

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Sisteme lipozomale cu acțiune antiangiogenică utilizate în terapia cancerului

---

Doctorand **Bianca Nicoleta Sylvester**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Ioan Tomuță**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	19
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Cancerul și angiogeneza</b>	23
1.1. Cancerul-aspecte generale	23
1.2. Mecanisme patofiziologice implicate în cancer	24
1.3. Medicația antiangiogenică	27
<b>2. Sisteme farmaceutice nanoparticulate</b>	29
2.1. Considerații generale	29
2.2. Clasificare	29
2.3. Materiale	30
2.4. Metode de preparare ale lipozomilor	30
<b>3. Conceptul de Calitate prin Design</b>	35
3.1. Aspecte generale	35
3.2. PAT ca și strategie de control al calității	36
3.3. Spectroscopia NIR ca și instrument PAT	36
<b>4. Liofilizarea-strategie pentru creșterea stabilității lipozomilor</b>	37
4.1. Aspecte generale	37
4.2. Etapele liofilizării	37
4.3. Mecanisme ale lioprotecției	38
<b>5. Prednisolon fosfat sodic și pravastatina ca substanțe model</b>	39
5.1. Pravastatina	39
5.1.1. Denumire chimică	39
5.1.2. Formulă moleculară	39
5.1.3. Masă molară	39
5.1.4. Structură 2D	39
5.1.5. Proprietăți fizice	40
5.1.6. Proprietăți biofarmaceutice și farmacocinetice	40
5.1.7. Acțiune antiangiogenică și mecanisme de acțiune	40
5.2. Prednisolon fosfat sodic	41
5.2.1. Denumire chimică	41
5.2.2. Formulă moleculară	41
5.1.3. Masă molară	41
5.2.4. Structură 2D	41
5.2.5. Proprietăți fizice	42
5.2.6. Proprietăți biofarmaceutice și farmacocinetice	42
5.1.7. Acțiune antiangiogenică și mecanisme de acțiune	42
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	47
<b>2. Studiul 1-Optimizarea formulării unor lipozomi cu pravastatină utilizând un plan experimental</b>	49

2.1. Introducere	49
2.2. Ipoteza de lucru	51
2.3. Material și metodă	51
2.4. Rezultate și discuții	55
2.5. Concluzii	63
<b>3. Studiul 2-Dezvoltarea unor preparate lipozomale liofilizate cu pravastatină utilizând conceptul de Calitate prin Design</b>	<b>65</b>
3.1. Introducere	66
3.2. Ipoteza de lucru	67
3.3. Material și metodă	67
3.4. Rezultate și discuții	72
3.5. Concluzii	86
<b>4. Studiul 3-Optimizarea formulării unor lipozomi cu prednisolon utilizând conceptul de Calitate prin Design</b>	<b>89</b>
4.1. Introducere	89
4.2. Ipoteza de lucru	90
4.3. Material și metodă	90
4.4. Rezultate și discuții	96
4.5. Concluzii	110
<b>5. Studiul 4-Utilizarea spectroscopiei NIR pentru monitorizarea liofilizării unor lipozomi cu prednisolon</b>	<b>113</b>
4.1. Introducere	113
4.2. Ipoteza de lucru	114
4.3. Material și metodă	155
4.4. Rezultate și discuții	120
4.5. Concluzii	134
<b>6. Concluzii generale</b>	<b>135</b>
<b>7. Originalitatea și contribuția inovatoare a tezei</b>	<b>139</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>141</b>

**CUVINTE CHEIE:** nanoparticule, lipozomi, antiangiogenic, plan experimental, design de experimente, calitate prin design.

## **INTRODUCERE**

În ultimele decenii au fost făcute progrese considerabile în domeniul nanotehnologiei, prin dezvoltarea a diferite tipuri de sisteme nanoparticulate utilizate fie în scop diagnostic fie de tratament.

Lipozomii fac parte din clasa veziculelor sferice cu un diametru cuprins între 20 nm până la peste 200 nm. Aceste vezicule sunt formate din mai multe straturi care au rolul de a separa două medii: un mediu intravezicular (ce permite încapsularea substanțelor hidrofile) și un mediu extern (ce permite încapsularea substanțelor lipofile).

Efectul lipozomilor ca sisteme farmaceutice de eliberare a agenților terapeutici este intrinsec legat de capacitatea de a controla cu exactitate concentrația de substanță activă care atinge locul de acțiune într-o perioadă de timp dată.

Momentan lipozomii se folosesc în terapia cancerului, în terapia antimicrobiană, în terapia genetică, pentru tratarea anumitor boli de piele sau oculare, în chelatarea metalică, în terapia de substituție hormonală și enzimatică, în formularea vaccinurilor, etc.

Teza de doctorat a avut ca obiectiv general formularea, prepararea și caracterizarea unor sisteme farmaceutice nanoparticulate (lipozomi) încărcate cu două substanțe cu proprietăți antiangiogenice—prednisolon fosfat sodic și pravastatina sodică. În plus, s-a urmărit creșterea stabilității sistemelor lipozomale prin liofilizare și optimizarea proceselor tehnologice de formulare și liofilizare prin aplicarea conceptului de calitate prin design.

## **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**

În partea generală a tezei sunt prezentate pe parcursul a 5 capitole, într-o manieră sintetică, aspectele cele mai importante și de actualitate legate de cancerul colo-rectal, posibilele mecanisme de declanșare și avantajele sistemelor lipozomale de transport la țintă comparativ cu chemoterapia tradițională.

În primul capitol, intitulat “Cancerul și angiogeneza” sunt prezentate aspecte generale privind cancerul colo-rectal, incidența acestuia și posibilele mecanisme implicate în declanșarea și progresia lui înspre metastaze. În același capitol se vorbește și despre angiogeneza, implicațiile acestui proces în promovarea și întreținerea metastazelor și posibilele mecanisme prin care terapia antiangiogenică își manifestă efectul antiproliferativ. Angiogeneza este esențială pentru dezvoltarea tumorală și este influențată de factorii de creștere, constituind ținta noilor terapii anticancerigene. În cel de-al doilea capitol sunt discutate caracteristicile lipozomilor ca și sisteme farmaceutice moderne de transport la țintă a substanțelor medicamentoase. Sunt menționate atât avantajele cât și dezavantajele lipozomilor, și metodele de preparare ale acestor sisteme farmaceutice. Cel de-al treilea capitol aduce în discuție conceptul de Calitate prin Design (Quality by Design—QbD), avantajele implementării lui în formularea medicamentelor cât și conceptul de PAT (Process Analytical Technology), ca și strategie de control. Cel de-al patrulea capitol menționează aspecte legate de liofilizare, ca și metodă de a crește stabilitatea lipozomilor în timp și de a îmbunătăți proprietățile lor fizico-chimice. Unul dintre cele mai importante dezavantaje ale sistemelor lipozomale este instabilitatea în soluție apoasă (se pot păstra pe o perioadă de maximum 2 săptămâni, la o temperatură de 4 °C). Prin intermediul liofilizării, se poate depăși acest inconvenient, astfel lipozomii pot fi păstrați la temperatura camerei pe o perioadă de aproximativ 1-2 ani. Totuși, procesul de liofilizare în sine, poate dăuna stabilității lipozomilor, dacă parametrii de proces nu sunt optimizați și controlați suficient. De aceea este importantă această abordare, prin prisma conceptului de Calitate prin Design, întrucât permite optimizarea acestor parametri. Ultimul capitol, aduce în discuție și motivează alegerea celor două substanțe, prednisolonul (fosfat disodic) și pravastatina (sare sodică). Sunt precizate mecanismele prin care cele două substanțe își manifestă acțiunea

antiangiogenică, respectiv prin inhibarea unor factori de adeziune endotelială, și prin reducerea producției de factori pro-inflamatori și pro-angiogenici.

## **CONTRIBUȚIILE PERSONALE**

Partea a doua a tezei, intitulată „Contribuții personale”, începe cu prezentarea ipotezei generale și a obiectivelor care au stat la baza studiilor experimentale, și se continuă cu 4 studii de cercetare experimentală. Această parte a lucrării este sistematizată în șapte capitole, corespunzătoare sistemelor lipozomale dezvoltate, liofilizării lor și evaluării lor in vitro, concluziilor generale și contribuțiilor inovative ale tezei. Fiecare capitol al părții experimentale este prezentat detaliat, începând cu descrierea clară a ipotezei de lucru și obiectivelor specifice fiecărui studiu și încheindu-se cu formularea unor concluzii pe baza rezultatelor experimentale obținute.

### **Studiul 1**

Primul capitol de „Contribuții personale” prezintă un studiu în care s-a urmărit prepararea de lipozomi cu durată lungă de circulație cu pravastatină prin metoda hidratării filmului lipidic. Pravastatina este o statină hidrofila, cu efecte proapoptotice și antiangiogenice. Cu toate acestea, efectele benefice ale statinelor asupra creșterii tumorale sunt obținute la doze mari, administrarea sistemică a acestor doze fiind asociată cu toxicitate severă. Astfel, utilizarea unui sistem lipozomal pentru transportul și eliberarea la țintă reprezintă o abordare interesantă în scopul intensificării efectelor terapeutice și minimizării în același timp a dozele necesare. Acest studiu a urmărit optimizarea formulării pravastatinei în lipozomi cu durată lungă de circulație (LCL-PRAV), utilizând un design experimental de tip D-optimal. A fost studiată influența a șapte factori de formulare, respectiv de proces: concentrația molară a fosfolipidelor (mM), raportul molar fosfolipide:colesterol, concentrația molară a soluției de PRAV (mM), temperatura de hidratare (°C), temperatura la extrudere (°C), viteza de rotație la formarea filmului lipidic (rot/min) și viteza de rotație la hidratarea filmului lipidic (rot/min), asupra concentrației lipozomale de PRAV, eficienței de încapsulare (EE %), mărimii lipozomilor și a indicelui de polidispersie (PDI). Caracteristicile dorite ale LCL-PRAV au fost: eficiență relativ ridicată a încapsulării PRAV (> 45%), variație scăzută și previzibilă în eficiența încapsulării, mărime medie a lipozomilor între 180 și 200 nm și valoare PDI scăzută (<0,100). Formularea optimizată a lipozomilor a fost caracterizată printr-o concentrație de  $6128 \pm 237 \mu\text{g/ml}$ , o eficiență de încapsulare de  $47 \pm 13\%$ , o mărime de  $192.3 \pm 5 \text{ nm}$  și o valoare a PDI de  $0,098 \pm 0.006$ . Per ansamblu, rezultatele obținute au arătat că PRAV poate fi încorporată cu succes în lipozomi cu durată lungă de circulație.

### **Studiul 2**

Al doilea capitol descrie liofilizarea lipozomilor cu durată lungă de circulație încărcăți cu pravastatină (LCL-PRAV) a căror formulare a fost optimizată în studiului anterior. Este abordat un concept modern—Calitate prin Design—în scopul definirii profilului de calitate dorit al produsului finit, al identificării atributelor critice de calitate (CQAs), al înțelegerii

impactului factorilor de formulare și de proces asupra acestor CQAs, și în final, al stabilirii unui spațiu de design, în care calitatea produsului finit este asigurată. În acest studiu, profilul de calitate al produsului finit este reprezentat de lipozomi liofilizați cu durată lungă de circulație, pentru administrare sistemică, care se acumulează la nivelul tumorilor și care au un profil de stabilitate superior lipozomilor ne-liofilizați.

Procentul de substanță încapsulată rămasă după liofilizare, mărimea medie a particulelor după liofilizare și conținutul de umiditate al liofilizatului sunt principalele proprietăți care afectează potențialul terapeutic al lipozomilor, fiind deci considerate atributele critice de calitate. Potențialul Zeta, temperatura de tranziție sticloasă ( $T_g$ ), timpul de uscare primară și aspectul macroscopic al liofilizatului au fost luate de asemenea în considerare.

În urma efectuării unei analize de risc, au fost stabilite caracteristicile critice de formulare și de proces, care pot avea impact asupra atributelor critice de calitate și au fost incluse într-un design experimental de tip D-optimal. În urma abordării acestui concept, s-a optimizat procesul de liofilizare al lipozomilor, atât din punct de vedere al lioprotectorului folosit cât și din punct de vedere al parametrilor tehnologici.

### **Studiul 3**

Cel de-al treilea capitol al părții de contribuții personale a urmărit optimizarea formulării prednisolonului în lipozomi cu durată lungă de circulație (LCL-PLP), prin aplicarea conceptului de Calitate prin Design, menționat anterior. Au fost urmați aceiași pași (descriși mai sus) în vederea identificării spațiului de design pentru formularea lipozomilor la scară de laborator. Ca și atribute critice de calitate (CQAs) au fost identificate concentrația prednisolonului în lipozomi, eficiența de încapsulare a acestuia în lipozomi și mărimea medie a particulelor. Influența mai multor factori de formulare și proces asupra acestor CQAs a fost studiată prin intermediul unui design experimental de tip D-optimal cu 21 de formulări. Spațiul de design a fost construit luând în considerare parametrii cheie care, în urma analizei planului experimental, au avut impactul cel mai mare asupra calității produsului finit și a fost generat prin aplicarea unor serii de limitări și valori țintă. Odată stabilită formularea optimă, a fost testat efectul antiproliferativ și antiangiogenic al acesteia asupra unor celule de cancer de colon (C26), în mono-cultură cât și în co-cultură cu macrofage murine.

### **Studiul 4**

Al patrulea capitol prezintă liofilizarea lipozomilor cu durată lungă de circulație încărcăți cu prednisolon (LCL-PLP) a căror formulare a fost optimizată în studiul trei. A fost investigat în special impactul tipului de lioprotector (trehaloză, sucroză și sucroză plus manitol) și a concentrației acestuia asupra atributelor critice de calitate ale produsului finit: procentul de substanță încapsulată rămasă după liofilizare, mărimea lipozomilor după liofilizare și distribuția lor granulometrică. Aceste rezultate au fost coroborate de analiza calorimetrie de scanare diferențiată (DSC) pentru determinarea temperaturii de tranziție sticloasă  $T_g$ , analiza microscopică (SEM) a liofilizatului pentru evidențierea unui posibil colaps, și studii de spectroscopie în domeniul infraroșu (IR) pentru evidențierea la nivel molecular a interacțiunilor dintre fosfolipide și lioprotectorul folosit. Spectroscopia în domeniul infraroșu

apropiat (NIR) a fost de asemenea utilizată în scopul monitorizării in-line, real-time, a întregului proces de liofilizare. S-a urmărit posibilitatea de a detecta modificări în structura lanțurilor policarbonate din învelișul lipozomilor, a căror integritate poate fi compromisă în timpul liofilizării. Spectroscopia NIR a permis evidențierea acestor modificări din structura lipozomilor, modificări care pot duce la agregarea/fuziunea particulelor după liofilizare și cedarea substanței medicamentoase încorporate. În plus, folosind această tehnică inovativă, a fost posibilă determinarea timpilor necesari pentru fiecare etapă a procesului de liofilizare, optimizând în acest fel durata procesului și implicit și costurile.

## **CONCLUZII GENERALE**

Obiectivul general al tezei de doctorat a constat în formularea, prepararea și caracterizarea a două sisteme farmaceutice nanometrice de tip lipozomi. În aceste sisteme s-au încorporat prednisolonul (fosfat sodic) și pravastatina (sare sodică) ca modele de substanțe cu proprietăți antiangiogenice. Totodată, s-a evaluat capacitatea antiangiogenică, antiinflamatoare și efectul antiproliferativ al acestor sisteme nanoparticulate, cu scopul de a evidenția posibilitatea lor aplicative în tratamentul cancerului de colon.

Pentru dezvoltarea fiecăruia dintre aceste sisteme nanoparticulate a fost folosită o abordare inovativă (Calitate prin Design) ce a permis studierea influenței factorilor de formulare asupra caracteristicilor sistemelor nanoparticulate, iar în final optimizarea procesului prin determinarea celei mai potrivite combinații a factorilor de formulare pentru un anumit răspuns.

În plus, prin liofilizarea lipozomilor, s-au obținut preparate lipozomale cu stabilitate crescută și proprietăți fizico-chimice net superioare lipozomilor ne-liofilizați.

## **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI**

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei constau și în dezvoltarea celor două sisteme lipozomale utilizând conceptul de Calitate prin Design, obținând în felul acesta rezultate superioare față de cele raportate de alți cercetători din domeniu, în ceea ce privește eficiența de încorporare a substanțelor active și uniformitatea mărimii particulelor.

De asemenea, elementul de noutate stă și la baza liofilizării acestor lipozomi și a monitorizării procesului tehnologic prin intermediul spectroscopiei NIR.

---

PhD THESIS SUMMARY

# Liposomal systems with antiangiogenic properties for cancer treatment

---

PhD Student **Bianca Nicoleta Sylvester**

PhD Supervisor Prof.dr. **Ioan Tomuța**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**IULIU HAȚIEGANU**  
CLUJ-NAPOCA



## TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	19
<b>ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Cancer and angiogenesis</b>	23
1.1. Cancer-general aspects	23
1.2. Physiopathological mechanisms involved in colorectal cancer	24
1.3. Targeting angiogenesis as treatment strategy	27
<b>2. Liposomal systems</b>	29
2.1. Liposomes—general aspects	29
2.2. Classification of liposomal systems	29
2.3. Materials	30
2.4. Methods of liposome preparation	30
2.4.1. Supercritical anti-solvent (SAS) method	31
2.4.2. Supercritical reverse phase evaporation (SPER) method	31
2.4.3. Dual asymmetric centrifugation (DAC)	31
2.4.4. Liposome preparation methods based on membrane contactor technology	32
2.4.5. Cross-flow filtration detergent depletion method	32
2.5. Applications of liposomes in medicine	32
<b>3. The Quality by Design concept(QbD)</b>	35
3.1. A Quality by Design(QbD) approach—general aspects	35
3.2. Process Analytical Technology (PAT) as control strategy	36
3.3. Near-infrared spectroscopy (NIRs) as PAT tool	36
<b>4. Freeze-drying as a strategy to increase liposomal systems' stability</b>	37
4.1. Freeze-drying—general aspects	37
4.2. Freeze-drying steps	37
4.3. Lyoprotection mechanisms	38
<b>5. Prednisolone sodium phosphate and pravastatin as model substances for this study</b>	39
5.1. Pravastatin	39
5.1.1. Chemical name	39
5.1.2. Molecular formula	39
5.1.3. Molecular weight	39
5.1.4. 2D structure	39

5.1.5. Physical properties	40
5.1.6. Biopharmaceutical and pharmacokinetic properties	40
5.1.7. Antiangiogenic mechanism	40
5.2. Prednisolone sodium phosphate	41
5.2.1. Chemical name	41
5.2.2. Molecular formula	41
5.2.3. Molecular weight	41
5.2.4. 2D structure	41
5.2.5. Physical properties	42
5.2.6. Biopharmaceutical and pharmacokinetic properties	42
5.2.7. Antiangiogenic mechanism	42

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

<b>1. General objectives/Work hypothesis</b>	47
<b>2. Study 1—Optimization of pravastatin-loaded long-circulating liposomes using a design of experiments</b>	49
2.1. Introduction	49
2.2. Hypothesis	51
2.3. Materials and methods	51
2.4. Results and discussion	55
2.5. Conclusion	63
<b>3. Study 2—Development of stable freeze-dried pravastatin-loaded long-circulating liposomes. A Quality by Design approach</b>	65
3.1. Introduction	65
3.2. Hypothesis	66
3.3. Materials	67
3.4. Methods	67
3.5. Results and discussion	72
3.6. Conclusion	86
<b>4. Study 3—Optimization of prednisolone-loaded long-circulating liposomes via application of Quality by Design approach.</b>	89
4.1. Introduction	89
4.2. Hypothesis	90
4.3. Materials	90
4.4. Methods	91
4.5. Results and discussion	96
4.6. Conclusion	110

<b>5. Study 4—An NIR spectroscopy tool for in-line monitoring of the freeze-drying process of optimized prednisolone-loaded long-circulating liposomes</b>	113
5.1. Introduction	113
5.2. Hypothesis	114
5.3. Materials	115
5.4. Methods	115
5.5. Results and discussion	120
5.6. Conclusion	134
<b>6. General conclusions</b>	135
<b>7. Originality and innovation of the thesis</b>	139
<b>REFERENCES</b>	141

**KEYWORDS:** nanoparticles, liposomes, antiangiogenic, design of experiments, design space, Quality by Design.

## INTRODUCTION

Liposomes are important drug carrier systems due to their good biocompatibility and biodegradability, and their advantages in clinical application have been quickly recognized in the past decades. Formulating drugs into liposomes offers the possibility of modifying fundamental properties of the drug, such as solubility, circulation time and uptake by the tumor. The liposomes act as vectors for the incorporated drug, offering protection against various biological factors, while allowing specific targeting of a certain organ, enhancing in this way the bioavailability of the active substance. Liposomes can be delivered to specific tumor sites by size-dependent “passive” targeting due to their moderate particle size, usually between 20-200 nm.

Based on the below mentioned advantages over conventional dosage forms, long-circulating liposomes enhance the therapeutic index of anticancer drugs by increasing the drug concentration in tumor cells through passive targeting. Except passive targeting, other available approaches used for tumor targeting using liposomes involve active targeting and triggered drug release. While more advanced targeting strategies proposed for cancer treatment are the development of multifunctional liposomes, having combined two or three of these targeting mechanisms, in the following chapters our main focus was on passive targeting.

The objective of the present thesis was the preparation and freeze-drying of liposomal systems incorporating pravastatin and prednisolone sodium phosphate, for the passive

targeting of colorectal cancer. Moreover, we aimed to increase their shelf-life and stability through freeze-drying. A Quality by Design (QbD) approach was employed in order to optimize both the preparation and freeze-drying processes.

## **ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE**

The general part of the thesis is structured into 5 main chapters, which present in a synthetic manner, the most important aspects related to angiogenesis and colorectal cancer, liposomal systems as drug carriers and freeze-drying as an attractive strategy to enhance liposomal stability.

The first chapter, entitled “Cancer and angiogenesis” presents general aspects related to colorectal cancer (CRC), its incidence and possible physiopathological mechanisms involved in its initiation and progression towards metastases. The same chapter, treats angiogenesis and its implications in metastasis promotion and the mechanisms of antiangiogenic therapy. Angiogenesis is essential for tumor progression and is highly influenced by growth factors, being the target of novel anticancer treatment strategies. In the second chapter, the characteristics of liposomes as modern pharmaceutical target delivery systems are explained, along to their advantages and disadvantages and lastly, preparation methods. The third chapter, describes the QbD concept, its advantages in pharmaceutical development as well as the Process Analytical Technology—PAT paradigm as control strategy. The fourth chapter mentions aspects related to freeze-drying, as a way to increase liposome stability and improve their physico-chemical properties. One of the most important disadvantages of liposomal formulations is their instability in aqueous solutions (storage period is limited to 2 weeks only, at 4 °C). This inconvenience can be overcome through freeze-drying, hence liposomes can be stored at room temperature for 1-2 years. Even though freeze-drying represents an attractive way to increase the shelf-life of liposomes by preserving them in a more stable dry state, the process itself can generate stress during the freezing and drying steps, which can be harmful for liposome integrity. Therefore, the optimization of the lyoprotectant concentration and a careful consideration of the processing parameters, such as freezing conditions and primary and secondary drying protocol, are critical in order to guarantee the quality of the final product. The last chapter motivates the choice of the prednisolone sodium phosphate and pravastatin sodium salt as model substances for this study and describes their antiangiogenic mechanism through inhibition of endothelial cell adhesion and key enzymes involved in the formation of mediators of inflammation.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

The personal contribution part of the PhD thesis includes on the one hand the general work hypothesis of the experimental studies, and on the other hand the experimental research itself. This part of the thesis is organized into seven chapters corresponding to the developed liposomal systems, their freeze-drying process and their *in vitro* evaluation, general conclusions and innovative contributions of the thesis. Each chapter of the experimental part is presented in detail, starting with the clear description of the work hypothesis and the

specific objectives of each study, and ending with conclusions drawn from the experimental results.

### **Study 1**

Pravastatin (PRAV) is a hydrophilic statin which has been proved to have antiangiogenic and proapoptotic effects. However, the beneficial effects of statins on tumor growth are obtained at high doses, the systemic administration of those doses being associated with severe toxicity. Thus, site-specific delivery with liposomal systems may be an interesting approach to intensifying therapeutic effects, while reducing the overall doses required. The objective of this study was to optimize the formulation of PRAV-loaded long circulating liposomes (LCL-PRAV) by using a D-optimal experimental design. The influence of seven formulation and process factors i.e. phospholipids molar concentration (mM), the molar ratio of phospholipids to cholesterol, PRAV molar concentration (mM), hydration temperature (°C), extrusion temperature (°C), rotation speed at the formation of the lipid film (rot/min) and rotation speed at the hydration of the film (rot/min) was studied on PRAV liposomal concentration, encapsulation efficiency (EE %), liposomal size and Polydispersity Index (PDI). The desired characteristics of LCL-PRAV are relatively high drug encapsulation efficiency (> 45%), low and predictable variation in the drug encapsulation efficiency, particle size range of 180-200 nm and low PDI value (< 0.100). The optimized formulation had liposomal PRAV concentration of  $6128 \pm 237 \mu\text{g/ml}$ , an encapsulation efficiency of  $47 \pm 13\%$ ,  $192.3 \pm 5 \text{ nm}$  size and a PDI of  $0,098 \pm 0.006$ . The overall results showed that PRAV can be successfully incorporated into long-circulating liposomes.

### **Study 2**

This study highlights the advantages of using a Quality by Design (QbD) approach in order to gain a more comprehensive understanding of the freeze-drying process of pravastatin-loaded long-circulating liposomes (LCL-PRAV). Within the QbD paradigm, the present study aimed to establish the design space for the optimization of freeze-dried LCL-PRAV by means of Design of Experiment (DOE) and response surface methodology. The encapsulated solute retention (ESR), the average particle size and Zeta potential after freeze-drying, the residual moisture content, the macroscopic cake appearance, the glass transition temperature ( $T_g$ ) of the freeze-dried cake and the primary drying time were defined as critical quality attributes (CQAs) for the freeze-dried final product. Further on, the influence of lyoprotectant type, freezing rate, shelf temperature during primary drying and the presence of an annealing step on the CQAs was investigated through a 21-run D-optimal experimental design. Three dimensional response surfaces were generated to complete the statistical analysis and for a better understanding of the influence of variables and their interactions on the responses. The developed model was then used to build the design space for the freeze-dried liposomes, within which the product quality was assured and the process variability was minimized.

### **Study 3**

Quality by design principles (QbD) were used to assist the formulation of prednisolone-loaded long-circulating liposomes (LCL-PLP) in order to gain a more comprehensive

understanding of the preparation process. This approach enables us to improve the final product quality in terms of liposomal drug concentration, encapsulation efficiency and size and to minimize preparation variability. A 19-run D-optimal experimental design was used to study the impact of the highest risk factors on PLP liposomal concentration (Y1-  $\mu\text{g/ml}$ ), encapsulation efficiency (Y2-%) and size (Y3-nm). Four out of six variables were identified as critical parameters affecting the studied responses. PLP molar concentration and the molar ratio of DPPC to MPEG-2000-DSPE had a positive impact on both Y1 and Y2, while the rotation speed at the formation of the lipid film had a negative impact. Y3 was highly influenced by prednisolone molar concentration and extrusion temperature. The accuracy and robustness of the model was further on confirmed. The developed model was used to optimize the formulation of LCL-PLP for efficient accumulation of the drug to tumor tissue. The cytotoxicity of the optimized LCL-PLP on C26 murine colon carcinoma cells was assessed. LCL-PLP exerted significant anti-angiogenic and anti-inflammatory effects on M2 macrophages, affecting indirectly the C26 colon carcinoma cell proliferation and development.

#### **Study 4**

The effect of lyoprotectant type and concentration on the stability of freeze-dried prednisolone-loaded long-circulating liposomes (LCL-PLP) was investigated. Trehalose at a 5:1 carbohydrate to lipid molar ratio proved to be superior in maintaining the structural integrity and the permeability properties of the liposome bilayers, assuring the desired characteristics of the final product: compact cake with a porous structure and easy to reconstitute, a similar size to the liposomes prior to freeze-drying, a high encapsulated solute retention (ESR) and a low residual moisture content. Further on, the study demonstrated the possibility of NIR spectroscopy to provide valuable insights in detecting critical changes in acyl chain packing of the liposome bilayer. Principal component analysis allows to predict whether any harm has occurred to the liposome integrity during the process. Moreover, NIR spectroscopy enabled us to determine the endpoints of primary and secondary drying without disturbing the normal freeze-drying procedure, which allowed us to gain a better understanding of the process and to improve process efficiency by optimizing the primary and secondary drying time.

#### **GENERAL CONCLUSIONS**

The present thesis treats aspects related to preparation, formulation optimization and characterization of nanoparticulate systems, liposomes in particular. Two substances with anti-angiogenic properties—prednisolone sodium phosphate and pravastatin—were successfully incorporated into long-circulating liposomes. Their antiangiogenic, anti-inflammatory and antiproliferative effects were evaluated with the purpose of evidencing their possible application in colorectal cancer. For the development of highly reproducible liposomal systems, the QbD approach was successfully applied, allowing us to detect both the main effects and the interaction between factors, providing a better understanding of the process. Moreover, we successfully overcame the disadvantages of liposomal formulations

such as the stability problems (aggregation during storage, fusion of the membranes, loss of encapsulated material, hydrolysis and oxidation of the lipids), by applying freeze-drying.

## **THE ORIGINALITY AND THE INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

The originality of the thesis is reflected by the experimental results obtained by applying an innovative concept—QbD—to the preparation and freeze-drying process of long-circulating liposomes. Unlike routine approach, the present studies were conducted based on a deep understanding of the quality target product profile (QTPP), establishment of critical quality attributes (CQAs) of the final product and risk assessment for variables that affect the efficiency of the developed process—allowing us to obtain superior results compared to the ones reported in literature so far, concerning encapsulation efficiency and liposomal size distribution.

Freeze-drying as a way to increase liposome stability and the use of NIR spectroscopy as a way to monitor the lyophilization process represents an advantage for process optimization. Taking into account the tremendous economic and quality benefits derived from implementing NIR spectroscopic monitoring, along with its speed and ease of use, its implementation in the freeze-drying process of liposomes can be of great use for manufacturers.