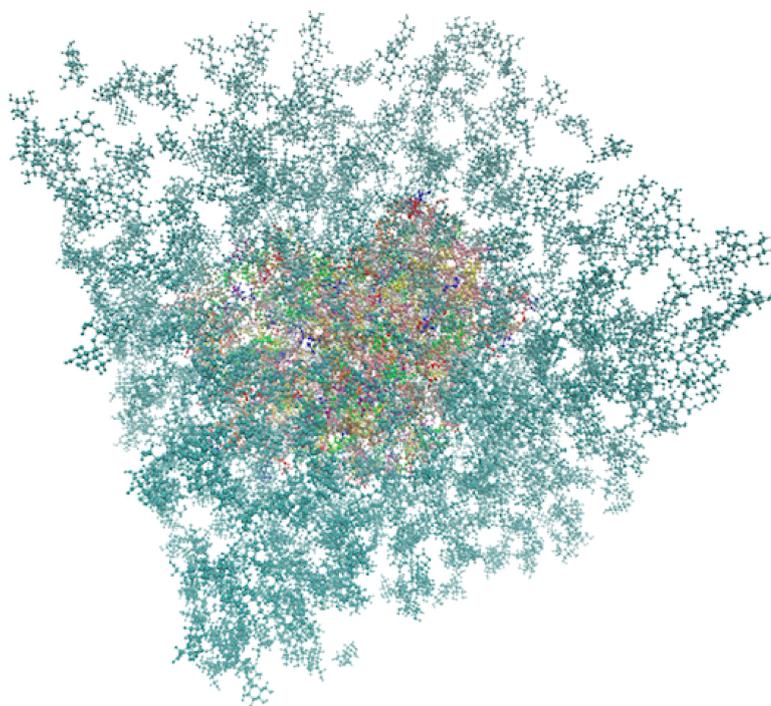


Figura 3.4: Rappresentazione mediante VMD di un sistema cubico costituito da LDH e saccarosio. In blu sono rappresentate le molecole di saccarosio che circondano LDH che si trova al centro della scatola.

- *-spc216.gro*: file contenente le informazioni relative alle molecole di solvente;
- *-p topol.top*: permette di aggiornare il file di topologia con l'aggiunta delle molecole di acqua.

Tale comando inserisce all'interno della scatola un numero di molecole d'acqua tale da saturare tutti gli spazi vuoti residui. Il file di output finale è **pswbox.gro**, la cui immagine molecolare viene rappresentata in Figura 3.6.

Una procedura analoga viene utilizzata anche per la simulazione con doppio eccipiente, la cui immagine molecolare viene rappresentata in Figura 3.7.

3.6.2 Fase di essiccamento

Dopo la fase di essiccamento, il sistema presenta una concentrazione residua di solvente pari al 6%(w/w), come precedentemente esposto. Viene riportato il calcolo di molecole di acqua residue, prendendo come riferimento un sistema contenente il saccarosio. Innanzitutto, si calcolano il numero di moli di saccarosio mediante

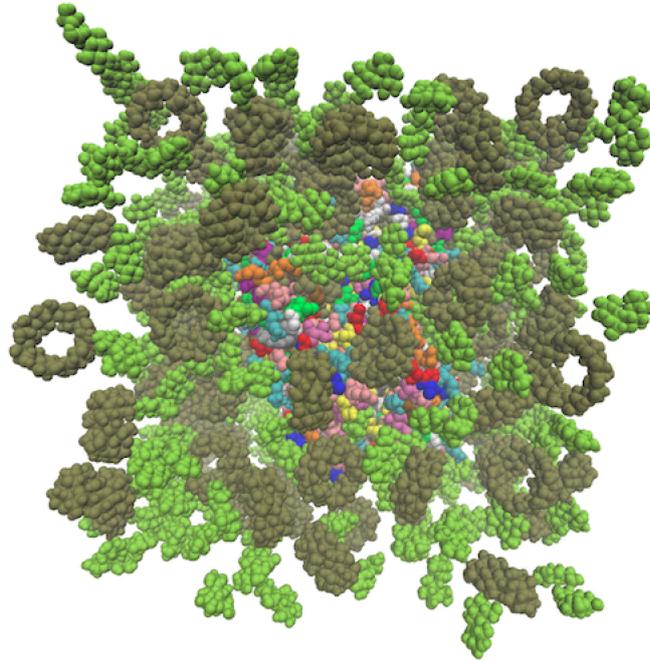


Figura 3.5: Rappresentazione mediante VMD di un sistema cubico costituito da LDH, β ciclodestrina e cellobiosio. In verde chiaro sono rappresentate le molecole di cellobiosio, in verde scuro quelle di β ciclodestrina.

la seguente relazione:

$$n_{saccarosio} = \frac{N_{saccarosio}^{box}}{N_A} = \frac{700}{6.0210^{23}} = 1.1610^{-21}. \quad (3.3)$$

Dal risultato dell'equazione (3.3) si possono stimare i grammi di saccarosio:

$$g_{saccarosio} = n_{saccarosio} * PM_{saccarosio} = 1.1610^{-21} * 342 = 3.97510^{-19}. \quad (3.4)$$

Un discorso analogo può essere effettuato per LDH:

$$n_{LDH} = \frac{N_{LDH}^{box}}{N_A} = \frac{1}{6.0210^{23}} = 1.6610^{-24}, \quad (3.5)$$

da cui:

$$g_{LDH} = n_{LDH} * PM_{LDH} = 1.6610^{-24} * 140000 = 2.32410^{-19}. \quad (3.6)$$

I grammi totali di proteina più eccipiente sono:

$$g_{totali} = g_{saccarosio} + g_{LDH} = 3.97510^{-19} + 2.32410^{-19} = 6.29910^{-19}. \quad (3.7)$$

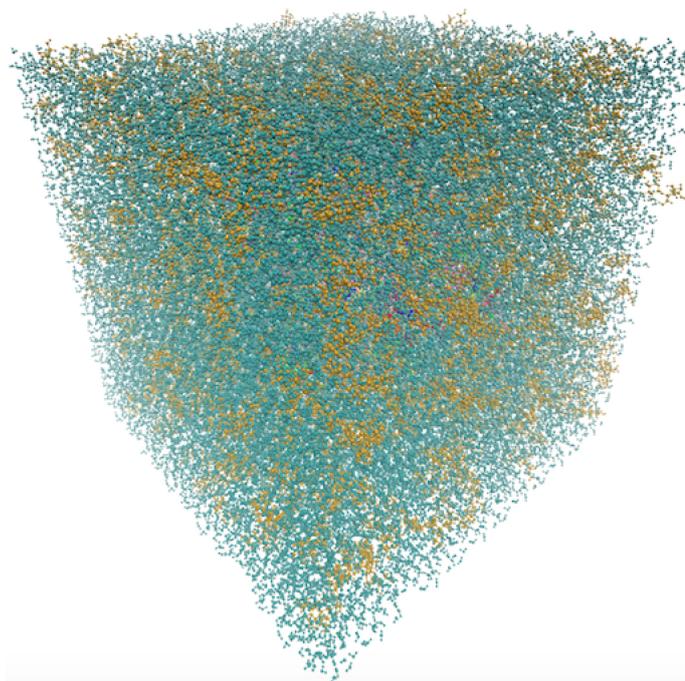


Figura 3.6: Rappresentazione mediante VMD di un sistema cubico costituito da LDH, saccarosio e acqua. In verde acqua sono rappresentate le molecole di solvente, in ocra quelle di saccarosio.

A partire dai grammi totali si possono stimare i grammi di acqua corrispondente ad una concentrazione in massa del 6%:

$$g_{acqua} = \frac{g_{totali}}{0.94} - g_{totali} = \frac{6.29910^{-19}}{0.94} - 6.29910^{-19} = 4.0210^{-20}, \quad (3.8)$$

da cui:

$$n_{acqua} = \frac{g_{acqua}}{PM_{acqua}} = \frac{4.0210^{-20}}{18} = 2.2310^{-21}, \quad (3.9)$$

ed infine si ottiene il numero di molecole di acqua da inserire nella box:

$$N_{acqua}^{box} = n_{acqua} N_A = 2.2310^{-21} * 6.0210^{23} = \mathbf{1345}. \quad (3.10)$$

Una procedura analoga è stata seguita per tutti gli altri eccipienti.

Dal punto di vista computazionale, prima di procedere con il comando *gmx solvate* occorre utilizzare il seguente codice:

gmx editconf -f psbox.gro -o psbox-new.gro -density 4000

Successivamente si può eseguire *gmx solvate*, come mostrato in precedenza. La linea di codice sovrastante permette di aumentare la densità della box in modo da

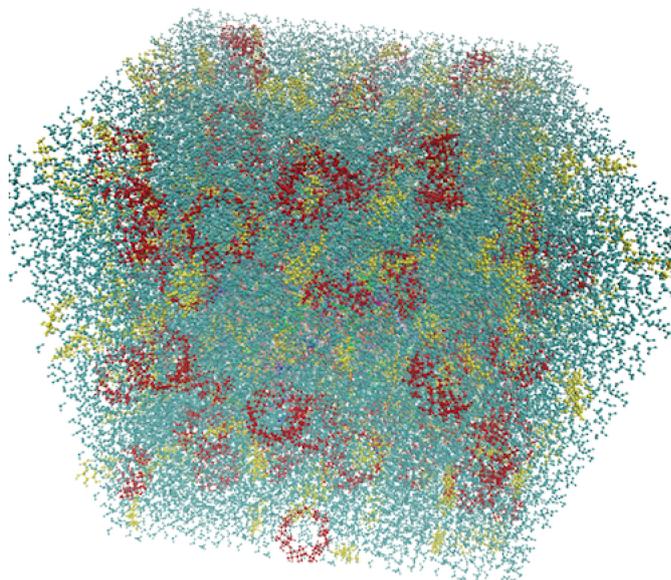


Figura 3.7: Rappresentazione mediante VMD di un sistema cubico costituito da LDH, β ciclodestrina, cellobiosio e acqua. In rosso sono rappresentate le molecole di β ciclodestrina, in giallo quelle di cellobiosio.

ridurre il numero di molecole di acqua inserite mediante *gmx solvate*. In particolare, un valore di densità di 4000 permette di ottenere un numero di molecole di acqua pari a 1345, nel caso del saccarosio.

3.7 Aggiunta di ioni

Una questione rilevante riguarda la carica totale del sistema. È possibile stimarla utilizzando la seguente linea di codice:

```
gmx grompp -f ions.mdp -c psandbox.gro -p topol.top
```

dove:

- *gmx grompp*: comando da utilizzare ogni volta che si voglia ottenere un file *.tpr*;
- *ions.mdp*: file di input usato per generare *ions.tpr*.

Tale comando genera un file di output **ions.tpr** e calcola la carica totale del sistema, in questo caso +13. Per rendere il volume di controllo elettricamente neutro si utilizza il seguente comando:

```
gmx genion -s ions.tpr -o pswibox.gro -p topol.top -pname NA -nname CL -nn 13
```

dove:

- *gmx genion*: permette di rimpiazzare casualmente delle molecole di solvente con ioni monoatomici. Gli ioni verranno aggiunti al file di topologia che verrà aggiornato con il comando *-p topol.top*;
- *-s ions.tpr*: file di input;
- *-pname*: nome degli ioni positivi (in questo caso sodio);
- *-nname*: nome degli ioni negativi (in questo caso cloro);

In questo modo vengono aggiunti 13 ioni cloro al posto dell'acqua, i quali rendono il sistema neutro dal punto di vista elettrico.

3.8 Minimizzazione energetica

Come precedentemente specificato, lo step di minimizzazione energetica è necessario per eliminare eventuali tensioni che potrebbero far insorgere problemi durante l'avvio della simulazione. Per attuare tale procedura bisogna munirsi del file input **minim.mdp**, nel quale vanno specificati attentamente i seguenti parametri:

- *emtol* = 1000: valore massimo di forza al disotto del quale viene interrotta la procedura di minimizzazione. In questo caso $|F_{max}| < 1000kJ/mol/nm$;
- *emstep* = 0.01: dimensione del passo iniziale, misurata in *nm*;
- *nsteps* = 5000: massimo numero di step del processo di minimizzazione.

Il codice usato in GROMACS per lo step di minimizzazione è:

```
gmx grompp -f minim.mdp -c pswibox.gro -p topol.top -o em.tpr
```

In questo modo viene generato il file output **em.tpr**, utile ad eseguire la simulazione. Per avviare la minimizzazione occorre utilizzare il seguente comando:

```
gmx mdrun -v -deffnm em
```

dove:

- *-v*: permette di visualizzare l'avanzamento della simulazione;
- *em*: nome del file output generato in precedenza con il comando *gmx grompp*.

Per la fase di congelamento si applica esattamente la procedura qui riportata; per quanto concerne, invece, la fase di essiccamento bisogna abbassare nuovamente il valore di densità per evitare problemi di convergenza della minimizzazione energetica.

3.9 Equilibratura

Il processo di equilibratura gioca un ruolo di fondamentale importanza, in quanto ha lo scopo di fissare la temperatura e la pressione del sistema di simulazione. Inizialmente, viene imposta la temperatura, mantenendo costante il volume e il numero di particelle della box (sistema NVT). Successivamente, si esegue la medesima analisi per la pressione, fissando la temperatura (al valore precedentemente ottenuto) e il numero di particelle (sistema NPT). Una volta determinata la pressione, occorre anche attuare una verifica sulla densità del sistema, in modo da accertarsi che abbia raggiunto valori coerenti al caso in esame. Per svolgere il primo passaggio bisogna munirsi del file input **nvt.mdp**, nel quale vanno impostati i seguenti parametri:

- $refT = 258 - 233$: valore di temperatura a cui portare il sistema: 258 K nella fase di congelamento, 233 K nella fase di essiccazione;
- $dt = 0.001$: time step, misurato in *ps*;
- $nsteps = 25000$: numero di step del processo di equilibratura della temperatura;

La durata della simulazione è quindi data dalla seguente relazione:

$$t_{NVT} = n_{steps} * dt = 25000 * 0.001 = 25ps \quad (3.11)$$

La scelta del passo temperale risulta cruciale, come precedentemente spiegato: un time step troppo lungo, infatti, può portare all'avvicinamento eccessivo di due molecole che causa una instabilità nel sistema, che GROMACS caratterizza come *errore di segmentazione*. Il comando per tale procedura è:

```
gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -p topol.top -o nvt.tpr
```

Come input vi è anche il file **em.gro**, generato dal precedente step di minimizzazione energetica. Per lanciare l'equilibratura si utilizza il comando mostrato in precedenza:

```
gmx mdrun -v -deffnm nvt
```

Una volta terminata tale misurazione, occorre verificare che il valore di temperatura raggiunto dal sistema sia coerente. Per far ciò si può scrivere:

```
gmx energy -f nvt.edr -o temperature.xvg
```

dove:

- *gmx energy*: comando che permette di calcolare diverse grandezze macroscopiche, caratteristiche del sistema in esame;
- *nvt.edr*: file input generato dalla simulazione di equilibratura;

- *temperature.xvg*: file output che contiene le informazioni circa l'evoluzione della temperatura nel tempo di simulazione.

Per equilibrare la pressione, invece, si seguono dei passi analoghi a quanto fatto per la temperatura. I parametri da specificare nel file input **npt.mdp** sono:

- *refT* = 258–233: valore di temperatura a cui portare il sistema: 258 K nella fase di congelamento, 233 K nella fase di essiccamento;
- *refP* = 1: valore di pressione a cui portare il sistema, analogo sia per la fase di congelamento sia di essiccamento;
- *dt* = 0.001: time step, misurato in *ps*;
- *nsteps* = 50000: numero di step del processo di equilibratura della pressione;

Generalmente la simulazione utile a fissare la pressione è più lunga rispetto a quella per imporre la temperatura; infatti la sua durata totale è:

$$t_{NPT} = n_{steps} * dt = 50000 * 0.001 = 50ps \quad (3.12)$$

Le linee di codice utilizzate in questo caso sono:

```
gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -t nvt.cpt -p topol.top -o npt.tpr
```

```
gmx mdrun -v -deffnm npt
```

L'input è rappresentato dai file output della simulazione precedente. Per controllare il valore di pressione e di densità si può scrivere:

```
gmx energy -f npt.edr -o pressure.xvg
```

```
gmx energy -f npt.edr -o density.xvg
```

3.10 Simulazione di Dinamica Molecolare

Per implementare e lanciare la simulazione finale, occorre munirsi del file input **md.mdp**. Le grandezze da imporre sono le medesime mostrate in precedenza:

- *refT* = 258 – 233: valore di temperatura imposto precedentemente;
- *refP* = 1: valore di pressione del sistema;
- *dt* = 0.001 – 0.0005: time step, misurato in *ps*: 0.001 nella fase di congelamento, 0.0005 nella fase di essiccamento;
- *nsteps* = 20000000–40000000: numero di step della simulazione: 20000000 nella fase di congelamento, 40000000 nella fase di essiccamento.

Entrambe le simulazioni presentano la medesima durata, infatti:

$$\begin{aligned} t_{\text{congelamento}} &= n_{\text{steps}} * dt = 20000000 * 0.001 = 20000ps = 20ns \\ t_{\text{essiccamento}} &= n_{\text{steps}} * dt = 40000000 * 0.0005 = 20000ps = 20ns \end{aligned} \quad (3.13)$$

Le linea di comando utilizzata è:

```
gmx grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p topol.top -o md.tpr
```

che genera come file output **md.tpr**. Dal momento che sarebbe alquanto dispendioso lanciare la simulazione su un normale PC, si è fatto uso di un servizio di *Academic Computing* fornito dal *Dipartimento di Automatica ed Informatica* del Politecnico di Torino. Tale servizio fornisce le risorse di calcolo e il supporto tecnico necessario per condurre efficientemente delle analisi di questo tipo, molto dispendiose dal punto di vista computazionale.

3.11 Post processing

Una volta terminata la simulazione, si può procedere alla stima di tutte le grandezze macroscopiche, utili ad indagare, dal punto di vista molecolare, i meccanismi di stabilizzazione proteica riportati in letteratura. I file utili ad effettuare il post processing della simulazione sono **md.tpr**, **md.trr** e **md.xtc**. Prima di procedere con il calcolo delle proprietà di interesse, occorre eliminare le condizioni periodiche al contorno, mediante il seguente comando:

```
gmx trjconv -s md.tpr -f md.xtc -o md-noPBC.xtc -pbc mol -ur compact
```

dove il comando *gmx trjconv* permette di convertire i file traiettoria in diversi modi: in questo caso è appunto utilizzato per modificare la periodicità del sistema. Il file output generato **md-noPBC.xtc** sarà quindi privo di condizioni al contorno periodiche.

3.11.1 Valutazione dell'esclusione preferenziale

La procedura analizzata è la medesima sia per la fase di congelamento sia per quella di essiccamento. Per valutare il meccanismo dell'esclusione preferenziale si sono seguiti due diversi approcci:

- mediante una relazione teorica proposta da Arakawa e Timasheff [57];
- mediante delle funzioni radiali cumulative del numero di molecole [58].

Il primo metodo è stato utilizzato per valutare tale meccanismo nel caso delle simulazioni con un solo eccipiente, mentre il secondo ha permesso di stimare l'esclusione preferenziale sia per le simulazioni ad eccipiente singolo sia per quelle con due eccipienti. Prima di analizzare dal punto di vista computazionale le metodologie appena elencate, è condotta una breve trattazione, utile ad evidenziarne le caratteristiche e le peculiarità.

Metodo di Arakawa e Timasheff [57]

Si consideri un sistema composto da tre componenti:

- acqua (componente numero 1);
- proteina (componente numero 2);
- eccipiente (componente numero 3).

Quando la concentrazione è espressa in unità termodinamiche, il parametro di interazione preferenziale ξ_3 viene stimato mediante la seguente relazione:

$$\xi_3 = \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} = A_1 \left(\frac{A_3}{A_1} - \frac{g_3}{g_1} \right), \quad (3.14)$$

dove A_i è il quantitativo totale del componente i legato alla proteina, espresso come grammi del componente i per grammi di proteina, mentre g_i è la concentrazione del componente i , descritta come grammi del componente i per grammi di acqua. In questo contesto, il termine "legato" non implica una interazione di legame vera e propria, ma tiene conto della quantità media dei componenti che si trovano nel volume di sistema perturbato dalla presenza della proteina; in poche parole, riflette le interazioni attrattive e repulsive che si instaurano nel sistema. Si comprende, quindi, come l'equazione (3.14) sia una misura della differenza di composizione tra il dominio proteico (ovvero il volume di spazio perturbato dalla proteina) e il bulk della soluzione [57]. È evidente come, dal momento che tale relazione è stata ricavata per un sistema contenente un solo eccipiente, essa non può essere applicata per le simulazioni con due eccipienti. In Figura 3.8 viene mostrata, dal punto di vista grafico, la teoria proposta da Arakawa e Timasheff [57].

Dalla Figura 3.8 si nota come:

$$\Delta G_1 + \Delta G_2 = \Delta G_3 + \Delta G_4. \quad (3.15)$$

Dal momento che $\Delta G_2 > \Delta G_3$ e $\Delta G_1 < \Delta G_4$, in presenza della soluzione zuccherina lo stato nativo della proteina è favorito termodinamicamente. Dal punto di vista computazionale, le grandezze presenti nella relazione (3.14) sono state così valutate (prendendo come riferimento il saccarosio):

- Valutazione di A_3

Si è utilizzata la seguente linea di codice:

```
gmx trjorder -f md-noPBC.xtc -s md.tpr -nshell ns.xvg -r 0.35 -na 45 -b  
19000 -e 20000
```

dove:

- *-nshell*: valuta il numero di molecole di un determinato componente all'interno di uno specifico volume;

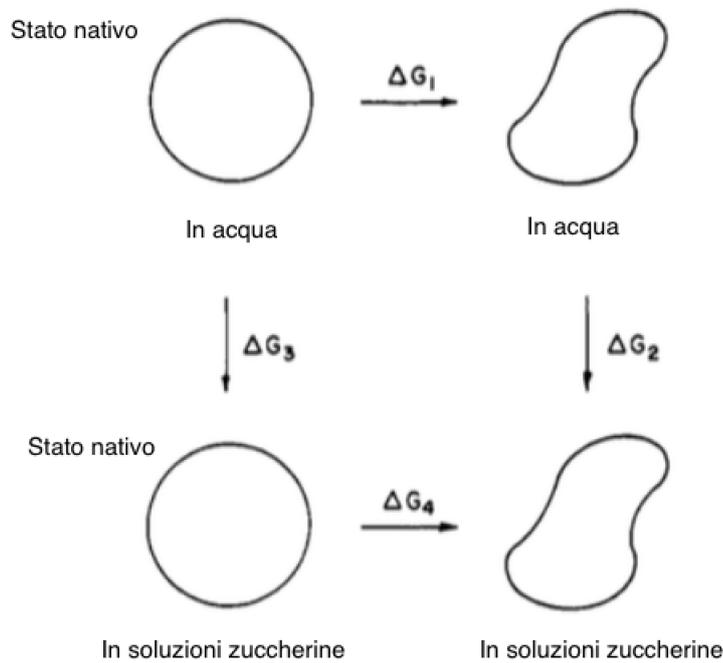


Figura 3.8: Schema raffigurante il meccanismo dell'esclusione preferenziale, interpretato da un punto di vista termodinamico. Immagine tratta da Arakawa e Timasheff [57], con modifiche.

- $-r 0.35$: raggio del volume sferico (misurato in nm) che viene approssimato essere il volume di perturbazione della proteina;
- $-na 45$: numero di atomi del componente di cui si vuole determinare il numero di molecole presenti nello shell; nel caso specifico del saccarosio è 45.
- $-b 19000 -e 20000$: vengono valutati solo gli ultimi 1000 ps di simulazione;
- $ns.xvg$: file output che contiene le informazioni relative al numero di molecole di saccarosio nello shell.

Una volta stimato il numero di molecole contenute nel volume di perturbazione proteico, si può procedere al calcolo di A_3 :

$$A_3 = \frac{N_{saccarosio} PM_{saccarosio}}{N_{LDH} PM_{LDH}}, \quad (3.16)$$

dove $N_{saccarosio}$ è il numero di molecole di saccarosio nello shell e N_{LDH} il numero di molecole proteiche inserite nel sistema. Con PM viene indicato, invece, il peso molecolare.

- Valutazione di A_1

La procedura è analoga a quella mostrata in precedenza; il comando GROMACS per calcolare il numero di molecole d'acqua è:

```
gmx trjorder -f md-noPBC.xtc -s md.tpr -nshell nw.xvg -r 0.35 -na 3 -b
19000 -e 20000,
```

mentre A_1 viene così trovato:

$$A_1 = \frac{N_{acqua}PM_{acqua}}{N_{LDH}PM_{LDH}}, \quad (3.17)$$

dove N_{acqua} è il numero di molecole di acqua nello shell.

- Valutazione di g_3

Tale parametro viene calcolato mediante la seguente equazione:

$$g_3 = \frac{N_{saccarosio}PM_{saccarosio}}{N_{acqua}PM_{acqua}}. \quad (3.18)$$

- Valutazione di g_1

È banale intuire che è sempre pari ad 1 per definizione.

L'espressione (3.14) può quindi essere semplificata come segue:

$$\xi_3 = A_3 - g_3 A_1. \quad (3.19)$$

Un valore di ξ_3 negativo significa che l'eccipiente in questione è escluso preferenzialmente dalla superficie della proteina; inoltre, più tale parametro è grande in valore assoluto più è rilevante l'esclusione preferenziale.

Funzioni radiali cumulative

Si passa ora a delineare la seconda metodologia utile a valutare l'esclusione preferenziale. La funzione radiale distributiva tra due particelle generiche A e B è definita come segue [52]:

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{locale}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{locale}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2}, \quad (3.20)$$

dove $\langle \rho_B(r) \rangle$ è la densità di particelle di tipo B ad una distanza r dalle particelle di tipo A e $\langle \rho_B \rangle_{locale}$ è la densità di particelle di tipo B, mediata su tutte le sfere intorno alla particella A con raggio r_{max} , come mostrato in Figura 3.9.

Dal punto di vista computazionale si utilizza la seguente procedura (prendendo come eccipiente di riferimento il saccarosio):

1. si calcola la funzione radiale cumulativa (dal centro di massa della proteina) delle molecole di saccarosio (nsc);

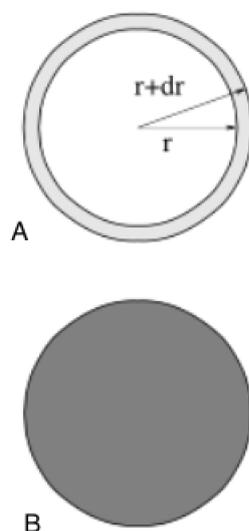


Figura 3.9: A) Rappresentazione della funzione $g_{AB}(r)$; B) Normalizzazione di $\rho_B >_{local}$. Immagine tratta dal manuale di GROMACS [52], con modifiche.

2. si calcola la funzione radiale cumulativa (dal centro di massa della proteina) delle molecole di acqua (nwc);
3. si esegue il rapporto nsc/nwc , normalizzando il risultato rispetto al medesimo rapporto valutato nel bulk della soluzione.

Così facendo, se il rapporto nsc/nwc normalizzato risulta essere minore di 1, vuol dire che tale componente è escluso preferenzialmente dalla superficie della proteina. La funzione di distribuzione radiale cumulativa per il saccarosio e l'acqua è calcolata come segue:

```
gmx rdf -f md.xtc -s md.tpr -cn nsc.svg -b 19000 -e 20000
```

```
gmx rdf -f md.xtc -s md.tpr -cn nwc.svg -b 19000 -e 20000
```

3.11.2 Valutazione del water replacement

Anche in questo caso, la procedura analizzata è analoga sia per la fase di congelamento sia per quella di essiccamento. Per valutare il water replacement occorre stimare i legami ad idrogeno che LDH instaura con l'eccipiente e con l'acqua. Ciò viene realizzato mediante i seguenti codici in GROMACS (prendendo come eccipiente di riferimento il saccarosio):

Una volta stimato il numero di legami ad idrogeno di eccipiente e solvente, si procede al calcolo del parametro χ , il quale definisce la frazione di legami ad idrogeno:

$$\chi = \frac{H_{saccarosio}}{H_{saccarosio} + H_{acqua}}, \quad (3.22)$$

dove $H_{saccarosio}$ è il numero di legami ad idrogeno saccarosio-LDH e H_{acqua} è il numero di legami ad idrogeno acqua-LDH. Più il parametro χ tende ad 1, più è forte l'azione dell'eccipiente come sostituito dell'acqua. Una procedura analoga viene condotta per tutti gli altri eccipienti

3.11.3 Indice di vetrificazione

GROMACS presenta un metodo di non equilibrio per determinare la viscosità. Questo fa uso del fatto che l'energia, alimentata nel sistema da forze esterne, viene dissipata attraverso attrito viscoso. Per un liquido newtoniano che subisce una piccola forza, si otterrà una gradiente di velocità secondo la seguente equazione [52]:

$$a_x(z) + \frac{\eta}{\rho} \frac{\partial^2 v_x(z)}{\partial z^2} = 0 \quad (3.23)$$

dove l'accelerazione $a_x(z)$ è in direzione dell'asse x ed è una funzione della coordinata z. In GROMACS il profilo di accelerazione è:

$$a_x(z) = A \cos\left(\frac{2\pi z}{l_z}\right), \quad (3.24)$$

dove l_z è l'altezza della box. Il profilo di velocità generato è:

$$\begin{aligned} v_x(z) &= V \cos\left(\frac{2\pi z}{l_z}\right) \\ V &= A \frac{\rho}{\eta} \left(\frac{l_z}{2\pi}\right)^2 \end{aligned} \quad (3.25)$$

La viscosità può essere così calcolata come:

$$\eta = \frac{A}{V} \rho \left(\frac{l_z}{2\pi}\right)^2 \quad (3.26)$$

Dal punto di vista computazionale, sono state eseguite delle nuove simulazioni per determinare la viscosità del sistema:

- simulazioni ad eccipiente singolo, sia in fase di congelamento che in fase di essiccamento;
- simulazioni ad eccipiente doppio, sia in fase di congelamento che in fase di essiccamento;

- simulazioni ad eccipiente doppio, volte a comprendere la variazione di viscosità al mutare della frazione in massa degli eccipienti ($w_{eccipiente}$) all'interno del volume di controllo (temperatura di 273 K e 258 K).

Per quest'ultimo caso sono stati selezionati come eccipienti di riferimento il saccarosio e la β ciclodestrina; sono state condotte tre diverse simulazioni, come riportato in Tabella 3.4.

Tabella 3.4: Condizioni operative delle simulazioni con doppio eccipiente per valutare la viscosità a 273K.

Eccipienti	$w_{disaccaride}, \%$	$w_{ciclodestrina}, \%$
Saccarosio+ β ciclodestrina	25	75
Saccarosio+ β ciclodestrina	50	50
Saccarosio+ β ciclodestrina	75	35

Gli step osservati per la preparazione del sistema da simulare sono i seguenti:

1. creazione di una box cubica;
2. aggiunta di eccipiente e solvente;
3. minimizzazione energetica del sistema;
4. equilibratura di pressione e temperatura;
5. simulazione di DM;
6. calcolo della viscosità.

Bisogna evidenziare i seguenti aspetti:

- per le simulazioni in fase di essiccamento con due eccipienti sono state condotte delle analisi più lunghe, con una dimensione della box di 9 nm per lato; per tutti gli altri casi il volume di controllo ha una dimensione compresa tra i 4 e i 4.4 nm;
- la composizione della box è stata fissata in modo da rispettare la frazione molare dell'eccipiente, in tutte le simulazioni base prima analizzate.

Nelle Tabelle 3.5 e 3.6 vengono riportate le condizioni operative delle simulazioni condotte in fase di congelamento, relative ad un singolo eccipiente.

Nella Tabella 3.7, invece, sono rappresentate le condizioni operative delle simulazioni condotte in fase di congelamento, relative a due eccipienti.

Nelle Tabelle 3.8 e 3.9 vengono mostrate le condizioni operative delle simulazioni condotte in fase di essiccamento, relative ad un singolo eccipiente.

Tabella 3.5: Condizioni operative delle simulazioni ad eccipiente singolo per valutare la viscosità in fase di congelamento.

Fase di congelamento eccipiente singolo				
Eccipiente	Frazione molare simulazione base	$N_{eccipiente}^{box}$	N_{acqua}^{box}	
Saccarosio	0.01855	32	1692	
Trealosio	0.01858	32	1648	
Cellobiosio	0.01864	32	1647	
Mannitolo	0.01668	31	1828	
Istidina	0.01624	32	1886	
β ciclodestrina	0.00554	12	2222	
γ ciclodestrina	0.00487	8	1816	

Tabella 3.6: Dimensioni della box di simulazione per valutare la viscosità in fase di congelamento.

Fase di congelamento eccipiente singolo	
Eccipiente	Dimensione della box, nm
Saccarosio	4
Trealosio	4
Cellobiosio	4
Mannitolo	4
Istidina	4
β ciclodestrina	4.4
γ ciclodestrina	4.1

Tabella 3.7: Condizioni operative delle simulazioni con doppio eccipiente per valutare la viscosità in fase di congelamento.

Fase di congelamento eccipiente doppio						
Eccipiente	$\chi_{disaccaride}$	$\chi_{ciclodestrina}$	$N_{disaccaride}^{box}$	$N_{ciclodestrina}^{box}$	N_{acqua}^{box}	Dimensione box, nm
Cellobiosio+ β ciclodestrina	0.00929	0.00279	16	5	1657	4
Saccarosio+ β ciclodestrina	0.00961	0.00278	16	5	1676	4
Trealosio+ β ciclodestrina	0.00927	0.00278	16	5	1661	4

Tabella 3.8: Condizioni operative delle simulazioni ad eccipiente singolo per valutare la viscosità in fase di essiccamento.

Fase di essiccamento eccipiente singolo				
Eccipiente	Frazione molare simulazione base	$N_{eccipiente}^{box}$	N_{acqua}^{box}	
Saccarosio	0.324	90	188	
Trealosio	0.322	90	187	
Cellobiosio	0.329	90	184	
Mannitolo	0.342	100	194	
Istidina	0.482	100	108	
β ciclodestrina	0.135	8	58	
γ ciclodestrina	0.122	8	58	

Tabella 3.9: Dimensioni della box di simulazione per valutare la viscosità in fase di essiccamento.

Fase di essiccamento eccipiente singolo	
Eccipiente	Dimensione della box, nm
Saccarosio	4
Trealosio	4
Cellobiosio	4
Mannitolo	4
Istidina	4
β ciclodestrina	4.1
γ ciclodestrina	4.3

Tabella 3.10: Condizioni operative delle simulazioni con doppio eccipiente per valutare la viscosità in fase di essiccamento.

Fase di essiccamento eccipiente doppio						
Eccipiente	$\chi_{disaccaride}$	$\chi_{ciclodestrina}$	$N_{disaccaride}^{box}$	$N_{ciclodestrina}^{box}$	N_{acqua}^{box}	Dimensione box, nm
Cellobiosio+ β ciclodestrina	0.206	0.058	340	100	1265	9
Saccarosio+ β ciclodestrina	0.195	0.059	333	100	1277	9
Trealosio+ β ciclodestrina	0.191	0.059	324	100	1277	9

Nella Tabella 3.10 si evidenziano le condizioni operative delle simulazioni condotte in fase di essiccamento, relative a due eccipienti.

Nelle Tabella 3.11 vengono riportate, infine, le condizioni operative delle simulazioni condotte per valutare la variazione di viscosità con la composizione in massa del sistema in esame.

Le linee di codice utilizzate per condurre questa analisi sono le seguenti (prendendo come riferimento il saccarosio):

```
gmx insert-molecules -c saccarosio.gro -nmol 30 -o sbox.gro -box 4 4 4
```

```
gmx solvate -cp sbox.gro -cs spc216.gro -o swbox.gro -p topol.top
```

```
gmx grompp -f minim.mdp -c swbox.gro -p topol.top -o em.tpr
```

```
gmx mdrun -v -deffnm em
```

```
gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -p topol.top -o nvt.tpr
```

```
gmx mdrun -v -deffnm nvt
```

```
gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -t nvt.cpt -p topol.top -o npt.tpr
```

```
gmx mdrun -v -deffnm npt
```

```
gmx grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p topol.top -o md.tpr
```

```
gmx mdrun -v -deffnm md
```

Nel capitolo successivo sono analizzati i risultati di tutte le grandezze stimate, con le opportune interpretazioni in termini di efficienza degli eccipienti studiati e importanza relativa dei meccanismi di stabilizzazione proposti in letteratura.

Tabella 3.11: Condizioni operative delle simulazioni con doppio eccipiente per valutare la viscosità a 273K.

Simulazioni al variare della frazione in massa dei componenti						
Eccipiente	$w_{disaccaride}, \%$	$w_{ciclodestrina}, \%$	$N_{disaccaride}^{box}$	$N_{ciclodestrina}^{box}$	N_{acqua}^{box}	Dimensione box, nm
Saccarosio+ β ciclodestrina	25	75	8	9	1763	4
Saccarosio+ β ciclodestrina	50	50	5	16	1796	4
Saccarosio+ β ciclodestrina	75	25	24	3	1667	4

Capitolo 4

Risultati simulazioni di DM

Nel presente capitolo verranno analizzati i risultati delle simulazioni di Dinamica Molecolare, ovvero si stimeranno tutte le grandezze macroscopiche, utili ad indagare, dal punto di vista molecolare, i meccanismi di stabilizzazione proteica riportati in letteratura. Inizialmente, verranno discusse le simulazioni ad eccipiente singolo, in modo da comprendere il comportamento dei diversi eccipienti nel ruolo di crio-protettori e lio-protettori; successivamente, invece, saranno attuati dei confronti mirati tra i risultati delle simulazioni appena citate e quelli delle simulazioni con due eccipienti, in modo da stimare, più nello specifico, eventuali effetti sinergici nella protezione del principio attivo proteico.

4.1 Meccanismi di protezione in fase di congelamento ed essiccamento

Prima di procedere con la disamina dei risultati, è bene chiarire alcuni aspetti. Come esposto nel Capitolo 3, i meccanismi di protezione ipotizzati in letteratura sono l'esclusione preferenziale, il water replacement e la vetrificazione. Tuttavia, non tutti questi meccanismi hanno la stessa efficacia ed importanza nell'intero processo di liofilizzazione, come frequentemente riportato in letteratura. In particolare, autori come Wang [26], Kawai [55], Carpenter [33], Nema [42] evidenziano i seguenti punti:

- l'esclusione preferenziale riveste un ruolo da protagonista in fase di congelamento;
- il water replacement ha maggiore rilevanza in fase di essiccamento;
- la vetrificazione è importante in tutte le fasi del processo di liofilizzazione.

Il motivo per cui l'esclusione preferenziale non è così rilevante durante la fase di essiccamento viene spiegato in maniera dettagliata da Carpenter [33]. Durante questa fase del processo di liofilizzazione, infatti, lo strato d'idratazione, che ricopre

la superficie della proteina, viene quasi interamente rimosso; l'ipotesi di esclusione preferenziale, quindi, acquista un ruolo più marginale rispetto ai meccanismi di water replacement e vetrificazione. Tuttavia, è stata lo stesso stimata anche in fase di essiccamento, dal momento che risulta comunque non trascurabile ai fini della stabilizzazione proteica.

4.2 Esclusione preferenziale: metodo di Arakawa

In questa sezione viene riportata la stima del grado di esclusione preferenziale mediante il metodo di Arakawa e Timasheff [57]. Come precedentemente spiegato, questa metodologia è applicabile solamente alle simulazioni con eccipiente singolo. La stima di tale parametro è stata condotta sia in condizioni di congelamento, sia di essiccamento.

4.2.1 Fase di congelamento

In Tabella 4.1 ed in Figura 4.1 sono mostrati i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento, per tutti gli eccipienti utilizzati. Come detto, in questa fase del processo di liofilizzazione, il meccanismo di esclusione preferenziale riveste un ruolo di primaria importanza nella protezione del principio attivo. Tale parametro, infatti, per quanto spiegato nel capitolo introduttivo, è direttamente collegato all'attività biologica della proteina: maggiore è il grado di esclusione preferenziale, maggiore risulterà l'attività proteica.

Tabella 4.1: Valori del parametro di esclusione preferenziale (ξ_3) in fase di congelamento.

Eccipiente	ξ_3
Trealosio	-0.0276
Saccarosio	-0.0311
Mannitolo	0.0425
Istidina	0.0673
β -ciclodestrina	-0.0791
γ -ciclodestrina	-0.0995
Cellobiosio	-0.0390

È utile rammentare che un valore di ξ_3 negativo indica che l'eccipiente in questione viene escluso preferenzialmente dalla superficie di LDH; inoltre, più è grande in valore assoluto, più è rilevante l'esclusione preferenziale. Dall'analisi della Figura 4.1 emergono i seguenti punti:

- le ciclodestrine sono escluse preferenzialmente in maniera più accentuata rispetto agli altri eccipienti;

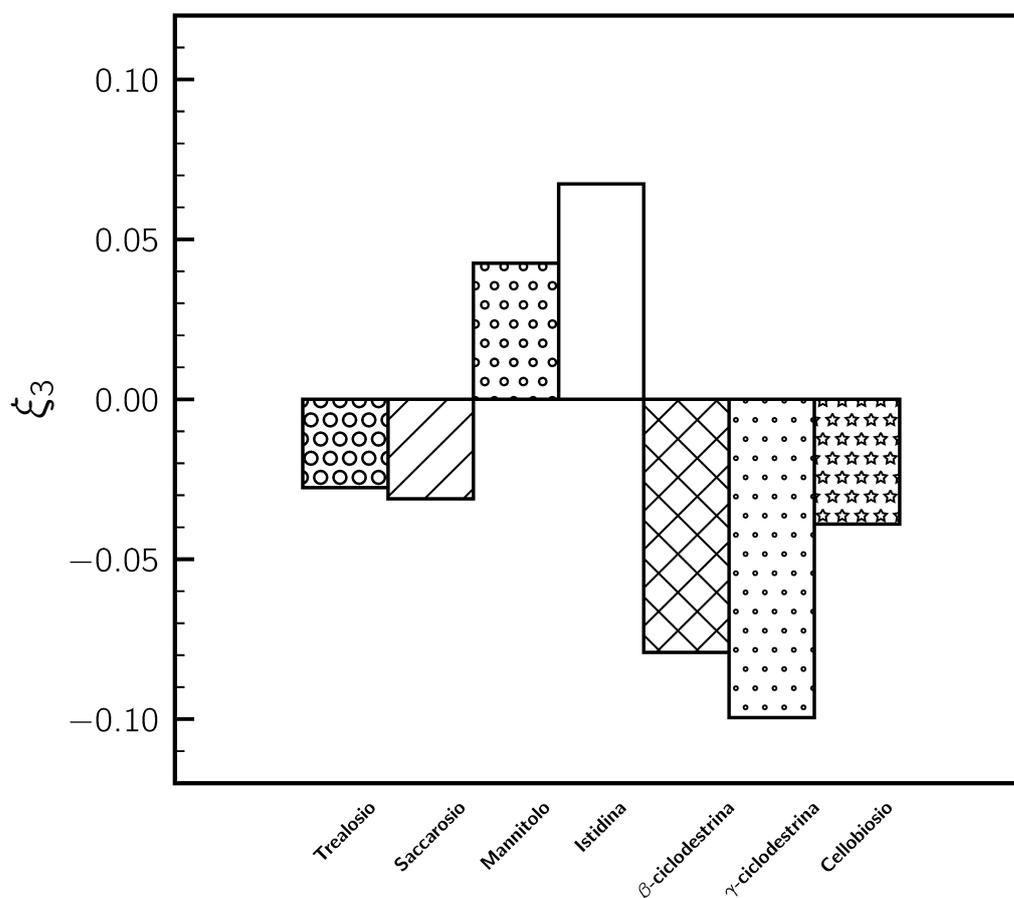


Figura 4.1: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente singolo.

- tra i disaccaridi, il cellobiosio è quello che evidenzia le migliori prestazioni in termini di esclusione preferenziale;
- mannitolo ed istidina non sono preferenzialmente esclusi dalla superficie proteica.

Tale meccanismo protettivo non implica che le molecole di soluto non si leghino alla superficie della proteina, ma che esse siano più concentrate nel bulk della soluzione, rispetto che nelle immediate vicinanze della proteina stessa. La dimensione molecolare dell'eccipiente, quindi, costituisce un fattore discriminante molto rilevante: maggiore è il peso molecolare del componente in questione, più elevato sarà il suo grado di esclusione preferenziale. Quanto appena esposto può trovare facilmente riscontro in studi di letteratura. Nema e Avis [42], ad esempio, hanno valutato l'attività residua della Lattato Deidrogenasi a seguito di un ciclo di

congelamento-scongelo, in presenza di diversi eccipienti. Dai risultati da loro ottenuti, si nota come, a parità di rapporto in peso tra i diversi eccipienti, l'attività residua di LDH aumenti con il crescere della grandezza dell'eccipiente. Alla luce di ciò, risultano coerenti i valori di esclusione preferenziale precedentemente riportati. La γ -ciclodestrina, infatti, presenta un grado di esclusione preferenziale superiore rispetto a quello di tutti gli altri eccipienti. Quindi, per quanto concerne esclusivamente la fase di congelamento, tale eccipiente risulta essere il più promettente nel ruolo di crio-protettore. Per quanto riguarda i disaccaridi, invece, le prestazioni sono piuttosto simili; tuttavia, il saccarosio mostra un'esclusione preferenziale leggermente superiore a quella del trealosio. Ciò risulta coerente con gli studi effettuati da Nema e Avis [42] e da Kawai e Suzuki [55]; in particolare, nel lavoro di Nema e Avis si evidenzia una discrepanza molto accentuata tra l'attività residua di LDH, in soluzione con saccarosio o trealosio. A parità di rapporto molare, infatti, il sistema contenente saccarosio salvaguarda meglio l'attività proteica (attività residua LDH: 73%) rispetto a quello contenente trealosio (attività residua LDH: 26%). Nel lavoro di Kawai e Suzuki, invece, si nota un'efficacia molto simile di tali eccipienti, ma, considerando la deviazione standard sulla misura, la soluzione con il saccarosio risulta lievemente migliore nel preservare l'attività della proteina. Il cellobiosio, infine, mostra un grado di esclusione preferenziale superiore rispetto agli altri disaccaridi adoperati; tale eccipiente non viene utilizzato spesso in letteratura negli studi relativi al LDH, ma, come si riscontrerà anche in seguito, rappresenta uno degli eccipienti migliori nelle formulazioni proteiche, in base alle stime effettuate con GROMACS. Come detto, mannitolo ed istidina non sono esclusi preferenzialmente dalla superficie della proteina, dal momento che ξ_3 assume un valore positivo. Ciò non deve sorprendere, in quanto tali componenti vengono utilizzati raramente all'interno delle formulazioni come stabilizzatori proteici. L'istidina, infatti, viene spesso adoperata in letteratura come buffer, in modo da non far variare il pH della formulazione durante il congelamento. Il mannitolo, invece, è visto generalmente come agente di bulking: si sfrutta la sua elevata tendenza a cristallizzare durante il congelamento per innalzare la densità del prodotto finale ed evitare perdite della proteina durante la fase di essiccazione. Sempre Nema e Avis [42] hanno valutato l'attività residua di LDH all'interno di una soluzione contenente mannitolo (utilizzato come stabilizzatore), in fase di congelamento: il valore stimato risulta essere pari al 6% dell'attività iniziale. Ciò testimonia ulteriormente la scarsa efficacia di tale eccipiente nel ruolo di crio-protettore, in linea coi risultati ottenuti nel presente lavoro.

4.2.2 Fase di essiccazione

In Tabella 4.2 ed in Figura 4.2 sono mostrati i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccazione.

Emergono subito delle analogie e delle differenze rispetto a quanto evidenziato in precedenza:

Tabella 4.2: Valori del parametro di esclusione preferenziale (ξ_3) in fase di essiccamento.

Eccipiente	ξ_3
Trealosio	-0.0920
Saccarosio	-0.0527
Mannitolo	-0.0438
Istidina	-0.0891
β -ciclodestrina	-0.4572
γ -ciclodestrina	-0.4670
Cellobiosio	-0.1147

- la γ -ciclodestrina e la β -ciclodestrina presentano i valori più elevati di esclusione preferenziale, con una discrepanza molto più accentuata rispetto al caso precedente;
- escluse le ciclodestrine, il cellobiosio rimane l'eccipiente che presenta le migliori prestazioni in termini di esclusione preferenziale;
- tutti gli eccipienti sono preferenzialmente esclusi dalla superficie proteica;
- il trealosio ha un valore di ξ_3 superiore in valore assoluto a quello del saccarosio;
- l'istidina mostra risultati leggermente migliori rispetto a mannitolo e saccarosio.

In generale, si può quindi affermare che i composti utilizzati siano dei discreti lioprotettori, in base al meccanismo dell'esclusione preferenziale. Tuttavia, occorre sempre tener presente quanto spiegato nella Sezione 4.1 sull'importanza di tale meccanismo in fase di essiccamento.

4.3 Distribuzioni radiali cumulative

Tale metodologia di analisi ha permesso di stimare il grado di esclusione preferenziale sia per le simulazioni ad eccipiente singolo sia per quelle con due eccipienti. In questa sezione verranno dapprima confrontati i risultati ottenuti per le simulazioni con un solo eccipiente e, in seguito, si tratterà il caso delle simulazioni con eccipiente doppio, in tutte le diverse casistiche. Per la corretta lettura dei grafici che saranno riportati, si tengano presenti i seguenti punti:

- in ascissa viene valutata la distanza delle molecole di eccipiente dal centro di massa della proteina;

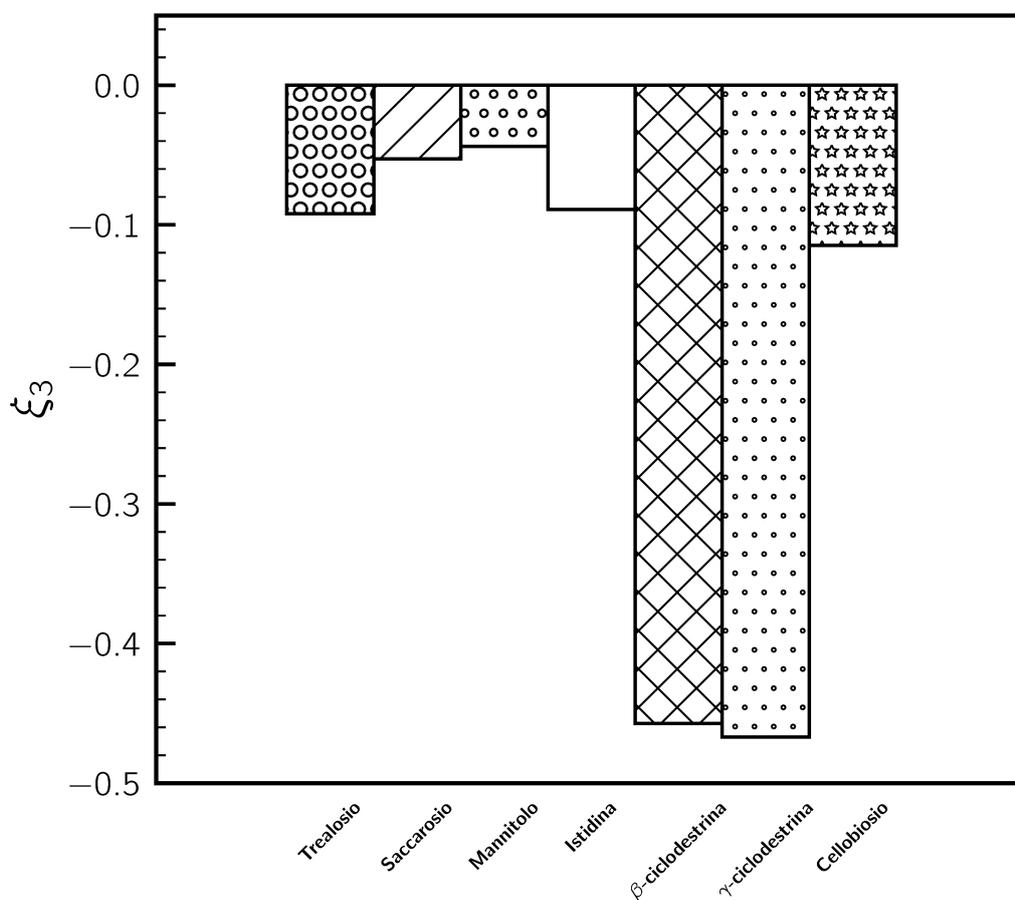


Figura 4.2: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente singolo.

- in ordinata viene stimato il fattore frc , ovvero:

$$frc = \frac{nec}{nwc * f_n}, \quad (4.1)$$

dove nec rappresenta la distribuzione radiale cumulativa delle molecole di eccipiente; nwc è la distribuzione radiale cumulativa delle molecole di solvente e f_n è un fattore di normalizzazione, il quale viene calcolato nella maniera esposta nel Capitolo 3.

- il valore iniziale di ascissa a cui è stato valutato il fattore frc è di 0.4 nm. Tale scelta è motivata dal fatto che, ad una distanza inferiore a quella appena citata, le molecole di solvente e di eccipiente sono prossime allo zero; risulterebbe quindi difficoltosa la stima del fattore frc .

4.3.1 Eccipiente singolo

In Figure 4.3 e 4.4 vengono riportate le distribuzioni radiali cumulative per le simulazioni con un solo stabilizzatore, sia in fase di congelamento che di essiccamento. Ogni curva fa riferimento ad un eccipiente specifico. La lettura di grafici di questo tipo è estremamente intuitiva:

- ad ascissa fissata, se il fattore frc è minore di 1 significa che il numero di molecole di solvente è superiore rispetto al numero di molecole di eccipiente; in questo caso, quindi, l'eccipiente in questione risulta essere preferenzialmente escluso;
- ad ascissa fissata, se il fattore frc è maggiore di 1 significa che il numero di molecole di solvente è inferiore rispetto al numero di molecole di eccipiente; in questo caso non si presenta il fenomeno dell'esclusione preferenziale;
- si considerino due curve: quella collocata più in basso fa riferimento ad un eccipiente che presenta un grado di esclusione preferenziale più elevato;
- all'aumentare della distanza dal centro di massa della proteina, tutte le curve convergono ad un valore di frc pari ad 1; ciò accade perché nel bulk della soluzione vi è, in media, lo stesso numero di molecole di acqua ed eccipiente.

Dall'analisi dei grafici, si nota una coerenza pressoché totale con i risultati ottenuti con il metodo di Arakawa e Timasheff [57]. L'unica differenza la si osserva in fase di essiccamento, dove la curva che fa riferimento al trealosio è posta più in basso rispetto a quella del cellobiosio, fino ad un valore di ascissa pari ad 1.5 nm. Per quanto concerne la fase di congelamento si vede come mannitolo ed istidina non presentino esclusione preferenziale, a differenza di tutti gli altri eccipienti. Ancora una volta sono entrambe le ciclodestrine a mostrare le performance migliori circa questo meccanismo di protezione, in accordo con quanto enunciato in precedenza. Per la fase di essiccamento, invece, è evidente come tutti gli eccipienti siano esclusi preferenzialmente dalla superficie della proteina; inoltre le curve relative alla β -ciclodestrina e alla γ -ciclodestrina sono collocate molto più in basso rispetto alle altre; ciò testimonia il maggior grado di esclusione preferenziale che tali eccipienti hanno durante la fase di essiccamento. In conclusione, quindi, si può affermare che, sia il metodo di Arakawa, sia quello delle distribuzioni radiali cumulative permette una stima accurata e coerente del grado di esclusione preferenziale per i sistemi ad eccipiente singolo. Entrambi i metodi mostrano risultati in linea con quanto valutato sperimentalmente in letteratura.

4.3.2 Eccipiente doppio

In questa sezione vengono illustrati i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale per i sistemi con doppio eccipiente. Questa analisi costituisce qualcosa di innovativo in tale contesto, in quanto, in letteratura, non si trovano

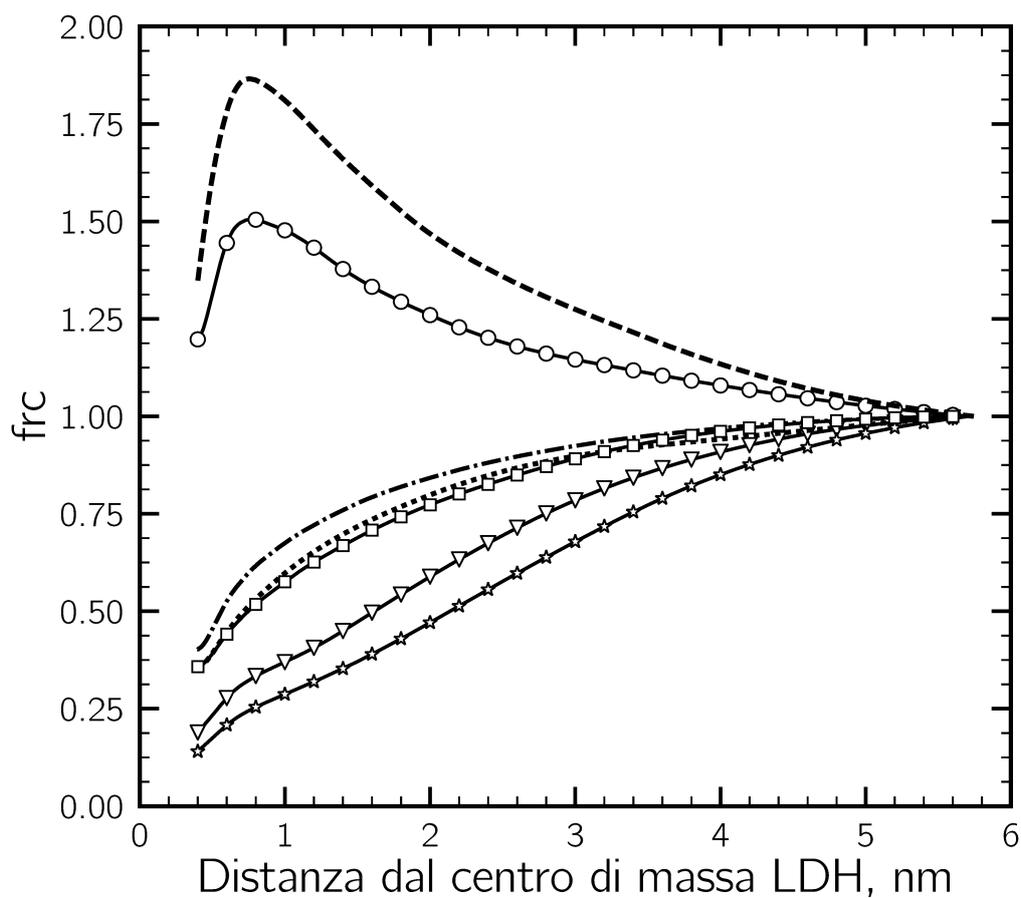


Figura 4.3: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente singolo. Ogni curva si riferisce ad una simulazione con un diverso eccipiente: --- istidina; -.- trealosio; ○ mannitolo; ··· saccarosio; □ cellobiosio; ▷ β -ciclodestrina; ☆ γ -ciclodestrina.

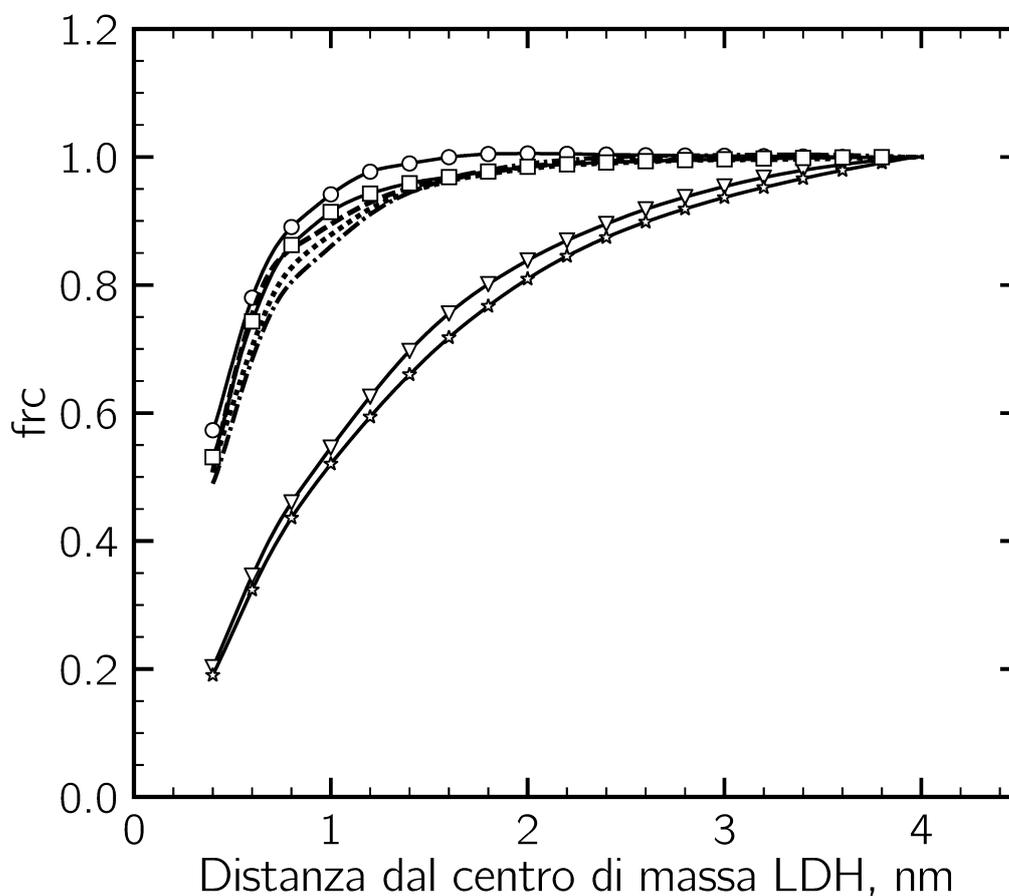


Figura 4.4: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente singolo. Ogni curva si riferisce ad una simulazione con un diverso eccipiente: — — — istidina; — · — trealosio; ○ mannitolo; · · · saccarosio; □ cellobiosio; ▷ β -ciclodestrina; ☆ γ -ciclodestrina.

facilmente studi che utilizzano due o più molecole di eccipiente all'interno dello stesso sistema, nel ruolo di stabilizzatori proteici. Come esposto nel Capitolo 3, tali simulazioni sono state imbastite in modo da valutare possibili effetti sinergici tra i componenti presenti nel sistema. In altre parole, sono state selezionate le molecole che mostravano le migliori prestazioni nel ruolo di crio-protettori e lio-protettori. In particolare, la β -ciclodestrina è stata scelta come crio-protettore, in quanto evidenzia, come visto, delle ottime performance in termini di esclusione preferenziale; come lio-protettore, invece, sono stati selezionati il trealosio, il saccarosio e il cellobiosio, per alcuni motivi che saranno meglio chiariti nel prosieguo del capitolo.

Fase di congelamento

In Figure 4.5, 4.6 e 4.7 sono rappresentate le distribuzioni radiali cumulative per le simulazioni con doppio eccipiente in fase di congelamento. In ogni grafico vengono diagrammate tre diverse curve:

- due distribuzioni radiali cumulative che fanno riferimento agli eccipienti singoli presenti in soluzione, ovvero β -ciclodestrina e trealosio, saccarosio o cellobiosio (calcolate in maniera analoga ai casi precedenti);
- una distribuzione radiale cumulativa che, invece, fa riferimento ad entrambi gli eccipienti presenti, valutata come:

$$frc = \frac{n\beta c + ndc}{nwc * f_n}, \quad (4.2)$$

dove $n\beta c$ si riferisce alla β -ciclodestrina e ndc al disaccaride specifico.

Le curve presenti in Figure 4.5, 4.6 e 4.7 mostrano tutte lo stesso andamento e la medesima collocazione:

- la curva che caratterizza il disaccaride è quella posta più in alto;
- la curva che caratterizza la β -ciclodestrina è quella collocata più in basso;
- la curva che caratterizza i due eccipienti contemporaneamente è quella posta nel mezzo.

Da questa analisi emerge una prima considerazione: il grado di esclusione preferenziale di due eccipienti considerati contemporaneamente è superiore a quello del disaccaride (valutato singolarmente), ma inferiore a quello della β -ciclodestrina (valutata singolarmente). Ciò significa che una formulazione contenente esclusivamente trealosio, saccarosio o cellobiosio permette una stabilizzazione inferiore del sistema rispetto ad una soluzione che, oltre ad uno degli eccipienti appena citati, contiene anche una ciclodestrina. L'azione sinergica dei due componenti comporta, quindi, un guadagno in termini di protezione secondo il meccanismo dell'esclusione preferenziale.

Confronto simulazione a singolo e doppio eccipiente in fase di congelamento

Un'altra analisi effettuata ha avuto lo scopo di comprendere se vi fossero differenze di comportamento tra una soluzione contenente un eccipiente singolo e un'altra formulazione con lo stesso eccipiente, accoppiato, però, ad un componente aggiuntivo nel ruolo di stabilizzatore. In Figure 4.8, 4.9 e 4.10 si può osservare il risultato di tale analisi. Nella legenda delle suddette Figure, con il termine "singolo" viene indicato l'eccipiente presente in maniera solitaria nel volume di controllo, mentre con il termine "doppio" è indicato lo stesso eccipiente accoppiato assieme ad un'altra molecola stabilizzatrice. Le curve degli eccipienti "singoli" sono le medesime

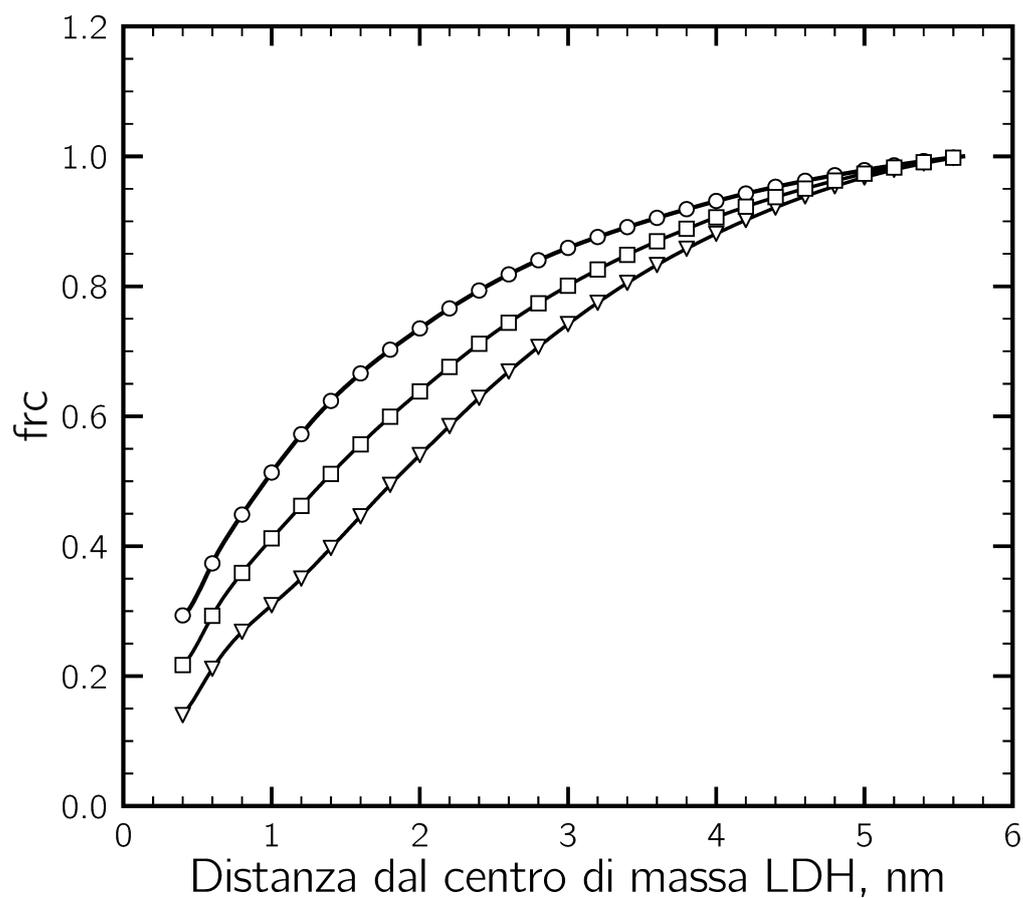


Figura 4.5: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: ○ trealosio; □ β-ciclodestrina+trealosio; ▽ β-ciclodestrina.

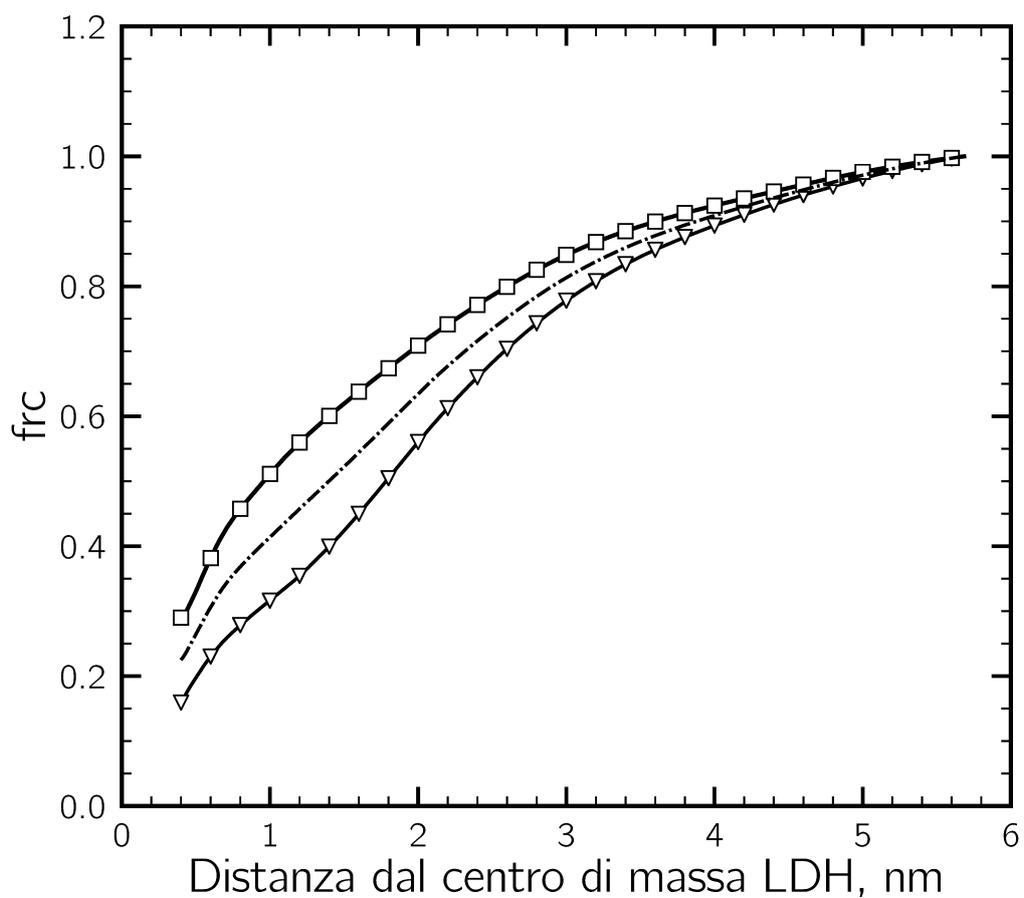


Figura 4.6: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: \square saccarosio; $- \cdot -$ β -ciclodestrina+saccarosio; \triangleright β -ciclodestrina.

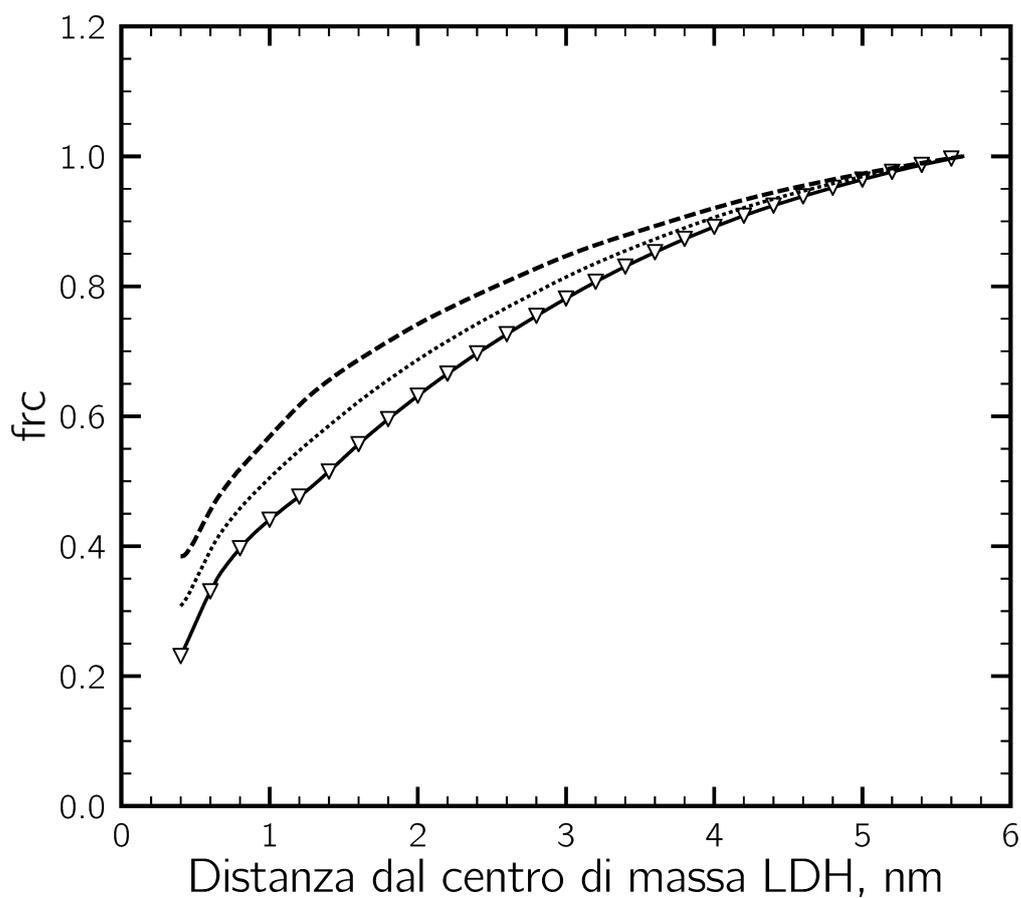


Figura 4.7: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: — — — saccharosio; - - - β -ciclodestrina+cellobiosio; \triangleright β -ciclodestrina.

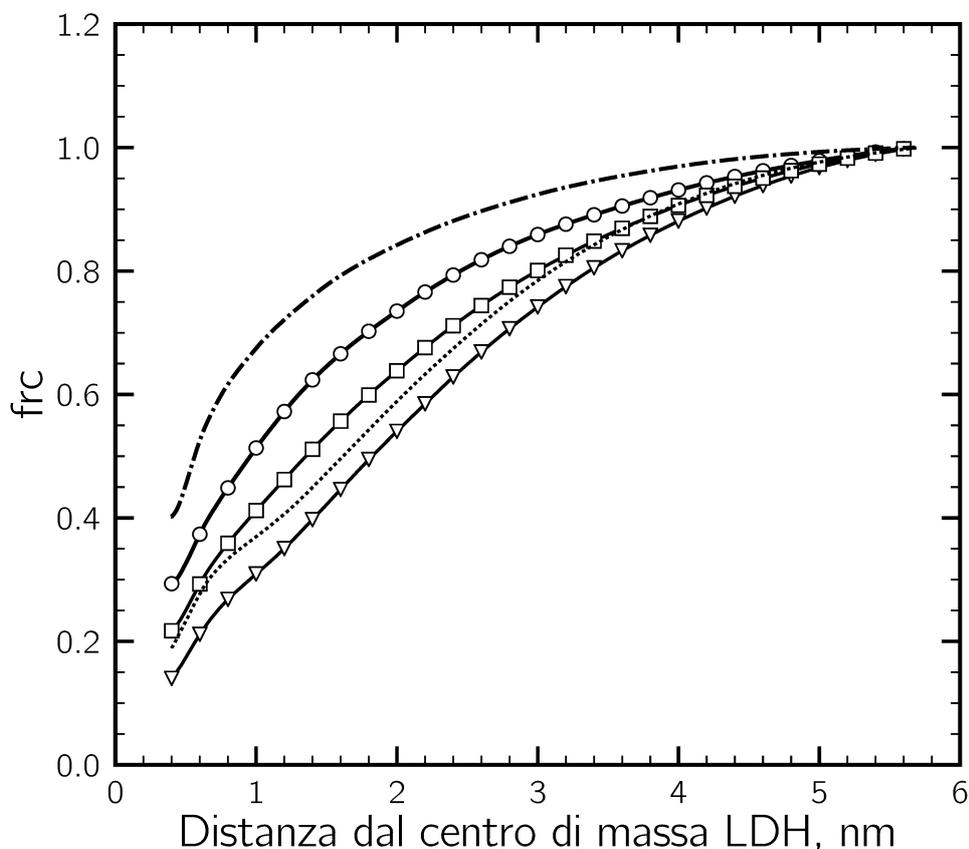


Figura 4.8: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipienti doppi: — · — trealosio singolo; ○ trealosio doppio; □ β -ciclodestrina+trealosio; - - - β -ciclodestrina singola; ▽ β -ciclodestrina doppia.

utilizzate nella Sezione 4.3.1, mentre quelle degli eccipienti "doppi" sono le stesse riportate nelle Figure 4.5, 4.6 e 4.7.

Dallo studio di tali grafici (Figure 4.8, 4.9 e 4.10) emerge un altro aspetto notevolmente rilevante: il grado di esclusione preferenziale degli eccipienti presenti singolarmente all'interno del sistema è inferiore rispetto a quello dei medesimi eccipienti accoppiati ad un'altra molecola all'interno della formulazione. Prendendo come esempio il trealosio, l'esclusione preferenziale di tale eccipiente, nella soluzione che contiene anche la β -ciclodestrina, è superiore rispetto a quella osservata nella box con il trealosio come unico stabilizzatore. Lo stesso discorso vale per la β -ciclodestrina e per gli altri disaccaridi. A questo punto, risulta definitivamente chiaro il beneficio delle formulazioni con all'interno crioprotettori multipli: l'efficacia di ciascun eccipiente, infatti, viene incrementata dalla presenza di un "compagno". È quindi molto più vantaggioso, durante la fase di congelamento,

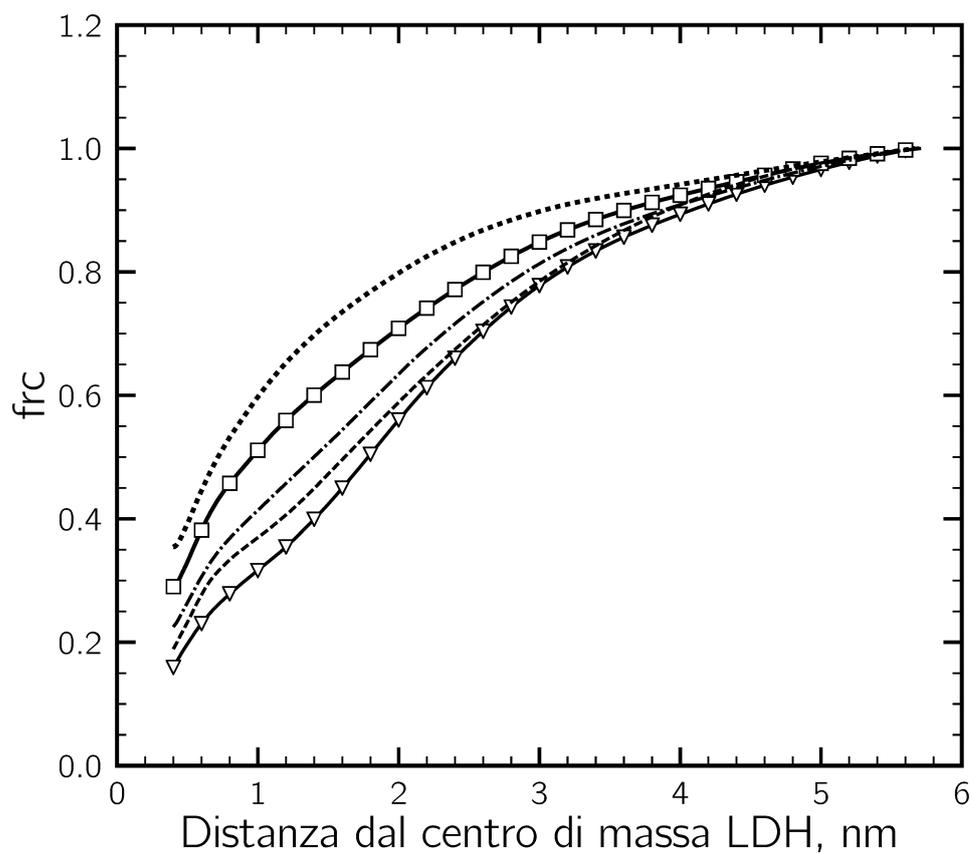


Figura 4.9: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: - - - saccharosio singolo; □ saccharosio doppio; - - - β -ciclodestrina+saccarosio; -.- β -ciclodestrina singola; ▷ β -ciclodestrina doppia.

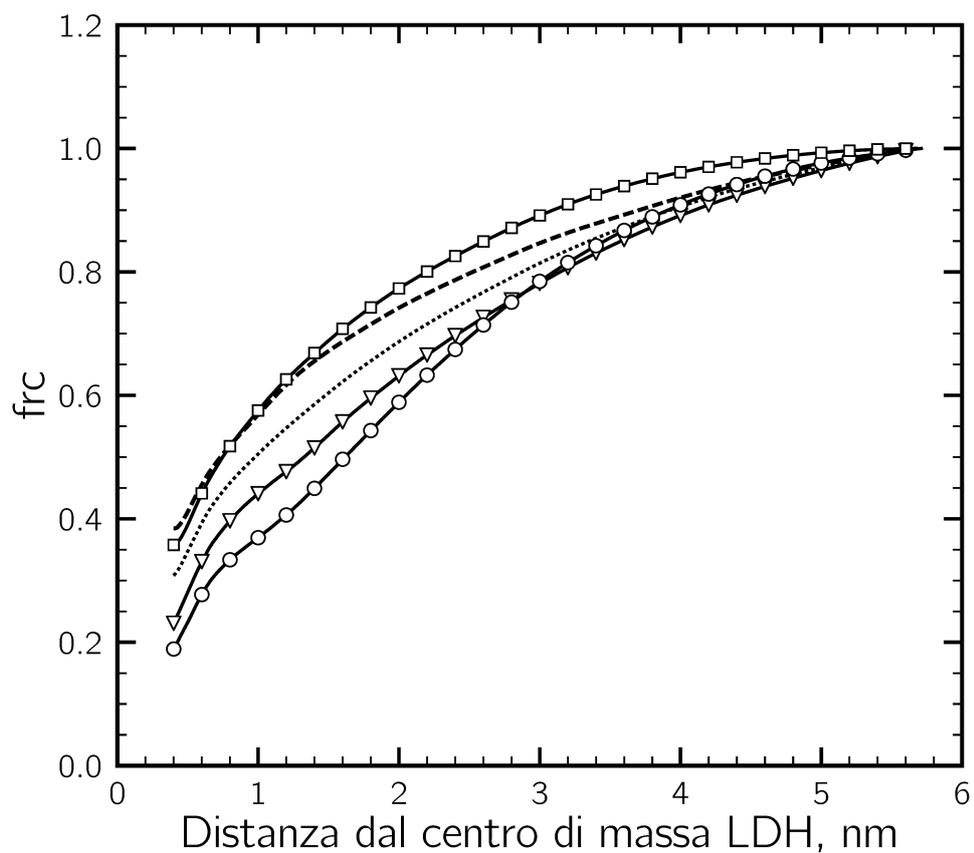


Figura 4.10: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: □ cellobiosio singolo; --- cellobiosio doppio; ···· β -ciclodestrina+cellobiosio; ○ β -ciclodestrina singola; ▷ β -ciclodestrina doppia.

imbastire delle formulazioni con più molecole di eccipiente, in modo da prevenire in maniera più efficace la denaturazione proteica.

Confronto simulazione a singolo e doppio eccipiente in fase di congelamento

In Figura 4.11 viene rappresentato un confronto relativo al grado di esclusione preferenziale tra i diversi sistemi a due eccipienti.

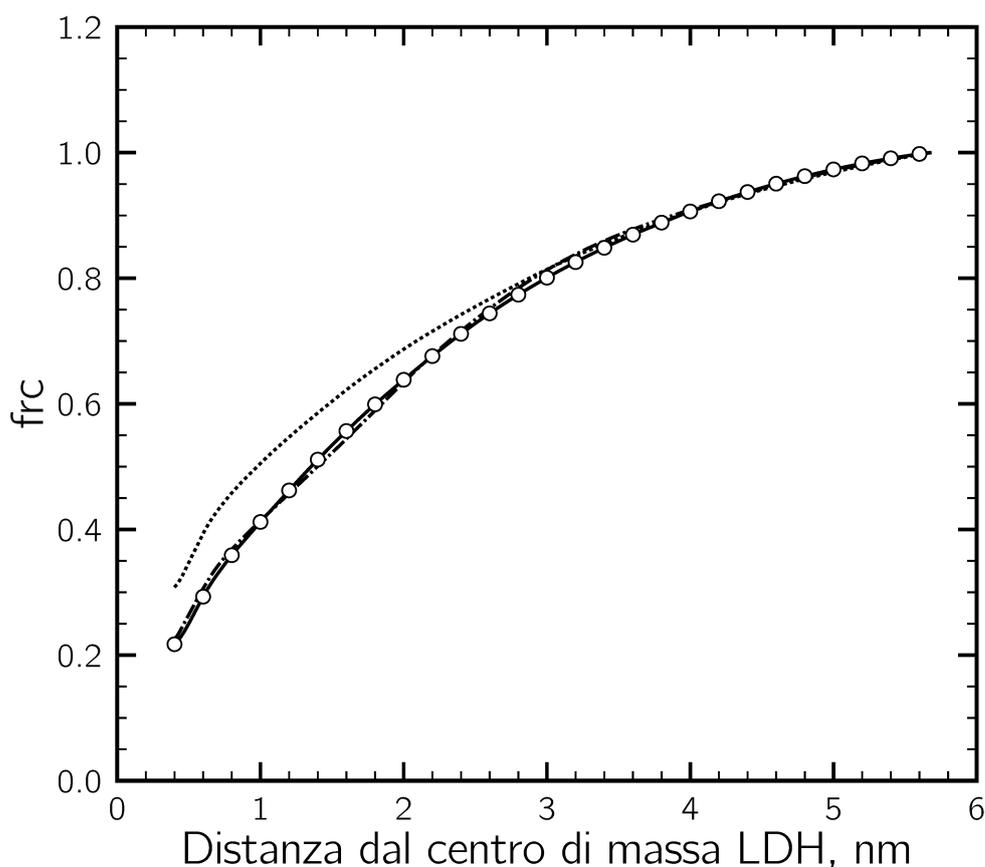


Figura 4.11: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: — - — β -ciclodestrina+saccarosio; - - - β -ciclodestrina+cellobiosio; \circ β -ciclodestrina+trealosio.

Dall'analisi della Figura 4.11 si notano alcuni aspetti interessanti:

- il sistema contenente la β -ciclodestrina e il saccarosio presenta sostanzialmente il medesimo grado di esclusione preferenziale della box con all'interno β -ciclodestrina e trealosio;
- la curva che fa riferimento alla formulazione che ha come eccipienti la β -ciclodestrina e il cellobiosio si discosta leggermente dalle altre nella prima

parte del grafico, fino ad una distanza dal centro di massa della proteina pari a 3 nm; superata tale distanza, la curva coincide con quella degli altri due eccipienti.

Tali risultati confermano l'azione "benefica" della β -ciclodestrina sui disaccaridi in esame. In Figura 4.3, infatti, dove veniva valutata l'esclusione preferenziale di ciascun disaccaride singolo, la discrepanza tra le curve di trealosio, saccarosio e cellobiosio era leggermente più accentuata, fino ad una distanza dal centro di massa della proteina pari a 4 nm. L'aggiunta al sistema della β -ciclodestrina, invece, rende più uniformi le performance dei sistemi contenenti tali disaccaridi, aumentando la stabilità del principio attivo. In ultima analisi, è stato effettuato un confronto tra i sistemi contenenti gli eccipienti che mostravano le migliori e le peggiori prestazioni in termini di esclusione preferenziale (Figura 4.3) e i tre sistemi con eccipienti multipli. In Figura 4.12 viene diagrammato quanto appena esposto. Come eccipiente "peggiore" (in fase di congelamento) è stato scelto il meno performante tra quelli che presentavano esclusione preferenziale, ovvero il trealosio (sono stati quindi scartati l'istidina e il mannitolo). L'eccipiente "migliore" è, invece, la γ -ciclodestrina. Dal grafico risulta chiaro come le curve dei sistemi a due eccipienti siano disposte nel mezzo.

Al netto di tutte le valutazioni effettuate, si può concludere che:

- i disaccaridi, accoppiati alla β -ciclodestrina, mostrano un netto miglioramento delle loro prestazioni come crio-protettori. Lo stesso discorso vale anche per la β -ciclodestrina;
- il sistema nel suo complesso evidenzia una leggera perdita di efficacia in termini di esclusione preferenziale, paragonato ad una formulazione contenente esclusivamente la β -ciclodestrina.

Tuttavia, il vantaggio di non utilizzare esclusivamente le ciclodestrine come molecole stabilizzatrici nel processo di liofilizzazione verrà meglio chiarito in seguito, quando si analizzeranno gli altri meccanismi di protezione.

Fase di essiccamento

Si passa ora alla descrizione del comportamento dei sistemi ad eccipienti multipli durante la fase di essiccamento, focalizzando sempre l'attenzione sul meccanismo dell'esclusione preferenziale. In Figure 4.13, 4.14 e 4.15 sono rappresentate le distribuzioni radiali per le simulazioni con doppio eccipiente in fase di essiccamento. Le considerazioni sul comportamento di tali curve sono analoghe a quelle riportate per la fase di congelamento; si nota facilmente, infatti, che il comportamento degli eccipienti è analogo a quello mostrato in precedenza.

Comportamento di eccipienti multipli in fase di essiccamento

Viene affrontata la medesima analisi condotta in fase di congelamento, ovvero lo studio della differenza di comportamento tra un sistema contenente un singolo ec-

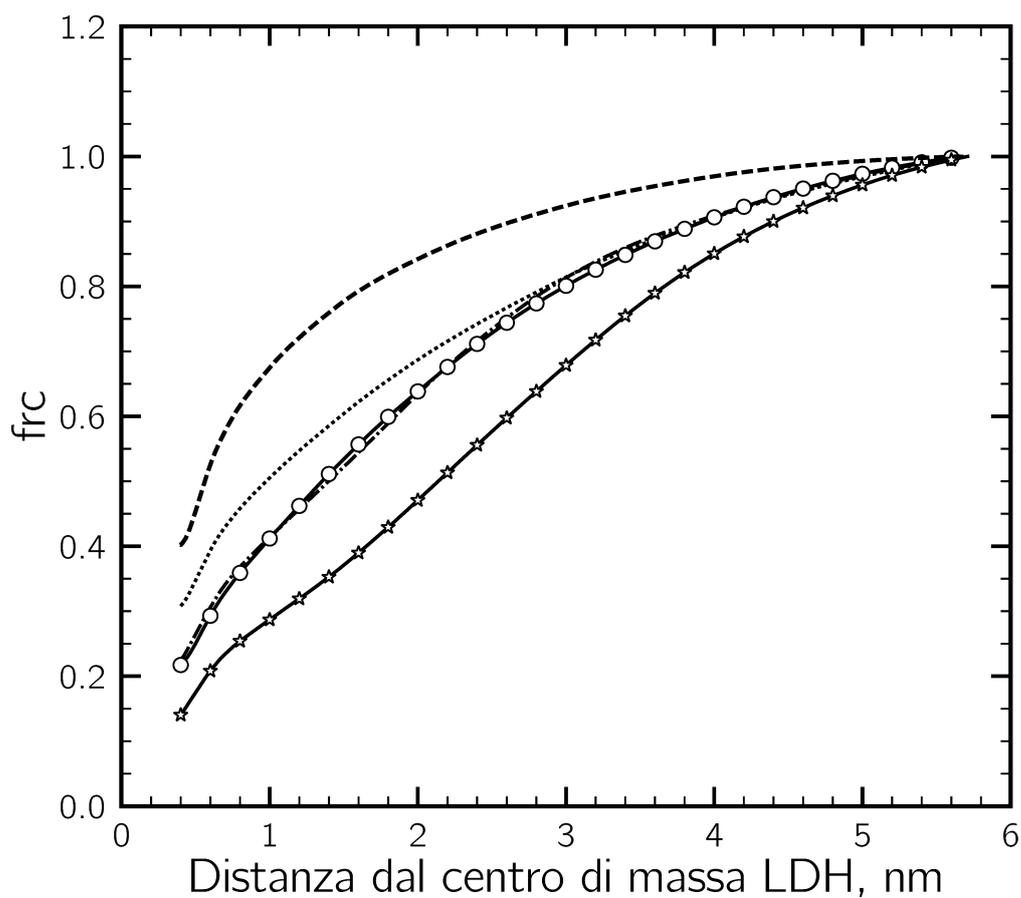


Figura 4.12: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: — — — trealosio; - - - β -ciclodestrina+cellobiosio; — - — β -ciclodestrina+saccarosio; \circ β -ciclodestrina+trealosio; \star γ -ciclodestrina.

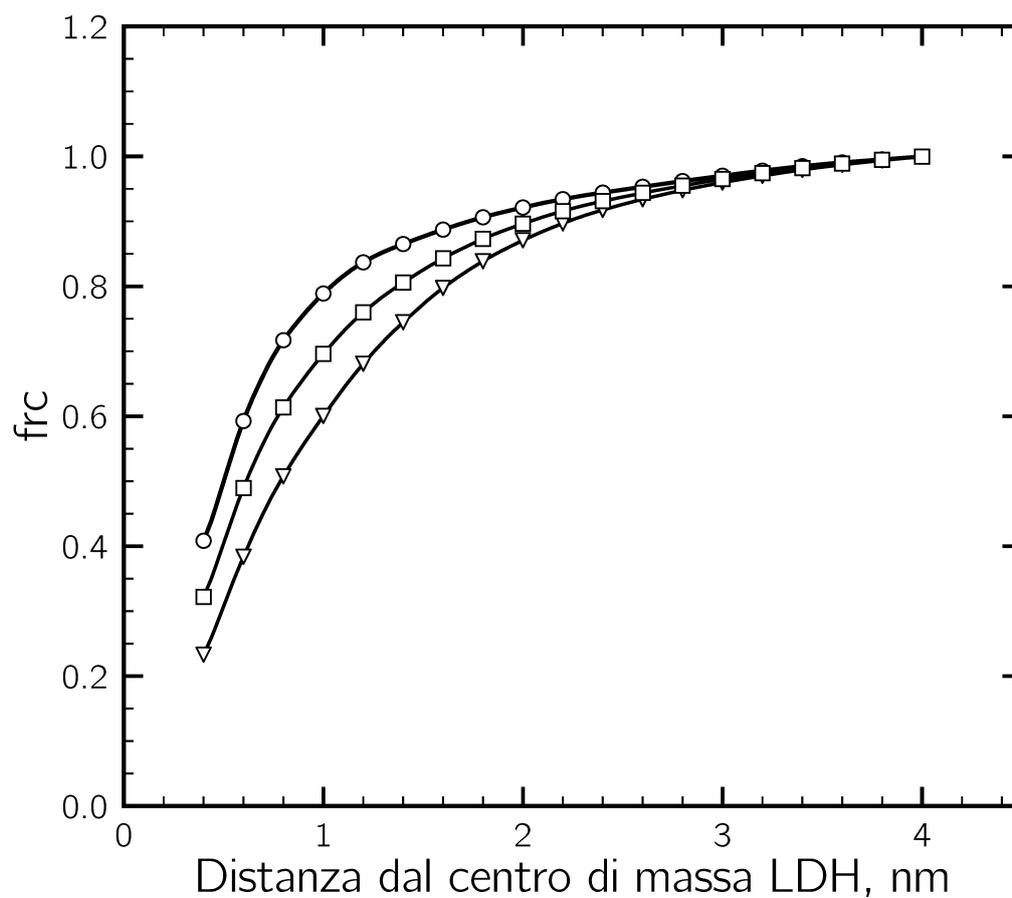


Figura 4.13: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: ○ trealosio; □ β -ciclodestrina+trealosio; ▷ β -ciclodestrina.

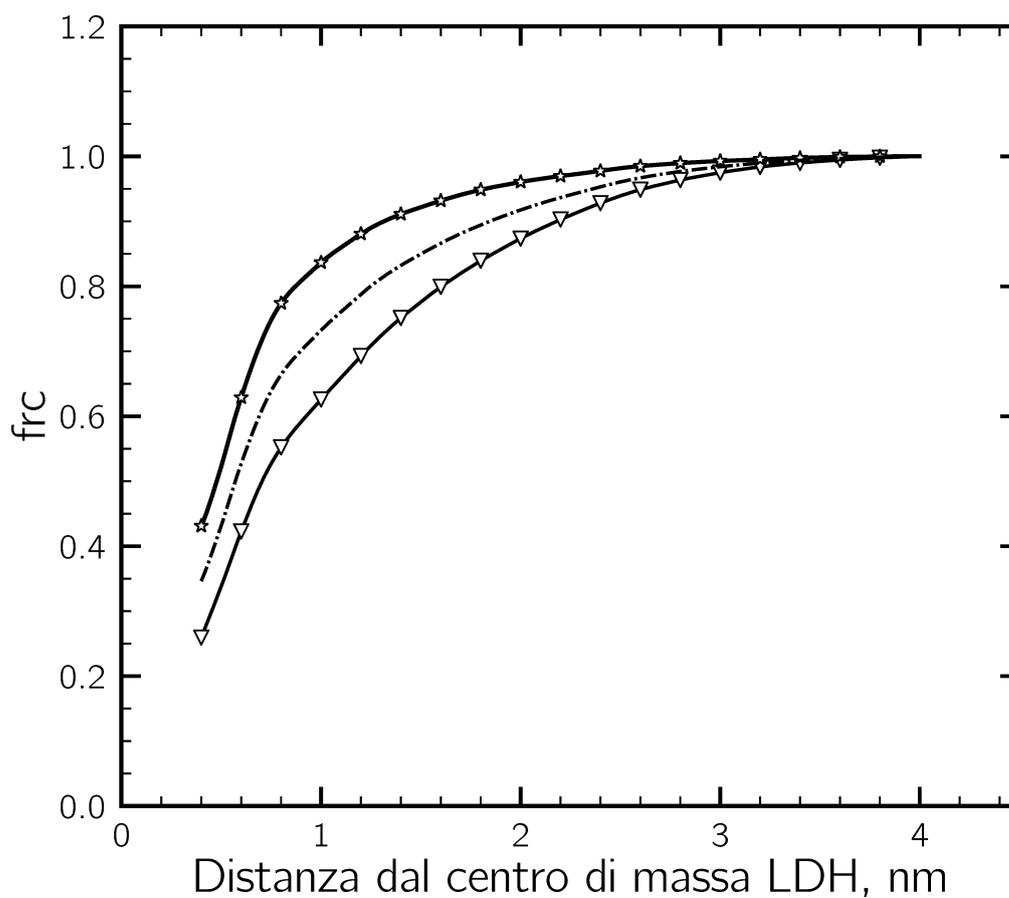


Figura 4.14: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: ☆ saccarosio; — · — β-ciclodestrina+saccarosio; ▷ β-ciclodestrina.

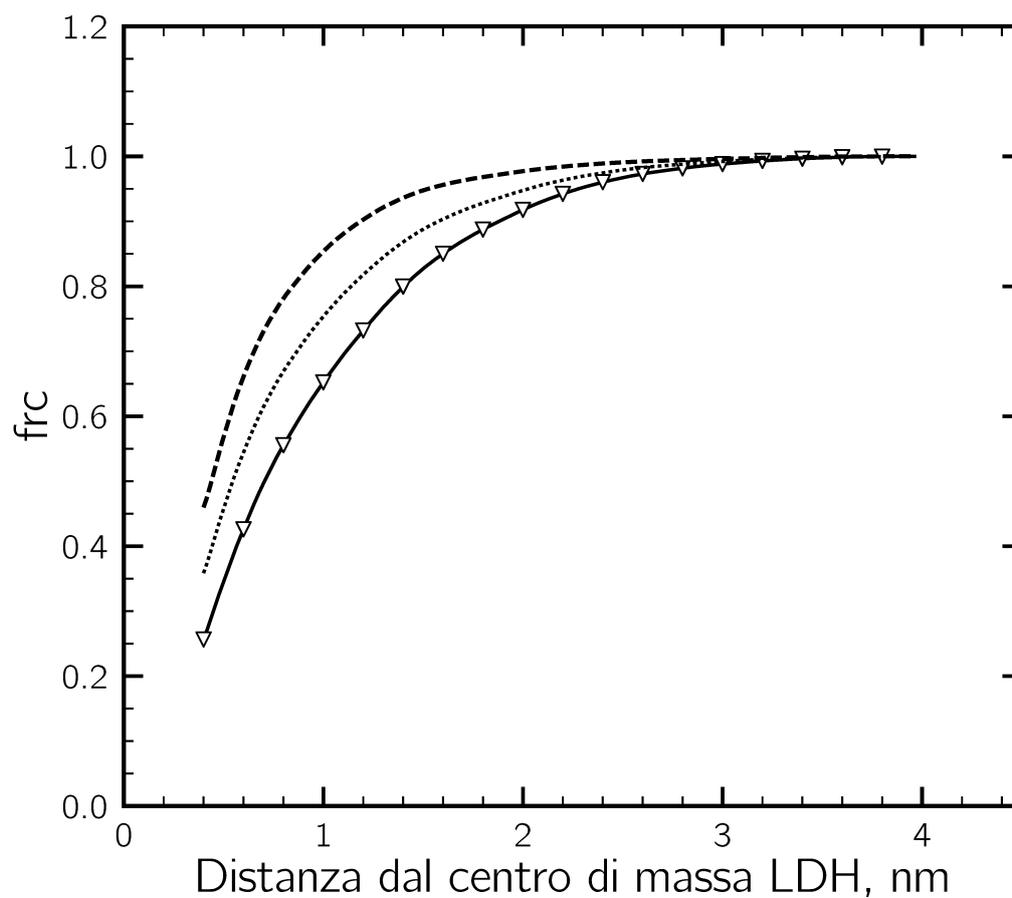


Figura 4.15: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: — — — saccharosio; - - - β -ciclodestrina+cellobiosio; \triangleright β -ciclodestrina.

ciante e il medesimo sistema con, invece, due componenti nel ruolo di stabilizzatori proteici. In Figure 4.16, 4.17 e 4.18 si notano i risultati di tale studio. Tutti e tre i grafici mostrano, ancora una volta, il medesimo comportamento e sono soggetti, quindi, alle stesse considerazioni.

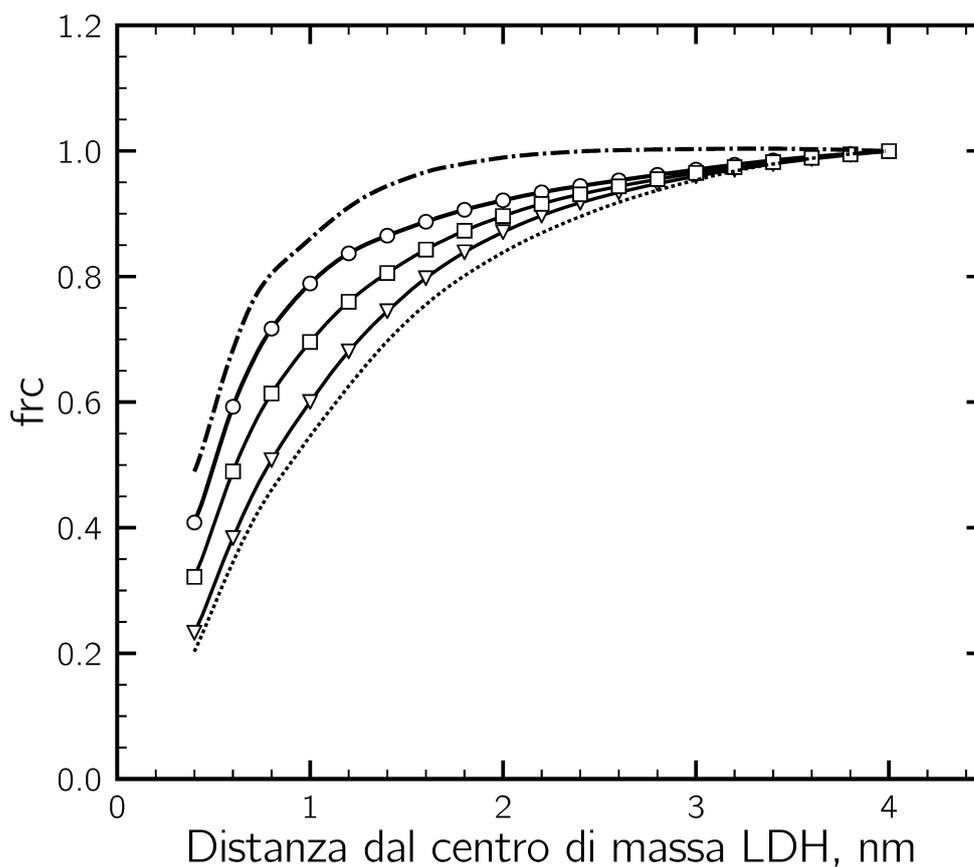


Figura 4.16: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: — - — trealosio singolo; ○ trealosio doppio; □ β -ciclodestrina+trealosio; - - - β -ciclodestrina singola; ▷ β -ciclodestrina doppia.

Dalla lettura dei grafici emergono i seguenti punti:

- la β -ciclodestrina, inserita singolarmente all'interno del sistema, presenta un grado di esclusione preferenziale superiore rispetto a quella collocata in un sistema contenente anche un disaccaride. Tale comportamento differisce con quanto visto in fase di congelamento.
- tutti i disaccaridi mostrano lo stesso comportamento descritto per la fase di congelamento.

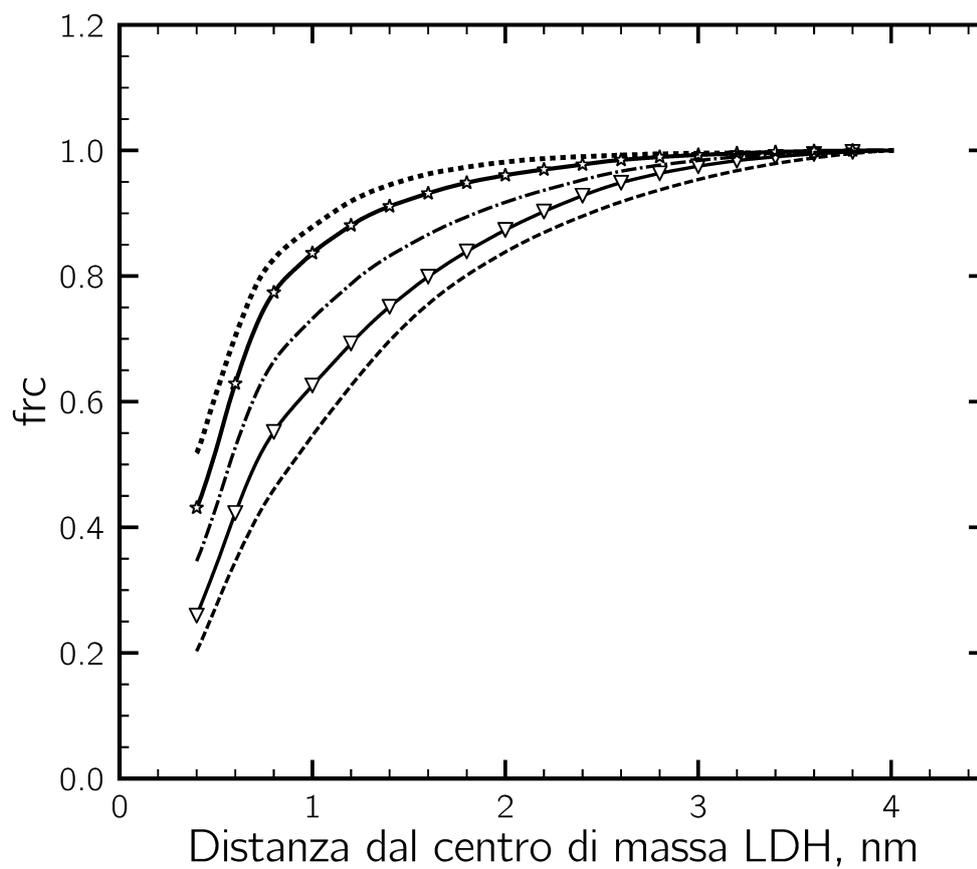


Figura 4.17: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: - - - saccharosio singolo; ☆ saccharosio doppio; - - - β -ciclodestrina+saccarosio; - - - β -ciclodestrina singola; ▷ β -ciclodestrina doppia.

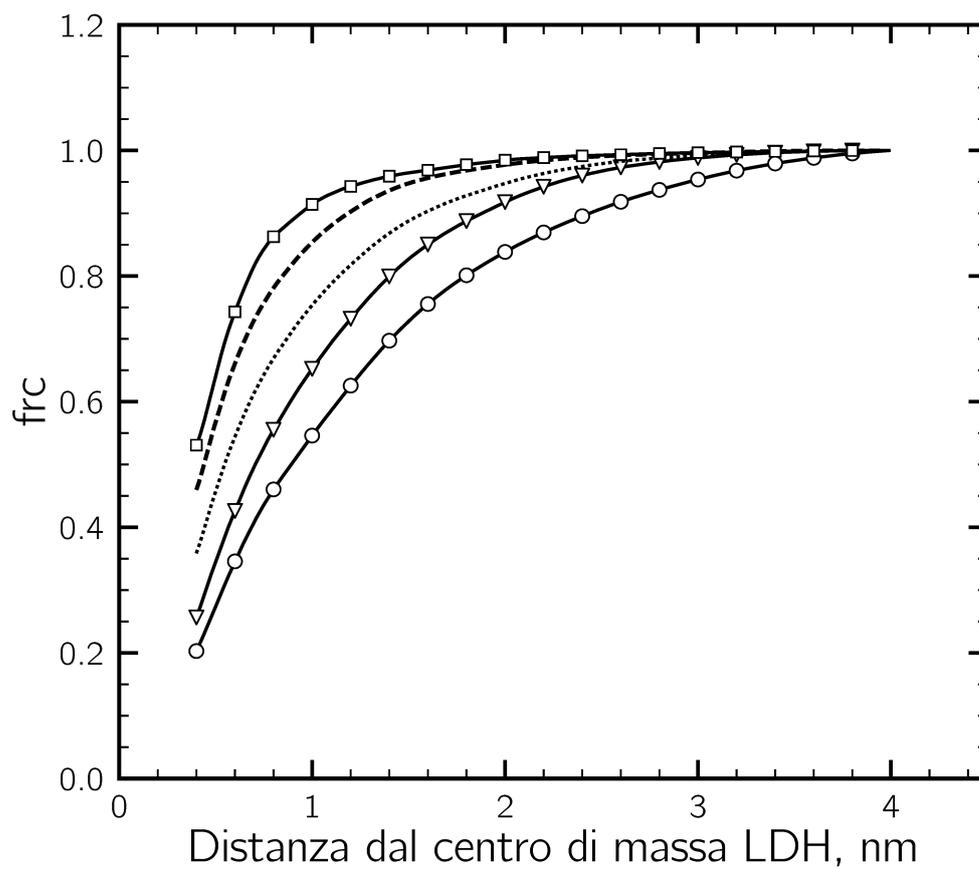


Figura 4.18: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: □ cellobiosio singolo; — — — cellobiosio doppio; - - - β-ciclodestrina+cellobiosio; ○ β-ciclodestrina singola; ▷ β-ciclodestrina doppia.

In fase di essiccamento, quindi, si nota come la presenza della β -ciclodestrina giovi al disaccaride presente, incrementando le sue prestazioni in termini di esclusione preferenziale, ma non è vero il contrario.

Confronto simulazione a singolo e doppio eccipiente in fase di essiccamento

È stato, infine, effettuato un confronto tra i sistemi contenenti gli eccipienti che mostravano le migliori e le peggiori prestazioni in termini di esclusione preferenziale (Figura 4.4) e le formulazioni con eccipienti multipli. In Figura 4.19 viene diagrammato quanto appena esposto. L'eccipiente "peggiore" in fase di essiccamento è il mannitolo, mentre il "migliore" è sempre la γ -ciclodestrina.

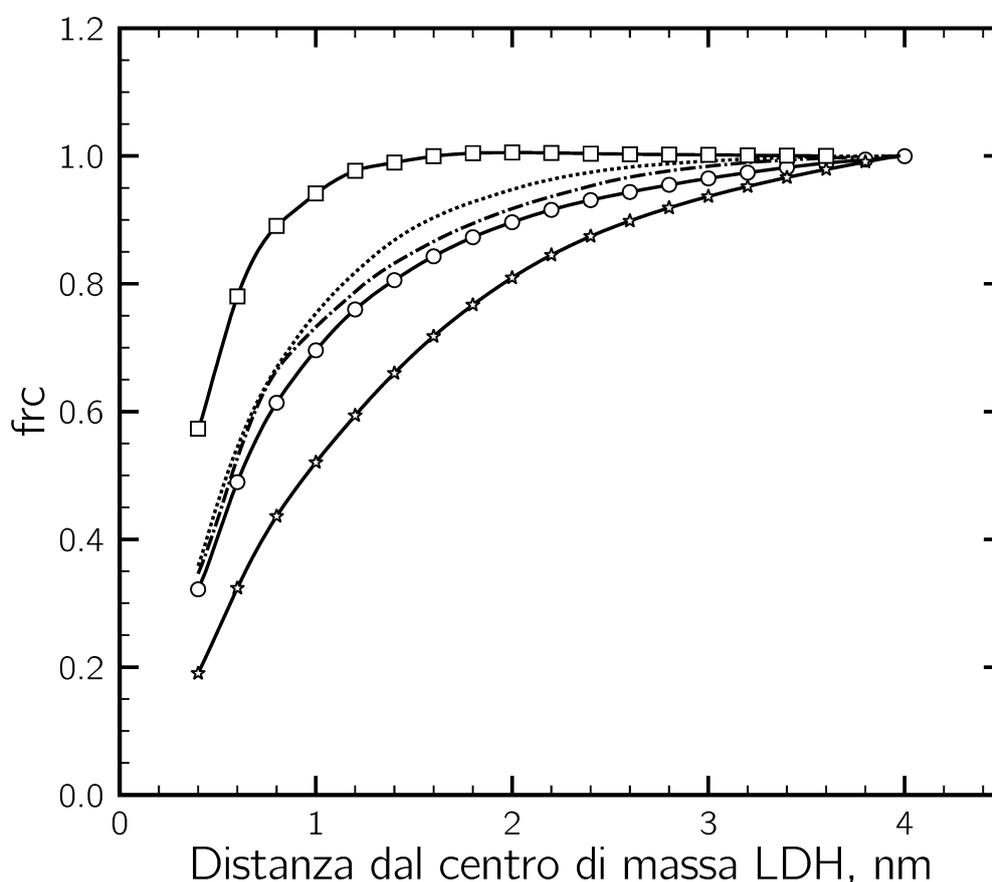


Figura 4.19: Grafico rappresentante i risultati relativi alla valutazione dell'esclusione preferenziale in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente doppio: □ mannitolo; - - - β -ciclodestrina+cellobiosio; - · - β -ciclodestrina+saccarosio; ○ β -ciclodestrina+trealosio; ☆ γ -ciclodestrina.

Il comportamento evidenziato in Figura 4.19 è il medesimo visto in precedenza per la fase di congelamento. Alla luce di tutte le analisi condotte si può sostenere che:

- i disaccaridi accoppiati con la β -ciclodestrina migliorano le loro prestazioni in termini di esclusione preferenziale;
- la β -ciclodestrina, in un sistema con eccipienti multipli, evidenzia un grado di esclusione preferenziale inferiore rispetto ad una formulazione dove tale eccipiente è presente in maniera solitaria;
- il sistema complessivo mostra una leggera perdita in termini di efficacia rispetto ad una formulazione contenente esclusivamente la β -ciclodestrina.

È buona norma ricordare sempre quanto espresso nella Sezione 4.1. Durante la fase di essiccamento, infatti, non è estremamente importante che gli eccipienti utilizzati abbiano un elevato grado di esclusione preferenziale. Tuttavia, in base a quanto emerso dallo studio effettuato, mediamente le formulazioni migliori come esclusione preferenziale in fase di congelamento mostrano un comportamento simile in fase di essiccamento. Quindi, nel momento in cui bisogna imbastire una formulazione con gli eccipienti migliori in termini di esclusione preferenziale, ci si può concentrare sulla scelta dei crio-protettori più efficaci secondo tale meccanismo.

4.4 Water replacement

Il meccanismo di water replacement prevede la formazione di legami ad idrogeno proteina-eccipiente, utili a preservare la struttura nativa della proteina durante la liofilizzazione. Come evidenziato nella Sezione 4.1, in letteratura si cita frequentemente l'importanza di tale meccanismo in fase di essiccamento, ovvero nel momento in cui lo strato d'idratazione attorno al principio attivo viene rimosso. Tuttavia, come accaduto per l'esclusione preferenziale, viene riportata la stima di tale meccanismo anche in fase di congelamento, in modo da avere dei riscontri basati su simulazioni di Dinamica Molecolare di quanto espresso in letteratura.

4.4.1 Eccipiente singolo in fase di congelamento

In Tabella 4.3 e in Figura 4.20 viene riportata la stima della frazione di legami idrogeno χ in fase di congelamento, calcolata come esposto nel Capitolo 3.

Dall'analisi della Figura 4.20 si evidenziano i seguenti punti:

- le ciclodestrine presentano un valore di χ inferiore rispetto a tutti gli altri eccipienti;
- tra i disaccaridi, il cellobiosio mostra le migliori prestazioni in termini di water replacement;

Tabella 4.3: *Frazione di legami idrogeno (χ) in fase di congelamento.*

Eccipiente	χ , %
Trealosio	6.897
Saccarosio	6.114
Mannitolo	11.739
Istidina	6.828
β -ciclodestrina	1.421
γ -ciclodestrina	0.943
Cellobiosio	6.941

- mannitolo ed istidina fanno riscontrare valori molto elevati di χ ; in particolare il mannitolo è quello che presenta il valore più elevato di tale parametro.

Dalla lettura di quanto riportato in Figura 4.20, emerge immediatamente la veridicità e la coerenza di quanto dimostrato in letteratura. La frazione di legami idrogeno, valutata in fase di congelamento, infatti, presenta un valore del parametro χ molto basso. Ciò significa che, mediamente, in questa fase del processo di liofilizzazione, i legami proteina-eccipiente sono pochi e non molto rilevanti nella stabilizzazione del principio attivo. Come precedentemente esposto, questo accade per la presenza, intorno alla superficie del LDH, di uno strato di solvente, il quale verrà eliminato nella successiva fase di essiccamento. Inoltre, si può ipotizzare che il motivo per cui mannitolo ed istidina presentino un valore di χ così elevato possa essere legato al fenomeno dell'esclusione preferenziale: in Figura 4.3 si è visto come entrambi tali eccipienti non diano esclusione preferenziale in fase di congelamento. Quindi, risulta più agevole per tali componenti trovarsi in prossimità della superficie della proteina ed instaurare dei legami con i suoi gruppi polari liberi.

4.4.2 Eccipiente singolo in fase di essiccamento

In Tabella 4.4 e in Figura 4.21 viene riportata la stima della frazione di legami idrogeno χ in fase di essiccamento.

Dall'analisi effettuata emergono i seguenti punti:

- le ciclodestrine presentano il valore più basso di χ anche in fase di essiccamento. In particolare, la γ -ciclodestrina ha un valore di χ superiore alla β -ciclodestrina per via dei maggiori gruppi -OH esposti dalla molecola in superficie;
- il cellobiosio è il disaccaride che evidenzia il più elevato numero di legami ad idrogeno con LDH. Ciò testimonia ulteriormente le sue interessanti caratteristiche nella stabilizzazione di tale enzima;

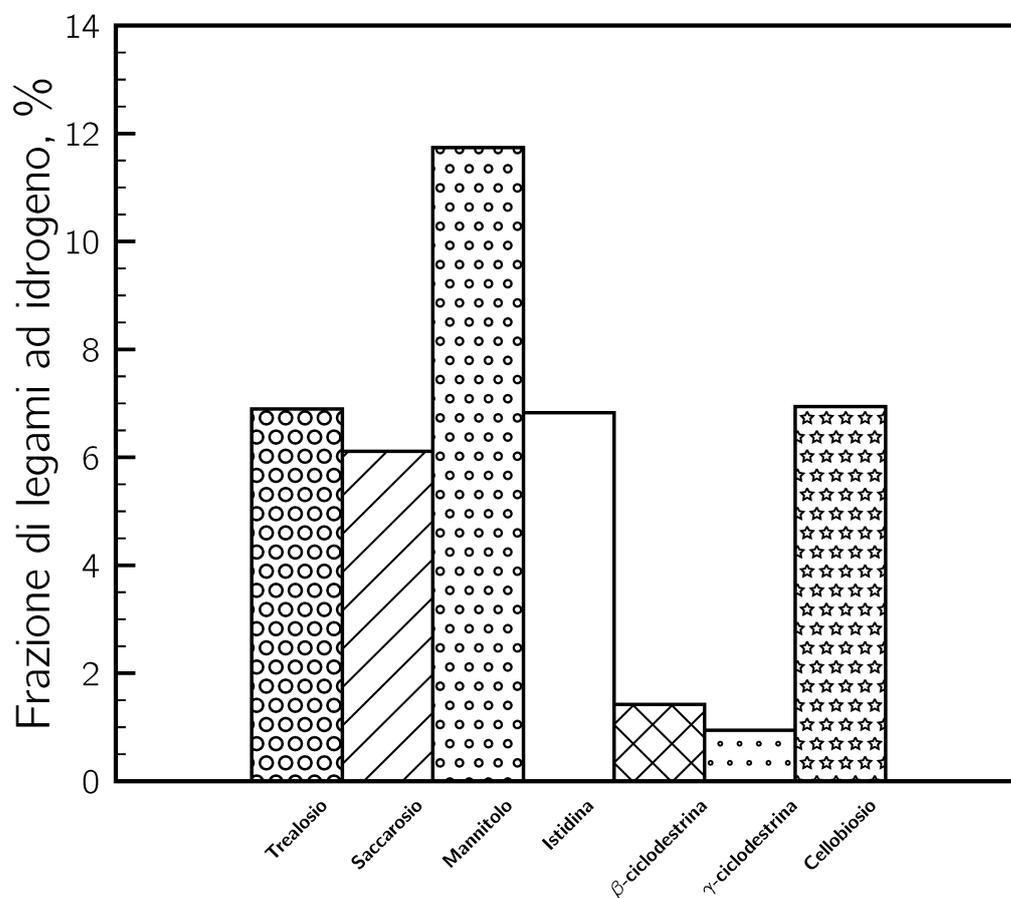


Figura 4.20: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della frazione di legami idrogeno in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente singolo.

Tabella 4.4: Frazione di legami idrogeno (χ) in fase di essiccaamento.

Eccipiente	χ , %
Trealosio	63.736
Saccarosio	64.804
Mannitolo	58.525
Istidina	59.639
β -ciclodestrina	30.435
γ -ciclodestrina	30.811
Cellobiosio	67.816

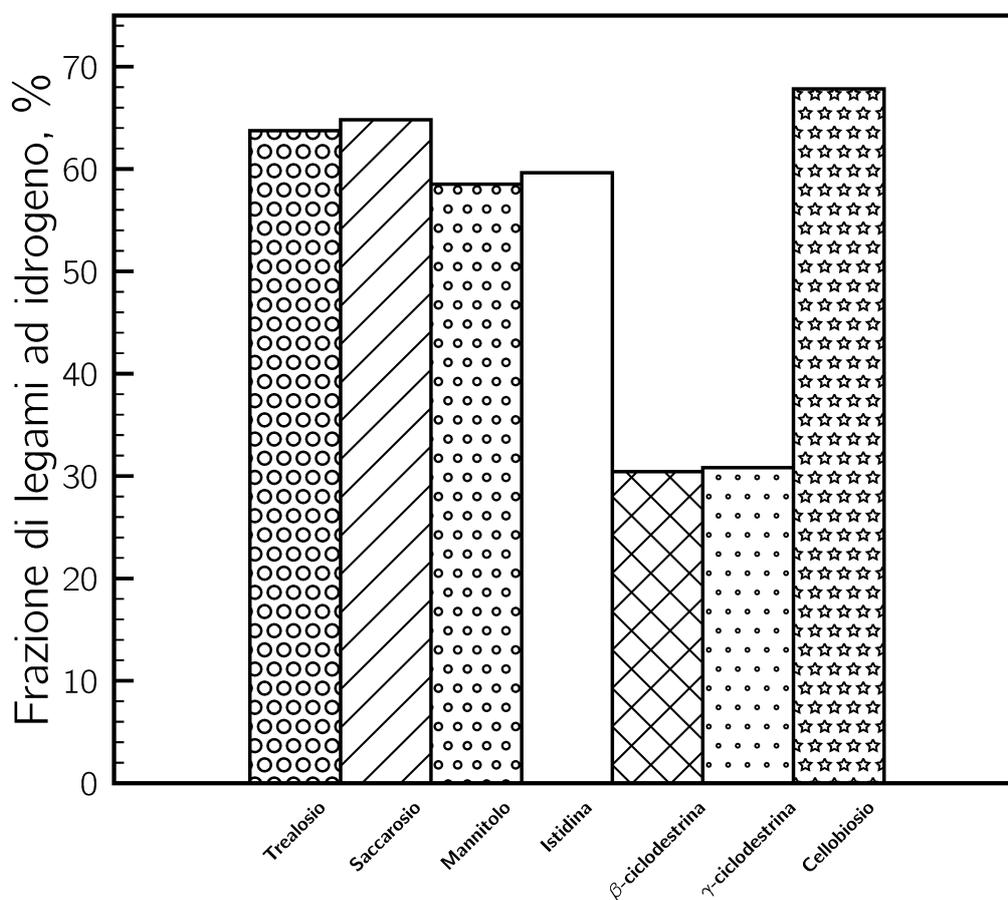


Figura 4.21: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della frazione di legami idrogeno in fase di essiccazione per le simulazioni ad eccipiente singolo.

- mannitolo ed istidina hanno valori di χ meno elevati rispetto a tutti i disaccaridi, diversamente da quanto visto in precedenza.

Scendendo più nel particolare, il saccarosio fa riscontrare un valore più elevato di χ rispetto al trealosio. Ciò è in linea con quanto riportato in letteratura, ad esempio nel lavoro di Allison [59]. Nello studio di Al Hussein [56], invece, viene analizzato il comportamento di un sistema costituito da mannitolo o saccarosio durante il processo di liofilizzazione. Dai risultati sperimentali ottenuti, a parità di concentrazione all'interno del sistema, traspare una netta differenza di efficacia, con il saccarosio notevolmente superiore. Tale evidenza è in accordo con quanto riscontrato mediante GROMACS: il saccarosio, infatti, presenta un grado di esclusione preferenziale e un water replacement considerevolmente più elevati rispetto al mannitolo, comportandosi meglio sia come crio-protettore sia come lio-protettore. Si comincia ora a comprendere il motivo per cui, nelle simulazioni con

eccipienti multipli, la scelta è ricaduta sulla β -ciclodestrina e sui disaccaridi. Le ciclodestrine, infatti, sono quelle che presentano le migliori prestazioni nel ruolo di crio-protettori, mentre, alla luce di quanto emerso in Figura 4.21, i disaccaridi svolgono un ruolo da protagonisti nella veste di lio-protettori. In particolare il cellobiosio evidenzia delle caratteristiche molto interessanti in tal senso, in quanto riesce a formare un numero elevato di legami ad idrogeno con i gruppi superficiali proteici.

4.4.3 Eccipienti multipli

Nelle Tabelle 4.5, 4.6 e nelle Figure 4.22, 4.23 viene riportata la valutazione della frazione di legami ad idrogeno per i sistemi con eccipienti multipli; in questo caso, il parametro χ viene così stimato:

$$\chi = \frac{H_{\beta\text{-ciclodestrina}} + H_{\text{disaccaride}}}{H_{\beta\text{-ciclodestrina}} + H_{\text{disaccaride}} + H_{\text{acqua}}}, \quad (4.3)$$

dove $H_{\beta\text{-ciclodestrina}}$, $H_{\text{disaccaride}}$ e H_{acqua} sono il numero di legami ad idrogeno con la proteina di β -ciclodestrina, del disaccaride e del solvente acquoso.

Tabella 4.5: Valutazione della frazione di legami idrogeno (χ) in fase di congelamento per simulazioni ad eccipienti multipli.

Eccipiente	χ , %
β -ciclodestrina+Trealosio	2.77
β -ciclodestrina+Saccarosio	3.23
β -ciclodestrina+Cellobiosio	4.34

Tabella 4.6: Valutazione della frazione di legami idrogeno (χ) in fase di essiccamento per simulazioni ad eccipienti multipli.

Eccipiente	χ , %
β -ciclodestrina+Trealosio	51.43
β -ciclodestrina+Saccarosio	53.85
β -ciclodestrina+Cellobiosio	57.40

Risulta evidente come sia in fase di congelamento, sia in fase di essiccamento l'andamento degli istogrammi in Figure 4.22 e 4.23 sia il medesimo; il sistema avente come eccipienti la β -ciclodestrina e il cellobiosio è il migliore in termini di water replacement.

Tuttavia, anche in questo caso, occorre confrontare i risultati ottenuti per i sistemi con due eccipienti con quelli ad eccipiente singolo, per comprendere più nel

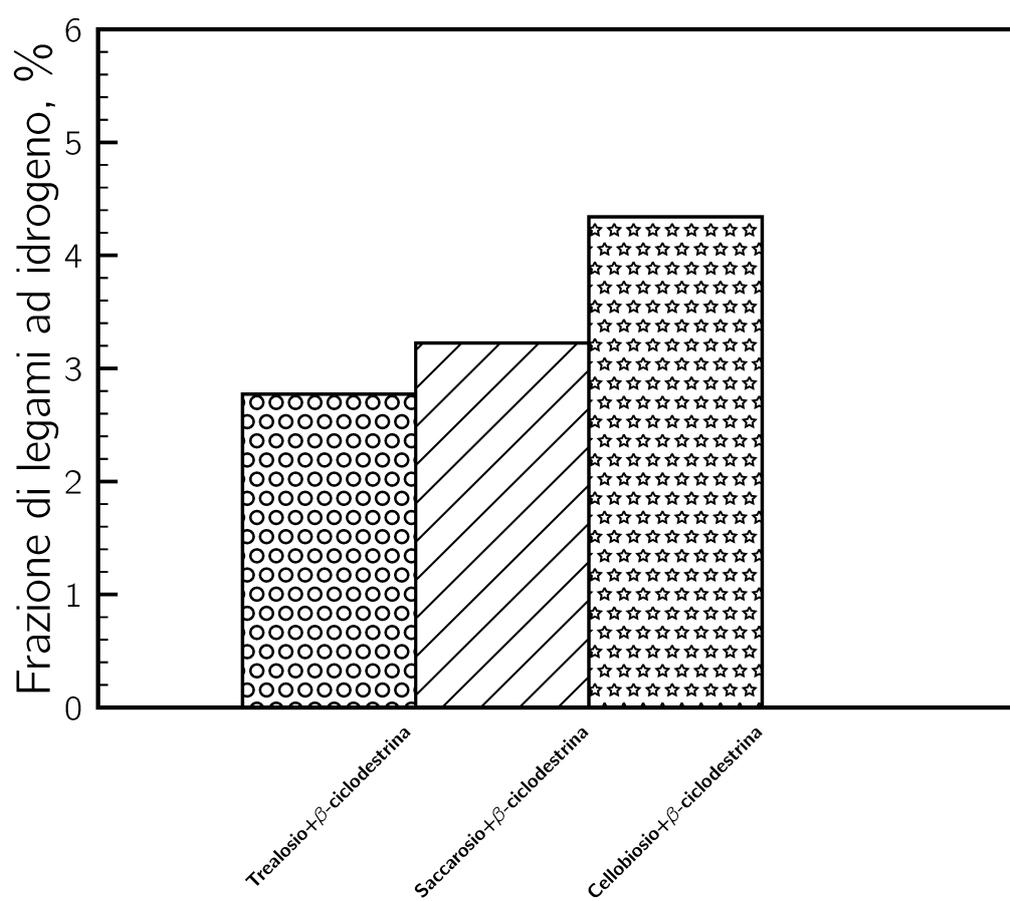


Figura 4.22: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della frazione di legami idrogeno in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente doppio.

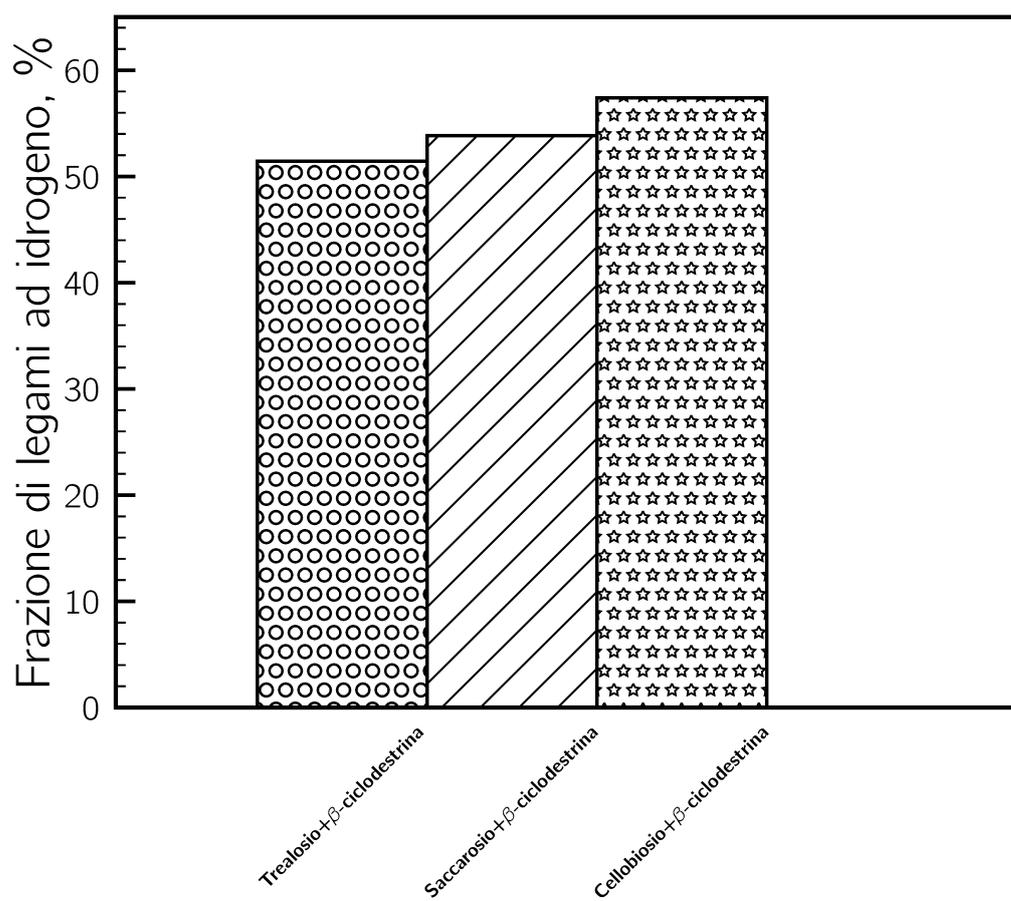


Figura 4.23: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della frazione di legami idrogeno in fase di essiccazione per le simulazioni ad eccipiente doppio.

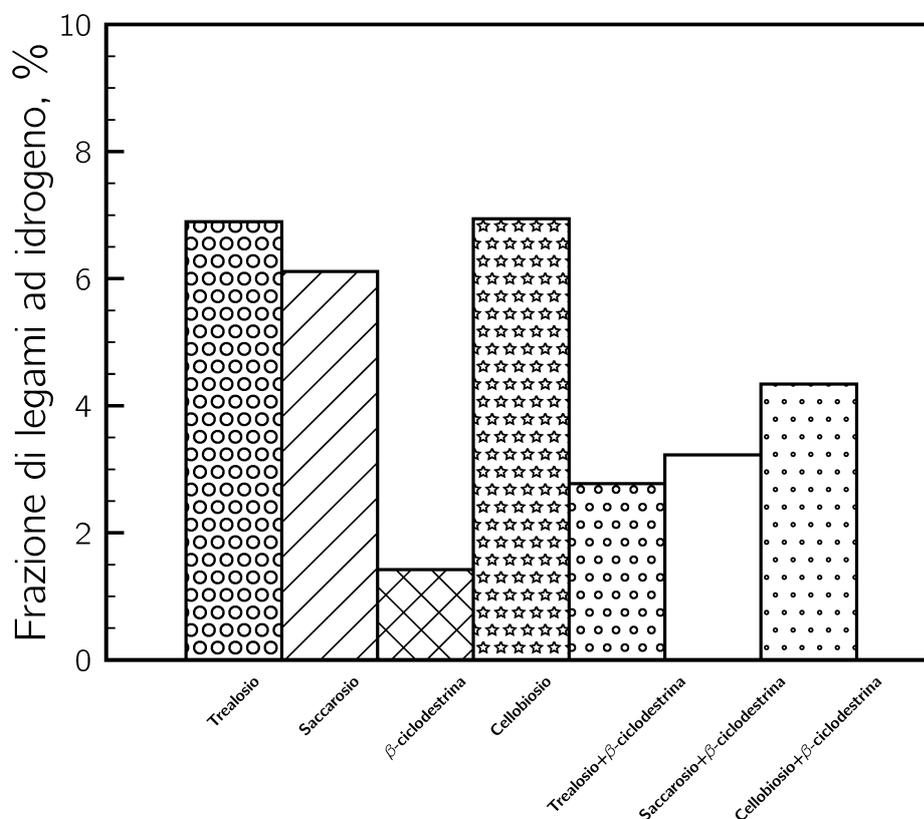


Figura 4.24: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della frazione di legami idrogeno in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente singolo e doppio.

dettaglio l'effetto sinergico tra le molecole presenti nel sistema. In Figure 4.24 e 4.25 è diagrammato il parametro χ in sistemi con eccipienti singolo e doppio. Le considerazioni in fase di congelamento ed essiccamento sono le stesse: in entrambi i casi, infatti, la presenza della β -ciclodestrina porta ad una riduzione del parametro χ per ciascun disaccaride presente. Quindi, il beneficio di aggiungere la β -ciclodestrina ad un sistema in cui è già presente un disaccaride consiste nell'aumentare la stabilità della formulazione in fase di congelamento, abbassandone di conseguenza le prestazioni in fase di essiccamento, seppur leggermente. Dal momento che LDH è un enzima molto sensibile al congelamento, questa potrebbe rilevarsi la scelta più strategica e congeniale nel mantenimento della sua attività biologica.

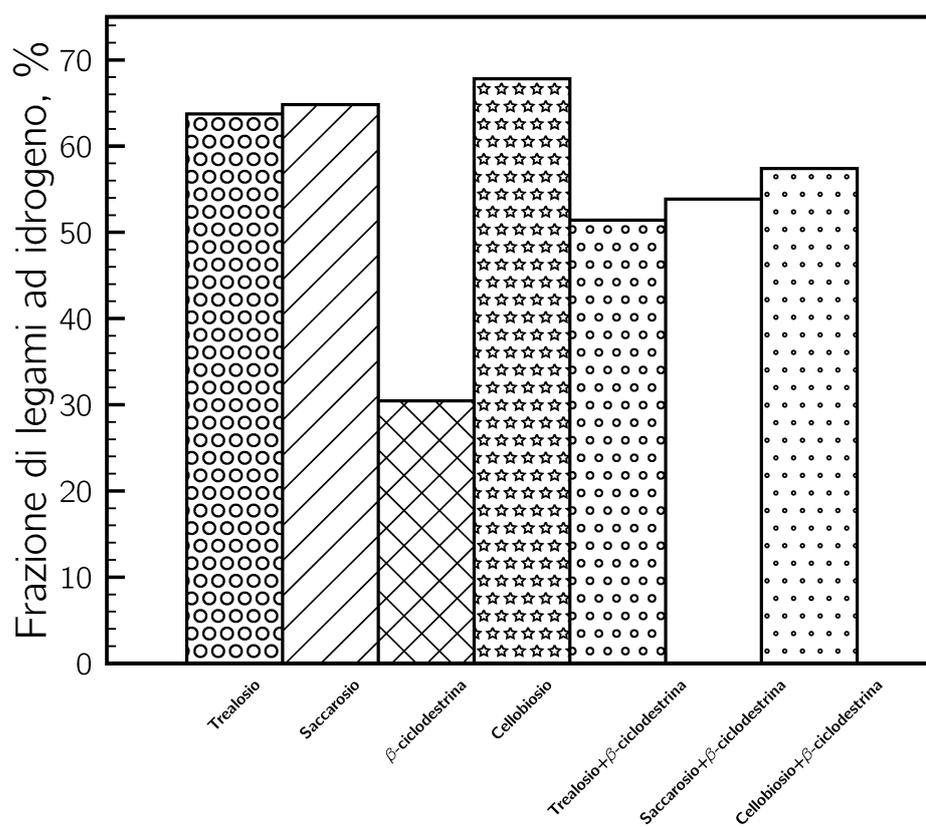


Figura 4.25: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della frazione di legami idrogeno in fase di essiccamento per le simulazioni ad eccipiente singolo e doppio.

4.5 Indice di vetrificazione

Tale meccanismo di protezione afferma che, finché la proteina rimane dispersa all'interno dello stabilizzatore amorfo, il quale è molto viscoso e si comporta come un vetro, la sua mobilità risulta limitata. A causa di questo "microambiente viscoso" attorno alla proteina, i movimenti saranno bloccati e la velocità dei mutamenti conformazionali sarà ridotta notevolmente. Quindi, la formazione di questa struttura amorfo-vetrosa aiuta il principio attivo a non incorrere in degradazioni fisiche o chimiche. Tale teoria trova fondamento in studi di letteratura di numerosi autori (Iwai [43], Wang [26], Kawai [55]), i quali fanno notare come uno dei parametri più significativi per questo tipo di analisi sia la temperatura di transizione vetrosa (T'_g) dello stabilizzatore, in quanto al di sopra di T'_g il sistema assume lo stato di un "liquido gommoso". Da quanto appena esposto, risulta evidente che più elevata è la temperatura di transizione vetrosa di un componente, migliore sarà la sua azione come stabilizzatore, in accordo con il meccanismo di protezione appena presentato. È utile rammentare che T'_g dipende da:

- la storia termica del sistema analizzato;
- l'umidità residua all'interno del volume di controllo dopo la fase di essiccamento.

L'ipotesi della vetrificazione gioca un ruolo importante sia in fase di congelamento, sia in fase di essiccamento e, nel presente lavoro, viene stimata calcolando il valore di viscosità del sistema. In particolare:

- in fase di congelamento occorre evitare la cristallizzazione degli eccipienti adoperati in modo da permettere la formazione di una struttura amorfa che limiti i movimenti della proteina;
- in fase di essiccamento bisogna avere degli eccipienti la cui T'_g risulti inferiore alla temperatura di lavoro nell'ottica di evitare la formazione di uno stato simile ad un "liquido gommoso".

4.5.1 Viscosità in fase di congelamento

In Tabella 4.7 e in Figura 4.26 viene riportata la stima della viscosità η in fase di congelamento, per i sistemi con eccipiente singolo.

Dall'analisi dell'istogramma in Figura 4.26 emergono i seguenti punti:

- il sistema contenente il cellobiosio mostra il valore di viscosità più elevato;
- il sistema con la β -ciclodestrina presenta un valore di η lievemente maggiore di quello con la γ -ciclodestrina;
- il sistema con all'interno il trealosio evidenzia una viscosità inferiore a quello contenente il cellobiosio, ma superiore rispetto a quello avente come eccipiente il saccarosio;

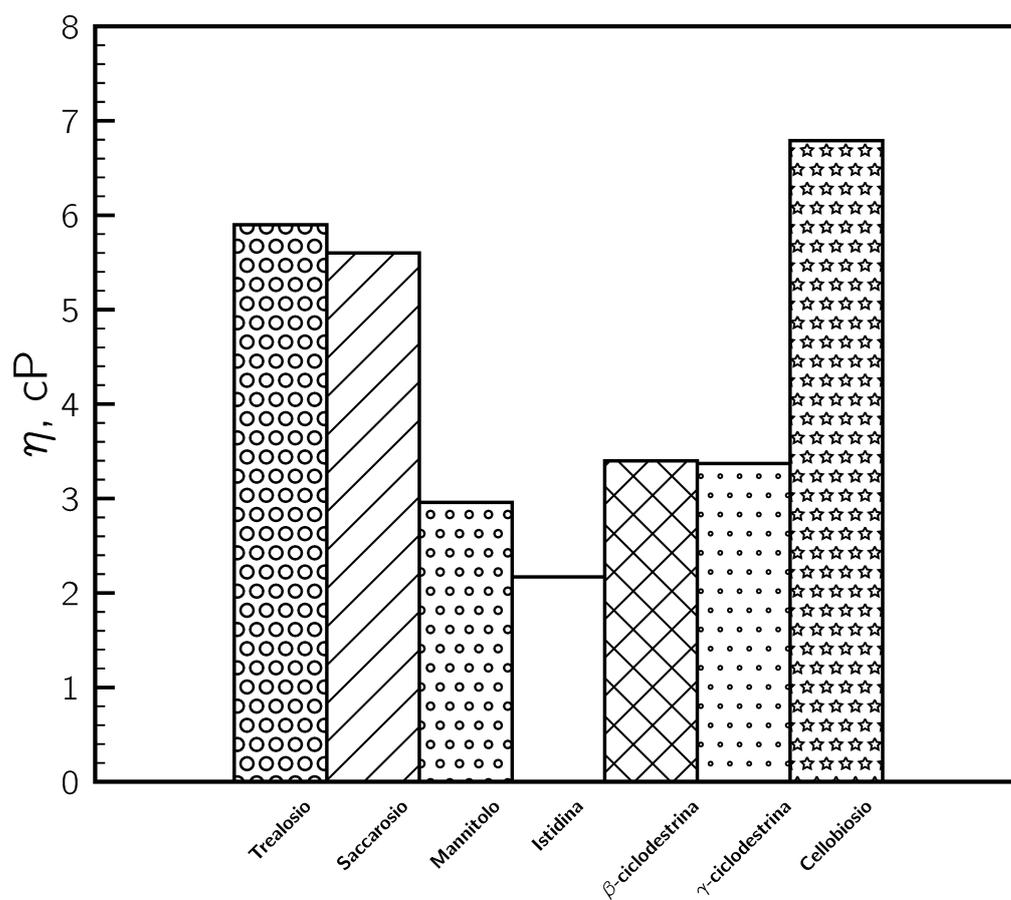


Figura 4.26: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della viscosità in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente singolo.

Tabella 4.7: Viscosità (η) in fase di congelamento per simulazioni a singolo eccipiente.

Eccipiente	η , cP
Trealosio	5.9
Saccarosio	5.6
Mannitolo	2.96
Istidina	2.17
β -ciclodestrina	3.4
γ -ciclodestrina	3.37
Cellobiosio	6.79

- mannitolo e istidina rappresentano gli eccipienti che conferiscono al volume di controllo il valore di η più basso.

La valutazione dei risultati viene interpretata sulla base dei seguenti criteri, i quali sono applicabili anche per le altre analisi che verranno riportate in seguito:

- a parità di rapporto in peso, presenta una viscosità più elevata il sistema avente un rapporto molare più alto e quindi un maggior numero di molecole presenti in soluzione;
- a parità di rapporto molare, presenta una viscosità più elevata il sistema contenente eccipienti con peso molecolare più elevato.

In base a quanto esposto nel Capitolo 3, per saccarosio, trealosio, cellobiosio, mannitolo ed istidina sono state inserite all'interno della box di simulazione un numero di molecole uguali, in modo da poter confrontare le prestazioni di tali eccipienti in condizioni di uguale rapporto molare; mentre per la β -ciclodestrina e la γ -ciclodestrina è stato eseguito un calcolo proporzionale, nell'ottica di riprodurre lo stesso rapporto in peso (1%(w/w)) utilizzato da Iwai [43] nel suo studio, prendendo come riferimento la molecola di saccarosio. I risultati ottenuti rispettano, quindi, i criteri sopra esposti. In particolare:

- saccarosio, trealosio e cellobiosio hanno lo stesso valore di massa molecolare; molto verosimilmente la differenza di viscosità presente tra questi eccipienti è relazionata ad alcuni parametri molecolari e di ingombro sterico, specifici del componente.
- mannitolo ed istidina, i quali sono presenti in ugual rapporto molare con i disaccaridi, hanno un valore di η inferiore, in quanto hanno un minor peso atomico.
- β -ciclodestrina e γ -ciclodestrina sono state inserite all'interno del sistema con lo stesso rapporto in peso rispetto ai disaccaridi; risulta quindi coerente,

dal momento che evidenziano una massa molecolare di un ordine di grandezza superiore a saccarosio, trealosio e cellobiosio, che presentino un valore di viscosità più basso di questi ultimi.

Quanto appena stimato, permette di compiere qualche osservazione su quanto affermato precedentemente: come più volte ripetuto nel capitolo introduttivo, bisogna evitare la cristallizzazione degli eccipienti in fase di congelamento, in modo da permettere la formazione di uno strato amorfo vetroso che salvaguardi l'attività proteica. Si era visto che negli studi di Nema e Avis [42] e Kawai e Suzuki [55] il saccarosio mostrava dei risultati migliori del trealosio, come crio-protettore del LDH. Ciò veniva spiegato in base al meccanismo di esclusione preferenziale; tuttavia la soluzione con il trealosio presenta un valore di viscosità superiore rispetto a quella con il saccarosio, ma siccome la discrepanza è solamente di 0.3 cP, si può tranquillamente assumere che la struttura amorfa formata da tali eccipienti sia la medesima dal punto di vista della viscosità.

Ora viene analizzato il comportamento con due eccipienti. In Tabella 4.8 viene riportata la stima della viscosità η in fase di congelamento, per i sistemi con eccipienti multipli. Dai valori di η riportati in Tabella 4.8 si nota come i sistemi a

Tabella 4.8: Viscosità (η) in fase di congelamento per simulazioni ad eccipienti multipli.

Eccipiente	η , cP
β -ciclodestrina+Trealosio	4.21
β -ciclodestrina+Saccarosio	3.98
β -ciclodestrina+Cellobiosio	5.08

due eccipienti presentano una viscosità che rispetta quanto visto in precedenza in merito a saccarosio, trealosio e cellobiosio. In Figura 4.27 si attua un confronto di tali risultati con quelli in Figura 4.26.

Quanto mostrato nell'istogramma in Figura 4.27 è in linea con il criterio precedentemente enunciato. Infatti, tutte le formulazioni presenti in Figura 4.27 sono state imbastite con il medesimo rapporto in peso (1%w/w), quindi risultano avere viscosità più elevata quelle che presentano un numero di molecole maggiore in soluzione.

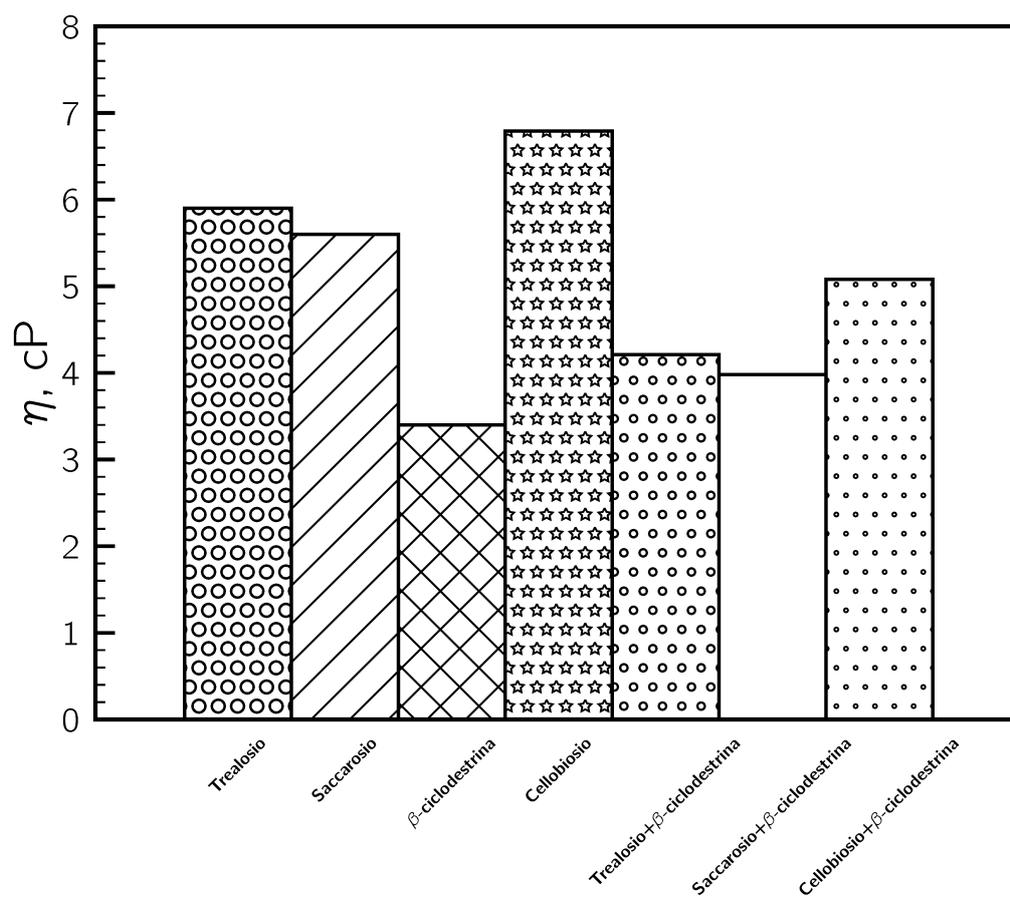


Figura 4.27: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della viscosità in fase di congelamento per le simulazioni ad eccipiente singolo e doppio.

4.5.2 Viscosità in fase di essiccamento

In Tabella 4.9 e in Figura 4.28 viene riportata la stima della viscosità η in fase di essiccamento, per i sistemi con eccipiente singolo.

Tabella 4.9: Viscosità (η) in fase di essiccamento per simulazioni a singolo eccipiente.

Eccipiente	η , cP
Trealosio	564
Saccarosio	519
Mannitolo	86
Istidina	74
β -ciclodestrina	312
γ -ciclodestrina	305
Cellobiosio	735

I risultati mostrati nell'istogramma in Figura 4.28 confermano quanto detto; gli eccipienti che presentavano le migliori prestazioni in fase di congelamento sono i medesimi che mostrano una notevole efficacia anche in fase di essiccamento. Lo stesso discorso vale anche per le simulazioni con eccipienti multipli, come raffigurato in Tabella 4.10 e in Figura 4.29.

Tabella 4.10: Viscosità (η) in fase di essiccamento per simulazioni ad eccipienti multipli.

Eccipiente	η , cP
β -ciclodestrina+Trealosio	370
β -ciclodestrina+Saccarosio	338
β -ciclodestrina+Cellobiosio	433

4.5.3 Variazione di viscosità in simulazioni con eccipienti multipli

Tale analisi ha permesso di indagare circa la variazione di viscosità di una soluzione al mutare della frazione in massa degli eccipienti all'interno del volume di controllo (temperature di 273 K e 258 K). Come eccipienti di riferimento sono stati scelti la β -ciclodestrina e il saccarosio. La frazione in massa totale della box rimane sempre fissata all'1%(w/w), ma varia il rapporto in peso dei rispettivi eccipienti, in base a quanto esposto nel Capitolo 3. In Tabella 4.11 ed in Figura 4.30 viene riportato quanto ottenuto. Risulta evidente e coerente come, all'aumentare della temperatura, la viscosità diminuisca in ciascuno dei sistemi analizzati. Inoltre si può notare, ancora una volta, come il sistema che presenti una percentuale più elevata di saccarosio sia quello con viscosità più elevata, in quanto è quello con un numero di molecole di eccipiente maggiore all'interno del sistema.

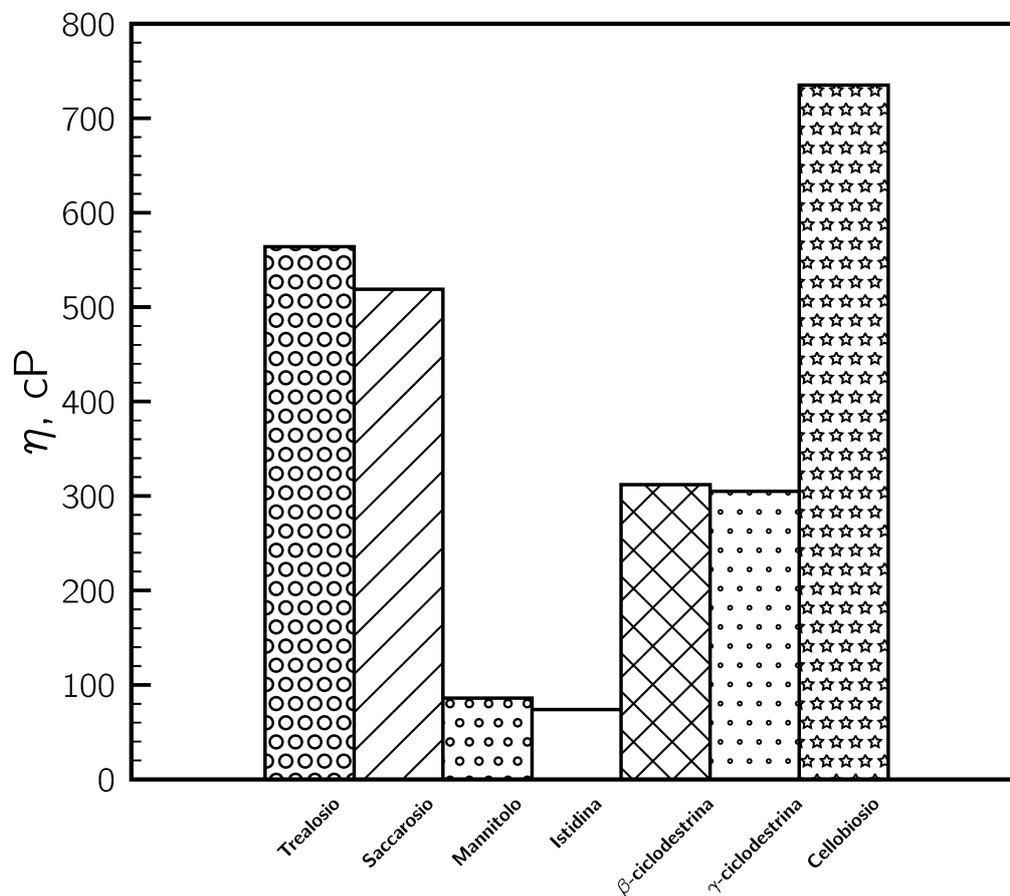


Figura 4.28: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della viscosità in fase di essiccazione per le simulazioni ad eccipiente singolo.

Tabella 4.11: Viscosità (η) al variare della frazione in massa dei componenti.

Eccipiente	η , cP (T=258K)	η , cP (T=273K)
β -ciclodestrina (25%(w/w))+Saccarosio (75%(w/w))	5.25	2.86
β -ciclodestrina (50%(w/w))+Saccarosio (50%(w/w))	3.98	2.78
β -ciclodestrina (75%(w/w))+Saccarosio (25%(w/w))	3.82	2.65

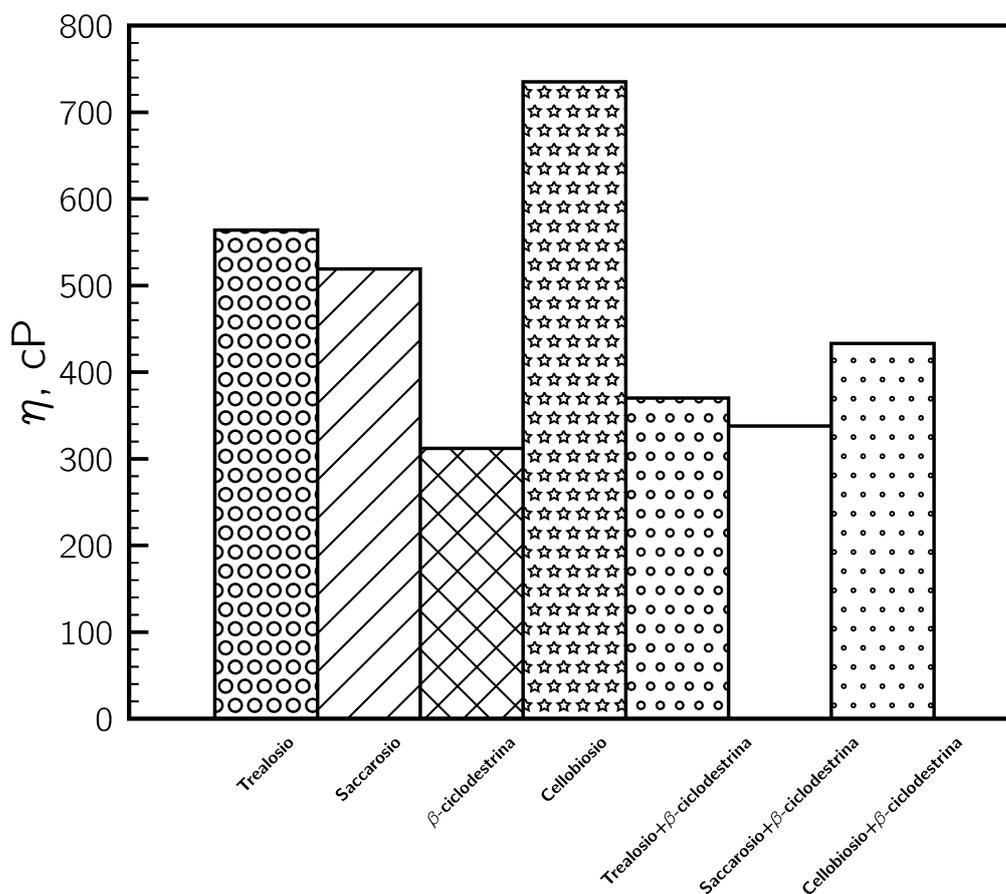


Figura 4.29: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della viscosità in fase di essiccazione per le simulazioni ad eccipiente singolo e doppio.

4.6 Considerazioni finali sulle formulazioni studiate

In linea di massima, i risultati ottenuti mediante le simulazioni di Dinamica Molecolare su GROMACS sono in linea con quanto ottenuto sperimentalmente in letteratura. Iwai [43] ha valutato l'attività residua di LDH dopo la liofilizzazione, all'interno di formulazioni con eccipienti singoli. Dall'analisi del suo studio emergono i seguenti punti:

- il sistema contenente la γ -ciclodestrina fa riscontrare una attività enzimatica superiore rispetto a quello con la β -ciclodestrina;
- la formulazione avente come eccipiente il trealosio mostra una attività di LDH superiore rispetto a quello con il saccarosio;

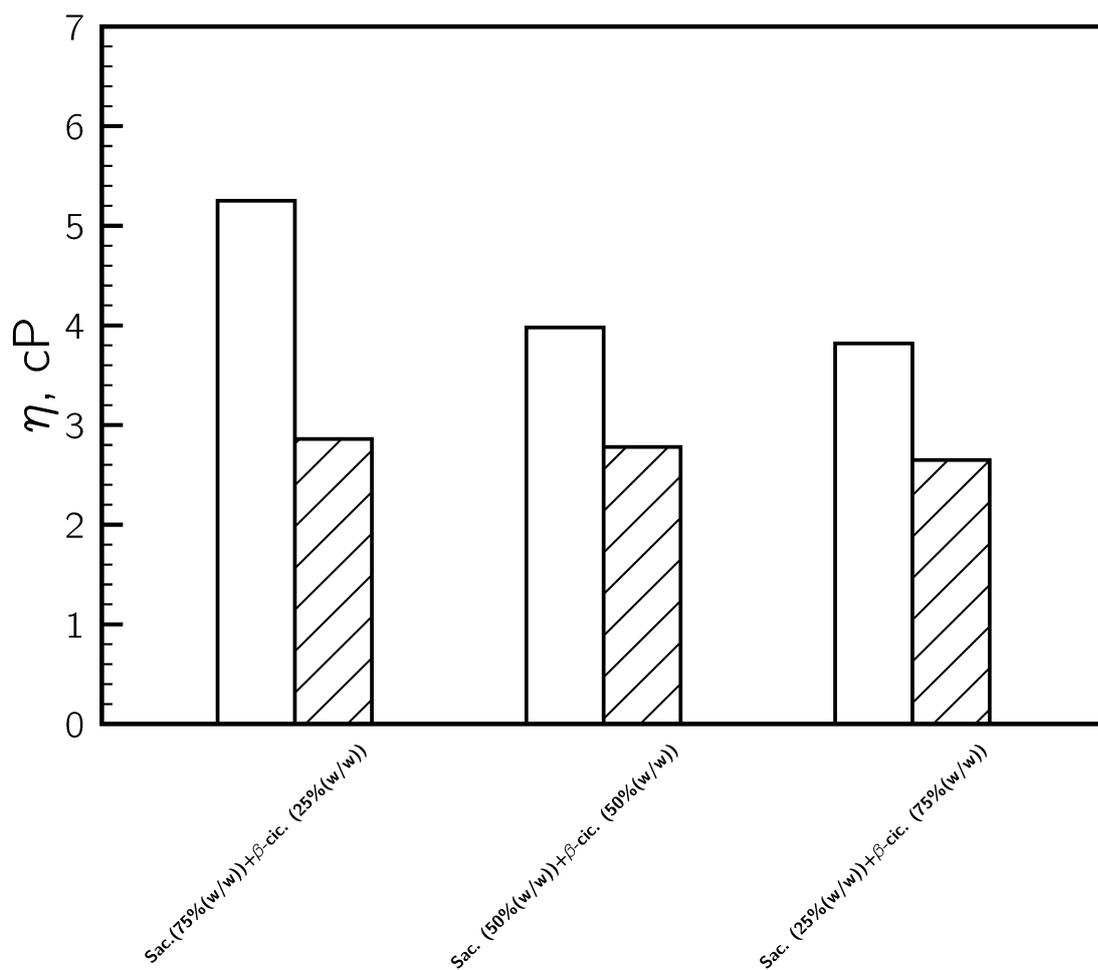


Figura 4.30: Istogramma rappresentante i risultati relativi alla valutazione della viscosità al variare della frazione in massa dei componenti. I riquadri vuoti fanno riferimento ad una temperatura di 258 K, mentre quelli tratteggiati ad una di 273 K.

- il trealosio mostra risultati migliori rispetto anche a β -ciclodestrina e γ -ciclodestrina.

Scendendo più nel dettaglio nel confronto tra le ciclodestrine, in base alle simulazioni di DM, la γ -ciclodestrina si era rivelata essere un crio-protettore più efficiente rispetto alla β -ciclodestrina, dal momento che mostrava un grado di esclusione preferenziale superiore a quello di quest'ultima. Nella fase di essiccamento, invece, entrambi tali eccipienti mostrano un comportamento simile: il parametro χ è pressoché lo stesso (30.811% della γ -ciclodestrina contro 30.435% della β -ciclodestrina) e la viscosità dei diversi sistemi si distanzia di pochi cP (305 cP della γ -ciclodestrina contro 312 cP della β -ciclodestrina). Per quanto concerne, invece, trealosio e saccarosio il discorso è più complesso. Dai risultati appurati nel presente lavoro di Tesi si nota che:

- il saccarosio presenta una migliore esclusione preferenziale in fase di congelamento;
- la frazione di legami ad idrogeno proteina-disaccaride in fase di essiccamento è sostanzialmente la stessa (63.736% del trealosio contro 64.804% del saccarosio);
- la soluzione contenente il trealosio mostra una viscosità più elevata in entrambe le fasi della liofilizzazione (5.9 cP del trealosio contro 5.6 cP del saccarosio in fase di congelamento e 564 cP del trealosio contro i 519 cP del saccarosio in fase di essiccamento);
- il trealosio evidenzia una migliore esclusione preferenziale in fase di essiccamento e water replacement in fase di congelamento (anche se, come visto, hanno una minore importanza).

Alla luce di quanto appena esposto, si può concludere che tali eccipienti dimostrino caratteristiche molto simili, come viene anche riportato da Carpenter [33]. In letteratura i risultati sperimentali relativi a questi eccipienti sono vari: come esposto precedentemente Iwai [43] ha constatato delle migliori prestazioni del trealosio rispetto al saccarosio; stesso discorso si può osservare nel lavoro di Luthra [60]. Kawai e Suzuki [55], invece, riportano una lieve superiorità del saccarosio. Le evidenze riscontrate tramite GROMACS non permettono di sbilanciarsi né da una né dall'altra parte; tuttavia, permettono di capire come il confronto tra questi due eccipienti dipenda da molti altri parametri, legati all'intero processo di liofilizzazione, al protocollo utilizzato, alla storia termica dei campioni e via discorrendo. Differenze più accentuate si notano, invece, nel momento in cui si va a confrontare l'azione dei disaccaridi con quella di mannitolo o istidina (Al Hussein [56]). In questi casi le predizioni ottenute mediante GROMACS rispecchiano in tutto e per tutto i risultati sperimentali. Un'ultima parola va, infine, spesa per il cellobiosio: come detto, è molto complicato in letteratura reperire studi che abbiano utilizzato tale eccipiente nell'analisi del comportamento di LDH dopo la liofilizzazione

(lo si trova per lo più adoperato con altri enzimi e proteine); tuttavia, in base a quanto emerso dalle simulazioni effettuate, tale eccipiente evidenzia un grado di esclusione preferenziale e un parametro χ superiore a quello degli altri disaccaridi. Inoltre, a parità di frazione in peso di eccipiente, la soluzione contenente cellobiosio mostra una viscosità superiore a tutte le altre analizzate. Sarebbe, quindi, interessante poter studiare più nel dettaglio, dal punto di vista sperimentale, diversi sistemi contenenti tale eccipiente.

Capitolo 5

Conclusioni e prospettive

A fronte dei risultati ottenuti nel presente lavoro di Tesi, si possono effettuare le seguenti considerazioni, per quanto concerne l'utilizzo della Dinamica Molecolare:

- riesce a predire in maniera efficace alcuni dei meccanismi di stabilizzazione proteica riportati in letteratura;
- è in grado di stimare l'efficienza di numerose molecole, adoperate come stabilizzanti proteici.

In questo senso, sembra plausibile ipotizzare che tale metodologia di calcolo possa essere impiegata come strumento preliminare nell'analisi di diverse formulazioni farmaceutiche. Infatti, piuttosto che intraprendere delle lunghe e difficoltose campagne sperimentali, utili a confrontare diversi eccipienti, si potrebbe pensare di utilizzare la Dinamica Molecolare come prassi per valutare l'efficacia di alcuni componenti nel salvaguardare l'attività di una specifica proteina. In tal senso, la ricerca sperimentale, necessaria ad imbastire una formulazione ottimale, si articolerebbe in due diversi step:

1. utilizzo di GROMACS per discriminare, tra una vasta gamma di eccipienti, quali possano essere i più adatti a preservare un particolare principio attivo;
2. conduzione di campagne sperimentali, solo per gli eccipienti precedentemente selezionati mediante GROMACS.

Nel presente lavoro di Tesi, ad esempio, si è individuato il cellobiosio come molecola avente le migliori performance protettive, rispetto a tutti gli altri disaccaridi. In più, come precedentemente esposto nel Capitolo 4, sono pochi gli studi sperimentali che hanno utilizzato tale componente in soluzioni contenenti LDH. È evidente, quindi, che l'analisi sperimentale di formulazioni con il cellobiosio risulterebbe molto interessante per comprendere la sua reale efficacia e il suo possibile utilizzo.

Un discorso analogo può essere effettuato per quanto riguarda lo studio di sistemi con doppio eccipiente. In letteratura non sono mai state affrontate, finora, campagne sperimentali utili a valutare l'esistenza di possibili effetti sinergici tra i

diversi eccipienti (nel ruolo di stabilizzatori). I risultati ottenuti con GROMACS hanno fornito tanti spunti interessanti:

- considerando l'intero processo di liofilizzazione, i sistemi a due eccipienti si comportano in maniera migliore rispetto a quelli con eccipiente singolo; infatti, le formulazioni sono state imbastite in modo da coadiuvare le eccellenti caratteristiche di crio-protezione delle ciclodestrine, con quelle di lio-protezione dei disaccaridi;
- prendendo come esempio il sistema contenente β -ciclodestrina e saccarosio, si è notato che esso mostra un grado di esclusione preferenziale e un water replacement inferiori rispetto ai volumi di controllo con all'interno rispettivamente β -ciclodestrina e saccarosio come unici eccipienti.

Analizzando più nello specifico quest'ultimo punto, bisogna considerare che, modificando la composizione della soluzione, si ottengono i seguenti scenari:

- inserendo un quantitativo maggiore di β -ciclodestrina cresce l'esclusione preferenziale della formulazione;
- innalzando il contenuto di saccarosio aumenta il water replacement della formulazione.

Tali scelte devono essere ponderate in base alla proteina in questione: se essa risulta essere molto sensibile agli stress dovuti alla fase di congelamento, allora occorre imbastire una formulazione con una percentuale maggiore di crio-protettori; viceversa, nel caso in cui fosse maggiormente intollerante agli stress causati dallo step di essiccamento, bisogna utilizzare un quantitativo superiore di lio-protettori. Si può concludere, quindi, che lo studio di sistemi con più eccipienti può rappresentare un punto di partenza importante per ottimizzare le formulazioni aventi come principio attivo le proteine.

In ultima analisi, è necessario evidenziare alcuni limiti, inerenti all'applicazione della Dinamica Molecolare con GROMACS:

- all'aumentare delle dimensioni della box di simulazione crescono notevolmente i tempi di calcolo;
- se il volume di controllo è troppo piccolo, non possono essere effettuate analisi con eccipienti di elevata massa molecolare (polimeri, tensioattivi, etc.);
- condurre simulazioni con una durata dell'ordine delle centinaia di nanosecondi risulta essere una procedura estremamente lunga.

Da quanto appena esposto, emerge come un altro aspetto importante preveda l'ottimizzazione delle procedure di calcolo, in modo da rendere l'analisi più rapida ed efficiente. Solo così, infatti, la Dinamica Molecolare potrà rappresentare uno strumento molto utile nella progettazione di adeguate formulazioni farmaceutiche.

Appendice A

File input

Nella presente Appendice viene riportata una descrizione dei file input più significativi, per avviare una simulazione di Dinamica Molecolare con GROMACS. Come eccipiente di riferimento viene preso il saccarosio.

A.1 Saccarosio.gro

In Figura A.1 viene mostrato un esempio di file **.gro**. In questo file si riportano le coordinate atomiche iniziali della molecola di saccarosio. Ogni riga fa riferimento ad un singolo atomo. In particolare:

- nella prima colonna è presente un codice alfa-numerico che si riferisce alla molecola in questione;
- nella seconda e nella terza colonna viene indicato un atomo specifico della struttura e il relativo numero;
- nella quarta, quinta e sesta colonna sono memorizzate le coordinate relative agli atomi costituenti la molecola.

Inoltre, alla fine di ogni file **.gro** è riportata la dimensione della box di simulazione.

A.2 Topol.top

La costruzione di un file di topologia molecolare (di estensione **.top**) è ottenuta realizzando una lista di tutti gli atomi costituenti la molecola in esame, con le relative proprietà (massa, angoli di legame, cariche parziali, etc.). Il file complessivo può essere suddiviso in diverse sezioni, le quali verranno spiegate più nello specifico nel prosieguo della trattazione.

0VH26	H11	1	-0.401	0.400	-0.036
0VH26	O6	2	-0.362	0.318	-0.070
0VH26	C6	3	-0.254	0.280	0.016
0VH26	H9	4	-0.284	0.287	0.122
0VH26	H10	5	-0.167	0.344	0.001
0VH26	C2	6	-0.218	0.134	-0.014
0VH26	H3	7	-0.182	0.126	-0.117
0VH26	O2	8	-0.112	0.104	0.079
0VH26	C1	9	-0.338	0.039	0.003
0VH26	H2	10	-0.383	0.055	0.103
0VH26	O5	11	-0.434	0.056	-0.100
0VH26	H8	12	-0.453	0.152	-0.102
0VH26	C5	13	-0.289	-0.106	-0.005
0VH26	H5	14	-0.249	-0.123	-0.106
0VH26	O4	15	-0.393	-0.199	0.024
0VH26	H7	16	-0.463	-0.186	-0.041
0VH26	C4	17	-0.179	-0.129	0.098
0VH26	H4	18	-0.221	-0.113	0.198
0VH26	O3	19	-0.127	-0.262	0.088
0VH26	H6	20	-0.204	-0.320	0.079
0VH26	C3	21	-0.064	-0.030	0.078
0VH26	H1	22	0.007	-0.036	0.161
0VH26	O1	23	0.000	-0.059	-0.044
0VH26	C10	24	0.143	-0.070	-0.055
0VH26	O7	25	0.203	-0.084	0.072
0VH26	C9	26	0.324	-0.006	0.083
0VH26	H13	27	0.407	-0.075	0.105
0VH26	C8	28	0.346	0.059	-0.056
0VH26	H14	29	0.383	0.162	-0.045
0VH26	O8	30	0.430	-0.018	-0.141
0VH26	H17	31	0.517	-0.025	-0.099
0VH26	C7	32	0.205	0.058	-0.116
0VH26	H12	33	0.209	0.053	-0.226
0VH26	O11	34	0.137	0.176	-0.075
0VH26	H22	35	0.049	0.152	-0.041
0VH26	C11	36	0.309	0.094	0.197
0VH26	H15	37	0.234	0.169	0.170
0VH26	H16	38	0.274	0.041	0.287
0VH26	O10	39	0.437	0.153	0.218
0VH26	H21	40	0.425	0.230	0.276
0VH26	C12	41	0.163	-0.197	-0.139
0VH26	H18	42	0.269	-0.211	-0.159
0VH26	H19	43	0.112	-0.182	-0.236
0VH26	O9	44	0.115	-0.312	-0.072
0VH26	H20	45	0.026	-0.291	-0.037

Figura A.1: File di estensione .gro relativo al saccarosio.

```
[ moleculetype ]  
; Name      nrexcl  
sucrose     3
```

Figura A.2: Sezione molecular type.

A.2.1 Molecule type

In Figura A.2 viene raffigurata la prima sezione. Nel terzo rigo si può osservare il nome della molecola scelta come riferimento. Il numero 3 fa fede al calcolo delle interazioni intermolecolari di non legame: in particolare, indica la condizione secondo cui gli atomi che distano più di tre legami tra loro vengano esclusi dalla stima di tali interazioni.

A.2.2 Atoms

In questa sezione viene definita una lista degli atomi costituenti la molecola (Figura A.3). Analizzando le colonne in Figura A.3:

- nella prima è riportato il numero che fa riferimento alla sequenza degli atomi nella catena;
- nella seconda è specificato il tipo atomico;
- nella terza è raffigurato un numero che rappresenta il residuo;
- nella quarta è indicato un codice alfa-numerico che si riferisce al composto di interesse;
- nella quinta è mostrato il nome dell'atomo;
- nella settima e nell'ottava sono riportate la carica e la massa di ogni singolo atomo.

A.2.3 Bonds

La terza sezione è caratterizzata dalle informazioni sui legami molecolari (Figura A.4). In Figura A.4 vengono elencati i legami presenti nella molecola:

- nelle prime due colonne sono riportati i numeri che fanno riferimento alla sequenza degli atomi;
- nella terza colonna è indicato il tipo di funzione potenziale, utilizzato per descrivere i legami (2 = funzione di Morse).

```

[ atoms ]
; nr  type  resnr  resid  atom  cgnr  charge  mass  total_charge
  1   H     1     AANA   H9    1     0.431  1.0080
  2   OA    1     AANA   O3    1    -0.629 15.9994
  3   C     1     AANA   C3    1     0.044 12.0110
  4   HC    1     AANA   H3    1     0.071  1.0080
  5   C     1     AANA   C4    1     0.102 12.0110
  6   HC    1     AANA   H4    1     0.081  1.0080
  7   OA    1     AANA   O4    1    -0.664 15.9994
  8   H     1     AANA   H10   1     0.467  1.0080      ; -0.097
  9   C     1     AANA   C2    2     0.386 12.0110
 10  HC    1     AANA   H2    2     0.052  1.0080
 11  OA    1     AANA   O2    2    -0.656 15.9994
 12  HS14  1     AANA   H8    2     0.393  1.0080
 13  C     1     AANA   C1    2    -0.010 12.0110
 14  HC    1     AANA   H1    2     0.136  1.0080
 15  OE    1     AANA   O1    2    -0.301 15.9994      ;  0.000
 16  OE    1     AANA   O5    3    -0.357 15.9994
 17  C     1     AANA   C5    3     0.035 12.0110
 18  HC    1     AANA   H5    3     0.160  1.0080
 19  CH2   1     AANA   C6    3     0.307 14.0270
 20  OA    1     AANA   O6    3    -0.682 15.9994
 21  H     1     AANA   H11   3     0.410  1.0080      ; -0.127
 22  C     1     AANA   C8    4     0.258 12.0110
 23  OE    1     AANA   O8    4    -0.295 15.9994
 24  CH2   1     AANA   C7    4     0.297 14.0270
 25  OA    1     AANA   O7    4    -0.623 15.9994
 26  H     1     AANA   H19   4     0.436  1.0080      ;  0.073
 27  C     1     AANA   C9    5    -0.033 12.0110
 28  HC    1     AANA   H14   5     0.160  1.0080
 29  OA    1     AANA   O9    5    -0.643 15.9994
 30  H     1     AANA   H20   5     0.516  1.0080      ;  0.000
 31  C     1     AANA   C10   6     0.265 12.0110
 32  HC    1     AANA   H15   6     0.082  1.0080
 33  OA    1     AANA   O10   6    -0.647 15.9994
 34  HS14  1     AANA   H21   6     0.383  1.0080      ;  0.083
 35  C     1     AANA   C11   7    -0.193 12.0110
 36  HC    1     AANA   H16   7     0.152  1.0080
 37  CH2   1     AANA   C12   7     0.324 14.0270
 38  OA    1     AANA   O11   7    -0.634 15.9994
 39  HS14  1     AANA   H22   7     0.419  1.0080      ;  0.068
; total charge of the molecule: -0.000

```

Figura A.3: Sezione atoms.

```

[ bonds ]
; ai aj funct c0 c1
  1  2  2  0.0972 1.9581e+07
  2  3  2  0.1430 8.1800e+06
  3  4  2  0.1100 1.2100e+07
  3  5  2  0.1520 5.4300e+06
  3  9  2  0.1530 7.1500e+06
  5  6  2  0.1100 1.2100e+07
  5  7  2  0.1430 8.1800e+06
  5 17  2  0.1530 7.1500e+06
  7  8  2  0.0972 1.9581e+07
  9 10  2  0.1090 1.2300e+07
  9 11  2  0.1430 8.1800e+06
  9 13  2  0.1540 4.2166e+06
 11 12  2  0.0972 1.9581e+07
 13 14  2  0.1090 1.2300e+07
 13 15  2  0.1430 8.1800e+06
 13 16  2  0.1410 6.5389e+06
 15 22  2  0.1430 8.1800e+06
 16 17  2  0.1450 5.2319e+06
 17 18  2  0.1090 1.2300e+07
 17 19  2  0.1530 7.1500e+06
 19 20  2  0.1420 3.2236e+06
 20 21  2  0.0983 9.8314e+06
 22 23  2  0.1420 3.2236e+06
 22 24  2  0.1540 4.2166e+06
 22 27  2  0.1530 7.1500e+06
 23 35  2  0.1460 4.6913e+06
 24 25  2  0.1430 8.1800e+06
 25 26  2  0.0972 1.9581e+07
 27 28  2  0.1090 1.2300e+07
 27 29  2  0.1410 6.5389e+06
 27 31  2  0.1530 7.1500e+06
 29 30  2  0.0972 1.9581e+07
 31 32  2  0.1090 1.2300e+07
 31 33  2  0.1430 8.1800e+06
 31 35  2  0.1540 4.2166e+06
 33 34  2  0.0971 7.9547e+06
 35 36  2  0.1090 1.2300e+07
 35 37  2  0.1530 7.1500e+06
 37 38  2  0.1430 8.1800e+06
 38 39  2  0.0972 1.9581e+07

```

Figura A.4: Sezione bonds.

```

[ pairs ]
; ai aj funct ; all 1-4 pairs but the ones excluded in GROMOS itp
  1  4  1
  1  5  1
  1  9  1
  2  6  1
  2  7  1
  2 10  1
  2 11  1
  2 13  1
  2 17  1
  3  8  1
  3 12  1
  3 14  1
  3 15  1
  3 16  1
  3 18  1
  3 19  1
  4  6  1
  4  7  1
  4 10  1
  4 11  1
  4 13  1
  4 17  1
  5 10  1
  5 11  1
  5 13  1
  5 20  1
  6  8  1
  6  9  1
  6 16  1
  6 18  1
  6 19  1
  7  9  1
  7 16  1
  7 18  1
  7 19  1
  8 17  1
  9 17  1
  9 22  1
 10 12  1
 10 14  1
 10 15  1
 10 16  1

```

Figura A.5: Sezione pairs.

A.2.4 Pairs

In questa sezione sono presenti le coppie atomiche coinvolte nelle interazioni di Lennard-Jones. La distanza di tali atomi è di 4 legami (Figure A.5, A.6).

11	14	1			
11	15	1			
11	16	1			
12	13	1			
13	18	1			
13	19	1			
13	23	1			
13	24	1			
13	27	1			
14	17	1			
14	22	1			
15	17	1			
15	25	1			
15	28	1			
15	29	1			
15	31	1			
15	35	1			
16	20	1			
16	22	1			
17	21	1			
18	20	1			
22	26	1			
22	30	1			
22	32	1			
22	33	1			
22	36	1			
22	37	1			
23	25	1			
23	28	1			
23	29	1			
23	32	1	28	35	1
23	33	1	29	32	1
23	38	1	29	33	1
24	28	1	29	35	1
24	29	1	30	31	1
24	31	1	31	38	1
24	35	1	32	34	1
25	27	1	32	36	1
27	34	1	32	37	1
27	36	1	33	36	1
27	37	1	33	37	1
28	30	1	34	35	1
28	32	1	35	39	1
28	33	1	36	38	1

Figura A.6: Sezione pairs.

A.2.5 Angles

In tale sezione sono riportati gli angoli di valenza della molecola di interesse (Figura A.7). In particolare:

- le prime tre colonne indicano i numeri di sequenza degli atomi coinvolti nel formare l'angolo;
- nella quarta colonna è presente il tipo di funzione potenziale che descrive il legame (1 = funzione armonica);
- nella quinta colonna viene riportato il valore dell'angolo, relativo ai tre atomi considerati.

A.2.6 Dihedrals

In quest'ultima sezione sono elencati gli angoli di torsione (Figura A.8), sia quelli propri, sia quelli impropri.

- le prime quattro colonne indicano i numeri di sequenza degli atomi coinvolti nel formare il diedro di riferimento;
- nella quinta colonna è presente il tipo di funzione potenziale che descrive il legame (2 = funzione di Morse per diedri impropri, 1 = funzione armonica per i diedri propri).

A.3 em.mdp

Come spiegato nel Capitolo 2, prima di procedere con le simulazioni effettive, occorre assicurarsi che il sistema non presenti configurazioni geometriche e steriche inadeguate. Ciò viene appurato mediante uno step di minimizzazione energetica. In Figura A.9 viene mostrato un esempio di file input, utile ad eseguire tale operazione. Ci sono due fattori, i quali aiutano a determinare se la minimizzazione energetica ha avuto successo.

- l'energia potenziale del sistema, che deve essere preferibilmente negativa;
- la forza massima scambiata tra due particelle; tale parametro non deve essere superiore a 1000 kJ/mol/nm.

Analizzando il file di simulazione si nota:

- l'algoritmo utilizzato è lo steep (steepest descent minimization);
- il valore di forza massima (F_{max}), raggiunto il quale GROMACS termina la simulazione, è definito dal parametro *emtol*;

[angles]										
;	ai	aj	ak	funct	angle	fc				
	1	2	3	2	109.50	450.00				
	2	3	4	2	110.00	4763.46				
	2	3	5	2	109.50	520.00				
	2	3	9	2	111.00	530.00				
	4	3	5	2	107.60	507.00				
	4	3	9	2	109.50	285.00				
	5	3	9	2	111.00	530.00				
	3	5	6	2	109.00	1680.51				
	3	5	7	2	111.00	530.00				
	3	5	17	2	109.50	520.00				
	6	5	7	2	110.30	524.00				
	6	5	17	2	109.00	1680.51				
	7	5	17	2	109.50	520.00				
	5	7	8	2	109.50	450.00				
	3	9	10	2	108.00	465.00				
	3	9	11	2	111.00	530.00				
	3	9	13	2	111.00	530.00	24	22	27	2
	10	9	11	2	106.00	1733.55	22	23	35	2
	10	9	13	2	108.53	443.00	22	24	25	2
	11	9	13	2	111.00	530.00	24	25	26	2
	9	11	12	2	109.50	450.00	22	27	28	2
	9	13	14	2	110.30	524.00	22	27	29	2
	9	13	15	2	109.50	520.00	22	27	31	2
	9	13	16	2	111.00	530.00	28	27	29	2
	14	13	15	2	109.50	285.00	28	27	31	2
	14	13	16	2	104.00	490.00	29	27	31	2
	15	13	16	2	113.00	545.00	27	29	30	2
	13	15	22	2	117.00	635.00	27	31	32	2
	13	16	17	2	118.00	7474.41	27	31	33	2
	5	17	16	2	109.50	520.00	27	31	35	2
	5	17	18	2	108.53	443.00	32	31	33	2
	5	17	19	2	111.00	530.00	32	31	35	2
	16	17	18	2	110.00	4763.46	33	31	35	2
	16	17	19	2	109.50	520.00	31	33	34	2
	18	17	19	2	109.00	1680.51	23	35	31	2
	17	19	20	2	115.00	610.00	23	35	36	2
	19	20	21	2	109.50	450.00	23	35	37	2
	15	22	23	2	111.00	530.00	31	35	36	2
	15	22	24	2	115.00	610.00	31	35	37	2
	15	22	27	2	109.50	520.00	36	35	37	2
	23	22	24	2	109.50	520.00	35	37	38	2
	23	22	27	2	104.00	490.00	37	38	39	2

Figura A.7: Sezione angles.

```

[ dihedrals ]
; GROMOS improper dihedrals
; ai  aj  ak  al  funct  angle  fc
  13 15  9 16  2    35.26 334.72
   9  3 13 11  2    35.26 334.72
   3  9  5  2  2    35.26 334.72
   5 17  3  7  2    35.26 334.72
  17 19  5 16  2    35.26 334.72
  27 22 31 29  2    35.26 334.72
  31 35 27 33  2    35.26 334.72
  35 37 31 23  2    35.26 334.72
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  funct  ph0  cp  mult
   1  2  3  9  1    0.00 1.26  3
   9  3  5 17  1    0.00 5.92  3
   5  3  9 13  1    0.00 5.92  3
   3  5  7  8  1    0.00 1.26  3
   3  5 17 19  1    0.00 5.92  3
  13  9 11 12  1    0.00 1.26  3
   3  9 13 15  1    0.00 5.92  3
   9 13 15 22  1   180.00 1.00  3
   9 13 16 17  1    0.00 1.26  3
  13 15 22 24  1    0.00 1.26  3
  13 16 17  5  1    0.00 1.26  3
   5 17 19 20  1    0.00 5.92  3
  17 19 20 21  1    0.00 1.26  3
  15 22 23 35  1    0.00 1.26  3
  15 22 24 25  1    0.00 5.92  3
  15 22 27 31  1    0.00 5.92  3
  22 23 35 31  1   180.00 1.00  3
  22 24 25 26  1    0.00 1.26  3
  22 27 29 30  1    0.00 1.26  3
  22 27 31 35  1   180.00 1.00  3
  27 31 33 34  1    0.00 1.26  3
  27 31 35 37  1   180.00 1.00  3
  31 35 37 38  1    0.00 5.92  3
  35 37 38 39  1    0.00 1.26  3
[ exclusions ]
; ai  aj  funct ; GROMOS 1-4 exclusions

```

Figura A.8: Sezione dihedrals.

```

; minim.mdp - used as input into grompp to generate em.tpr
integrator      = steep          ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)
emtol          = 1000.0         ; Stop minimization when the maximum force < 1000.0 kJ/mol/nm
emstep         =0.01           ; Energy step size
nsteps         = 50000          ; Maximum number of (minimization) steps to perform

; Parameters describing how to find the neighbors of each atom and how to calculate the interactions
nstlist        = 20             ; Frequency to update the neighbor list and long range forces
cutoff-scheme  = Verlet
ns_type        = grid           ; Method to determine neighbor list (simple, grid)
coulombtype    = PME            ; Treatment of long range electrostatic interactions
rcoulomb       = 1.0            ; Short-range electrostatic cut-off
rvdw           = 1.0            ; Short-range Van der Waals cut-off
pbc            = xyz            ; Periodic Boundary Conditions (yes/no)

```

Figura A.9: File *em.mdp*.

- il numero di step limite, entro cui condurre la simulazione, è specificato dal valore di *nsteps*.

È possibile ottenere una energia potenziale ragionevole anche con $F_{max} > emtol$. Tuttavia, se ciò dovesse accadere, il sistema potrebbe non essere abbastanza stabile per la simulazione.

A.4 nvt.mdp

Lo step di minimizzazione energetica permette, quindi, di ottenere una configurazione iniziale ottimale, in termini di geometria e orientamento del solvente. Tuttavia, per iniziare la dinamica reale, è necessario equilibrare il solvente e gli ioni attorno alla proteina, evitando condizioni che potrebbero portare il sistema a collassare. Quest'ultimo deve essere innanzitutto condotto alla temperatura di simulazione, calcolata in base all'energia cinetica delle molecole presenti. In Figura A.10 viene riportato un generico file di input, utile ad eseguire l'operazione appena descritta. In particolare:

- l'integrazione delle equazioni del moto avviene mediante l'algoritmo leap-frog;
- il numero di step per l'equilibratura è di 25000, con un time step di 0.001 ps; tali parametri vanno selezionati in maniera adeguata, in modo da non indurre il sistema a collassare;
- la temperatura di simulazione è in questo caso pari a 233 K;
- il controllo della temperatura viene effettuato mediante il *temperature coupling*: viene usato il comando *V-rescale* che rappresenta un miglioramento del metodo di accoppiamento debole di Berendsen, il quale non riesce a riprodurre un ensemble cinetico in maniera accurata;
- in questa fase, non viene eseguito il controllo sulla pressione del sistema;

```

title           = NVT equilibration
define          = -DPOSRES           ; position restrain the protein
; Run parameters
integrator      = md                 ; leap-frog integrator
nsteps         = 25000               ; 1 * 25000 = 25 ps
dt             = 0.001               ; 1 fs
; Output control
nstxout        = 500                 ; save coordinates every 1.0 ps
nstvout        = 500                 ; save velocities every 1.0 ps
nstenergy      = 500                 ; save energies every 1.0 ps
nstlog         = 500                 ; update log file every 1.0 ps
; Bond parameters
continuation    = no                 ; first dynamics run
constraint_algorithm = lincs         ; holonomic constraints
constraints     = all-bonds          ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter     = 1                   ; accuracy of LINCS
lincs_order    = 4                   ; also related to accuracy
; Neighborsearching
cutoff-scheme  = Verlet
ns_type        = grid                ; search neighboring grid cells
nstlist        = 10                  ; 20 fs, largely irrelevant with Verlet
rcoulomb       = 1.0                 ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw           = 1.0                 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype    = PME                 ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order      = 4                   ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16                ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl         = V-rescale            ; modified Berendsen thermostat
tc-grps        = Protein Non-Protein ; two coupling groups - more accurate
tau_t          = 0.1 0.1             ; time constant, in ps
ref_t          = 233 233             ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is off
pcoupl         = no                  ; no pressure coupling in NVT
; Periodic boundary conditions
pbc            = xyz                 ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr       = EnerPres            ; account for cut-off vdW scheme
; Velocity generation
gen_vel        = yes                 ; assign velocities from Maxwell distribution
gen_temp       = 300                 ; temperature for Maxwell distribution
gen_seed       = -1                  ; generate a random seed

```

Figura A.10: File nvt.mdp.

- si esegue una inizializzazione delle velocità in maniera semi casuale (*gen-seeds*); ciò permette di poter realizzare diverse simulazioni a partire dalla stessa struttura di partenza;
- si tiene conto delle interazioni elettrostatiche mediante il metodo di Ewald;
- sono applicate le condizioni periodiche al contorno (PBC).

A.5 **npt.mdp**

Dopo aver raggiunto la temperatura ottimale di simulazione, occorre applicare una certa pressione al sistema, in modo da conferire al volume di controllo la giusta densità. La struttura del file **npt.mdp** (Figura A.11) è analoga a quella di Figura A.10. Le uniche differenze sono il numero di step (in questo caso 5000) e l'applicazione del *pressure coupling* per il controllo della pressione. È importante specificare il valore di pressione a cui il sistema si deve portare (in questo caso 1 bar).

A.6 **md.mdp**

Al termine delle due fasi di equilibratura, si può procedere con la simulazione vera e propria, durante la quale il sistema viene lasciato libero di evolversi nel tempo. Il file **md.mdp** (Figura A.12) presenta la stessa struttura dei file **nvt.mdp** e **npt.mdp**.

La sola differenza consiste nel numero di step totali e nel time step di simulazione. Come spiegato nel Capitolo 3, infatti, le simulazioni di Dinamica Molecolare nel presente lavoro di Tesi hanno una durata di 20 ns.

```

title           = NPT equilibration
define          = -DPOSRES           ; position restrain the protein
; Run parameters
integrator      = md                  ; leap-frog integrator
nsteps         = 50000                ; 1 * 50000 = 50 ps
dt             = 0.001                ; 1 fs
; Output control
nstxout        = 500                  ; save coordinates every 1.0 ps
nstvout        = 500                  ; save velocities every 1.0 ps
nstenergy      = 500                  ; save energies every 1.0 ps
nstlog         = 500                  ; update log file every 1.0 ps
; Bond parameters
continuation    = yes                 ; Restarting after NVT
constraint_algorithm = lincs          ; holonomic constraints
constraints     = all-bonds           ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter      = 1                   ; accuracy of LINCS
lincs_order     = 4                   ; also related to accuracy
; Neighborsearching
cutoff-scheme   = Verlet
ns_type         = grid                ; search neighboring grid cells
nstlist         = 10                  ; 20 fs, largely irrelevant with Verlet scheme
rcoulomb        = 1.0                 ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw            = 1.0                 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype     = PME                  ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order       = 4                   ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16                 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl         = V-rescale             ; modified Berendsen thermostat
tc-grps        = Protein Non-Protein  ; two coupling groups - more accurate
tau_t          = 0.1 0.1              ; time constant, in ps
ref_t          = 233 233              ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl         = Parrinello-Rahman     ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype     = isotropic             ; uniform scaling of box vectors
tau_p          = 2.0                  ; time constant, in ps
ref_p          = 1.0                  ; reference pressure, in bar
compressibility = 4.5e-5               ; isothermal compressibility of water, bar^-1
refcoord_scaling = com
; Periodic boundary conditions
pbc            = xyz                   ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr       = EnerPres              ; account for cut-off vdW scheme

```

Figura A.II: File npt.mdp.

```

title           = MD simulation
; Run parameters
integrator      = md           ; leap-frog integrator
nsteps          = 40000000    ; 0.5 * 40000000 = 20000 ps (20.0 ns)
dt              = 0.0005      ; 0.5 fs
; Output control
nstxout         = 10000       ; save coordinates every 10.0 ps
nstvout         = 10000       ; save velocities every 10.0 ps
nstenergy       = 10000       ; save energies every 10.0 ps
nstlog          = 10000       ; update log file every 10.0 ps
nstxout-compressed = 10000    ; save compressed coordinates every 10.0 ps
; nstxout-compressed replaces nstxtcout
compressed-x-grps = System    ; replaces xtc-grps
; Bond parameters
continuation    = yes         ; Restarting after NPT
constraint_algorithm = lincs   ; holonomic constraints
constraints     = all-bonds   ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter      = 1           ; accuracy of LINCS
lincs_order     = 4           ; also related to accuracy
; Neighborsearching
cutoff-scheme   = Verlet
ns_type         = grid        ; search neighboring grid cells
nstlist         = 10          ; 20 fs, largely irrelevant with Verlet scheme
rcoulomb        = 1.0         ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw            = 1.0         ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype     = PME         ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order       = 4           ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16        ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl         = V-rescale     ; modified Berendsen thermostat
tc-grps        = Protein Non-Protein ; two coupling groups - more accurate
tau_t          = 0.1 0.1      ; time constant, in ps
ref_t          = 233 233      ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl         = Parrinello-Rahman ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype     = isotropic     ; uniform scaling of box vectors
tau_p          = 2.0          ; time constant, in ps
ref_p          = 1.0          ; reference pressure, in bar
compressibility = 4.5e-5       ; isothermal compressibility of water, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc            = xyz          ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr       = EnerPres     ; account for cut-off vdW scheme

```

Figura A.12: File md.mdp.

Bibliografia

- [1] Landers P., 2007. *Cost of developing a drug increases to about \$1.7 billion*. PAREXEL's Pharmaceutical R&D Statistical Sourcebook 2006/2007. Bain & Co. (report of a 2003 study), p. 107.
- [2] Leader B., Baca Q.J., Golan D.E., 2008. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**(1): 21-39.
- [3] Jameel F., Hershenson S., 2010. *Formulation and process development strategies for manufacturing biopharmaceuticals*, Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons.
- [4] Brown L.R., 2005. Commercial challenges of protein drug delivery. *Expert Opinion Drug Discovery* **2**(1): 29-42.
- [5] Shahrokh Z., Sluzky V., Cleland J. L., Shire S. J., Randolph T. W., 1997. *Therapeutic Protein and Peptide Formulation and Delivery*, American Chemical Society, Washington, DC.
- [6] McNally E., 2000. *Protein Formulation and Delivery*, Marcel Dekker, New York.
- [7] Roberts C. J., 2007. Non-native protein aggregation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering* **98**(5): 927-938.
- [8] Calamai M., Canale C., Relini A., Stefani M., Chiti F., Dobson C. M., 2005. Reversal of protein aggregation provides evidence for multiple aggregated States. *Journal of Molecular Biology* **346**(2): 603-616.
- [9] Masters K., 2002. *Spray Drying in Practice*, Danish Dairy Board, Aarhus, Denmark.
- [10] Miller D. P., Anderson R. E., De Pablo J. J., 1998. Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze thawing and vacuum-drying in the presence of trehalose and borate. *Pharmaceutical Research* **15**(8): 1215-1221.
- [11] Abdul-Fattah A. M., Lechuga-Ballesteros D., Kalonia D., and Pikal M., 2008. The impact of drying method and formulation on the physical properties and

- stability of methionyl human growth hormone in the amorphous solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **97**(1): 163-184.
- [12] Nastaj J. F., 1994. Vacuum contact drying of selected biotechnology products. *Drying Technology* **12**(5): 1145-1166.
- [13] Rupley J.A., Careri G., 1991. Protein hydration and function. *Advanced Protein Chemistry* **41**(1): 37-173.
- [14] Kuhlman B., Yang H.Y., Boice J.A., Fairman R., Raleigh D.P., 1997. An exceptionally stable helix from the ribosomal protein L9: Implications for protein folding and stability. *Journal of Molecular Biology* **270**(1): 640-647.
- [15] Fissore D., 2013. *Freeze drying of pharmaceuticals*. Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology (Swarbrick J., Ed), Fourth Edition. Taylor and Francis, New York.
- [16] Vemuri S., Yu C.D., Roosdorp N., 1994. Effect of cryoprotectants on freezing, lyophilization, and storage of lyophilized recombinant alpha 1-antitrypsin formulations. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **48**(5): 241-246.
- [17] Chang B.S., Randall C.S., Lee Y.S., 1993. Stabilization of lyophilized porcine pancreatic elastase. *Pharmaceutical Research* **10**(10): 1478-1483.
- [18] Townsend M.W., DeLuca P.P., 1990. Stability of ribonuclease A in solution and the freeze-dried state. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **79**(12): 1083-1086.
- [19] Jaenicke R., 1990. Protein structure and function at low temperatures. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **326**(1237): 535-551.
- [20] Schwegman J.J., Hardwick L.M., Akers M.J., 2008. Practical formulation and process development of freeze-dried products. *Pharmaceutical Development and Technology* **10**(2): 151-173.
- [21] Dill K.A., Alonso D.O.V., Hutchinson K., 1989. Thermal stabilities of globular proteins. *Biochemistry* **28**(13): 5439-5449.
- [22] Graziano G., Catanzano F., Riccio A., Barone G., 1997. A reassessment of the molecular origin of cold denaturation. *Journal of Biochemistry* **122**(2): 395-401.
- [23] Franks F., 1990. Freeze-drying: from empiricism to predictability. *Cryo-Letters* **11**(1): 93-110.
- [24] Franks F., 1994. Long-term stabilization of biologicals. *Biotechnology Progress* **12**(1): 253-256.

- [25] Volkin D.B., Klivanov A.M., 1989. *Minimizing protein inactivation*. Creighton, T.E. (Ed.), Protein Function: A Practical Approach. Information Press, Oxford, UK, pp. 1-24.
- [26] Wang W., 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* **185**(2): 129-188.
- [27] Heller M.C., Carpenter J.F., Randolph T.W., 1997. Manipulation of lyophilization-induced phase separation: implications for pharmaceutical proteins. *Biotechnology Progress* **13**(5): 590-596.
- [28] Heller M.C., Carpenter J.F., Randolph T.W., 1999. Application of a thermodynamic model to the prediction of phase separations in freeze-concentrated formulations for protein lyophilization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **363**(2): 191-201.
- [29] Geidobler R., Winter G., 2013. Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: fundamentals and technology review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **85**(2): 214-222
- [30] Chang B.S., Randall C.S., Lee Y.S., 1993. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology* **29**(1): 632-656.
- [31] Bindschaedler C., 1999. *Lyophilization process validation*. Rey L., May J.C. (Eds.), Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products, vol. 96. Marcel Dekker, New York, pp. 373-408.
- [32] Carpenter J.F., Chang B.S., Garzon-Rodriguez W., Randolph T.W., 2002. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice. *Pharmaceutical Biotechnology* **13**(1): 109-133.
- [33] Carpenter J.F., Prestrelski S., Arakawa T., 1993. Separation of freezing- and drying- induced denaturation of lyophilized proteins by stress-specific stabilization: I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **303**(2): 456-464
- [34] Murase N., Franks F., 1989. Salt precipitation during the freeze-concentration of phosphate buffer solutions. *Biophysical Chemistry* **34**(3): 293-300.
- [35] Gomez G., Pikal M.J., Rodriguez-Horned N., 2001. Effect of initial buffer composition on pH changes during far from equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions. *Pharmaceutical Research* **18**(1): 90-97.
- [36] Chang S., Randall C.S., 1992. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology* **29**(1): 632-656.
- [37] Bechtel W.J., Schellman J.A., 1987. Protein stability curves. *Biopolymers* **26**(11): 1859-1877.

- [38] Arakawa T., Timasheff S.N., 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal* **47**(3): 411-414.
- [39] Carpenter J.F., Crowe J.H., 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* **25**(3): 244-255.
- [40] Hillgren A., 2002. *Investigation of the Freeze-Thawing Process for Pharmaceutical Formulations of a Model Protein*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy. Uppsala, Svezia.
- [41] Jiang S., Nail S.L., 1998. Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **45**(3): 249-257.
- [42] Nema S., Avis K.E., 1992. Freeze-thaw studies of a model protein, lactate dehydrogenase, in the presence of cryoprotectants. *Journal of Parenteral Science and Technology* **47**(2): 76-83.
- [43] Iwai J., Ogawa N., Nagase H., Endo T., Loftsson T., Ueda H., 2006. Effects of Various Cyclodextrins on the Stability of Freeze-Dried Lactate Dehydrogenase. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**(11): 3140-3143.
- [44] Levine I.N., 2000. *Quantum Chemistry (7th edition)*, Chemistry Department, Brooklyn College, City University of New York.
- [45] Alder B.J., Wainwright T.E., 1957. Phase transition for a hard sphere system. *Journal of Chemical Physics* **27**(1): 1208.
- [46] Rahman A., 1964. Correlations in the motion of atoms in liquid Argon. *Physical Review Journals* **136** (A405).
- [47] Ryckaert J.P., Bellemans A., 1975. Molecular dynamics of liquid n-butane near its boiling point. *Chemical Physics Letters* **30**(1): 123-125.
- [48] Roccatano D. *Introduzione alla dinamica molecolare*, Dipartimento di Chimica, Università di L'Aquila, IT.
- [49] Calaminici R., 2016. *Simulazioni con dinamica molecolare di miscele acqua-acetone*. Tesi di laurea magistrale, Dipartimento di Scienze Applicate e Tecnologia, Politecnico di Torino, Torino, IT.
- [50] Fortunati N., 2012. *Approcci teorico/computazionali per l'interpretazione di dinamiche molecolari 50-500 ns in proteine*. Tesi di laurea magistrale, Università di Padova, Dipartimento di Scienze Chimiche, Padova, IT.
- [51] Ercolessi F., 1997. *A molecular dynamics primer*. International School for Advanced Studies, Trieste, IT.

- [52] Abraham M., Hess B., Van der Spoel D., Lindahl E., 2005. *Gromacs User Manual*. Department of Biophysical Chemistry, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
- [53] Carchini G., 2010. *Studio del folding di analoghi della Gramicidina S mediante simulazioni di dinamica molecolare*. Università degli studi "La Sapienza", Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali, Roma, IT.
- [54] Ryckaert J.P., Ciccotti G., Berendsen H.J.C., 1977. Numerical integration of the cartesian equations of motion in a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* **23**(1): 327-341.
- [55] Kawai K., Suzuki T., 2007. Stabilizing effect of four types of disaccharide on the enzymatic activity of freeze-dried lactate dehydrogenase: step by step evaluation from freezing to storage. *Pharmaceutical Research* **24**(10): 1883-1890.
- [56] Al Hussein A., Gieseler H., 2012. Investigation of histidine stabilizing effects on LDH during freeze-drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **102**(3): 813-826.
- [57] Arakawa T., Timasheff S.N., 1982. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry* **21**(25): 6536-6544.
- [58] Arsiccio A., Pisano R., 2017. Stability of proteins in carbohydrates and other additives during freezing: the human growth hormone as a case study. *The Journal of Physical Chemistry. B.* **121**(37): 8652-8660.
- [59] Allison S.D., Chang B., Randolph T.W., Carpenter J.F., 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **365**(2): 289-298.
- [60] Luthra S., Obert J.P., Kalonia D.S., Pikal M.J., 2007. Investigation of drying stresses on proteins during lyophilization: differentiation between primary and secondary-drying stresses on lactate dehydrogenase using a humidity controlled mini freeze-dryer. *Journal of Pharmaceutical Science* **96**(1): 61-70.

Ringraziamenti

Il momento è arrivato! Dopo sette lunghi mesi, la mia Tesi di Laurea, ma più in generale la mia carriera da studente universitario, si conclude con queste brevi frasi di ringraziamento. Ripercorrendo, istante per istante, questi anni passati, stento quasi a crederci. Una cosa è certa: tutto quello che sono riuscito a realizzare non è frutto solo del mio sudore e del mio impegno, ma è anche merito di tutte le persone che sono state in grado di sostenermi, ma soprattutto di sopportarmi fino al raggiungimento di questo traguardo. È stato un percorso di profondo apprendimento, non solo a livello scientifico, ma anche personale. Devo ammettere che la scrittura di queste poche righe costituisce un momento veramente emozionante; pensa: imbocchi la strada universitaria con l'incoscienza e la follia di un adolescente e varchi la meta con la consapevolezza di un uomo. Proust scriveva: "Il vero viaggio di scoperta non consiste nel cercare nuove terre, ma nell'avere nuovi occhi"; e sono proprio questi i nuovi occhi con cui, guardandomi alle spalle, riesco a percepire ed apprezzare quanto questo percorso universitario mi abbia donato.

Vorrei ringraziare innanzitutto il mio relatore, il Prof. Roberto Pisano per la sua bravura e la sua disponibilità. Sono poche le persone che al giorno d'oggi sono in grado di trasmetterti la passione per ciò che fanno e lui è senza dubbio una di queste. Un altro doveroso ringraziamento va ad Andrea Arsiccio, che con pazienza e dedizione mi ha seguito durante tutto il lavoro di Tesi, permettendomi di svolgerlo nel migliore dei modi.

Un ringraziamento particolare va a tutti i miei colleghi ed amici: credo sia giusto risparmiare a voi lettori questo lungo elenco di nomi (già la Tesi non scherza!). Ciascuno di loro ha avuto un contributo importante nella mia crescita personale: da Fabiana, Tommaso, Nicolò e "lu Filippi", fedeli compagni dei primi anni, che mi hanno fatto sentire meno la mancanza di casa; passando per tutti i miei compagni di corso (Sasi, Elena, Lucrezia, Valeria, Daniele, Mariangela e molti altri) con cui ho condiviso le intense giornate di vita al Politecnico, tra mille risate e infinite ore di lezione; per finire con i miei compagni del "cioccolato" (Jacopo, Alessandro, Roberta e Esther) per le ore, ore e ore di lavoro passate nel cercare di capire cosa di "buono" ci potesse essere dentro delle bucce di fave di cacao. Con loro abbiamo reinventato il concetto di "serata": nel gergo comune vuol dire divertirsi fino a notte inoltrata con gli amici; per noi, invece, nei mesi di lavoro, è significato restare fino alle sei di mattina davanti ad un computer cercando di far quadrare bilanci

di materia, perdite di carico e stime economiche. Vi lascio immaginare le grasse risate che ci siamo fatti quando il nostro cervello non connetteva più (più o meno verso mezzanotte)... Come dimenticare, inoltre, tutti i miei compagni di squadra (Fede, Dade, Vins, Camo, Beppe, Vitto, Vezza, Diego, Baldo, Simo, Oras, Murel): merito loro è aver reso la vita da ingegnere meno "triste" grazie alle tante sere passate assieme ad allenarci o davanti ad una buona birra. In modo particolare, un ringraziamento speciale va ad Andrea detto "Lecce", perché è una delle persone migliori che conosco: sempre presente, sempre pronto a dare una mano nel momento del bisogno, con una gentilezza ed una spontaneità più uniche che rare.

Ora è il suo turno: Aldo. Compagni da sempre. Compagni di vita si potrebbe dire. Abbiamo iniziato insieme questo lungo percorso (tra bolle, serate e pazzie varie), sostenendoci sempre a vicenda. Non bastano delle semplici parole a descrivere quanto importante sia stato il suo contributo nel raggiungimento di questo traguardo; semplicemente, pensando a tutto quello che abbiamo vissuto e a come è maturato il nostro rapporto, sono ora in grado di definire in maniera esaustiva che cosa significhi veramente la parola Amicizia. "Hold on to the dream..."

È arrivato il momento di ringraziare anche te, Katia, la mia ragazza: conosciuta tra i banchi dell'università (quale trama fu più scontata). A lei consegno il premio di Oscar come migliore attrice protagonista. Anche se, per il ruolo che ha ricoperto per me in questi anni, non merita di essere premiata soltanto con una statuetta d'oro. Quando prima ho citato la parola "sopportato" (oltre che ad Aldo) mi riferivo soprattutto a lei: le mie ansie, i miei "problemi" di voti, le mie paure, le mie indecisioni. Tutto. E non la potrò mai ringraziare abbastanza, se non con questa consapevolezza: una grande donna è condizione necessaria e sufficiente (siamo pur sempre ingegneri, il gergo matematico ci appartiene) per provare a costruire un "grande uomo".

Siamo arrivati alla fine: vorrei quindi ringraziare la mia famiglia, i veri artefici di tutto. I miei genitori, mio fratello, i miei nonni, i miei zii. Mi hanno dato la possibilità di intraprendere questo percorso con tanti sacrifici. Hanno sempre creduto in me. Sono stati sempre al mio fianco: a congratularsi dopo un esame andato bene, a consolarmi dopo una prova andata male. Questa Laurea non esisterebbe senza di loro.

Voglio concludere con un'altra citazione. È una frase in cui credo molto, una lezione di vita. Mi ha accompagnato durante tutto questo percorso, soprattutto nei momenti in cui le cose non andavano nel verso giusto: "C'è una forza motrice più forte del vapore, dell'elettricità e dell'energia atomica: la volontà" (Albert Einstein). Ed è proprio così. Sempre.